

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



**EFFECTO DE DISTINTAS ESTRATEGIAS
DE ALIMENTACIÓN EN EL CONTENIDO DE
GRASA INTRAMUSCULAR, LA
ESTRUCTURA DE LOS
TRIGLICÉRIDOS Y LAS PROPIEDADES
REOLÓGICAS DE LA GRASA EN EL
CERDO**

JOSE FRANCISCO SEGURA PLAZA

MADRID, 2015

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFECTO DE DISTINTAS ESTRATEGIAS
DE ALIMENTACIÓN EN EL CONTENIDO DE
GRASA INTRAMUSCULAR, LA
ESTRUCTURA DE LOS
TRIGLICÉRIDOS Y LAS PROPIEDADES
REOLÓGICAS DE LA GRASA EN EL
CERDO**

**Tesis Doctoral presentada por
JOSE FRANCISCO SEGURA PLAZA**

**Realizada bajo la dirección de los doctores
CLEMENTE JOSÉ LÓPEZ BOTE
M^a ISABEL CAMBERO RODRÍGUEZ**

MADRID, 2015

Los doctores Clemente J. López Bote catedrático del departamento de Producción y Nutrición Animal y M^a Isabel Cambero Rodríguez profesora titular del departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “EFECTO DE DISTINTAS ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN EN EL CONTENIDO DE GRASA INTRAMUSCULAR, LA ESTRUCTURA DE LOS TRIGLICÉRIDOS Y LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LA GRASA EN EL CERDO” presentada por José Francisco Segura Plaza para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección, cumple las condiciones exigidas para obtener dicho título y autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así consten, firma en Madrid, a 12 de diciembre de 2014.

Clemente J. López Bote.

M^a Isabel Cambero Rodríguez.

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Producción Animal y el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid financiado mediante los siguientes proyectos de investigación:

* MEDGAN (S2013/ABI-2913), Comunidad de Madrid y CEI Campus Moncloa UCM-UPM.

* AGL 2010-19158 y AGL 2013-48121 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de esta Tesis Doctoral debo agradecer en mi primer lugar a los directores de esta tesis, Dr. Clemente J. López Bote y a la Dra. M^a Isabel Cambero Rodríguez, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en el Departamento de Producción Animal y en el de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Madrid.

También me gustaría extender mi agradecimiento a mi madre y a Mariano por apoyarme en todo momento y por su continuo apoyo para que yo haya podido llegar hasta aquí.

A mi compañera de laboratorio y doctoranda Miriam por los momentos compartidos, el apoyo moral recibido y por los cafés y las comidas en los que arreglamos el mundo que han hecho todas las dificultades más llevaderas.

A los Doctores Ana Rey, Beatriz Isabel, Álvaro Olivares, David Menoyo, Noemí Ruíz, Rosa Escudero, Lola Romero y otros muchos que gracias a su ayuda y consejos he podido desarrollar esta tesis. Gracias a los departamentos de Producción Animal y Nutrición y Bromatología por la amabilidad con la que me han acogido durante esta etapa.

A Margarita Parra y Salvador Gil, que me iniciaron en la actividad investigadora y despertaron mi pasión por ello.

A los técnicos Isabel Martín y Raúl Salazar, gracias por vuestra ayuda en el laboratorio y a Eugenio Hernández, Luís Calvo y Antonio Palomo porque sin su ayuda logística esta tesis no hubiera podido llevarse a cabo.

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN.	25
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	31
2.1 Lípidos. Características generales.	33
2.1.1. Definición. Generalidades.	33
2.1.2. Clasificación de lípidos.	33
2.2 Digestión y absorción de lípidos.	50
2.2.1. Introducción.	50
2.2.2. Digestión de grasas.	50
2.2.3. Absorción de grasas.	52
2.2.4. Algunos factores que afectan a la digestibilidad de la grasa.	53
2.3 Metabolismo de lípidos.	54
2.3.1. Introducción.	54
2.3.2. Lipogénesis.	54
2.3.3. Transporte.	60
2.3.4. Lipolisis.	62
2.4 Acumulación de grasa en tejidos del cerdo.	68
2.4.1. Grasa intramuscular.	68
2.4.2. La grasa subcutánea.	78
2.4.3. Papel de la grasa en la calidad sensorial y tecnológica de la carne y productos elaborados.	79
2.5 Glicerol en alimentación animal.	82
2.5.1. Generalidades.	82
2.5.2. Metabolismo del glicerol.	83

2.5.3. Inclusión de glicerol en la dieta del cerdo.	83
2.6 Análisis reológico de la grasa.	84
2.6.1. Generalidades.	84
2.6.2. Análisis del perfil de textura (TPA).	85
3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.	89
4. RESULTADOS.	95
4.1 CAPITULO 1: A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis.	97
4.2 CAPÍTULO 2: Alternative method for intramuscular fat analysis using common laboratory equipment.	105
4.3 CAPÍTULO 3: Comparison of analytical techniques for the determination of the positional distribution of fatty acids in triacylglycerols – relationship with pig fat melting point and hardness.	111
4.4 CAPÍTULO 4: Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat.	121
4.5 CAPÍTULO 5: Effect of sex, dietary glycerol or dietary fat during late fattening on fatty acid composition and positional distribution of fatty acids within the triglyceride in pigs.	129
4.6 CAPÍTULO 6: Effect of sex, glycerol or dietary fat on fatty acid composition, their positional distribution within the triglyceride and selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat.	145
4.7 CAPÍTULO 7: Extensive feeding with acorn and grass alters fatty acid composition at the sn-2 position of the triglyceride in pigs.	159
5 DISCUSIÓN GENERAL.	171
5.1 Propuesta y optimización de un nuevo método de extracción de grasa intramuscular.	173
5.2 Comparativa de técnicas analíticas para la determinación de la distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido.	180
5.3 Distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido y algunas propiedades físicas de la grasa, como el punto de fusión y el perfil de textura: Relación y modificación.	183
5.3.1 Estudio de la distribución posicional de los ácidos grasos.	184

5.3.2 Estrategias nutricionales para modificar la distribución posicional de ácidos grasos.	189
6 CONCLUSIONES.	197
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	201
8 RESUMEN AMPLIADO / EXTENDED ABSTRACT.	229
8.1 Resumen ampliado.	231
8.1.1 Introducción.	231
8.1.2 Objetivos.	235
8.1.3 Material y Metodología.	236
8.1.4 Resultados.	237
8.1.5 Discusión.	239
8.1.6 Conclusiones.	242
8.2 Extended abstract.	245
8.2.1 Introduction.	245
8.2.2 Objectives.	248
8.2.3 Material and Methods.	249
8.2.4 Results.	250
8.2.5 Discussion.	252
8.2.6 Conclusions.	255
8.2.7 References.	256

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras de la revisión bibliográfica:

Figura 2.1. Estructura semidesarrollada del ácido α -linolénico.	35
Figura 2.2. Estructura en zig-zag de ácidos grasos. Asociación paralela.	36
Figura 2.3. Policétido: Aflatoxina B1.	40
Figura 2.4. Saponificación de triglicérido.	41
Figura 2.5. Esquema de los productos obtenidos en una lipólisis enzimática de un triacilglicerol.	46
Figura 0.1. Glicerofosfolípido: 1-hexadecanoil-2-(9cis-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfocolina.	47
Figura 0.2. Esfingolípido: N-(tetradecanoil)-4-esfingoenina.	48
Figura 0.3. Esteroide: colesterol.	48
Figura 2.9. Prenoles: Farnesol y Vitamina K1.	49
Figura 2.10. Sacarolípido: UDP-3-O-(3R-hidroxitetradecanoil)- α D-N-acetilglucosamina.	50
Figura 2.11. Reacción de la acetil-CoA carboxilasa	55
Figura 2.12. Reacción de la Ácido graso sintetasa y elongación en 2 átomos de carbono de una cadena de ácido graso.	57
Figura 2.13. Transferencia de grupos acetilo entre la mitocondria y el citosol.	58
Figura 2.14. Conversión de C18:0, C18:2n-6 y C18:3n-3 en sus metabolitos de cadena larga: a) vía metabólica convencional, b) vía metabólica propuesta por Sprecher et al. (1995).	59
Figura 2.15. Pasos implicados en la β -oxidación.	63
Figura 2.16. Pasos en la oxidación de ácidos grasos y formación de ATP.	64
Figura 2.17. Ruta de formación y utilización de cuerpos cetónicos.	67
Figura 2.18. Contenido en grasa intramuscular en cerdos en cebo, en función del tipo de grasa incluido en la dieta (grasa animal, aceite de palma y aceite de colza) y de su porcentaje de inclusión en el pienso (0, 4, 8, 13%).	73
Figura 2.19. Transesterificación de un triglicérido mediante metanol. Obtención de glicerol y ésteres metílicos de ácidos grasos.	83

Figura 2.20. Gráfica característica del análisis de perfil de textura (TPA) y principales parámetros obtenidos. 87

Figuras del apartado de resultados:

Capítulo 1:

Figure 1. Regression equations and coefficient of determination (R^2) between values of intramuscular fat (% IMF) obtained from different methodologies: *Folch et al. (1957)* (FOL), *Sukhija & Palmquist (1988)* (OS) and New Method proposed (NW). 101

Capítulo 2:

Figure 1. Regression equations and coefficient of determination (R^2) between values of intramuscular fat (% IMF) of turkey meat and pork, obtained by Ball-mill homogenization and extraction methods (Ball-mill/Ball-mill) as proposed Segura and López-Bote (2014) or by grinder homogenization followed by vortex extraction (Grinder/Vortex). 110

Capítulo 3:

Figure 1. Schematic representation of TAGs enzymatic lipolysis and its reaction products. 114

Capítulo 4:

Figure 1. Response surface plot showing the relationship between fatty acid concentration (g/100g) in Sn-2 or Sn-1,3 position of triglyceride and slip point ($^{\circ}\text{C}$) for subcutaneous fat of dry-cured ham. 127

Capítulo 7:

Figure 1. Interaction Treatment \times Position of main fatty acid positional distribution. 166

Figuras de la discusión general:

Figura 5.1. Coeficiente de variación de la concentración de grasa intramuscular de cuatro muestras de lomo de cerdo analizadas por sextuplicado por 5 procedimientos analíticos: *Folch et al., (1957)* con muestra fresca (FOL) o liofilizada (L-FOL), *Sukhija y Palmquist (1988)* (OS), *Marmer y Maxwell (1981)* (MM) y el nuevo método propuesto (NW). 177

Figura 5.2. Coeficiente de variación de la concentración de grasa intramuscular de tres muestras de pechuga de pavo y tres muestras de lomo de cerdo analizadas por triplicado por 6 procedimientos

analíticos Mixer-Mill/Mixer-Mill, Mixer-Mill/Vortex, Molinillo/Mixer-Mill, Molinillo/Vórtex, Mortero/Mixer-mill y Mortero/Vórtex. 179

Figura 5.3. Modelos de superficie que muestran la relación entre la distribución posicional de C18:0, C18:1 y/o C18:2n-6 en el triglicérido y la dureza (N) de grasa subcutánea de jamón curado. 188

Figura 5.4. Análisis global de los distintos perfiles de distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de triglicéridos (promedio) obtenidos en los distintos trabajos experimentales realizados. 193

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas de la revisión bibliográfica:

Tabla 2.1. Principales ácidos grasos presentes en el cerdo.	35
Tabla 2.2. Distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido (TAG) en algunas grasas y aceites de origen animal y vegetal.	44
Tabla 2.3. Perfil de ácidos grasos en la grasa subcutánea e intramuscular en función del tipo de grasa incluida en la dieta, según distintos autores.	76

Tablas del apartado de resultados:

Capítulo 1:

Table 1. Quantification of intramuscular fat (mean±s.d) concentration (g fat/100g meat) from three analytical methods: Folch et al. (1957) (FOL). Sukhija & Palmquist (1988) (OS) and New Method proposed (NW) (n=32). (Experiment 1)	101
Table 2. Quantification of intramuscular fat (mean±s.d) concentration (g fat/100g meat) in four pork samples containing different fat levels (low, mid-low, mid-high or high). Each sample was analyzed six times by five analytical procedures: Folch et al. (1957) from fresh sample (FOL) or lyophilised ones (L-FOL), Sukhija and Palmquist (1988) (OS), Marmer and Maxwell (1981) (MM) and New Method proposed (NW)1. (Experiment 2)	102
Table 3. Fatty acid composition of intramuscular fat (g fatty acid/100 g total fatty acids) analyzed by five analytical procedures: Folch et al. (1957) from fresh (FOL) or lyophilised samples (L-FOL), Sukhija and Palmquist (1988) (OS), Marmer and Maxwell (1981) (MM) and the New Method proposed (NW) 1. (Experiment 2)	102

Capítulo 2:

Table 1. Mean intramuscular fat concentration (g/100g meat) in turkey and pork samples (n=9) with low, medium or high fat content. Each sample was analyzed by three homogenization (Hom) methods (Ball-mill, Grinder and Mortar) and two extraction (Ext) methods (Ball-mill and Vortex). 109

Table 2. Fatty acid composition of intramuscular fat (g fatty acid/100 g total fatty acids) analyzed by three homogenization (Hom) techniques (Ball-mill, Grinder and Mortar) and two extraction (Ext) methods (Ball-mill and Vortex). 109

Table 3. Coefficient of variation of a single representative sample from turkey or pig meat with low, medium or high intramuscular fat content analyzed 3 consecutive times by one of the six experimental protocols differing in the homogenization (Ball-mill, Grinder or Mortar) and extraction (Ball-mill and Vortex) procedures. 110

Capítulo 3:

Table 1. Mean, standard deviation (SD) and range of melting point and hardness of dry-cured ham subcutaneous fat. 117

Table 2. Fatty acid (g/100g) composition¹ of intact triacylglycerides from subcutaneous fat of dry-cured ham and TAG sn-2 and sn-1,3 fatty acid composition obtained by the two analytical methods under evaluation. 117

Table 3. Pearson's linear correlation coefficients for melting point and hardness values against fatty acid composition from both analytical methods in dry-cured ham subcutaneous fat. 119

Capítulo 4:

Table 1. Mean, standard deviation (S.D) and range of slip point, aw, moisture, texture parameters, fatty acid concentration (g/100 g), fatty acid group and their positional distribution for subcutaneous fat of dry-cured ham. 125

Table 2. Simple and multiple linear regression analysis of the slip point, hardness or adhesiveness value versus fatty acid concentration (g/100g) in Sn-2 or Sn-1,3 position of the triglyceride. 126

Capítulo 5:

Table 1. Ingredient composition and calculated analysis ¹ of the experimental diets (g/kg diet as fed basis unless otherwise indicated).	133
Table 2. Total (whole triglyceride), position 2 (Sn-2) and position 1,3 (Sn-1,3) fatty acid composition of fat sources used in this experiment.	134
Table 3. Effect of dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on growth performance of pigs during the last 32 days of fattening.	136
Table 4. Effect of sex, dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on carcass quality and meat composition.	136
Table 5. Effect of sex, dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on fatty acid profile of the intramuscular fat.	138
Table 6. Effect of gender (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on the subcutaneous fat in total (whole triglyceride), position 2 (Sn-2) and position 1,3 (Sn-1,3) fatty acid composition.	140

Capítulo 6:

Table 1. Ingredients and calculated analysis ¹ of diets (g/kg diet as fed basis).	149
Table 2. Total (whole triglyceride), position 2 (Sn-2) and position 1,3 (Sn-1,3) fatty acid composition of fat sources used in this experiment.	150
Table 3. Effect of sex (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol inclusion (Gly) on moisture, aw, pH and slip point of subcutaneous fat of dry-cured ham.	151
Table 4. Effect of sex (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol inclusion (Gly) on fatty acid profile of the subcutaneous fat of dry-cured ham.	152
Table 5. Effect of gender (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on the dry-cured ham subcutaneous fat in total (whole triglyceride), position 2 (Sn-2) and position 1,3 (Sn-1,3) fatty acid composition ¹ .	154

Table 6. Effect of gender (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on the texture parameters of dry-cured ham subcutaneous fat.	156
---	-----

Capítulo 7:

Table 1. Triglyceride, position 2 (sn-2) and position 1 and/or 3 (sn-1,3) fatty acid composition of fat sources (lard, high oleic sunflower oil and acorns) used in this experiment.	163
--	-----

Table 2. Effect of treatments on fatty acid profile of triglycerides of subcutaneous fat ¹ .	
---	--

Table 3. Triacylglyceride sn-2 and sn-1,3 fatty acid composition(g·kg ⁻¹) profile and positional distribution (Pos) of subcutaneous fat of considered treatments (Diet).	164
--	-----

Table 4. . Effect of proposed treatments on moisture, melting point and textural parameters of pig subcutaneous fat.	168
--	-----

Tablas de la discusión general:

Tabla 5.1. Cuantificación de la concentración (g/100g de carne) de grasa intramuscular de cuatro muestras de lomo de cerdo analizadas por sextuplicado por 5 procedimientos analíticos: Folch et al., (1957) con muestra fresca (FOL) o liofilizada (L-FOL), Sukhija y Palmquist (1988) (OS), Marmer y Maxwell (1981) (MM) y el nuevo método propuesto (NW).	176
--	-----

Tabla 5.2. Matriz de correlaciones lineales de Pearson del punto de deslizamiento, actividad de agua (aw) y parámetros de textura frente a los principales ácidos grasos.	185
---	-----

PRINCIPALES ABREVIATURAS EMPLEADAS

ACC	Acetil Co-A carboxilasa.
AGS	Ácido graso sintetasa.
CPT-I	Carnitina pantoiltransferasa I.
DAG	Diacilglicérido.
DHA	Ácido docosahexenoico.
DPA	Ácido docosapentenoico
EPA	Ácido eicosapentenoico
FA	Ácido graso.
FABP	Proteína de ligazón de ácidos grasos.
FFA	Ácido graso libre.
GC	Cromatografía de gases.
HDL	Lipoproteínas de alta densidad.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
IMF	Grasa intramuscular.
LCAT	Lecitín-colesterol acil transferasa.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
MAG	Monoacilglicérido.
MUFA	Ácido graso monoinsaturado.
PUFA	Ácido graso poliinsaturado.
SFA	Ácido graso saturado.
TAG	Triacilglicérido.
TLC	Cromatografía en capa fina.
UI	Índice de insaturación.
VLDL	Proteínas de muy baja densidad.

RESUMEN / ABSTRACT¹

¹ Este breve resumen es parte del cuerpo de la Tesis. El resumen ampliado se presenta al final del manuscrito, en cumplimiento de las directrices de la normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, que regula los estudios de doctorado en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº 14, de 21 de diciembre de 2012) y de acuerdo con las especificaciones establecidas por la Comisión de Doctorado de la UCM.

This short abstract is part of the main Thesis report. The extended abstract is included, at the end of the manuscript, in fulfilment of the directives of the regulation of development of the Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, which regulates the studies of doctorate at the Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº14, de 21 de diciembre de 2012) and in agreement with the specifications established by the Commission of Doctorate of the UCM.

RESUMEN

El control de la composición de la grasa en el cerdo es un tema de interés debido a su relación directa con la calidad nutricional, características sensoriales y propiedades tecnológicas de la carne y productos cárnicos. La composición de la grasa está relacionada con la dieta, el sexo, con la velocidad de salado y desecado de los jamones y también con la formación de compuestos aromáticos que afectan a las propiedades organolépticas finales. Recientes estudios demuestran que no sólo la composición, sino también la estructura molecular de la grasa parecen estar relacionadas con las propiedades reológicas finales e incluso tener implicaciones nutricionales de importancia.

La presente tesis ha sido realizada por una parte con la finalidad de optimizar una técnica de análisis de grasa intramuscular y de la estructura de los triglicéridos. Se ha analizado cómo afecta la estructura del triglicérido en las propiedades reológicas de la grasa y, por último, se han realizado una serie de estudios exploratorios para tratar de poner de manifiesto las posibilidades que tiene la alimentación animal de modificar la distribución de ácidos grasos en el interior de la molécula de triglicérido.

A lo largo de dos trabajos metodológicos se ha desarrollado un nuevo procedimiento para extraer grasa intramuscular que permite minimizar la cantidad de muestra, el disolvente empleado y el tiempo de análisis, resultando especialmente interesante el hecho de que se reduce marcadamente la variabilidad. El procedimiento se basa en la liofilización de la muestra, posterior homogeneizado, extracción de la grasa mediante una mezcla diclorometano:metanol (8:2) y posterior centrifugación.

En un tercer trabajo metodológico se ha realizado una comparación entre los dos métodos más utilizados en la determinación de la distribución posicional de ácidos grasos en las moléculas de triacilglicéridos de grasas de origen animal. El método A consiste en la incubación de los triacilglicéridos con una suspensión acuosa de la enzima lipasa, la separación de los productos por cromatografía de capa fina (TLC), y el posterior análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos de cada fracción mediante cromatografía gas-líquido. El método B elimina la separación por TLC. Este

método se basa en que la metilación básica (NaOH) únicamente metila los ácidos grasos esterificados al glicerol. Nuestros resultados demuestran que los datos obtenidos con el método A estuvieron en concordancia con la literatura anterior cuando analizamos grasa subcutánea de cerdo. Además el método A mostró una buena correlación entre la distribución de los ácidos grasos y el punto de fusión y dureza de las grasas analizadas. Sin embargo, el método B condujo a una subestimación del ácido palmítico y a resultados carentes de correlación con las propiedades físicas citadas.

En un cuarto trabajo se llevó a cabo un estudio de la dependencia de ciertas propiedades reológicas de grasa con la distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de triglicérido. Se encontró que el punto de fusión (medido como punto de deslizamiento) se relaciona tanto con la concentración como con la distribución posicional de ácidos grasos. La dureza se relacionó exclusivamente con los ácidos grasos presentes en las posiciones 1 y 3 del triglicérido mientras que la adhesividad únicamente con los presentes en la posición 2.

Los últimos tres trabajos de la presente tesis doctoral se centraron en la modificación del tipo de grasa de la dieta y/o la inclusión de glicerol en la misma y analizar tanto los cambios en la distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de triglicérido como las repercusiones que tenían estos cambios sobre las propiedades reológicas de la grasa. Un primer experimento se llevó a cabo con cerdos blancos alimentados con 4 dietas diferentes basadas en 2 tipos de grasa con similar perfil de ácidos grasos (palma y manteca) pero distinta distribución posicional, y la inclusión o no de glicerol en las mismas. En líneas generales se comprobó que con esta estrategia la posición sn-2 sufrió pocas modificaciones mientras que en la posición sn-1,3 sí que se produjo cierta reordenación.

Los jamones de los cerdos anteriores se curaron según el método tradicional y se analizó la estructura y las propiedades reológicas de la grasa subcutánea a la altura del músculo *biceps femoris*. Por una parte se volvió a comprobar que únicamente sn-1,3 se veían afectadas por el tipo de grasa. La dureza de la grasa se vio incrementada en cerdos alimentados con aceite de palma y tanto la dureza como la adhesividad, la elasticidad y la gomosidad disminuyeron con la inclusión de un 5% de glicerol en el pienso.

En último trabajo experimental se alimentaron con tres dietas diferentes de cebo a cerdos ibéricos y una cuarta basada en montanera. Con este trabajo quisimos comprobar si la utilización de grasa en las dietas con una gran variación de perfil de ácidos grasos total (manteca vs aceite de girasol alto oleico vs montanera) producía una modificación de en la distribución posicional de los ácidos grasos y en las propiedades reológicas de la grasa. Se puso de manifiesto que las diferentes dietas de pienso lograron modificar las posiciones 1 y 3 del triglicérido aumentando significativamente la concentración de C18:1n-9 y cierta reordenación del resto de ácidos grasos mientras que la montanera sí que logró afectar a la posición sn-2. Estos cambios también produjeron una disminución en las propiedades de la grasa anteriormente consideradas.

ABSTRACT

Control of the composition of pig fat is a topic of current interest due to its relationship with the nutritional value, organoleptic properties and rheological behavior of meat and meat products. The fat composition is related to the diet, the duration of the salting and drying periods of dry-cured hams and it is also related to the aromatic compounds, which alter the final organoleptic characteristics. Recent studies demonstrate that not only the composition but also the molecular structure of the fat may be related to the final rheological properties and even have important nutritional implications.

This doctoral Thesis was developed in a first stage with the purpose of optimizing a protocol to analyze intramuscular fat and triglyceride structure. It has also been discussed the relationship between positional distribution of fatty acids within the triglyceride molecule and the rheological properties of fat and, finally, some exploratory studies have been carried out to highlight and discuss the capacity of animal feeding to modify the fatty acid positional distribution.

Throughout two methodological works, a new procedure to extract intramuscular fat was developed to minimize sample amount, solvent use and time of analysis, together with a marked reduction of variability. It is based on lyophilized samples subsequent homogenization and extraction with dichloromethane-methanol (8:2) and centrifugation.

In the third methodological work, a study was conducted to compare two of the most used methods for the determination of the positional distribution of fatty acids within the triacylglycerol molecules from fats of animal origin. Method A involves incubation of the triacylglycerol fraction with an aqueous suspension of the lipase enzyme, separation of the reaction products by thin-layer chromatography (TLC), and analysis of fatty acid methylesters by gas-liquid chromatography. Method B eliminates the need for TLC. The technique makes use of the fact that methanolic-NaOH methylates only fatty acids esterified to glycerol. Our results demonstrated that method A data were in line with previous literature. Additionally, method A showed good correlations between fatty acid positional

distribution and fat melting point and hardness. However, method B showed an underestimation of palmitic acid and lacked of correlation with these physical properties.

In a forth study, the analysis of fatty acid positional distribution within the triglyceride and selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat were carried out. The slip point of the subcutaneous fat was related to the concentration and positional distribution of fatty acids. Hardness was related to the fatty acid concentration in external positions of the triglyceride while adhesiveness was exclusively related to fatty acid present in 2 position.

The three experimental works of this doctoral thesis were fundamentally focused in the effect of the modification of dietary fat and/or inclusion of glycerol on positional distribution of fatty acids within the triglyceride molecule and the consequences of these changes on the rheological properties of fat. A first experiment was carried out with white pigs fed with 4 different diets based in 2 types of fat with similar global fatty acid profile (lard vs palm oil) but different distributional position, and the possible inclusion of glycerol in them. In general terms, there is limited possibility of altering the fatty acid composition at the sn-2 location of the triglyceride by dietary intervention during the fattening phase but the sn-1,3 suffered a reorganization.

Hams of the cited pigs were cured according to traditional manner and the structure and rheological properties of subcutaneous fat at level of *biceps femoris* muscle were analyzed. It was again proved that only sn-1,3 were affected by the selected dietary fats. Hardness was increased in pigs fed with palm oil and hardness, adhesiveness, springiness and cohesiveness decreased with the inclusion of 5% glycerol in the diet.

In a final experimental work, Iberian pigs were fed with three different diets. In this work, we wanted to prove if the use of dietary fats with a different fatty acid profile (lard vs high oleic sunflower oil vs montanera) induced changes in the distributional position of fatty acid and in rheological properties of fat. It was found that diets based on feed had succeeded in changing sn-1,3 with the increase of the concentration of C18:1n-9 while montanera also altered sn-2 position. These changes also produced a decrease in considered rheological properties of subcutaneous fat.

1. INTRODUCCIÓN.

En 2013, la producción española de carne de porcino rompió la tendencia de crecimiento que llevaba desde el año 2009. El sacrificio disminuyó alrededor de un 0,5% en número de animales sacrificados (150 mil cerdos menos), respecto al ejercicio anterior, y un 1% en peso/canal (descenso de aproximadamente 330 g), sin llegar igual que en 2012 a la cifra histórica de 3,5 millones de toneladas. Con ese volumen de producción, que representa el 3,4% de la producción mundial, España se consolida ya en estos últimos años como el cuarto mayor productor de carne de porcino, por detrás de China (que por sí sola produce el 50% de la carne de cerdo de todo el mundo), EE.UU. (10% de la producción mundial) y Alemania (5,3%), y por delante de Brasil (3,1%), Rusia y Vietnam (2% cada uno) y Canadá (1,7%). A la vez, es el segundo país europeo en producción, representando el 16% del total de la UE, por delante de Francia (9%), Polonia (8%), Dinamarca e Italia (7%) y Países Bajos (6%). Dentro de nuestras fronteras, estas cifras significan más del 39 % de la producción final ganadera y el 14.2 % de la producción final agraria (MAGRAMA, 2013).

El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) ha publicado el estudio de los indicadores económicos del sector porcino correspondiente al año 2013. Las cifras reflejan que el valor de la producción final de porcino alcanzó el nivel máximo de su historia, cifrado en 6.273 millones de euros.

La calidad y abundancia de materia prima y unas condiciones climáticas propicias, favoreció el desarrollo en nuestro país de una cultura en torno al arte de salar y desecar las carnes de forma artesanal. España es uno de los países con una tradición más rica en la elaboración y consumo de los más variados embutidos y jamones. Lo diverso de nuestra producción chacinera, que se extiende a todos los rincones de nuestro país, forma parte de nuestro acervo cultural y gastronómico, y es apreciada dentro y fuera de nuestras fronteras.

Por tipos de productos, las preferencias del consumidor español están encabezadas por los jamones curados, término que engloba de forma genérica tanto a jamones serranos como ibéricos, y que son el principal referente de la producción cárnica de nuestro país. Los jamones serranos procedentes de cerdos de capa blanca y los jamones de cerdo ibérico representan alrededor de la quinta parte de los

volúmenes comercializados. De hecho, España es con diferencia el primer productor mundial de jamones y paletas curadas, con una producción que superó en 2012 los 42 millones de piezas. España es igualmente el primer consumidor, con un consumo por habitante y año de 5 kg.

La importancia que tiene en España el consumo de productos cárnicos curados desecados ejerce una gran influencia en todo el sector productivo y condiciona la mayor parte de las decisiones técnicas y económicas. Este hecho exige de una materia prima con atributos de alta calidad y características diferentes a las que requiere la comercialización fresca del producto, lo que nos diferencia claramente de otros países.

De entre las muchas propiedades que definen la calidad de la carne (color del músculo, firmeza, textura...), la grasa intramuscular juega un papel especialmente importante, ya que repercute directamente, por un lado, en la calidad sensorial de los productos, que es la más valorada por el consumidor, y por otro, sobre la calidad tecnológica, ya que influye decisivamente en la velocidad de desecación y de penetración de la sal en los productos de larga maduración. No hay que olvidar que el engrasamiento también condiciona en gran medida la rentabilidad, ya que resulta muy ineficiente. Es preciso por ello profundizar en estrategias productivas que permitan mantener criterios de calidad elevados (grasa intramuscular), pero que sean compatibles con una alta eficiencia productiva (bajo engrasamiento). Los principales factores que influyen en el engrasamiento son la raza o tipo genético, la edad y la alimentación.

La selección genética de los últimos años se ha dirigido fundamentalmente hacia genotipos conformados, que presentan una mayor proporción de magro en la canal y una velocidad de crecimiento elevada, lo que se traduce en un sacrificio de los animales a edades más tempranas. Es sobradamente conocido que la consistencia de la carne, así como el contenido en grasa, incluida la grasa de infiltración, aumentan con la edad de sacrificio de los animales, mejorando de esta manera notablemente la calidad de los productos elaborados y la aceptación por parte del consumidor. Por tanto nos encontramos ante un problema de elevado interés, ya que los cruces comerciales de cerdo blanco utilizados en la actualidad presentan un bajo estado de engrasamiento y, por tanto, de grasa intramuscular, debido al escaso carácter

adipogénico de estas razas así como a la temprana edad de sacrificio. Este hecho provoca problemas tecnológicos y de calidad en la industria de productos cárnicos elaborados.

El control de la composición de la grasa en el cerdo es un tema interesante debido a su relación directa con la calidad nutricional, características sensoriales y propiedades tecnológicas de la carne y productos cárnicos. La composición de la grasa está relacionado con la velocidad de salado y desecado de los jamones y también con la formación de compuestos aromáticos que afectan a las propiedades organolépticas finales. Además, recientes estudios demuestran que no sólo la composición neta sino también la estructura molecular de la grasa parece estar relacionada con las propiedades reológicas finales e incluso, desde un punto de vista nutricional, puede influir en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipertensión... entre otras.

Por lo anteriormente expuesto, es necesario para el sector porcino un conocimiento adecuado de los factores y nuevas estrategias de producción para mejorar la calidad de la carne y de los productos elaborados. La acumulación de grasa es un proceso que depende cuantitativa y cualitativamente de la alimentación recibida. El animal puede sintetizar grasa a partir de hidratos de carbono o proteínas, puede acumular los ácidos grasos y otros compuestos liposolubles ingeridos sin apenas modificarlos o puede modificarlos con mayor o menor intensidad. Así pues, y particularmente en lo relacionado con la nutrición animal, podrían plantearse soluciones a los problemas expuestos anteriormente. Se han de revisar estrategias para mejorar la eficiencia y reducir el coste de la producción siendo una de ellas a considerar el uso de nuevos productos, como el glicerol, en piensos. Además, es necesaria la optimización de las técnicas de análisis de grasa intramuscular y composición y estructura de la grasa, procesos utilizados con relativa frecuencia en la mayoría de laboratorios de alimentos, que permitan un control de calidad con menor coste y mayor eficiencia.

La presente tesis ha sido realizada por una parte con la finalidad de optimizar una técnica de análisis de grasa intramuscular y de la estructura de los triglicéridos. Este último aspecto, muy poco atendido en estudios previos en alimentación animal, ha sido uno de los principales objetivos de nuestro estudio. Se ha analizado cómo afecta la estructura del triglicérido en las propiedades reológicas de la

grasa de jamón curado y, por último, se han realizado una serie de estudios exploratorios para tratar de poner de manifiesto las posibilidades que tiene la alimentación animal de modificar la distribución de ácidos grasos en el interior de la molécula de triglicérido.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Lípidos. Características generales.

2.1.1. Definición. Generalidades.

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, que tienen como característica principal el ser mayormente hidrofóbicas o insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos como cloroformo, hexano, etanol, metanol o éter. El nombre de lípido se ha usado tradicionalmente para describir una amplia variedad de sustancias naturales entre las que se incluyen los ácidos grasos (FA) y sus derivados, los esteroides, los terpenos, los carotenoides y las sales biliares, todos ellos solubles en los solventes mencionados.

2.1.2. Clasificación de lípidos.

Se han realizado distintas propuestas de clasificación del amplio y complejo conjunto de sustancias que constituyen los lípidos. Teniendo en cuenta su estructura química, los lípidos se pueden distribuir en cinco grupos principales: triacilglicéridos, fosfoglicéridos, esfingolípidos, ceras y esteroides. Otras alternativas de clasificación serían las que atienden a su polaridad, en cuyo caso pueden ordenarse en: lípidos polares y lípidos neutros (Small, 1968; Carey y Small, 1972; según la función que desarrollan en los seres vivos, diferenciándose entre lípidos estructurales y lípidos de reserva (Enser, 1984); o teniendo en cuenta su capacidad de formar jabones, agrupándose en saponificables e insaponificables. La mayoría de criterios de agrupación mencionados están basados en las recomendaciones de la IUPAC-IUB (1978).

La clasificación más actual de los lípidos y de mayor aceptación internacional es la realizada en 2005 por el Comité Internacional de Clasificación y Nomenclatura de Lípidos (ILCNC) bajo el respaldo del consorcio LIPID MAPS (Fahy et al., 2005 y Fahy et al., 2009). Esta clasificación se basa en su estructura química y diferencia policétidos, acilgliceroles (triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos), esfingolípidos, prenoles o derivados de isopreno y sacarolípidos. Sin embargo, en esta clasificación, por motivos históricos y bioinformáticos, se ha decidido separar los ácidos grasos de otros

policétidos, los glicerosfosfolípidos de otros glicerolípidos y los esteroides de otros prenoles, resultando, de esta forma, un total de ocho categorías primarias.

2.1.2.1. Ácidos grasos.

2.1.2.1.1. Estructura y generalidades.

Los FA forman parte de la composición de la mayoría de los lípidos. Pueden definirse como ácidos orgánicos con un grupo carboxilo terminal y una cadena apolar hidrocarbonada que les confiere su característica hidrofobicidad. Se trata de moléculas anfipáticas cuya estructura general sería $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$. Los FA pueden inicialmente clasificarse teniendo en cuenta su grado de saturación, siendo ácidos grasos saturados (SFA) los que no tienen dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada, monoinsaturados (MUFA) cuando hay un doble enlace y poliinsaturados (PUFA) si hay más de un doble enlace. Desde el punto de vista estructural, los de origen animal son relativamente simples y pueden agruparse en familias bien definidas. Sin embargo, los FA de origen vegetal son más complejos y en algunos casos pueden incorporar a su estructura general grupos funcionales adicionales (anillos de ciclopropeno, etc.). Para identificar correctamente un FA, es preciso indicar el número de átomos de carbono y el de dobles enlaces así como su posición en la molécula. Respecto a los dos primeros, el criterio está unificado, pero para identificar la posición de los dobles enlaces hay dos posibilidades: iniciar la contabilidad desde el grupo carboxilo (-COOH) o desde el grupo metilo terminal (-CH₃). Esto resulta en dos nomenclaturas diferentes: la delta o química y la omega o bioquímica. Por ejemplo, el FA cuyo nombre común es ácido α -linolénico (Figura 2.1), está constituido por una cadena con 18 átomos de carbono y tres dobles enlaces en posiciones 9, 12 y 15, si contamos desde el grupo carboxilo. El nombre del ácido α -linolénico en la nomenclatura delta será " $\Delta^{9,12,15}$ C18:3", mientras en la nomenclatura omega sería C18:3n-3, ya que el primer doble enlace, contando desde el grupo metilo terminal, está entre el tercer y el cuarto átomo de carbono. Los dobles enlaces en los FA insaturados son generalmente tipo cis, es decir, los dos grupos prioritarios respecto al doble enlace se sitúan geoméricamente en el mismo lado considerando el doble enlace como un plano.

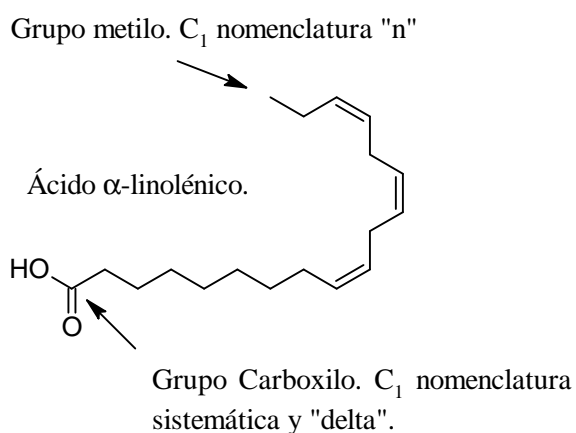
Además de los tres citados criterios para identificar un FA existe un cuarto. Se trata de la nomenclatura original o sistemática (IUPAC) con el que se hace referencia a su estructura (Tabla 2.1).

Bajo su aplicación, el ácido α -linolénico (Figura 2.1) sería: ácido *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-octadecatrienoico (Webb y O'Neil, 2008) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Principales ácidos grasos presentes en el cerdo.

Nombre trivial	Nombre IUPAC	n-x	Δ^n
Ácido láurico	Ácido dodecanoico	C12:0	
Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	C14:0	
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	C16:0	
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	C18:0	
Ácido palmitoleico	Ácido <i>cis</i> -9-hexadecenoico	C16:1n-7	<i>cis</i> - Δ^9
Ácido oleico	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico	C18:1n-9	<i>cis</i> - Δ^9
Ácido <i>cis</i> -vacénico o ascléptico	Ácido <i>cis</i> -11-octadecenoico	C18:1n-7	<i>cis</i> - Δ^{11}
Ácido linoleico	Ácido <i>cis</i> -9,12-octadecadienoico	C18:2n-6	<i>cis</i> - Δ^9, Δ^{12}
Ácido γ -linoleico	Ácido <i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienoico	C18:3n-6	<i>cis</i> - $\Delta^6, \Delta^9, \Delta^{12}$
Ácido α -linolénico	Ácido <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	C18:3n-3	<i>cis</i> - $\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$
Ácido gonodoico	Ácido <i>cis</i> -11-eicosanoico	C20:1n-9	<i>cis</i> - Δ^{11}
Ácido eicosadienoico	Ácido <i>cis</i> -11,14-eicosadienoico	C20:2n-6	<i>cis</i> - Δ^{11}, Δ^{14}
Ácido eicosadienoico	Ácido <i>cis</i> -14,17-eicosadienoico	C20:2n-3	<i>cis</i> - Δ^{14}, Δ^{17}
Ácido dihomo- γ -linolénico, DGLA	Ácido <i>cis</i> -8,11,14-ecosatrienoico	C20:3n-6	<i>cis</i> $\Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$
Ácido dihomo- α -linolénico	Ácido <i>cis</i> -11,14,17-ecosatrienoico	C20:3n-3	<i>cis</i> - $\Delta^{11}, \Delta^{14}, \Delta^{17}$
Ácido araquidónico	Ácido <i>cis</i> -5,8,11,14-ecosatetraenoico	C20:4n-6	<i>cis</i> - $\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$
Ácido timnodónico, EPA	Ácido <i>cis</i> -5,8,11,14,17-ecosapentaenoico	C20:5n-3	<i>cis</i> - $\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}, \Delta^{17}$
Ácido clupanodónico, DPA	Ácido <i>cis</i> -7,10,13,16,19-decosapentaenoico	C22:5n-3	<i>cis</i> - $\Delta^7, \Delta^{10}, \Delta^{13}, \Delta^{16}, \Delta^{19}$
Ácido cervónico, DHA	Ácido <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosaheenoico	C22:6n-3	<i>cis</i> - $\Delta^4, \Delta^7, \Delta^{10}, \Delta^{13}, \Delta^{16}, \Delta^{19}$

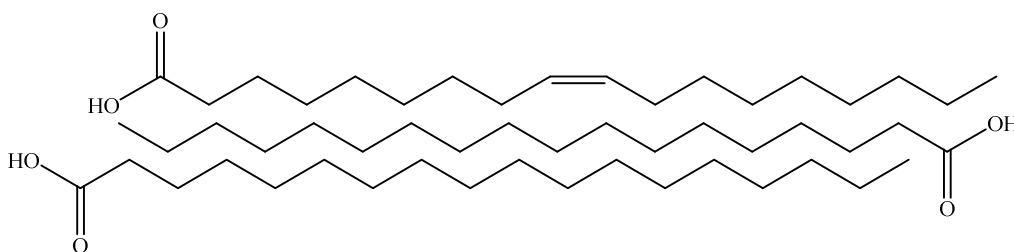
Figura 2.1. Estructura semidesarrollada del ácido α -linolénico.



2.1.2.1.2. *Propiedades: punto de fusión y solubilidad.*

El punto de fusión de la grasa está determinado por la facilidad con que los residuos acilo forman estructuras organizadas. Cuando los FA saturados solidifican, sus moléculas se organizan en estructuras paralelas, proceso facilitado por su estructura lineal en zig-zag (Figura 2.2). Esta estructura se estabiliza por las interacciones hidrófobas a lo largo de las cadenas (interacciones Van der Waals entre los grupos metileno). El elevado grado de organización hace que la energía necesaria para fundir el cristal sea elevada y que la temperatura de fusión aumente a medida que se incrementa el número de átomos de carbono de la cadena, es decir, su longitud. Cuanto mayor sea la cadena menor capacidad de rotación tendrá la molécula y más efectivas serán las interacciones y también mayor su peso molecular. Los FA insaturados (así como los ramificados o los cíclicos), debido a su forma no lineal, no se pueden disponer espacialmente en paralelo, por lo que tienen menos posibilidad de interactuar entre sí para formar estructuras estables. Las interacciones de Van der Waals disminuyen drásticamente con un pequeño aumento en la distancia entre las cadenas acilo y, puesto que la presencia de dobles enlaces cis aumenta el volumen ocupado por el FA, aumentará el espacio entre ellas, disminuyendo su posibilidad de asociación. Cuanto más insaturado sea el FA menor capacidad de rotación tiene en sus enlaces C-C, mayor volumen ocupará y peor será el empaquetamiento. Por este motivo forman estructuras cristalinas mucho más débiles (desorganizadas) y precisan menos energía para perder su organización (fundirse), por lo que su punto de fusión se presenta a temperaturas menores (Figura 2.2) (Brenner, 1984; Cook, 1991).

Figura 2.2. Estructura en zig-zag de ácidos grasos. Asociación paralela.



Los FA son moléculas anfipáticas, es decir, con una cabeza hidrófila (grupo carboxilo) y una cola hidrófoba (cadena hidrocarbonada). Esta naturaleza les confiere la propiedad de organizarse en la interfase lípido-agua y de formar micelas en solución acuosa. La polaridad de los FA y por tanto, su

capacidad de formar micelas, depende de la longitud de su cadena y de su grado de insaturación. De este modo, cuanto más corta sea la cadena y mayor el grado de insaturación, mayor será su polaridad y su capacidad para formar micelas. Basándose en su polaridad, los FA se pueden clasificar en dos grupos: FA de polaridad baja (FA saturados de cadena larga) y FA de polaridad media/alta (FA de cadena corta y FA insaturados de cadena larga) (Freeman, 1984).

2.1.2.1.3. Ácidos grasos esenciales y no esenciales.

Los ácidos grasos omega 3 y omega 6 son importantes en la dieta de los humanos y en la de otros mamíferos monogástricos, al no poderlos sintetizar *de novo*. Estos ácidos grasos forman parte de las membranas celulares, colaboran en el transporte de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y son precursores en la síntesis de eicosanoides, moléculas relacionadas con diversas funciones biológicas tales como la inflamación o la respuesta inmunitaria. Con esta estructura, los FA con 18 átomos de carbono, linoleico (C18:2n-6) y linolénico (C18:3n-3) son esenciales para el organismo humano, y muchos mamíferos, ya que si se suministran pueden sintetizar el resto de ácidos grasos que necesita (Webb y O'Neill, 2008, Lands 2012 y 2014).

El C18:2n-6 es un ingrediente importante en la alimentación animal, ya que la mayor parte de las materias primas utilizadas en la formulación de piensos tienen una elevada concentración de este FA. En el caso del cerdo, pasa a través del estómago casi sin sufrir modificaciones y entonces es absorbido por el torrente sanguíneo en el intestino delgado y se incorpora desde allí a lipoproteínas y, pasando previamente por el hígado, se recircula junto con otras lipoproteínas a los tejidos. Este FA es un importante constituyente estructural en las membranas celulares y se utiliza para formar derivados por elongación y desaturación que dan lugar a toda una serie de FA de la familia n-6.

Otro PUFA de importancia en la alimentación animal es el C18:3n-3 que está presente principalmente en los tejidos vegetales de hoja verde (Lawrie, 2006). Se encuentra en muchos concentrados de los piensos aunque en la mayor parte de los casos, a niveles muy inferiores a los del C18:2n-6. En los tejidos animales se encuentra en cantidades variables, así en los cerdos, la proporción

de C18:3n-3 es mayor en el tejido adiposo que en el músculo y, además, es ligeramente más alta en los lípidos neutros que en los fosfolípidos (Wood et al., 2008).

De acuerdo con Kuklev y Smith (2006), los FA esenciales más importantes con 20 átomos de carbono son el ácido araquidónico (C20:4n-6) y el ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3, EPA), los cuales se forman por la desaturación y elongación del C18:2n-6 y el C18:3n-3 respectivamente al igual que los de 22 átomos de carbono, el ácido docosapentaenoico (DPA, C22:5n-6) y ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3). Estos últimos ácidos grasos participan en importantes funciones orgánicas (Ordoñez et al., 2003a, b), por ejemplo, el DHA es necesario para la función óptima del sistema nervioso. Como se ha mencionado, la mayoría de las especies pueden sintetizar estos FA a partir del ácido linoleico y α -linolénico, por lo que éstos PUFA de cadena larga dejan de ser esenciales si existe suficiente C18:2n-6 y C18:3n-3 en la dieta. Generalmente, los PUFA de cadena larga n-3 y n-6 son componentes importantes de los fosfolípidos estructurales de las membranas y orgánulos celulares (Dolz, 1996) y forman su propia serie de eicosanoides que poseen una amplia gama de acciones fisiológicas. Por ejemplo, el C18:3n-6 es el precursor de la prostaglandina PGE1, que inhibe la agregación plaquetaria, mientras que el tromboxano TXA2 deriva del C20:4n-6 (Webb y O'Neill, 2008). El C18:2n-6 proporciona materia prima para la producción de prostaglandinas (Le et al., 2009; Seppänen-Näakso et al., 2002; Wood et al., 2008). EPA y DHA están normalmente presentes en bajas concentraciones en la carne, pero la concentración es elevada en los aceites de pescado (Lawrie, 2006).

2.1.2.1.4. Análisis de ácidos grasos.

Por lo general, para el análisis de FA es necesario preparar derivados apolares de diferentes tipos. Mayoritariamente se preparan los correspondientes metilésteres. A excepción del análisis de grasas o aceites, los lípidos han de ser liberados de la matriz en la que se encuentran. Esta operación se realiza por extracción directa de los lípidos con diferentes mezcla de disolventes (comúnmente para tejidos animales se han empleado mezclas de cloroformo – metanol). En algunos casos, se requiere de una hidrólisis ácida o básica previa.

La cromatografía de gases (GC) es la técnica analítica más empleada para la obtención del perfil de FA de cualquier muestra, tras la mencionada generación de los correspondientes metil ésteres.

Además, si el FA contiene otros grupos polares deberán también enmascarse o prepararse otros derivados aptos para su identificación. Con este proceso se mejora la resolución cromatográfica y la estructura de los espectros (forma de los picos), al acortarse generalmente los tiempos de retención. En la GC, la identificación de los FA puede realizarse por comparación de tiempos de retención utilizando sustancias patrón. También puede recurrirse a combinar la GC con técnicas de derivatización o degradación química o al acoplamiento de sistemas espectroscópicos como la espectrometría de masas (Dobson y Christie, 2002).

La preparación de los ésteres metílicos puede, fundamentalmente, llevarse a cabo mediante metilación ácida, básica o con diazometano. En la primera, tanto los ácidos grasos libres (FFA) como los O-acil lípidos se esterifican o transesterifican por calentamiento con metanol anhidro en presencia de un catalizador ácido, comúnmente HCl o H₂SO₄. El trifluoruro de boro también puede utilizarse aunque tiende a evitarse por provocar un mayor número de reacciones secundarias. En el caso de la metilación básica, únicamente se transesterifican los O-acil lípidos y es importante que se realice en ausencia de agua, para evitar la hidrólisis básica irreversible de los ésteres. Comúnmente se consigue el medio básico disolviendo KOH o metóxido sódico en metanol anhidro. Hay que tener en cuenta que en el caso de PUFA o FA con dobles enlaces conjugados (Christie et al., 2007) una exposición a un medio ácido o básico excesivamente concentrado, o durante un tiempo prolongado, puede producir migraciones de los dobles enlaces y, por tanto, errores en la cuantificación. La metilación con diazometano se evita por su alta toxicidad, además es muy sensible a la cantidad de metanol presente y al tiempo de reacción. Sin embargo, es el mejor procedimiento para la metilación de FA de cadena corta (volátiles) que difícilmente permanecen en disolución en el metanol caliente necesario en las otras opciones. En la obra de Christie (1993) se revisan todas estas opciones y se optimizan para cada circunstancia de análisis.

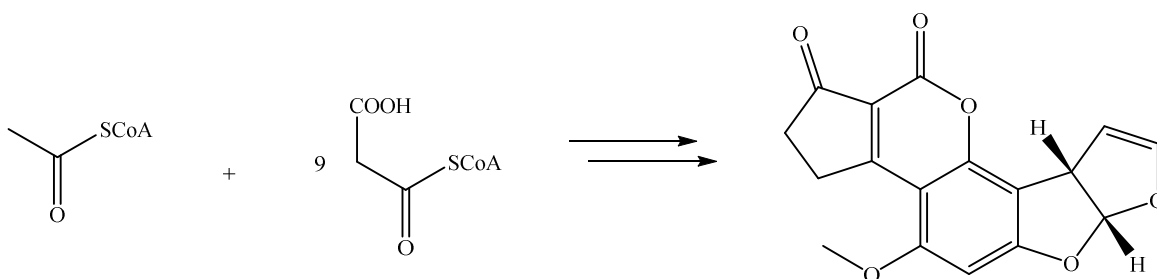
Cuando hay disponibilidad de GC, el uso de HPLC es mucho menos práctico, si bien se hace necesario para procedimientos micro-preparativos, como el aislamiento de compuestos para su posterior análisis por espectrometría de masas. En la revisión de Nikolowa-Damyanova (1997) se detallan las posibilidades de cada técnica cromatográfica.

En muchas ocasiones, los ésteres metílicos de los FA presentan problemas de detección por lo que se suelen emplear ésteres con grupo o grupos cromóforos que absorban en UV o presenten fluorescencia. En general, se recomiendan derivados de fenacilo como p-bromo o p-metoxi fenacil ésteres.

2.1.2.2. *Policétidos.*

En la biosíntesis de ácidos grasos, aunque se detallará más adelante, se producen condensaciones sucesivas de unidades de 2 átomos de carbono a un cebador de acetilo o propionilo y posterior reducción dando lugar a la cadena hidrocarbonada. En ausencia de los procesos de reducción, se obtendrían cadenas poliketídicas estabilizadas por la propia superficie enzimática hasta que la elongación se completara. Este proceso comprende un gran número de metabolitos secundarios y productos naturales de origen animal, vegetal, fuentes bacterianas, fúngicas y marinas, que una gran diversidad estructural ya que estas cadenas son muy reactivas y pueden dar lugar a múltiples estructuras cíclicas (Figura 2.3).

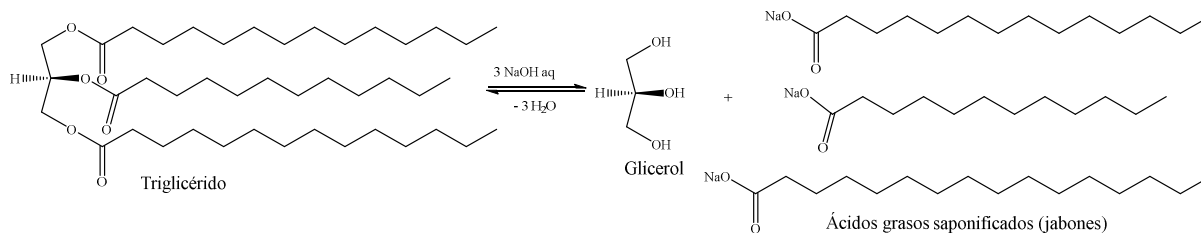
Figura 2.3. Policétido: Aflatoxina B1.



2.1.2.3. *Acilglicerolos.*

2.1.2.3.1. *Estructura y propiedades.*

En esta subdivisión se encuentran los tri-, di- y monoacilglicerolos. Los triglicéridos (TAG) también llamados grasas neutras (lípidos neutros) o simplemente grasas, son los componentes cuantitativos más importantes de los depósitos grasos animales y vegetales (adipocitos). Los TAG son ésteres del alcohol glicerina con tres moléculas de ácido graso. Su hidrólisis con algún hidróxido como KOH o NaOH (saponificación) produce jabones de sodio o potasio (Figura 2.4)

Figura 2.4. Saponificación de triglicérido.

El punto de fusión de los TAG depende principalmente de su composición en ácidos grasos. Sin embargo, algunos otros factores, como el tipo de cristalización (α , β o γ) o la ubicación de los ácidos grasos en el glicerol también tienen una marcada influencia en el punto de fusión.

Las grasas y los aceites son mezclas de TAG y, por consiguiente, no tienen un verdadero punto de fusión sino que pasan de sólidos a líquidos de una forma progresiva a lo largo de un rango de temperaturas. El punto de fusión de las grasas se mide frecuentemente como ‘punto de deslizamiento’ o temperatura a la que la grasa empieza a ser suficientemente fluida como para desprenderse de las paredes de un capilar y desplazarse al sufrir el empuje del agua. El punto de deslizamiento de la grasa está muy correlacionado con su contenido en ácidos grasos. Así, por ejemplo, el punto de deslizamiento de la grasa del cerdo se ha correlacionado fundamentalmente con su contenido en ácido linoleico y esteárico (Wood et al., 1978) y el de la grasa del pollo, con la relación entre el contenido de ácidos grasos saturados e insaturados (Hrdinka et al., 1996).

Los TAG son moléculas apolares y por tanto, completamente insolubles en agua. Su hidrólisis, por la acción de la lipasa pancreática en el intestino delgado del cerdo, da como resultado la formación de 2-monoglicéridos (éster de un ácido graso con el grupo hidroxilo en posición 2 de la molécula de glicerol). Esto es debido a la acción específica de la lipasa en los grupos hidróxilo extremos (en posición 1 y 3) del glicerol (Laws y Moore, 1963). Los 2-monoglicéridos son moléculas bastante polares y por tanto tienen alta capacidad para formar micelas en un medio acuoso.

2.1.2.3.2. *Estructura de triglicéridos en grasas animales y vegetales.*

En la tabla 2.2 se puede ver la distribución posicional de FA en algunas grasas de origen vegetal y animal. De forma general se puede comprobar que las moléculas de TAG provenientes de grasas vegetales contienen casi exclusivamente C18:1n-9 y C18:2n-6 en posición 2 mientras que los SFA tienden a ocupar posiciones externas. El C18:3n-3, si lo hay, se reparte entre las 3 posiciones prefiriendo generalmente la posición 3. Algo similar ocurre en la leche y sebo de vaca donde la preferencia de los insaturados por la posición 2 no es tan marcada pero sí la de los SFA por las posiciones externas.

Hay que destacar la disposición que se puede observar en la leche humana, muy similar a la leche a la manteca de cerdo. Éstas contienen elevadas cantidades de C16:0 y, además, un 50 – 60 % se encuentra esterificado en sn-2 (esto supone aproximadamente el 70% de todo el C16:0 presente). Esta configuración inusual se acompaña por un posicionamiento de los FA C18:1n-9 y C18:2n-6 preferente por posiciones externas. Esto parece ser algo estrictamente necesario para el adecuado crecimiento tanto de bebés humanos como de lechones. Resulta llamativo cómo la dieta de lactantes es rica en SFA (con la mayor parte de la energía proporcionada por C16:0) mientras que en otras etapas de la vida se consideraría ésta alimentación de riesgo para la salud. Todos estos hechos han de considerarse a la hora de diseñar un sustituto para la leche materna. En la tabla 2.2 se puede ver la distribución posicional de FA en algunas grasas de origen vegetal y animal. De forma general, se puede comprobar que las moléculas de TAG provenientes de grasas vegetales contienen casi exclusivamente C18:1n-9 y C18:2n-6 en posición 2 (sn-2) mientras que los SFA tienden a ocupar posiciones externas (sn-1 y sn-3). El C18:3n-3, si lo hay, se reparte entre las 3 posiciones, prefiriendo generalmente la posición sn-3. Algo similar ocurre en la leche y sebo de vaca donde la preferencia de los insaturados por la posición 2 no es tan marcada pero sí la de los SFA por las posiciones externas.

Hay que destacar la disposición de ácidos grasos en la grasa en la leche humana (Tabla 2.2), muy similar a la de la leche y manteca de cerdo. Estas grasas contienen elevadas cantidades de C16:0 encontrándose un 50 – 60 % esterificado en sn-2 (lo que supone aproximadamente el 70% de todo el C16:0 presente). Esta configuración inusual se acompaña por un posicionamiento de los FA C18:1n-9

y C18:2n-6 preferente en posiciones externas. Esto parece ser algo estrictamente necesario para el adecuado crecimiento tanto de bebés humanos como de lechones. Resulta llamativo cómo la dieta de lactantes es rica en SFA (con la mayor parte de la energía proporcionada por C16:0) mientras que en otras etapas de la vida se consideraría ésta alimentación de riesgo para la salud. Todos estos hechos han de considerarse a la hora de diseñar un sustituto para la leche materna.

2.1.2.3.3. Análisis de la estructura de triglicéridos.

Como ya se ha mencionado, los TAG constituyen cuantitativamente la mayor fracción lipídica mayoritaria de la carne y productos cárnicos, mientras que constituyentes menores son los fosfolípidos, glicolípidos, esteroides, FFA y vitaminas liposolubles.

Se ha demostrado que tanto la composición de FA de la dieta como la distribución posicional estereoespecífica de estos FA en la molécula de TAG son factores de importancia en la digestión y absorción de FA (Mu y Hoy, 2004). Además, la distribución posicional también afecta a las propiedades físicas del tejido adiposo lo cual tiene diversas implicaciones tecnológicas en el procesado de carnes y, por tanto, en la calidad de los productos finales (Segura et al., 2015; Smith et al., 1998;). También se ha comprobado en estudios recientes que la posición de los FA en la molécula de TAG podría afectar al desarrollo de enfermedades como obesidad, diabetes o hipertensión (Gouk et al., 2013; Ponnampalam et al, 2011). Hunter (2001) revisó la forma en la que la estructura estereoespecífica de los TAG de la dieta puede afectar al metabolismo lipídico en humanos, lo cual parece estar íntimamente relacionado con el progreso de varias enfermedades cardiovasculares. Aunque la distribución posicional de los FA es un tema de interés en las grasas de origen animal, paradójicamente existe poca información en la bibliografía sobre estudios dirigidos a alterar dicha distribución. Además, existen marcadas diferencias entre los resultados que ofrecen diferentes metodologías analíticas, lo cual lleva a cierta información científica errática en este tema.

Tabla 2.2. Distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido (TAG) en algunas grasas y aceites de origen animal y vegetal.

Fuente	Posición	Ácido graso (%)				
		C16:0	C18:0	C18:1n-9	C18:2n-6	C18:3n-3
Leche humana	TAG	27	7	36	13	1
	sn-1	16	15	46	11	0.9
	sn-2	65	3	13	7	0.8
	sn-3	6	2	50	15	1.4
Leche de vaca	TAG	24	24	25	3	<1
	sn-1	36	15	21	2	-
	sn-2	33	6	14	4	-
	sn-3	10	4	15	2	-
Manteca de cerdo	TAG	26	15	40	10	1
	sn-1	22	7	50	11	1
	sn-2	58	1	15	8	1
	sn-3	15	5	52	12	1
Sebo de vaca	TAG	26	20	38	4	1
	sn-1	41	17	20	4	1
	sn-2	17	9	41	5	1
	sn-3	22	24	37	5	1
Manteca de cacao	TAG	24	35	36	3	<1
	sn-1	34	50	12	1	-
	sn-2	2	2	87	9	-
	sn-3	37	53	9	-	-
Aceite de maiz	TAG	11	3	28	58	1
	sn-1	18	3	27	50	1
	sn-2	2	<1	26	70	<1
	sn-3	13	3	31	51	1
Aceite de soja	TAG	11	6	24	54	7
	sn-1	14	6	23	48	9
	sn-2	1	<1	21	70	7
	sn-3	13	6	28	45	8
Aceite de palma	TAG	45	4	38	18	<1
	sn-1	60	3	27	3	-
	sn-2	13	-	68	35	-
	sn-3	72	8	14	19	-
Aceite de oliva	TAG	13	4	71	10	1
	sn-1	13	3	72	10	<1
	sn-2	1	-	83	14	1
	sn-3	7	4	74	5	1

sn- = posición estereoquímica dentro de la molécula de triglicérido

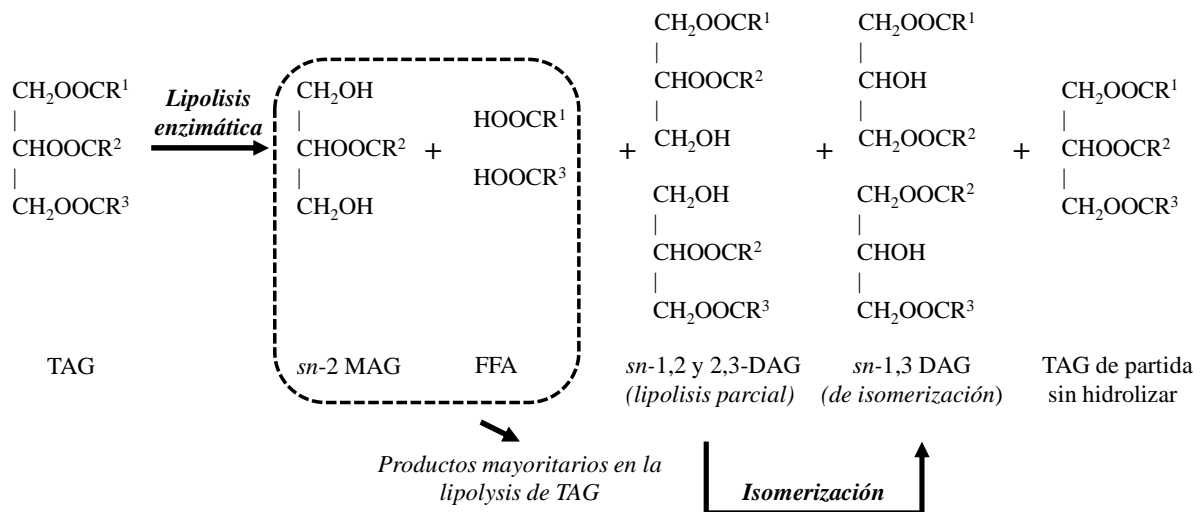
Para el análisis de la molécula de TAG, lo primero que se ha de considerar es que se trata de una molécula de glicerol que esterifica tres ácidos grasos. Las posiciones se numeran mediante un sistema estereoquímico: sn-1-, sn-2- y sn-3-. Puesto que la posición 2 es quiral, se puede asumir que existen dos TAG enantiómeros con perfil de FA similar y el mismo FA en sn-2 y, por tanto, el número de TAG diferentes incluyendo enantiómeros ascendería a n^3 , donde n es el número de FA considerado que, aunque en los tejidos animales es limitado, el número de moléculas resultante a analizar sería muy elevado.

Generalmente, los TAG se pueden caracterizar por GC o HPLC. En estas técnicas, además de tener que adecuar los respectivos parámetros cromatográficos, se necesitan de los correspondientes patrones para identificar cada pico del cromatograma y, generalmente, no son capaces de diferenciar entre enantiómeros a no ser que se dote al sistema de columna quiral o se derivaticen los mismos a otras moléculas. Podría solventarse el problema del elevado número de patrones a conseguir acoplando los sistemas con un espectrómetro de masas. Las mencionadas técnicas cromatográficas fueron ampliamente revisadas por Andrikopoulos (2002), Buchgraber et al. (2004), Perona y Ruiz-Gutiérrez (2004) y más recientemente por Kalo y Kempainen (2012). Otra técnica frecuentemente utilizada en la gran mayoría de laboratorios es la cromatografía de capa fina (TLC). Touchstone (1995), Sherma (2000) y Fuch et al. (2011) han llevado a cabo excelentes revisiones de las aplicaciones de esta técnica en el análisis lipídico.

Las técnicas cromatográficas anteriormente mencionadas (TLC, GC y HPLC) son en general bien aceptadas por los analistas. Sin embargo, la más *tradicional*, la TLC, aún conserva notables ventajas entre las que cabe citar: simplicidad en el proceso, disponibilidad de reactivos con diferentes sensibilidades y selectividades tanto para la separación como para la detección, capacidad de repetir la detección y cuantificación de distintos compuestos, versatilidad, buena relación coste/efectividad ya que se pueden analizar varias muestras en un mismo plato con un consumo bajo de disolventes y facilidad de recuperación de las fracciones separadas para análisis ulteriores (Fucht et al., 2011; Sherma, 2000; Touchstone, 1995).

Para obtener la información estructural de los TAG de una grasa, más allá del mero perfil de FA, se requiere un procedimiento de análisis más o menos complejo, que podría incluir los siguientes pasos: (1) análisis por GC para obtener la composición de previo aislamiento de los TAG, (2) degradación de la fracción de TAG en sn-2-monoacilglicerol (MAG), mediante digestión (hidrólisis) enzimática (o una degradación de Grignard), (3) aislamiento del sn-2-MAG (podría realizarse por TLC) y (4) posterior análisis de los FA de esta fracción por GC. Este procedimiento proporciona el perfil de FA total, el de los FA que ocupan la posición 2 en los TAG y, por diferencia, los FA que están ocupando las posiciones externas (sn-1 o sn-3). Cabría suponer que los FA que ocupan las posiciones externas en los TAG podrían caracterizarse analizando los ácidos grasos libres (FFA) producto de la lipólisis. Sin embargo, durante la digestión son posibles y probables procesos de traslocación, si bien FFA y 2-MAG son los productos mayoritarios (Figura 2.5).

Figura 2.5. Esquema de los productos obtenidos en una lipólisis enzimática de un triacilglicerol.



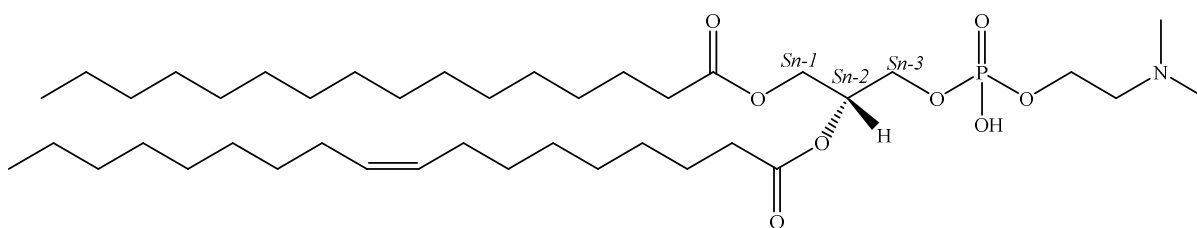
Si se quisiera llevar una caracterización completa de todas las moléculas de TAG presentes en una grasa, un posible procedimiento sería: (1) separación de los TAG por TLC, impregnada con nitrato de plata en función de sus insaturaciones. Este paso separará los TAG SFA/SFA/SFA de los MUFA/SFA/SFA, etc., (2) cada fracción aislada se separa en sus TAG por HPLC en fase reversa, (3) cada TAG individual se somete a análisis regio-específico con hidrólisis enzimática o degradación de Grignard para determinar el FA de la posición 2 por GC del FA aislado del *sn*-2-MAG, (4) el conjunto

de sn-1,2 (2,3)- diacilglicerol (DAG) se derivatizan con 3,5-dinitrofeniluretano y se separan por HPLC con columna quiral y se cuantifican. Con la distribución total de FA y la localización de cada FA en los TAG individuales se pueden calcular las cantidades de los diferentes TAG presentes (Christie et al., 1991; Mu y Hoy, 2004).

2.1.2.4. Glicerofosfolípidos.

Son fosfolípidos que contienen dos moléculas de ácido graso esterificadas en los grupos hidroxilo primero y segundo de la glicerina. El tercer grupo hidroxilo establece un enlace éster con el ácido fosfórico que a su vez se esterifica con un segundo grupo alcohol. Esta estructura química les confiere una polaridad muy alta a pH neutro, con una cabeza polar formada por el ácido fosfórico y el segundo grupo alcohol, y dos colas no polares formadas por las moléculas de ácidos grasos (Figura 2.6). Los diferentes fosfolípidos se nombran en función del nombre del grupo alcohol localizado en sus cabezas polares. Por ejemplo, la fosfatidilcolina (lecitina) y la fosfatidiletanolamina contienen, respectivamente, los alcoholes colina y etanolamina en sus cabezas polares. Los fosfolípidos son los lípidos más comunes de las membranas celulares. Debido a su alto carácter anfipático, tienen gran capacidad para formar micelas en solución acuosa de forma espontánea, además de vesículas cerradas llamadas liposomas.

Figura 2.6. Glicerofosfolípido: 1-hexadecanoil-2-(9cis-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfocolina.

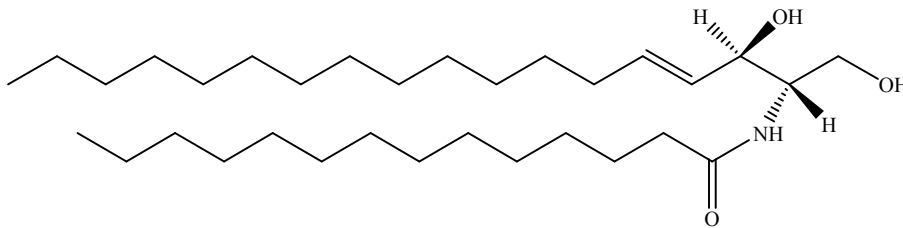


2.1.2.5. Esfingolípidos.

Los esfingolípidos están formados por una molécula de ácido graso de cadena larga, una molécula de esfingosina (aminoalcohol de cadena larga), y un alcohol polar. De entre los lípidos de membrana y después de los fosfolípidos, los esfingolípidos son los más abundantes. Hay tres clases principales de esfingolípidos: las esfingomielinas, los gangliósidos y los cerebrósidos. Las

esfingomielinas son los esfingolípidos más abundantes; así, por ejemplo, la cubierta de mielina que recubre las células nerviosas es muy rica en esfingomielina. Los esfingolípidos contienen fósforo y por esa razón también pueden ser incluidos en el grupo de los fosfolípidos. Cerebrósidos y gangliósidos no contienen fósforo y generalmente forman parte de células cerebrales (Figura 2.7).

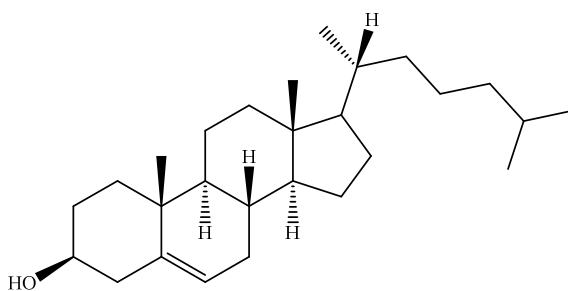
Figura 2.7. Esfingolípido: N-(tetradecanoil)-4-esfingoenina.



2.1.2.6. Esteroides.

Los esteroides son moléculas liposolubles con cuatro anillos condensados. Dentro del grupo de los esteroides, los más abundantes son los esteroides, con un grupo hidroxilo en la molécula. El más representativo de los esteroides es el colesterol. Éste último y sus ésteres con ácidos grasos de cadena larga son importantes componentes de las lipoproteínas plasmáticas y de la membrana celular externa. El colesterol también tiene una cabeza polar (el grupo hidróxilo en la posición 3) y una cola hidrofóbica muy rígida (el resto de la cadena) (Figura 2.8).

Figura 2.8. Esteroide: colesterol.



El colesterol es precursor de las sales biliares, formadas principalmente por sus combinaciones con el ácido cólico y la taurina o la glicina. Debido a sus características anfipáticas (taurina y glicina son hidrofílicas, mientras que el grupo del esteroide es hidrófobo), las sales biliares son potentes agentes emulsionantes. Estas sales se producen en el hígado y se acumulan en la vesícula biliar que las vierte a la parte superior del intestino delgado durante la digestión. A baja concentración y en solución acuosa,

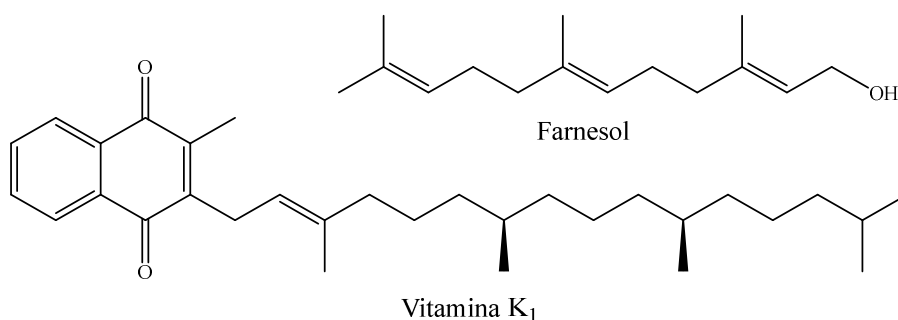
las sales biliares se dispersan en el medio. Sin embargo, en condiciones fisiológicas normales, su concentración en el lumen intestinal excede la conocida como “concentración micelar crítica”. A esta concentración o superior se agregan espontáneamente en micelas cargadas negativamente llamadas “micelas simples” (Roda et al., 1983). Las sales biliares son esenciales en el proceso de emulsificación en el intestino, y por esta razón, en el proceso de digestión-absorción de las grasas del alimento. Una vez los monoglicéridos y los ácidos grasos han sido absorbidos, las sales biliares pueden ser parcialmente reabsorbidas en la parte más baja del intestino delgado, volviendo al hígado para ser usadas de nuevo.

2.1.2.7. Prenoles.

Los prenoles y los esteroides comparten una ruta biosintética común a través de la polimerización de dimetilalil pirofosfato (isopentenil pirofosfato), pero tienen claras diferencias en su estructura y función, por eso se separan en dos categorías distintas.

Así por ejemplo, los terpenos e isoprenoides simples se forman por la adición sucesiva de unidades de 5 átomos de carbono (isopreno) y se clasifican de acuerdo al número de estas unidades. Las estructuras que contienen más de 40 átomos de carbono son conocidos como politerpenos. Los carotenoides son isoprenoides simples importantes que funcionan como antioxidantes y como precursores de la vitamina A. Otra clase importante de moléculas biológicamente importantes son las quinonas e hidroquinonas, que contienen una cola isoprenoide unido a un núcleo quinonoide de origen no-isoprenoide. La vitamina E y vitamina K, así como las ubiquinonas son ejemplos de esta clase (Figura 2.9).

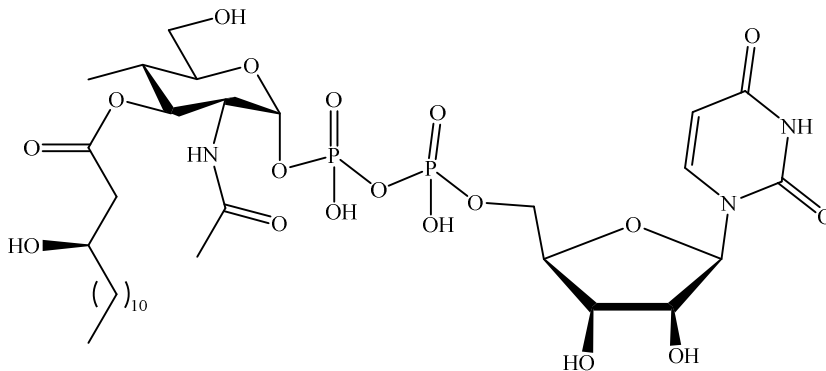
Figura 2.9. Prenoles: Farnesol y Vitamina K₁.



2.1.2.8. Sacarolípidos.

Se refiere a compuestos que contienen al menos un residuo de monosacárido unido por medio de un enlace glicosídico a una unidad hidrófoba: acilglicerol, esfingolípido, ceramida o prenil-fosfato. Este tipo de estructuras también tienen carácter anfipático siendo compatibles con las bicapas de membrana y son muy típicos de bacterias gram negativas (Figura 2.10).

Figura 2.10. Sacarolípidos: UDP-3-O-(3R-hidroxitetradecanoil)-αD-N-acetilglucosamina.



2.2 Digestión y absorción de lípidos.

2.2.1. Introducción.

Los lípidos de la dieta están representados principalmente por los TAG (componentes mayoritarios de grasas y aceites) y en menor proporción por los fosfolípidos, FFA, MAG, DAG, esteroides (colesterol), ceras, pigmentos y otros compuestos. Se trata de sustratos insolubles en agua y tanto la degradación enzimática como su captación por los enterocitos implicados en la digestión y absorción son procesos complicados y lentos.

2.2.2. Digestión de grasas.

El objetivo primario de la digestión de los lípidos es hacerlos hidromiscibles para que puedan absorberse a través de las microvellosidades intestinales que están recubiertas por una capa acuosa.

Si bien existe un cierto grado de digestión de las grasas antes de llegar al intestino delgado gracias a la actuación de las lipasas preintestinales (lipasa oral y lipasa gástrica), su significado funcional es escaso. El proceso de digestión empieza de pleno cuando las gotas de grasa del alimento llegan al

intestino. Allí deben convertirse en gotas menores por acción mecánica. Esta ‘ruptura mecánica’ tiene mucha importancia ya que mejora la relación entre superficie y volumen de la gota de grasa. Este proceso comienza en el estómago por el efecto de movimientos gástricos peristálticos (Freeman, 1984). Cuando el quimo entra en el intestino delgado se mezcla con las sales biliares acelerando así el proceso de emulsión. Los fosfolípidos provenientes del alimento también cooperarán en este proceso de emulsión de los TAG. La emulsión lipídica, por tanto, implica una mezcla de fosfolípidos, sales biliares, TAG, vitaminas liposolubles, y ésteres de colesterol.

Una vez los lípidos están formando la emulsión, la lipasa pancreática actúa en la interfase lípido-agua y cataliza la hidrólisis de los enlaces éster en posiciones 1 y 3 del TAG para liberar dos ácidos grasos libres y un 2-monoglicérido (Figura 2.5) (Laws y Moore, 1963). La colipasa, una proteína de bajo peso molecular secretada por el páncreas, es también esencial para la acción de la lipasa en la emulsión de TAG provenientes del alimento ya que facilita el anclaje de la lipasa pancreática desde el medio acuoso hasta la gota de grasa. Las secreciones pancreáticas contienen también otras enzimas como las fosfolipasas A2 o las carboxil-éster-hidrolasas encargadas de la digestión de fosfolípidos y de colesterol, respectivamente. Los productos de esta lipólisis se separan de la interfase de agua-grasa (de la emulsión) y se incorporan en las micelas simples formadas por las sales biliares. En condiciones fisiológicas normales, la alta concentración de sales biliares y la temperatura del medio, permite a las sales biliares formar espontáneamente dichas ‘micelas simples de sales biliares’. Las ‘micelas mixtas’ se forman también espontáneamente y son el resultado de la interacción entre sales biliares y moléculas polares insolubles en agua, como los MAG, los FFA insaturados de cadena larga y los fosfolípidos. Los centros hidrófobos de estas micelas tienen la capacidad de hincharse y solubilizar otras moléculas liposolubles no polares, como los ácidos grasos saturados de cadena larga, DAG, vitaminas liposolubles y ésteres de colesterol. Por tanto, las moléculas polares son necesarias para la utilización de moléculas no polares. Una vez formadas, las micelas facilitan la absorción de grasa, causando una concentración alta de lípidos en la capa acuosa adyacente a los enterocitos. Más información sobre la importancia de la formación de micelas y emulsiones en los procesos de digestión puede obtenerse en los trabajos de Wilde y Chu (2010) y Golding y Wooster (2010).

La lipasa pancreática es capaz de hidrolizar las posiciones 1 y 3 del triglicérido dando lugar a dos FFA y un 2-MAG (Figura 2.5). Se ha comprobado (Akesson et al., 1978) que alrededor de un 25 % de los ácidos grasos presentes en la posición 2 del TAG migran a posiciones externas (traslocación), concluyéndose que aproximadamente el 75 % de los FA en esta posición, provenientes de la dieta, se mantienen en ella.

En un principio se pensó que la lipasa pancreática era selectiva frente a PUFA n-3 (particularmente 20:5n-3 y 22:6n-3) situados en posiciones externas (Bottino et al., 1967). Sin embargo, con posterioridad se ha comprobado que la presencia de PUFA n-3 en posición sn-1,3 produce que la hidrólisis sea más lenta. Este efecto se resuelve disminuyendo el tamaño de las partículas de los lípidos y facilitando la superficie de contacto con las sales biliares y las lipasas (Ikeda et al., 1995). Estos procesos fueron revisados por Mu y Hoy (2004) y Bauer et al. (2005).

Estos hechos deben considerarse a la hora de incorporar TAG de síntesis en las dietas. Si bien un enriquecimiento con PUFA n-3 aumenta las propiedades nutricionales de la carne y productos cárnicos posteriores, un exceso de los mismos en la dieta del cerdo en posición sn-1,3 produce una hidrólisis más lenta disminuyendo la cantidad de 2-MAG en la mucosa intestinal y ralentizando la reconstrucción del TAG.

2.2.3. Absorción de grasas.

La siguiente etapa en el proceso digestivo de los lípidos es la entrada de los productos de la digestión en la célula del epitelio intestinal (absorción). Este proceso supone el transporte de los compuestos lipídicos insolubles en agua, en un medio acuoso, hasta la vecindad de la membrana del enterocito (borde en cepillo) para que pueda atravesarla. El mecanismo de traslado de los productos de la lipólisis micelar al interior de las células de la mucosa no se conoce en detalle. La teoría más aceptada sugiere que antes de la absorción, es necesaria la ruptura de las micelas (Krogdahl, 1985). Se conoce que el transporte es pasivo, y las proporciones de absorción varían con la longitud de la cadena y el grado de saturación de los ácidos grasos. Una vez atravesada la membrana celular, los lípidos se transportan a través del citosol del enterocito por acción de la proteína de ligazón de ácidos grasos (FABP) (del inglés fatty acid-binding protein) que tiene mayor afinidad por ácidos grasos insaturados

que por los saturados y prácticamente ninguna afinidad por ácidos grasos de cadena media o corta (Ockner 1991; Ockner et al., 1972; Ockner y Manning, 1974). En mamíferos se han aislado dos tipos de proteínas ligadoras de grasa, la I-FABP, específica del intestino delgado, y la L-FABP, presente en el hígado (Sweetser et al., 1987). Mientras la L-FABP tiene una mayor afinidad por los ácidos grasos insaturados, la I-FABP es mucho más inespecífica (Davidson et al., 1991). La función de FABP es transportar los ácidos grasos de cadena larga desde la membrana de las microvellosidades, a través del citosol, hasta el retículo endoplásmico, donde los ácidos se re-esterifican (Mansbach y Gorelick, 2007). Una buena revisión sobre estos procesos lo realizaron Iqbal y Hussain (2009) y Hussain (2014).

2.2.4. Algunos factores que afectan a la digestibilidad de la grasa.

2.2.4.1. Composición de la grasa de la dieta.

En animales monogástricos, la composición y configuración de la grasa de la dieta tiene un efecto significativo en su asimilación, afectando tanto a la digestión como a la absorción. En la digestión, como ya se ha descrito, la lipasa pancreática reacciona de forma más lenta cuanto más larga es la cadena y mayor es el grado de insaturación. En el caso de la absorción, diversos estudios han demostrado que las grasas de la dieta que tienen SFA en posición sn-1 o sn-3 conducen a una mayor pérdida de los mismos por heces (peor absorción) (Apgar et al., 1987; Bracco, 1994; Monsma y Ney, 1993; de Schrijver et al., 1991a y b). La explicación más extendida se basa en que las sales formadas con iones (fundamentalmente Ca^{2+} y Mg^{2+}) de estos FFA son más insolubles cuanto más saturados y de cadena más larga son y, por tanto, tienen dificultada su absorción por el intestino (Denke et al., 1993).

2.2.4.2. Edad.

La leche de la cerda contiene alrededor de un 40% de su materia seca en forma de grasa, la cual sufre aproximadamente el 60% de las necesidades energéticas del cerdo neonato. La eficiencia con la que el lechón convierte los nutrientes de la leche en ganancia de peso indica que es capaz de digerir y utilizar una cantidad elevada de grasa. Sin embargo, en la transición a la alimentación por pienso se produce una disminución en la eficiencia de la digestión probablemente debido a que, por una parte, en la leche las partículas de grasa están ya emulsionadas y finamente divididas, por otra, a variaciones en

la frecuencia con la que se alimentan y, por último, a la posibilidad de la existencia de alguna enzima específica para la digestión de leche provocando que la actividad de la lipasa pancreática esté parcialmente inhibida hasta el destete.

2.3 Metabolismo de lípidos.

2.3.1. Introducción.

La grasa presente en los tejidos animales puede tener un doble origen. Mientras una parte ingresa en el animal con el alimento (origen exógeno) otra fracción es sintetizada por el propio animal (origen endógeno). La cantidad de grasa acumulada en los animales dependerá del balance entre la cantidad de grasa que ingresa en el organismo con el alimento, la que sintetiza el animal y la cantidad de grasa que destina al catabolismo lipídico o a fines metabólicos. Aunque los mecanismos íntimos de regulación de los procesos metabólicos involucrados en la síntesis, transporte y catabolismo de grasas distan mucho de ser totalmente conocidos, un mayor conocimiento de dichos procesos puede ayudar a entender mejor cómo y por qué los animales acumulan y utilizan sus depósitos grasos. En este capítulo se describirán brevemente los procesos metabólicos involucrados en la transformación de otros nutrientes a lípidos (lipogénesis), en la modificación de la grasa exógena o endógena (elongación y desaturación), en el transporte, la distribución y el catabolismo de las grasas.

2.3.2. Lipogénesis.

2.3.2.1. Síntesis de ácidos grasos.

La mayoría de los estudios realizados indica que el tejido adiposo es el lugar anatómico donde se realiza por excelencia la síntesis de FA en rumiantes no lactantes (Vernon, 1981) y cerdos (O'Hea y Leveill, 1969). Por el contrario, en humanos (Vernon, 1981) y aves (Saadoun y Leclerq, 1983), el hígado es la localización más activa mientras que en roedores y conejos, tanto el hígado como el tejido adiposo son comparables en actividad (Vernon, 1981). A finales de los años 60, los estudios de Hanson y Ballard (1967) y de O'Hea y Leveille (1968) establecieron que el acetato y la glucosa eran las principales fuente de carbono en la síntesis de FA en el tejido adiposo de rumiantes y cerdos. Sin embargo, Smith y Crouse (1984) demostraron que la especificidad del sustrato puede variar en función de la localización del depósito de grasa. En los depósitos intramusculares de vacas de carne es la glucosa en lugar del acetato

el que parece ser el sustrato primario en la síntesis de FA. Nafikov y Beitz (2007) hicieron una breve revisión sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos en animales de granja.

El acetyl-CoA es el primer compuesto involucrado en la síntesis de ácidos grasos. El acetyl-

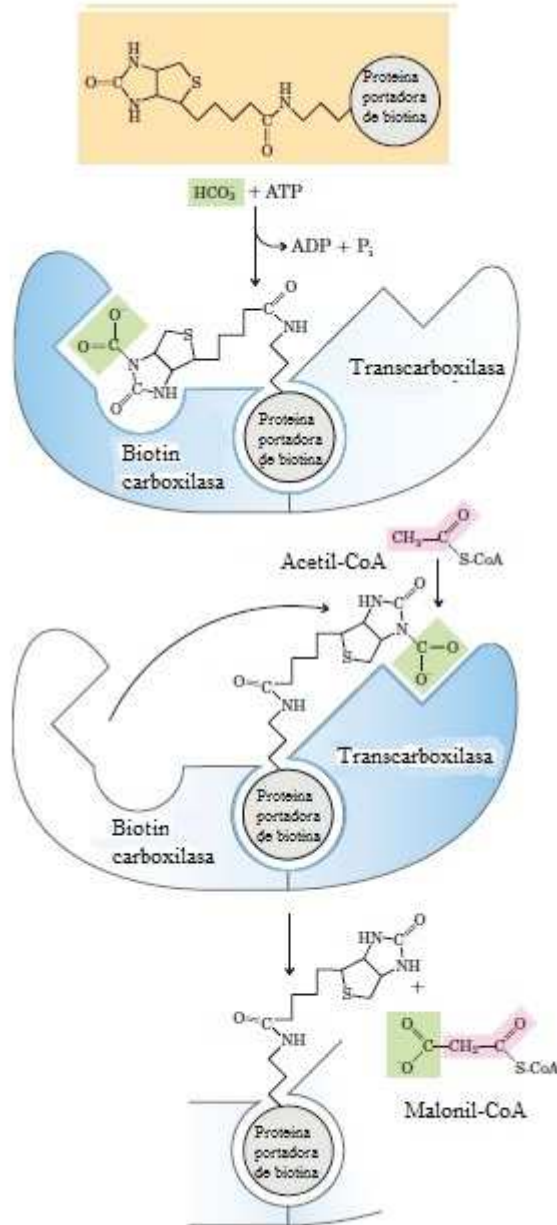


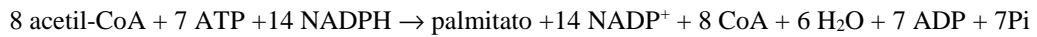
Figura 2.11. Reacción de la acetil-CoA carboxilasa. (Figura tomada y traducida de: *Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition - David L. Nelson, Michael M. Cox*)

CoA puede derivar: (1) de la decarboxilación oxidativa de piruvato (producto final de la oxidación de glucosa), (2) de la ruptura de ácidos grasos exógenos o endógenos, o (3) del catabolismo de aminoácidos, principalmente glicogénicos, como la treonina, alanina y arginina. En la primera reacción de biosíntesis de ácidos grasos (Figura 2.11), el acetyl-CoA se elonga a malonil-CoA en presencia de bicarbonato y ATP por acción de la enzima acetyl-CoA carboxilasa (ACC). El proceso lo facilitan las enzimas biotincarboxilasa y transcarboxilasa.

Posteriormente la cadena se elonga por enlaces sucesivos de acetyl-CoA al malonil-CoA. Este paso está catalizado por el complejo multi-enzimático ácido graso sintetasa (AGS). Se trata de una enzima con 7 centros activos localizados en diferentes dominios totalmente independientes dentro del largo péptido que forma la enzima. En cada uno de ellos ocurre un paso distinto de la

biosíntesis de FA (Figura 2.12). Dicho complejo requiere la presencia de NADPH y H^+ (Leadlay y Baerta-Ortiz, 2003; Smith et al., 2003; Smith y Tsai, 2007). La adición sucesiva de unidades de 2 átomos

de carbono a un cebador de acetilo da lugar a la formación de cadenas de ácidos grasos con un número par de átomos de carbono. Excepcionalmente puede ocurrir que el cebador sea un propionilo, con tres átomos de carbono, por lo que la cadena resultante tendrá un número impar de átomos de carbono. El producto final mayoritario de la síntesis de ácidos grasos en el hígado y en el tejido adiposo, es el ácido palmítico (C16:0) (Rangan et al., 1998) cuya estequiometría de reacción será:

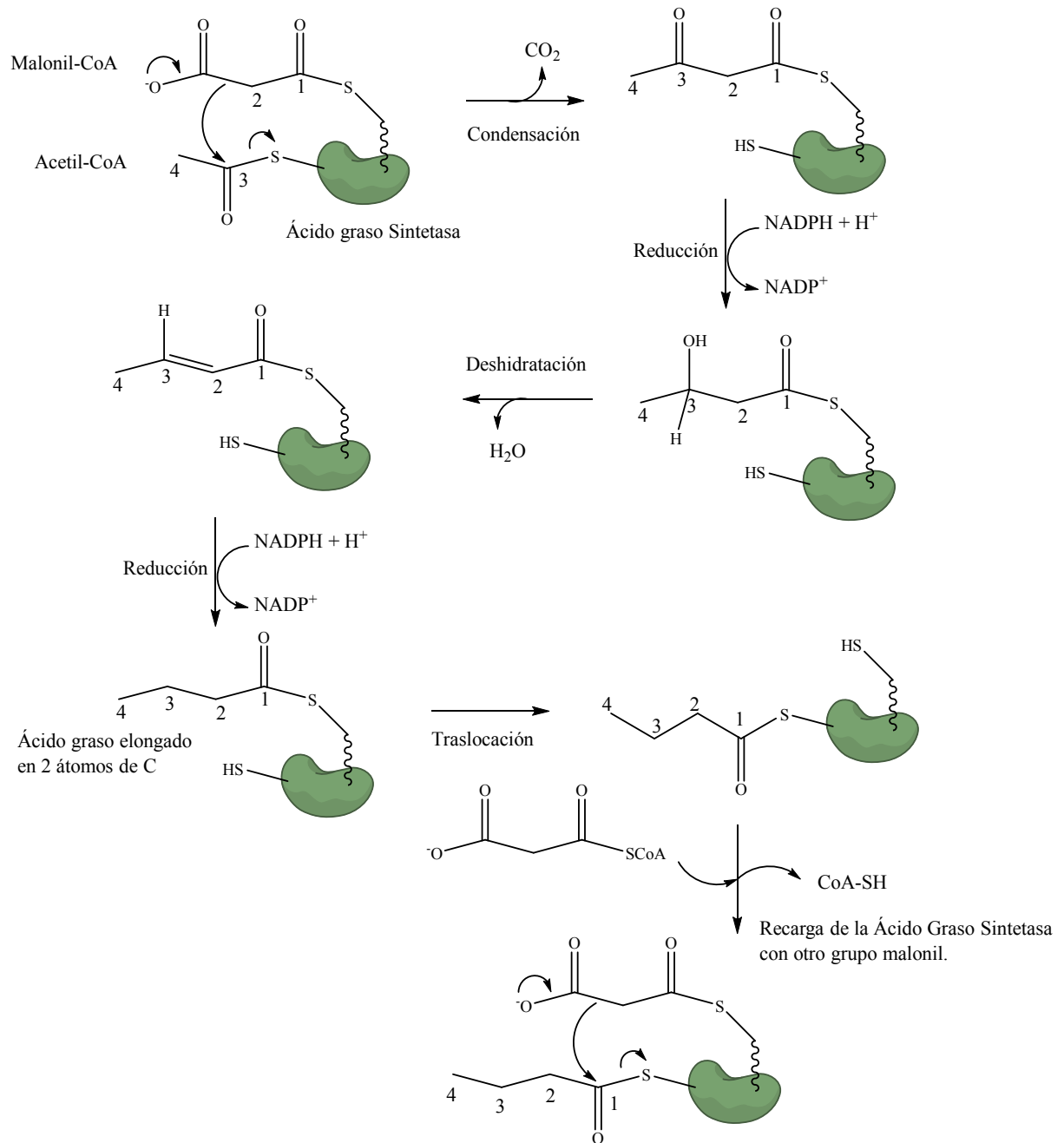


La síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el citosol celular mientras que el acetil-CoA necesario proviene mayoritariamente del piruvato generado en la mitocondria. Por tanto, es necesario transportar el acetil-CoA desde la mitocondria al citosol. Como la membrana mitocondrial interna es impermeable al acetil-CoA, éste debe atravesar la barrera en forma de citrato, que se forma en la matriz mitocondrial por condensación de acetil-CoA con oxalacetato (Figura 2.13). Cuando la concentración de citrato en el interior de la mitocondria es alta, éste se transporta al citosol, donde por acción de la enzima citrato liasa, se rompe para producir de nuevo acetil-CoA y oxalacetato (Figura 2.13).

El oxalacetato, entonces, debe ser devuelto al interior de la mitocondria. Para ello precisa toda una serie de reacciones asociadas, puesto que la membrana mitocondrial interna es también impermeable a este compuesto (Figura 2.13). Estas reacciones generan gran parte del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos. La síntesis de una molécula de ácido palmítico requiere 8 acetil-CoA y 14 NADPH. Por cada acetil-CoA que sale desde la mitocondria al citosol se genera un NADPH. Se forman, por tanto, 8 NADPH cuando 8 moléculas de acetil-CoA salen al citosol. Los 6 NADPH adicionales necesarios para la síntesis de C16:0 provienen de la ruta de la pentosa fosfato.

Como se ha indicado, en las células animales, el C16:0 es el principal ácido graso que puede sintetizar el complejo AGS. Este FA será el precursor de otros ya que puede elongarse formar ácido esteárico (C18:0) o incluso SFA más largos por sucesivas adiciones de grupos acetilo aportados por el malonil-CoA y posterior reducción, deshidratación y de nuevo otra reducción. Los sistemas de

elongación necesarios están presentes en el retículo endoplásmico liso (el más activo) y en las mitocondrias.



Repitiendo lo 4 pasos: condensación, reducción, deshidratación y reducción se sigue elongando en 2 átomos de C.

Figura 2.12. Reacción de la Ácido graso sintetasa y elongación en 2 átomos de carbono de una cadena de ácido graso.

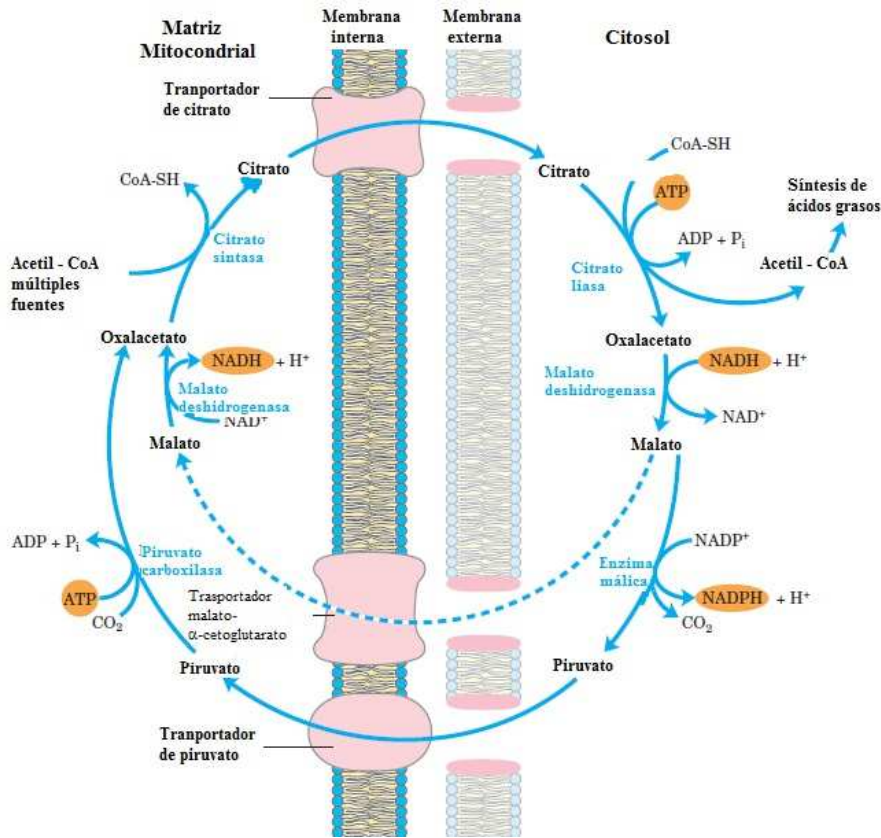


Figura 2.13. Transferencia de grupos acetilo entre la mitocondria y el citosol. Figura tomada y traducida de: Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition - David L. Nelson, Michael M. Cox

El palmitato y el estearato son los precursores de los dos MUFA más comunes en tejidos animales: ácido palmitoleico (C16:1n-7) y oleico (C18:1n-9). El doble enlace se introduce en la cadena por una reacción oxidativa catalizada por la enzima acil-CoA desaturasa. Esta enzima puede introducir dobles enlaces hasta la posición Δ^9 de los FA, pero no puede introducirlos en lugares más alejados del grupo carboxilo, es decir, entre el C-10 y el metilo terminal (Gostinčar et al., 2010; Manabu et al., 2004). Así pues no es posible la síntesis de C18:2n-6 o C18:3n-3 siendo por tanto ácidos grasos esenciales, como ya se ha mencionado en apartados anteriores (2.1.2.1.3) que deben incorporarse al organismo a través de la dieta. Una vez ingeridos, el linoleato puede ser convertido por elongación y/o desaturación en otros PUFA, particularmente γ -linoleico (C18:3n-6), ácido dihomo- γ -linoleico (C20:3n-6) y ácido araquidónico (C20:4n-6) (Figura 2.14).

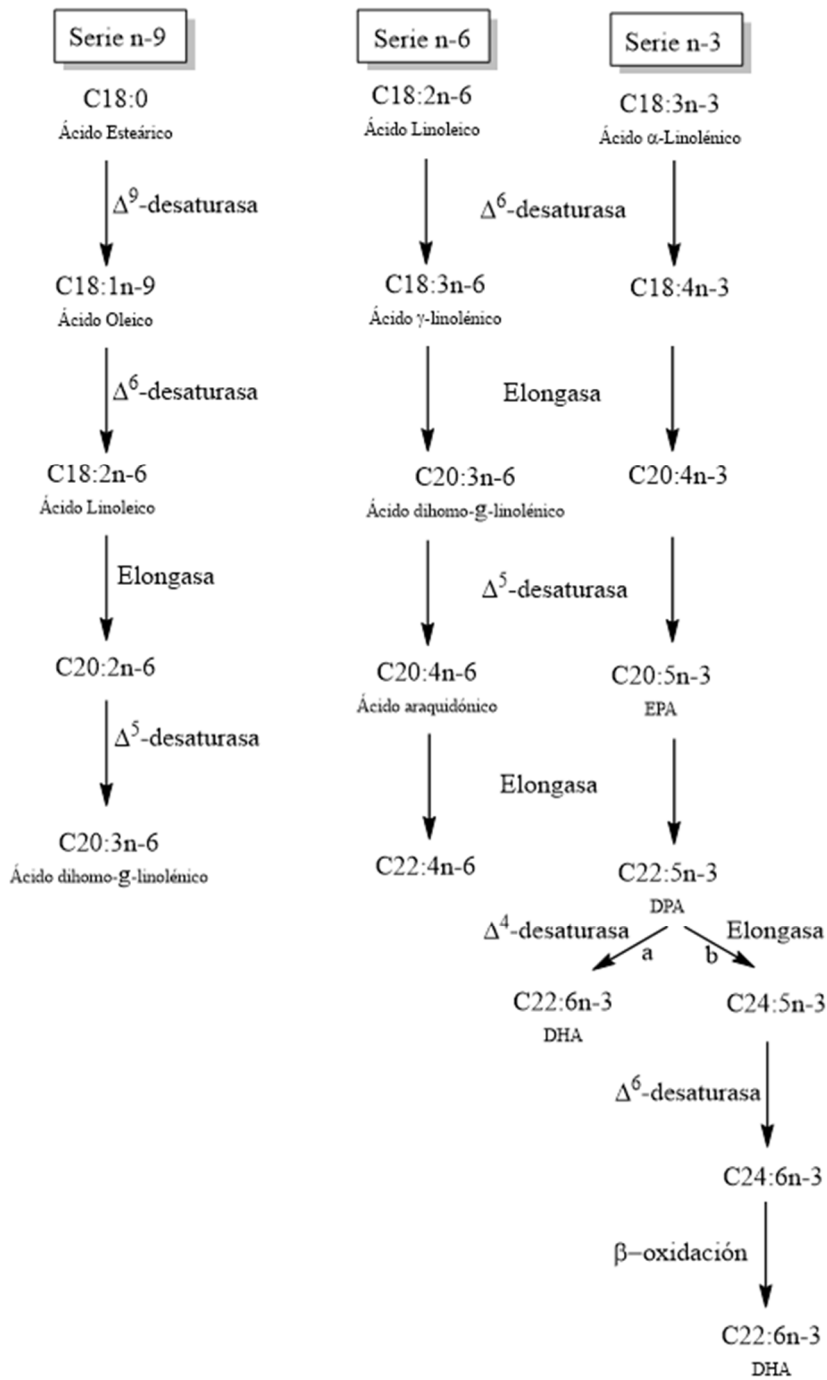


Figura 2.14. Conversión de C18:0, C18:2n-6 y C18:3n-3 en sus metabolitos de cadena larga: a) vía metabólica convencional, b) vía metabólica propuesta por Sprecher et al. (1995). (Raes et al., 2004)

2.3.2.2. Síntesis de glicerolípidos.

La mayoría de ácidos grasos que se acumulan en los tejidos de los seres vivos lo hacen a través de una de las dos vías principales de incorporación: a) constituyen TAG para el almacenamiento de energía o b) estructuran fosfolípidos de membranas. La distribución entre estos destinos depende de las necesidades del organismo. Durante las etapas de crecimiento rápido, la formación de nuevas membranas necesita de gran cantidad de fosfolípidos mientras que si se encuentran cubiertas las necesidades alimenticias por completo, y no está en crecimiento, la mayoría de ácidos grasos derivan a la síntesis de TAG en el tejido adiposo. Ambos destinos comienzan en el mismo punto: la condensación de ácidos grasos con glicerol para la formación de ésteres (TAG) (Wendel et al., 2009).

En tejidos animales, los TAG y glicerofosfolípidos como fosfatidiletanolamina comparten dos precursores (ácido graso-CoA y L-glicerol-3-fosfato) y varios pasos biosintéticos. La gran mayoría del glicerol-3-fosfato deriva del intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por acción de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa acoplada a NAD citosólico. En hígado y riñones, una pequeña cantidad de glicerol-3-fosfato puede sintetizarse por acción de la glicerol kinasa a partir de glicerol (Bartley y Ward, 1985).

El primer paso en la biosíntesis de TAG es la acilación de dos de los grupos hidroxilo del L-glicerol-3-fosfato por dos moléculas de ácido graso-CoA que conduce a una molécula de diacilglicerol-3-fosfato, llamado comúnmente ácido fosfatídico o fosfatidato. Este ácido está presente únicamente a nivel de trazas en las células aunque es el intermediario central en la síntesis tanto de TAG como de glicerofosfolípidos. En la ruta de síntesis de TAG, el ácido fosfatídico se hidroliza a 1,2-diacilglicerol mediante la catálisis de la enzima ácido fosfatídico fosfatasa. Los diacilglicéridos son entonces transformados por transesterificación con un tercer ácido graso-CoA en TAG (González-Baro et al., 2007; Yen et al., 2008).

2.3.3. Transporte.

Como se ha comentado, el transporte de lípidos en los organismos vivos es un proceso complejo. La convivencia entre material altamente hidrofóbico y el agua de la sangre, líquido intersticial

o citoplasma provoca una gran tensión superficial y llevaría asociado un proceso de coalescencia y formación de dos fases, que resultaría incompatible con la vida.

En el caso de los lípidos procedentes de la digestión se produce, en las mismas células epiteliales del intestino delgado, un empaquetamiento de TAG reconstruidos y colesterol con fosfolípidos y proteínas específicas (apoproteínas) de naturaleza anfipática que les permiten ser vehiculados por la linfa y la sangre. Estos agregados son los llamados quilomicrones (Kindel et al., 2010), constituidos, de esta forma, principalmente por lipoproteínas de gran tamaño y poca densidad con elevada proporción de TAG

Una vez formados los quilomicrones en el retículo endoplásmico de las células epiteliales del intestino, se desplazan por el sistema linfático hasta el torrente sanguíneo. Las apolipoproteínas asociadas a quilomicrones incluyen apoB-48, apoE y apoC-II. Ésta última activa la enzima lipoproteína lipasa (LLE) en los capilares del tejido adiposo, corazón, músculo esquelético y glándulas mamarias, permitiendo la liberación de FA en esos tejidos. De esta forma, los quilomicrones, transportan los FA de la dieta a los tejidos para que sean consumidos o almacenados. Una parte de los quilomicrones migran por el torrente sanguíneo al hígado, que es el órgano fundamental en la regulación del transporte de lípidos en el organismo animal, ya sea de origen exógeno (alimentación) o endógeno (síntesis a partir de carbohidratos o proteínas) (Black, 2007; Mansbach y Gorelick, 2007).

Cuando la disponibilidad de TAG en el hígado supera las necesidades energéticas del animal a corto plazo, y para evitar un acumulo excesivo en el órgano, estas moléculas son vehiculadas por el torrente sanguíneo hasta los músculos y el tejido adiposo. Con este fin, los TAG, hidrófobos, se empaquetan de nuevo en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), constituyendo una estructura muy similar a la de los quilomicrones antes señalados. Además de TAG, las VLDL contienen colesterol y ésteres de colesterol junto con apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III y apoE. Una vez en los músculos o en el tejido adiposo, la activación de la lipoproteína lipasa por apoC-II provoca la liberación de FA desde los TAG vehiculados por las VLDL. Los adipocitos reconstruyen nuevos TAG a partir de los FFA y los almacenan. Sin embargo, en el tejido muscular los FFA pueden ser oxidados, con fines energéticos, en

las mitocondrias de los miocitos, o ser almacenados en el interior de los adipocitos, que constituyen la grasa intramuscular. La pérdida de TAG transforma algunas VLDL en LDL (lipoproteínas de baja densidad), muy ricas en colesterol y sus ésteres, que contienen apoB-100 como apoproteína mayoritaria. Las LDL llevan colesterol a tejidos extrahepáticos (Mansbach y Siddiqi, 2010).

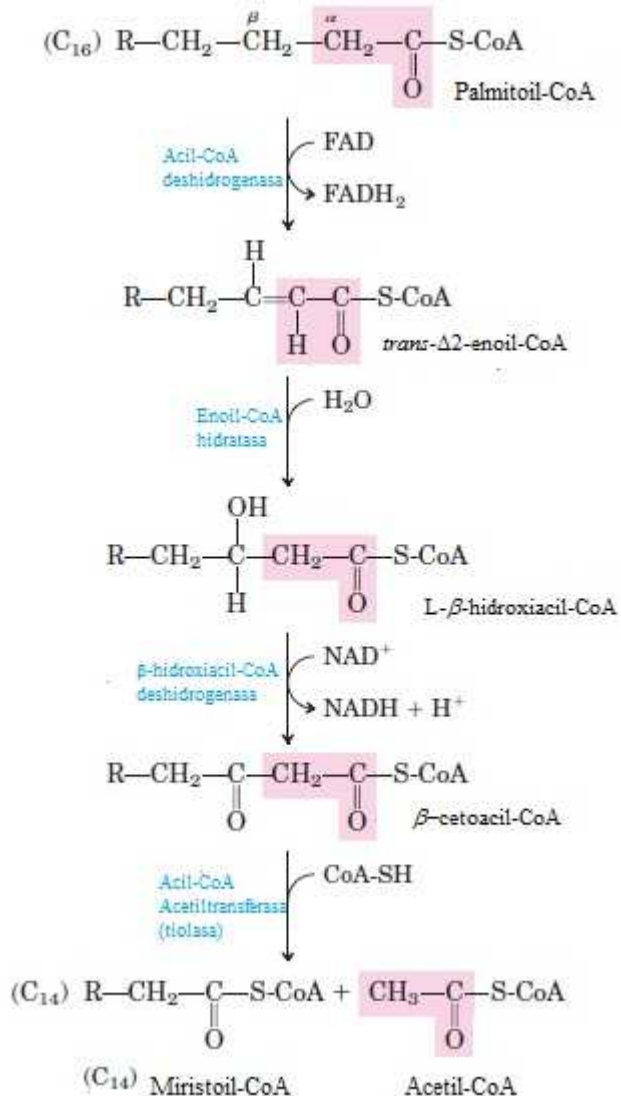
A diferencia de las LDL, las lipoproteínas de alta densidad (HDL), originadas en el hígado y en el intestino delgado, no contienen ésteres de colesterol cuando empiezan a formarse y están constituidas por apoA-I, apoC-I, apoC-II, entre otras apolipoproteínas, y la enzima lecitín-colesterol acil transferasa (LCAT) que cataliza la formación de ésteres de colesterol a partir de colesterol y fosfatidilcolina (lecitina). De esta forma, la LCAT de la superficie de HDL en formación transforma el colesterol y la lecitina de los restos de quilomicrones y VLDL en ésteres de colesterol que van constituyendo el núcleo de la HDL. Las LDL vuelven al hígado donde el colesterol es liberado y parte transformado en sales biliares que son vertidas al intestino delgado.

2.3.4. Lipolisis.

2.3.4.1. Oxidación de los ácidos grasos (β -oxidación).

La β -oxidación de ácidos grasos es una de las principales rutas en el metabolismo animal para obtener energía en forma de ATP. Esta oxidación de los FA tiene lugar en el interior de la mitocondria. Para iniciar el proceso, es necesario que se ‘activen’ con anterioridad a su entrada en la matriz mitocondrial. En el proceso de ‘activación’, los ácidos grasos se unen al CoA en presencia de ATP para formar acil-CoA (Figura 2.15). La reacción de activación tiene lugar en la membrana mitocondrial exterior, y es catalizada por el enzima acil-CoA sintetasa (también llamada ácido graso tioquinasa). Las moléculas de acil-CoA con 12 o menos átomos de carbono pueden cruzar la membrana mitocondrial. Sin embargo, las de cadena larga (la mayor parte de ácidos grasos provenientes de la dieta) no pueden cruzar por sí mismas la membrana mitocondrial interna, por lo que necesitan un mecanismo especial de transporte, que está mediado por la carnitina. Los grupos acilo de los acil-CoA (ácido graso activado) se transfieren a la carnitina para formar acil-carnitina en una reacción catalizada por la enzima carnitina aciltransferasa I. La molécula de acil-carnitina formada se transporta hacia la membrana mitocondrial interna por una translocasa. Una vez situados en el lado de la matriz de la membrana mitocondrial

interna, los grupos acilo de las acil-carnitinas se transfieren a otro CoA para formar de nuevo acil-CoA. Esta reacción está catalizada por el encima carnitina aciltransferasa II. Finalmente la carnitina es devuelta al lado citosólico por acción de la translocasa, y siempre a cambio de una molécula de



acilcarnitina entrante. Un defecto en la actividad de las transferasas o translocasas, o una deficiencia de carnitina, podría dificultar o impedir la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga.

Las moléculas de acil-CoA son degradadas a través de una secuencia repetitiva de cuatro reacciones: (1) oxidación por flavin adenina dinucleotido (FAD), (2) hidratación, (3) oxidación por NAD⁺, y (4) tiolisis por CoA (Figura 2.15).

Figura 2.15. Pasos implicados en la β-oxidación. (Figura tomada y traducida de: Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition - David L. Nelson, Michael M. Cox)

Los productos finales de la β-oxidación de los ácidos grasos, NADH y FADH₂, se oxidarán posteriormente en la cadena respiratoria (Figura 2.16). El acetil CoA se oxidará a través del ciclo del ácido cítrico. El rendimiento neto de la oxidación completa de palmitato es de 129 ATP.

La oxidación de ácidos grasos insaturados es ligeramente diferente y requiere una enzima (isomerasa) que transforme el doble enlace *cis* en *trans* que, como se observa en la Figura 2.15 (a partir de la deshidrogenación de Palmitoil Co-A), ya son intermedios naturales del proceso de β -oxidación.

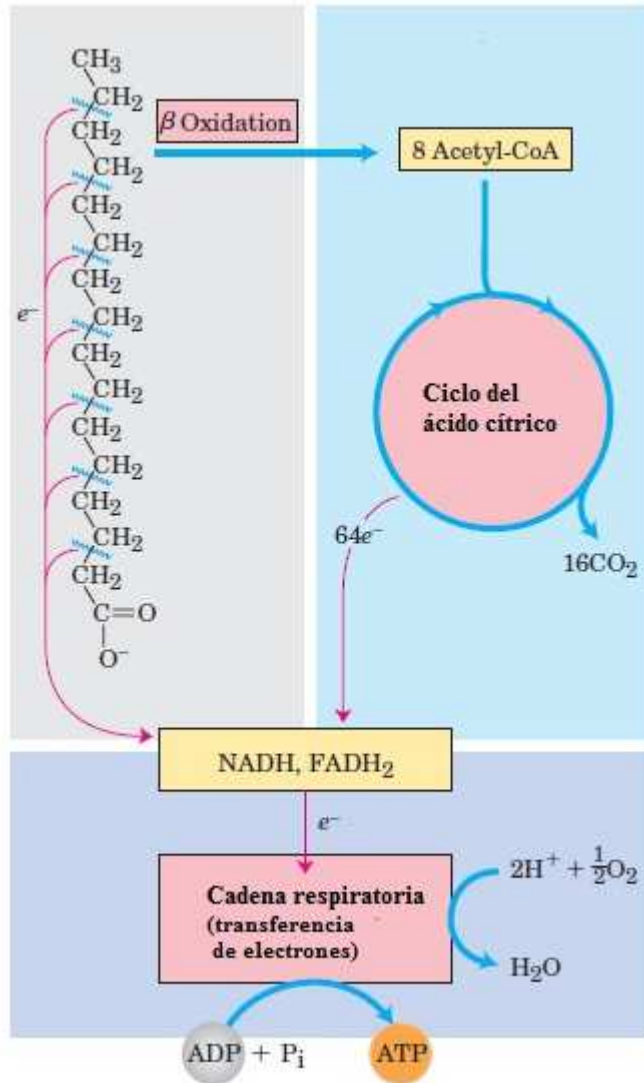


Figura 2.16. Pasos en la oxidación de ácidos grasos y formación de ATP. (Figura tomada y traducida de: Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition - David L. Nelson, Michael M. Cox)

2.3.4.1.1. Regulación de la β -oxidación y su papel en la deposición de grasa.

El ritmo de captación de triglicéridos circulantes (y por tanto la actividad de la LLE) en los distintos tejidos está relacionado con las demandas nutritivas y fisiológicas de los animales (Fielding y Frayn, 1998; Mead et al., 2002). Como el control de la oxidación de ácidos grasos se modula en parte a

través de su concentración plasmática (Newsholme et al., 1993), es lógico pensar que la oxidación de triglicéridos depende también de los requerimientos o necesidades del organismo. Por tanto, situaciones específicas como el ayuno o el ejercicio deberían cambiar la capacidad de los animales para oxidar grasa. Por ejemplo, es bien conocido que en los músculos que se encuentran realizando un ejercicio de baja/media intensidad, la grasa contribuye de forma considerable en sus demandas totales de energía, mientras que si el ejercicio es intenso hay un cambio hacia la utilización de carbohidratos (Newsholme et al., 1993; Brouns y Vusse, 1998). También es conocido, que los músculos que hacen ejercicio regularmente tienen una mayor capacidad para oxidar FA (Romijn et al., 1993; Saltin y Astrand, 1993). Puesto que se ha demostrado que el ejercicio disminuye la deposición de grasa (Meservey y Carey, 1994; Bell et al., 1995), es posible que la mayor capacidad para oxidar FA en los músculos ejercitados sea responsable, al menos parcialmente, del menor engrasamiento. Efectivamente, Chang et al. (1990) demostraron que las ratas con mayor capacidad para oxidar FA eran menos susceptibles a un acúmulo excesivo de grasa corporal. En el mecanismo íntimo de regulación de la capacidad de catabolizar la grasa se encuentran probablemente las bases de la explicación de las diferencias en la retención de grasa en animales producidos en extensivo y en confinamiento y probablemente las diferencias en la capacidad adipogénica provocadas por la domesticación (Crawford et al., 1984).

La capacidad de los animales para catabolizar grasas depende, entre otros factores, de la capacidad mitocondrial para oxidar ácidos grasos, que a su vez es función de la capacidad real del sistema de transporte de carnitina para transferir los FA activados desde el exterior al interior de la mitocondria (McMurray y Hackney, 2005). La actividad de este sistema está regulada a través del malonil-CoA (McGarry et al., 1983; Saggerson et al, 1992) puesto que el malonil-CoA (el producto de la primera reacción en la síntesis de FA) es un potente inhibidor de la carnitina pantoiltransferasa I (CPT-I). Durante el ejercicio, por ejemplo, la formación de malonil-CoA disminuye y, por tanto, la capacidad de transportar los FA a través de la membrana mitocondrial aumenta (Winder et al., 1989). La sensibilidad de la CPT-I a la inhibición de malonil-CoA parece diferir de unos tejidos a otros y estaría influenciada, entre otros factores, por la composición en FA de la grasa del alimento (Power et al., 1994; Power y Newsholme, 1997). Este efecto se analizará en profundidad más tarde en este mismo capítulo.

El ayuno parece también aumentar la actividad de la CPT-I (Drynan et al., 1996), provocando la movilización de los lípidos del tejido adiposo produciendo una mayor concentración en sangre de ácidos grasos no esterificados (Drynan et al., 1996). Además, el ayuno disminuye la concentración de malonil-CoA en el suero y en los tejidos (McGarry et al., 1983; Drynan et al., 1996) produciendo, por ambas razones, una mayor oxidación de los lípidos.

Algunos factores relativos a la alimentación se han correlacionado también con la actividad de carnitina aciltransferasa. Por ejemplo, se ha observado que alimentar ratas con productos ricos en grasa provoca un aumento en la actividad de carnitina aciltransferasa muscular (Cheng et al., 1997).

2.3.4.2. Formación y utilización de cuerpos cetónicos.

En las células hepáticas, el acetil CoA proveniente de la oxidación de ácidos grasos sólo entra en el ciclo del ácido cítrico si la degradación de grasas e hidratos de carbono están apropiadamente equilibradas (Stryer, 1988). Sin embargo, si predomina el catabolismo de grasas, el acetil-CoA hepático tendrá un destino diferente. La razón es que la entrada de acetil CoA en el ciclo del ácido cítrico depende de la disponibilidad del oxalacetato para la formación de citrato (véase Figura 2.13). Pero la concentración de oxalacetato desciende si no hay suficiente utilización metabólica de hidratos de carbono. En estas condiciones, el acetil CoA se desvía hacia la formación de cuerpos cetónicos (acetoacetato, β -hidroxibutirato y acetona) (Figura 2.17). El acetoacetil-CoA es el resultado de la condensación de dos moléculas de acetil CoA por la inversión de la reacción de tiolisis de la oxidación de ácidos grasos (Figura 2.17). El acetoacetil-CoA da lugar a acetoacetato libre que puede reducirse a β -hidroxibutirato en una reacción reversible catalizada por la β -hidroxibutirato deshidrogenasa. El acetoacetato y el β -hidroxibutirato pueden considerarse como las formas solubles y transportables en agua de unidades acetilo. Las mitocondrias hepáticas son incapaces de oxidar cuerpos cetónicos. Sin embargo, las mitocondrias de varios tejidos extrahepáticos, como el muscular y el cerebral, sí pueden hacerlo. El β -hidroxibutirato se reconvierte en acetoacetato en las mitocondrias de tejidos extrahepáticos por acción de una β -hidroxibutirato deshidrogenasa NAD-acoplada. El acetoacetato así formado se convierte entonces en acetoacetil CoA por traslado de un grupo CoA desde el succinil CoA. El acetoacetil CoA resultante se escinde por una tiolasa para formar dos grupos acetil CoA que ya pueden

entrar en el ciclo del ácido cítrico. Finalmente, el acetoacetato también puede sufrir descarboxilaciones espontáneas para formar acetona, aunque esta reacción es más lenta (Figura 2.17).

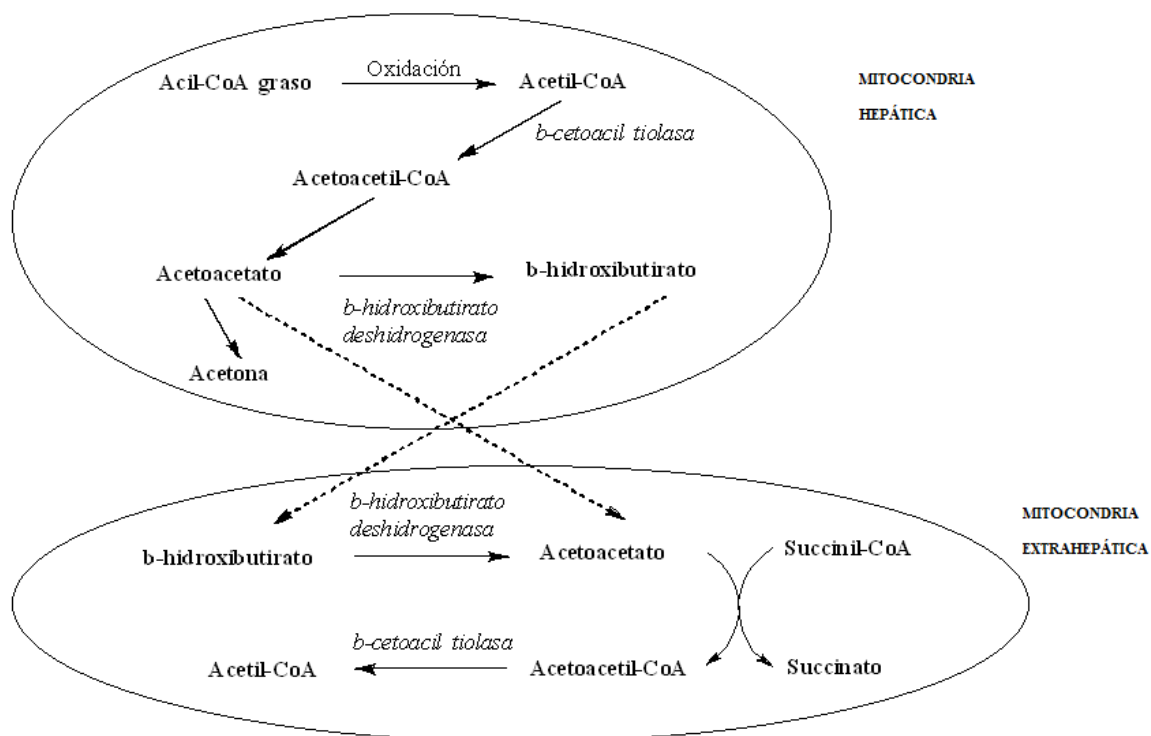


Figura 2.17. Ruta de formación y utilización de cuerpos cetónicos.

2.3.4.3. Movilización de lípidos del tejido adiposo.

La movilización de lípidos almacenados en las células grasas depende de la hidrólisis de triglicéridos por acción de la enzima lipasa sensible a hormonas. La actividad de esta enzima aumenta después de una breve exposición de las células grasas a un buen número de hormonas distintas, incluyendo la epinefrina, la norepinefrina y el glucagón (Langin, 2006).

La hidrólisis de triglicéridos por la enzima lipasa sensible a hormonas libera FFA que salen de la célula hacia el torrente circulatorio donde son transportados ligados a la albúmina plasmática. La actividad de la enzima lipasa sensible a hormonas se regula por un mecanismo de control en cascada cuyo efecto estimulante comienza cuando una hormona se une a un receptor específico situado en la superficie de la célula grasa. Este proceso activa la enzima adenil ciclasa que convierte ATP en AMP

cíclico (cAMP), que a su vez activa la enzima proteína quinasa A. Esta última convierte (por fosforilación) la enzima lipasa sensible a hormonas de la forma inactiva a la forma activa, siendo capaz de transformar los TAG almacenados en FFA y glicerol (Wang et al., 2008).

2.4 Acumulación de grasa en tejidos del cerdo.

La reducción de la acumulación de grasa ha sido durante décadas el objetivo fundamental en producción porcina debido, por una parte, a que ésta es mucho menos eficaz y rentable para la producción de derivados cárnicos que la fracción magra y, por otra, al hecho de que en las sociedades modernas existe una baja demanda de grasas y mantecas, debido a su relación con diversas patologías (enfermedades cardiovasculares, obesidad, etc.). El elevado coste de producción y el bajo precio de comercialización han hecho que buena parte de los esfuerzos de selección y mejora genética así como de la producción animal, incluida de alimentación y manejo, se hayan encaminado a este fin. En esta línea de trabajo, se ha logrado reducir el contenido de grasa total de la canal de porcino desde valores iniciales que superaban el 30-40 % a menos del 20% en el momento actual (Nguyen y McPhee, 2005; Tribout et al., 2012). La grasa corporal en el cerdo se acumula mayoritariamente debajo de la piel (grasa subcutánea) y en localizaciones intracavitarias (grasa perirrenal, mesentérica, etc...), pero también en adipocitos localizados entre las fibras musculares. Es la denominada grasa intramuscular (Kouba y Sellier 2011; Monziolis et al., 2007).

2.4.1. Grasa intramuscular.

2.4.1.1. Introducción.

La grasa intramuscular (IMF) es un indicador de la calidad de la carne puesto que proporciona sabor, consistencia, aroma y jugosidad (Fernández et al., 1999), a la vez que reduce la percepción de dureza. Como se ha mencionado, durante las últimas décadas, la industria porcina se ha encaminado a producir canales con un elevado contenido en tejido magro y un bajo contenido en tejido adiposo. Puesto que el tejido adiposo es de desarrollo tardío, la elección del momento óptimo de sacrificio, se ha situado a edades tempranas, en el punto en el que la acumulación magra es máxima y antes de que el engrasamiento sea excesivo. Dado que el contenido en IMF se encuentra muy relacionado con el engrasamiento total de la canal (Kouba et al., 1999), las medidas tomadas para su reducción han

provocado de modo colateral una disminución del contenido de IMF, hasta niveles, en muchos casos, más allá de lo mínimo deseable (Wood, 1990) para el desarrollo de una adecuada calidad sensorial así como para la elaboración de determinados productos cárnicos.

En la bibliografía se encuentran indicaciones que señalan que para mantener los atributos de calidad, es preciso que la carne contenga al menos un 2% de IMF (Bejerholm y Barton-Gade, 1986), si bien, nuestras costumbres gastronómicas y la tradición en el procesado de la carne hacen que en nuestra área de producción se prefieran carnes con un contenido claramente superior, especialmente en carnes destinadas a la elaboración de derivados cárnicos. Así, estudios basados en análisis sensoriales, han mostrado que los consumidores prefieren carnes con un nivel de IMF no inferior al 3% (Fernández et al., 1999).

El contenido en IMF depende de factores genéticos y ambientales. Respecto a los primeros, los cruces con animales de raza Duroc se han utilizado ampliamente en producción porcina para conseguir mejores propiedades tecnológicas y organolépticas de la carne relacionadas con un mayor contenido en IMF. En cuanto a los factores ambientales, el manejo nutricional es especialmente importante. Hasta el momento, las estrategias nutricionales, encaminadas al incremento de IMF, se fundamentaban principalmente en un aumento energético de la ración consiguiendo un mayor engrasamiento general de la canal e indirectamente un incremento de la intramuscular. No obstante, es preciso recordar que la alimentación proporciona muchos factores de regulación que pueden permitir modular el metabolismo animal dentro de unos márgenes razonables, de modo que se pueda modificar el reparto de grasa y favorecer su acumulación entre las fibras musculares sin modificar marcadamente el engrasamiento global y por tanto la eficiencia productiva.

En base a lo mencionado, hay que tener en cuenta que no todos los depósitos grasos son negativos, en algunas localizaciones, como es el caso de la IMF, una disminución excesiva repercute directamente sobre la calidad de la carne. Es importante, por tanto, que en las estrategias de producción porcina se diferencien con nitidez según afecten al conjunto de la grasa corporal o específicamente a la IMF.

2.4.1.2. Influencia del tipo genético.

Existen numerosos trabajos que abordan las diferencias existentes entre los distintos cruces y razas de cerdos en aspectos productivos (Blasco et al., 1994; Blanchard et al., 1999a) y características sensoriales de su carne y de los productos cárnicos derivados (Guerrero et al., 1996; Estévez et al., 2003). Gran parte de estas diferencias son atribuibles a las distintas frecuencias alélicas de determinados genes del cerdo. Existen claros ejemplos de la existencia de determinados genes relacionados con los atributos de calidad de la carne, como el gen halotano relacionado con la aparición de hipertermia y carnes PSE, o las carnes ácidas producidas por el gen RN-, que provoca un pH, a las 24 horas, mucho más bajo de lo normal.

Tradicionalmente, los programas de mejora genética del cerdo blanco han incidido fundamentalmente, en la consecución de animales de elevada eficiencia productiva con el fin de rentabilizar las explotaciones. Productores e industriales se encuentran especialmente interesados en incrementar parámetros como la ganancia media diaria, el índice de transformación del alimento, el rendimiento a la canal así como en el desarrollo de ciertas partes nobles y el porcentaje de magro de la canal (Daza y Mateos, 2004). Como se ha mencionado, el aumento de la proporción de carne magra en la canal ha dado lugar a una reducción en el contenido de IMF debido al antagonismo genético existente entre carne magra y contenido en IMF (De Vries et al., 1992; De Vries et al., 1994; Seillier, 1998). Así, la carne de las razas Duroc, Hampshire, y de las tradicionales británicas, de bajo nivel de selección, en lo que a acumulación de magro se refiere, ofrecen mejores características sensoriales y mayor grado de aceptabilidad por los consumidores que la de las razas muy seleccionadas, como Large White, Landrace y Pietrain. Por ello, en los países en los que la carne de cerdo tiene un elevado contenido magro, se están llevando a cabo intentos para elevar la calidad gastronómica de este tipo de carne aumentando su contenido en IMF. Una de las prácticas más extendidas para conseguirlo es el cruce de los animales con cerdos de la raza Duroc, en la que el contenido de IMF es considerablemente mayor, pudiendo llegar, en algunos casos al 5-8 % (Wood et al., 1994). Este hecho se asocia además, a unos índices productivos y reproductivos similares a los de razas porcinas empleadas en la producción cárnica intensiva (Large White, Landrace, Pietrain, etc.) (Seillier, 1998; Blanchard et al., 1999b; Latorre et al., 2003). En la

actualidad, la raza Duroc se emplea con frecuencia como macho finalizador en pureza, o en el cruce con otras razas en los programas de cruzamiento con tres o cuatro razas (Blasco, 1996). Este mayor contenido en IMF, conocido en términos productivos como “efecto Duroc”, ha convertido a esta raza en una interesante alternativa para la obtención de híbridos comerciales con el fin de aumentar la calidad sensorial de la carne fresca de cerdo. Debido a la relativamente elevada heredabilidad de este carácter, ($h^2 = 0.4-0.5$), (De Vries et al., 1994; Sellier y Monin, 1994), esta técnica ha proporcionado resultados muy positivos incluso en el caso de híbridos que tienen sólo el 25 y el 50 % de genes Duroc. Blanchard et al. (1999b) encontraron porcentajes de IMF de 1,0, 1,1 y 1,8% y valores de la terneza (evaluada mediante una escala de 1 a 8 puntos, de menor a mayor) de 4,9, 5,0 y 5,3 en cerdos 0%, 25% y 50% Duroc, respectivamente. Sin embargo, se han obtenido algunos resultados contradictorios. La utilización del Duroc, en esquemas de cruzamiento, puede empeorar la calidad de la canal al generar un aumento del grado de engrasamiento y un empeoramiento de la conformación de la misma, no faltando, incluso, experimentos en los que al utilizar líneas de Duroc muy seleccionadas para las características productivas, no se obtuvieron mejoras significativas de las características organolépticas de la carne (Edwards et al., 1992; Alonso et al., 2009). Lebret et al. (2001), en cerdos cruzados (MLS) [(machos de líneas sintéticas) x (Large White x Landrace)] frente a cerdos Duroc x (Large White x Landrace), sacrificados a los 110 kg, observaron menor rendimiento a la canal, mayor contenido de magro, menor porcentaje de grasa de la canal y una proporción de jamón más elevada. El contenido de IMF y de colágeno en los músculos *Longissimus dorsi* y *Biceps femoris* fue superior en los cerdos hijos de padres Duroc que en los de machos sintéticos.

Por otra parte, en la actualidad las nuevas tecnologías relacionadas con la genética molecular, como el uso de marcadores moleculares, han permitido obtener un número creciente de QTL (*quantitative trait loci*) relacionados con parámetros productivos y de calidad de la carne de cerdo (Seillier, 1998; Garnier et al., 2003). Entre los principales QTL detectados en esta especie, destacan especialmente los relacionados con el nivel de engrasamiento de la canal y el contenido y composición de la IMF (Gerbens et al., 1997; Carrión et al., 2002). Dado que este último condiciona en gran medida

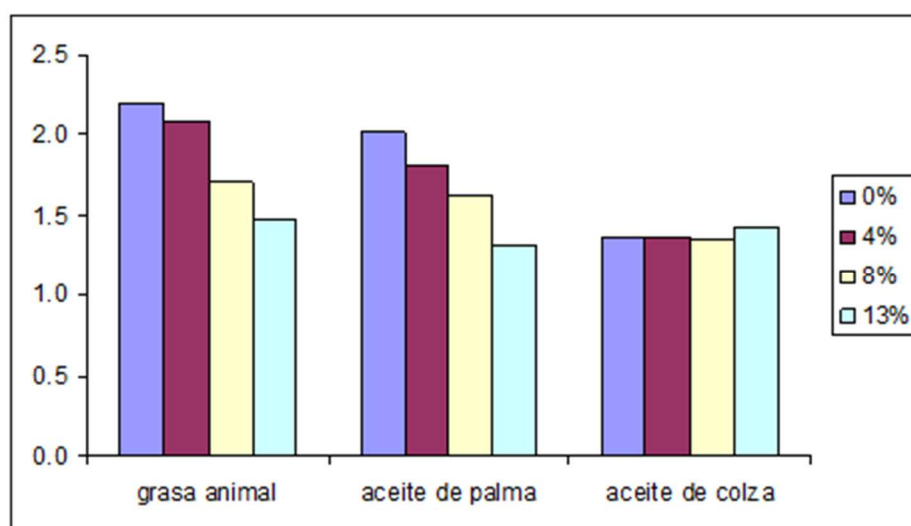
la calidad de la carne y de los productos cárnicos, este parámetro se ha incluido en numerosos esquemas de selección genética (Wood, 1990; Seillier, 1998).

2.4.1.3. Influencia del tipo de grasa de la ración.

La inclusión de distintos tipos de grasa en la alimentación porcina presenta numerosas ventajas nutricionales tales como el incremento de la concentración energética del pienso, reducir el estrés calórico y mejorar la eficacia del alimento. Asimismo, presentan ventajas tecnológicas como reducir la formación de polvo, mejorar el aspecto y la estructura del pienso, lo que incrementa la palatabilidad y el consumo (Sanz et al., 2000). En la producción porcina actual es preciso utilizar piensos con una alta concentración de nutrientes. En consecuencia, las grasas, que son una importante fuente de energía, se añaden en las raciones en cantidades relativamente elevadas (4-6%). Con este objetivo, en la alimentación porcina se emplean con frecuencias grasas de origen animal, como el sebo o la manteca, y los aceites vegetales, como el aceite de soja o de girasol (Flachowsky et al., 2008). La diferencia principal entre las grasas animales más comunes y los aceites vegetales reside en el grado de saturación de sus ácidos grasos y la distribución posicional de los mismos en los TAG. En general, los aceites vegetales son más ricos en PUFA que las grasas animales.

La mayor parte de los trabajos que han estudiado el efecto de los distintos tipos de grasa en la ración se han enfocado hacia las diferencias existentes en la digestibilidad en función de su composición en FA (Durán-Montgé et al., 2008; Jorgensen y Fernández, 2000) o hacia su influencia sobre el perfil de ácidos grasos de la grasa de la canal (Wiseman et al., 2000; Flachowsky et al., 2008). En general, se asume que una vez absorbidas, las grasas se usan de forma idéntica para fines metabólicos. Esta asunción ha hecho que la información relacionada, por ejemplo, con el efecto del grado de saturación de la grasa de la ración sobre la acumulación de grasa sea muy limitada. Algunos autores han señalado que la grasa saturada aumenta el engrasamiento de la canal e incluso el contenido en IMF (Sanz et al., 1999), pero la información es poco consistente. En ganado porcino los trabajos en relación con esta temática son escasos, siendo el pollo la especie animal en la que más se ha estudiado. Así, Sanz et al. (1999), suministraron a pollos de carne tres dietas isoenergéticas que diferían exclusivamente en la fuente de grasa añadida (sebo, manteca y aceite de girasol) para evaluar el efecto de las mismas sobre la

acumulación de grasa abdominal e IMF. Los resultados mostraron que a medida que el contenido de grasa poliinsaturada aumentaba en las dietas, disminuía significativamente la acumulación de grasa abdominal e intramuscular. Madsen et al. (1992) observaron en cerdos que a medida que se incrementaba el grado de saturación de las grasas suministradas a los animales se aumentaba el contenido de IMF, a la vez que ésta última disminuía según se incrementaba el contenido en grasa en el pienso (Figura 2.18). Los tipos de grasa utilizadas fueron grasa animal (con alto contenido en ácidos grasos saturados), aceite de palma (grasa saturada pero de origen animal) y aceite de colza (que contiene un elevado porcentaje de MUFA) todas ellas incluidas a distintos niveles (0, 4, 8 y 12%).



Fuente: Madsen et al. 1992

Figura 2.18. Contenido en grasa intramuscular en cerdos en cebo, en función del tipo de grasa incluido en la dieta (grasa animal, aceite de palma y aceite de colza) y de su porcentaje de inclusión en el pienso (0, 4, 8, 13%).

El mayor porcentaje en IMF correspondió a los animales que habían consumido grasa animal seguido por los alimentados con aceite de palma y los que recibieron aceite de colza. Dentro de cada tipo de grasa, la IMF fue inversamente proporcional al nivel de grasa incluido en la ración. Varios autores confirman que estos hechos pueden ser debidos a que el uso metabólico de las grasas se ve afectado por la distribución posicional de los FA (sobre todo por la ubicación de los SFA) en el TAG.

En trabajos realizados por Bracco (1994) y por Mu y Hoy (2004) se comprobó que, tanto la digestión (facilidad para formar micelas que impiden o facilitan el trabajo de la lipasa pancreática) como la absorción (formación o no de jabones cálcicos o magnésicos), estaban influenciadas por la naturaleza del FA (saturado o insaturado o de cadena larga o corta) y por su posición en la molécula de TAG. Resultados similares fueron obtenidos por Innis (2011). Este autor revisó los efectos de la estructura de TAG en la nutrición infantil y concluyó que aproximadamente el 70% de los FA en la posición sn-2 de los TAG de la dieta se conservaba en la formación de los quilomicrones, además la absorción y acumulación eran mayores si en esa posición había un SFA y observó que, en el caso de los lactantes, este FA debía ser mayoritariamente C16:0.

Los FA presentes en los tejidos animales provienen, bien de la acumulación directa de los ácidos grasos del pienso, sin apenas modificación, o de la síntesis *de novo* a partir de hidratos de carbono y aminoácidos (Shorland, 1952). Los animales monogástricos sólo sintetizan *de novo* ácidos grasos saturados y monoinsaturados a partir de estos precursores. En consecuencia, y como se ha mencionado, los ácidos grasos linoleico y linolénico, depositados en los tejidos, provienen obligatoriamente del alimento (Garton y Duncan, 1954). En monogástricos, el perfil de FA de la grasa de la dieta se refleja marcadamente en la composición de FA de los tejidos (Jorgensen et al., 1996) y por tanto, en el porcino el tipo de grasa incluido en la dieta afecta considerablemente la calidad de su carne. Para el tejido adiposo y la IMF, se han establecido relaciones cuantitativas entre la ingestión de PUFA y la composición de FA de los tejidos (Nguyen et al., 2003). En la Tabla 2.3 puede observarse el perfil de FA en la grasa subcutánea e IMF en función del tipo de grasa incluida en la dieta, según distintos autores. Como ya se ha mencionado, el hecho de que el FA en sn-2 no se hidrolice puede condicionar en buena medida los procesos de acumulación de grasa de origen digestivo, ya que no todos los FA del TAG siguen la misma ruta metabólica.

Metz y Dekker (1981) observaron que los cerdos que recibían una alimentación carente de FA sintetizaban un 55% de MUFA (C16:1n-7 y C18:1n-9) y un 45% de SFA (C16:0 y C18:0). En general, se ha relacionado la síntesis de grasa endógena con la elevada inclusión de carbohidratos en la dieta. En

la actualidad, se está incrementando la inclusión en la dieta de glicerol, que también promueve la lipogénesis.

Los trabajos realizados por Chwalibog y Thorbek (1995) se reitera que la formación y degradación de TAG del tejido adiposo depende del estatus energético del animal. Los cerdos alimentados *ad libitum* en la fase de cebo se encuentran en balance energético positivo, es decir, apenas movilizan la grasa acumulada. Además existe una prioridad metabólica para utilizar preferentemente la energía de los ingredientes de la ración de modo que hasta que no se gasta la energía de los carbohidratos no se empieza a utilizar la de los lípidos. En consecuencia, se acepta que prácticamente toda la grasa del alimento se retiene en el cuerpo del cerdo con pocas modificaciones y que en la fase de cebo existe una relación estrecha entre el tipo de grasa ingerida y la depositada (Miller et al., 1990).

Sin embargo, la situación en la práctica es más complicada, ya que en determinadas ocasiones el animal utiliza la grasa para fines metabólicos aunque se encuentre en balance energético positivo (Chwalibog y Thorbek, 1995). Se ha observado que la utilización de grasa para fines metabólicos depende de su nivel de inclusión en el pienso, siendo prácticamente nula si el nivel es bajo, pero aumenta con la concentración de grasa en el pienso. Además, probablemente dependa del tipo de FA considerado, puesto que los SFA parecen utilizarse con menor prioridad para fines metabólicos que el ácido linoleico (López Bote et al., 1999). De ahí, que el uso de grasas ricas en ácido linoleico desencadena el uso de este ácido graso para fines metabólicos, de modo que no llega a acumular tanto en los tejidos como cabría esperar.

Tabla 2.3. Perfil de ácidos grasos en la grasa subcutánea e intramuscular en función del tipo de grasa incluida en la dieta, según distintos autores.

Autor	Tejido	Fuente	Ácidos grasos						
			C16:0	C18:0	C18:1n-9	C18:2n-6	SFA	MUFA	PUFA
Wiseman y Agunbiade, 1998	grasa de paletilla	Aceite de colza	13.0	7.0	43.1	20.7			
		Soja	14.6	6.3	27.2	41.2			
		Sebo	19.4	9.5	43.3	18.0			
Mitchoathai et al., 2007	grasa subcutánea	Soja	20.9 ^b	11.0 ^b	36.0 ^b	22.3 ^a	33.7 ^b	41.0 ^b	24.6 ^a
		Sebo	23.0 ^a	12.8 ^a	39.1 ^a	11.5 ^b	38.2 ^a	46.0 ^a	13.4 ^b
Flachowsky et al., 2008	grasa subcutánea	Sebo	24.7 ^a	14.6 ^a	44.6 ^b	8.2 ^d			
		Aceite de oliva	22.7 ^b	12.3 ^b	48.3 ^a	9.3 ^c			
		Soja	22.7 ^b	13.7 ^a	36.5 ^c	18.8 ^a			
	grasa intramuscular	Aceite de lino	22.0 ^b	13.8 ^a	35.6 ^c	11.9 ^b			
		Sebo	25.4	11.8	42.3 ^{ab}	8.9 ^b			
		Aceite de oliva	25.9	12.1	44.3 ^a	9.5 ^b			
	Soja	25.0	12.3	38.0 ^c	13.9 ^a				
	Aceite de lino	25.7	12.8	39.2 ^{bc}	10.6 ^b				

Diferentes superíndices indican que las medias son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

2.4.1.4. Cuantificación de la grasa intramuscular.

La extracción sólido-líquido ha sido durante décadas el método más empleado para la cuantificación de la IMF. Esta metodología se basa en la adición de un disolvente orgánico sobre un sólido para extraer y solubilizar ciertos componentes hidrófobos, separándose por gravedad o filtración el material insoluble restante.

Los lípidos son solubles en un amplio rango de disolventes orgánicos. Sin embargo, la mezcla modelo para su extracción debe ser lo suficientemente polar para desligarlos de sus asociaciones con las membranas celulares y de otros componentes de los tejidos, lo suficientemente apolar para disolver por completo los triglicéridos y otros lípidos menos polares (colesterol y derivados) y, obviamente, no debe reaccionar químicamente con ellos (Christie y Han, 2010).

Los métodos desarrollados por Folch (1957) y por Bligh y Dyer (1959) han sido los más referenciados y usados en la extracción cuantitativa de los lípidos durante años. Ambos métodos se basan en la utilización de mezclas de cloroformo – metanol ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$) añadidas directamente sobre la muestra de carne triturada. Marmer y Maxwell (1981) desarrollaron un método que permitía la separación, en columna de gel de sílice, de lípidos neutros (mayormente colesterol y triglicéridos) y lípidos polares (mayormente fosfolípidos) a partir de una muestra de carne o producto cárnico y, por adición, la determinación de contenido total de grasa. Todos estos protocolos convencionales consumen mucho tiempo y necesitan un gran volumen de disolvente lo que los hace inapropiados para el análisis rutinario. Además, el cloroformo tiene un impacto negativo elevado en la salud humana y en el medio ambiente debido a su alta volatilidad y bajo límite de seguridad, contaminando el aire del lugar de trabajo (1-2 ppm) (International Labor Organization, 2009).

Otros métodos, como el propuesto por Sukhija y Palmquist (1988), extraen y metilan los FA en un solo paso mediante la utilización de disoluciones ácidas (HCl o H_2SO_4) y mezclas tolueno-metanol. En este caso, la cuantificación del total de FA se lleva a cabo con un patrón interno y, a partir de ésta, se estima la cantidad de grasa total.

La búsqueda de nuevos y más precisos métodos de extracción de lípidos en carne y productos cárnicos es un campo que no pierde vigencia. De hecho, cada grupo de investigación adapta los métodos tradicionales a sus muestras y forma de trabajo y desarrolla nuevos protocolos. Pérez-Palacios et al. (2008) realizaron una comparativa de métodos para la cuantificación de lípidos totales en carne y productos cárnicos e Iverson et al (2001) compararon entre las metodologías de Folch y Bligh y Dyer aplicadas a tejidos marinos.

Por otra parte, también se están adaptando nuevas tecnologías para la cuantificación de IMF. Metherel et al. (2009) y Ayuso et al. (2013) pusieron en práctica la utilización de ultrasonidos para aumentar la extracción de lípidos de la matriz sólida y disminuir el tiempo empleado en la extracción. Sahena et al. (2009) revisaron las aplicaciones comerciales y desarrollo de la extracción mediante CO₂ supercrítico en la industria alimentaria. Huang et al. (2014) han puesto a punto un método para dicha cuantificación utilizando imágenes de infrarrojo cercano hiper-espectrales pero, puesto que se trata de un método no invasivo, no es posible realizar posteriores estudios tales como el perfil de FA y el fraccionamiento de los mismos.

2.4.2. La grasa subcutánea.

En la comercialización de la carne fresca, la consistencia de la grasa tiene una gran importancia porque determina la apariencia y facilidad de manipulación. De todos los ácidos grasos, el que muestra una correlación más elevada con la consistencia de la grasa del cerdo es el C18:0 seguido del C18:2n-6, si bien en los límites de variación más próximo a los valores comerciales es éste último el principal responsable. Algunos trabajos clásicos realizados en el Reino Unido con carne fresca o destinada a la producción de bacon establecen un umbral crítico del 15% en la concentración de C18:2n-6 en la grasa subcutánea del cerdo, valor a partir del cual empiezan a presentarse problemas de grasas blandas o aceitosas o “floppy meat” (Wood et al., 1978). La gran mayoría de autores coinciden con esta recomendación para carne fresca. En partidas de carne destinadas a la elaboración de embutidos (Stiebing et al., 1993) y jamones crudos madurados (Boulard et al., 1995) establecen un límite del 12% para el C18:2n-6. Este es un valor de referencia para un buen número de industriales chacineros en el área Mediterránea. Más próximo a nuestro entorno, aunque sea un problema ligeramente diferente, es el

caso del Cerdo Ibérico destinado a la elaboración de chacinas, donde el límite máximo recomendable (incluso en los cerdos alimentados con piensos compuestos) se establece en el 9-10%.

El control de la concentración de C18:2n-6 en la grasa del cerdo puede abordarse desde dos perspectivas diferentes atendiendo al control de la alimentación. Se deberá analizar por una parte, el nivel de inclusión del mismo en la grasa y, por otra, el tiempo de administración de cierta dieta. Serán las condiciones del mercado en cada caso, y el nivel de exigencia de la concertación final de C18:2n-6, los que permitan el diseño de la estrategia más adecuada, como la elaboración de una mezcla de grasas que se administre durante toda la fase de crecimiento/cebo o administrar raciones de alto contenido en C18:2n-6 hasta un momento determinado antes del sacrificio y restringir a partir de ahí el aporte de este nutriente añadiendo o no nutrientes que incrementen la síntesis *de novo* de FA.

Queda por mencionar que, dentro de la grasa subcutánea, se pueden encontrar varias capas o niveles con diferente composición. Fundamentalmente se habla de una capa externa pegada a la piel (OUTER) y una capa más interna por debajo de la anterior (INNER). Aunque los procesos metabólicos que conducen a diferencias en la composición no son completamente conocidos, se estima que la adaptación a la temperatura externa debe influenciar notablemente. Bee et al. (2002), Cámara et al. (1996) y Lefaucheur et al. (1991), entre otros autores, observaron que en la capa OUTER existe un menor metabolismo lipídico que en la INNER. Ésta última exhibe en mayor medida los efectos de la síntesis *de novo* de FA lo que provoca que la acumulación de los PUFA (principalmente C18:2n-6) de la dieta quede diluida en esta capa y se observe mejor en la OUTER. Además, generalmente se puede comprobar que el índice de insaturación (UI) sigue un gradiente negativo desde la piel hacia el interior (Bee et al., 2002; Monziois et al., 2006).

2.4.3. Papel de la grasa en la calidad sensorial y tecnológica de la carne y productos elaborados.

La grasa (especialmente la IMF) contribuye a la jugosidad de la carne y productos cárnicos mejorando la lubricación del bolo alimenticio durante la masticación, evitando las pérdidas de agua durante el cocinado y estimulando la salivación (Wood et al., 1986). El efecto de lubricación durante la

masticación es especialmente importante en el caso de productos que han sufrido un proceso de secado, como el jamón, donde la grasa se convierte en el primer determinante de la jugosidad (Ruiz et al., 2000). Del mismo modo, existe una relación entre el contenido en IMF de la carne y su ternura. Parece ser que dicha relación tiene que ver con la mejora de la jugosidad, con el efecto protector sobre las proteínas cárnicas durante el cocinado (disminuyendo su coagulación, y por lo tanto disminuyendo la dureza) y con una disminución global de la densidad de la carne. Otros autores han postulado que la IMF, por situarse en el tejido conectivo perimisial, disminuye la resistencia del mismo a ser cortado durante la masticación (Essén-Gustavsson et al., 1992).

Por otro lado, la composición en FA de la carne de cerdo influye también en otros aspectos de calidad relacionados con la consistencia y fluidez de la grasa, el desarrollo del aroma de la misma o con la susceptibilidad a que se desarrollen procesos oxidativos. La consistencia y fluidez de la grasa puede medirse mediante la determinación del punto de fusión o de deslizamiento que es inversamente proporcional al número de insaturaciones y directamente proporcional a la longitud de la cadena (Smith et al., 1998). De esta forma, cuanto mayor es la proporción de FA insaturados de la grasa presentará una mayor fluidez, lo que afecta a la textura y aspecto de la misma (L{Ruiz-Carrascal, 2000 #430}ópez-Bote et al., 2002). Si la grasa presenta una alta proporción de PUFA, a temperaturas de refrigeración se encontrará en estado líquido. Esto no sólo afecta al aspecto de la carne, sino que en el caso de las piezas empleadas en la producción de jamones o paletas, la grasa al formar una capa exterior hidrófoba, dificulta la difusión de sal y agua, afectando de forma significativa al proceso de salazón y deshidratación de las piezas (Ruiz-Carrascal et al., 2000).

La oxidación lipídica es una de las reacciones que presenta un mayor interés desde el punto de vista de la calidad de la carne. Este tipo de procesos se inician tras el sacrificio del animal, momento en el que se inactivan los mecanismos biológicos de protección. Con la muerte del animal se desencadena una secuencia de hechos caracterizados por el cese del flujo sanguíneo, la acumulación de ácido láctico en los tejidos, el descenso del pH y el cese de los mecanismos celulares capaces de controlar los procesos oxidativos (Morrissey et al., 1996). A medida que aumenta el número de dobles enlaces de los FA crece la susceptibilidad de los mismos a sufrir procesos oxidativos, de manera que los PUFA son altamente

sensibles, mientras que los SFA apenas se oxidan (Horwitt, 1986). Así, un incremento en la proporción de PUFA en la composición de los lípidos del músculo, hace que éste presente una menor estabilidad a las reacciones de oxidación. Esta es una de las razones que explican cómo los procesos oxidativos en el músculo se inician en la membranas de las células y de los orgánulos citoplasmáticos, donde se ubican los fosfolípidos que contienen una mucho mayor proporción de PUFA (Ashgar et al., 1988) y además esta localización favorece la interacción con enzimas y compuestos como el hierro que actúan como catalizadores de la oxidación.

Como consecuencia de la oxidación lipídica se forman hidroperóxidos, que posteriormente se descomponen dando lugar a una amplia variedad de compuestos volátiles y no volátiles con importantes repercusiones en el aroma y sabor de la carne. En la carne cruda, como consecuencia de este tipo de reacciones, se originan olores y sabores desagradables (olor a rancio, sabores anómalos, etc.), que suelen acompañar a los procesos de alteración de la carne, junto con decoloración y pérdida de uniformidad en el color, derivados de la oxidación de determinados pigmentos de la carne, y alteraciones de la textura y de la apariencia al producirse exudado, por ruptura de membranas celulares o por formación de enlaces cruzados entre proteínas (Buckley et al., 1989). Cuando la carne cocinada recibe un nuevo tratamiento térmico, tras un periodo prolongado de almacenamiento en refrigeración o congelación, se aceleran las reacciones de oxidación dando lugar a aromas indeseables. Los olores y el perfil de compuestos aromáticos, derivados de la oxidación lipídica en carne cruda son diferentes, pero se piensa que los compuestos responsables son los mismos y la única variación es la relativa a las concentraciones (St Angelo et al., 1987). En múltiples experiencias, se ha puesto de manifiesto el papel de la oxidación del componente lipídico en el desarrollo aromático y sávido de productos cárnicos fermentados y curados (Lammers et al. 2011; Martín et al. 2009; Soto et al. 2010).

No obstante, y a pesar de su implicación positiva sobre el aspecto, la jugosidad y la ternura, un veteado excesivo no es valorado positivamente ya que los consumidores consideran que este elevado contenido graso perjudica su salud (Miller, 1994).

Puede concluirse que, las estrategias encaminadas a disminuir el contenido graso en la carne pueden repercutir negativamente sobre atributos como la jugosidad, la textura y el sabor de la misma, propiciando carnes más secas, duras y fibrosas. No obstante, hay que tener en cuenta que la acumulación de la IMF parece tener lugar fundamentalmente en etapas relativamente tardías del cebo del animal, lo que implica que para que su contenido sea alto, el sacrificio de los animales debe llevarse a cabo a pesos elevados. En el caso de carne de cerdo blanco para consumo en fresco, el sacrificio a pesos muy elevados implicaría un aumento de otros depósitos grasos de escaso valor comercial.

2.5 Glicerol en alimentación animal.

2.5.1. Generalidades.

El glicerol es un subproducto de las industrias de transformación de grasas animales o vegetales en biodiesel y, puesto que esta industria está creciendo en los últimos años, el volumen de glicerol disponible es cada vez mayor y, por tanto, su precio asequible.

Su nombre sistemático es 1,2,3-propanotriol y es un líquido viscoso incoloro, inodoro y con sabor dulce. Es completamente soluble en agua y alcoholes y parcialmente en muchos disolventes orgánicos comunes como acetato de etilo, dietil éter o dioxano e insoluble en hidrocarburos. Sus temperaturas de ebullición y fusión a presión atmosférica son 290 y 17 °C respectivamente. Tiene una densidad de 1.26 g/ml a 25 °C y un peso molecular de 92 uma (McGraw-Hill, 2005).

El biodiesel se produce por transesterificación de grasas animales o vegetales (Figura 2.19). En condiciones óptimas de procesado, 100 litros de grasa o aceite producirían 100 L de biodiesel y 10 L de glicerol, aunque al requerirse posteriormente operaciones de refinado la recuperación es de 79 g de glicerol por cada litro de biodiesel.

considerable avance en este campo. Principalmente se comprobó que la adición de entre un 5 y un 10 % de glicerol en cebo provocaba un aumento en el consumo y ganancia media diaria de peso. Este resultado puede deberse tanto al sabor dulce del glicerol como a la mejora en la estructura del pienso que produce su incorporación (Kijora et al., 1995; Kijora y Kupsch 1996). Un exceso de glicerol se excreta por la orina, probablemente debido a la activación de la glicerol-kinasa a glicerol-3-fosfato que limita su absorción (Doppenber y Van der Aar 2007). Kijora (1997) realizó un estudio con la inclusión de un 10% de glicerol en la dieta de cerdos y obtuvo canales con un menor espesor de grasa dorsal y un aumento de las concentraciones de C16:0 y C18:0 en la misma.

Lammers et al. (2007) comprobaron que el glicerol podía incorporarse en la alimentación de lechones sin alterar su crecimiento y desarrollo y Doppenberg y Van der Arr (2007) sugirieron su conveniencia en dieta de cerdas lactantes ya que podría prevenir una excesiva pérdida de grasa, promover un mejor uso de los aminoácidos y reducir el metabolismo de proteínas incrementando así la producción de leche, el contenido proteico de la misma y la fertilidad. Mourot et al. (1994) observaron que la inclusión de glicerol en la dieta provocaba un aumento en la capacidad de retención de agua (CRA) de ciertos músculos del cerdo lo que conllevaba una disminución en las pérdidas por exudado o al cocinarla. Doppenberg y Van der Arr (2007) también observaron un aumento de la capacidad de retención de agua al incorporar glicerol en las dietas de acabado lo que puede ser de gran interés para la industria de procesado de la carne.

2.6 Análisis reológico de la grasa.

2.6.1. Generalidades.

La Reología es la ciencia que estudia la deformación de los materiales sometidos a la acción de fuerzas externas (Bird, 1998). El estudio del comportamiento reológico es esencial en numerosos campos y para múltiples aplicaciones (como mecánica de suelos, fatiga de materiales, procesado de polímeros, procesos interfaciales, etc.), incluido el de la Tecnología de los Alimentos. Sin embargo, su aplicación en el ámbito alimentario, especialmente en el caso de los alimentos sólidos, es muy limitado y en muchos casos su análisis se reduce a parámetros relacionados con la textura. En la elaboración industrial, en cualquier sector, el análisis reológico contribuye a: (1) Controlar los procesos, (2)

Optimizar el diseño de máquinas y equipos de procesado, (3) Adecuar las características de una producción y (4) Controlar la calidad de producto.

A pesar de que el comportamiento reológico de los alimentos es complejo, su conocimiento es de gran utilidad, debido al importante papel que desempeña en muchas fases del procesado y manipulación. Su estudio comprende las propiedades mecánicas, y está íntimamente relacionado con la textura del alimento. De una forma general, podría decirse que para un material dado al que se aplica una determinada fuerza, las propiedades mecánicas se limitan a su respuesta ante dicha fuerza, las reológicas explican su deformación y flujo, y la textura se ciñe a las impresiones sensoriales percibidas en la boca. Por tanto, las propiedades mecánicas, entre las que se encuentran la *tenacidad*, la *dureza* y la *fragilidad*, dependen de la resistencia de un material frente a la aplicación de distintas fuerzas (tracción, compresión, impacto, etc.), y la textura es una sensación subjetiva provocada por el comportamiento mecánico y reológico del alimento durante la masticación y la deglución. En conjunto, el comportamiento reológico está condicionado por las características físicas del material, que últimamente dependen de la estructura del mismo.

2.6.2. Análisis del perfil de textura (TPA).

La textura de un alimento se define como el conjunto de atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto, perceptibles mediante receptores mecánicos, táctiles y, si es apropiado, visuales y auditivos (ISO 5492-1992). La textura es una de las características sensoriales más valoradas por el consumidor (Bourne, 2002) y juega un importante papel en el establecimiento de preferencias individuales por determinados alimentos. En este sentido, pequeñas diferencias de textura entre productos similares pueden ser determinantes en el grado de aceptación del alimento por el consumidor.

Entre los métodos instrumentales empleados para la determinación de la textura, el más extendido es, sin duda, el ensayo de imitación de doble compresión denominado de forma genérica análisis de perfil de textura (TPA, *Texture Profile Analysis*). Diversos estudios (Bourne 2002; Honikel, 1998) recogen su empleo en una amplia gama de alimentos, junto con las condiciones de ensayo. El éxito de este método se debe a que proporciona datos del comportamiento mecánico (dureza,

cohesividad, viscosidad, elasticidad, adhesividad, fracturabilidad, masticabilidad y gomosidad) que pueden relacionarse de forma razonablemente precisa con el proceso de masticación (Bourne, 1978 y 2002) y con la percepción sensorial. En la boca, el alimento se somete fundamentalmente a fuerzas de compresión (entre los dientes y lengua y paladar), penetración y corte (dientes). A este respecto, analizadores de textura, como el texturómetro de General Foods o de ensayo universal Instron, se diseñaron para simular el proceso de masticación (Szczesniak, 1963; Bourne, 1978, 2002). En la actualidad, con esta concepción, se encuentran distintos equipos o texturómetros. Estos equipos permiten un estudio amplio del comportamiento de los materiales ante distintas sollicitaciones. En el TPA, la masticación se imita sometiendo las muestras generalmente a dos ciclos de compresión-descompresión sucesivos. El comportamiento de la muestra se recoge en gráficas en las que se relaciona la fuerza aplicada y el tiempo de ensayo (Figura 2.20).

Los parámetros de compresión obtenidos son: dureza (N), fuerza máxima necesaria para comprimir la muestra; elasticidad (m), capacidad de la muestra de recuperar su forma tras la retirada de la fuerza de deformación; adhesividad (N·s), área bajo la abscisa tras la primera compresión; cohesividad, punto hasta el cual la muestra puede deformarse antes de su ruptura; gomosidad (N), fuerza para desintegrar una muestra de carne semisólida por deglución (dureza · cohesividad); masticabilidad (J), trabajo necesario para masticar la muestra antes de la deglución (dureza · cohesividad · elasticidad) (Figura 2.20).

Estos parámetros se han utilizado ampliamente en diversos alimentos (cárnicos, quesos, ovoproductos, etc.) como indicadores de la calidad del producto final, así como para la selección de ingredientes, mejora de formulaciones o establecimiento de condiciones de procesado (Bruna et al., 2000; Gimeno et al., 2000; de la Hoz et al., 2004; Mendoza et al., 2001; Muguerza et al., 2001; Tunick, 2000; Visessanguan et al., 2004).

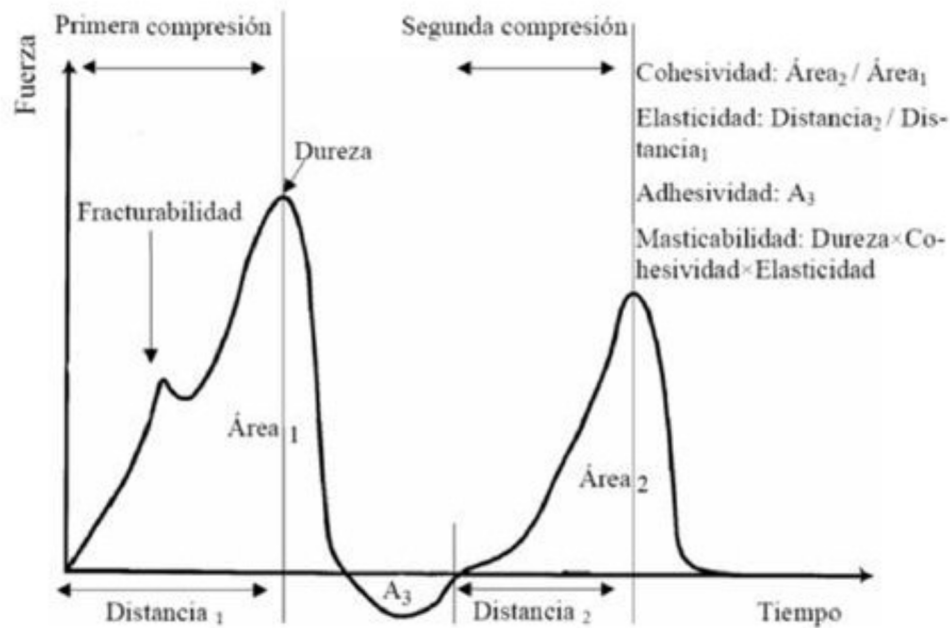


Figura 2.20. Gráfica característica del análisis de perfil de textura (TPA) y principales parámetros obtenidos.

En nuestro caso, es conocido que cambios en la composición del tejido adiposo de cerdo pueden causar problemas en los procesos tecnológicos de elaboración de productos cárnicos al haber cambios en la consistencia y estabilidad oxidativa de los mismos. Houben y Kroll (1980) analizaron el efecto del almacenamiento en la consistencia de la grasa y Gandemer (2002) y Maw et al. (2003) observaron que los productos cárnicos manufacturados con grasas blandas mostraban defectos de calidad como: secado insuficiente, apariencia oleosa, rancidez temprana o falta de cohesividad entre músculos y tejido adiposo al cortar. Una revisión del papel de las propiedades físicas y reológicas de la grasa en la calidad de los productos cárnicos elaborados fue publicada por Hugo y Roodt (2007).

3 . PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .

El sector porcino es el primero de la ganadería española con una producción anual que supera los 4.000 millones de euros, lo que sitúa a España como el segundo productor de la Unión Europea. La producción de carne de este sector se destina aproximadamente en un 60 % al consumo directo y en un 40% a la producción industrial de derivados cárnicos, con un considerable valor añadido. La industria cárnica ocupa el primer lugar del sector de alimentos y bebidas y representa el primer subsector exportador de la parcela agroalimentaria española. España ocupa el cuarto lugar en la producción de elaborados cárnicos en la UE. Dada la relevancia económica, social y comercial de la industria cárnica, en especial de la de porcino, sus demandas y necesidades ejercen una gran influencia en todo el sector productivo, condicionando la mayor parte de las decisiones técnicas y económicas. Ante la creciente competitividad de los países del Este de Europa, la proyección y el desarrollo del sector porcino en el ámbito de la Unión Europea depende en gran medida del desarrollo tecnológico que permita producir derivados cárnicos diferenciados, con características que se adapten a las preferencias del consumidor europeo y que presenten una calidad uniforme y contrastada. Por tanto, resulta interesante establecer estrategias de producción encaminadas a incrementar los parámetros de calidad de la carne de porcino y de los productos derivados. En este sentido, la grasa intramuscular y el perfil de ácidos grasos juegan un papel especialmente importante ya que repercuten directamente tanto en la aptitud tecnológica de la carne como en la calidad sensorial y particularidades nutricionales de los productos derivados.

En este contexto, el autor de esta tesis planteó el trabajo de investigación que se recoge en la misma con el objetivo principal de determinar el efecto del tipo de grasa (palma y manteca en cerdos blancos y manteca con os in adición de glicerol y girasol y montanera en ibéricos), utilizada en la última fase del cebo en distintos atributos del componente lipídico (intramuscular y de depósito) de su carne y de los productos derivados (jamón curado). Para la consecución de este propósito se afrontaron los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar el efecto de la fuente de grasa utilizada en la alimentación de los animales en la cantidad de grasa intramuscular.

2. Analizar la distribución de ácidos grasos en los triglicéridos de animales cebados con distintos tipos de grasas

3. Estudiar las características reológicas de la grasa subcutánea de cerdos alimentados con distintos tipos de grasa y establecer su relación con la morfología de los triglicéridos.

En el desarrollo experimental de esta tesis, y ante las dificultades y deficiencias halladas en las técnicas de cuantificación de la grasa intramuscular y de estudio de la estructura de los triglicéridos que se encuentran en la bibliografía científico-técnica, se abordaron, de forma paralela, los siguientes objetivos metodológicos:

- a. – Desarrollar un método preciso, rápido y de bajo coste de ejecución para la cuantificación de grasa intramuscular.
- b. – Seleccionar el método más adecuado para el análisis estructural de triglicéridos de la grasa de porcino.

En conjunto, la tesis doctoral se planificó para abordar objetivos de carácter científico y técnico. Por una parte, se pretendía incrementar el conocimiento existente sobre la estructura de los triglicéridos de grasa de porcino alimentados con distintos tipos de grasa y su relación con atributos de textura, como dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad, masticabilidad y gomosidad, y con características físicas, como el punto de fusión. El estudio se ha realizado tanto en carne fresca como tras su procesado para obtener jamón curado. Se estima que esta parte del trabajo, constituye un primer paso para el establecimiento y diseño de dietas (en la última etapa del cebo) que permitan obtener animales con un componente graso con determinadas características reológicas.

De otro lado, en el desarrollo experimental de la tesis, se consideró la necesidad de plantear metodologías alternativas a las actualmente utilizadas para la cuantificación de grasa intramuscular, que empleando material común de laboratorio, permitan analizar un número elevado de muestras por unidad de tiempo y requieran un mínimo consumo de disolventes. Para el estudio de la estructura de la molécula de triglicéridos se están utilizando fundamentalmente dos métodos, sin que se hayan encontrado

referencias de trabajos en los que se contrasten los resultados derivados de ambos procedimientos o se proceda a valorar su viabilidad para el análisis de la grasa de porcino. En el afán de subsanar estas carencias y optimizar la metodología para el estudio de los triglicéridos en porcino, se ha realizado un análisis comparativo de los mencionados métodos enzimáticos y se ha procedido a su adecuación para abordar las experiencias planteada en esta tesis doctoral.

4. RESULTADOS.

4.1 CAPITULO 1: A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis.

Los resultados del presente capítulo se recogen en el siguiente artículo:

A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis.

J. Segura y C.J. Lopez-Bote

Food Chemistry, 145 (2014), 821.-825.



Analytical Methods

A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis



J. Segura, C.J. Lopez-Bote*

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2012

Received in revised form 21 November 2012

Accepted 29 August 2013

Available online 7 September 2013

Keywords:

Intramuscular fat

Fat analysis

Fatty acids

Lyophilised samples

Low solvent volume

ABSTRACT

A new procedure to extract intramuscular fat (IMF) was developed to minimize sample amount, solvent use and time of analysis. Lyophilised samples (200 mg) were accurately weighed in a safe-lock micro test tube, homogenized in 1.5 mL dichloromethane-methanol (8:2) and mixed in a mixer mill (MM400, Retsch technology). The final biphasic system was separated by centrifugation (8 min, 10,000 rpm). The extraction was repeated three times. Solvent was evaporated under nitrogen stream and lipid content was gravimetrically determined. Results from 64 determinations were compared to those obtained with other referred method and showed a linear response over the whole range of IMF content (1.6–6.9 g/100 g sample). Moreover, the analysis with different methodology of six replica from the same sample showed lowest variability (standard deviation intra-method) for the new methodology proposed over a wide range of IMF content. A cost and time efficient lipid extraction procedure was developed without loss of precision and accuracy and with a fatty acid profile comparable to other protocols.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Intramuscular fat (IMF) content is an important characteristic that affects consumer acceptability of pork (Fernández, Monin, Talmant, Mourot & Lebret, 1999) and it is largely variable according to breed, sex, diet, age and weight at slaughter (Bosch, Tor Reixach, & Estany, 2012; Gou, Guerrero, & Arnau, 1995; Olivares, Daza, Rey, & López-Bote, 2009). A certain amount is required to ensure acceptability and tenderness of pork (Bejerholm & Barton-Gade, 1986; Cannata et al., 2010), but the optimal IMF content of meat and products is dependent on the country (Ngapo, Martin, & Dransfield, 2007a), the consumer (Ngapo, Martin, & Dransfield, 2007b, Font-i-Furnols et al. 2012) and the technological process (Ventanas, Ruiz, García, & Ventanas, 2007).

Therefore, considerable research effort is being carried out to obtain the target level adequate for each market, which requires fast, low cost and accurate methodology to quantify IMF fat. However, this is not easy to achieve, since IMF distribution within the muscle and anatomical location is very variable (Faucitano, Rivest, Daigle, Lavesque, & Gariepy, 2004), thus usually leading to a coefficient of variation above 25–30%.

The standard methodology has been for decades solid–liquid extraction procedures (Bligh & Dyer, 1959; Folch et al., 1957). These are based on a solvent (hydrophilic or hydrophobic, acidic, neutral or basic) added to a solid. Insoluble material can be separated by gravity or vacuum filtration, and soluble material is 'extracted' into the solvent.

Although pure lipids are soluble in a wide range of organic solvents, the model solvent or solvent mixture for extracting lipids should be polar enough to remove such lipids from their association with cell membranes and tissue constituents, but also not so polar that the solvent does not readily dissolve all triacylglycerols and other nonpolar lipids and, of course, should not react chemically with the extract (Christie & Han, 2010).

For decades the most referenced and used methods in quantitative lipids extraction have been Folch, Lees, and Stanley (1957) and Bligh and Dyer (1959). Both methods are based on chloroform (CHCl₃)/methanol (MeOH) mixtures added directly to the meat sample. Marmer and Maxwell (1981) developed a dry column method for the determination of the total fat content of meat and meat products as an alternative, allowing the separation in neutral (mostly cholesterol and triacylglycerols) and polar lipids (mostly phospholipids) but nowadays, this technique has been fulfilled by solid phase extraction minicolumns (Ruiz et al., 2004, Pérez-Palacios, Ruiz, & Antequera, 2006). All these conventional protocols are time consuming and require a large amount of sample and solvent, which makes them frequently not suitable for routine analysis. In addition, CHCl₃ has a very low safety limit in the work place air (1–2 ppm; International Labor Organization, 2009) due to its negative impact on the environment and human health.

Other methods, such as the one proposed by Sukhija and Palmquist (1988), extract and methylate fatty acids in a Toluene-Methanol/HCl solution in a rapid one-step procedure. The total fatty acid content is quantified using an internal standard.

The search for new and accurate lipid extractions methods in meat and meat products is a very demanded topic. In fact, depending on the tissue source, multiple groups adapted the conventional

* Corresponding author. Tel.: +34 913943781; fax: +34 913943824.

E-mail address: clemente@vet.ucm.es (C.J. Lopez-Bote).

protocols or developed new ones. Pérez-Palacios, Ruiz, Martín, Muriel and Antequera (2008) compared some methods for total lipid quantification in meat and meat products and Iverson, Lang and Cooper (2001) developed a comparison between Folch et al. (1957) and Bligh and Dyer (1959) methodologies applied to marine tissues. Moreover, Metherel, Taha, Izadi and Stark (2009) put into practice the application of ultrasounds to increase lipid extraction from solid matrix samples and decrease time consumed. Remarkable is the use of supercritical carbon dioxide extraction (Supercritical fluid extraction), an alternative technology that does not use solvents. Sahena et al. (2009) reviewed the commercial applications and recent developments of this technique in the food industry.

With this whole range of possibilities, the objective of this study was to develop an accurate method to quantify IMF, which allowed us to treat a large number of samples in the shortest time, using non sophisticated inexpensive equipment and minimizing solvent use.

2. Materials and methods

2.1. Experiment design

Longissimus dorsi samples (200 g) at the level of the last rib from a group of 64 Landrace × Large White pigs (32 each gender) slaughtered at 120 live weight were used for analysis. A first experiment was carried out in which IMF content was analysed in each sample following the methodology proposed by Folch et al. (1957), Sukhija and Palmquist (1988) one-step protocol and the new method proposed in this manuscript. The whole muscle samples were minced before sampling for each method. According to the results obtained in the first experiment, four samples of castrated barrows with different intramuscular fat concentration were selected by dividing the whole range of IMF content in four groups and selecting in each one the one with IMF content closest to the mean and a second experiment was carried out: six replicates of each sample were analyzed by five different protocols in order to compare the accuracy, precision and capacity of differentiation between them. A fatty acids profile was obtained in each case.

2.2. Methodology proposed by (FOL)

Lipid extractions following FOL were carried out using the original extraction ratio of 20 parts Folch et al. (1957) CH_2Cl_2 :MeOH (2:1, v/v) to 1 part sample. Briefly, five representative grams of fresh meat taken from a 50 g transversal chop finely minced were mixed with 100 mL of CH_2Cl_2 :MeOH (2:1, v/v). The mixture was homogenized and filtered. Five mL of 0.9% NaCl solution was added to the filtrate and the new mixture was shaken vigorously. The final biphasic system was allowed to separate and two phases were collected by siphoning. The upper aqueous phase was eliminated. The lower phase was filtered through anhydrous sodium sulphate and collected. Solvent was evaporated with a rotary evaporator under vacuum and further evaporated under nitrogen. Lipid content was then gravimetrically determined.

2.3. Folch-lyophilised Method (L-FOL)

The original extraction ratio of 20 parts CH_2Cl_2 :MeOH (2:1, v/v) to 1 part sample was preserved. Briefly, 700 mg of lyophilised sample were mixed with 21 mL of chloroform and shaken vigorously for 10 min. Then, 10 mL of methanol were added and shake was maintained for 10 more minutes. The mixture was filtered through anhydrous sodium sulphate and collected. Solvent was evaporated by means of a rotary evaporator under vacuum and further evaporated under nitrogen. Lipid content was then gravimetrically determined.

2.4. Sukhija and Palmquist (1988) one-step protocol (OS)

Pentadecanoic acid (C15:0) (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) was used as internal standard. Briefly, 200 mg of lyophilised sample were mixed with 1 mL of toluene containing 1 mL of internal standard of 10 mg/mL concentration, 1 mL of toluene and 3 mL of freshly made 5% methanolic HCl (prepared by slowly adding 10 mL of acetyl chloride to 100 mL of anhydrous methanol) in a culture tube. After being tightly capped, the tubes were vortexed for 1 min and heated for 2 h in a shaking water-bath at 70 °C. After tempering, 5 mL of 5% potassium carbonate solution were slowly added. The mixture was vigorously vortexed and centrifuged (5 min, 3000 rpm). The upper phase (3 phases are formed) was dried with anhydrous sodium sulphate and collected.

2.5. Marmer and Maxwell (1981) (MM) dry-column method

Fresh sample (3 g) was ground in a 750 mL porcelain mortar with anhydrous sodium sulphate (20 g) and then Celite 545 (15 g). The resulting mixture was packed above a 1:9 CaHPO_4 /Celite 545 trap (10 g) in a glass chromatography column (id 35 mm). The columns were charged with CH_2Cl_2 :MeOH (9:1) and 150 mL of eluate was collected in a 250 mL flask. Solvent was evaporated by means of a rotary evaporator under vacuum and further evaporated under nitrogen. Lipid content was then gravimetrically determined. In order to isolate Neutral and Polar Lipids by sequential elution, the column was packed in the same manner, but it was charged first with 150 mL of CH_2Cl_2 instead of 9:1 solvent mixture. At the point when the last of the CH_2Cl_2 reached the top of the column packing, the flask containing the collected eluate (neutral lipid) was replaced by a second 250 mL volumetric flask, and the column was charged with 150 mL of the 9:1 solvent mixture. The eluate was collected until the column was solvent stripped.

2.6. New method (NW)

In a 2 mL safe-lock micro test tube, 200 mg of lyophilised sample were accurately weighed. Two steel balls (2 mm Ø) and 1.5 mL of CH_2Cl_2 :MeOH 8:2 mixture were added. After being tightly capped, the tubes were placed on the adapters and homogenized for 2 min at 20 Hz in a Mixer Mill MM400 (Retsch technology, Haan, Germany). The final biphasic system was allowed to separate by centrifugation (8 min, 10,000 rpm). The solvent was decanted into a previously weighed 4 mL vial. The extraction was repeated three times. Solvent was evaporated under nitrogen stream at 25 °C. All the samples were kept in a desiccator until constant weight (2 h). Lipid content was then gravimetrically determined.

2.7. Esterification of fatty acids (methylation)

Total lipid extracts were subjected to esterification by dissolving the sample in 1 mL of sodium methylate–methanol mixture 5% in culture tubes (Olivares et al., 2009). After being tightly capped, the tubes were vortexed and heated for 1 h at 70 °C, shaking every 15 min. After tempering, 1 mL of 5% sulphuric acid–methanol solution was slowly added. The tubes were vortexed and were heated for 1 h at 70 °C again, shaking every 15 min. After tempering, the fatty acids methyl esters (FAMES) were extracted two times with 1.5 mL of petroleum ether and directly injected in GC system.

2.8. Gas–liquid chromatography conditions

The FAMES were separated using a gas chromatograph (HP 6890 Series GC System) equipped with flame ionization detector. Separation was performed with a J&W GC Column, HP-Innowax

Polyethylene Glycol (30 m × 0.316 mm × 0.25 μm). Nitrogen was used as a carrier gas. After injection at 170 °C, the oven temperature was raised to 210 °C at a rate 3.5 °C/min, then to 250 °C at a rate of 7 °C/min and held constant for 1 min. The flame ionization was held at 250 °C. FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of authentic standards (Sigma–Aldrich, Alcobendas, Spain).

2.9. Lyophilization

Removing moisture from samples was required in some particular methods. This was carried out by including 50 g of minced fresh meat in a Lyophilizer (Lyoquest, Telstar, Tarrasa, Spain).

2.10. Statistical analysis

Response data were evaluated using the General Linear Model (GLM) of SAS version 9.1 (SAS, 2002). The linear regressions were carried out with the PROC REG procedure contained in SAS. Bonferroni's test was used to separate treatment means.

3. Results and discussion

In experiment 1, IMF concentration of *L. dorsi* muscle from 120 kg Landrace × Large White pigs, was obtained from different analytical procedures. A representative number of samples ($n = 64$) was used to compare response under a wide range of IMF content. Since it is well known that pig gender affects IMF content (Alonso, Campo, Español, Roncalés, & Beltrán, 2009; Barton-Gade, 1987; Latorre, Lázaro, Gracia, Nieto, & Mateos, 2003), gilts ($n = 32$) and barrows ($n = 32$) meat samples were used in order to assess the ability of each method to discriminate gender groups. Results of IMF content and comparison between genders are shown in Table 1. All methods separated samples according to gender and the response was similar in all cases. As expected, FOL and NW procedures obtained higher concentration than the OS because the latter quantifies exclusively intramuscular fatty acids, while FOL and NW extract all liposoluble compounds and this also includes complex lipids. No differences were observed between FOL and NW procedures (Table 1).

In order to compare response of different analytical procedures in the whole range of samples, regression analysis was used and it is shown in Fig. 1. It is noteworthy that response was linear throughout the whole range of IMF content in all cases. Results suggest a validity of NW method similar to FOL or OS which is of interest because these two procedures are widely used both in scientific and technical works.

A second experiment was carried out to compare accuracy and precision of NW with other analytical procedures. Four samples with different fat content were selected from the previous experiment and identified as: Low, Mid-Low, Mid-High and High. Each sample was analyzed six times with five different protocols: FOL, L-FOL, OS, MM and NW. FOL was used as generic model reference due to its wide dissemination and use, L-FOL was developed in order to check out if lyophilization affects either the extraction or the

Table 1

Quantification of intramuscular fat (mean ± s.d) concentration (g fat/100 g meat) from three analytical methods: Folch et al. (1957) (FOL), Sukhija and Palmquist (1988) (OS) and New Method proposed (NW) ($n = 32$) (experiment 1).

Method	Gilt	Barrow	P
FH	2.98 ± 0.93	3.73 ± 0.68	0.0004
NW	2.67 ± 0.98	3.44 ± 0.59	0.0002
OS	2.08 ± 0.91	2.76 ± 0.63	0.0007

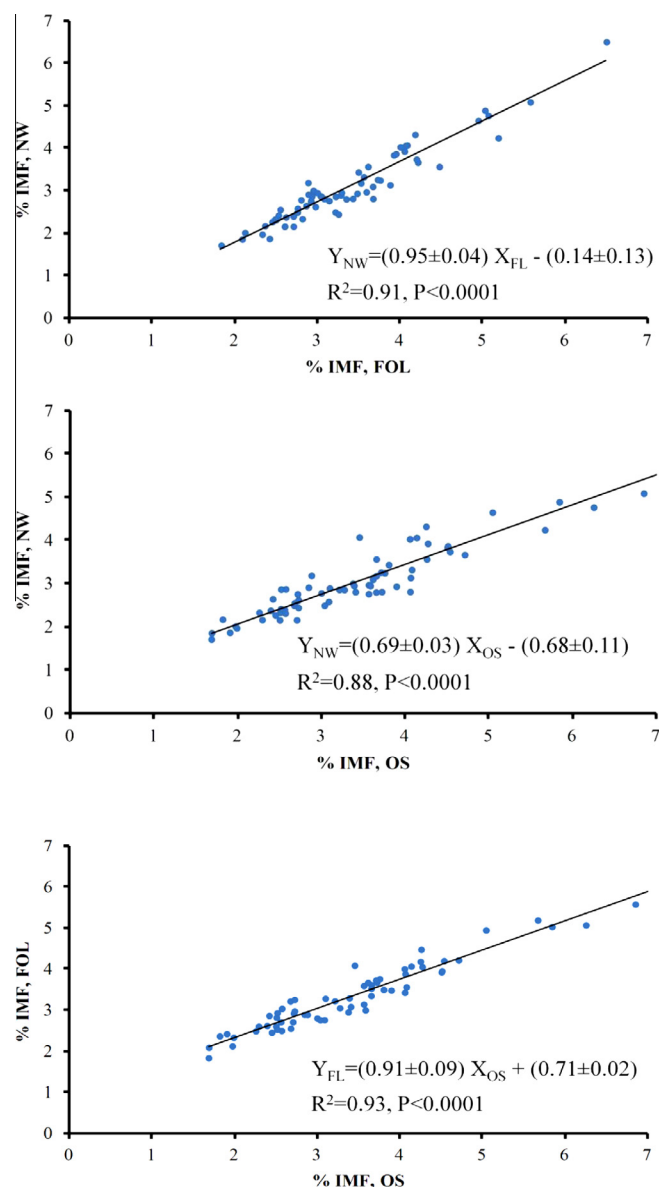


Fig. 1. Regression equations and coefficient of determination (R^2) between values of intramuscular fat (% IMF) obtained from different methodologies: Folch et al. (1957) (FOL), Sukhija and Palmquist (1988) (OS) and New Method proposed (NW).

fatty acids profile. OS was chosen as a model of direct extraction and methylation in acidic conditions and MM as a dry column methodology. Analysis time, solvent use and results of all these methods were compared to those obtained with NW.

Table 2 shows results for lipid extractions (% IMF, mean ± s.d.) depending on the method employed and fat level sample. No marked differences between methods were observed in extracting ability within each IMF range. Nevertheless, NW, FOL, L-FOL and OS were able to discriminate between the IMF levels. MM differentiated between High and Low but not between them and their respective closer level.

Attending to similarity between methods, it can be observed that at High IMF level, the NW shows higher extracting ability, followed closely by FOL and OS. MM is the method with the lowest extracting power and the highest standard deviation. At Mid-high level, NW still has the highest extraction ability followed by the other four methods with not significant differences among them. By decreasing the level of fat to Mid-low or Low level, NW loses

Table 2
Quantification of intramuscular fat (mean \pm s.d) concentration (g fat/100 g meat) in four pork samples containing different fat levels (low, mid-low, mid-high or high). Each sample was analyzed six times by five analytical procedures: Folch et al. (1957) from fresh sample (FOL) or lyophilised ones (L-FOL), Sukhija and Palmquist (1988) (OS), Marmer and Maxwell (1981) (MM) and New Method proposed (NW)¹ (experiment 2).

Method	LOW	MID-LOW	MID-HIGH	HIGH	Mean
NW	^C 2.14 \pm 0.03 ^d	^{AB} 3.03 \pm 0.05 ^c	^A 4.47 \pm 0.05 ^b	^A 6.77 \pm 0.06 ^a	^A 4.10 \pm 0.05
FOL	^A 2.91 \pm 0.31 ^d	^A 3.59 \pm 0.23 ^c	^B 4.04 \pm 0.26 ^b	^{AB} 6.11 \pm 0.09 ^a	^A 4.16 \pm 0.22
MM	^{AB} 2.57 \pm 0.31 ^b	^B 2.68 \pm 0.78 ^b	^B 3.78 \pm 0.31 ^a	^C 4.80 \pm 0.87 ^a	^A 3.46 \pm 0.57
Mean	2.34 \pm 0.16	3.04 \pm 0.31	3.95 \pm 0.16	5.98 \pm 0.26	

¹ Different uppercase letters (A – D) within a column indicate differences between analytical procedures and different lowercase letters (a – d) within a row indicate differences between sample groups.

Table 3
Fatty acid composition of intramuscular fat (g fatty acid/100 g total fatty acids) analyzed by five analytical procedures: Folch et al. (1957) from fresh (FOL) or lyophilised samples (L-FOL), Sukhija and Palmquist (1988) (OS), Marmer and Maxwell (1981) (MM) and the New Method proposed (NW)¹ (experiment 2).

	OS	NW	FOL	L-FOL	MM
C16:0	24.94 \pm 1.22 ^b	25.60 \pm 1.04 ^{ab}	25.65 \pm 0.80 ^{ab}	26.06 \pm 0.69 ^a	25.61 \pm 0.43 ^{ab}
C16:1	3.84 \pm 0.36 ^{ab}	3.54 \pm 0.27 ^c	3.61 \pm 0.22 ^{bc}	3.62 \pm 0.37 ^{bc}	4.02 \pm 0.24 ^{ab}
C18:0	14.07 \pm 0.33 ^b	14.82 \pm 0.61 ^{ab}	14.89 \pm 0.31 ^a	14.50 \pm 0.76 ^{ab}	14.04 \pm 0.67 ^b
C18:1	45.27 \pm 2.52 ^b	45.15 \pm 1.80 ^b	44.77 \pm 2.32 ^b	45.90 \pm 2.32 ^{ab}	47.07 \pm 0.90 ^a
C18:2n – 6	8.11 \pm 2.44 ^{ab}	7.53 \pm 2.23 ^{ab}	8.28 \pm 1.89 ^a	7.32 \pm 1.83 ^{ab}	6.62 \pm 0.79 ^b
C18:3n – 3	0.29 \pm 0.08 ^a	0.32 \pm 0.06 ^a	0.32 \pm 0.06 ^a	0.29 \pm 0.03 ^a	0.34 \pm 0.10 ^a
C20:0	0.22 \pm 0.07 ^c	0.30 \pm 0.04 ^b	0.31 \pm 0.03 ^b	0.25 \pm 0.05 ^c	0.38 \pm 0.09 ^a
C20:1n – 9	0.65 \pm 0.15 ^b	0.91 \pm 0.05 ^a	0.48 \pm 0.28 ^c	0.87 \pm 0.06 ^a	0.78 \pm 0.26 ^{ab}
SFA ²	40.45 \pm 1.13 ^c	41.66 \pm 0.85 ^{ab}	41.95 \pm 0.76 ^a	41.65 \pm 1.34 ^{ab}	40.88 \pm 0.89 ^{bc}
MUFA ²	49.20 \pm 2.12 ^{ab}	48.54 \pm 1.42 ^b	48.37 \pm 1.90 ^b	48.94 \pm 2.26 ^b	50.48 \pm 0.76 ^a
PUFA ²	8.18 \pm 2.40 ^{ab}	7.65 \pm 1.85 ^{ab}	8.38 \pm 1.83 ^a	7.42 \pm 1.81 ^{ab}	6.79 \pm 0.86 ^b
UNSAT ²	57.37 \pm 0.47 ^a	56.19 \pm 0.96 ^b	56.75 \pm 0.68 ^{ab}	56.36 \pm 1.13 ^b	57.27 \pm 0.60 ^a

¹ Different letter (a – d) within the same row indicates difference between methods.

² SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; UNSAT, unsaturated fatty acids.

part of its extracting ability in comparison to other methods but maintains the lowest standard deviation.

It is interesting to highlight that, NW shows the lowest variability throughout the whole range of IMF content, while MM shows the highest. It is also interesting to note a limited effect of lyophilization on IMF extracting ability and a lower variability in the response.

Aspects to consider when comparing methodologies are time consumption and amount of solvent used. In our laboratory conditions, considering simultaneous analysis of 20 samples, it was evaluated that FOL and MM required approximately 40 min/sample, while 25 and 15 min/sample were needed for OS and NW respectively. NW methodology lies in: a previous lyophilization, 2 min of sample and solvent shaking, 8 min of centrifugation, solvent evaporation and the three times each extraction is repeated. Thereby, it has been estimated a total of 300 min each 20 samples. Obviously, a large decrease in time consumed.

Regarding solvent utilization, FOL and MM used 150–200 mL per sample, while only 5 and 4.5 mL were required per sample by OS and NW, respectively.

Moreover, two additional operational aspects should be noticed: the use of chloroform in routine procedures is called into question due to its possible carcinogenic behaviour in humans, and the use of chloroform–methanol mixtures in fresh samples introduce a third solvent, water, that makes more difficult the liquid phase separation.

OS and MM protocols were developed, according to their authors, to decrease the amount of time, solvent and sample consumed. In both cases, the existing problem with the slow and unclear phase separation was solved. Other advantages of OS lie in the use of lower amount of sample, the limited amount of solvent used and the concomitant products obtained which are methanol, water and inorganic salts of potassium and carbonate. Nevertheless, acid esterification is criticized since it may produce migration of conjugated double bonds in unsaturated fatty acids

Moreover, since extraction and esterification is carried out in a single one-step procedure, this method do not allow carrying out further analysis of IMF, such as fractionation into lipids classes. In the case of MM, the sample quantity was also reduced but the solvents and the by-products obtained still were in a considerable amount. Faced with all these difficulties, we might approach the problem from different angles and find different solutions. Lyophilization of meat prior to analysis allowed us to work with lower amount of sample and to avoid the tedious water-phase separation. This is in agreement with Dunstay, Volkman and Barret (1993) who found no deleterious effect of lyophilization on fatty acid or sterols content and only detected a small decrease of neutral lipids extracted in *Oyster Crassostrea-Gigas*.

The amount of sample used in our experiment was 5 g for the FOL, 3 g for the MM and 700 mg (4 g of fresh sample), 500 (3 g of fresh sample) and 200 mg (1.2 g of fresh sample) for the L-FOL, OS and NW procedures respectively. However, coefficient of variation (CV = $s^d \cdot 100 / \text{mean}$) of analysis were respectively 5.29, 16.4 for FOL and MM procedures, and 3.1, 4.2 and 1.22 for L-FOL, OS and MW respectively (Table 2).

Lipids of low polarity are freely soluble in ethers, hydrocarbon solvents, CHCl₃ and CH₂Cl₂. Unsaturated lipids dissolve in most solvents more readily than saturated. In contrast, polar lipids are only soluble in hydrocarbon solvents if other lipids are present, but they dissolve readily in more polar solvents such as methanol or ethanol. Currently, there are many restrictions for CHCl₃ use. It has been classified as a probable human carcinogenic. Dichloromethane (CH₂Cl₂) has a threshold limit in the workplace 20–25 time higher than CHCl₃. In addition, it is 15–18% cheaper. Cequier-Sánchez, Rodríguez, Ravelo, and Zárate (2008) validated the use of CH₂Cl₂ as an effective extraction solvent in fatty acid studies.

After comparing different competent extraction methods, it was needed to check that the fatty acid profile was not altered by the different used protocol. For FOL, L-FOL, NW and MM, the methylate of the different fatty acids were obtained by a method described in

literature and were analyzed by Gas–liquid chromatography. Table 3 summarizes fatty acid profile obtained for the different methods. Two major (C16:0, C18:1), three middle (C16:1, C18:0, C18:2) and three minor (C18:3, C20:0, C20:1) fatty acids were selected. Furthermore, total saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids were included. No differences in major fatty acids composition and fatty acid classes were found between FOL, L-FOL and NW. This result confirms the suitability of NW as an alternative to FOL to quantify IMF.

4. Conclusions

The objective of this study was to develop an accurate method for lipid extraction. It has been shown that the NW protocol allow the analyst to treat a large number of samples in a shorter time than FOL. Attending to fat content, NW offers analogous results to FOL method in quantity, but it shows lower variability. In case that the fatty acid profile was the pursued goal, OS showed a similar speed than NW but results obtained with NW are closest to those obtained with the FOL procedure, which is attributed to the strong acid methylation of OS protocol.

Fewer amounts of sample and solvent used are additional benefit of NW over FOL, thus leading to greener qualities for environment and health.

Acknowledgments

This research was financed by AGL2010-21991. Authors are grateful to Raul Salazar.

References

- Alonso, V., Campo, M. M., Español, S., Roncalés, P., & Beltrán, J. A. (2009). Effect of crossbreeding and gender on meat quality and fatty acid composition in pork. *Meat Science*, 81, 209–217.
- Barton-Gade, P. A. (1987). Meat and fat quality in boars, castrates and gilts. *Livestock Science*, 16, 187–196.
- Bejerholm, C., & Barton-Gade, P. Effect of intramuscular fat level on eating quality of pig meat. In: Proceedings of the 32nd European Meeting of Meat Research Workers, Ghent, Belgium, Part II, 1986, 389–391.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Bosch, L., Tor, M., Reixach, J., & Estany, J. (2012). Age-related changes in intramuscular and subcutaneous fat content and fatty acid composition in growing pigs using longitudinal data. *Meat Science*, 91, 358–363.
- Cannata, S., Engle, T., Moeller, S. J., Zerby, H. N., Radunz, A. E., Green, M. D., et al. (2010). Effect of visual marbling on sensory properties and quality traits of pork loin. *Meat Science*, 85, 428–434.
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, A., & Zárata, R. (2008). Dichloromethane as a solvent for lipid extraction as assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 4297–4303.
- Christie, W. W., & Han, X. (2010). *Lipid analysis* (4th ed.). England: The Oily Press.
- Dunstay, G. A., Volkman, V., & Barret, S. M. (1993). The effect of lyophilization on the solvent extraction of lipid classes, fatty acids and sterols from the Oyster Crassostrea-Gigas. *Lipids*, 28(10), 937–944.
- Faucitano, L., Rivest, J., Daigle, J. P., Lavesque, K., & Garipey, C. (2004). Distribution of intramuscular fat content and marbling within the longissimus muscle of pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(1), 57–61.
- Fernandez, X., Monin, G., Talmant, A., Mouro, J., & Lebre, B. (1999). Influences of intramuscular fat content on the quality of pig meat – 2. Consumer acceptability of m. longissimus lumborum. *Meat Science*, 53, 67–72.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Font-i-Furnols, M., Tous, N., Esteve-García, E., & Gispert, M. (2012). Do all the consumers accept marbling in the same way? The relationship between eating and visual acceptability of pork with different intramuscular fat content. *Meat Science*, 91, 448–453.
- Gou, P., Guerrero, L., & Arnau, J. (1995). Sex and crossbreed effects on the characteristics of dry-cured ham. *Meat Science*, 40, 21–31.
- Iverson, S. J., Lang, S. L. C., & Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue. *Lipids*, 36, 1283–87. Kramer, J.K.G., Fellner, V., Dugan, M.E.R., Sauer, F.D., Mossoba, M.M., & Yurawecz, M.P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*, 32, 1219–1228.
- Latorre, M. A., Lázaro, R., Gracia, M. I., Nieto, M., & Mateos, G. G. (2003). Effect of sex and terminal sire genotype on performance, carcass characteristics, and meat quality of pigs slaughtered at 117 kg body weight. *Meat Science*, 65, 1369–1377.
- Marger, W. N., & Maxwell, R. J. (1981). Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. *Lipids*, 16, 365–371.
- Metherel, A. H., Taha, A. Y., Izadi, H., & Stark, K. D. (2009). The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81, 417–423.
- Olivares, A., Daza, A., Rey, A. I., & Lopez-Bote, C. J. (2009). Interactions between genotype, dietary fat saturation and vitamin A concentration on intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs. *Meat Science*, 82, 6–12.
- Ngapo, T. M., Martin, J. F., & Dransfield, E. (2007a). International preferences for pork appearance: I. Consumer choices. *Food Quality and Preference*, 18, 26–36.
- Ngapo, T. M., Martin, J. F., & Dransfield, E. (2007b). International preferences for pork appearance: II. Factors influencing consumer choice. *Food Quality and Preference*, 18, 139–151.
- Pérez-Palacios, T., Ruiz, J., & Antequera, T. (2006). Improvement of a solid phase extraction method for separation of animal muscle phospholipid classes. *Food Chemistry*, 102, 875–879.
- Pérez-Palacios, T., Ruiz, J., Martín, D., Muriel, E., & Antequera, T. (2008). Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chemistry*, 110, 1025–1029.
- Ruiz, J., Antequera, T., Andres, A. I., Petron, M. J., & Muriel, E. (2004). Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta*, 520, 201–205.
- Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Karim, A. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. N., et al. (2009). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 95, 240–253.
- Sukhija, P. S., & Palmquist, D. L. (1988). Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 36, 1202–1206.
- Ventanas, S., Ruiz, J., Garcia, C., & Ventanas, J. (2007). Preference and juiciness of Iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 77, 324–330.

4.2 CAPÍTULO 2: Alternative method for intramuscular fat analysis using common laboratory equipment.

Los resultados del presente capítulo se recogen en el siguiente artículo:

Alternative method for intramuscular fat analysis using common laboratory equipment

J. Segura, L. Calvo, C. Ovilo, A. González-Bulnes, A. Olivares, M.I. Cambero, C.J. Lopez-Bote.

Meat Science, 103 (2015), 24-27.



Alternative method for intramuscular fat analysis using common laboratory equipment



J. Segura ^a, L. Calvo ^{a,b}, C. Óvilo ^c, A. González-Bulnes ^d, A. Olivares ^a, M.I. Cambero ^e, C.J. López-Bote ^{a,*}

^a Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

^b Incarlopsa, Tarancón, Cuenca, Spain

^c Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

^d Departamento de Reproducción Animal, INIA, 28040 Madrid, Spain

^e Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2014

Received in revised form 11 November 2014

Accepted 31 December 2014

Available online 7 January 2015

Keywords:

Intramuscular fat

Fatty acids

Lyophilized samples

Low solvent volume

Inexpensive laboratory equipment

ABSTRACT

A procedure to quantify intramuscular fat was developed using common inexpensive laboratory equipment. Three homogenization methods of lyophilized muscle samples (Ball-mill, Grinder and Mortar) and two extraction methods (Ball-mill or Vortex) were used in turkey meat and pork. Two-hundred mg of lyophilized and homogenized samples were accurately weighed and mixed with 1.5 mL of dichloromethane–methanol (8:2) and shaken either in a Mixer Mill (MM400, Retsch Technology) or in a Vortex. The final mixture was separated by centrifugation. Solvent was evaporated under a nitrogen stream and lipid content was gravimetrically determined. Besides, it was checked that the fatty acid profile was not altered by the protocol used. Moreover, the analysis of 4 replicas from the same sample showed different variation coefficients (16–29%) for the new procedures proposed over a wide range of IMF content. The combination of Grinder and Vortex methodologies can be proposed as a simple and inexpensive alternative to previous ones.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Intramuscular fat (IMF) content affects the flavor and juiciness of meat (Fernandez, Monin, Talmant, Mourot, & Lebret, 1999). Moreover, in dry-cured meat products, the IMF content and composition are considered of critical importance due to its relationship with technological processes along salting and drying and it is also positively linked to the acceptability characteristics of meat products (Isabel et al., 2003).

However, accurate quantification of IMF is not accomplished easily, since IMF distribution within the muscle and anatomical location is variable (Faucitano, Rivest, Daigle, Lavesque, & Gariépy, 2004), thus usually leading to coefficients of variation over 25–30%. To quantify IMF, solid–liquid extraction procedures are frequently used (Bligh & Dyer, 1959; Folch, Lees, & Stanley, 1957). These methods are based on chloroform (CHCl₃)/methanol (MeOH) mixtures added directly to the fresh meat sample, thus introducing a third liquid component to the mixture, water, immiscible with the mixture of organic solvents, that makes the liquid phase separation more difficult. This is finally done by using separation funnels, but the procedure is time consuming. Moreover, large amounts of solvents are required, which makes them frequently not suitable for routine analysis. In addition, CHCl₃ has a very low safety

limit in the work place air (1–2 ppm; International Labor Organization, 2009) due to its negative impact on the environment and human health. Although different non-invasive methodologies for IMF quantification are emerging such as ultrasounds (Ayuso, González, Hernández, Corral, & Izquierdo, 2013) or near infrared hyperspectral images (Huang, Liu, Ngadi, & Gariépy, 2014) further studies of extracted IMF (such as fatty acid profile) cannot be made.

We have recently developed a procedure based on water removal through lyophilization and a two-step subsequent analysis (Segura & López-Bote, 2014). The first step consists of the homogenization of dry meat samples to achieve a uniform powder which allows the use of a small and representative sample for analysis. Subsequently, a second step follows consisting of IMF extraction in small (1.5 mL) centrifugation tubes with a combination of dichloromethane (CH₂Cl₂)/MeOH. The main advantages of this procedure are low solvent use and fastness because solvent separation is done by centrifugation. Moreover, an important advantage of the protocol developed by Segura & López-Bote is its lower variability compared to other solid–liquid (Bligh & Dyer, 1959; Folch et al., 1957; Marmer & Maxwell, 1981) extraction procedures. However, such method requires the use of a Mixer Mill (MM400, Retsch Technology, Haan, Germany), which is not common in many food analysis laboratories.

The final objective of this study was to optimize an analytical procedure using common inexpensive laboratory equipment to

* Corresponding author. Tel.: +34 913943781; fax: +34 913943824.
E-mail address: clemente@vet.ucm.es (C.J. López-Bote).

quantify IMF, which allows treating a large number of samples in a short time and obtaining comparable results to those achieved with the ball miller equipment.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Twenty-seven samples of turkey breast (representative of meat with low IMF content) and 27 samples of Iberian pig loins (representative of meat with high IMF content) were used for analysis. The procedure described by Segura and López-Bote (2014) was used to quantify IMF content. In each meat type, samples were sorted out according to their IMF content and divided into three groups (high, medium or low IMF content). A factorial arrangement of three homogenization procedures (Ball-mill, Grinder and Mortar) and two IMF extraction procedures (Ball-mill and Vortex) were used, thus producing six different analytical protocols (Ball-mill/Ball-mill, Ball-mill/Vortex, Grinder/Ball-mill, Grinder/Vortex, Mortar/Ball-mill and Mortar/Vortex). Each of the lyophilized samples was analyzed in duplicate. Fatty acids were quantified in each sample.

In addition, a second experiment was carried out to analyze variability in the results (precision) of each analytical procedure. A single representative sample of turkey or pig meat with low, medium or high IMF content was analyzed four consecutive times by the six experimental protocols and coefficient of variation was calculated.

2.2. Lyophilization

Removing moisture was carried out in 30 g of fresh meat (previously frozen and merely cut in approximately 1 cm³ pieces) in a lyophilizer (Lyoquest, Telstar, Tarrasa, Spain) until constant weight (72 h).

2.3. Homogenization procedures

2.3.1. Ball-mill procedure

Approximately 1 g of lyophilized sample and two stainless steel balls (7 mm Ø) were introduced in a 25 mL mill-jar. After being capped, the jars were placed on the adapters and shaken for 2 min at 30 Hz in a Mixer Mill MM400 (Retsch Technology, Haan, Germany).

2.3.2. Grinder procedure

Approximately, 1 g of lyophilized sample was introduced in a common coffee grinder (Moulinex knife mill, Model A843). After being capped, the sample was ground for 30 s.

2.3.3. Mortar procedure

In a 50 mL porcelain Mortar, approximately 1 g of lyophilized sample was crushed and homogenized by a pestle for 1 min.

2.4. IMF extraction

2.4.1. Ball-mill procedure (Segura & López-Bote, 2014)

In 2 mL safe-lock micro test tubes, 200 mg of lyophilized samples was accurately weighed. Two steel balls (2 mm Ø) and 1.5 mL of a CH₂Cl₂–MeOH 8:2 mixture were added. After being tightly capped, the tubes were placed on the adapters and homogenized for 2 min at 20 Hz in a Mixer Mill MM400 (Retsch Technology, Haan, Germany). The final mixture was allowed to separate by centrifugation (8 min, 10,000 rpm). The solvent was decanted into a previously weighed 4 mL vial. The extraction was repeated 3 times. Solvent was evaporated under a nitrogen stream at 25 °C. All the samples were kept in a desiccator until constant weight (2 h). Lipid content was then gravimetrically determined.

2.4.2. Vortex method

In 2 mL safe-lock micro test tubes, 200 mg of lyophilized samples were accurately weighed. 1.5 mL of a CH₂Cl₂–MeOH 8:2 mixture were added. After being tightly capped, the tubes were vortexed for 30 s and the mixture, solvent separation and evaporation were carried out the same way as the previous protocol (see above).

2.5. Fatty acid esterification (methylation)

Total lipid extracts were subjected to acid-catalyzed methylation by dissolving the sample in 1 mL of a 5% sodium methylate–MeOH mixture in culture tubes (Oliveras, Daza, Rey, & López-Bote, 2009). After being tightly capped, the tubes were vortexed and heated for 1 h at 70 °C, shaking every 15 min. After tempering, 1 mL of a 5% sulphuric acid–MeOH solution was slowly added. The tubes were vortexed and were heated for 1 h at 70 °C again, shaking every 15 min. After tempering, the fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted 2 times with 1.5 mL of petroleum ether and directly injected in a gas chromatography system.

2.6. Gas-liquid chromatography conditions

The FAMES were separated by means of a gas chromatograph (HP 6890 Series GC System) equipped with a flame ionization detector. Separation was performed with a J&W GC Column, HP-Innowax Polyethylene Glycol (30 m × 0.316 mm × 0.25 µm). Nitrogen was used as a carrier gas. After injection at 170 °C, the oven temperature was raised to 210 °C at a rate of 3.5 °C/min and then to 250 °C at a rate of 7 °C/min and held constant for 1 min. The flame ionization was held at 250 °C. FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of authentic standards (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain).

2.7. Statistical analysis

Data were evaluated using the General Linear Model (GLM) of SAS version 9.2 (SAS, 2009). Main effects (fat analysis, homogenization and extraction procedures) and interactions were analyzed by a 3 × 3 × 2 factorial arrangement. The linear regressions were carried out using the PROC REG procedure contained in SAS. Duncan's test was used to separate treatment means. Coefficients of variation (CV) were calculated as (CV = S.D. * 100 / mean) and also a GLM procedure was used to evaluate them.

3. Results and discussion

Fifty four samples (n = 27 each type) were used to compare a wide range of IMF content values. They were analyzed by the proposed methodology of Segura and López-Bote (2014) (coincident with Ball-mill/Ball-mill procedure) and the obtained mean ± standard deviation were 2.69 ± 1.14 for turkey meat samples and 6.50 ± 3.03 (g/100 g fresh meat) in Iberian pig muscle.

The twenty-seven samples from each origin were sorted out according to their IMF content and divided into high, medium or low IMF content. The combination of three homogenization procedures and two extraction methodologies led to six different analytical protocols. Table 1 shows results for lipid extractions (% IMF) depending on the method employed, fat level sample and meat type. As expected, a clear differentiation, induced by our selection, was observed among fat content levels.

According to the homogenization methodology, in pork samples no effect of homogenization procedures was observed. Although not significant, a numeric tendency in favor of Grinder as the method which led to the highest amount of quantified fat was observed (6.91% in Grinder vs 5.96 and 6.69% in Ball-mill and Mortar respectively). In the case of turkey meat, significant differences were obtained among

Table 1

Mean intramuscular fat concentration (g/100 g meat) in turkey and pork samples (n = 9) with low, medium or high fat content. Each sample was analyzed by three homogenization (Hom) methods (Ball-mill, Grinder and Mortar) and two extraction (Ext) methods (Ball-mill and Vortex)¹.

		Turkey	Pork
Fat content			
	Low	1.7 ^c	3.3 ^c
	Medium	2.8 ^b	6.0 ^b
	High	3.7 ^a	10.8 ^a
Homogenization method			
	Ball-mill	3.3 ^a	6.0
	Grinder	2.8 ^b	6.9
	Mortar	2.1 ^c	6.7
Extraction method			
	Ball-mill	2.7	6.5
	Vortex	2.8	6.5
SEM ²		0.11	0.32
p Value			
	Fat	0.001	0.001
	Hom	0.001	0.065
	Ext	0.555	0.974
	Fat* Hom	0.001	0.277
	Hom* Ext	0.911	0.729
	Fat* Ext	0.859	0.942
	Fat* Hom * Ext	0.968	0.980

¹ Different letters within the same column indicates difference between methods.

² SEM = pooled standard error (n = 9).

methods. Thus, homogenization with Ball-mill led to a higher amount of extracted fat than Grinder and Mortar (3.29 vs 2.83 and 2.06%). Mention should be made about the interaction between fat amount and homogenization method in turkey meat ($p < 0.0001$). This interaction was due to the lack of differentiation between high, medium or low IMF amount when Mortar homogenization was applied. No other interactions were detected. A possible explanation is that Mortar homogenization is based on breaking up the sample by compression with a pestle against its walls. In samples with low IMF amount (turkey meat), tiny fibrous tissue strands are formed during the disaggregation, which may hinder solvent-fat interaction. In samples with higher fat content (pork) or when Grinder or Ball-mill are used, less quantity of fibrous tissue is formed or reduced to a smaller grain size which allows the solvent greater accessibility to solute. It is also noteworthy that, assuming that the time taken for cleaning and preparing the different materials is approximately equal in the three methodologies, excessive time consumption has not been observed as a limiting stage of the process for any of the three options.

No significant differences between extraction methods (Ball-mill or Vortex) were observed in turkey meat or in pork (2.68 and 2.77% IMF respectively for turkey breasts and 6.52% in both cases in pork). In terms of capacity of extraction, there seems to be no difference. Besides, no significant interaction with fat content or homogenization method was found. Time consumption was the only disadvantage detected in relation to the extraction methods. Shaking with Vortex implies the use of 30 s per sample while Ball-mill is able to shake 20 samples simultaneously.

After comparing different competent extraction methods, further analysis of fatty acid composition was done to observe the possible effects of the analytical procedures used to homogenize or extract IMF. The methylates of the different fatty acids were obtained and analyzed by gas-liquid chromatography. Table 2 summarizes the fatty acid profiles obtained for the different methods. Major (C16:0, C18:0, C18:1n-9 and C18:2n-6) and highly unsaturated FA are presented. Furthermore, total saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) and unsaturation index (UI) were included. In both meat types, no differences in fatty acid composition and fatty acid classes were found according to homogenization or

Table 2

Fatty acid composition of intramuscular fat (g fatty acid/100 g total fatty acids) analyzed by three homogenization (Hom) techniques (Ball-mill, Grinder and Mortar) and two extraction (Ext) methods (Ball-mill and Vortex)^a.

	Homogenization			Extraction		SEM	p Value	
	Ball-mill	Grinder	Mortar	Ball-mill	Vortex		Hom	Ext
Turkey								
C16:0	26.0	26.0	26.2	26.0	26.1	0.12	0.277	0.859
C16:1	5.8	6.2	5.8	5.8	6.1	0.17	0.111	0.101
C18:0	10.9	10.9	10.9	11.0	10.7	0.27	0.111	2.267
C18:1n-9	26.9	27.6	27.5	26.9	27.8	0.80	0.490	0.240
C18:1n-7	2.6	2.5	2.4	2.6	2.4	0.68	0.330	0.280
C18:2n-6	22.5	22.6	22.2	22.6	22.4	0.27	0.920	0.895
C18:3n-3	0.8	1.0	1.0	0.9	0.9	0.05	0.119	0.733
C20:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.03	0.860	0.887
C20:1n-9	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.03	0.473	0.317
C20:3n-6	0.5	0.4	0.5	0.4	0.4	0.05	0.245	0.879
C20:4n-6	1.5	1.4	1.5	1.5	1.5	0.20	0.337	0.488
SAT	41.0	40.6	40.6	41.2	40.1	0.44	0.950	0.074
MUFA	37.1	38.2	37.5	37.2	38.0	0.51	0.129	0.095
PUFA	21.8	21.2	21.9	21.5	21.8	0.22	0.095	0.286
UI	81.2	81.1	81.7	80.6	82.2	0.74	0.847	0.179
Pork								
C16:0	25.3	25.2	25.2	25.1	25.4	0.31	0.988	0.613
C16:1	3.9	3.6	3.7	3.7	3.8	0.06	0.102	0.346
C18:0	12.5	12.6	12.4	12.5	12.5	0.12	0.444	0.840
C18:1n-9	43.7	43.6	43.9	44.3	43.1	0.63	0.955	0.182
C18:1n-7	4.3	5.4	4.2	4.2	5.0	0.54	0.392	0.299
C18:2n-6	5.4	5.0	5.6	5.3	5.4	0.34	0.540	0.939
C18:3n-3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.05	0.618	0.919
C20:0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.02	0.116	0.552
C20:1n-9	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.02	0.155	0.930
C20:3n-6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.03	0.141	0.969
C20:4n-6	1.1	0.9	1.1	1.0	1.0	0.08	0.460	0.893
SAT	39.9	39.9	39.8	39.7	40.0	0.40	0.971	0.639
MUFA	53.1	53.7	53.0	53.4	53.1	0.26	0.213	0.381
PUFA	7.0	6.4	7.2	6.8	6.9	0.46	0.537	0.930
UI	69.6	68.5	69.9	69.4	69.2	0.11	0.720	0.909

SFA, total saturated fatty acids; MUFA, total monounsaturated fatty acids; PUFA, total polyunsaturated fatty acids; UI, unsaturation index.

^a SEM = pooled standard error (n = 9)

extraction methodology and no interaction between them was detected. This supports the validity of any of these methodologies to obtain a fatty acid profile.

In a second experiment three samples with different fat content were selected from the previous experiment and identified as: low, medium and high. Three replicas of each sample were analyzed by three different homogenization procedures (Ball-mill, Grinder and Mortar) and two extraction methods (Ball-mill and Vortex) in order to compare the precision among them. Such comparison was carried out in terms of coefficients of variation which are shown in Table 3. It can be observed that Mortar is the methodology that leads to the highest variability in the results in both turkey meat and pork (25.5 and 28.7%, $p = 0.010$ and $p = 0.045$ respectively) and it was confirmed that the values rise with increasing IMF content. This result could also be attributable to the fact that Mortar does not allow a fine enough homogenization. In turkey breast, a meat with low IMF, no remarkable differences between Ball-mill and Grinder were observed. Nevertheless, in pork, the homogenization with Grinder resulted to be the most precise (lowest CV, 14.7%) and the Ball-mill method stands close to this value (19.0%). These samples had a high amount of IMF and it seems that the finer the grinding is, the easier the extraction results. This can be probably attributed to the formation of a smaller grain size powder when Grinder is used thus allowing a larger contact surface with the solvent. As an extraction technique, Vortex showed a similar behavior to Ball-mill.

Consequently, we propose the Grinder/Vortex procedure as an alternative to the Ball-mill/Ball-mill methodology developed by Segura and López-Bote (2014). In Fig. 1, regression between both procedures was

Table 3

Coefficient of variation of a single representative sample from turkey or pig meat with low, medium or high intramuscular fat content analyzed 3 consecutive times by one of the six experimental protocols differing in the homogenization (Ball-mill, Grinder or Mortar) and extraction (Ball-mill and Vortex) procedures¹.

		Turkey	Pork
Fat content	Low	18.8	28.1
	Medium	21.0	19.2
	High	19.3	16.7
Homogenization method	Ball-mill	17.2 ^b	19.0 ^{ab}
	Grinder	16.4 ^b	14.7 ^b
	Mortar	25.5 ^a	28.7 ^a
Extraction method	Ball-mill	19.3	21.1
	Vortex	20.1	20.5
SEM ²		0.89	1.81
p Value	Fat	0.696	0.161
	Hom	0.010	0.045
	Ext	0.728	0.805
	Fat* Hom	0.558	0.139
	Hom* Ext	0.829	0.656
	Fat* Ext	0.364	0.654
	Fat* Hom * Ext	0.966	0.958

¹ Different letters within the same column indicates difference between methods.

² SEM = pooled standard error (n = 9).

shown. It can be observed that the response was linear throughout the whole range of IMF content in all cases. It thus ($R^2 = 0.94$, $p < 0.0001$ and slope line close to 1 in both cases) supports the validity of the Grinder/Vortex method as an alternative to the Ball-mill/Ball-mill one.

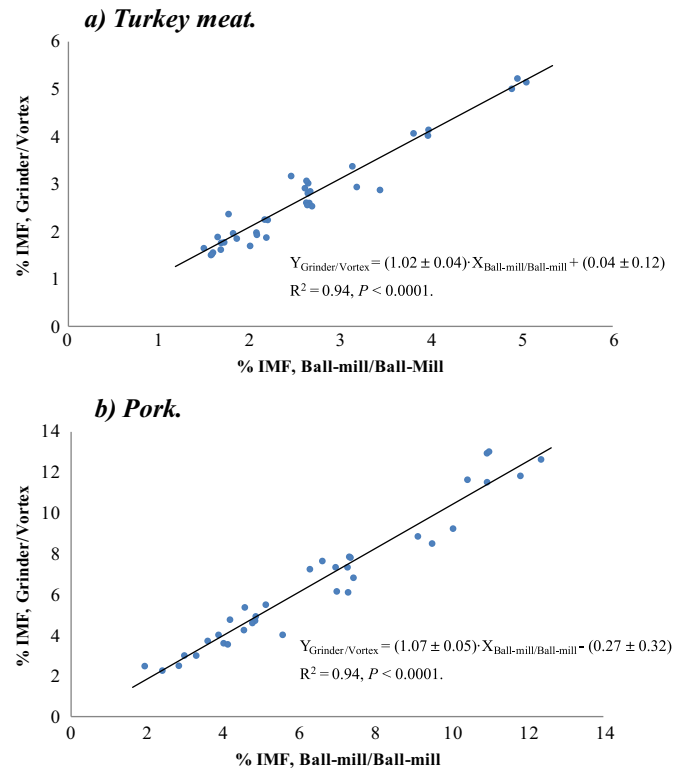


Fig. 1. Regression equations and coefficient of determination (R^2) between values of intramuscular fat (% IMF) of turkey meat and pork, obtained by Ball-mill homogenization and extraction methods (Ball-mill/Ball-mill) as proposed by Segura and López-Bote (2014) or by grinder homogenization followed by vortex extraction (Grinder/Vortex).

The amount of sample and solvent used is not discussed because it has been maintained equal in all methodologies.

4. Conclusions

The objective of this study was to optimize the analytical procedure using common inexpensive laboratory equipment to quantify IMF. It has been shown that extraction with Vortex is achievable with little extra consumed analytical time.

In samples with high IMF amount (pork), the three homogenization methodologies (Ball-mill, Grinder or Mortar) offered similar results, but when turkey samples were considered (low amount of fat), Mortar results were different from the other procedures. Variability in the results was highest for Mortar extraction, but Grinder and Ball-mill showed similar values.

Therefore, Grinder/Vortex is proposed as an inexpensive alternative to Ball-mill/Ball-mill methodology. All methodology combinations showed no significant differences in FA profile.

Acknowledgments

This research was financed by AGL2013-48121 and AGL2010-21991. Thanks are due to Isabel Martín for skilful technical assistance.

References

Ayuso, D., González, A., Hernández, F., Corral, J.M., & Izquierdo, M. (2013). Prediction of carcass composition, ham and foreleg weight, and lean meat yields of Iberian pigs using ultrasound measurements in live animals. *Journal of Animal Science*, 91, 1884–1892.

Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.

Faucitano, L., Rivest, J., Daigle, J.P., Lavesque, K., & Gariépy, C. (2004). Distribution of intramuscular fat content and marbling within the longissimus muscle of pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 84, 57–61.

Fernandez, X., Monin, G., Talmant, A., Mourot, J., & Lebret, B. (1999). Influences of intramuscular fat content on the quality of pig meat—2. Consumer acceptability of m. longissimus lumborum. *Meat Science*, 53, 67–72.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.

Huang, H., Liu, L., Ngadi, M.O., & Gariépy, C. (2014). Rapid and non-invasive quantification of intramuscular fat content of intact pork cuts. *Talanta*, 119, 385–395.

Isabel, B., López-Bote, C.J., De la Hoz, L., Timón, M., García, C., & Ruiz, J. (2003). Effects of feeding elevated concentrations of monounsaturated fatty acids and vitamin E to swine on characteristics of dry cured hams. *Meat Science*, 64, 475–482.

Marmer, W.N., & Maxwell, R.J. (1981). Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. *Lipids*, 16, 365–371.

Olivares, A., Daza, A., Rey, A.I., & López-Bote, C.J. (2009). Interactions between genotype, dietary fat saturation and vitamin A concentration on intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs. *Meat Science*, 82, 6–12.

SAS (2009). *SAS user's guide statistics*. Cary, NC, USA: Stat Anal Syst Inst Inc.

Segura, J., & López-Bote, C.J. (2014). A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis. *Food Chemistry*, 145, 821–825.

4.3 CAPÍTULO 3: Comparison of analytical techniques for the determination of the positional distribution of fatty acids in triacylglycerols – relationship with pig fat melting point and hardness.

Los resultados del presente capítulo se recogen en el siguiente artículo:

Comparison of analytical techniques for the determination of the positional distribution of fatty acids in triacylglycerols - relationship with pig fat melting point and hardness.

J. Segura, N. Ruiz-Lopez, D. Menoyo, M.I. Cambero, C.J. Lopez-Bote.

Grasas y Aceites, 66(2) (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.1073142>



Comparison of analytical techniques for the determination of the positional distribution of fatty acids in triacylglycerols. Relationship with pig fat melting point and hardness

J. Segura^a, N. Ruiz-López^{b,✉}, D. Menoyo^b, M.I. Cambero^c and C.J. López-Bote^a

^aDepartamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

^bDepartamento de Producción Animal, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^cDepartamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

✉Corresponding author: noemi.ruiz@ig.csic.es

Submitted: 24 October 2014; Accepted: 26 December 2014

SUMMARY: This study was conducted to compare two of the most widely used methods for the determination of the positional distribution of fatty acids within the triacylglycerol molecules from fats of animal origin. Method A involves incubation of the triacylglycerol fraction with an aqueous suspension of the lipase enzyme, separation of the reaction products by thin-layer chromatography (TLC), and analysis of fatty acid methyl esters by gas-liquid chromatography. Method B eliminates the need for TLC. This technique makes use of the fact that methanolic-NaOH methylates only fatty acids esterified to glycerol. Our results demonstrated that method A data were in line with previous literature. Additionally, method A showed good correlations between fatty acid positional distribution and fat melting point and hardness. However, method B showed an underestimation of palmitic acid and lacked correlation with selected physical properties.

KEYWORDS: Basic methylation; Fatty acids; Positional distribution; TLC; Triacylglycerides

RESUMEN: *Comparación de técnicas analíticas usadas para la determinación de la distribución posicional de ácidos grasos en los triacilglicéridos. Relación con el punto de fusión y la dureza de la grasa de cerdo.* Este estudio se realizó con el objetivo de comparar los dos métodos más comúnmente utilizados en la determinación de la distribución posicional de ácidos grasos en las moléculas de triacilglicéridos de grasas de origen animal. El método A consiste en la incubación de los triacilglicéridos en una suspensión acuosa de la enzima lipasa, la separación de los productos por cromatografía de capa fina (TLC), y el posterior análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos de cada fracción mediante cromatografía gas-líquido. El método B elimina la separación por TLC. Este método se basa en que la metilación básica (NaOH) únicamente metila los ácidos grasos esterificados al glicerol. Cuando analizamos grasa subcutánea de cerdo, nuestros resultados demuestran que los datos obtenidos con el método A estuvieron en concordancia con resultados publicados anteriormente. Además el método A mostró una buena correlación entre la distribución de los ácidos grasos y el punto de fusión y dureza de las grasas analizadas. Sin embargo, el método B condujo a una subestimación del ácido palmítico y a resultados carentes de correlación con las propiedades físicas citadas.

PALABRAS CLAVE: Ácidos grasos; Distribución posicional; Metilación básica; Triacilglicerol; TLC

Citation/Cómo citar este artículo: Segura J, Ruiz-López N, Menoyo D, Cambero MI, López-Bote CJ. 2015. Comparison of analytical techniques for the determination of the positional distribution of fatty acids in triacylglycerols. Relationship with pig fat melting point and hardness. *Grasas Aceites* 66 (2): e076. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.1073142>.

Copyright: © 2015 CSIC. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial (by-nc) Spain 3.0 Licence.

1. INTRODUCTION

Triacylglycerols (TAGs) consist of a glycerol backbone to which three fatty acids (FAs) are esterified. The positions are numbered by a stereo-chemical numbering system: *sn*-1-, *sn*-2- and *sn*-3 (Figure 1). It is well known that natural TAGs exist in the form of a large number of distinct molecular species. The possible number of different TAGs (including enantiomers) in a mixture is n^3 , where n is the number of different FAs. Even considering a fat containing a limited number of FAs (low n); there would be a very large amount of different TAG molecules to analyze.

Quantitatively, the TAG fraction constitutes the most important lipid component in meat and meat products. Other minor fat constituents include phospholipids, free fatty acids, sterols (including cholesterol) and fat-soluble vitamins. Under normal circumstances, the human digestive system is able to digest TAGs and to absorb them with high efficiency (more than 95%). It has been proven that dietary FA composition and stereo-specific positioning of these FAs in TAG molecules are important factors in FA digestion and absorption (Mu and Hoy, 2004). Besides that, the distribution of FAs within the TAG molecules also affects the physical properties of the adipose tissue. This fact has many technological implications in the processing of meats which are closely linked to the quality features of final products (Smith *et al.*, 1998). Recent studies have shown that the position of the FAs within the TAG molecule might affect the incidence of illnesses such as obesity, diabetes or hypertension (Ponnampalam *et al.*, 2011; Gouk *et al.*, 2013) in humans. Hunter (2001) reviewed how the stereo-specific structure of dietary TAGs may affect human lipid metabolism

which implies their involvement in the progress of different cardiovascular diseases.

Although FA positional distribution is a topic of interest in fats from animal origin, little information exists on interventional studies aimed to alter this distribution. Moreover, marked differences due to diverse analytical methodologies exist, leading to erratic scientific information on this topic.

Several methods are used for TAG analysis. They can be divided into four categories: enzymatic hydrolysis, chemical, spectroscopic and spectrometric methods. The enzymatic approaches use lipases which specifically hydrolyze esterified FAs from the *sn*-1 and *sn*-3 positions of the TAG glycerol backbone (Figure 1) and are followed by the determination of the FA profile of the residual 2-monoacylglycerol (2-MAG) fraction and/or other resulting fractions like free fatty acids. The chemical method involves partial deacylation of the TAGs with a Grignard reagent (Becker *et al.*, 1993). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is the basic spectroscopic way to regiospecifically characterizes FAs (Redden *et al.*, 1996) and HPLC coupled with mass spectrometry (Kuksis and Itabashi, 2005) is the fourth approach to determine the position of FAs into the TAG backbone. Every one of these four methods offers some advantages and disadvantages. The enzymatic methods are time consuming and they only inform about the FA profiles at the *sn*-2 and *sn*-1,3 positions, making it impossible to distinguish between TAG enantiomeric forms. However, the stereochemical distribution of fatty acids in triacylglycerols has been described by calculating the asymmetric α coefficient from the *sn*-2 fatty acid, and triacylglycerol composition of the oil (Martínez-Force *et al.*, 2004). This coefficient reflects the relative

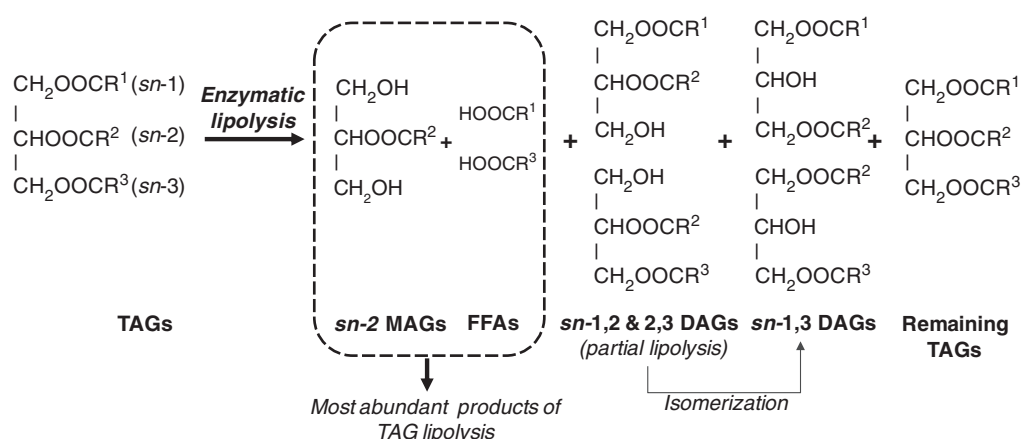


FIGURE 1. Schematic representation of TAG enzymatic lipolysis and its reaction products. TAG positions are defined by a 'stereo-specific numbering' (*sn*) system as *sn*-1, *sn*-2 and *sn*-3 where R¹, R², and R³ represent saturated or unsaturated hydrocarbon chains. When TAGs are incubated with a specific lipase and an appropriate buffer, fatty acids are hydrolyzed from the primary positions leaving 2-monoacylglycerol molecules, which can be isolated for the determination of its fatty acid composition. Additionally, *sn*-1,2 and *sn*-2,3 diacylglycerols resulting from partial TAG lipolysis are also generated.

These molecules could be isomerized with the generation of *sn*-1,3 diacylglycerols. Abbreviations: DAGs, diacylglycerols; FFA, free fatty acids; MAGs, monoacylglycerols; TAGs, triacylglycerols.

content of fatty acids at the *sn*-1 and *sn*-3 positions. The compositions of positions *sn*-1 and *sn*-3 were initially obtained by complex “stereospecific” procedures with many steps involving degradation, synthesis, enzymatic hydrolysis and chromatographic separation of the products (Brockerhoff, 1965). This α coefficient reflects the relative content of fatty acids at the *sn*-1 and *sn*-3 positions. Nowadays, this task has been improved by the development of methods involving chiral chromatography (Christie, 1992). On the other hand, enzymatic methods are relatively simple and non-expensive; additionally they do not need any special equipment. For these reasons the enzymatic methods are regularly used for the study of the positional distribution of FAs in TAG molecules.

Two enzymatic procedures are extensively used for TAG molecule studies. One of the methods uses the lipase treatment followed by thin-layer chromatography (TLC) separation of the reaction products and by acid methylation of the 2-MAG fraction (Luddy *et al.*, 1964). The second method is faster and easier to use as it eliminates the separation of the fractions by the TLC used in the standard technique.

This second method makes use of two different methylation procedures. After lipase reaction, it is possible to determine the free fatty acids by comparing the FA contents of the two methylation reactions (Williams *et al.*, 1995). The objective of the present study is to compare these two procedures when analyzing pig fat samples.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

All solvents were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain) and used as received. All other reagents were purchased by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) including: Tris/HCl buffer, lipase from porcine pancreas (Type II, 100–500 units/mg protein), lipase from *Rhizopus arrhizus* (lyophilized powder, ≥ 300 units/mg solid), primuline, silica gel TLC plates and sodium deoxycholate.

2.2. Experimental design

Pigs (Landrace \times Large White (25% Pietrain)) were randomly selected at 80 kg body weight for the experiment. The pigs were fed a commercial diet containing 2.41 Mcal·kg⁻¹ Net Energy, 162 g Crude Protein, 37 g·kg⁻¹ Crude Ash. The source of dietary fat was lard (3.2%). The dietary fatty acid composition was 0.97% palmitic acid, 0.43% stearic acid, 1.64% oleic and 0.95% linoleic acid. The calculated dietary FA composition was 0.97% (palmitic acid), 0.43% (stearic acid), 1.64% (oleic acid) and 0.95% (linoleic acid). Pigs were fed the commercial

diet ad libitum for 32 days and then slaughtered at 110 (± 2.98) kg of body weight. The right thigh from each pig was obtained by cutting (24 h after slaughter) and processed in a traditional manner for approximately 12 months to produce a dry-cured ham (Santos *et al.*, 2008), which were subsequently deboned. The subcutaneous fat at the level of the *biceps femoris* muscle was carefully taken from each dry-ham. The SF samples were stored at 4 °C until analysis. Samples were analyzed in the 1st week of storage.

2.3. Triacylglycerol purification

The total lipids of the subcutaneous fat were extracted following Segura and López-Bote (2014) and Segura *et al.* (2015) protocols. The TAG fraction was purified (as Sayanova *et al.*, 2012) by TLC using silica gel plates (0.25 mm thickness) that were developed using hexane: ethyl ether: acetic acid (75:25:1 by volume). The TLC plates were sprayed with a 0.05% solution of primuline in acetone: water (80:20 by volume) to identify the position of the TAG fraction on the plates. The TAG fraction was scraped off the plates and eluted from silica with hexane: ethyl ether (95:5 by volume).

2.4. Positional analysis of FAs in TAGs-Method A

A positional analysis of purified TAGs was performed as previously described by Luddy *et al.* (1964) and adapted by Mancha and Vazquez (1970). Samples containing 10 mg TAGs were dried under nitrogen and re-suspended in 1 mL of 1 mM Tris/HCl (pH 8.0). Samples were sonicated for 60 sec to ensure complete emulsification of the lipid. Then 0.1 mL of 22% CaCl₂ and 0.25 mL of 0.1% deoxycholate were added. The samples were warmed at 40 °C for 30 sec. Fat hydrolysis started after the addition of 2 mg pancreatic lipase (Sigma-Aldrich). The samples were vortexed for 1–2 min. The reaction was stopped when approximately 60% of the TAGs were hydrolyzed by adding 0.5 mL of 6 N HCl (to prevent diacylglycerol isomerization). The total lipids were extracted three times with 1.5 mL diethyl ether, evaporated at 40 °C under nitrogen, and separated into lipid classes by TLC as above. The spots corresponding to 2-MAG and remaining TAGs were scraped off the plate and directly transmethylated for GC-FID analysis. The validity of the procedure was confirmed by comparing the FA composition of the intact TAG sample and those remaining after the partial hydrolysis (Martínez-Force *et al.*, 2009). The mean composition of FAs in the *sn*-1,3 positions was calculated using the composition of an aliquot of the initial TAGs and the formula:

$$\text{Mean } sn\text{-1,3 \%} = [(3 \times \% \text{ FAs in TAGs}) - (\% \text{ FAs in 2-MAG})] / 2.$$

Fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained from isolated lipids by heating the samples at 80 °C for 1 h in 3 mL of methanol: toluene: H₂SO₄ (88:10:2 by volume) as in Garcés and Mancha, 1993. After cooling, 1 mL of hexane was added and the samples were mixed. FAMES were recovered from the upper phase. FAMES were separated and quantified using a gas chromatograph (Agilent, HP 6890 Series GC System) equipped with a flame ionization detector. Separation was performed with a J&W GC Column, HP-Innowax Polyethylene Glycol (30 m×0.316 mm×0.25 µm). Nitrogen was used as a carrier gas. After injection at 170 °C, the oven temperature was raised to 210 °C at a rate 3.5 °C·min⁻¹, then to 250 °C at a rate of 7 °C·min⁻¹ and held constant for 1 minute. The flame ionization was held at 250 °C. The split ratio was 1:40. FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of authentic standards (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

2.5. Positional analysis of FAs in TAGs -Method B

Extracted TAGs were digested with *Rhizopus arrhizus* lipase (Sigma-Aldrich, Spain) following the protocol of Williams *et al.* (1995), as modified by Smith *et al.* (1998). Lipids (2 µL) were added to 1 mL of buffer containing 1 mg·mL⁻¹ Triton X-100, 0.05 M borate, 0.04 M Tris (pH 7.2). Samples were sonicated for 60 s to ensure a complete emulsification of the lipids. Onehalf of the suspension was transferred to a clean tube. Two hundred units of *R. arrhizus* lipase were added to the tube. The remaining portion of the suspension was analyzed without digestion. Both sets of tubes were incubated at 37 °C for 60 min. The reaction was terminated with 0.5 mL of 1 N acetic acid and 3 mL of chloroform:methanol (2:1 by volume). The lipids were extracted three times with chloroform:methanol and evaporated under N₂. The complete digestion of TAGs was confirmed by TLC.

Lipase hydrolysis products were trans-methylated by incubating with 1 mL of 0.1 M NaOH in methanol for 30 min at 65 °C. After cooling, 1 mL of hexane was added and the samples were mixed. FAMES were recovered from the upper phase, separated and quantified by GC as shown in 2.3 (see above). The NaOH/methanol methylation procedure does not methylate non-esterified FAs. Therefore, the fatty acid compositions of the lipase-digested (recognized as FAs in *sn*-2 position) and undigested (FAs in total lipids) fractions were used to calculate the average composition of the FAs in the *sn*-1,3 positions (Smith *et al.*, 1998):

$$\text{Average } sn\text{-1,3 } \% = (3 \times \% \text{ FAs in total lipids}) - (2 \times \% \text{ FAs in } sn\text{-2 position})$$

2.6. Determination of melting Point

Triplicate subcutaneous fat samples were independently collected from each dry-cured ham. Samples were melted at 80 °C and 1 cm was drawn

into capillary tubes while still warm. The capillary tubes containing the samples were stored at 4 °C overnight and then placed vertically in a chilled water bath. The temperature was gradually increased in the water bath (2 °C·min⁻¹). The temperature at which the lipid began to move up the capillary tube was recorded (ISO 6321-2002).

2.7. Texture profile analysis

A texture profile analysis (TPA) was performed using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Expert programmes. Textural tests of dry-cured ham subcutaneous fat were carried out in quadruplicate at about 22 °C. Briefly, four cylinders of 1.5 cm high and 1 cm wide were prepared from every sample. A slice of 1.5 cm of subcutaneous fat from the *Biceps femoris* level was cut and the cylinders were made using a stainless steel cutting cylindrical device made for that purpose. A double compression cycle test was performed with up to 50% compression of the original portion height using an aluminium cylinder probe of 2 cm in diameter. A time of 5 seconds was allowed to elapse between the two compression cycles. Force-time deformation curves were obtained with a 25 kg load cell applied at a cross-head speed of 2 mm·s⁻¹. Hardness (N), measured as the maximum force required to compress the sample, was quantified (Bourne, 1978).

2.8. Statistical analysis.

Response data were evaluated using the General Linear Model (GLM) of SAS version 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2009). The Pearson linear correlation matrix was carried out with the *Proc Corr Pearson* procedure contained in SAS.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The firmness of the fatty tissue in pork meat is one of the most important criteria of meat quality (Enser, 1983). The composition in saturated FAs principally dictates the melting point of a fat (firmness), with a highly saturated fat having a higher melting point (firmer) than an unsaturated fat. In this study, subcutaneous fat samples had an average slip point value of 29.9 (Table 1). This value is in agreement with previous records published in the Codex Alimentarius (1999) and Silva *et al.* (2009). Additionally, the hardness of these samples varied between 14.2 and 40.2 N, which is within the range of the values described by Herrero *et al.* (2007) in fermented sausages and Herrero *et al.* (2008) in cooked meat sausages, all of them high-fat meat products. Table 2 shows the average, standard deviation and range of main FAs in the TAG fraction from those samples, as well as the values for the sum of all saturated

TABLE 1. Mean, standard deviation (SD) and range of melting point and hardness of dry-cured ham subcutaneous fat

	Mean	SD	Range
Slip point ^a (°C)	29.9	1.3	27.8–32.5
Hardness ^b (N)	22.9	6.8	14.2–40.2

^aData obtained from twenty ham samples analyzed in triplicate.

^bData obtained from four ham samples analyzed in quadruplicate.

fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). There were no remarkable differences between the

subcutaneous TAG fractions which were to be evaluated using method A or B.

There is not a general agreement on the recommended methodology to assess the positional distribution of FAs within the TAGs in fats from animal origin (Smith *et al.*, 1998; Perona and Ruiz-Gutierrez, 2004). In table 2, the positional distributions of major FAs within TAG fractions are shown as obtained by the two different analytical methods under evaluation. Both methods start by the lipase digestion of the TAGs using lipases which are specific for the primary ester bond of acylglycerols (*sn*-1,3 specific). As a result, lipase hydrolysis mainly

TABLE 2. Fatty acid (g·100g⁻¹) composition¹ of intact triacylglycerides from the subcutaneous fat of dry-cured hams and TAG *sn*-2 and *sn*-1,3 fatty acid compositions obtained from the two analytical methods under evaluation

TAGs	Method A		Method B		P value
	Mean±SD	Range	Mean±SD	Range	
TAGs					
16:0	24.9±1.2	23.3–27.7	25.4±1.9	23.6–30.0	ns
16:1	2.6±0.3	1.8–3.1	2.2±0.2	1.8–2.6	ns
18:0	13.8±2.0	10.5–20.3	13.8±3.5	11.1–19.3	ns
18:1<i>n</i>-9	48.9±2.5	42.8–53.8	46.1±2.6	37.7–49.0	*
18:2<i>n</i>-6	5.5±1.8	2.7–8.5	7.6±1.6	7.0–10.9	*
Others	4.4±0.6	2.7–4.9	5.0±0.3	4.3–5.7	ns
SFA	40.8±3.0	37.0–50.0	41.0±3.2	34.1–50.0	ns
MUFA	53.4±2.7	47.1–58.5	50.7±2.8	41.2–54.2	*
PUFA	5.9±1.9	2.9–9.0	7.2±1.9	8.1–11.8	*
<i>sn</i>-2 position					
16:0	43.2±6.2	31.0–52.9	22.8±2.1	16.6–25.5	***
16:1	3.1±0.4	2.4–3.8	3.3±0.3	2.6–3.9	ns
18:0	7.7±1.1	5.8–10.7	8.6±1.0	7.1–10.8	***
18:1<i>n</i>-9	31.8±4.6	24.5–42.2	47.5±2.1	42.0–50.8	***
18:2<i>n</i>-6	3.9±1.1	2.2–5.7	11.8±2.2	8.6–16.0	***
Others	10.4±3.4	6.2–16.2	6.1±0.5	5.2–7.5	***
SFA	57.1±5.9	42.4–65.4	33.5±2.9	25.5–38.2	***
MUFA	36.0±4.8	28.3–47.6	52.1±2.2	46.2–55.1	***
PUFA	6.8±1.7	4.9–10.0	14.4±2.5	10.9–19.4	***
<i>sn</i>-1,3 positions					
16:0	15.4±3.0	9.6–20.0	30.5±5.2	22.8–41.0	***
16:1	2.2±0.4	1.2–2.9	0.3±0.4	0.1–1.4	***
18:0	16.4±2.9	12.6–25.7	27.1±5.9	12.0–37.7	***
18:1<i>n</i>-9	55.8±4.5	47.7–66.1	37.3±8.2	18.3–55.3	***
18:2<i>n</i>-6	6.2±2.2	2.7–9.7	5.2±2.4	0.3–10.5	ns
Others	4.1±0.9	1.6–4.9	1.7±0.5	0.3–2.5	***
SFA	33.4±5.2	24.5–45.3	56.2±10.0	30.1–75.0	***
MUFA	60.4±4.9	51.4–70.4	39.0±8.6	20.5–58.9	***
PUFA	6.3±2.2	2.8–9.8	5.3±2.6	1.3–10.9	ns

* $P < 0.05$, *** $P < 0.005$.

¹Each value is the mean ± SD from three independent experiments.

Abbreviations: MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids SFA, saturated fatty acids; SD, standard deviation.

produces free fatty acids and 2-MAGs. Method A is based on the TLC separation of the hydrolysis products, followed by the acid trans-methylation of 2-MAG and initial TAG fractions. As TAG hydrolysis may not be completely random and as there may be some contamination from FAs liberated from position *sn*-2 following acyl migration to positions *sn*-1,3 (see isomerization in Figure 1), the free fatty acid released after lipase hydrolysis may be somewhat different from the composition originally present in the primary positions (*sn*-1,3) of the TAGs. Thus, the mean composition of each fatty acid in positions *sn*-1 and *sn*-3 was calculated from its proportion in the intact TAG and in position *sn*-2, using the relationship previously described by Luddy *et al.* (1964) (see *Materials and Methods* 2.3).

Method B is simpler and quicker than method A. This method is easier to use as it eliminates the TLC used in method A and it can be performed on smaller samples using less lipase. This method also starts by using a lipase that de-esterifies FAs from the *sn*-1,3 position. However, method B makes use of the fact that methanolic-NaOH methylates only FAs that are esterified to the glycerol backbone and converts free fatty acids to aqueously soluble sodium salts. After lipase treatment the difference between the fatty acid composition of the two methylation reactions (intact and lipase treated samples) is a quantitative measure of the fatty acids released by the enzyme. Therefore, the fatty acid composition of the lipase-digested and undigested (total) fractions are used to calculate the average composition of FAs at the *sn*-1,3 TAG positions as described by Smith *et al.* (1998) (see *Materials and Methods* 2.4).

These two analytical methods (A and B) were applied on TAG fractions obtained from dry-cured ham subcutaneous fat (Table 2). Surprisingly, the fatty acid distributions obtained by both methods were significantly different. The fatty acid profile obtained with method A showed that palmitic acid (16:0) is mainly located in the *sn*-2 position of TAGs (43.2% of total FAs in *sn*-2 versus 15.4% of total FAs in *sn*-1,3), while a different saturated fatty acid, stearic acid (18:0), is mainly esterified at the external positions (*sn*-1,3) of the TAGs, as well as oleic acid (18:1*n*-9) and linoleic acid (18:2*n*-6). Similar distribution has been reported earlier in a variety of pig tissues. Fatty acids are not randomly esterified to the glycerol hydroxyl groups in animal fats. In the adipose tissue of pigs and in human milk the *sn*-2-position of TAGs is mostly occupied by SFA, mainly palmitic acid (Christie and Moore, 1970; Innis and Nelson, 2013). Furthermore, this preference for the *sn*-2 position is used for species differentiation (Mottram *et al.*, 2001; Szabo *et al.*, 2007). However, results obtained when using method B were completely different. Method B indicated that oleic acid is the major fatty acid at the *sn*-2 position in pork TAGs (average 47.5%) and more

importantly, it showed that palmitic acid is preferentially esterified to positions *sn*-1,3. Similar results were obtained by King *et al.* (2004) who used the same methodology of analysis (Method B). Method B underestimates the concentration of palmitic acid in *sn*-2, which obviously affects the rest of the fatty acid evaluation. Method B essentially relies on two facts (1) that, the lipase digestion is ideal, and only a mixture of 2-MAGs and free fatty acids are obtained after lipolysis and (2) that a basic trans-methylation would lead to the correspondent FAMES of exclusively the fatty acid components of the 2-MAGs. Although we have not completely elucidated the reasons for such underestimation, a likely explanation is that this method does not take into account the minority fractions resulting from the partial lipolysis (*sn*-1,2 DAGs and *sn*-2,3 DAGs) of the products from the *sn*-1,3 DAG isomerization and intact TAGs (non hydrolyzed) when FAs are methylated and mistakenly accounted for as fatty acids from 2-MAGs. It is likely that either under lipase digestion or under basic trans-methylation conditions, the translocation of FAs from *sn*-2 to external positions could be facilitated, as earlier described by Mattson and Volpenhein (1961). This translocation would diminish the concentration of palmitic acid in the *sn*-2 position of TAGs which ultimately would underestimate the real value of the whole FAs occurrence in the internal (*sn*-2) position.

As a further step, we aimed to optimize a method for predicting the melting point of a pig fat. Wood *et al.* (1978) attributed the content in stearic acid as the best predictor of melting point and Lea *et al.* (1970) considered the relationship between MUFA and SFA the best index. In general, higher proportions of stearic acid and lower proportions of linoleic acid led to a harder fat. Hugo and Roodt (2007) reviewed the significance of porcine fat quality and reported that both linoleic acid and palmitic acid are important in terms of firmness. López-Bote *et al.* (2002) found that an increase in dietary SFA entailed a rise in fat firmness. Isabel *et al.* (2003) and Hallenstvedt *et al.* (2012) revealed that changes in dietary fat, specifically in PUFA, MUFA and SFA levels, had a direct effect on shoulder fat firmness. Smith *et al.* (1998) and King *et al.* (2004) analyzed the effect caused by changes in dietary fat on the positional distribution of FAs in TAGs and they related some of such observed changes with variations in adipose tissue melting points. They reported that palmitic acid and stearic acid accumulated in *sn*-1,3 positions increased the slip and melting points in bovine adipose tissue.

In Table 3, a Person matrix linear correlation of melting point and hardness against the main FAs resulted from both methods is shown. The results indicate that the fatty acid profiles of TAGs were not high-quality indicators of fat melting point or hardness, and that the content in palmitic acid was

TABLE 3. Pearson's linear correlation coefficients for melting point and hardness values against fatty acid compositions from both analytical methods in dry-cured ham subcutaneous fat

	Melting point		Hardness	
	Method A	Method B	Method A	Method B
TAGs				
16:0	0.453	0.617**	0.584*	0.461
16:1	-0.131	0.219	-0.378	0.476*
18:0	0.338	0.341	0.690**	0.388*
18:1n-9	-0.225	0.180	-0.490*	0.148
18:2n-6	-0.088	-0.296	-0.532*	-0.470*
SFA	0.329	0.008	0.708**	0.280
MUFA	-0.297	0.199	-0.451*	0.172
PUFA	-0.090	-0.309	-0.545*	-0.489*
sn-2 position				
16:0	-0.445*	0.226	-0.070	0.000
16:1	-0.145	-0.003	-0.510*	0.153
18:0	0.114	0.480	-0.099	-0.109
18:1n-9	0.587**	0.013	0.137	0.460*
18:2n-6	0.212	-0.356*	-0.262	-0.362
SFA	-0.517*	0.336	-0.101	-0.046
MUFA	0.565**	0.014	0.143	0.463*
PUFA	0.185	-0.401	-0.065	-0.353
sn-1,3 position				
16:0	0.582**	0.492*	0.356	0.183
16:1	-0.085	0.012	-0.182	0.407
18:0	0.311	-0.162	0.715**	0.012
18:1n-9	-0.505*	0.164	-0.470	-0.104
18:2n-6	-0.162	0.064	-0.586*	-0.042
SFA	0.564*	-0.186	0.632**	0.103
MUFA	-0.527*	0.184	-0.435	-0.078
PUFA	-0.162	-0.043	-0.596*	-0.233

* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

Abbreviations: MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids SFA, saturated fatty acids.

the best indicator for fat melting point and stearic acid was the best indicator for hardness.

The examination of both methods by themselves, with no more variability sources other than the intrinsic biological variation of the samples, was able to establish similar relationships between melting point and hardness and main FAs to those already reported by recently cited authors. Method A led to correlations between the fat melting point and oleic acid, total MUFA, internal TAG (*sn-2*)

position contents, or the palmitic acid content at the external positions. However, Method B results only showed one positive and significant correlation: the palmitic acid content at the *sn-1,3* position and the fat melting point. Regarding hardness, it seems that the *sn-2* fatty acids in TAGs are not good indicators (for both methods). However, stearic and total SFA contents in the *sn-1,3* TAG positions showed a positive correlation with hardness when TAGs were analyzed by method A but not when method B was used. In fact, none of the contents of FAs in TAGs from internal or external positions analyzed by method B showed any significant correlation with hardness values.

From our point of view, it is clear that method B underestimates the proportion of palmitic acid in the *sn-2* position of TAGs from pork fat samples. For that reason, it was not possible to get any high-quality correlation of the fatty acids with the fat melting point or hardness when this method was used.

4. CONCLUSIONS

After the comparison of two commonly used methods for the determination of the positional distribution of fatty acids within triacylglycerols obtained from subcutaneous fat samples it was found that method A (based in TLC followed by acid trans-methylation of 2-monoacylglycerol products of a previous lipase digestion and of intact triacylglycerols) led to results which are in line with the most recent findings in the literature. Additionally, this method's results showed positive correlations between the positional distribution of FA and the physical properties of subcutaneous fat. Method B was founded on the fact that a basic trans-methylation would only methylate fatty acids esterified to glycerol molecules, and this method led to entirely different results which were lacking correlation with selected physical fat properties. We concluded that these inexact results were likely due to an underestimation of *sn-2* palmitic acid concentration by method B.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was financed by MEDGAN (S2013/ABI-2913). Thanks are due to Isabel Martín for her skilful technical assistance.

REFERENCES

- Becker CC, Rosenquist A, Hølmer G. 1993. Regiospecific analysis of triacylglycerols using allyl magnesium bromide. *Lipids*. **28**, 147–149. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02535779>.
- Bourne MC. 1978. Texture profile analysis. *Food Technol.* **32**, 62–66.
- Brockerhoff H. 1965. A stereospecific analysis of triglycerides. *J. Lipid Res.* **6**, 10–15.

- Christie WW, Moore JH. 1970. A comparison of structures of triglycerides from various pig tissues. *Biochim Biophys Acta*. **210**, 46–56.
- Christie WW. 1992. The chromatographic resolution of chiral lipids. In Oily Press, Ayr (Ed.) *Advances in Lipid Methodology - One*, pp. 121–148. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(70\)90060-3](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(70)90060-3).
- Codex Alimentarius. 1999. CODEX – STAN 211. Codex 1999 Standard for Named Animal Fats.
- Enser MB. 1983. The relationship between the composition and the consistency of pig backfat. In Wood JD (Ed.) *Fat quality in lean pigs, Meat Research Institute Special report No. 2*, Document number EUR 8901 EN, CEC Workshop, Brussels, Belgium, 53–57.
- Garcés R, Mancha M. 1993. One-step lipid extraction and fatty-acid methyl-esters preparation from fresh plant-tissues. *Anal. Biochem.* **211**, 139–143. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1993.1244>.
- Gouk SW, Cheng SF, Mok JSL, Ong ASH, Chuah CH. 2013. Long-chain SFA at the *sn*-1,3 positions of TAG reduce body fat deposition in c57bl/6 mice. *Br. J. Nutr.* **110**, 1987–1995. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114513001475>.
- Hallenstvedt E, Kjos NP, Overland M, Thomassen M. 2012. Changes in texture, colour and fatty acid composition of male and female pig shoulder fat due to different dietary fat sources. *Meat Sci.* **90**, 519–527. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.08.009>.
- Herrero AM, Ordoñez JA, de Ávila R, Herranz B, de la Hoz L, Cambero MI. 2007. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Sci.* **77**, 331–338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.022>.
- Herrero AM, de la Hoz L, Ordoñez JA, Herranz B, Romero de Ávila MD, Cambero MI. 2008. Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Sci.* **80**, 690–696. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.03.008>.
- Hugo A, Roodt E. 2007. Significance of porcine fat quality in meat technology: A review. *Food Res Int.* **23**, 175–198. <http://dx.doi.org/10.1080/87559120701225037>.
- Hunter JE. 2001. Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids.* **36**, 655–668. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-001-0770-0>.
- Innis SM, Nelson CM. 2013. Dietary triacylglycerols rich in *sn*-2 palmitate alter post-prandial lipoprotein and unesterified fatty acids in term infants. *Prostag Leukotr. Ess.* **89**, 145–151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2013.03.003>.
- Isabel B, López-Bote CJ, de la Hoz L, Timón M, García C, Ruiz J. 2003. Effects of feeding elevated concentrations of monounsaturated fatty acids and vitamin e to swine on characteristics of dry cured hams. *Meat Sci.* **64**, 475–482. [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00225-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00225-5).
- ISO 6321:2002. 2002. Animal and vegetable fats and oils - Determination of melting point in open capillary tubes (slip point), Second edition, pp 2–15.
- King DA, Behrends JM, Jenschke BE, Rhoades RD, Smith SB. 2004. Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols from subcutaneous adipose tissue of pigs fed diets enriched with conjugated linoleic acid, corn oil, or beef tallow. *Meat Sci.* **67**, 675–681. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.01.006>.
- Kuksis A, Itabashi Y. 2005. Regio- and stereospecific analysis of glycerolipids. *Methods.* **36** (2), 172–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.11.001>.
- Lea CH, Swoboda PAT, Gatherum DP. 1970. A chemical study of soft fat in cross-bred pigs. *J. Agr. Sci.* **74**, 279–284. <http://dx.doi.org/10.1017/S0021859600022899>.
- López-Bote CJ, Isabel B, Daza A. 2002. Partial replacement of poly- with monounsaturated fatty acids and vitamin e supplementation in pig diets: effect on fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular fat and on fat and lean firmness. *Anim. Sci.* **75**, 349–358.
- Luddy FE, Barford RA, Herb SF, Magidman P, Riemenschneider RW. 1964. Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **41**, 693–696. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02661412>.
- Mancha M, Vázquez A. 1970. Transformación de los glicéridos durante la maduración de la aceituna. III. Distribución de los ácidos grasos en los triglicéridos. *Grasas Aceites.* **21**, 127–131.
- Martínez-Force E, Ruiz-López N, Garcés R. 2004. The determination of asymmetrical stereochemical distribution of fatty acids in triacylglycerols. *Anal. Biochem.* **334**, 175–182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2004.07.019>.
- Martínez-Force E, Ruiz-López N, Garcés R. 2009. Influence of specific fatty acids on the asymmetric distribution of saturated fatty acids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) triacylglycerols. *J. Agric Food Chem.* **57**, 1595–1599. <http://dx.doi.org/10.1021/jf803227n>.
- Mattson EH, Volpenhein RA. 1961. The use of pancreatic lipase for determining the distribution of fatty acids in partial and complete glycerides. *J. Lipid Res.* **2**, 58–62.
- Mottram HR, Crossman ZM, Evershed RP. 2001. Regiospecific characterisation of the triacylglycerols in animal fats using high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Analyst.* **126**, 1018–1024. <http://dx.doi.org/10.1039/b102491b>.
- Mu HL, Hoy CE. 2004. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.* **43**, 105–133. [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00050-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00050-X).
- Perona JS, Ruiz-Gutiérrez V. 2004. Analysis of neutral lipids: triacylglycerols. In Nollet LML (Ed.) *Handbook of food analysis*. Marcel Dekker, New York, 275–312.
- Ponnampalam EN, Lewandowski P, Nesaratnam K, Dunshea FR, Gill H. 2011. Differential effects of natural palm oil, chemically-and enzymatically-modified palm oil on weight gain, blood lipid metabolites and fat deposition in a pediatric pig model. *Nutr. J.* **10**, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-10-53>.
- Redden PR, Lin X, Horrobin DF. 1996. Comparison of the Grignard deacylation TLC and HPLC methods and high resolution 13C-NMR for the *sn*-2 positional analysis of triacylglycerols containing γ -linolenic acid. *Chem. Phys. Lipids.* **79**, 9–19. [http://dx.doi.org/10.1016/0009-3084\(95\)02502-2](http://dx.doi.org/10.1016/0009-3084(95)02502-2).
- Santos C, Hoz L, Cambero MI, Cabeza MC, Ordoñez JA. 2008. Enrichment of dry-cured ham with alpha-linolenic acid and alpha-tocopherol by the use of linseed oil and alpha-tocopherol acetate in pig diets. *Meat Sci.* **80**, 668–674. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.03.004>.
- Sayanova O, Ruiz-López N, Haslam R, Napier J. 2012. The role of Delta 6-desaturase acyl-carrier specificity in the efficient synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal.* **10**, 195–206. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00653.x>.
- Segura J, López-Bote CJ. 2014. A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis. *Food Chem.* **145**, 821–825. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.131>.
- Segura J, Escudero R, Romero de Ávila MD, Cambero MI, López-Bote CJ. 2015. Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat. *Meat Sci.* **103**, 90–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.01.008>.
- Silva RC, Cotting LN, Poltronieri TP, Balcão VM, Gioielli LA. 2009. Physical properties of structured lipids from lard and soybean oil produce by enzymatic interesterification. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* **29**, 652–660. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000300031>.
- Smith SB, Yang AJ, Larsen TW, Tume RK. 1998. Positional analysis of triacylglycerols from bovine adipose tissue lipids varying in degree of unsaturation. *Lipids.* **33**, 197–207. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-998-0196-8>.
- Szabo A, Febel H, Sugar L, Romvari R. 2007. Fatty acid regiodistribution analysis of divergent animal triacylglycerol samples - a possible approach for species differentiation. *J. Food Lipids.* **14**, 62–77. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2006.00071.x>.
- Williams JP, Khan MU, Wong D. 1995. A simple technique for the analysis of positional distribution of fatty-acids on diacylglycerols and triacylglycerols using lipase and phospholipase-A₂. *J Lipid Res.* **36**, 1407–1412.
- Wood JD, Enser MB, Macfie HJ, Smith WC, Chadwick JP, Ellis M, Laird R. 1978. Fatty acid composition of backfat in large white pigs selected for low backfat thickness. *Meat Sci.* **2**, 289–300. [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(78\)90030-X](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(78)90030-X).

4.4 CAPÍTULO 4: Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat.

Los resultados del presente capítulo se recogen en el siguiente artículo:

Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat.

J. Segura, R. Escudero, M.D. Romero de Ávila, M.I. Cambero, C.J. López-Bote.

Meat Science 103 (2015), 90-95.



Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat



J. Segura^a, R. Escudero^b, M.D. Romero de Ávila^b, M.I. Cambero^{b,*}, C.J. López-Bote^a

^a Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2014

Received in revised form 8 January 2015

Accepted 20 January 2015

Available online 24 January 2015

Keywords:

Triglycerides

Fatty acid

Positional distribution

Slip point

Texture profile analysis

Subcutaneous fat

ABSTRACT

Analysis of fatty acid (FA) positional distribution within the triglyceride (TG) and selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat (SF) were carried out. The slip point (SP) of the SF was related to the concentration and positional distribution of FA. When C16:0 was in Sn-2, the SP depended on the FA present in Sn-1,3. Hardness was related to the FA concentration in external positions of TG. A significant direct linear correlation between hardness against C18:0, SFA and average chain length (ACL) and inverse against C18:1, C18:2 and PUFA and unsaturation index (UI) in external positions was found. Adhesiveness was related to SFA, C16:0, C18:0, C18:1, MUFA, UI and ACL exclusively in Sn-2 position. A different role of FA in Sn-2 and Sn-1,3 positions on SP and texture properties of fat was found.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Variation in technological properties of meat largely depends on the productive conditions of pig (including genetics and feeding) and processes of muscle conversion into meat (Candek-Potokar & Skrlep, 2011) and it is an important drawback in the commercial setting.

Lipids markedly affect the quality of dry-cured hams and other meat products not only because of their importance in oxidation and flavor development (Soto et al., 2010) but also because the physical characteristics of fat affect technological properties (Houben & Krol, 1983; Hugo & Roodt, 2007) and final acceptability (Fernández, Mourot, Lebret, Gilbert, & Monin, 2000). Lean swine genotypes are prone to produce soft, oily and floppy fat (Wood, 1984) with dramatic undesirable consequences in salting, flavor development and consistency of dry-cured meat products (Gandemer, 2002; Isabel et al., 2003; Maw, Fowler, Hamilton, & Petchey, 2003). High linoleic acid (C18:2 n-6) and low saturated fatty acid (SFA) concentration have been associated to low consistency, oiliness and soft texture (Bosi & Russo, 2004). Therefore, a number of feeding practices are implemented in different consortium rules aimed to the production of quality meat products, which emphasizes the importance of maintenance of C18:2n-6 and SFA within certain limits in pig tissues (Candek-Potokar & Skrlep, 2011).

On the other hand, physical properties of adipose tissue are also affected by positional distribution of fatty acids (FA) within the triacylglycerol (TG) structure, those FA in the external position of the molecule (Sn-1 and Sn-3) having a higher effect on consistency and melting point (Smith, Yang, Larsen, & Tume, 1998). Moreover, evidence exists that dietary treatment may alter the proportion of FA in external (Sn-1 and Sn-3) and internal (Sn-2) position of the TG (King, Behrends, Jenschke, Rhoades, & Smith, 2004).

The aim of this study was to establish a relationship between the main FA and TG structure with physical and textural properties of subcutaneous fat in dry-cured hams.

2. Materials and methods

2.1. Experiment design

The experiment was conducted using 10 castrated barrows and 10 gilts (Landrace × Large White (25% Pietrain)), randomly selected at 80 kg body weight. Pigs were fed a commercial diet containing 2.41 Mcal/kg net energy and 162 g/kg crude protein. The source of dietary fat was lard (added 3.2%), rapeseed meal (8%) and soybean meal (10.7%). The calculated dietary fatty acid composition as 100 g fed was 0.97% (palmitic acid), 0.43% (stearic acid), 1.64% (oleic acid) and 0.95% (linoleic acid). Pigs had free access to diets. At 110 (±2.98) kg of body weight, the pigs were slaughtered. The right thigh from each pig was obtained at cutting (24 h after slaughter) and processed in a traditional

* Corresponding author. Tel.: +34 913943745; fax: +34 913943743.
E-mail address: icambero@vet.ucm.es (M.I. Cambero).

manner for approximately 12 months to produce a dry-cured ham (Santos, De la Hoz, Cambero, Cabeza, & Ordóñez, 2008), which were subsequently deboned. The subcutaneous fat (SF) at level of *biceps femoris* muscle was carefully taken from each dry-ham. The SF samples were stored at 4 °C until use.

2.2. Triacylglyceride purification

The total lipids of SF were extracted (Segura & López-Bote, 2014) and the TG were purified by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates (0.25 mm thickness) that were developed with hexane/ethyl ether/acetic acid (75:25:1 by volume). To detect the position of the TG, the TLC plates were sprayed with primuline acetone/water (80:20 by volume) 0.05% solution. TG fractions were scraped off the plates and eluted from silica with hexane/ethyl ether (95:5 by volume). In each case, the samples of purified TG were analyzed both by GC and lipase hydrolysis.

2.3. Lipase hydrolysis

For the positional analysis of TG Sn-2 fatty acids, 10 mg of purified TG was hydrolyzed with 2 mg of pancreatic lipase in 1 ml of 1 M Tris-HCl buffer (pH 8), 0.1 ml CaCl₂ (22%), and 0.25 ml deoxycholate (0.1%). The reaction was stopped when approximately 60% of the TGs were hydrolyzed (1–2 min) by adding 0.5 ml of 6 N HCl. The lipids were extracted three times with 1.5-ml aliquots of ethyl ether, and the reaction products were separated by TLC (see above). Free fatty acids and Sn-2-monoacylglycerol bands representing the positions Sn-1,3 and Sn-2 of TG were scraped off the plate and transmethylated (see below).

The validity of the procedure was confirmed by comparing the fatty acid composition of the original TG and those remaining after the partial hydrolysis.

2.4. Lipid analysis

Fatty acid methyl esters (FAME) were obtained from isolated lipids by heating the samples at 80 °C for 1 h in 3 ml of methanol/toluene/H₂SO₄ (88:10:2 by volume) (Garcés & Mancha, 1993). After cooling, 1 ml of hexane was added and the samples were mixed. The fatty acid methyl esters were recovered from the upper phase, separated and quantified using a gas chromatograph (HP 6890 Series GC System) equipped with a flame ionization detector. Separation was performed with a J&W GC Column, HP-Innowax Polyethylene Glycol (30 m × 0.316 mm × 0.25 μm). Nitrogen was used as a carrier gas. After injection at 170 °C, the oven temperature was raised to 210 °C at a rate of 3.5 °C/min, then to 250 °C at a rate of 7 °C/min and held constant for 1 min. The flame ionization was held at 250 °C. The split ratio was 1:40. FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of authentic standards (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain).

Unsaturation index (UI) was calculated as follows: 1 (% monoenoics) + 2 (% dienoics) + 3 (% trienoics) + 4 (% tetraenoics) + 5 (% pentaenoics) + 6 (% hexaenoics).

Average chain length (ACL) was calculated as $\Sigma (n \times (\% \text{ fatty acid})_n) / 100$, n = number of atoms of carbon.

2.5. Slip point

The lipids (extracted as mentioned in Section 2.2) were drawn 1 cm into capillary tubes while still warm. Triplicate capillary tubes were collected for each sample. The samples in the capillary tubes were stored at 4 °C overnight and then placed vertically in a chilled water bath. The temperature was increased gradually in the water bath (1–2 °C/min), and the temperature was recorded at the moment when the lipid began to move up the capillary tube (ISO 6321-2002). 124

2.6. Moisture and water activity (a_w)

Moisture was determined by drying the sample at 110 °C to a constant weight and the results were expressed as a percentage (AOAC, 2006). Water activity (a_w) was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C.

2.7. Texture profile analysis (TPA)

The texture analysis was performed according to previous works (Herrero et al., 2007). TPA was performed using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with Texture Exponent programmes. Textural tests were carried out at about 22 °C. The TPA was assayed in cylinders (1 cm high by 1.5 cm wide). The following parameters were quantified (Bourne, 1978; Herrero et al., 2007): hardness (N), maximum force required to compress the sample; springiness (m), ability of the sample to recover its original form after deforming force was removed; adhesiveness (N × s), area under the abscissa after the first compression; cohesiveness, extent to which the sample could be deformed prior to rupture; gumminess (N), force to disintegrate a semisolid meat sample for swallowing (hardness × cohesiveness); and chewiness (J), work required to masticate the sample before swallowing (hardness × cohesiveness × springiness).

2.8. Statistical analysis

The results of physicochemical analysis, FA concentration and TPA data were presented as the mean values of the samples from 20 dry-cured hams, standard deviation and range. Chemical and TPA analyses were carried out in triplicate. The simple and multiple linear regressions were performed to determine the relationships between data obtained by TPA, physico-chemical analysis, slip point and lipid analysis. These analyses were carried out with the PROC REG procedure contained in SAS. Surface models were obtained by a regression analysis to estimate the response function as is shown below: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$, where Y is the estimated parameter value, β_0 is a constant and $\beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}$ and β_{12} are the coefficients estimated from regression. They represent the linear, quadratic and cross-product effects of X_1 and X_2 on the response. The coefficient of determination (R^2) was the parameter considered to obtain a regression model. Variables were selected in the multivariate model using the backward elimination procedure, which is based on the start of the multiple regression using all of the predictors, then multiple regressions were performed with each X variable removed in turn. The X variable whose removal causes the smallest decrease in R^2 is eliminated. This process continues until removal of any X variable would cause a significant decrease in R^2 (Chatterjee & Hadi, 2006). The significance of the equation parameters for each response variable was assessed by the F-test.

3. Results and discussion

3.1. Moisture, a_w and fatty acid analysis

As it was expected, the moisture values (Table 1) varied between 2.2 and 6.7 g/100 g since TGs are the major component present in adipose tissue forming up to 95% of its weight. The average a_w value of SF was 0.80 (Table 1) which was similar to those detected by other authors (Romero de Ávila, Escudero, Ordóñez, & Cambero, 2014) in adipose tissue of dry cured ham.

Since there were no changes in the diet, the variability shown in the data was caused by differences between the animals themselves. Table 1 also shows the mean, standard deviation and range of main fatty acids, total saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA), unsaturation index (UI) and average

Table 1

Mean, standard deviation (S.D.) and range of slip point, a_w , moisture, texture parameters, fatty acid concentration (g/100 g), fatty acid group and their positional distribution for subcutaneous fat of dry-cured ham.

	Mean	S.D.	Range
Slip point (°C)	29.93	1.27	[27.80, 32.50]
a_w	0.80	0.04	[0.73, 0.88]
Moisture (g/100 g)	4.30	1.29	[2.2, 6.73]
Hardness (N)	22.90	6.82	[14.16, 40.19]
Adhesiveness (N × s)	−0.16	0.05	[−0.31, −0.06]
Springiness ($\times 10^{-3}$) (m)	2.85	0.54	[2.00, 3.75]
Cohesiveness	0.28	0.06	[0.12, 0.42]
Gumminess (N)	6.33	3.22	[2.46, 15.80]
Chewiness ($\times 10^{-2}$) (J)	1.87	0.99	[0.70, 3.99]
TOTAL			
C16:0	24.94	1.18	[23.26, 27.67]
C16:1	2.55	0.33	[1.84, 3.14]
C18:0	13.76	2.01	[10.53, 20.31]
C18:1	48.88	2.55	[42.76, 53.83]
C18:2n − 6	5.51	1.80	[2.69, 8.53]
SFA	40.78	2.99	[36.9, 50]
MUFA	53.41	2.71	[47.12, 58.53]
PUFA	5.89	1.91	[2.88, 9.04]
UI	0.66	0.04	[0.53, 0.72]
ACL	9.30	0.42	[8.49, 10.32]
Sn-2			
C16:0	42.36	7.02	[26.79, 52.87]
C16:1	3.06	0.42	[2.39, 3.82]
C18:0	7.65	1.13	[5.83, 10.74]
C18:1	31.81	4.62	[24.45, 42.15]
C18:2n − 6	3.88	1.09	[2.15, 5.73]
SFA	57.12	5.90	[42.4, 65.38]
MUFA	36.04	4.84	[28.33, 47.61]
PUFA	6.85	1.69	[4.95, 9.99]
UI	0.56	0.09	[0.45, 0.77]
ACL	11.87	0.65	[10.56, 12.86]
Sn-1,3			
C16:0	15.73	3.29	[9.56, 22.21]
C16:1	2.23	0.44	[1.23, 2.91]
C18:0	16.35	2.88	[12.61, 25.72]
C18:1	55.78	4.51	[47.71, 66.07]
C18:2n − 6	6.16	2.20	[2.66, 9.69]
SFA	33.43	5.21	[24.53, 45.27]
MUFA	60.36	4.89	[51.37, 70.35]
PUFA	6.32	2.18	[2.82, 9.83]
UI	0.73	0.06	[0.58, 0.84]
ACL	8.33	0.71	[6.72, 9.69]

SFA (saturated fatty acids), MUFA (monounsaturated fatty acids), PUFA (polyunsaturated fatty acids), UI (unsaturation index), ACL (average chain length). TOTAL (in the whole triglyceride; comprising all positions), Sn-2 (in 2-position of triglyceride), and Sn-1,3 (average of 1 and 3-positions of triglyceride).

chain length (ACL) in the whole TG (TOTAL; comprising all positions), in 2-position (Sn-2) and the average of 1 and 3-positions (Sn-1,3) of TG of SF in order to establish the composition and global structure of TG and working interval considered. It can be observed that palmitic acid (C16:0) was located mainly in the Sn-2 position, while stearic acid (C18:0) esterified the external positions (Sn-1,3) of the TG. Mono (mainly oleic acid (C18:1)) and polyunsaturated fatty acids (mainly C18:2n − 6) were also located preferentially at the Sn-1,3 positions. It is also noticeable that C18:2n − 6 showed preference for external position within the TG. Similar results were reported in various pig tissues (Christie & Moore, 1970), human milk and substitutes (Christie & Clapperton, 1982) and plasma and milk of rat and rabbit (Christie, 1985). As is known, FA are not esterified at random to the glycerol hydroxyl groups in animals. In pigs and human milk, as opposed to most species, the 2-position in the adipose tissue TG is occupied by a saturated fatty acid, mainly C16:0 (Christie & Moore, 1970).

3.2. Slip point analysis

The consistency of fat is often estimated as the slip point. Enser (1983) considered consistency as one of the most important criteria of

fat quality and indicated that slip point (SP) could indicate this property of the back fat. The fat tissue used in this research showed an average SP value of 29.93 (range of 27.80 to 32.50). This result is in agreement with the results published by several authors (Silva, Cotting, Poltronieri, Balcão, & Gioielli, 2009) and in Codex Alimentarius (1999), which describes a large range of temperatures (28 to 40 °C).

The C18:0 content (Wood et al., 1978) and relationship between MUFA and SFA (Lea, Swoboda, & Gatherum, 1970) have been considered as the best predictor of the SP. In general, a higher proportion of C18:0 and a lower proportion of C18:2n − 6 acids led to a harder fat (Lea et al., 1970). As can be observed in Table 2 and Fig. 1, not only the FA itself, but also its positional distribution in TG played an important role in SP. It can be observed for C18:0 a significant correlation between the SP and TG structure with opposite signs for each position (Table 2). C18:0 and total SFA showed a direct contribution when they are located in external positions but C16:0 and C18:0 produced a decrease in SP when located in Sn-2 (Table 2). Total MUFA concentration in Sn-2 also showed a direct contribution to SP while ACL in Sn-2 and UI in Sn-1,3 were inversely proportional to SP.

When multicollinearity between the predictor variables and/or a significant lack of fit of the first-order model (R^2 with $P > 0.05$) was detected, second-order response surface was used to evaluate the SP behavior. This technique allowed an easy view of how SP changes with the positional distribution of FA within the triglyceride.

The surface representation and respective regression equations were shown in Fig. 1. In this figure only the cases with significant ($P < 0.05$) coefficients of determination are recorded.

In general, it was observed that the slip point values of the SF were affected by the concentration and positional distribution of FA within TG. As it has been mentioned, C16:0 is the main component of Sn-2 position (Table 1). In this case, the behavior of the SP is apparently dependent of the FA present in Sn-1,3 (Fig. 1. a, b, c). Maximum SP could be observed in fat with a high concentration of TG with C16:0 in both positions of TG (Fig. 1. b) and/or when C18:0 is in the external position (Fig. 1. c). The decrease of the SP could be produced by an increase of the presence of C18:1 in the external position (Fig. 1. a). It could be verified that C18:0 in the Sn-2 position did not conduct to any significant model, in fact, it has been mentioned that it is not a main FA in this position (Christie & Moore, 1970) so its importance was related to the Sn-1,3 positions.

In Fig. 1. d and e, the possible combinations with C18:1 in the Sn-2 position were shown. It could be observed (Fig. 1. d) that higher SP value can be related to the presence of C18:1 in both positions. Nevertheless, no effect of C18:1 concentration in Sn-2 was observed at low concentrations of C18:1 in Sn-1,3 (Fig. 1. d). This relationship was inverse when C18:1 was replaced by C18:0 in the external positions (Fig. 1. e). Moreover, the model (not shown) with C18:2n − 6 in the external position, although significant ($P < 0.05$), only had an adjusted R^2 of 0.35.

Models of combinations with C18:2n − 6 in the Sn-2 position, did not explain more than 30% of the variation (model not shown) with the exception of the one with C16:0 in Sn-1,3 which led to an adjusted R^2 of 0.61 ($P < 0.05$). Nevertheless, this model only confirmed the independence of SP of C18:2n − 6 in Sn-2 as the variation is provided by C16:0 in Sn-1,3 (Fig. 1. f).

These results emphasize the importance of the FA location to predict SP values. The results obtained were in agreement with Smith et al. (1998) who reported in bovine adipose tissue that C16:0 and C18:0 accumulated in the Sn-1,3 positions increased the slip and melting points. In our work range, the results were coincident but, as it has been shown, it is not accurate to simplify the SP behavior to only one FA concentration and it is necessary to consider the FA positional distribution. A possible explanation could be that when SFA are located in the Sn-1,3 positions, van der Waals forces between methylene carbons are maximized (folds and turns in unsaturated fatty acid structures hinder these hydrophobic interactions), therefore, a more organized structure

Table 2
Simple and multiple linear regression analysis of the slip point, hardness or adhesiveness value versus fatty acid concentration (g/100 g) in Sn-2 or Sn-1,3 positions of the triglyceride.

Dependent variable	R ²	SE	Independent variable	Regression coefficient	t value	P value	
Slip point (°C)	0.57***	2.38	Constant	37.99	15.95	0.0001	
		0.03	C16:0, Sn-2	-0.18	-5.66	0.0001	
		0.18	C18:0, Sn-2	-0.49	-2.74	0.0131	
	0.44**	0.06	C18:0, Sn-1,3	0.22	3.75	0.0014	
		3.93	Constant	45.11	11.47	0.0001	
		0.36	ACL, Sn-2	-0.88	-2.42	0.0249	
	0.32**	3.64	UI, Sn-1,3	-6.45	-1.77	0.0912	
		1.45	Constant	25.35	306.32	0.0001	
	0.31**	0.04	SFA, Sn-1,3	0.14	10.17	0.0042	
		1.70	Constant	24.58	208.89	0.0001	
	Hardness (N)	0.62***	0.05	MUFA, Sn-2	0.15	10.03	0.0045
			7.80	Constant	8.51	1.09	0.2896
0.37			C18:0, Sn-1,3	1.28	3.50	0.0026	
0.53**		0.48	C18:2n-6, Sn-1,3	-1.14	-2.35	0.0303	
		13.28	Constant	66.04	4.97	0.0001	
		0.23	C18:1, Sn-1,3	-0.58	-2.49	0.0230	
0.56***		0.49	C18:2n-6, Sn-1,3	-1.75	-3.53	0.0024	
		8.85	Constant	12.41	1.40	0.1778	
		0.21	SFA, Sn-1,3	0.56	2.67	0.0156	
		0.52	PUFA, Sn-1,3	-1.34	-2.58	0.0190	
		13.15	Constant	68.64	5.22	0.0001	
		0.21	MUFA, Sn-1,3	-0.56	-2.67	0.0155	
0.50***	0.48	PUFA, Sn-1,3	-1.90	-3.95	0.0009		
	11.84	Constant	76.31	6.44	0.0001		
	16.18	UI, Sn-1,3	-73.25	-4.53	0.0002		
0.20*	15.72	Constant	-11.38	-0.72	0.4781		
	1.88	ACL, Sn-1,3	4.12	2.19	0.0415		
	13.66	Constant	-83.53	-6.12	0.0001		
Adhesiveness (10 ⁻²) (N · s)	0.54***	0.18	C16:0, Sn-2	0.92	5.16	0.0001	
		0.84	C18:0, Sn-2	2.88	3.42	0.0031	
		0.79	C18:2n-6, Sn-2	1.49	1.88	0.0760	
	0.35*	7.65	Constant	-5.83	-0.76	0.4548	
		0.27	C18:1, Sn-2	-1.01	-3.74	0.0014	
		1.03	C18:2n-6, Sn-2	2.30	2.23	0.0382	
	0.20*	0.36	C18:0, Sn-1,3	0.79	2.21	0.0393	
		10.36	Constant	-41.53	-4.01	0.0006	
		0.18	SFA, Sn-2	0.45	2.50	0.0206	
	0.23*	7.79	Constant	3.81	0.49	0.6300	
		0.22	MUFA, Sn-2	-0.54	-2.52	0.0199	
	0.20*	6.64	Constant	0.20	0.03	0.9759	
11.94		UI, Sn-2	-28.86	-2.42	0.0248		
19.96		Constant	-58.78	-2.94	0.0077		
0.18*	1.67	ACL, Sn-2	3.62	2.16	0.0423		

SE = standard error of the estimate; R² = coefficient of determination. P-Value for R² was determined using F-test.

SFA (saturated fatty acids), MUFA (monounsaturated fatty acids), PUFA (polyunsaturated fatty acids), UI (unsaturation index), ACL (average chain length). Sn-2 (in 2-position of triglyceride), Sn-1,3 (average of 1 and 3-positions of triglyceride), TOTAL (in whole triglyceride; comprising all positions).

* P < 0.05.

** P < 0.001.

*** P < 0.001.

is reached. These forces are diminished with a slight increase in the distance between acyl chains so the presence of *cis* double bounds increase the occupied volume by the FA, thus increasing the distance between a FA and its neighboring acyl chain and decreasing the association (Brenner, 1984; Cook, 1991). Interestingly, C18:2n-6 and total PUFA were not directly correlated to SP but, an increase in UI in external positions implied a decrease in SP values (Table 2). The more unsaturated the FA, the less it is able to rotate around its carbon-carbon bonds and, consequently, the more it influences acyl packing (Brenner, 1984; Cook, 1991). PUFA contain in their structure more folds or turns that further hamper the intermolecular associations mentioned above. Besides, it was found that SP tended to increase when the external positions were occupied by longer FA and tended to decrease if they were located in Sn-2 which is also related with the degree of packaging of TG in fat tissue. Longer FA have less freedom of movement than shorter

ones, thus intermolecular van der Waals association is more effective (Brenner, 1984; Cook, 1991).

3.3. TPA parameters

The results of TPA showed that hardness varied between 14.16 and 40.19 N and adhesiveness between -0.31 and -0.06 Ns. The means of springiness, cohesiveness, gumminess and chewiness were 2.85 · 10⁻³ m, 0.28, 6.33 N and 1.87 · 10⁻² J respectively (Table 1). In general, the estimated texture parameters of SF are within the range of values described by Herrero et al. (2007) in fermented sausages and Herrero et al. (2008) in cooked meat sausages, all of them high-fat meat products.

Springiness and adhesiveness showed a negative correlation (P < 0.05, R² = -0.586 and R² = -0.50, respectively) to a_w while cohesiveness showed a positive one (R² = 0.40, P < 0.05). This correlation was also observed by Herrero et al., 2007 in fermented sausages, a meat product with high-fat content.

Table 2 shows the simple and multiple linear analyses with significant coefficients of determination (R²) corresponding to the effect of the FA in different positions of the TGs in the texture parameters. It was revealed that hardness was the texture property with a major correlation with fatty acids and TG structure (Table 2). Hugo and Roodt (2007) reviewed the significance of porcine fat quality and reported that C18:2n-6 and C16:0 were important in firmness terms. López-Bote, Isabel, and Daza (2002) found that an increase in dietary SFA entailed a rising in fat firmness and Hallenstvedt, Kjos, Overland, and Thomassen (2012) revealed that changes in dietary fat, specifically in PUFA, MUFA and SFA levels, had a direct effect in shoulder fat firmness. In the present work, the results (Table 2) obtained also showed that C18:1 and C18:2n-6 were associated to hardness (directly related with firmness).

As it was expected, the hardness of SF was related to the TG structure because, being adipose tissue composed by more than 95% of TGs, their level of packaging affected its behavior when compressive force was applied (Tables 2). Unlike SP, which seems to have dependence with the relationship of concentrations in each position, hardness is more correlated to total FA and mainly with the FA concentration in Sn-1,3 (Table 2). Concurrently with SP, total SFA, UI and ACL located in Sn-1,3 showed the same effect on hardness. Simple linear regression analysis also showed that the coefficients of determination (R²) between UI (R² = 0.50, P < 0.0001) and ACL (R² = 0.20, P < 0.05) in Sn-1,3 positions and hardness were significant (Table 2).

The statistical significance (R² = 0.62, p < 0.001) of the multiple linear regression when C18:0 and C18:2n-6 in Sn-1,3 positions were related to hardness indicated that the positional distribution of FA plays an important role in the textural behavior of SF (Table 2). Regression equation of hardness against C18:1 and C18:2n-6, in Sn-1,3 also showed a significant correlation (R² = 0.53, P < 0.001). TGs with C 18:0 in the external position increased the hardness value while an unsaturated acid (C18:1 or C18:2n-6) produced a decrease. Hugo and Roodt (2007), López-Bote et al. (2002) or Hallenstvedt et al. (2012) have already shown a dependence of fat hardness and consistency with FA. This behavior seemed to be focused in the Sn-1,3 positions of the TG molecule.

Adhesiveness seemed to be related to total SFA, C16:0, C18:0, C18:1, total MUFA, UI and ACL exclusively in the Sn-2 position. The higher concentration of SFA or C18:2n-6 in the Sn-2 position, the higher adhesiveness of adipose tissue was observed. Casutt, Scheeder, Escher, Dufey, and Kreuze (1999) in bovine kidney fat and Nishioka and Irie (2005) in chilled porcine fat found similar results without considering the position in the TGs.

Differences in the relationship of hardness and adhesiveness with the composition of FA are undoubtedly linked to the behavior of the TGs, depending on the FA positional distribution, to the application of compressive forces. Hardness is referred to the required strength to

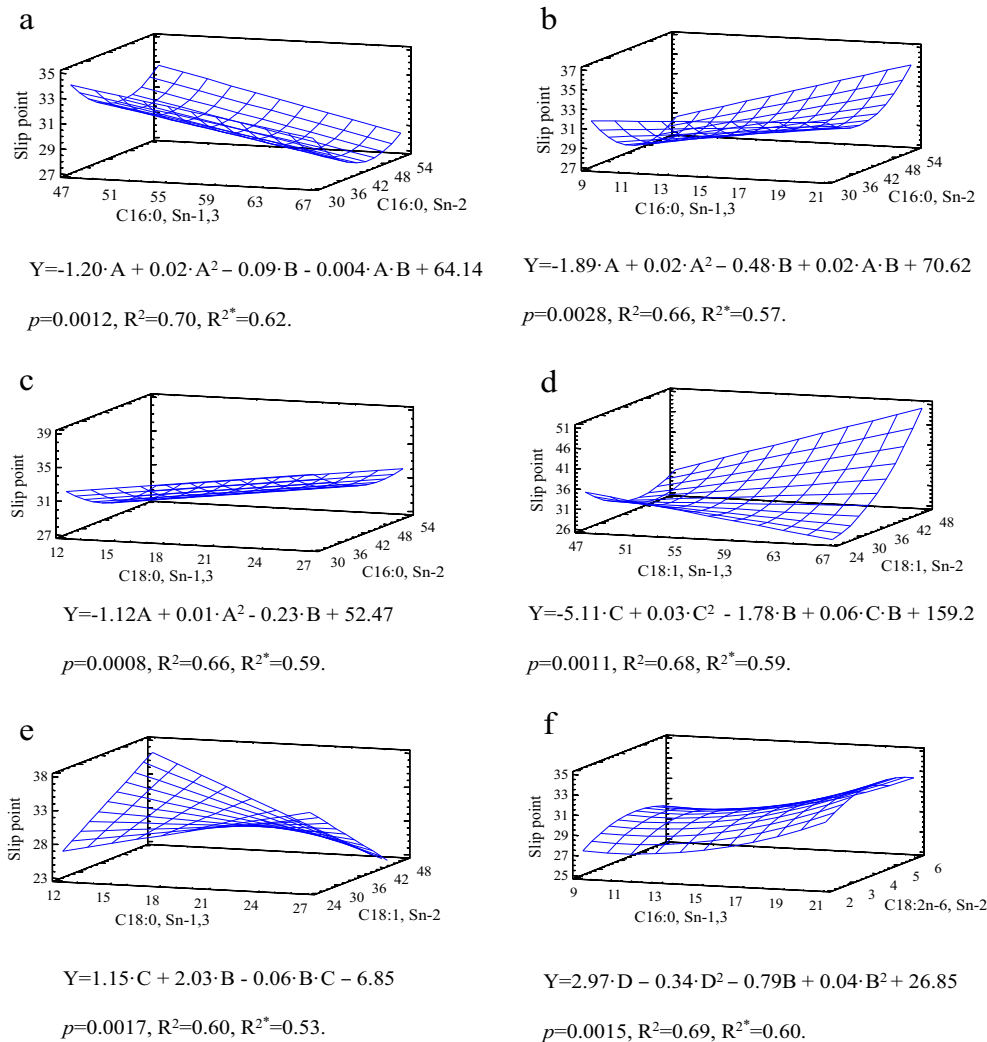


Fig. 1. Response surface plot showing the relationship between fatty acid concentration (g/100 g) in Sn-2 or Sn-1,3 positions of triglyceride and slip point (°C) for subcutaneous fat of dry-cured ham. R^2 = determination coefficient; R^{2*} = adjusted determination coefficient; Y = slip point (°C); A = C16:0 concentration (%) in Sn-2; B = fatty acid concentration (%) in Sn-1,3; C = C18:1 concentration (%) in Sn-2; D = C18:2n–6 concentration (%) in Sn-2; Sn-2 (2-position of triglyceride); and Sn-1,3 (average of 1 and 3-position of triglyceride).

compress food between molars or between tongue and palate, while adhesiveness represents the necessary work to unstick the sample from a surface (palate) (Civille & Szczesniak, 1976). In case of hardness, the structural component or packaging properties of the TG must play the most important role to predict its value, thus FA in external positions of the TG are the most correlated with it. Nevertheless, for adhesiveness, the correlation was formed with FA in the Sn-2 position, suggesting the importance of the FA position within the TG. Future research should confirm this finding.

No remarkable effect of FA was observed either in springiness and cohesiveness or in gumminess or chewiness. Serra, Ruiz-Ramírez, Arnau, and Gou (2005) also observed this behavior in *biceps femoris* muscle samples.

4. Conclusions

Dependence exists between the fat physical properties and the structure of triglyceride. While C18:0 is preferentially located in the Sn-1,3, C16:0 is located predominantly in the Sn-2 position. C18:1 and C18:2n–6 preferentially occupy the Sn-1,3 positions. The slip point of the subcutaneous fat is related to the concentration and positional distribution of fatty acids within the TG. When C16:0 is in Sn-2, the behavior of the slip point depends on the fatty present in Sn-1,3. An increase of the slip point is possible if C16:0 or C18:0 are located in Sn-1,3

and a decrease when C18:1. A positive correlation between hardness and C16:0, C18:0, SFA and ACL in the Sn-1,3 positions exist. The opposite for C18:2n–6 and total PUFA was found. Adhesiveness is related to fatty acids in the Sn-2 position, directly with C16:0, SFA and ACL and inverse with C18:1, MUFA and UI.

The results obtained allow us to conclude that the rheological behaviors of subcutaneous fat depend on the positional distribution of fatty acids within the triglyceride molecule, therefore, the achievement of a method to modify the fatty acid positional distribution could be an interesting way to modify the physical properties of fat.

Acknowledgments

This project was partially supported by Newgan (S2009/AGR-1704) and AGL2010-19158 Comunidad de Madrid and CEI Campus Moncloa UCM-UPM, 28040 Madrid, Spain.

References

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2006). *Association of Official Analytical Chemists* (18th ed.) (Washington, DC).
- Bosi, P., & Russo, V. (2004). The production of the heavy pig for high quality processed products. *Italian Journal of Animal Science*, 4, 309–321.
- Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62–66.
- Brenner, R.R. (1984). Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Progress in Lipid Research*, 23, 69–96.

- Candek-Potokar, M., & Skrlep, M. (2011). Dry ham ("Kraskiprsut") processing losses as affected by raw material properties and manufacturing practice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35, 96–111.
- Casutt, M.M., Scheeder, M.R.L., Escher, F., Dufey, P.A., & Kreuze, M. (1999). Relating texture properties and composition of bovine fat tissue. *Fett-Lipid*, 8, 283–290.
- Chatterjee, S., & Hadi, A.S. (2006). Variable selection procedures. *Regression analysis by example* (pp. 281–316). New Jersey: Wiley.
- Christie, W.W. (1985). Structure of the triacyl-sn-glycerols in the plasma and milk of the rat and rabbit. *Journal of Dairy Research*, 52, 219–222.
- Christie, W.W., & Clapperton, J.L. (1982). Structures of the triacylglycerols of human milk and some substitutes. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 35, 22–24.
- Christie, W.W., & Moore, J.H. (1970). A comparison of the structures of triglycerides from various pig tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 210, 46–56.
- Civille, G., & Szczesniak, A. (1976). Guidelines to training a texture profile panel. *Journal of Texture Studies*, 4, 204–223.
- Codex Alimentarius (1999). *CODEX – STAN 211*. Codex 1999 Standard for Named Animal Fats.
- Cook, H.W. (1991). Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In D.E. Vance, & J. Vance (Eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (pp. 141–169). Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Enser, M.B. (1983). The relationship between the composition and the consistency of pig backfat. In J. D. Wood (Ed.), *Fat quality in lean pigs*, Meat Research Institute special report no. 2, document number EUR 8901 EN (pp. 53–57). Brussels, Belgium: CEC Workshop.
- Fernández, X., Mourot, J., Lebreton, B., Gilbert, S., & Monin, G. (2000). Influence of intramuscular fat content on lipid composition, sensory qualities and consumer acceptability of cured cooked ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 705–710.
- Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62, 309–321.
- Garcés, R., & Mancha, M. (1993). One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 211, 139–143.
- Hallenstvedt, E., Kjos, N.P., Overland, M., & Thomassen, M. (2012). Changes in texture, colour and fatty acid composition of male and female pig shoulder fat due to different dietary fat sources. *Meat Science*, 90, 519–527.
- Herrero, A.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Herranz, B., Romero de Ávila, M.D., & Cambero, M.I. (2008). Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 80, 690–696.
- Herrero, A.M., Ordóñez, J.A., Romero de Ávila, M.D., Herranz, B., Hoz, L., & Cambero, M.I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331–338.
- Houben, J.H., & Krol, B. (1983). Pig fats and the manufacture and storage of meat products. In J.D. Wood (Ed.), *Fat quality in lean pigs*, Meat Research Institute special report no. 2, document number EUR 8901 EN (pp. 15–26). Brussels, Belgium: CEC Workshop.
- Hugo, A., & Roodt, E. (2007). Significance of porcine fat quality in meat technology: a review. *Food Reviews International*, 23, 175–198.
- Isabel, B., López-Bote, C.J., de la Hoz, L., Timón, M., García, C., & Ruiz, J. (2003). Effects of feeding elevated concentrations of monounsaturated fatty acids and vitamin E to swine on characteristics of dry cured hams. *Meat Science*, 64, 475–482.
- ISO 6321 (2002). *Animal and vegetable fats and oils – Determination of melting point in open capillary tubes (slip point)* (2nd ed.) (2002-2-15).
- King, D.A., Behrends, J.M., Jenschke, B.E., Rhoades, R.D., & Smith, S.B. (2004). Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols from subcutaneous adipose tissue of pigs fed diets enriched with conjugated linoleic acid, corn oil, or beef tallow. *Meat Science*, 67, 675–681.
- Lea, C.H., Swoboda, P.A.T., & Gatherum, D.P. (1970). A chemical study of soft fat in cross-bred pigs. *Journal of Agricultural Science*, 74, 279–284.
- López-Bote, C.J., Isabel, B., & Daza, A. (2002). Partial replacement of poly- with monounsaturated fatty acids and vitamin E supplementation in pig diets: Effect on fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular fat and on fat and lean firmness. *Animal Science*, 75, 349–358.
- Maw, S.J., Fowler, V.R., Hamilton, M., & Petchey, A.M. (2003). Physical characteristics of pig fat and their relation to fatty acid composition. *Meat Science*, 63, 185–190.
- Nishioka, T., & Irie, M. (2005). Evaluation method for firmness and stickiness of porcine perirenal fat. *Meat Science*, 70, 399–404.
- Romero de Ávila, M.D., Escudero, R., Ordóñez, J.A., & Cambero, M.I. (2014). Wiebull analysis characterizes the breaking properties of dry-cured ham slices. *Meat Science*, 97, 451–458.
- Santos, C., De la Hoz, L., Cambero, I., Cabeza, C., & Ordóñez, J.A. (2008). Enrichment of dry cured ham with α -linolenic acid and α -tocopherol by the use of linseed oil and α -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Science*, 80, 668–674.
- Segura, J., & López-Bote, C.J. (2014). A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis. *Food Chemistry*, 145, 821–825.
- Serra, X., Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J., & Gou, P. (2005). Texture parameters of dry-cured ham m. *biceps femoris* samples dried at different levels as a function of water activity and water content. *Meat Science*, 69, 249–254.
- Silva, R.C., Cotting, L.N., Poltronieri, T.P., Balcão, V.M., & Gioielli, L.A. (2009). Physical properties of structured lipids from lard and soybean oil produce by enzymatic interesterification. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 29, 652–660.
- Smith, S.B., Yang, A., Larsen, T.W., & Tume, R.K. (1998). Positional analysis of triacylglycerols from bovine adipose tissue lipids varying in degree of unsaturation. *Lipids*, 33, 197–207.
- Soto, E., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Hierro, E., Herranz, B., López-Bote, C.J., & Cambero, M.I. (2010). The lipid composition and texture profile of dry-cured loin as affected by feeding level in the period prior to the late fattening phase and by rearing system of Iberian pigs. *Italian Journal of Food Science*, 22, 377–385.
- Wood, J.D. (1984). Fat deposition and the quality of fat tissue in meat animals. In J. Wiseman (Ed.), *Fats in animal nutrition* (pp. 407–435). London: Butterworths.
- Wood, J.D., Enser, M.B., MacFie, H.J.H., Smith, W.C., Chadwick, J.P., Ellis, M., & Laird, R. (1978). Fatty acid composition of backfat in Large White pigs selected for low backfat thickness. *Meat Science*, 2, 289–300.

4.5 CAPÍTULO 5: Effect of sex, dietary glycerol or dietary fat during late fattening on fatty acid composition and positional distribution of fatty acids within the triglyceride in pigs.

Los resultados del presente capítulo se recogen en el siguiente artículo:

Effect of sex, dietary glycerol or dietary fat during late fattening on fatty acid composition and positional distribution of fatty acids within the triglyceride in pigs.

J. Segura, M.I. Cambero, C.J. Lopez-Bote.

Que se encuentra en corrección en la revista: Animal (2015)

Effect of sex, dietary glycerol or dietary fat during late fattening on fatty acid

composition and positional distribution of fatty acids within the triglyceride in pigs

J. Segura^{1,*}, M.I. Cambero^{2,3}, and C.J. López-Bote^{1,3}

¹ Departamento de Producción Animal, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; ² Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; ³ CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, 28040 Madrid, Spain.

The effect of sex, source of saturated fat (lard vs palm oil) and glycerol inclusion in the fattening diet on composition and fatty acid distribution within the triglyceride was studied in pigs from 78 to 110 kg body weight. Average daily gain and carcass characteristics, including ham and loin weight, were not affected by dietary treatment. A marked effect of sex was observed on backfat depth ($P < 0.01$). An interaction sex \times glycerol was observed; dietary glycerol increased lean content in gilts, but had no effect in barrows ($P < 0.05$ for the interaction). Individual and total saturated fatty acid (SFA) concentrations were greater in barrows than in gilts. In contrast, the concentration of total polyunsaturated fatty acids (PUFA), C18:2n-6, C18:3n-3, C20:3n-9 and C20:4n-6 in the intramuscular fat (IMF) was higher ($P < 0.05$) in gilts than in barrows. Sex, however, did not affect total monounsaturated fatty acids (MUFA) concentration in the IMF. In the subcutaneous fat (SF), barrows had a higher proportion of SFA than gilts ($P < 0.001$). The individual SFA concentration were affected by sex only for C14:0 and C16:0 ($P < 0.001$). Dietary fat did not affect total SFA, MUFA or PUFA of the IMF. Dietary fat did not affect the subcutaneous concentration of SFA or PUFA but that of MUFA tended to be higher ($P = 0.079$) in pigs fed lard. Dietary glycerol increased total MUFA and C18:1n-9 concentration in the IMF. Also, glycerol inclusion increased total MUFA and decreased and C18:2n-6, C18:3n-3 total PUFA concentrations in the SF. The data indicate that the potential for altering the fatty acid composition at the 2- position of the triglyceride molecule, by dietary intervention during the fattening phase, is very limited.

Keywords: dietary fat, glycerol, intramuscular fat, pig, positional fatty acid distribution.

Implications.

The structure and composition of triacylglycerides is highly related to the quality of dry-cured hams and other meat products. Besides, the structure of triglyceride molecule is markedly related to the development of illnesses as obesity, type 2 diabetes and hypertension. Information on mechanisms and metabolic control over these

E.mail: josesegu@ucm.es

variables could help to improve the quality of meat products and the prevention of certain diseases.

Introduction

Control of fatty acid (FA) profile of pig tissues is a matter of interest in the production of meat aimed for the production of high quality meat products (D'Arrigo et al., 2002; Candek-Potokar and Skrlep, 2012). An important objective is to limit the concentration of linoleic acid (C18:2n-6) in pig fat to improve fat consistency, reduce the susceptibility to oxidation and development of undesirable flavor and reduce the incidence of technological problems (such as hampered water migration) (López-Bote, 1998; López-Bote et al., 2002; Isabel et al., 2003). A reduction in C18:2n-6 concentration is normally

achieved through the incorporation of saturated fats or ingredients that enhance endogenous fat synthesis in fattening diets (Farnworth and Kramer, 1987; Wood et al., 2004; Duran-Montgé et al., 2008).

Among saturated fats, lard and palm oil are frequently used because of their low C18:2n-6 concentration together with a high concentration of saturated and monounsaturated FA (De Blas et al., 2010). Both fat sources have a similar saturated + unsaturated FA to polyunsaturated FA ratio, although palm oil had a higher proportion of C16:0 (45.6 vs. 24.5%) and lower of C18:1 (39.9 vs. 49.8%) than lard. In addition, both fat sources differ markedly in the location of individual FA within the triglyceride (TG) molecule, something that usually, is not taken into consideration by swine nutritionists. While in lard most of the C16:0 present concentrates in the internal Sn-2 position, palm oil locates it in the external (Sn-1 and Sn-3) positions of the TG (Small, 1991; Innis, 2011). This information might be relevant because the distribution of FA within the TG molecule affects the physical properties of the adipose tissue (Smith et al., 1998; Segura et al., 2014). Recent studies have shown that the position of the FA within the TG molecule might affect the incidence of illnesses such as obesity, diabetes or hypertension (Ponnampalam et al., 2011; Gouk et al., 2013).

Glycerol is a co-product of the bio-fuel industry commonly used in swine nutrition. It has been reported to affect pH, water holding capacity and other quality characteristics of potential interest in the production of dry-cured hams (Mourot et al., 1994). Moreover, it enhances FA synthesis and thus, reduces the concentration of C18:2n-6 in pig tissues increasing fat firmness (Schieck et al., 2010).

This research aimed to study the effect of diet on profile and positional distribution of FA within the TG molecule of subcutaneous fat of pigs. Diets containing glycerol (which enhances de novo FA synthesis) and two fat sources (lard vs palm oil)

differing in the FA distribution within the TG were used in fattening gilts and barrows.

Material and methods

All the experimental procedures used in this research were approved by the Animal Ethics Committee of Universidad Politécnica de Madrid, in compliance with the Spanish guidelines for the care and use of animals in research (Boletín Oficial del Estado, 2007).

Husbandry, diets and experimental design

In total, 160 crossbred pigs (40.3 ± 0.78 kg BW) obtained from a commercial farm were used in this experiment. The female line (Syra, Gene+, Erin, France) used included blood from Large White, Landrace and Duroc and the sire line was PIC L65 (PIC, Barcelona, Spain). Upon arrival at the experimental farm, pigs were housed in groups of 10 (5 gilts and 5 barrows) in a naturally ventilated finishing barn in 16 pen replicates (4 m × 3 m). All pigs received a common pre-experimental diet containing 20 g C18:2n-6/ kg diet for 38 days (79.0 ± 6.58 kg BW). Then, pigs received for 32 days their respective experimental diets consisted in four finishing diets with similar nutritive value but differed in the fat source (palm oil or lard) and the concentration of glycerol (0 vs 50g/kg). All diets in the finishing period contained low concentration of C18:2n-6 (10 g/kg). Diets were provided for ad libitum consumption and were formulated according to De Blas *et al.* (2013). The ingredient composition and the calculated (De Blas *et al.*, 2010) nutrient content of the diets are shown in Table 1. Dietary FA distribution within the TG molecule of the fat sources used is shown in Table 2.

Table 1. Ingredient composition and calculated analysis¹ of the experimental diets (g/kg diet as fed basis unless otherwise indicated).

Ingredients	40 to 79 kg BW	79 to 109 kg BW			
		Glycerol, 0%		Glycerol, 5%	
		Palm Oil	Lard	Palm Oil	Lard
Barley	300	300	300	342	342
Wheat	322	303	303	200.5	200.5
Rye	120	150	150	150	150
Glycerol-85	-	-	-	50	50
Rapeseed meal (34%)	60	80	80	80	80
Soyabean meal (47%)	134	107	107	122	122
Soyabean oil	32	-	-	-	-
Lard	-	-	32	-	32
Palm Oil	-	32	-	32	-
Lysine (50%)	6	5.4	5.4	4.8	4.8
DL-Methionine	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6
L-Threonine (99%)	1.1	1	1	0.9	0.9
Choline (60%)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Calcium carbonate	11.8	11.6	11.6	11.6	11.6
Monocalcium phosphate	1	-	-	-	-
Sodium chloride	4	4	4	1.2	1.2
Formic acid, 75% activity	2	-	-	-	-
Premix ¹	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2
Calculated composition ²					
Net energy (kcal/kg)	2410	2410	2410	2430	2430
Crude protein	163	162	162	162	162
Crude ash	38	37	37	40	40
C16:0	12.4	15.9	9.7	15.8	9.6
C18:0	5.4	1.7	4.3	1.7	4.3
C18:1	22.6	15.1	16.4	15.0	16.3
C18:2n-6	26.1	9.5	9.5	9.2	9.2

¹Supplied per kg diet: 7,000 IU vitamin A (trans-retinyl acetate); 1,600 IU vitamin D₃ (cholecalciferol); 20 IU vitamin E (all-rac-tocopherol-acetate); 1.0 mg vitamin K₃ (bisulphate menadione complex); 0.7 mg thiamine (thiamine-mononitrate); 3.0 mg riboflavin; 9 mg of pantothenic acid (D-Ca pantothenate); 15 mg vitamin B₃ (niacin); 150 mg choline (choline chloride); 1 mg pyridoxine (pyridoxine HCl); 0.016 mg vitamin B₁₂ (cobalamin); 16.5 copper (CuSO₄·5H₂O); 75 mg iron (FeSO₄·7H₂O); 40 mg manganese (MnO₂); 110 mg zinc (ZnO); 0.3 mg selenium Se (Na₂SeO₃); 0.8 mg iodine [Ca(IO₃)₂] and 125 mg ethoxyquin. Phytase (500 FTU; Natuphos 5,000, Basf Española, Barcelona, Spain)

²According to Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal (2010) (supplied per kg of diet).

Table 2. Total (whole triglyceride), position 2 (Sn-2) and position 1,3 (Sn-1,3) fatty acid composition of fat sources used in this experiment.

	Palm oil	Lard
TOTAL ¹		
C16:0	45.6	24.5
C18:0	4.7	13.2
C18:1n-9	39.9	49.8
C18:2n-6	9.8	12.5
Sn-2 ¹		
C16:0	12.5	70.8
C18:0	2.9	9.3
C18:1n-9	65.6	16.5
C18:2n-6	19.0	3.4
Sn-1,3 ²		
C16:0	62.2	1.4
C18:0	5.7	15.2
C18:1n-9	27.0	66.5
C18:2n-6	5.1	17.1

¹ (g/100g of total present fatty acids).

² (g/100g of total present fatty acids calculated as Sn-1,3 = (3 x %Total – %Sn-2) / 2).

Growth performance

Individual BW per pen was recorded at the beginning and at the end of the finishing period. Excess of feed was removed from the feeders and weighed and feed disappearance was determined. Feed wastage was not measured. From these data average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI) and feed conversion ratio (FCR) per pen were calculated.

Carcass measurements and primal cuts yield

The day before slaughter, pigs were weighed, fasted for 15 h and transported 300 km to a commercial abattoir (Incarlopsa, Cuenca, Spain) where they were allowed to rest for 4 h with full access to water but not to feed. Pigs were stunned in a 90% CO₂ atmosphere and then slaughtered, exsanguinated and scalded at 65 °C according to standard commercial procedures. Lean percentage, backfat depth and the weight and yield of fresh hams

of four carcasses per pen chosen at random, were measured using the Autofom classification system (Carometec Spain, S.L., Barcelona, Spain) as described by Busk *et al.* (1999). Then, carcasses were eviscerated and splitted down the center of the spine. Hot carcass weight was individually recorded and used to calculate carcass yield. Carcasses were suspended in the air and refrigerated at 2 °C (1 m/s; 90% relative humidity) for 2 h. At 2 h *post mortem*, the subcutaneous BF depth between the third and fourth last ribs, including the skin, was measured at the thinnest point in the left side of each carcass using a flexible ruler with a precision of 0.5 mm. Carcasses were processed according to standard commercial procedures. Hams were kept in the chilled room at 4 °C for 24 h and the weights of the untrimmed hams and loins were recorded (chilled weight). Then, hams were trimmed of external fat and weighed again (trimmed weight). The trimming consisted of eliminating part of the external fat and skin to fit commercial requirements and was performed by qualified personnel as described by Serrano *et al.* (2009). Data on ham and loin weights were used to calculate chilled and trimmed ham yield and chilled loin yield. Because of the design of the processing line of the slaughterhouse and the method of carcass dissection, shoulder weights could not be recorded.

After collection of carcass data, a 300 g sample of *Longissimus dorsi* and 150 g of subcutaneous fat (SF) were excised at the last rib. The meat samples were stored in individual plastic bags and vacuum packaged at -20 °C until subsequent meat analyses. The intramuscular fat (IMF) was quantified as proposed by Segura and López-Bote (2014). The total lipids were extracted from the subcutaneous outer backfat layer and the triacylglycerol (TG) were purified by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates (0.25 mm thickness) that were developed with hexane/ethyl ether/acetic acid (75:25:1 by volume). To detect the position of the TG, the TLC plates were sprayed with primuline acetone/water (80:20 by volume) 0.05% solution. TG fractions were scraped off the plates and

eluted from silica with hexane/diethyl ether (95:5 by volume). In each case, the samples of purified TG were analyzed by gas chromatography after lipase hydrolysis. For the positional analysis of TG Sn-2 fatty acids, 10 mg of purified TG was hydrolyzed with 2 mg of pancreatic lipase in 1 ml of 1 M Tris-HCl buffer (pH 8), 0.1 ml CaCl₂ (22%), and 0.25 ml deoxycholate (0.1%) . The reaction was stopped when approximately 60% of the TG were hydrolyzed (1–2 min) by adding 0.5 ml of 6 N HCl. The lipids were extracted three times with 1.5-ml aliquots of ethyl ether, and the reaction products were separated by TLC (see above). Free FA and Sn-2-monoacylglycerol bands representing the positions Sn-1,3 and Sn-2 of TG were scraped off the plate and transmethylated. The validity of the procedure was confirmed by comparing the FA composition of the original TG and those remaining after the partial hydrolysis (Perona and Ruíz-Gutiérrez, 2004).

Fatty acid methyl esters (FAME) were obtained from isolated lipids by heating the samples at 80 °C for 1 h in 3 ml of methanol/toluene/H₂SO₄ (88:10:2 by volume) (Garcés and Mancha, 1993). After cooling, 1 ml of hexane was added and the samples were mixed. FAME were recovered from the upper phase, separated and quantified using a gas chromatograph (HP 6890 Series GC System) equipped with flame ionization detector. Separation was performed with a J&W GC Column, HP-Innowax Polyethylene Glycol (30m x 0.316 mm x 0.25 m). Nitrogen was used as a carrier gas. After injection at 170 °C, the oven temperature was raised to 210 °C at a rate 3.5 °C/min, then to 250 °C at a rate of 7 °C/min and held constant for 1 min. The flame ionization was held at 250 °C. The split ratio was 1:40. FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of authentic standards (Sigma – Aldrich, Alcobendas, Spain).

Statistical analyses

All data were analyzed as a completely randomized design with dietary fat source, glycerol level and gender as main effects and their interactions, by using the GLM procedure of SAS 9.2

(SAS Inst. Inc., NC, 2009). A factorial arrangement was used for productive data (2 fat sources x 2 glycerol levels) and carcass and meat quality data (2 fat sources x 2 glycerol levels x 2 sexes). The experimental unit was the pen for growth performance traits (gilt and barrows together, n=4) and the individual pig for carcass and meat quality traits (two pigs of each gender chosen at random from each pen, n=8).

Results and discussion

As expected, ADG was not affected by dietary treatment (Table 3) and no interaction between fat and glycerol on growth performance was detected. A number of experiments carried out in recent years have demonstrated that glycerol inclusion in finishing diets at levels of 50 (Doppenberg and Van Der Aar, 2007), 80 (Zijlstra *et al.*, 2009) or 100 g/kg diet have not adverse effect on productivity (Lammers *et al.*, 2008; Zijlstra *et al.*, 2009). The FCR increased with the inclusion of glycerol (Table 3), which is also in agreement with previous research. Kijora and Kupsch (1996) observed that ADFI of pigs increased by 7.5% in all groups that received glycerol compared to the control group, but no effect was observed in the finishing period. Zijlstra *et al.* (2009) reported that the inclusion of 80 g glycerol/kg diet as a wheat replacement, increased ADFI and ADG, but had no effect on FCR. Possible reasons for the higher intake of diets containing glycerol are the sweet taste, the improvement in feed structure of the diets and the lower than planned net energy content of the glycerol containing diet.

The effect of fat source or glycerol inclusion in the diet on carcass characteristics of pigs is shown in Table 4. As expected, a marked effect of sex was observed on backfat depth (Peinado *et al.*, 2008; Latorre *et al.*, 2009), but neither fat source nor glycerol inclusion in the diet affected carcass characteristics, pH or ham or loin weights (Table 4). Previous results on the effect of dietary glycerol on carcass fatness are controversial, probably due to the differences reported on feed intake, which may

affect carcass fatness. Kijora *et al.* (1995) reported that dietary glycerol did not affect carcass leanness but in a second experiment, Kijora *et al.* (1997) reported a decrease in backfat thickness. On the other hand, Zijlstra *et al.* (2009) reported that glycerol supplementation increased backfat depth. In the current experiment, no effect of glycerol was found on carcass fatness, but an interesting sex x glycerol interaction was observed, in which dietary glycerol increased lean content in gilts, but had no such effect in barrows. More research on the different response between sexes should be carried out to confirm this effect and to determine if it is due to a specific effect

of sex or to different effectiveness of glycerol according to the lean growth capacity of the pig. Moreover, possible relationship of feed intake with differential response according to sex could also be involved.

Dietary treatment did not affect IMF content in agreement with data of Kijora and Kupsch (1996) who did not observed any effect of dietary glycerol on meat quality. In contrast, Kijora *et al.* (1997) reported a slight increase in backfat and marbling. Zijlstra *et al.* (2009) reported that glycerol supplementation increased backfat depth, but decreased loin marbling and carcass leanness.

Table 3. Effect of dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on growth performance of pigs during the last 32 days of fattening¹.

	Fat		Gly		SEM (n=4) ²	PValue ³	
	Palm	Lard	0%	5%		Fat	Gly
Initial BW (kg)	78.90	79.00	79.60	78.40	0.32	0.940	0.472
Final BW (kg)	108.50	109.10	108.80	108.70	0.87	0.749	0.965
ADG (kg)	0.92	0.94	0.91	0.95	0.01	0.563	0.213
ADFI (kg)	2.87	2.83	2.73	2.98	0.04	0.650	0.026
FCR	3.11	3.01	2.98	3.14	0.04	0.247	0.085

¹BW = body weight, ADG = average daily gain, ADFI = average daily feed intake, FCR = feed conversion ratio

² Four pens per treatment of 10 pigs each. ³ No significant interaction Fat x Gly was detected.

Table 4. Effect of sex, dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on carcass quality and meat composition.

	Gly		Fat		Sex		SEM (n=8)	PValue ¹		
	0%	5%	Palm	Lard	Gilt	Barrow		Sex	Fat	Gly
Carcass weight (kg)	90.00	89.70	89.20	90.60	88.10	91.00	1.36	0.011	0.175	0.96
Fat thickness (mm)										
Last rib	25.00	24.50	24.80	24.80	23.30	25.70	1.26	0.015	0.947	0.66
<i>Gluteus medius</i>	16.20	16.70	16.50	16.30	15.10	17.30	1.10	0.010	0.973	0.58
Carcass lean (%) ²	54.00	54.10	54.00	54.10	54.80	53.40	0.80	0.043	0.658	0.93
pH 24 h	5.76	5.77	5.74	5.79	5.74	5.78	0.06	0.505	0.570	0.93
Fresh ham weight (kg)	14.30	14.10	14.10	14.30	13.90	14.40	0.19	0.001	0.299	0.39
Trimmed ham weight (kg)	13.00	12.90	12.90	13.00	12.70	13.10	0.16	0.001	0.386	0.63
Loin weight (kg)	5.44	5.44	5.45	5.44	5.40	5.47	0.12	0.457	0.886	0.93

¹ Although otherwise stated, no significant interactions for main effects were detected ($P > 0.05$).

² Interaction Sex x Gly ($P = 0.055$) was detected (mean values Gilt-5% Gly = 55.2, Gilt-0% Gly=54.3, Barrow-5% Gly=53.1, Barrow-0% Gly=53.8)

The effects of dietary treatment and sex on FA composition of the intramuscular or subcutaneous outer backfat are shown in Table 5 and 6 respectively. The FA profile of the IMF of the longissimus dorsi muscle was affected by sex, with all the individual and total saturated fatty acid (SFA) concentration being higher in barrows than in gilts ($P < 0.001$). On the contrary, the concentration of total PUFA, C18:2n-6, C18:3n-3, C20:3n-9 and C20:4n-6 in the IMF was higher in gilts than in barrows.

However, sex did not affect total MUFA concentration. In the SF, a marked effect of sex on total SFA was found with barrows showing also higher values than gilts ($P < 0.001$). Individual SFA concentrations were affected significantly by sex only in the case of C14:0 and C16:0 ($P < 0.001$). As reported for IMF, no effect of sex on total MUFA was observed, but total PUFA ($P = 0.099$) and C18:2n-6 ($P = 0.077$) concentration tended to be higher in gilts than in barrows. Piedrafita *et al.* (2001) reported that gender affected the proportion of FA, as gilts showed a higher proportion of C18:2n-6 than barrows and barrows had a lower proportion of unsaturated FA than gilts. Also, Alonso *et al.* (2009) observed in Semimembranous muscle that C18:2n-6, total n-6 FA and total PUFA proportions were higher ($P < 0.05$) in gilts than in barrows, although C16:0, C18:1n-9, total SFA and total MUFA proportions were only numerically lower ($P > 0.05$) in gilts. Barea *et al.* (2013), Latorre *et al.* (2009) and Serrano *et al.* (2008) observed that C16:0, C18:0 and total SFA concentrations in SF were higher and C18:2n-6 and total PUFA proportions were lower in barrows than in gilts. Warnants *et al.* (1999) reported that barrows had higher percentages of SFA, C14:0 and C16:0, compared to gilts, with no differences in C18:1n-9 and total MUFA between sexes. Also Nuernberga *et al.* (2005) observed that SF from gilts had lower total SFA and higher total PUFA proportions than barrows. Generally, fatter pigs receiving the same diet have always lower essential FA concentration (C18:2n-6 and C18:3n-3) and higher proportion of C18:1n-9 in their tissues. Concurrently, the final explanation about sex differences lies in the fact that barrows

intake is higher and therefore endogenous FA synthesis is also higher.

No effects of dietary fat on intramuscular total SFA, MUFA or PUFA were observed. In agreement with these results, no effect of dietary fat was observed on subcutaneous SFA or PUFA, but a tendency ($P = 0.079$) for higher total MUFA concentration was observed in pigs fed diets containing lard (Table 6).

Dietary glycerol tended to increase total MUFA and C18:1n-9 in IMF, in agreement with most published data. A tendency to lower total PUFA ($P = 0.087$) and C18:2n-6 ($P = 0.062$) concentration was also observed in pigs fed diets containing glycerol (Table 5). Similarly, glycerol increased total MUFA ($P = 0.013$) and decreased PUFA ($P = 0.001$) in SF (Table 6). The concentration of C18:2n-6 and C18:3n-3 was markedly affected by dietary glycerol in SF ($P < 0.001$). Mourou *et al.* (1994) observed that dietary glycerol increased C18:1n-9 and reduced C18:2n-6 in backfat and the *Semimembranosus* muscle in pigs. Kijora *et al.* (1997) did not observe any significant effect of glycerol on the SFA profile of the backfat, but reported a moderate increase in C18:1n-9, accompanied by a decrease in C18:2n-6 and C18:3n-3 concentrations, thus reducing the PUFA to MUFA ratio in this tissue. No significant interactions between main effects were detected.

Schieck *et al.* (2010) compared in pigs a control diet (31 to 128 kg BW), a diet with 8% glycerol during the last 8 weeks of the fattening period (45 to 128 kg BW) and the same diet with 16% glycerol for the last 16 weeks (31 to 128 kg). The authors reported that feeding glycerol during the last 8 weeks before slaughter resulted in similar growth performance, with little concomitant effect on carcass composition or pork quality. These authors did not report a potential effect of dietary treatment on FA composition, but observed that glycerol inclusion enhanced belly firmness when compared to pigs fed the corn-soybean meal control diet. These results are consistent with those observed in the current experiment.

Table 5. Effect of sex, dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on fatty acid profile of the intramuscular fat¹.

	Sex		Fat		Gly		SEM (n=8)	P Value ²		
	Gilt	Barrow	Palm	Lard	0%	5%		Sex	Fat	Gly
IMF(mg/g)	74.65	82.35	80.28	76.72	76.09	80.91	7.22	0.049	0.484	0.317
C10:0	0.21	0.18	0.20	0.20	0.20	0.19	0.02	0.043	0.835	0.207
C12:0	0.07	0.06	0.06	0.07	0.06	0.07	0.02	0.319	0.778	0.335
C14:0	1.17	1.25	1.21	1.21	1.21	1.22	0.26	0.563	0.280	0.259
C16:0	22.93	23.86	23.51	23.28	23.39	23.40	0.44	0.001	0.842	0.500
C16:1n-9	0.15	0.06	0.11	0.10	0.12	0.08	0.05	0.001	0.213	0.555
C16:1n-7	3.08	3.23	3.12	3.20	3.10	3.21	0.14	0.050	0.221	0.324
C17:0	0.35	0.31	0.33	0.33	0.33	0.33	0.02	0.009	0.806	0.866
C17:1	0.25	0.23	0.24	0.24	0.23	0.25	0.15	0.178	0.314	0.198
C18:0	12.86	13.38	13.22	13.02	13.27	12.97	0.42	0.212	0.106	0.721
C18:1n-9	39.16	39.48	39.33	39.31	38.74	39.89	0.83	0.208	0.587	0.074
C18:1n-7	3.40	3.29	3.27	3.41	3.34	3.35	0.14	0.029	0.365	0.308
C18:2n-6	11.68	10.43	11.01	11.10	11.41	10.70	0.73	0.007	0.686	0.062
C18:3n-3	0.50	0.46	0.48	0.48	0.49	0.47	0.02	0.004	0.759	0.144
C18:4n-3	0.08	0.07	0.07	0.08	0.07	0.08	0.01	0.415	0.361	0.750
C20:0	0.17	0.20	0.19	0.19	0.19	0.18	0.02	0.023	0.547	0.692
C20:1n-9	0.70	0.73	0.71	0.71	0.71	0.71	0.03	0.048	0.739	0.798
C20:3n-9	0.45	0.41	0.43	0.44	0.45	0.41	0.04	0.007	0.844	0.283
C20:4n-6	2.78	2.36	2.51	2.64	2.66	2.49	0.49	0.019	0.630	0.769
SFA	37.82	39.27	38.74	38.34	38.63	38.45	0.55	0.001	0.156	0.733
MUFA	46.74	46.93	46.83	46.84	46.26	47.41	0.88	0.389	0.617	0.099
PUFA	15.44	13.81	14.43	14.82	15.11	14.14	1.03	0.016	0.413	0.087

¹IMF, (intramuscular fat), SFA (total saturated fatty acids), MUFA (total monounsaturated fatty acids), PUFA (total polyunsaturated fatty acids).

² No significant interactions were detected.

The effect of sex or dietary treatment on FA location within the TG in SF is shown in Table 6. It can be observed that, in any case, C16:0 was mainly located in Sn-2 position, while C18:0, C18:1n-9 and C18:2n-6 preponderantly occupied the external positions (Sn-1,3) of the TG. Similar results have been reported in various pig tissues (Christie and Moore, 1970), human milk and substitutes (Christie and Clapperton, 1982) and plasma and milk of rat and rabbit (Christie, 1985). As it is known, FA are not esterified at random to the glycerol hydroxyl groups

in animals. In pigs and human milk, as opposed to what happens in most species, the 2-position in the adipose tissue TGs is occupied by a saturated fatty acid, mainly C16:0 (Christie and Moore, 1970).

One of the main findings of this research is the very limited effect of either sex or dietary treatment on the FAs located in the internal Sn-2 position. In fact, the only noticeable effect was the higher concentration of C18:0 in Sn-2 position in pigs fed the glycerol containing diets, a finding that was in agreement with an increase in the endogenous synthesis of FA induced by carbohydrates (Ovilo *et*

et al. 2014). On the other hand, a marked effect of sex on Sn-1,3 position for C18:0, C18:2n-6 and C18:3n-3 FA concentrations was observed. Reasonably, the effect of sex on FAs of the TAG should be also reflected in the position where the FA is majoritarian. Besides, in external positions, lower concentration of C16:0 and a tendency to higher concentration of C18:0 and C20:1n-9 were observed.

As shown in Table 2, a marked difference in FA composition in Sn-2 position exist between lard and palm oil, but composition of Sn-2 position in stored lipids seems to be highly metabolically regulated and lack of response was observed. Little information on this topic is available. In an experiment with weaned piglets, Innis *et al.* (1997) provided diets differing in total FA content and distribution within the TG and observed a marked effect of dietary treatment on chylomicron FA composition (including those located in the Sn-2 position). However, the authors also studied FA composition in liver lipids and reported limited effect of dietary treatment, thus suggesting metabolic regulation of fatty acid composition in Sn-2 position.

It has been shown that dietary FA composition and positional distribution is an important determinant in FA digestion and absorption (Mu and Hoy, 2004). Gastric and pancreatic lipases hydrolyze FA from the 1,3 position of the TG and Hunter (2001), Mu and Porsgaard (2005) and Innis (2011) observed that around 70 % of FAs located in sn-2 is conserved unaltered in chylomicrons, which suggest that it might be also conserved in the subcutaneous fat. In our experiment, lard contains about 25% C16:0 and most of it is esterified in the internal Sn-2 position (approximately 70% of Sn-2

FA). In contrast, the C16:0 in palm oil is predominantly esterified at the 1,3 position, while C18:1n-9 and C18:2n-6 are located preferentially in the internal Sn-2 position (Table 2). As a result, formation of free FA and 2-monoglycerides during the digestion of fat is markedly different depending on the dietary fat source (Innis and Nelson, 2013). In our case, the use of palm oil should involve higher restructuring of TG in SF after digestion and absorption in order to keep constant the previously Sn-2 positional distribution described. Consequently, the lower availability of C16:0 and the higher of C18:0 to conform Sn-1,3 must have implications in the final TG structure.

In bovine tissue, dietary intervention has been proven to alter FA in the external Sn-1,3 position of the TG rather than the Sn-2 location. Smith *et al.* (1998) observed that depressing the desaturase enzyme activity increased the concentration of C18:0 located in the external Sn-1,3 position in bovine adipose tissue, but limited response was observed on Sn-2 position. There is limited possibility of altering the FA composition at the Sn-2 location of the TG by dietary intervention during the fattening phase. This is a matter of interest, because it is believed that saturated FA in the Sn-2 position have more detrimental health effect than those located in the external Sn-1,3 location (Berry, 2009), thus negatively affecting pork consumer acceptability. More research efforts are needed to elucidate the possible effect of productive circumstances, including genetic or more prolonged feeding regimens on Sn-2 fatty acid composition in pig fat.

Table 6. Effect of gender (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on the subcutaneous fat in total (whole triglyceride), position 2 (Sn-2) and position 1,3 (Sn-1,3) fatty acid composition¹.

	Sex		Fat		Gly		SEM (n=8)	P VALUE ⁴		
	Gilt	Barrow	Palm	Lard	0%	5%		Sex	Fat	Gly
Total ²										
C14:0	1.20	1.31	1.18	1.13	1.18	1.15	0.03	0.001	0.297	0.185
C16:0	21.88	22.54	22.59	22.57	22.31	22.85	0.38	0.001	0.922	0.584
C16:1	2.58	2.54	2.53	2.58	2.65	2.46	0.03	0.001	0.998	0.434
C18:0	10.69	11.72	11.58	10.83	11.01	11.40	0.55	0.459	0.464	0.429
C18:1	43.55	44.31	43.99	43.86	43.79	44.09	0.76	0.818	0.119	0.075
C18:2n-6	14.93	13.42	14.01	14.56	14.77	14.05	0.57	0.077	0.531	0.001
C18:3n-3	0.13	0.15	0.14	0.14	0.25	0.14	0.05	0.341	0.897	0.001
C20:0	0.32	0.33	0.23	0.41	0.41	0.23	0.01	0.148	0.623	0.144
C20:1n-9	0.83	0.91	0.90	1.22	0.81	0.92	0.03	0.840	0.040	0.799
SFA	35.55	36.56	36.27	35.57	35.61	36.23	0.51	0.001	0.453	0.650
MUFA	47.78	48.25	47.91	48.19	47.76	47.96	0.69	0.638	0.079	0.043
PUFA	16.67	15.19	15.82	16.24	16.63	15.81	0.65	0.099	0.619	0.001
Sn-2 ²										
C14:0	3.01	3.23	2.95	2.89	3.00	2.90	0.83	0.217	0.160	0.130
C16:0	61.28	63.51	63.98	63.01	62.59	64.40	2.25	0.143	0.860	0.915
C16:1	2.99	3.02	2.97	3.04	3.15	2.86	0.86	0.960	0.564	0.141
C18:0	6.95	7.32	7.14	7.14	6.97	7.31	1.12	0.779	0.239	0.010
C18:1	16.38	16.14	15.92	16.60	16.98	15.54	4.65	0.932	0.643	0.115
C18:2n6	3.61	3.50	3.35	3.76	3.44	3.66	0.98	0.217	0.902	0.752
C18:3n3	0.11	0.09	0.11	0.10	0.10	0.10	0.03	0.584	0.171	0.548
C20:0	0.13	0.10	0.12	0.11	0.12	0.11	0.03	0.247	0.960	0.917
C20:1n-9	0.57	0.47	0.51	0.53	0.51	0.53	0.17	0.020	0.169	0.148
SFA	75.56	75.75	76.13	75.19	74.73	76.58	21.82	0.395	0.548	0.587
MUFA	20.38	20.09	19.84	20.64	21.12	19.35	5.92	0.277	0.481	0.814
PUFA	4.05	4.15	4.03	4.18	4.14	4.06	1.13	0.666	0.960	0.134
Sn-1,3 ³										
C14:0	0.30	0.35	0.29	0.26	0.27	0.28	0.08	0.263	0.288	0.949
C16:0	2.18	2.06	1.90	2.34	2.16	2.08	0.59	0.854	0.004	0.876
C16:1	2.37	2.30	2.31	2.36	2.40	2.26	0.67	0.231	0.087	0.325
C18:0	12.56	13.93	13.81	12.68	13.03	13.45	0.86	0.001	0.064	0.562
C18:1	57.14	58.39	58.03	57.50	57.19	58.36	4.73	0.099	0.483	0.147
C18:2n-6	20.60	18.39	19.34	19.96	20.43	19.25	2.46	0.020	0.179	0.077
C18:3n-3	0.14	0.17	0.15	0.16	0.32	0.16	0.04	0.053	0.344	0.993
C20:0	0.41	0.44	0.28	0.57	0.56	0.29	0.20	0.387	0.003	0.095
C20:1n-9	0.95	1.12	1.10	1.57	0.96	1.12	0.30	0.003	0.006	0.105
SFA	15.55	16.96	16.35	15.76	16.05	16.06	4.62	0.001	0.233	0.683
MUFA	61.48	62.33	61.95	61.96	61.07	62.26	0.86	0.129	0.498	0.094
PUFA	22.97	20.70	21.71	22.28	22.87	21.68	6.12	0.026	0.120	0.098

¹ SFA (Saturated fatty acids), MUFA (monounsaturated fatty acids), PUFA (polyunsaturated fatty acids).

² (g/100g of total present fatty acids).

³ (g/100g of total present fatty acids calculated as Sn-1,3 = (3 x %Total - %Sn-2) / 2).

⁴ No significant interactions were detected.

Acknowledgements

MEDGAN (S2013 / ABI-2913) funding is acknowledged. Authors are also thankful to Isabel Martín for technical support.

References

- Alonso V, Campo MM, Español S, Roncalés P and Beltrán JA 2009. Effect of crossbreeding and gender on meat quality and fatty acid composition in pork. *Meat Science* 81, 209-217.
- Barea R, Isabel B, Nieto R, López-Bote C, Aguilera JF 2013. Evolution of the fatty acid profile of subcutaneous back-fat adipose tissue in growing Iberian and Landrace X Large White pigs. *Animal* 7, 688-698.
- Berry SE 2009. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fat: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutrition Research Reviews* 22, 3-17.
- Boletín Oficial del Estado 2007. Ley 32/2007 de 7 de Noviembre para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. BOE 268, 45914-45920.
- Busk H, Olsen EV and Brondum J, 1999. Determination of lean meat in pig carcasses with the Autofom classification system. *Meat Science* 52, 307-314.
- Candek-Potokar M and Skrlep M 2012. Factors in pig production that impact the quality of dry-cured ham: a review. *Animal* 6, 327-338.
- Christie WW 1985. Structure of the triacyl-sn-glycerols in the plasma and milk of the rat and rabbit. *Journal of Dairy Research* 52, 219-222.
- Christie WW and Clapperton JL 1982. Structures of the triacylglycerols of human milk and some substitutes. *Journal of the Society of Dairy Technology* 35, 22-24.
- Christie WW and Moore JH 1970. A comparison of the structures of triglycerides from various pig tissues. *Biochimica and Biophysica Acta* 210, 46-56.
- D'Arrigo M, Hoz L, López-Bote CJ, Cambero I, Pin C, Rey A and Ordonez JA 2002. Effect of dietary linseed oil and α -tocopherol on selected properties of pig fat. *Canadian Journal of Animal Science* 82, 339-346.
- De Blas C, Mateos GG and Rebollar PG 2010. Normas FEDNA de Composición y Valor Nutritivo de Alimentos para la Fabricación de Piensos Compuestos (2nd ed.). Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal, Madrid, Spain
- De Blas C, Gasa J and Mateos GG 2013. Necesidades Nutricionales para Ganado Porcino. Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal, Madrid, Spain.
- Doppenberg J and Piet Van der AA 2007. Biofuels: implications for the feed industry. Wageningen Academic Publisher, The Netherlands.
- Duran-Montgé P, Realini CE, Barroeta AC, Lizardo R and Esteve-Garcia E 2008. Tissue fatty acid composition of pigs fed different fat sources. *Animal* 2, 1753-1762.
- Farnworth ER and Kramer JKG 1987. Fat metabolism in growing swine: a review. *Canadian Journal of Animal Science* 67, 301-318.
- Garcés R and Mancha M 1993. One-step lipid extraction and fatty-acid methyl-esters preparation from fresh plant-tissues. *Analytical Biochemistry* 211, 139-143.
- Gouk SW, Cheng SF, Mok JSL, Ong ASH and Chuah CH 2013. Long-chain SFA at the Sn-1, 3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. *British Journal of Nutrition* 110, 1987-1995.
- Hunter JE 2001. Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids* 36, 655-668.
- Innis SM 2011. Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. *Advances in Nutrition* 2, 275-283.
- Innis SM, Dyr RA and Lien EL 1997. Formula containing randomized fats with palmitic acid (C16:0) in the 2-position increases C16:0 in the 2-position of plasma and chylomicron triglycerides in formula-fed piglets to levels approaching those of the piglet fed sow's milk. *Journal of Nutrition* 127, 1362-1370.
- Innis SM and Nelson CM 2013. Dietary triacylglycerols rich in Sn-2 palmitate alter post-

- prandial lipoprotein and unesterified fatty acids in term infants. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 89, 145-151.
- Isabel B, López-Bote CJ, de la Hoz L, Timon M, Garcia C and Ruiz J 2003. Effects of feeding elevated concentrations of monounsaturated fatty acids and vitamin E to swine on characteristics of dry cured hams. *Meat Science* 64, 475-482.
- Kijora C, Bergner H, Kupsch RD and Hageman L 1995. Glycerol as feed component in diets of fattening pigs. *Archives in Animal Nutrition* 47, 345-360.
- Kijora C and Kupsch RD 1996. Evaluation of technical glycerols from "biodiesel" production as a feed component in fattening of pigs. *Fett/Lipid* 98, 240-245.
- Kijora C, Kupsch RD, Bergner H, Wenk C and Prabucki AL 1997. Comparative investigation on the utilization of glycerol, free fatty acids, free fatty acids in combination with glycerol and vegetable oil in fattening of pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 77, 127-138.
- Lammers PJ, Kerr BJ, Weber TE, Bregendahl K, Lonergan SM and Prusa, DU 2008. Growth performance, carcass characteristics, meat quality and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin-supplemented diets. *Journal of Animal Science* 86, 2962-2970.
- Latorre MA, Ripoll G, García-Belenguer E and Ariño L 2009. The increase of slaughter weight in gilts as strategy to optimize the production of Spanish high quality dry-cured ham. *Journal of Animal Science* 87, 1464-1471.
- López-Bote CJ 1998. Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat Science* 49, S17-S27.
- López-Bote CJ, Isabel B and Daza A 2002. Partial replacement of poly- with monounsaturated fatty acids and vitamin E supplementation in pig diets: effect on fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular fat and on fat and lean firmness. *Animal Science* 75, 349-358.
- Mourot J, Aumaitre A, Mounier A, Peiniau P and Francois AC 1994. Nutritional and physiological effects of dietary glycerol in the growing pig. Consequences on fatty tissues and post mortem muscular parameters. *Livestock Production Science* 38, 237-244.
- Mu HL and Hoy CE 2004. The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* 43, 105-133.
- Mu H and Porsgaard T 2005. The metabolism of structured triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* 44, 430-448.
- Nuernberga K, Dannenbergera D, Nuernberga G, Endera K, Voigta J, Scollanb ND, Wood JD, Nutec GR and Richardson RI 2005. Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. *Livestock Production Science* 94, 137-147.
- Óvilo C, Benítez R, Fernández A, Isabel B, Núñez Y, Fernández AI, Rodríguez C, Daza A, Silió L and López-Bote C 2014. Dietary energy source largely affects tissue fatty acid composition but has minor influence on gene transcription in Iberian pigs. *Journal of Animal Science* 92, 939-954.
- Peinado J, Medel P, Fuentetaja A and Mateos GG 2008. Influence of sex and castration of females on growth performance and carcass and meat quality of heavy pigs destined for the dry-cured industry. *Journal of Animal Science* 86, 1410-1417.
- Perona JS and Ruíz-Gutiérrez V 2004. Analysis of Neutral Lipids: Triacylglycerols. In *Handbook of food analysis* (ed Nollet LML), pp 275-312, Marcel Decker, New York.
- Piedrafita J, Christian LL and Lonergan SM 2001. Fatty acid profiles in three stress genotypes of swine and relationships with performance, carcass and meat quality traits. *Meat Science* 57, 71-77.
- Ponnampalam EN, Lewandowski P, Nesaratnam K, Dunshea, FR and Gill H 2011. Differential effects of natural palm oil, chemically-and enzymatically-modified palm oil on weight gain, blood lipid metabolites and fat deposition in a pediatric pig model. *Nutrition Journal* 10, 1-7.
- Schieck SJ, Shurson GC, Kerr BJ and Johnston LJ 2010. Evaluation of glycerol, a biodiesel coproduct,

- in grow-finish pig diets to support growth and pork quality. *Journal of Animal Science* 88, 3927-3935.
- Segura J and López-Bote CJ 2014. A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis. *Food Chemistry* 145, 821-825.
- Segura J, Escudero R, Romero de Ávila MD, Cambero MI and López-Bote CJ 2015. Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat. *Meat Science* 103, 90-95.
- Serrano MP, Valencia DG, Fuentetaja A, Lázaro R and Mateos GG 2009. Influence of feed restriction and sex on growth performance and carcass and meat quality of Iberian pigs reared indoors. *Journal of Animal Science* 87, 1676-1685.
- Serrano MP, Valencia DG, Nieto M, Lázaro R and Mateos GG 2008. Influence of sex and terminal sire line on performance and carcass and meat quality of Iberian pigs reared under intensive production systems. *Meat Science* 78, 420-428.
- Small DM 1991. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annual Review of Nutrition* 11, 412-434.
- Smith SB, Yang A, Larsen TW and Tume RK 1998. Positional analysis of triacylglycerol from bovine adipose tissue lipids varying in degree of saturation. *Lipids* 33, 197-207.
- Warnants N, Van Oeckel MJ and Boucque CV 1999. Incorporation of dietary polyunsaturated fatty acid into pork fatty tissues. *Journal of Animal Science* 77, 2478-2490.
- Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E, Sheard PR and Enser M 2004. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science* 66, 21-32.
- Zijlstra RT, Menjivar K, Lawrence E and Beltranena E 2009. The effect of feeding crude glycerol on growth performance and nutrient digestibility in weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 89, 85-89.

4.6 CAPÍTULO 6: Effect of sex, glycerol or dietary fat on fatty acid composition, their positional distribution within the triglyceride and selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat.

Los resultados del presente capítulo se recogen en el siguiente artículo:

Effect of sex, glycerol or dietary fat on fatty acid composition, their positional distribution within the triglyceride and selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat.

J. Segura, R. Escudero, M.D. Romero de Ávila, Olivares, A., M.I. Cambero, C.J. López-Bote.

Enviado a la revista: Journal of Food Science and Technology.

Effect of sex and dietary treatment on composition and rheological properties of dry-cured ham subcutaneous fat

Segura, J^a., Escudero, R^b., Romero de Ávila, M.D^b., Olivares, A^a., Cambero, M.I^{b*}, López-Bote, C.J^a.

^a Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040, Madrid, Spain; ^b Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

* E-mail: josesegu@ucm.es

The effect of sex, source of dietary fat (lard vs palm oil) and glycerol inclusion in fattening diet on composition, fatty acid distribution within the triglyceride (TAG) and slip point and textural parameters was studied on dry-cured hams subcutaneous fat. A marked effect of sex on saturated fatty acids (SFA) was found with barrows showing higher values than gilts. No effect of dietary fat on subcutaneous SFA or polyunsaturated fatty acids (PUFA) was observed. Dietary glycerol increased monounsaturated fatty acids and decrease total PUFA in subcutaneous fat. Besides, the possibility of altering fatty acid composition at the 2- position of the TAG by dietary intervention during the fattening phase is very limited. Partial restructuring was observed in external positions of the TAG. All these changes had their effect on slip point and textural parameters. It was observed an increase of hardness and a decrease of adhesiveness when palm oil was used as dietary fat.

1. Introduction.

Principal efforts of pork industry have been focused in decrease the total amount of deposited fat in pigs and the modification of its fatty acid (FA) composition to better match in nutritional value for human diet and technological requirements. Quality of dry-cured hams and other meat products depends on lipid composition of the raw material for both their flavor development (Soto et al. 2010) and subsequent industrial processing (Hugo and Roodt 2007).

Fatty acid composition is completely related to meat quality (Wood et al. 2008). It influences tissue firmness (Hallenstvedt et al. 2012; López-Bote et al. 2002) and stickiness (Nishioka and Irie 2005), shelf life, eating quality and flavor (López-Bote et al. 2002; Wood et al. 2008). Generally, a high ratio of saturated (SFA) to polyunsaturated fatty acids (PUFA), fundamentally linoleic acid (C18:2n-6),

improves most aspects of meat quality but that may negatively impact on the nutritional value. On the contrary, high C18:2n-6 and low SFA levels have been associated to low consistency, oiliness and soft texture compromising technological and sensory quality of pork meat and meat products. Therefore, a number of feeding practices are implemented in different consortium rules aimed to the production of quality meat products, which emphasizes the importance of maintenance of C18:2n-6 and SFA within certain limits in pig tissues (Candek-Potokar and Skrlep 2011).

The subcutaneous fat (SF) is largely composed by around 95% of adipocytes (lipids storage) separated by a network of connective tissue fiber, predominantly collagen fibers and small quantities of elastic and reticular ones (Sumena et al. 2010), which contribute to the texture features, mainly cohesiveness and toughness. It is fully accepted that FA

composition of pig adipose tissue is dependent upon the FA profile of the diet (Mitchoathai et al. 2007). Control of C18:2n-6 concentration is currently carried out through the incorporation of saturated fats or ingredients that enhance endogenous fat synthesis in fattening diets (Farnworth and Kramer 1987; Wood et al. 2008). Among saturated fats, lard and palm oil are frequently used because of their low C18:2n-6 concentration together with a high concentration of SFA and monounsaturated fatty acids (MUFA) (De Blas et al. 2013). Glycerol is a co-product of the bio-fuel industry which is now fully available for swine nutrition. It has been proven to enhance FA synthesis, thus reducing the concentration of C18:2n-6 in pig tissues (Mourot et al. 1994), and increasing meat firmness (Schieck et al. 2010).

Lard and palm oil are considered of similar nutritional value, but it is noticeable that location of FA within the triglyceride (TAG) is markedly different. While lard concentrates most C16:0 in the internal (sn-2) position, palm oil locates C16:0 in the external (sn-1 and sn-3) positions of the TAG (Innis and Nelson, 2013; Small, 1991). This may be an aspect of interest, since distribution of FA within the TAG may affect physical properties of adipose tissue (Segura et al. 2015b; Smith et al. 1998) and, recently, implications with illnesses as obesity, diabetes or hypertension have been detected (Gouk et al. 2013).

This research was undertaken to study the effect of diet on profile and positional distribution of FA within the TAG molecule of SF in dry-cured hams. Diets containing glycerol (which enhances de novo FA synthesis) and two fat sources (lard vs palm oil) differing in the FA distribution within the TAG were used in fattening gilts and barrows.

2. Material and Methods.

2.1 Experiment design

The experiment was conducted using 20 barrows and 20 gilts randomly selected at 80 kg body weight. The female line (Syra, Gene+, Erin, France) used included blood from Large White, Landrace, and Duroc and the sire line was PIC L65 (PIC, Barcelona, Spain). Four finishing diets differing in the fat source (palm oil or lard) and the concentration of glycerol (0 vs 50g/kg) were provided for 32 days until slaughter. All diets contained low concentration of C18:2n-6 (10 g/kg). Diets were provided for *ad libitum* consumption and were formulated according to Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal (De Blas et al. 2013). The ingredient

composition and the calculated (De Blas et al. 2013) nutrient content of the diets are shown in Table 1. Dietary fatty acid distribution within the TAG of fat sources used in this experiment is shown in Table 2.

At 110 (\pm 2.98) kg of body weight, the pigs were slaughtered. The right thigh from each pig was obtained at cutting (24 h after slaughter) and processed in a traditional manner for approximately 12 months to produce a dry-cured which were subsequently deboned. The SF at level of *biceps femoris* muscle was carefully removed from each deboned dry-cured ham and samples were stored at 4 °C until use.

2.2 Triglyceride purification.

The total lipids of SF were extracted (Segura and López-Bote, 2014) and the TAG were purified by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates (0.25 mm thickness) that were developed with hexane/ethyl ether/acetic acid (75:25:1 by volume). To detect the position of the TAG, the TLC plates were sprayed with primuline acetone/water (80:20 by volume) 0.05 % solution. TAG fractions were scraped off the plates and eluted from silica with hexane/ethyl ether (95:5 by volume). In each case, the samples of purified TAG were analyzed by both gas chromatography and lipase hydrolysis (Perona and Ruíz-Gutiérrez, 2004).

2.3 Lipase hydrolysis.

For the positional analysis of TAG sn-2 fatty acids, 10 mg of purified TAG was hydrolyzed with 2 mg of pancreatic lipase in 1 ml of 1 M Tris-HCl buffer (pH 8), 0.1 ml CaCl₂ (22%), and 0.25 ml deoxycholate (0.1%) . The reaction was stopped when approximately 60% of the TAGs were hydrolyzed (1–2 min) by adding 0.5 ml of 6 N HCl. The lipids were extracted three times with 1.5 ml aliquots of ethyl ether, and the reaction products were separated by TLC (see above). Free fatty acids (FFA) and sn-2-monoacylglycerol bands representing the positions sn-1,3 and sn-2 of TAG were scraped off the plate and transmethylated (see below). The validity of the procedure was confirmed by comparing the fatty acid composition of the original TAG and those remaining after the partial hydrolysis.

2.4 Lipid analysis.

Fatty acid methyl esters (FAME) were obtained from isolated lipids by heating the samples at 80 °C for 1 h in 3 ml of methanol/toluene/H₂SO₄ (88:10:2 by volume). After cooling, 1 ml of hexane was added and the samples were mixed. The FAME were recovered from the upper phase, separated and quantified using a gas chromatograph (HP 6890 Series GC

Table 1. Ingredients and calculated analysis¹ of diets (g/kg diet as fed basis).

Ingredients	79 to 109 kg BW				
	40 to 79 kg BW	Glycerol, 0%		Glycerol, 5%	
		Palm Oil	Lard	Palm Oil	Lard
Barley	300	300	300	342	342
Wheat	322	303	303	200.5	200.5
Rye	120	150	150	150	150
Glycerol-85	-	-	-	50	50
Rapeseed meal (34%)	60	80	80	80	80
Soyabean meal (47%)	134	107	107	122	122
Soyabean oil	32	-	-	-	-
Lard	-	-	32	-	32
Palm Oil	-	32	-	32	-
Lysine (50%)	6	5.4	5.4	4.8	4.8
DL-Methionine	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6
L-Threonine (99%)	1.1	1	1	0.9	0.9
Choline (60%)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Calcium carbonate	11.8	11.6	11.6	11.6	11.6
Monocalcium phosphate	1	-	-	-	-
Sodium chloride	4	4	4	1.2	1.2
Formic acid, 75% activity	2	-	-	-	-
Premix ¹	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2
Calculated composition ²					
Net energy (kcal/kg)	2410	2410	2410	2430	2430
Crude protein	163	162	162	162	162
Crude ash	38	37	37	40	40
C16:0	12.4	15.9	9.7	15.8	9.6
C18:0	5.4	1.7	4.3	1.7	4.3
C18:1	22.6	15.1	16.4	15.0	16.3
C18:2n-6	26.1	9.5	9.5	9.2	9.2

¹Supplied per kg diet: 7,000 IU vitamin A (trans-retinyl acetate); 1,600 IU vitamin D₃ (cholecalciferol); 20 IU vitamin E (all-rac-tocopherol-acetate); 1.0 mg vitamin K₃ (bisulphate menadione complex); 0.7 mg thiamine (thiamine-mononitrate); 3.0 mg riboflavin; 9 mg of pantothenic acid (D-Ca pantothenate); 15 mg vitamin B₃ (niacin); 150 mg choline (choline chloride); 1 mg pyridoxine (pyridoxine HCl); 0.016 mg vitamin B₁₂ (cobalamin); 16.5 copper (CuSO₄·5H₂O); 75 mg iron (FeSO₄·7H₂O); 40 mg manganese (MnO₂); 110 mg zinc (ZnO); 0.3 mg selenium Se (Na₂SeO₃); 0.8 mg iodine [Ca(IO₃)₂] and 125 mg ethoxyquin. Phytase (500 FTU; Natuphos 5,000, Basf Española, Barcelona, Spain)

²According to Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal (2010) (supplied per kg of diet).

System) equipped with flame ionization detector. Separation was performed with a J&W GC Column, HP-Innowax Polyethylene Glycol (30m x 0.316 mm x 0.25 µm). Nitrogen was used as a carrier gas. After injection at 170 °C, the oven temperature was raised to 210 °C at a rate 3.5 °C/min, then to 250 °C at a rate of 7 °C/min and held constant for 1 minute. The flame ionization was held at 250 °C. The split ratio was 1:40. FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of authentic standards (Sigma – Aldrich, Alcobendas, Spain).

Table 2. *Total (whole triglyceride), position 2 (Sn-2) and position 1,3 (Sn-1,3) fatty acid composition of fat sources used in this experiment.*

	Palm oil	Lard
TOTAL ¹		
C16:0	45.6	24.5
C18:0	4.7	13.2
C18:1n-9	39.9	49.8
C18:2n-6	9.8	12.5
Sn-2 ¹		
C16:0	12.5	70.8
C18:0	2.9	9.3
C18:1n-9	65.6	16.5
C18:2n-6	19.0	3.4
Sn-1,3 ²		
C16:0	62.2	1.4
C18:0	5.7	15.2
C18:1n-9	27.0	66.5
C18:2n-6	5.1	17.1

¹ (g/100g of total present fatty acids).

² (g/100g of total present fatty acids calculated as Sn-1,3 = (3 x %Total – %Sn-2) / 2).

2.5 Slip Point determination.

Triplicate SF samples were independently collected from each dry-cured ham. Samples were melted at 80 °C and drawn 1 cm into capillary tubes while still warm. Capillary tubes containing the samples were

stored at 4 °C overnight and then placed vertically in a chilled water bath. The temperature was increased gradually in the water bath (2 °C/min). The temperature when the lipid began to move up the capillary tube was recorded (ISO 6321-2002).

2.6 Moisture and water activity (a_w).

Moisture was determined by drying the sample at 110 °C to a constant weight and the results were expressed as a percentage (AOAC, 2006). Water activity (a_w) was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C.

2.7 Texture Profile Analysis (TPA).

TPA was performed using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Exponent programs. Textural tests were carried out at about 22 °C. Briefly, three cylinders of 1 cm height and 1.5 cm diameter were prepared from every sample. A double compression cycle test was performed up to 50% compression of the original portion height with an aluminum cylinder probe of 2 cm diameter. A time of 5 seconds was allowed to elapse between the two compression cycles. Force-time deformation curves were obtained with a 30 kg load cell applied at a cross-head speed of 2 mm/s. The following parameters were quantified (Bourne 1978): hardness (N), maximum force required to compress the sample; springiness (m), ability of the sample to recover its original form after deforming force was removed; adhesiveness (N × s), area under the abscissa after the first compression; cohesiveness, extent to which the sample could be deformed prior to rupture; gumminess (N),

force to disintegrate a semisolid meat sample for swallowing (hardness x cohesiveness); and chewiness (J), work required to masticate the sample before swallowing (hardness x cohesiveness x springiness).

2.8 Statistical analysis.

Chemical and TPA analyses were carried out by triplicate. Response data were analyzed as a completely randomized design with dietary fat source, glycerol level and gender as main effects and their interactions, by using the GLM procedure of SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., NC, 2009). A factorial arrangement was used for meat quality data (2 fat sources × 2 glycerol levels × 2 sexes). The experimental unit was the individual pig for meat quality traits (five pigs of each sex chosen at random).

3. Results and Discussion.

3.1 Moisture, a_w , pH and fatty acid profile

As it was expectable, moisture values of the samples were around 4% and a_w and pH around 0.8 and 5.8 respectively (Table 3) which were similar to those obtained by other authors (Romero de Ávila et al. 2014). As it is also shown in Table 3, such three variables remained

unaffected by sex (Sex) or dietary fat (Fat) although an interaction Sex*Fat was observed in moisture and a_w . In gilts an increase of moisture and a decrease of a_w was observed when animals were fed with lard in comparison to palm oil, in barrows the opposite happened. These results are in agreement with Tabilo et al. (1999) who found higher moisture in hams of female pigs although Mitchaothai et al. (2007) did not find differences in pH, moisture or drip loss in pigs fed either with beef tallow or sunflower oil. Glycerol inclusion in the diet led to a significant increase of a_w and a decreasing tendency of pH of SF of dry-cured hams. Mourot et al. (1993) found a reduction in water and cooking losses in Large White pigs fed 5 % glycerol from 30 to 100 kg of live weight. It was attributed to glycerol action on cell osmotic pressure, what would increase the water content. Thus, muscle fibers would be hyperhydrated reducing protein denaturation during heat treatment, which provide value to meat processor. Similar results were described by Doppenberg and Van Der Aar (2007) who also found a reduction in this parameter in meat from pigs fed glycerol. An interaction sex vs glycerol inclusion (Gly) was observed in a_w . Thus, barrows fed with glycerol showed higher values of a_w than gilts.

Table 3. Effect of sex (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol inclusion (Gly) on moisture, a_w , pH and slip point of subcutaneous fat of dry-cured ham.

	PALM				LARD				SEM (n=5)	P VALUE ¹					
	0% GLY		5% GLY		0% GLY		5% GLY			Sex	Fat	Gly	Sex*Fat	Sex*Gly	Fat*Gly
	Gilt	Barrow	Gilt	Barrow	Gilt	Barrow	Gilt	Barrow							
Moisture	5.52	4.22	5.24	4.02	3.99	4.26	3.98	5.00	0.569	0.4040	0.2372	0.8612	0.0137	0.5735	0.4172
a_w	0.81	0.81	0.79	0.84	0.80	0.78	0.82	0.81	0.012	0.5297	0.2350	0.0338	0.0136	0.0356	0.2384
pH	5.97	6.01	5.79	5.81	5.80	5.94	5.88	5.77	0.092	0.7343	0.4155	0.0620	0.8790	0.2702	0.2593
Slip point	29.25	28.68	29.59	29.50	29.20	29.71	28.41	29.51	0.406	0.3687	0.8546	0.8745	0.0361	0.3062	0.0479

¹ No significant triple interactions for main effects were detected ($P > 0.05$).

The SF composition of dry-cured ham will be fundamentally based on TAG, phosphoglycerides, and higher concentration of monoglycerides and FFA due to lipolytic processes occurred during processing than fresh fat (Narváez-Rivas et al. 2009). Effects of dietary treatment and sex on FA composition of total SF are shown in Table 4. A marked effect of sex on total SFA was found, barrows showing higher values than gilts. The most marked effect induced by sex on SFA was observed for C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 and C20:0. No differences were observed for C18:0. Total and individual PUFA as C18:2n-6, C18:3n-3, C20:3n-9 and

C20:4n-3 concentrations were higher in gilts when compared to barrows. No effect of sex was observed for MUFA and C18:1 isomers. Piedrafita et al. (2001) found that gender affected the proportion of FA, as gilts showed a higher proportion of C18:2n-6 than barrows and barrows had lower proportion of unsaturated FA than gilts. Latorre et al. (2009) observed that, in SF, C16:0, C18:0 and total SFA were higher and C18:2n-6 and total PUFA proportions were lower in barrows than in gilts. Nuernberga et al. (2005) observed that SF from gilts had lower SFA and higher PUFA proportions than barrows.

Table 4. Effect of sex (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol inclusion (Gly) on fatty acid profile of the subcutaneous fat of dry-cured ham¹.

	SEX		FAT		GLY		SEM (n=5)	P VALUE ²		
	Gilt	Barrow	Palm oil	Lard	0 %	5 %		Sex	Fat	Gly
C14:0	1.14	1.30	1.19	1.25	1.22	1.22	0.051	0.0001	0.1726	0.8364
C15:0	0.06	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06	0.005	0.0001	0.3976	0.8610
C16:0 ⁴	22.10	23.01	22.48	22.87	22.67	22.44	0.320	0.0001	0.4404	0.2597
C16:1n-9	0.28	0.21	0.22	0.23	0.23	0.26	0.018	0.0001	0.0085	0.0016
C16:1n-7	2.07	2.42	2.18	2.21	2.20	2.30	0.135	0.0003	0.4055	0.2559
C17:0	0.41	0.31	0.38	0.35	0.36	0.36	0.033	0.0001	0.6035	0.8224
C17:1	0.41	0.34	0.37	0.37	0.37	0.38	0.023	0.0001	0.2355	0.6099
C18:0	11.66	11.52	11.74	11.69	11.71	11.46	0.493	0.6671	0.8036	0.4386
C18:1n-9	44.70	44.93	43.80	44.72	44.26	45.38	0.902	0.6940	0.7897	0.0610
C18:1n-7	2.29	2.46	2.37	2.30	2.34	2.41	0.157	0.1059	0.7198	0.4941
C18:2n-6 ⁴	11.43	10.07	11.71	10.46	11.08	10.43	0.612	0.0014	0.8255	0.1056
C18:3n-3	0.90	0.82	0.94	0.84	0.89	0.83	0.051	0.0174	0.5066	0.1182
C18:4n-3	0.13	0.13	0.12	0.13	0.12	0.13	0.005	0.2358	0.0008	0.0332
C20:0	0.21	0.24	0.22	0.24	0.23	0.22	0.011	0.0001	0.4565	0.2018
C20:1n-9	1.06	1.14	1.08	1.18	1.13	1.07	0.048	0.0156	0.1351	0.0446
C20:3n-9	0.21	0.18	0.19	0.18	0.19	0.20	0.009	0.0001	0.0400	0.0762
C20:4n-3	0.16	0.15	0.17	0.16	0.16	0.15	0.008	0.0166	0.0399	0.0019
SFA	35.68	36.55	36.17	36.56	36.36	35.86	0.649	0.0458	0.9776	0.2394
MUFA	50.82	51.50	50.03	51.01	50.52	51.79	1.055	0.3240	0.8048	0.0684
PUFA ^{3,4}	13.50	11.96	13.80	12.43	13.12	12.34	0.687	0.0012	0.6849	0.0885
UI ⁴	0.80	0.77	0.79	0.77	0.78	0.78	0.875	0.0001	0.6288	0.5553

¹SFA (total saturated fatty acids), MUFA (total monounsaturated fatty acids), PUFA (total polyunsaturated fatty acids), UI (unsaturation index).

² Although otherwise stated, no significant interactions for main effects were detected ($P > 0.05$).

³ Interaction Sex*Fat observed ($P < 0.05$).

⁴ Interaction Fat*Gly detected ($P < 0.01$).

No effect of dietary fat was observed on FAs profile. Attending to glycerol dietary inclusion, on FA profile only tendencies were observed on increase of total MUFA and C18:1n-9 and a decrease in total PUFA and C18:2n-6 concentration, which is in agreement to literature. Mourot et al. (1994) observed that dietary glycerol increased C18:1n-9 and reduced C18:2n-6 in backfat and *semimembranous* muscle tissue of pigs. Kijora et al. (1997) did not observe any significant change in the SFA profile of the backfat, but reported a moderate increase in C18:1n-9, accompanied by a decrease in C18:2n-6 and C18:3n-3 concentrations, thus producing a decline in the PUFA/MUFA ratio in backfat. Interaction Sex*Fat and Fat*Gly in total PUFA and C18:2n-6 concentrations were detected (Table 4). The lower concentration in barrows was more noticeable in animals fed with palm oil and the glycerol inclusion in palm oil diet produced a higher decrease of PUFA concentration than the addition to lard diet. These results seemed expectable considering that the SFA/PUFA palm oil ratio is higher than the lard one.

3.2. Positional analysis of fatty acid within Triacylglyceride

As it is known, FA are not esterified at random by the glycerol hydroxyl groups in animals. In contrast to other species, the sn-2 in the TAG of adipose tissue of pigs and pigs and human milk is occupied by C16:0 mainly (Christie and Moore 1970; Innis and Nelson 2013). Table 5 shows the concentration of main FA, total SFA, MUFA and PUFA and unsaturation index (UI) in the whole TAG, in sn-2 and the average of 1 and 3-positions (sn-1,3). It can be observed that C16:0 is located mainly in the sn-2 position, while C18:0 esterifies the external positions of the TAG. Monounsaturated

FAs (mainly C18:1) were located preferentially at the sn-1,3 position and PUFA (C18:2n-6) are almost at random located with slight preference for sn-1,3 position. Similar results were reported in various pig tissues (Christie and Moore, 1970), human milk and substitutes (Innis and Nelson 2013) and plasma and milk of rat and rabbit (Christie 1985).

It is noticeable that the significant differences in FA profile between sexes showed in Table 4, which are in agreement with the literature, were not reflected in the whole TAG analysis (Table 5). All lipolytic and oxidation reactions happened during dry-curing process together with an increase of variability produced by the method of analysis made the observed changes not significant. Nevertheless, numerically the same behavior was observed when the position where there were more abundant was isolated. Interestingly, the increase of C16:0 and total SFA and the decrease of C18:2n-6 and total PUFA (all of them in sn-2) became again significant. Differently, dietary fat did not show any effect in SF (Table 4) but, as can be seen in Table 5, in the whole TAG, C16:0, C18:2n-6, total PUFA and UI were affected. In origin, changes in dietary fat should affect TAG composition (Mitchothai et al. 2007). After all biochemical reactions happened during dry-curing process, changes in dietary fat must be conserved in residual TAG and therefore detectable when TAG was previously isolated. Higher concentration of C18:2n-6 and total PUFA were found in animals fed with lard and this increase was fundamentally reflected in sn-1,3. C16:0 was higher in animals fed with palm diet without any effect on the positions and it was remarkable the increase of stearic acid (C18:0) only in sn-1,3 position.

Table 5. Effect of gender (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on the fatty acid composition of dry-cured ham subcutaneous fat in the whole triglyceride (TAG), position 2 (Sn-2) and position 1,3 (Sn-1,3).

	SEX		FAT		GLY		SEM (n=5)	P Value ²		
	Gilt	Barrow	Palm oil	Lard	0%	5%		Sex	Fat	Gly
TAG										
C16:0	25.74	25.38	25.88	24.60	25.54	25.24	0.876	0.6534	0.0454	0.5910
C16:1	2.46	2.52	2.35	2.55	2.61	2.45	0.127	0.4798	0.1335	0.0632
C18:0	13.16	13.41	13.99	13.14	13.70	13.57	0.785	0.5434	0.1728	0.7884
C18:1	47.43	47.49	47.46	48.55	48.61	48.01	1.358	0.6548	0.2647	0.4956
C18:2n-6	5.97	5.83	5.76	6.86	5.58	6.31	0.665	0.8924	0.034	0.0958
SFA	41.67	41.67	41.96	39.79	41.27	40.87	1.535	0.9185	0.0645	0.6927
MUFA	51.49	51.70	51.95	52.95	52.88	52.45	1.377	0.8422	0.3173	0.6304
PUFA	6.83	6.62	6.17	7.33	5.93	6.75	0.710	0.8534	0.0377	0.1796
UI	0.68	0.67	0.65	0.68	0.65	0.67	0.020	0.9870	0.0279	0.2935
Sn-2										
C16:0	43.19	45.63	43.67	42.43	43.00	43.05	0.402	0.0395	0.0439	0.7754
C16:1	3.29	3.28	3.37	3.12	3.32	3.24	0.152	0.9642	0.9846	0.4068
C18:0	7.85	7.54	8.14	7.61	7.52	7.88	0.557	0.3919	0.1802	0.3275
C18:1	32.32	29.73	29.88	31.41	31.41	30.64	1.225	0.0913	0.3227	0.4809
C18:2n-6	4.49	4.21	4.54	4.52	4.16	4.53	0.132	0.0842	0.0537	0.1087
SFA	56.52	59.30	58.38	57.14	58.06	57.76	1.499	0.0396	0.7466	0.6442
MUFA	36.50	34.17	34.70	35.55	35.55	35.12	1.780	0.1129	0.9468	0.7662
PUFA	7.34	6.53	6.92	7.32	6.75	7.12	0.413	0.0301	0.0391	0.0925
UI	0.58	0.52	0.53	0.56	0.55	0.55	0.027	0.2027	0.0984	0.8645
Sn-1,3										
C16:0	17.01	15.26	16.50	15.26	16.39	15.88	1.634	0.1035	0.3499	0.6299
C16:1	2.05	2.14	1.80	2.21	2.19	2.00	0.192	0.4305	0.1550	0.1390
C18:0	15.81	16.34	16.50	15.51	16.15	16.00	1.129	0.4739	0.0396	0.8382
C18:1	54.98	56.37	55.04	55.69	55.98	55.37	2.240	0.3424	0.2982	0.6722
C18:2n-6	6.71	6.64	6.26	7.84	6.30	7.05	0.358	0.1970	0.0293	0.2080
SFA	34.25	32.86	34.41	31.99	33.91	33.20	1.695	0.4115	0.1211	0.6737
MUFA	58.98	60.47	59.27	60.12	59.76	59.69	1.443	0.3308	0.3745	0.9670
PUFA	6.98	6.57	6.43	7.99	6.44	7.21	0.313	0.0499	0.0318	0.0927
UI	0.73	0.74	0.72	0.76	0.73	0.74	0.031	0.5411	0.056	0.4545

1SFA (total saturated fatty acids), MUFA (total monounsaturated fatty acids), PUFA (total polyunsaturated fatty acids), UI (unsaturation index).

2 No significant interactions for main effects were detected ($P > 0.05$).

Although, as shown in Table 2, a marked difference in FA composition in sn-2 exists between lard and palm oil, FA profile of sn-2 position in stored lipids seems to be high metabolically regulated and positional distribution proportions are constant despite dietary fat. Little information exists on this topic. Innis et al. (1997) provided diets differing in total FA composition and distribution within the TAG, studied the liver lipids of piglets, and reported limited effect of dietary treatment, thus suggesting metabolic regulation of fatty acid composition in sn-2 position. Segura et al. 2015 (unpublished results) also found a limited effect

of either sex or dietary treatment on the FAs located in the internal sn-2 position. Gastric and pancreatic lipases hydrolyze FA from the external positions of the TAG. Lard contains about 25% C16:0 and most of it is esterified in the internal sn-2 position (approximately 70% of sn-2 FAs). In contrast, the C16:0 in palm oil is predominantly esterified at the 1,3 position, while C18:1 and C18:2n-6 fatty acids are located preferentially in the internal sn-2 position (Table 2). As a result, formation of FFA and 2-monoglycerides during the digestion of fat is markedly different depending on the dietary fat source (Innis and Nelson 2013) so that the

rebuild of the TAG could not be convergent. In bovine tissue, dietary intervention has also been proven to alter FA in the external sn-1,3 position of the TAG rather than the sn-2 location. Smith et al. (1998) observed that depressing desaturase enzyme activity increased the concentration of C18:0 located in the external sn-1,3 position in bovine adipose tissue, but limited response was observed on sn-2.

Inclusion of glycerol in the diet did not produce any effect on positional distribution of FA within TAG (Table 5). This finding supports the theory that there is a limited possibility of altering FA composition at the sn-2 location of the TAG by dietary intervention during the fattening phase (Segura et al. 2015). This is a matter of interest, because it is believed that SFA in the sn-2 position have more detrimental health effect than those located in the external sn-1,3 location (Berry 2009), thus negatively affecting pork consumer acceptability. Nevertheless, further studies are needed.

3.3. Slip point and textural parameters

Slip point was not directly affected by dietary treatment, sex or glycerol inclusion (Table 3). Daza et al. (2009) found no effect on slip point of outer, inner and subinner subcutaneous backfat in Iberian pigs fed with acorns of a formulated diet rich in C18:1n-9. An interaction Sex*Fat in slip point was found (Table 3). Thus, gilts fed with palm oil had larger values than barrows in this variable. The opposite change occurred in animals fed with lard. It has to be noted that the same interaction occurs for C18:2n-6 and total PUFA (Table 4). There is a marked decrease of concentration of PUFA in barrows fed with palm oil which is not such in lard. In general, higher proportions of C18:0 and lower of C18:2n-6 led to a harder fat and higher melting point (Lea et al. 1970; Wood et al. 2008). López-Bote et al. (2002) also found an increase on slip point when PUFA were substituted by MUFA. In slip point values, also an interaction Fat*Glycerol was detected. In animals fed diets containing palm oil, an increase in slip point value was found when glycerol was included (29.0 to 29.5 °C) but the opposite occurred when lard was used. It is remarkable that again, same interaction was detected for C16:0, C18:2n-6, total PUFA and UI (Table 4). In case of palm oil diet, an increase of C16:0 and decrease of C18:2n-6 and total PUFA concentration was found in SF when glycerol was present in the diet and in lard total PUFA remained almost unaltered but C16:0 concentration decreased

which could justify the slip point values obtained.

Although Hallenstvedt et al. (2012) found that female pigs showed significantly higher firmness scores than male pigs, no differences due to sex in TPA considered properties were found. Changes in dietary fat affected hardness and adhesiveness. Pigs fed with palm oil exhibited larger values for hardness and lower for adhesiveness than pigs fed with lard. Despite no effect was found in FA of SF due to different fat source. Segura et al. (2015b) confirmed that hardness and adhesiveness behavior was influenced by FA positional distribution within the TAG and in Table 5 was shown a plausible redistribution of FA depending on dietary fat. In fact, animals fed diets containing palm oil showed higher concentration of 18:0 and lower of C18:2n-6 in sn-1,3 position which could cause an increase of hardness value (Segura et al. 2015b; Smith et al. 1998) and an increase of total PUFA concentration and a tendency to higher UI value in sn-2 which could be a cause for decreasing adhesiveness (Segura et al. 2015b). Glycerol inclusion in the diet caused a significant decrease in all considered rheological properties values (Table 6). Possible factors that could help the explanation for this behavior were, in first place, the increase of a_w detected when glycerol was included in the diet. Serra et al. (2005) for muscle *biceps femoris* and Segura et al. (2015b) for SF of dry-cured ham found a negative correlation of hardness and chewiness with a_w . Besides, a tendency to a lower final pH was another effect of dietary glycerol inclusion. A lower final pH could be an indicative of higher proteolysis happened during processing (Candek-Potokar and Skrlep 2011). Moreover, a higher a_w implies less inhibition of enzymatic activity (Morales et al. 2007). In any case, collagen fibers and other protein matrixes would suffer longer proteolysis, which would affect the rheological properties. In springiness, interactions Sex*Fat and Sex*Glyc were detected and also in gumminess as interaction Sex*Fat was observed. Although there is no available information, they are possibly related to different behavior of a_w and total PUFA (same interactions found) for gilts and barrows. Gilts fed with palm oil showed higher values of a_w and lower of total PUFA than barrows; in lard, such differences were not detected. Springiness and gumminess were higher in palm-fed gilts than in barrows. Gumminess was also higher in gilts fed diets containing glycerol than in barrows while there were not such differences when glycerol was not included in the diet.

Table 6. Effect of gender (Sex), dietary fat source (Fat) and glycerol (Gly) inclusion on the texture parameters of dry-cured ham subcutaneous fat.

	SEX		FAT		GLY		SEM (n=5)	P VALUE		
	Gilt	Barrow	Palm Oil	Lard	0%	5%		Sex	Fat	Gly
Hardness(N)	16.13	15.46	17.75	13.84	23.71	7.89	2.265	0.6476	0.0107	0.0001
Adhesiveness (Nxs)	-0.08	-0.09	-0.08	-0.10	-0.13	-0.04	0.018	0.2696	0.0853	0.0001
Springiness (10 ⁻³) (m) ^{1,2}	2.23	2.21	2.14	2.30	2.84	1.60	0.173	0.8493	0.1517	0.0001
Cohesiveness	0.25	0.27	0.26	0.25	0.27	0.24	0.016	0.0615	0.2741	0.0091
Gumminess (N) ¹	3.04	4.12	3.48	3.68	6.32	0.85	0.863	0.0604	0.7182	0.0001
Chewiness 10 ⁻² (J)	0.97	1.06	0.87	0.75	1.73	0.30	0.212	0.5054	0.3134	0.0001

1 Interaction Sex*Fat was detected (P < 0.01).

2 Interaction Sex*Gly was detected (P < 0.05)

4. Conclusions.

The combination of glycerol with different dietary fat sources could be a regulatory system of rheological properties of subcutaneous fat of dry cured ham without a remarkable effect on positional distribution of the fatty acids of the triglyceride molecule. The use of two fat sources with different fatty acid positional distribution but similar nutritional value (lard vs palm oil) caused a restructuring of fatty acids within the triglyceride molecule and an increase of hardness and a decrease of adhesiveness when palm oil was used. Slip point showed changes on its behavior according to changes detected in positional distribution of fatty acids within triglyceride molecule.

Acknowledgements

This work was partially supported by MEDGAN (S2013 / ABI-2913) Autonomous Community of Madrid and Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM and Projects AGL2010-19158 and AGL2013-48121, funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

References.

Barea R, Isabel B, Nieto R, López-Bote C, Aguilera JF (2013) Evolution of the fatty acid profile of subcutaneous back-fat adipose tissue in growing Iberian and Landrace X Large White pigs. *Animal* 7(4):688-698

Berry SE (2009) Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fat: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutr Res Rev* 22:3-17

Bourne MC (1978) Texture profile analysis. *Food Technol* 32:62-66

Candek-Potokar M, Skrllep M (2012) Factors in pig production that impact the quality of dry-cured ham: a review. *Animal* 6:327-338

Christie WW (1985) Structure of the triacyl-sn-glycerols in the plasma and milk of the rat and rabbit. *J Dairy Res* 52:219-222

Christie WW, Moore JH (1970) A comparison of the structures of triglycerides from various pig tissues. *Biochim Biophys Acta* 210:46-56

Daza A, Menoyo D, López-Bote CJ (2009) Carcass traits and fatty acid composition of subcutaneous, intramuscular and liver fat from Iberian pigs fed in confinement only with acorns or a formulated diet. *Food Sci Technol Int* 15(6):563-569

De Blas C, Gasa J, Mateos GG (2013) Necesidades Nutricionales para Ganado Porcino. Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal (FEDNA), Madrid, Spain

Doppenberg J, Van Der Aar P (2007) The nutritional value of biodiesel by-products (Part 2: Glycerine). *Feed Business Asia* Mar-Apr: 42-43

Farnworth ER, Kramer JKG (1987) Fat metabolism in growing swine: a review. *Can J Anim Sci* 67:301-318

Gouk, SW, Cheng SF, Mok, JSL, Ong ASH, Chuah CH (2013) Long-chain SFA at the Sn-1,3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. *Brit J Nutr* 110:1987-1995

Hallenstvedt E, Kjos NP, Øverland M, Thomassen M (2012) Changes in texture, colour and fatty acid composition of male and female pig shoulder fat due to different dietary fat sources. *Meat Sci* 90:519-527

Hugo A, Roodt E (2007) Significance of porcine fat quality in meat technology: a review. *Food Rev Int* 23:175-198

Innis SM, Dyer RA, Lien EL (1997) Formula containing randomized fats with

palmitic acid (C16:0) in the 2-position increases 16:0 in the 2-position of plasmas and chylomicron triglycerides in formula-fed piglets to levels approaching those of piglets fed sow's milk. *J Nutr* 127:1362-1370

Innis SM and Nelson CM (2013) Dietary triacylglycerols rich in sn-2 palmitate alter postprandial lipoprotein and unesterified fatty acids in term infants. *Prostag Leukotr Ess* 89:145-151

Kijora C, Kupsch RD, Bergner H, Wenk C, Prabucki AL (1997) Comparative investigation on the utilization of glycerol, free fatty acids, free fatty acids in combination with glycerol and vegetable oil in fattening of pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr* 77:127-138

Lea CH, Swoboda PAT, Gatherum DP (1970) A chemical study of soft fat in cross-bred pigs. *J Agric Sci* 74:279-284

López-Bote CJ, Isabel B, Daza A (2002) Partial replacement of poly- with monounsaturated fatty acids and vitamin E supplementation in pig diets: Effect on fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular fat and on fat and lean firmness. *Anim Sci* 75:349-358

Mitchaotai J, Yuangklang C, Wittayakun S, Vsupen K, Wongsutthavas S, Srenanul P, Hovenier R, Everts H, Everts H, Beynen AC (2007) Effect of dietary fat type on meat quality and fatty acid composition of various tissues in growing-finishing swine. *Meat Sci* 76:95-101.

Morales R, Serra X, Guerrero L, Gou P (2007) Softness in dry-cured porcine biceps femoris muscles in relation to meat quality characteristics and processing conditions. *Meat Sci* 77:662-669

Mourot J, Aumaitre A, Mounier A, Peiniau P, Francois AC (1994) Nutritional and physiological effects of dietary glycerol in the growing pig. Consequences on fatty tissues and post mortem muscular parameters. *Livest Prod Sci* 38:237-244

Narváez-Rivas M, Vicario IM, Constante EG, León-Camacho, M (2007) Changes in the concentrations of free fatty acid, monoacylglycerol, and diacylglycerol in the subcutaneous fat of Iberian ham during the dry-curing process. *J Agric Food Chem* 55:10953-10961

Nishioka T, Irie M (2006) Evaluation method for firmness and stickiness of porcine perirenal fat. *Meat Sci* 70:399-404

Nuernberga K, Dannenbergera D, Nuernberga G, Endera K, Voigta J, Scollanb ND, Wood JD, Nutec GR, Richardson RI (2005)

Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. *Livest Prod Sci* 94:137-147

Perona JS, Ruíz-Gutiérrez V (2004) Analysis of Neutral Lipids: Triacylglycerols. In Nollet LML ed *Handbook of food analysis*, Marcel Decker, New York, pp 275-312

Piedrafita J, Christian LL, Lonergan SM (2001) Fatty acid profiles in three stress genotypes of swine and relationships with performance, carcass and meat quality traits. *Meat Sci* 57:71-77

Romero de Ávida MD, Escudero R, Ordóñez JA, Cambero MI (2014) Wiebull analysis characterizes the breaking properties of dry-cured ham slices. *Meat Sci* 97:451-458

Segura J, Cambero I, Cámara L, Loriente C, Mateos GG, López-Bote CJ (2015) Effect of sex, dietary glycerol or dietary fat during late fattening on fatty acid composition and positional distribution of fatty acids within the triglyceride in pigs. *Animal* (submitted).

Segura J, Escudero R, Romero de Ávida MD, Cambero MI, López-Bote CJ (2015b) Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat. *Meat Sci* 103:90-95.

Schieck SJ, Shurson GC, Kerr BJ, Johnston LJ (2010) Evaluation of glycerol, a biodiesel coproduct, in grow-finish pig diets to support growth and pork quality. *J Anim Sci* 88:3927-3935.

Small DM (1991). The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Ann Rev Nutr* 11:412-434.

Smith SB, Yang A, Larsen TW, Tume RK (1998) Positional analysis of triacylglycerol from bovine adipose tissue lipids varying in degree of saturation. *Lipids* 33:197-207.

Soto E, de la Hoz L, Ordóñez JA, Hierro E, Herranz B, López-Bote CJ, Cambero MI (2010) The lipid composition and texture profile of dry-cured loin as affected by feeding level in the period prior to the late fattening phase and by rearing system of Iberian pigs. *Ital J Food Sci* 22:377-385.

Sumena KB, Lucy KM, Chungath JJ, Ashok N, Harshan KR (2010) Regional histology of the subcutaneous tissue and the sweat glands of Large White Yorkshire pigs. *Tamil Nadu J Vet Anim Sci* 6:128-135.

4.7 CAPÍTULO 7: Extensive feeding with acorn and grass alters fatty acid composition at the sn-2 position of the triglyceride in pigs.

Los resultados del presente capítulo se recogen en el siguiente artículo:

Extensive feeding with acorn and grass alters fatty acid composition at the sn-2 position of the triglyceride in pigs.

J. Segura, R. Escudero, M.D. Romero de Ávila, A. Olivares, M.I. Cambero, C.J. López-Bote.

Enviado a la revista: Journal of Food Science and Agriculture.

Extensive feeding with acorn and grass alters fatty acid composition at the sn-2 position of the triglyceride in pigs

Jose Segura^{a,*}, Rosa Escudero^b, M Dolores Romero de Ávila^b, Álvaro Olivares^a, M Isabel Cambero^b, Clemente J López-Bote^a.

^aDepartamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040, Madrid, Spain. ^b Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

*E-mail: josesegu@ucm.es

BACKGROUND: Although considerable information exists on dietary interventions of swine diets to alter adipose tissue fatty acid profile, studies aimed to control fatty acid positional distribution by dietary intervention in pigs are scarce and evidence that fatty acid in the internal sn-2 position is highly regulated.

RESULTS: A study about the range of variation of fatty acid concentration in the triglyceride positions in subcutaneous fat from Iberian pigs fattened extensively on acorn and grass and their effect on textural properties of subcutaneous fat was carried out. Moderate dietary enrichment with C18:1n-9 in mixed diets does not alter regulation of sn-2 position of triglyceride (approximately 69 % C16:0 and 15 % C18:1n-9). However, the extremely high intake of C18:1n-9, C18:2n-6 and C18:3n-3 in extensively reared pigs fed on acorn and grass surpasses this regulation, thus modifying fatty acids in such position (approximately 55 % C16:0 and 27 % C18:1n-9).

CONCLUSION: Iberian pig raised extensively has a more favorable nutritional lipid profile and distinctive fat rheological properties than pigs fed conventional diets.

Keywords: Iberian pig, subcutaneous fat, fatty acid, positional distribution, textural parameters.

1. - Introduction.

Considerable information exists on dietary interventions of swine diets in order to alter adipose tissue fatty acid (FA) profile ^{1,2} and its effect on technological properties of meat and derived products, ³⁻⁶ shelf life, eating quality and flavor. ^{7,8}

Contrary to other animal fats, pig locates preferentially saturated fatty acids (SFA) in the internal sn-2 position of the triglyceride molecule (TAG), reaching a concentration over 75 g SFA/100 g total FA (Segura J, unpublished). This is considered a drawback for pig meat quality, since high concentration of SFA concentration in this position in human diet is related to obesity, diabetes and cardiovascular disease. ^{9,10} Moreover, technological properties of pig fat are also affected by FA distribution within the sn-2 position. ^{11,12}

Studies aimed to control FA distribution by dietary intervention in pigs are scarce and evidence that FA in the internal sn-2 position is highly regulated and slightly reflective to dietary

manipulation ^{11, 13} thus maintaining a narrow range of variation.

The extensive traditional feeding of Iberian pigs involves the intake of natural resources, mainly acorns and pasture. ¹⁴ Acorns provide high-levels of monounsaturated fatty acids (MUFA) (mainly oleic acid) thus leading to an extremely high concentration of MUFA in pig tissues (frequently surpassing 55 g oleic acid/ 100 g total FA) whereas the grass is a recognized source of n-3 FAs (mainly linolenic acid) and α -tocopherol. ¹⁴ Extraordinary sensory features characterize Iberian dry-cured hams and they are mainly attributable both to the genetic background of the animals and the traditional outdoor feeding system. ¹⁵

Such feeding regime is not always feasible. The availability of the natural resources is limited by environmental factors. Therefore alternative feeding systems are also used which generally involve using mixed diets high in MUFA content ³ in order to imitate the favorable effects of the traditional extensive feeding system on meat quality characteristics.⁷

To date, no information exists about positional distribution of FAs of subcutaneous fat of Iberian pigs raised extensively on acorn and grass and its relationship with SF physical properties. Taking into consideration the outstanding concentration of MUFA in subcutaneous fat from these pigs, this experiment was carried out to study range of variation in FA within TAG positions in subcutaneous fat from Iberian pigs fattened extensively on acorn and grass and their effect on textural properties. Three additional groups of pigs differing in the dietary fat source were used to compare.

2. – Material and Methods.

2.1 *Experimental design.*

Four groups of 8 barrows Iberian × Duroc were used: a) Pigs reared indoors and fed a diet containing lard (40 g / kg diet) from 90 kg live weight to slaughter (150 kg) (LARD), b) Pigs reared indoors and fed a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 3 weeks previous to slaughter (120 to 150 kg) (S-SUN), c) Pigs reared indoors and fed a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 6 weeks previous to slaughter (from 90 to 150 kg) (L-SUN) and d) Pigs produced extensively in free-range conditions according to the traditional way with acorn and grass from 90 kg to slaughter (150 kg) (EXT).¹⁴ Fatty acid composition of fat sources used in the experiment (triglyceride, position 2 (sn-2) and positions 1 and 3 (sn1, 3)) are shown in table 1. Animals were slaughtered by electrical stunning and exsanguinated at a local slaughterhouse. Sampling was carried out within the hour following slaughter.

2.2 *Triacylglyceride purification.*

The total lipids of SF were extracted¹⁶ and the TAG were purified by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates (0.25 mm thickness) that were developed with hexane/ethyl ether/acetic acid (75:25:1 by volume). To detect the position of the TAG, the TLC plates were sprayed with primuline acetone/water (8:2 by volume) 0.05 % solution. TAG fractions were scraped off the plates and eluted from silica with hexane/ethyl ether (95:5 by volume). In each case, the samples of purified TAG were analyzed by both gas chromatography (GC) and lipase hydrolysis.¹⁷

2.3 *Lipase hydrolysis.*

For the positional analysis of TAG sn-2 FAs, 10 mg of purified TAG was hydrolyzed with 2 mg of pancreatic lipase in 1 ml of 1 M Tris-HCl buffer (pH 8), 0.1 ml CaCl₂ (22%), and 0.25 ml deoxycholate (0.1%). The reaction was stopped when approximately 60% of the TAGs were hydrolyzed (1–2 min) by adding 0.5 ml of 6 N HCl. The lipids

were extracted three times with 1.5-ml aliquots of ethyl ether, and the reaction products were separated by TLC (see above). Free fatty acids (FFA) and sn-2-monoacylglycerol bands representing the positions sn-1,3 and sn-2 of TAG were scraped off the plate and transmethylated (see below). The validity of the procedure was confirmed by comparing the FA composition of the original TAG and those remaining after the partial hydrolysis.

2.4 *Lipid analysis.*

Fatty acid methyl esters (FAME) were obtained from isolated lipids by heating the samples at 80 °C for 1 h in 3 ml of methanol/toluene/H₂SO₄ (88:10:2 by volume).¹⁸ After cooling, 1 ml of hexane was added and the samples were mixed. The FAME were recovered from the upper phase, separated and quantified using a gas chromatograph (HP 6890 Series GC System, Agilent, Avondale, PA) equipped with flame ionization detector. Separation was performed with a J&W GC Column, Innowax Polyethylene Glycol (30m × 0.316 mm × 0.25 μm, Hewlett Packard). Nitrogen was used as a carrier gas. After injection at 170 °C, the oven temperature was raised to 210 °C at a rate 3.5 °C/min, then to 250 °C at a rate of 7 °C/min and held constant for 1 minute. The flame ionization was held at 250 °C. The split ratio was 1:40. FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of authentic standards (Sigma – Aldrich, Alcobendas, Spain).

2.5 *Melting Point determination.*

Melting point was determined as slip point. The lipids were drawn 1 cm into capillary tubes while still warm. Triplicate capillary tubes were collected for each sample. The samples in the capillary tubes were stored at 4 °C overnight and then placed vertically in a chilled water bath. The temperature was increased gradually in the water bath (2 °C/min), and the temperature at which the lipid began to move up the capillary tube was recorded.¹⁹

2.6 *Texture Profile Analysis (TPA).*

TPA was performed using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Expert programs. Textural tests were carried out at about 22 °C. Briefly, four cylinders of 1 cm height and 1.5 cm diameter were prepared from every sample. A double compression cycle test was performed up to 50% compression of the original portion height with an aluminum cylinder probe of 2 cm diameter. A time of 5 seconds was allowed to elapse between the two compression cycles. Force-time deformation curves were obtained with a 30 kg load cell applied at a crosshead speed of 2 mm/s. The following parameters were quantified:²⁰ hardness (N), maximum force required to compress the

sample; springiness (m), ability of the sample to recover its original form after deforming force was removed; adhesiveness ($N \times s$), area under the abscissa after the first compression; cohesiveness, extent to which the sample could be deformed prior to rupture; gumminess (N), force to disintegrate a semisolid meat sample for swallowing (hardness \times cohesiveness); and chewiness (J), work required to masticate the sample before swallowing (hardness \times cohesiveness \times springiness).

2.5 Statistical analysis.

Chemical and TPA analyses were carried out by triplicate. Response data were analyzed as a completely randomized design with dietary treatment as main effect by using the GLM procedure of SAS 9.2²¹ and Bonferroni's test was used to separate treatment means. Positional distribution of FAs was analyzed by repeated measurements considering position and treatment as dependent variables.

Table 1. Triglyceride, position 2 (sn-2) and position 1 and/or 3 (sn-1,3) fatty acid composition of fat sources (lard, high oleic sunflower oil and acorns) used in this experiment.

	Lard	High oleic sunflower oil	Acorn
<i>TAG</i>			
C16:0	24.5	18.7	15.4
C18:0	14.2	12.5	2.7
C18:1 n-9	48.8	61.7	61.9
C18:2 n-6	12.5	7.0	18.0
<i>sn-2</i>			
C16:0	70.8	21.7	1.8
C18:0	9.3	14.4	0.3
C18:1 n-9	16.5	58.9	66.1
C18:2 n-6	3.4	5.1	30.7
<i>sn-1,3</i>			
C16:0	1.6	17.3	22.2
C18:0	15.2	11.6	3.9
C18:1 n-9	65.5	63.1	59.9
C18:2 n-6	17.7	8.0	11.7

1. — Results and Discussion.

The FA profiles of the TAG molecules of subcutaneous fat of each treatment are shown in Table 2. The lowest concentration of myristic (C14:0), palmitic (C16:0), stearic (C18:0), arachidic acid (C20:0) and SFA was found for EXT group. No significant differences in these FAs were found between LARD and SUN treatments. Regarding to MUFA concentration, no differences between LARD and SUN diets were found for palmitoleic (C16:1n-7) and eicosenoic acid (C20:1n-9) concentrations (2.5 % and 1.24 % respectively). Oleic acid (C18:1n-9) showed the highest

concentration (58 %) in EXT diet while S-SUN and L-SUN concentrations were intermediate and statistically different (49 % and 52 % respectively). The lowest value for C18:1n-9 was shown in LARD group (48 %). For total MUFA concentration and unsaturation index (UI), no differences were found between LARD and S-SUN diets. The L-SUN group showed intermediate values and the EXT group the highest. In TAG molecule, linoleic acid (C18:2n-6) and linolenic acid (C18:3n-3) concentrations and total polyunsaturated fatty acid (PUFA) showed the highest values in the EXT group, probably due to the high concentration of grass on the diet.¹⁴

Ruiz *et al.*,²² Timón *et al.*,²³ Carrapiso *et al.*²⁴ and Ventanas *et al.*,²⁵ reported similar results to our EXT group by studying the FA profiles of adipose tissues from free-range-reared Iberian pigs. Muriel *et al.*,²⁶ Isabel *et al.*,⁷ and Ventanas *et al.*,²⁵ found similar results to our SUN groups by working on tissues from Iberian pigs fed diets containing elevated levels of MUFA. In agreement with such literature, in SUN diets an increase of C18:1n-9 was accompanied with a concomitant decrease of PUFAs and SFAs when compared to EXT pigs.

Dietary FA composition and positional distribution is an important determinant in FA digestion and absorption.²⁷ As it is shown in Table 1, a marked difference in FA positional distribution exists between lard and high oleic sunflower oil or acorns. It can be seen that lard is characterized by around 49% of C18:1n-9 preferably located in sn-1,3, 25 % of C16:0 almost fully occupying sn-2 position and approximately similar concentrations (12-14 %) of C18:0 and C18:2n-6 located almost in 2:1 ratio external vs internal position. High oleic sunflower and acorns have similar concentration of C18:1n-9 (62%) which is located with a slight excess in sn-1,3 in sunflower and in sn-2 in acorns, similar concentration of C16:0 that is almost fully located in sn-1,3 in acorns and randomly distributed in sunflower oil. C18:0 and C18:2n-6 are also located in a randomized way in sunflower oil. Acorns have the lowest concentration of C18:0 and it is quantitatively located in sn-1,3 position, and the highest of C18:2n-6, mostly occupying sn-2 location.

Positional distribution within the TAG molecule of subcutaneous pig fat is given in Table 3. Apart from C20:3n-6, the rest of FAs showed a significant different allocation between positions ($P < 0.0001$). In contrast to other species, the sn-2 in the TAG of pig adipose tissue is occupied by mainly C16:0.^{28,29} Stearic acid is mainly esterified at the sn-1,3 of the TAGs, as well as C18:1n-9 and C18:2n-6. Similar distribution has been reported earlier in a variety of pig tissues,²⁸ human milk substitutes,^{30,31} plasma, and milk of rat and rabbit,³² thus indicating that fatty acids are not randomly esterified to the glycerol hydroxyl groups in animal fats.

Table 2. Effect of treatments on fatty acid profile of triglycerides of subcutaneous fat¹.

	LARD	S-SUN	L-SUN	EXT	SEM	P
C14:0	1.45 ^a	1.43 ^a	1.42 ^a	1.06 ^b	0.028	0.0001
C15:0	0.05 ^a	0.06 ^a	0.04 ^b	0.06 ^a	0.003	0.0147
C16:0	24.5 ^a	24.3 ^a	24.2 ^a	18.2 ^b	0.292	0.0001
C16:1n-7	2.58 ^a	2.37 ^a	2.59 ^a	2.05 ^b	0.060	0.0001
C17:0	0.27 ^b	0.32 ^a	0.25 ^b	0.28 ^b	0.013	0.0174
C17:1	0.31 ^a	0.33 ^a	0.27 ^b	0.27 ^b	0.013	0.0107
C18:0	12.4 ^a	12.1 ^a	11.8 ^a	7.86 ^b	0.274	0.0001
C18:1n-9	48.0 ^c	48.9 ^c	51.9 ^b	57.9 ^a	0.482	0.0001
C18:2n-6	7.71 ^b	7.47 ^b	7.40 ^b	9.44 ^a	0.133	0.0001
C18:3n-3	0.60 ^b	0.52 ^b	0.56 ^b	0.71 ^a	0.034	0.0090
C20:0	0.20 ^a	0.20 ^a	0.20 ^a	0.17 ^b	0.010	0.1062
C20:1n-9	1.22 ^b	1.27 ^b	1.25 ^b	1.38 ^a	2.381	0.0050
C20:3n-6	0.51	0.62	0.57	0.49	0.048	0.1684
C20:4n-6	0.14	0.14	0.14	0.15	0.006	0.3814
SFA	38.9 ^a	38.4 ^a	37.9 ^a	27.6 ^b	0.550	0.0001
MUFA	52.1 ^c	52.9 ^c	56.0 ^b	61.6 ^a	0.524	0.0001
PUFA	8.97 ^b	8.75 ^b	8.68 ^b	10.79 ^a	0.145	0.0001
UI	71.5 ^c	71.8 ^c	74.7 ^b	84.7 ^a	0.752	0.0001

SFA (saturated fatty acids), MUFA (monounsaturated fatty acids), PUFA (polyunsaturated fatty acids), UI (unsaturation index). LARD: Iberian × Duroc (IB × DR) pigs reared indoors and fed with lard as fat source. S-SUN: IB × DR pigs reared indoors and fed on a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 3 weeks. L-SUN: IB × DR pigs reared indoors and fed on a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 6 weeks. EXT: IB × DR breed pigs free-range reared and exclusively fed on acorns and grass according to the traditional feeding system.

¹ Different letters within the same raw indicate difference between groups ($P < 0.05$).

² SEM= pooled standard error (n=8).

The treatments caused different effect on the positional distribution of FAs. In Figure 1, it can be observed the interaction treatment × position. LARD and SUN treatments were only different in dietary fat which caused an increase of TAG C18:1n-9 and a decrease of TAG C18:3n-3 mainly reflected in sn-1,3 location (Table 3). Therefore, total MUFA index was reduced in TAG and sn-1,3 when LARD was used, total PUFA was reduced in TAG without interaction with the positions when LARD and SUN diets were compared to EXT and also in this case, the decrease of total SFA was again reflected in TAG and sn-1,3 position. EXT treatment differed from the others in reared treatment and diet (mainly C18:1n-9 provided by acorns and C18:2n-6 and C18:3n-3 from grass). The increase of PUFA and C20:1n-9 and the decrease of C14:0 was reflected equally in both positions. Nevertheless, the strong decrease of C16:0 and the marked increase of C18:1n-9 in EXT treatment were both mainly located in sn-2 (Table 3 and Figure 1).

Hunter,³³ Mu & Porsgaard³⁴ and Innis³¹ reported that TAG sn-2 position suffers little alteration during digestion, as approximately 70 % of FAs located in such position are conserved in chylomicrons. Little information exists on this topic. Innis *et al.*,³⁵ provided diets differing in total FA composition and distribution within the TAG, studied the liver lipids of piglets and reported limited effect of dietary treatment, thus suggesting metabolic regulation of FA composition in sn-2 position. Besides, during lactation, the presence of C16:0 in sn-2 of the dietary TAG in human infants and piglets seems to be of importance for the adequate development of the organism.^{30,31,36} Gastric and pancreatic lipases hydrolyze FAs from the external positions of the TAG. With the positional distribution of dietary fat sources shown in Table 1, formation of FFAs and 2-monoglycerides during the digestion of fat is markedly different depending on the dietary fat source,²⁹ so that the reassembly of the TAG could not be convergent.

Table 3. Triacylglyceride sn-2 and sn-1,3 fatty acid composition($g \cdot kg^{-1}$) profile and positional distribution (Pos) of subcutaneous fat of considered treatments (Diet).

		LARD	S-SUN	L-SUN	EXT	SEM	SEM*	P value	
								Diet	Pos
C14:0	sn-2	3.54 ^a	3.60 ^a	3.61 ^a	2.85 ^b	0.072	0.223	0.0001	0.0001
	sn-1,3	0.37 ^a	0.38 ^a	0.32 ^a	0.17 ^b	0.025		0.0001	
C16:0	sn-2	69.2 ^a	68.0 ^a	70.7 ^a	55.0 ^b	0.692	2.652	0.0001	0.0001
	sn-1,3	1.96 ^a	2.13 ^a	1.16 ^b	0.57 ^c	0.239		0.0045	
C16:1n-7	sn-2	3.76 ^a	3.65 ^a	3.76 ^a	3.69 ^a	0.170	0.118	0.9521	0.0001
	sn-1,3	2.18 ^a	1.64 ^b	2.04 ^a	1.23 ^c	0.098		0.0001	
C18:0	sn-2	4.31 ^a	4.17 ^a	3.01 ^b	3.56 ^b	0.212	0.582	0.0010	0.0001
	sn-1,3	15.9 ^a	15.9 ^a	15.1 ^a	10.0 ^b	0.406		0.0001	
C18:1n-9	sn-2	13.7 ^b	15.1 ^b	14.0 ^b	27.2 ^a	0.488	1.777	0.0001	0.0001
	sn-1,3	65.5 ^c	65.4 ^c	68.2 ^b	73.2 ^a	0.497		0.0001	
C18:2n-6	sn-2	3.33 ^b	3.05 ^b	2.82 ^b	5.23 ^a	0.276	0.405	0.0001	0.0001
	sn-1,3	10.0 ^b	9.71 ^b	9.28 ^b	11.6 ^a	0.139		0.0001	
C18:3n-3	sn-2	0.33 ^b	0.31 ^b	0.30 ^b	0.53 ^a	0.031	0.015	0.0001	0.0001
	sn-1,3	0.76 ^a	0.61 ^b	0.67 ^b	0.79 ^a	0.050		0.0506	
C20:0	sn-2	0.14 ^a	0.12 ^a	0.13 ^a	0.09 ^b	0.037	0.002	0.1418	0.0001
	sn-1,3	0.23 ^b	0.23 ^b	0.27 ^a	0.21 ^b	0.014		0.0587	
C20:1n-9	sn-2	0.15 ^b	0.17 ^b	0.16 ^b	0.22 ^a	0.007	0.006	0.0001	0.0001
	sn-1,3	1.73 ^b	1.82 ^b	1.78 ^b	1.95 ^a	0.039		0.0032	
C20:3n-6	sn-2	0.46	0.64	0.54	0.47	0.090	0.055	0.3883	0.9407
	sn-1,3	0.64	0.51	0.58	0.51	0.082		0.7955	
C20:4n-6	sn-2	0.11	0.11	0.11	0.14	0.013	0.001	0.2892	0.0015
	sn-1,3	0.17	0.15	0.16	0.16	0.009		0.5074	
SFA	sn-2	77.8 ^a	76.5 ^a	78.0 ^a	62.1 ^b	0.839	3.643	0.0001	0.0001
	sn-1,3	18.7 ^a	19.9 ^a	16.1 ^b	10.8 ^c	0.474		0.0001	
MUFA	sn-2	18.0 ^b	19.4 ^b	18.3 ^b	31.5 ^a	0.647	2.771	0.0001	0.0001
	sn-1,3	69.7 ^c	69.1 ^c	73.3 ^b	76.6 ^a	0.590		0.0001	
PUFA	sn-2	4.23 ^b	4.12 ^b	3.76 ^b	6.36 ^a	0.191	0.463	0.0001	0.0001
	sn-1,3	11.6 ^b	11.0 ^b	10.7 ^b	13.0 ^a	0.279		0.0001	
UI	sn-2	27.4 ^b	28.8 ^b	26.9 ^b	45.5 ^a	1.079	7.859	0.0001	0.0001
	sn-1,3	94.6 ^{bc}	92.5 ^c	96.1 ^b	104.2 ^a	0.857		0.0001	

SFA (saturated fatty acids), MUFA (monounsaturated fatty acids), PUFA (polyunsaturated fatty acids), UI (unsaturation index), sn-2 (in 2-position of triglyceride), sn-1,3 (average of 1 and 3- position of triglyceride). LARD: Iberian \times Duroc (IB \times DR) pigs reared indoors and fed with lard as fat source. S-SUN: IB \times DR pigs reared indoors and fed on a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 3 weeks. L-SUN: IB \times DR pigs reared indoors and fed on a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 6 weeks. EXT: IB \times DR breed pigs free-range reared and exclusively fed on acorns and grass according to the traditional feeding system.

¹ Different letters within the same raw indicate difference between groups ($P < 0.05$).

² SEM= pooled standard error (n=8).

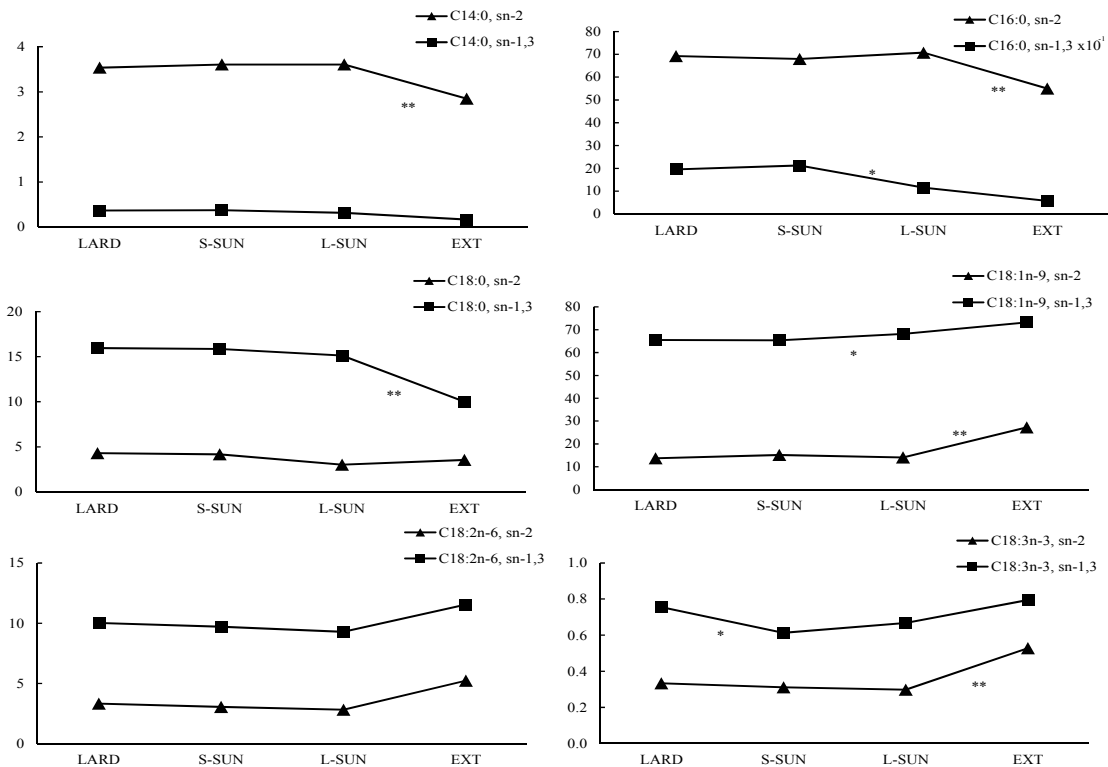
³ SEM*= pooled standard error (n=16) of repeated measurement analysis.

The treatments caused different effect on the positional distribution of FAs. In Figure 1, it can be observed the interaction treatment \times position. LARD and SUN treatments were only different in dietary fat which caused an increase of TAG C18:1n-9 and a decrease of TAG C18:3n-3 mainly reflected in sn-1,3 location (Table 3). Therefore, total MUFA index was reduced in TAG and sn-1,3 when LARD was used, total PUFA was reduced in TAG without interaction with the positions when LARD and SUN diets were compared to EXT and also in this case, the decrease of total SFA was again reflected in TAG and sn-1,3 position. EXT treatment differed from the others in reared treatment and diet (mainly C18:1n-9 provided by acorns and C18:2n-6 and C18:3n-3 from grass). The increase of PUFA and C20:1n-9 and the decrease of C14:0 was reflected equally in both positions. Nevertheless, the strong decrease of C16:0 and the marked increase of C18:1n-9 in EXT treatment were both mainly located in sn-2 (Table 3 and Figure 1).

Hunter,³³ Mu & Porsgaard³⁴ and Innis³¹ reported that TAG sn-2 position suffers little

alteration during digestion, as approximately 70 % of FAs located in such position are conserved in chylomicrons. Little information exists on this topic. Innis *et al.*,³⁵ provided diets differing in total FA composition and distribution within the TAG, studied the liver lipids of piglets and reported limited effect of dietary treatment, thus suggesting metabolic regulation of FA composition in sn-2 position. Besides, during lactation, the presence of C16:0 in sn-2 of the dietary TAG in human infants and piglets seems to be of importance for the adequate development of the organism.^{30,31,36} Gastric and pancreatic lipases hydrolyze FAs from the external positions of the TAG. With the positional distribution of dietary fat sources shown in Table 1, formation of FFAs and 2-monoglycerides during the digestion of fat is markedly different depending on the dietary fat source,²⁹ so that the reassembly of the TAG could not be convergent.

Figure 1. Interaction Treatment \times Position of main fatty acid positional distribution.



* ($P < 0.001$), ** ($P < 0.0001$) of the interaction Position \times Treatment. LARD: Iberian \times Duroc (IB \times DR) pigs reared indoors and fed with lard as fat source. S-SUN: IB \times DR pigs reared indoors and fed on a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 3 weeks. L-SUN: IB \times DR pigs reared indoors and fed on a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 6 weeks. EXT: IB \times DR breed pigs free-range reared and exclusively fed on acorns and grass according to the traditional feeding system. sn-2 (in 2-position of triglyceride), sn-1,3 (average of 1 and 3- position of triglyceride).

In bovine tissue, dietary intervention has also been proven to alter FA in the external sn-1,3 position of the TAG rather than the sn-2 location. Smith *et al.*,¹¹ observed that depressing desaturase enzyme activity increased the concentration of C18:0 located in the external sn-1,3 position in bovine adipose tissue, but limited response was observed on sn-2 and Segura J (unpublished) observed that the substitution of lard by palm oil as dietary fat only produced slight changes in sn-1,3. In this research, only in EXT diet the high increase of TAG C18:1n-9 and decrease of C16:0 had higher effect in sn-2 position than in sn-1,3. Further research is needed to clarify whether this behavior was completely due to special feeding conditions.

Moisture percentage, melting point (measured as slip point) and results of textural profile analysis of each diet are shown in Table 4. Moisture and adhesiveness did not show statistical difference between both SUN groups. The lowest values of moisture, melting point, hardness and adhesiveness were shown by subcutaneous fat of pigs of EXT treatment while the highest was found in LARD diet. Melting point values were different for each diet, the highest (30.5 °C) was obtained for LARD treatment, the lowest one (26.4 °C) was shown by subcutaneous fat of pig fed EXT while S-SUN and L-SUN showed intermediate and different values (30.0 and 29.4 °C respectively, $P < 0.0001$). Springiness, cohesiveness, gumminess and chewiness also showed their highest value in LARD diet and the lowest in pigs fed EXT but not clear differences were observed if S-SUN or L-SUN diets were considered.

The decrease of fat moisture in a diet enriched with MUFA was also observed by Ventanas *et al.*,³⁷ the higher saturated the fat is, the higher moisture level presents. Similar behavior was observed for melting point. In fact, the C18:0 content⁸ and relationship between MUFA and SFA³⁸ have been considered the best predictor of the melting point. Besides, Segura *et al.*,¹² analyzed the effect of positional distribution within the TAG molecule on selected physical properties of subcutaneous fat of dry-cured hams and concluded that melting point oscillations were related to the concentration and positional distribution of FAs. When C16:0 is preponderant in sn-2, the behavior of the melting point depends largely on the FA present in sn-1,3. An increase of slip point is observed when C16:0 or C18:0 are located in sn-1,3 (LARD group) and a decrease when C18:1n-9 increases in this position. But, when C18:1n-9 concentration in sn-2 increases, C18:0 of sn-1,3 do not cause a marked impact, it was

the increase of C18:1n-9 and C18:2n-6 in sn-1,3 which caused a strong decrease (L-SUN and EXT treatments).

In the case of hardness, generally, higher proportion of C18:0 and lower proportion of C18:2n-6 acids led to a harder fat.³⁸ Segura *et al.*,¹² also observed that hardness was correlated with FAs of external positions of TAG molecule. Authors found a positive correlation between hardness and C16:0, C18:0 and SFA in sn-1,3 position and negative for C18:2n-6 and total PUFA. In our case, the lowest value of hardness in EXT treatment was coincident with the lowest value of C18:0 and the highest of C18:1n-9, C18:2n-6 and ACL in sn-1,3 whereas the opposite was observed in LARD diet. Between LARD and S-SUN groups, only difference in sn-1,3 was found in total PUFA while between S-SUN and L-SUN also in C18:1n-9, total MUFA and total SFA changes were detected and could cause the observed changes on hardness.

Casutt *et al.*,³⁹ (1999) in bovine kidney fat and Nishioka & Irie⁶ found that the higher concentration of SFA or C18:2n-6, the higher adhesiveness of adipose tissue was observed and Segura *et al.*,¹² added that adhesiveness was dependent of FA concentration in sn-2, directly to C18:0 and C18:2n-6 and inversely proportional to C18:1n-9. The strong decrease in EXT group compared to the others could be explained by the strong increase of C18:2n-6 and decrease of SFA in sn-2.

A direct dependence of springiness and cohesiveness on FAs has not been clarify in our results. In fact, Sumena *et al.*,⁴⁰ concluded that the contribution to the texture features, mainly cohesiveness, was the network of connective tissue fiber, predominantly the collagen fibers and small quantities of elastic and reticular fibers and not the adipocyte composition itself.

4. Conclusions.

In agreement with previous literature, sn-2 position of the triglyceride is highly regulated and concentrates C16:0 around 70g /100g fatty acids. Moderate dietary enrichment with C18:1n-9 in mixed diets does not alter this regulation. However, the extremely high intake of C18:1n-9 (and also C18:2n-6 and C18:3n-3) in extensively reared pigs fed on acorn and grass surpasses this regulation, thus modifying fatty acids in the sn-2 position. Iberian pig raised extensively has a more favorable nutritional lipid profile and distinctive fat rheological properties than pigs fed mixed diets.

Table 4. . Effect of proposed treatments on moisture, melting point and textural parameters of pig subcutaneous fat¹.

	LARD	S-SUN	L-SUN	EXT	SEM	P
Moisture (%)	6.5 ^a	6.0 ^b	5.7 ^b	4.80 ^c	0.16	0.0001
Melting Point (°C)	30.5 ^a	30.0 ^a	29.4 ^b	26.4 ^c	0.19	0.0001
Hardness(N)	44.1 ^a	42.0 ^{ab}	40.6 ^b	32.9 ^c	1.14	0.0039
Adhesiveness (Nxs)	-0.41 ^a	-0.28 ^b	-0.27 ^b	-0.07 ^c	0.04	0.0001
Springiness (10 ⁻³) (m)	1.11 ^a	0.92 ^a	0.47 ^b	0.67 ^{ab}	0.20	0.1001
Cohesiveness	0.56 ^a	0.55 ^a	0.59 ^a	0.50 ^b	0.02	0.0225
Gumminess (N)	25.0 ^a	22.7 ^a	24.0 ^a	16.6 ^b	1.67	0.0038
Chewiness 10 ⁻² (J)	2.82 ^a	1.89 ^{ab}	1.11 ^b	1.09 ^b	0.49	0.0400

LARD: Iberian × Duroc (IB × DR) pigs reared indoors and fed with lard as fat source. S-SUN: IB × DR pigs reared indoors and fed on a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 3 weeks. L-SUN: IB × DR pigs reared indoors and fed on a diet containing high-oleic sunflower oil (115 g/kg of diet) during 6 weeks. EXT: IB × DR breed pigs free-range reared and exclusively fed on acorns and grass according to the traditional feeding system.

¹ Different letters within the same raw indicate difference between groups (P < 0.05).
2 SEM= pooled standard error (n=8).

Acknowledgements

This project was partially supported by MEDGAN (S2013 / ABI-2913). Comunidad de Madrid and CEI Campus Moncloa UCM-UPM, 28040 Madrid, Spain and AGL2013-48121 Ministerio de economía y competitividad. Thanks are due to Isabel Martín for her skillful technical assistance.

References.

- Mitchaotai J, Yuangklang C, Wittayakun S, Vsupen K, Wongsutthavas S, Srenanul P, Hovenier, R, Everts H, Everts H, Beynen AC, Effect of dietary fat type on meat quality and fatty acid composition of various tissues in growing-finishing swine. *Meat Sci* **76**: 95-101 (2007).
- Apple JK, Maxwell CV, Galloway DL, Hamilton CR, Yancey JWS, Interactive effects of dietary fat source and slaughter weight in growing-finishing swine: II. Fatty acid composition of subcutaneous fat. *J Anim Sci* **87**:1423-1440 (2009).
- López-Bote CJ, Isabel B, Daza A, Partial replacement of poly- with monounsaturated fatty acids and vitamin E supplementation in pig diets: effect on fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular fat an on fat and lean firmness. *Anim Sci* **75**: 349-358 (2002).
- Teye GA, Sheard PR, Whittington FM, Nute GR, Stewart A, Wood JD, Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 1. Effects on muscle fatty acid composition, carcass, meat and eating quality. *Meat Sci* **73**:157-165 (2006).
- Hallenstvedt E, Kjos NP, Overland M, Thomassen M, Changes in texture, colour and fatty acid composition of male and female pig shoulder fat due to different dietary fat sources. *Meat Sci* **90**: 519-527 (2012).#
- Nishioka T, Irie M, Evaluation method for firmness and stickiness of porcine perirenal fat. *Meat Sci* **70**: 399-404 (2005).
- Isabel B, López-Bote CJ, de la Hoz L, Timón M, García C, Ruiz, J, Effect of feeding elevated concentrations of monounsaturated fatty acids and vitamin E to swine on characteristics of dry-cured hams. *Meat Sci* **64**: 475–482 (2003).
- Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, Hughes SI, Whittington FM, Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci* **78**: 343-358 (2008).
- Ponnampalam EN, Lewandowski P, Nesaratnam K, Dunshea FR, Gill H, Differential effects of natural palm oil, chemically-and enzymatically-modified palm oil on weight gain, blood lipid metabolites and fat deposition in a pediatric pig model. *Nutr J* **10**: 1-7 (2011).
- Gouk SW, Cheng SF, Mok JSL, Ong ASH, Chuah CH, Long-chain SFA at the Sn-1,3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. *Brit J Nutr* **110**: 1987-1995 (2013).
- Smith SB, Yang A, Larsen TW, Tume, RK, Positional analysis of triacylglycerol from bovine adipose tissue lipids varying in degree of saturation. *Lipids* **33**: 197-207 (1998).
- Segura J, Escudero R, Romero de Ávila MD, Cambero MI, López-Bote CJ, Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical

- properties of dry-cured ham subcutaneous fat. *Meat Sci* **103**: 90-95 (2015).
13. King DA, Behrends JM, Jenschke BE, Rhoades RD, Smith SB, Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols from subcutaneous adipose tissue of pigs fed diets enriched with conjugated linoleic acid, corn oil, or beef tallow. *Meat Sci* **67**: 675-681 (2004).
 14. López-Bote CJ, Sanz Arias R, Rey AI, Castaño A, Isabel B, Thos J, Effect of free-range feeding on *n*-3 fatty acid and α -tocopherol content and oxidative stability of eggs. *Anim Feed Sci Tech* **72**: 33-40 (1998).
 15. Ventanas S, Ventanas J, Ruiz J, Estévez M, Iberian pigs for the development of high-quality cured products, in *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry* ed. S. G. Pandalai by Research Signpost, Trivandrum, India, pp: 27-53 (2005).
 16. Segura J, López-Bote CJ, A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis. *Food Chem* **145**: 821-825 (2014).
 17. Perona JS, Ruíz-Gutiérrez V, Analysis of Neutral Lipids: Triacylglycerols. In: *Handbook of food analysis* (Nollet LML ed), New York (USA), pp: 275-312 (2004).
 18. Garcés R, Mancha M, One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal Biochem* **211**: 139-143 (1993).
 19. ISO, 6321:2002, *Animal and vegetable fats and oils - Determination of melting point in open capillary tubes (slip point)*, Second edition, 2-15 (2002).
 20. Bourne MC, Texture profile analysis. *Food Technol* **32**: 62-66 (1978).
 21. SAS, *SAS user's guide statistics*. Stat Anal Syst Inst Inc. Cary, NC, USA (2009).
 22. Ruiz J, Cava R, Antequera T, Martín L, Ventanas J, López-Bote CJ, Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat Sci* **49**: 155-163 (1998).
 23. Timón ML, Martín L, Petró MJ, Jurado A, García C, Composition of subcutaneous fat from dry-cured Iberian hams as influenced by pig feeding. *J Sci Food Agri* **82**: 186-191 (2001).
 24. Carrapiso AI, Bonilla F, García C, Effect of crossbreeding and rearing system on sensory characteristics of Iberian ham. *Meat Sci* **65**: 623-629 (2001).
 25. Ventanas S, Tejada JF, Estévez M, Chemical composition and oxidative status of tissues from Iberian pigs as affected by diets: extensive feeding vs. oleic acid and tocopherol enriched mixed diets. *Animal* **2**: 621-630 (2008).
 26. Muriel E, Ruiz J, Ventanas J, Antequera T, Free-range rearing increase (*n*-3) polyunsaturated fatty acids of neutral and polar lipids in swine muscles. *Food Chem* **78**: 219-225 (2002).
 27. Mu H, Hoy CE, The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res* **43**: 105-133 (2004).
 28. Christie WW, Moore JH, 1970. A comparison of the structures of triglycerides from various pig tissues. *Biochim Biophys Acta* **210**: 46-56 (1970).
 29. Innis SM, Nelson CM, Dietary triacylglycerols rich in sn-2 palmitate alter post-prandial lipoprotein and unesterified fatty acids in term infants. *Prostag Leukotr Ess* **89**: 145-151 (2013).
 30. Christie WW, Clapperton JL, Structures of the triacylglycerols of human milk and some substitutes. *J Soc Dairy Technol* **35**: 22-24 (1982).
 31. Innis SM, Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. *Adv Nutr* **2**: 275-283 (2011).
 32. Christie WW, Structure of the triacyl-sn-glycerols in the plasma and milk of the rat and rabbit. *J Dairy Res* **52**: 219-222 (1985).
 33. Hunter JE, Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids* **36**: 655-668 (2001).
 34. Mu H, Porsgaard T, The metabolism of structured triacylglycerols. *Prog Lipid Res* **44**: 430-448 (2005).
 35. Innis SM, Dyer RA, Lien, EL, Formula containing randomized fats with palmitic acid (C16:0) in the 2-position increases 16:0 in the 2-position of plasmas and chylomicron triglycerides in formula-fed piglets to levels approaching those of piglets fed sow's milk. *J Nutr* **127**: 1362-1370 (1997).
 36. Innis SM, Dyer R, Quinlan PT, DiersenSchade D, Dietary triacylglycerol structure and saturated fat alter plasma and tissue fatty acids in piglets. *Lipids* **31**: 497-505 (1996).
 37. Ventanas S, Estévez M, Tejada JF, Ruiz J, Protein and lipid oxidation in Longissimus dorsi and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Sci* **72**: 647- 655 (2006).
 38. Lea CH, Swoboda PAT, Gatherum DP, A chemical study of soft fat in cross-bred pigs. *J Agric Sci* **74**: 279.284 (1970).
 39. Casutt MM, Scheeder MRL, Escher F, Dufey PA, Kreuze M, Relating texture properties and composition of bovine fat tissue. *Fett-Lipid* **8**: 283-290 (1999).
 40. Sumena KB, Lucy KM, Chungath JJ, Ashok N, Harshan KR, Regional histology of the subcutaneous tissue and the sweat glands of Large White Yorkshire pigs. *Tamil Nadu J Vet Anim Sci* **6**: 128-135 (2010).

5. DISCUSIÓN GENERAL.

5.1 Propuesta y optimización de un nuevo método de extracción de grasa intramuscular.

La grasa intramuscular es un indicador de calidad de la carne puesto que le proporciona sabor, aroma, jugosidad, y una adecuada consistencia (Fernández et al., 1999). La utilización de diferentes cruces y razas ha permitido la obtención de animales de elevada eficacia productiva. Parámetros productivos, como la ganancia media diaria, el índice de transformación del alimento, el rendimiento y proporción de magro de la canal y la proporción de partes nobles, son de gran interés, tanto para productores como industriales. En la bibliografía se encuentran referencias que señalan que para mantener los atributos de calidad óptimos, es preciso que la carne contenga al menos un 2% de grasa intramuscular. Aunque, nuestras costumbres gastronómicas y la tradición en el procesado de la carne, hacen que en nuestra área de producción se prefieran carnes con un contenido claramente superior, especialmente en carnes destinadas a la elaboración de derivados cárnicos. Así, estudios basados en test sensoriales, han mostrado que los consumidores prefieren carnes con un nivel de grasa intramuscular no inferior al 3% mientras en el sector del cerdo ibérico, la industria busca valores por encima del 6-7 %.

La determinación precisa de la grasa intramuscular presenta considerables dificultades, ya que varía tanto dentro del propio músculo como con la localización anatómica (Faucitano et al., 2004), obteniéndose con frecuencia coeficientes de variación entre 25-30 %. Este hecho, no sólo complica su cuantificación, también obstaculiza el desarrollo de estrategias de producción animal para tratar de modificarla. Sin embargo, hemos podido comprobar que buena parte de la variabilidad asociada a la cuantificación de la grasa intramuscular se debe al procedimiento analítico empleado.

Los procedimientos de análisis habitualmente empleados para la cuantificación de la grasa intramuscular (Blig y Dyer, 1959; Folch et al., 1957; Marmer y Maxwell, 1981) son lentos, ya que implican sucesivas extracciones sólido-líquido con mezclas de disolventes (comúnmente cloroformo-metanol). Estos métodos tienen un coste elevado al requerir el empleo de cantidades importantes de disolventes y de muestra, derivando, sin embargo, en resultados que, como se ha mencionado, presentan elevada variabilidad. Sukhija y Palmquist (1988) desarrollaron un método en un solo paso bastante, utilizado en análisis de piensos (generalmente materia seca) pero únicamente cuantifica por metilación

directa de los ácidos grasos presentes en la muestra e imposibilita cualquier tratamiento de los mismos o la obtención de otro tipo de lípidos.

Ante estos inconvenientes y, puesto que la extracción de grasa intramuscular es un procedimiento de rutina en muchos laboratorios, nos planteamos desarrollar un método de extracción que solventara, en la medida de lo posible, los problemas encontrados.

Así pues, comprobamos que uno de los mayores inconvenientes, de la metodología existente, era la utilización de muestra fresca ya que introducía un tercer disolvente en la mezcla, el agua, dificultando y ralentizando las separaciones. Para paliar este factor, nos planteamos la posibilidad de trabajar con muestras previamente liofilizadas. Este procedimiento ya había conducido a buenos resultados en el trabajo de Dunstan et al. (1993). La liofilización permitiría, a su vez, reducir la cantidad de muestra empleada y, por tanto, el volumen de disolventes. Además, sustituimos el cloroformo empleado por diclorometano, menos volátil, más seguro y barato y que ya había sido empleado por Céquier-Sánchez et al. (2008) en trabajos de extracción de ácidos grasos.

El siguiente paso fue optimizar tanto la homogenización de la muestra como la extracción sólido-líquido. Con este objetivo, se trabajó para conseguir un tamaño de partícula final y un procedimiento de agitación más uniforme, que redujera la variabilidad del método y facilitara la forma de proceder. Para ello, se optó por utilizar un sistema Mixer Mill MM400 (Retsch technology, Haan, Alemania) que cubría los requerimientos iniciales y además permitía procesar varias muestras a la vez, con el consiguiente reducción del tiempo de análisis.

Por último, se comprobó que la filtración final era otra etapa limitante del método original. Aprovechando que se había reducido la cantidad de muestra de partida, el proceso podía llevarse a cabo en tubos cónicos de eppendorf que podían centrifugarse directamente para la separación, sencilla y rápida, de la matriz sólido del disolvente de extracción. Se estructuró así el método descrito en el artículo Segura y López-Bote (2014).

Los resultados derivados de la aplicación del nuevo método (NW) diseñaron se han contrastado y comparado con los obtenidos por otros métodos establecidos. En primer lugar, un conjunto

de 64 muestras de lomo de cerdo blanco Landrace x Large White (32 de cada género) se analizaron por el método NW, por propuesto por Folch et al. (1957) (FOL) y por el de un solo paso propuesto por Sukhija y Palmquist (1988) (OS). En esta experiencia se observó:

- Una significativa ($P < 0.05$) regresión lineal entre los datos obtenidos por el método NW y los otros referenciados (R^2 entre 0.88 y 0.93).

- No existieron diferencias ($P > 0.05$) en la cantidad de grasa extraída por el método NW y FOL.

- El método OS extrajo menor cantidad de grasa ($P < 0.05$) que los otros dos métodos utilizados, ya que únicamente es válido para cuantificar los ácidos grasos.

- Los tres métodos permitieron detectar diferencias significativas ($P < 0,05$) entre sexos en el contenido de grasa intramuscular (Alonso et al., 2009; Barton-Gade, 1987; Latorre et al., 2003)

De acuerdo con los resultados obtenidos, utilizando la cuantificación por el método de Folch et al (1957), se dividieron las muestras en 4 grupos y se eligió la más próxima a la media de cada uno. Éstas cuatro muestras (con Bajo, Medio-bajo, Medio-alto y Alto contenido en grasa intramuscular) se analizaron por sextuplicado por los tres métodos estudiados: el método propuesto por Marmer y Maxwell (1988) (MM), FOL, por una adaptación del mismo con muestra liofilizada (L-FOL) y el método desarrollado en esta tesis doctoral (NM). Los resultados se muestran en la Tabla 5.1. Se pudo así comprobar que, aunque significativas, no existían diferencias cuantitativas muy notorias entre métodos en cuanto a la capacidad de extracción de grasa. Además, a excepción de MM, todos los métodos pudieron diferenciar los distintos niveles de grasa establecidos. Analizando las similitudes entre metodologías, se pudo observar que, a niveles altos de grasa intramuscular, NW, junto con FOL y OS, mostró la mayor capacidad de extracción. MM fue el método con menor rendimiento de extracción. En el nivel Medio-alto, NW fue, el método que más cantidad de grasa extrajo ($P < 0,05$) seguido por los otros 4 métodos, entre los que no hubo diferencias significativas. Al disminuir el contenido en grasa, NW fue perdiendo parte de su poder de extracción.

Tabla 5.1. Cuantificación de la concentración (g/100g de carne) de grasa intramuscular de cuatro muestras de lomo de cerdo analizadas por sextuplicado por 5 procedimientos analíticos: Folch et al., (1957) con muestra fresca (FOL) o liofilizada (L-FOL), Sukhija y Palmquist (1988) (OS), Marmer y Maxwell (1981) (MM) y el nuevo método propuesto (NW).

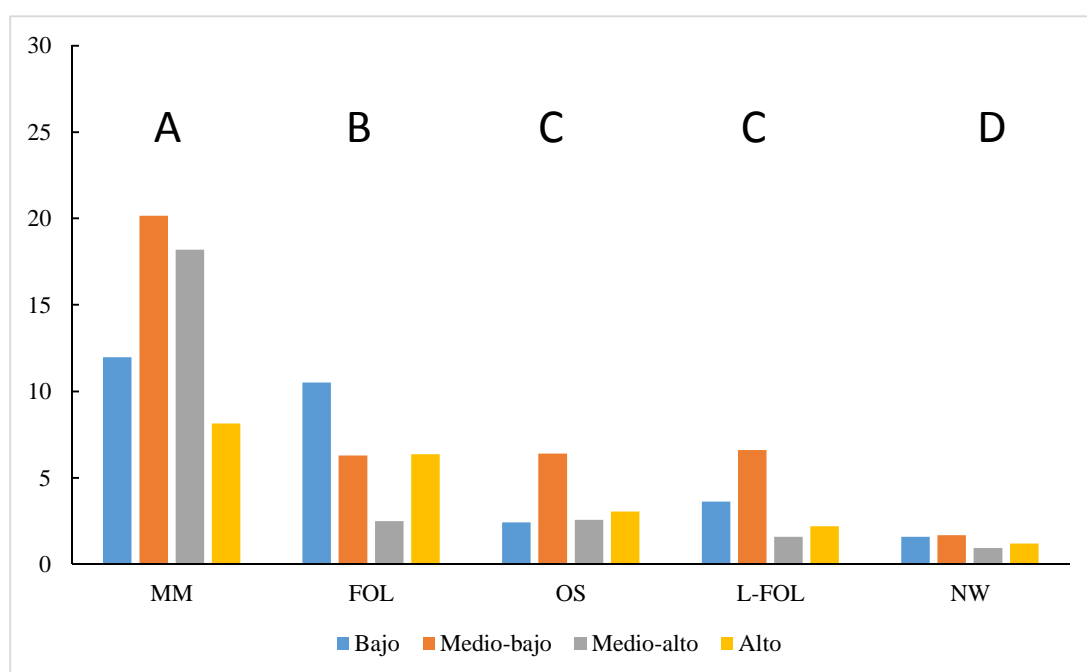
Método	Bajo	Medio-bajo	Medio-alto	Alto	Media
NW	^C 2.14 ^d	^{AB} 3.03 ^c	^A 4.47 ^b	^A 6.77 ^a	4.10
FOL	^A 2.91 ^d	^A 3.59 ^c	^B 4.04 ^b	^{AB} 6.11 ^a	4.16
L-FOL	^B 2.52 ^d	^A 3.48 ^c	^B 3.73 ^b	^B 5.76 ^a	3.87
OS	^D 1.55 ^d	^B 2.40 ^c	^B 3.74 ^b	^{AB} 6.45 ^a	3.53
MM	^{AB} 2.57 ^b	^B 2.68 ^b	^B 3.78 ^a	^C 4.80 ^a	3.46
Media	2.34	3.04	3.95	5.98	

Letras diferentes en mayúsculas (A-D) en la misma columna indican diferencias ($P < 0.05$) entre procedimiento analítico y letras en minúscula (a-d) en la misma fila indican diferencias entre grupos de contenido de grasa intramuscular.

Por otra parte, no se encontraron diferencias en los perfiles de ácidos grasos atribuibles a las distintas metodologías empleadas. En este mismo estudio, se comprobó que NW reducía muy significativamente la variabilidad de los resultados (Figura 5.1). Este hallazgo se considera de gran relevancia ya que es un buen indicador de la exactitud de las determinaciones y de la eficacia del método.

En conjunto, el método desarrollado en esta Tesis Doctoral presenta considerables ventajas frente a otros procedimientos utilizados para la extracción de grasa intramuscular. Su desarrollo permite utilizar una cantidad mucho menor de disolvente, reducir la variabilidad de los resultados y un ahorro notable del tiempo de análisis, con una elevada eficacia en la extracción de grasa. A estos hechos contribuye la liofilización de las muestras y que no se requieran complejas separaciones sólido-agua-disolvente orgánico así como el empleo del sistema Mixer Mill MM400 para la homogeneización y agitación de las muestras. Se propone, por todo ello, como un método alternativo para la extracción de grasa intramuscular.

Figura 5.1. Coeficiente de variación de la concentración de grasa intramuscular de cuatro muestras de lomo de cerdo analizadas por sextuplicado por 5 procedimientos analíticos: Folch et al., (1957) con muestra fresca (FOL) o liofilizada (L-FOL), Sukhija y Palmquist (1988) (OS), Marmor y Maxwell (1981) (MM) y el nuevo método propuesto (NW).



Letras diferentes en mayúsculas (A-D) indican diferencias ($P < 0.05$) entre coeficientes de variación del procedimiento analítico.

A partir de la publicación del mencionado método (Segura y López-Bote, 2014), varios investigadores se pusieron en contacto con nuestro grupo solicitando más información sobre su desarrollo, especialmente por desconocer el equipo Mixer Mill MM400, que es poco común en los laboratorios de análisis de carne.

Por este motivo, consideramos que era necesaria la búsqueda de alternativas que condujeran a resultados similares pero con la utilización de un equipamiento más común y asequible. Para ello, nos planteamos para la homogeneización de las muestras liofilizadas, la utilización de un molinillo de café simple y el triturado con mortero. Como sistema de agitación para la extracción con disolventes se probó un agitador de tubos (tipo vórtex). Se trataba por tanto de materiales habituales o comunes entre el material de laboratorio. En el diseño experimental se realizaron diversas combinaciones para establecer seis métodos de análisis: Mixer Mill/Mixer Mill (correspondiente al procedimiento NW y considerado

como referencia), Mixer Mill/Vortex, Molinillo/Mixer Mill, Molinillo/Vórtex, Mortero/Mixer-mill y Mortero/Vórtex.

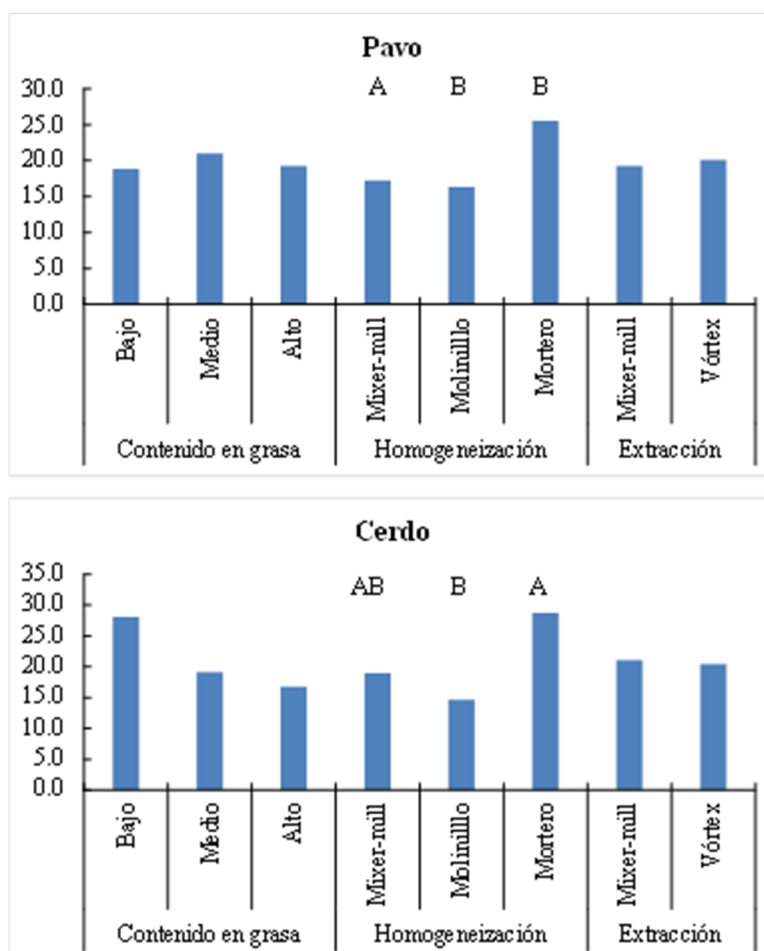
Como material de estudio se seleccionaron 27 muestras de pechuga de pavo (como muestra de carne con bajo contenido de grasa intramuscular) y 27 muestras de lomo de cerdo ibérico (como muestra de carne con alto contenido). El análisis de las muestras por NW, como método de referencia, permitió su agrupación en tres niveles de grasa (bajo, medio y alto). En la comparación de los resultados obtenidos por los distintos métodos de agitación, no se encontraron diferencias significativas entre los derivados del uso de un Vórtex y los del empleo de Mixer Mill en cuanto a cantidad de grasa extraída. Atendiendo al método de homogeneización, cabe destacar que el uso del equipo Mixer Mill o de un Molino, proporcionan mayor extracción de grasa que el trabajo en un Mortero. Además, se comprobó que con la homogeneización por Mortero se perdía la capacidad de discriminación entre distintos niveles de grasa.

En cuanto al coeficiente de variación (Figura 5.2), se comprobó que la utilización del Mortero proporcionaba la mayor variabilidad mientras que con el Molinillo se obtuvieron los resultados con la menor. No se detectaron diferencias significativas en este parámetro atribuibles al método de agitación.

No se observaron diferencias en el perfil de ácidos grasos de la grasa extraída por cualquiera de los métodos mencionados.

A la vista de estos resultados se propone el procedimiento Molinillo/Vórtex como alternativa al método Mixer-mill/Mixer-mill (Segura y López-Bote, 2014), para la extracción de grasa intramuscular, ya que ofrece la ventaja de trabajar con material de laboratorio más asequible obteniendo resultados y empleando cantidades similares de disolventes, aunque el tiempo de análisis es mayor.

Figura 5.2. Coeficiente de variación de la concentración de grasa intramuscular de tres muestras de pechuga de pavo y tres muestras de lomo de cerdo analizadas por triplicado por 6 procedimientos analíticos Mixer-Mill/Mixer-Mill, Mixer-Mill/Vortex, Molinillo/Mixer-Mill, Molinillo/Vórtex, Mortero/Mixer-mill y Mortero/Vórtex.



Letras diferentes en mayúsculas (A-D) indican diferencias ($P < 0.05$) entre coeficientes de variación del procedimiento de homogeneización.

5.2 Comparativa de técnicas analíticas para la determinación de la distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido.

Mediante modificaciones en el tipo de grasa de la dieta, la industria porcina ha conseguido modificar los ácidos grasos presentes tanto en la grasa intramuscular como en la subcutánea.

Las propiedades físicas (fundamentalmente punto de fusión) de los ácidos grasos son muy variables y por consiguiente también las de los triglicéridos. El control del perfil de ácidos grasos se hace necesario tanto por aspectos nutricionales como por su interés para la industria de derivados cárnicos.

Durante los últimos años, diversos estudios han demostrado que la distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido afecta marcadamente a la digestibilidad de la grasa (Mu y Hoy, 2004). Además, puede afectar la incidencia de enfermedades como obesidad, diabetes o hipertensión (Gouk et al., 2013; Ponnampalam et al., 2011). Es conocido que durante la lactación, la presencia de C16:0 en posición 2 del triglicérido de la dieta, tanto en humanos como en lechones, es fundamental para el buen desarrollo del organismo (Christie y Clapperton, 1982; Innis et al., 1995; Innis 2011). Por tanto, las implicaciones metabólicas son complejas y de gran trascendencia práctica.

En este contexto, pensamos que sería de gran interés comprobar si las modificaciones de la dieta podían alterar la posición de los ácidos grasos en la molécula de triglicérido ya que existe poca información sobre estudios dedicados a modificar dicho reparto. Sin embargo, tras analizar las técnicas disponibles para cuantificar la distribución posicional, pudimos comprobar que tampoco existía en la literatura acuerdo sobre el mejor método de determinación. La digestión del triglicérido con una lipasa, la obtención del perfil de ácidos grasos en la posición 2 de forma directa y el correspondiente a las posiciones 1 y 3 por diferencia, es una metodología sencilla y relativamente barata y rápida. Los pocos trabajos existentes de producción animal han utilizado un procedimiento analítico basado en la metilación en medio básico, tras la reacción con la lipasa y posterior caracterización por cromatografía de gases (Williams et al, 1995). Este procedimiento parte de la suposición de que en medio básico no se

metilan los ácidos grasos libres y, por tanto, sólo se obtendrán los ésteres metílicos de los ácidos grasos ubicados en posición sn-2. Los resultados de King et al. (2004) en cerdos blancos alimentados con sebo de vacuno o aceite de maíz concluyen que el C18:1n-9 es el ácido graso mayoritario en posición 2, mientras que C18:2n-6 y C18:3n-3 lo son en sn-1,3. Sin embargo, C18:0 y C16:0 se distribuyen por igual entre las distintas posiciones. Diaz et al. (1996) y Viera-Alcaide et al. (2007) obtienen resultados similares en cerdo Ibérico. Estos trabajos proporcionan resultados diferentes a los obtenidos por otros autores (Christie, 1985; Christie & Clapperton, 1982; Christie & Moore, 1970; Innis 2011) que describen que, tanto en la grasa de cerdo como en la leche humana, la posición 2 del triglicérido está ocupada principalmente por C16:0 mientras que C18:0 esterifica las posiciones externas. El C18:1n-9 se encuentra preferentemente localizado en sn-1,3 y C18:2n-6 y otros poliinsaturados se encuentran distribuidos casi por igual entre las posiciones externas e interna con cierta preferencia por sn-1,3.

Resulta interesante comprobar que en trabajos orientados a alimentación humana o en laboratorios de análisis de aceites, la metodología analítica para cuantificar la posición de ácidos grasos en el triglicérido es diferente a la utilizada por William et al. (1995). Unos autores han utilizado la separación de los productos de reacción de lipólisis mediante cromatografía de capa fina, posterior metilación en medio ácido y caracterización por cromatografía de gases (Luddy et al., 1964). Los resultados obtenidos en este caso están de acuerdo con la distribución propuesta por Christie (1985), Christie y Clapperton (1982), Christie y Moore (1970) e Innis (2011).

La grasa subcutánea de 20 jamones curados (tomada a la altura del músculo *bíceps femoris*) se analizó por el método propuesto por Luddy et al. (1964) y posteriormente adaptado por Mancha y Vázquez (1970) (método A) y por el protocolo propuesto por Williamns et al. (1995) y modificado posteriormente por Smith et al. (1998) (método B). Los resultados del método A fueron consistentes con la mayoría de los referenciados en la literatura. Además, se encontró una correlación entre la distribución posicional de los ácidos grasos, propiedades físicas, como el punto de fusión (determinado como punto de deslizamiento) y la dureza de la grasa. Sin embargo, el método B condujo a un conjunto de resultados bastante dispares, tanto con el método A como con los de la mayoría de bibliografía publicada al respecto

y carentes de correlación con las propiedades físicas mencionadas. Comprobamos que este hecho fundamentalmente se debía a una subestimación del ácido palmítico existente en sn-2.

Por todo ello, decidimos utilizar la metodología denominada A para nuestros posteriores estudios.

5.3 Distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido y algunas propiedades físicas de la grasa, como el punto de fusión y el perfil de textura: Relación y modificación.

Tanto en la comercialización de la carne fresca como en los procesos tecnológicos destinados a la obtención de productos cárnicos, la consistencia de la grasa tiene una gran relevancia por su importante papel en la apariencia y en la facilidad de manipulación. La consistencia de la grasa depende fundamentalmente de la proporción de triglicéridos que se encuentran en forma líquida o sólida a una determinada temperatura, es decir, del número de insaturaciones de las cadenas de ácidos grasos que los constituyen (Enser 1984; Glaser et al., 2004).

De todos los ácidos grasos, el que muestra una correlación más elevada con la consistencia de la grasa del cerdo es el C18:0, seguido del C18:2n-6, si bien en los límites de variación más próximos a los valores comerciales es éste último el principal responsable (Glaser et al., 2004).

La gran mayoría de los autores (Warnants et al. 1999, Wood et al. 2008) coinciden con recomendar un máximo de un 15 % en la concentración de C18:2n-6 para carne fresca, mientras que en partidas de carne destinadas a la elaboración de embutidos crudos madurados, Stiebing et al. (1993) establecen un límite del 12% para el C18:2n-6, que en condiciones excepcionales se puede aumentar hasta el 14%. En el caso de jamones crudos madurados, Boulard et al. (1995) recomiendan un valor máximo del 12%. Este es un valor de referencia para un buen número de industriales chacineros en el área Mediterránea. En el caso del cerdo ibérico destinado a la elaboración de chacinas, el límite máximo recomendable (incluso en los cerdos alimentados con piensos compuestos) se establece en el 9-10%.

La consistencia de la grasa ha sido considerada como una de las medidas de calidad más importantes y el punto de fusión como la propiedad física más relacionada con ella (Enser, 1984). Aunque para determinar el punto de fusión existen diversas metodologías, en el caso de grasas una de las más utilizadas es la medida en capilar abierto o “punto de deslizamiento” (ISO 6321:2002), ya que los triglicéridos de la grasa están compuestos por diferentes ácidos grasos lo cual provoca que en la obtención del punto de fusión, como “cambio de estado físico”, se obtengan intervalos amplios carentes

de utilidad práctica. El contenido en C18:0 (Wood et al., 1978) y la relación entre MUFA y PUFA (Lea et al., 1970) han sido considerados como los mejores predictores del punto de deslizamiento. En general, una alta proporción de C18:0 y baja proporción de C18:2n-6 conduce a grasas más duras, más consistentes y con mayor punto de deslizamiento (Enser 1984; Glaser et al., 2004).

Por otra parte, como se ha mencionado en el apartado anterior, la distribución posicional de los ácidos grasos dentro de la molécula de triglicérido ha adquirido gran importancia durante las últimas décadas por estar involucrada tanto en la digestibilidad de los triglicéridos (y por tanto en su absorción y probablemente su metabolismo) como en la incidencia de diversas enfermedades cardiovasculares (Mu y Hoy, 2004). Por todo ello, nos planteamos si la ubicación de los ácidos grasos en la molécula de triglicérido podría también influir en el punto de fusión (deslizamiento) y en algunas propiedades reológicas de la grasa (dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad), todas ellas variables de interés tecnológico para la industria cárnica y en el caso de ser así, qué estrategias nutricionales se podrían seguir para modificar y controlar dichas variables.

5.3.1 Estudio de la distribución posicional de los ácidos grasos.

A partir de la grasa de jamones curados (tomada a la altura del músculo *biceps femoris*), provenientes de cerdos cebados con manteca como fuente de grasa, se ha obtenido la distribución posicional de los ácidos grasos por el método propuesto por Luddy et al. (1964) y posteriormente adaptado por Mancha y Vázquez (1970) cuya idoneidad se discutió en el apartado anterior, midiéndose además el punto de fusión como punto de deslizamiento y los principales parámetros de textura.

5.3.1.1 Relación con el punto de fusión (determinado como punto de deslizamiento).

La matriz de correlaciones de Pearson en la que se relaciona la posición de los ácidos grasos en los triglicéridos y distintas características físicas de la grasa de estos valores (Tabla 5.2) pone de manifiesto que el punto de deslizamiento se correlaciona tanto con la posición sn-2 como con las posiciones sn-1,3 del triglicérido. Se ha podido comprobar también que las concentraciones de los diferentes ácidos grasos considerados en las diferentes posiciones mostraban colinealidad. En particular, en el caso de C16:0, sn-2, C16:0, sn-1,3 y C18:1, sn-2; C18:2n-6, sn-2 y C18:2, sn-1,3; SFA, MUFA,

PUFA y UI con independencia de la posición considerada y en las regresiones lineares múltiples se evitaron las combinaciones mencionadas.

Tabla 5.2. Matriz de correlaciones lineales de Pearson del punto de deslizamiento, actividad de agua (a_w) y parámetros de textura frente a los principales ácidos grasos.

		P. deslizamiento	a_w	Dureza	Adhesividad	Elasticidad	Cohesividad	Gomosidad	Masticabilidad
	P. deslizamiento			0.307	-0.505 *	-0.130	-0.123	0.011	-0.035
	a_w			0.145	-0.495 *	-0.586 **	0.399 *	0.144	-0.169
C16:0	TOTAL	0.253	0.058	0.584 *	0.015	0.122	-0.016	0.365	0.450 *
	Sn-2	-0.445 *	-0.449 *	-0.070	0.450 *	0.402	-0.205	-0.088	0.181
	Sn-1,3	0.582 **	0.421	0.356	-0.401	-0.287	0.169	0.263	0.066
C16:1	TOTAL	-0.131	-0.027	-0.378	-0.157	-0.033	0.276	0.216	0.063
	Sn-2	-0.145	-0.363	-0.510 *	0.235	0.463 *	-0.140	-0.134	0.009
	Sn-1,3	-0.085	0.083	-0.182	-0.245	-0.196	0.337	0.287	0.080
C18:0	TOTAL	0.338	0.056	0.690 **	0.151	0.033	-0.308	-0.061	0.164
	Sn-2	0.114	0.138	-0.099	0.146	-0.260	-0.036	-0.183	-0.123
	Sn-1,3	0.311	-0.021	0.715 **	0.164	0.133	-0.339	-0.045	0.203
C18:1	TOTAL	-0.225	0.326	-0.490 *	-0.283	-0.312	0.278	-0.085	-0.309
	Sn-2	0.587 **	0.310	0.137	-0.467 *	-0.255	0.145	0.111	-0.101
	Sn-1,3	-0.505 *	-0.010	-0.470	0.074	-0.008	0.093	-0.144	-0.165
C18:2	TOTAL	-0.088	-0.502 *	-0.532 *	0.042	0.220	-0.042	-0.091	-0.106
	Sn-2	0.212	-0.337	-0.262	-0.069	0.133	-0.023	0.003	-0.042
	Sn-1,3	-0.162	-0.543 *	-0.586 *	0.082	0.257	-0.058	-0.119	-0.115
SFA	TOTAL	0.329	0.053	0.708 **	0.125	0.076	-0.221	0.103	0.293
	Sn-2	-0.517 *	-0.352	-0.101	0.487 *	0.287	-0.164	-0.113	0.137
	Sn-1,3	0.564 *	0.256	0.632 **	-0.169	-0.119	-0.079	0.146	0.155
MUFA	TOTAL	-0.297	0.321	-0.451 *	-0.180	-0.270	0.287	-0.051	-0.260
	Sn-2	0.565 **	0.353	0.143	-0.482 *	-0.233	0.121	0.085	-0.129
	Sn-1,3	-0.527 *	-0.031	-0.435	0.142	0.008	0.110	-0.102	-0.114
PUFA	TOTAL	-0.090	-0.512 *	-0.545 *	0.049	0.246	-0.046	-0.093	-0.105
	Sn-2	0.185	0.207	-0.065	-0.303	-0.325	0.222	0.147	-0.105
	Sn-1,3	-0.162	-0.553 *	-0.596 *	0.087	0.273	-0.062	-0.126	-0.120
UI	TOTAL	-0.267	-0.289	-0.736 **	-0.054	0.084	0.121	-0.115	-0.245
	Sn-2	0.388	0.439 *	0.101	-0.479 *	-0.410	0.241	0.158	-0.140
	Sn-1,3	-0.522 *	-0.403	-0.724 **	0.172	0.197	0.042	-0.167	-0.172
ACL	TOTAL	0.206	-0.334	0.480 *	0.308	0.319	-0.291	0.060	0.292
	Sn-2	-0.597 **	-0.221	-0.118	0.429 *	0.174	-0.110	-0.103	0.072
	Sn-1,3	0.478 *	-0.035	0.474 *	-0.023	0.046	-0.123	0.124	0.173

*P<0.05, **P<0.001, SFA (ácidos grasos saturados), MUFA (ácidos grasos monoinsaturados), PUFA (ácidos grasos poliinsaturados), UI (índice de insaturación), ACL (longitud media de la cadena). TOTAL (en todo el triglicérido; incluyendo todas las posiciones), Sn-2 (en posición 2 del triglicérido), Sn-1,3 (promedio de posiciones 1 y 3 del triglicérido).

Las regresiones lineales se obtuvieron mediante un procedimiento de “paso a paso” hacia atrás. Se ha podido comprobar que, para el punto de deslizamiento, los modelos con elevados coeficientes de determinación incluyen la concentración de ácidos grasos en ambas (ver Tabla 2, capítulo 4 de resultados). Estos resultados están en concordancia con las conclusiones de Enser 1984, Glaser et al., 2004 o Lea et al., 1970 en las que, los ácidos grasos saturados generalmente aumentaban el punto de fusión mientras que los mono y poliinsaturados lo disminuyen. Por otra parte, Wood et al. (2004) encontraron que el ácido graso con mayor relación con el punto de fusión y con otras propiedades físicas era el C18:0. Sin embargo, resulta destacable que, en este último ácido graso, el comportamiento es diferente en función de la posición que ocupa en el triglicérido. Se podría deducir, por tanto, que la relación del punto de fusión con los ácidos grasos es de mayor complejidad que la que proporciona un modelo lineal.

Dado que las variables estimadas mostraron un comportamiento no ajustable a un modelo de primer orden (distribución no definida por un plano) y que la multicolinealidad limitaba el análisis de regresión lineal simple y múltiple optamos por utilizar modelos de superficie de respuesta de segundo orden. Estos modelos son más flexibles y permiten el ajuste de datos experimentales en los que existe curvatura y representar la interacción entre variables (como producto del cruce de las mismas). Los modelos obtenidos pueden consultarse en la Figura 1 del capítulo 4 de resultados. Los modelos obtenidos mediante este procedimiento podrían utilizarse para estimar el punto de fusión de la grasa conociendo la composición y posición de los ácidos grasos de la grasa de porcino.

El estudio de intervenciones sobre animales con intención de modificar la distribución posicional de ácidos grasos ha sido poco desarrollado hasta el momento. Sin embargo, la modificación enzimática o química de dicha disposición es frecuentemente utilizada a nivel industrial para obtener, por ejemplo, nuevos sustitutos de leche materna (Innis 2011; Innis et al., 2013; Zou et al., 2014), en los que, en la especie humana, es necesario que el C16:0 se encuentre casi con exclusividad en la posición sn-2. Otra aplicación que cabe mencionarse es la obtención de mantequillas y derivados, con diferente composición y propiedades (especialmente para modificar la consistencia y, por tanto, el punto de fusión), para diversificar la oferta de (Sonwai et al., 2014; Yusoff et al., 2013). Por tanto, los modelos

planteados pueden ser un primer paso de futuros estudios para controlar punto de deslizamiento y su comportamiento.

5.3.1.2 Relación con parámetros de textura.

Siguiendo el mismo esquema de trabajo que en el apartado anterior, la matriz de correlación de Pearson (Tabla 5.2), y en general el análisis de regresión lineal, que la dureza únicamente relacionaba significativamente con los ácidos grasos en las posiciones externas del triglicérido mientras que los posicionados en el interior (sn-2) lo hacen con la adhesión, siendo por tanto los que mejor predicen este atributo de textura de la grasa.

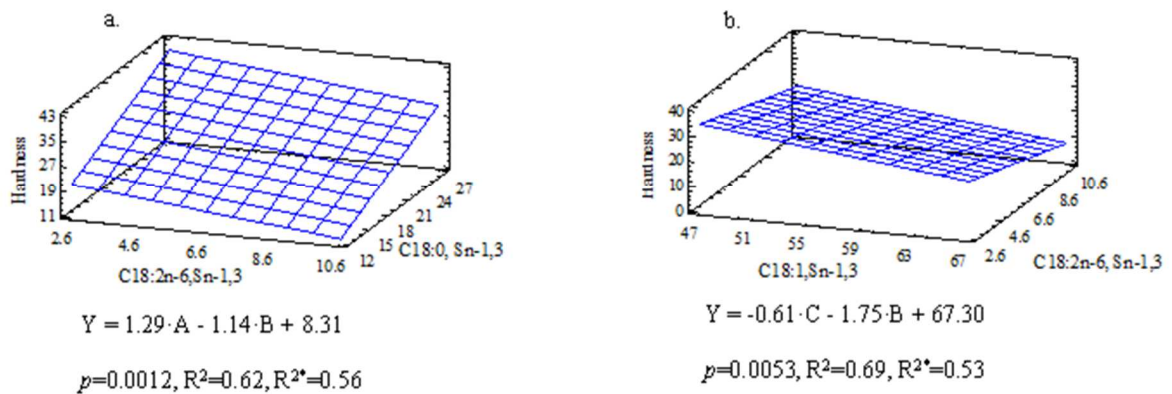
En este caso, la relación entre características de textura y la estructura de los triglicéridos se ajustó a modelos lineales múltiples, en los que la dureza resultó directamente proporcional a la concentración de C18:0 y SFA e inversamente proporcional a C18:1n-9, C18:2n-6, MUFA, PUFA y UI (Figura 5.3). La adhesividad fue directamente proporcional a C18:0 y C18:2n-6 mientras presentó una relación inversa con C18:1 en sn-2. En la Figura 3.1 se muestran modelos de superficie de respuesta correspondiente a la dureza, cuyas ecuaciones se encuentran en la Tabla 2 del capítulo 4 de resultados.

Con el procedimiento seguido, la dureza queda definida como la resistencia a la compresión (Bourne, 1978). En la grasa fresca, más del 90 % son triglicéridos. La asociación entre ellos se produce por medio de fuerzas de Van der Waals que son tanto más efectivas cuanto menor es la distancia entre moléculas. Esta distancia depende del volumen ocupado por cada ácido graso que va en aumento con el número de insaturaciones y la longitud de la cadena (Brenner, 1984; Cook, 1991). Así pues, cuanto mayor sea la cadena del ácido graso y mayor el número de insaturaciones, mayor será el volumen ocupado, mayor la distancia entre triglicéridos y menor la interacción entre ellos. Esta mayor distancia provocará una menor resistencia a la compresión y, por tanto, una menor dureza.

En comparación con la dureza, los modelos para la adhesión frente a la estructura de los triglicéridos de la grasa, aunque significativos, presentaron coeficientes de determinación inferiores, por lo que explican un menor porcentaje de la variabilidad de esta característica de textura. El resultado de

su dependencia con los ácidos grasos que ocupan la posición interna del triglicérido necesita de mayor estudio para su correcta descripción y explicación.

Figura 5.3. Modelos de superficie que muestran la relación entre la distribución posicional de C18:0, C18:1 y/o C18:2n-6 en el triglicérido y la dureza (N) de grasa subcutánea de jamón curado.



R^2 =coeficiente de determinación; R^{2*} =coeficiente de determinación corregido; Y=Dureza (N);

A=concentración (%) de C18:0 en sn-1,3; B=concentración (%) de C18:2n-6 en sn-1,3;

C= concentración (%) de C18:1 en sn-1,3; sn-2 (posición 2 del triglicérido), sn-1,3 (promedio de posición 1 y 3 del triglicérido).

Tanto en el caso de la elasticidad como de la cohesividad, no se encontró una relación clara con los ácidos grasos y la estructura de los triglicéridos. De hecho, Sumena et al. (2010) concluyeron que ambas variables, principalmente la cohesividad, estaban relacionadas con la red de tejido conectivo, predominantemente fibras de colágeno y pequeñas cantidades de fibras reticulares y elásticas y no con la composición lipídica del adipocito.

Podemos pues deducir que la dureza depende de la concentración y tipo de ácido graso presente en posiciones externas del triglicérido mientras que la adhesividad depende de la composición de ácidos grasos presente en la posición interna. El punto de deslizamiento depende de la distribución y concentración de cada ácido graso en ambas localizaciones. Además, de las superficies de respuesta obtenidas cabe suponer que para obtener cambios significativos en el punto de deslizamiento se necesitan modificaciones de mayor magnitud (en general, coeficientes de determinación menores así como pendientes más bajas) que para cambiar la dureza (mayores coeficientes). Es decir, un pequeño

cambio en la distribución de ácidos grasos en posiciones externas podría provocar un cambio marcado en la dureza de la grasa. Sin embargo, este cambio puede no ser suficiente para provocar modificaciones en el punto de deslizamiento.

5.3.2 Estrategias nutricionales para modificar la distribución posicional de ácidos grasos.

Para analizar el efecto de la dieta en la estructura de los triglicéridos de la grasa subcutánea se llevó a cabo un primer experimento (capítulo 5 del apartado de resultados) se escogieron 160 cerdos blancos (40.3 ± 0.78 kg de peso vivo). La línea hembra (Syra, Gene+, Enrin, Francia) utilizada incluía sangre de Large White, Landrace y Duroc y la línea macho fue PIC L65 (PIC, Barcelona, España). Recibieron una dieta pre-experimental *ad-libitum* durante 38 días (79.0 ± 6.58 kg de peso) que contenía 20 g C18:2n-6/kg de dieta y, posteriormente, cuatro dietas experimentales *ad-libitum* que diferían en el tipo de grasa (aceite de palma o manteca) y la concentración de glicerol (0 ó 50 g/kg) durante 32 días hasta el sacrificio. Todas las dietas de acabado contenían 10 g/kg de C18:2n-6. Mediante este diseño experimental se conseguiría teóricamente un elevado contenido en C18:2n-6 tanto en grasa intramuscular como subcutánea durante la etapa de crecimiento para posteriormente, durante la etapa de cebo, reducirlo a niveles comunes mediante el empleo de grasas más saturadas combinadas o no con glicerol que estimularía la síntesis endógena disminuyendo por tanto los PUFA. Nuestra hipótesis de partida se basó en que el empleo de dos grasas saturadas (palma vs manteca) con similar energía neta (FEDNA, 2010; INRA, 2002) pero con distinta distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido, conllevaría variaciones de la digestión y absorción de los mismos y, por tanto, podría conducir a diferentes estructuras del triglicérido almacenado en la grasa del cerdo.

En un segundo experimento (capítulo 6 del apartado de resultados) se trabajó con los jamones curados de 50 de los cerdos anteriores. Se separó la grasa subcutánea a nivel del músculo *biceps femoris* y se analizó su composición y distribución posicional de los ácidos grasos en los triglicéridos además de la humedad, actividad de agua, punto de fusión (medido como punto de deslizamiento) y su perfil de textura (dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad). Mediante estos análisis se podría comprobar si también se cumple igual o similar distribución posicional de ácidos

grasos en la molécula de triglicérido y ver qué efecto ha tenido la dieta sobre ésta y sobre algunas propiedades físicas.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se llevó a cabo un tercer con 32 cerdos cruzados Ibérico x Duroc alimentados con manteca o aceite de girasol alto oleico en condiciones intensivas o en montanera (capítulo 7 del apartado de resultados). Con este estudio se pretendía analizar otra estrategia nutricional muy diferente a la anterior y muy utilizada en el cerdo ibérico. La manteca, el girasol alto oleico o las bellotas y hierba ingeridas en cada tratamiento tienen una composición muy diferente de ácidos grasos y una distribución posicional también muy distinta y, por lo tanto, era de esperar una gama de estructuras de triglicéridos diferentes. Se quiso comprobar tanto la distribución posicional de ácidos grasos, las propiedades reológicas de la grasa y el posible efecto sobre ellas que pudiera tener la distinta alimentación.

5.3.2.1 Efectos sobre la distribución posicional de ácidos grasos.

En los tres experimentos mencionados, se ha podido comprobar que el C16:0 se localiza principalmente en sn-2 mientras que el C18:0 esterifica a sn-1,3 del triglicérido. Los ácidos grasos mono (principalmente C18:1n-9) y poliinsaturados (principalmente C18:2n-6) se localizan preferentemente en posiciones externas (Figura 5.4). Es conocido que los ácidos grasos no esterifican de forma aleatoria los grupos hidroxilo del glicerol en grasas animales. En contraste con otras especies, la posición sn-2 del triglicérido en grasa de cerdo y en leche materna, tanto de cerdos como de humanos, está ocupada principalmente por C16:0 (Christie y Moore 1970; Innis y Nelson 2013) al igual que los triglicéridos analizados de plasma y leche de rata y coneja (Christie, 1985).

Aunque se trata de una comparación en la que están involucradas las variables dieta, sexo, raza, localización anatómica y producto crudo o curado, en la Figura 3.2 se puede apreciar a grandes rasgos que existe una diferencia muy considerable entre la distribución posicional de ácidos grasos de la grasa de jamón curado y las grasas frescas aunque sigue manteniéndose la relación de concentraciones en sn-2 $C16:0 > C18:1n-9 > C18:0 \sim C18:2n-6$.

Si bien es cierto que no son realmente comparables las distribuciones posicionales del experimento 1 y 2 por tratarse de diferente localización anatómica (grasa dorsal y grasa a la altura del *bíceps femoris*), se trata del mismo tejido adiposo y autores como Domínguez et al. (2014) y Franco et al. (2006) han observado que como máximo la diferencia a ese nivel es como máximo de 1-2% en ácidos grasos como C18:1n-9 y/o C18:2n-6. Por lo tanto, las diferencias mayores se podrían atribuir a procesos de oxidación y lipólisis ocurridos durante el curado. En este contexto, se ha podido deducir que el proceso de curado produce una modificación sustancial de la distribución de ácidos grasos. Fundamentalmente se ha observado una disminución muy destacable de ácido linoleico total tras el proceso de curado y centrado sobre todo en las posiciones externas del triglicérido y una recolocación de ácido palmítico desde sn-2 a sn-1,3. Estos procesos coinciden con la descripción de Narváez-Rivas et al (2007), Raclot (2003) y Vestergaard et al. (1999) que concluyen que, si bien las enzimas lipolíticas actúan sobre las posiciones 1 y 3 del triglicérido, existe cierto control hacia la hidrólisis previa de triglicéridos más polares (más insaturados); de ahí la disminución de C18:2n-6, y, tras la primera hidrólisis, si las condiciones son las adecuadas, se produce una traslocación del ácido graso presente en posición 2 hacia una posición externa. Este hecho conduciría a la reubicación fundamentalmente del C16:0, al ser el mayoritario en sn-2 y por su menor peso molecular, que favorece su movilidad.

En los dos primeros trabajos experimentales (capítulos 5 y 6 del apartado de resultados) se ha podido comprobar que la utilización de glicerol en la dieta no produce modificación en la distribución posicional de ácidos grasos en la grasa subcutánea. No existe información previa al respecto, por lo que estos resultados apoyan las conclusiones de los recientes trabajos de Linares et al. (2014) y Orengo et al. (2014) que afirman que el glicerol puede utilizarse en alimentación porcina sin alteraciones en la calidad de la grasa del cerdo.

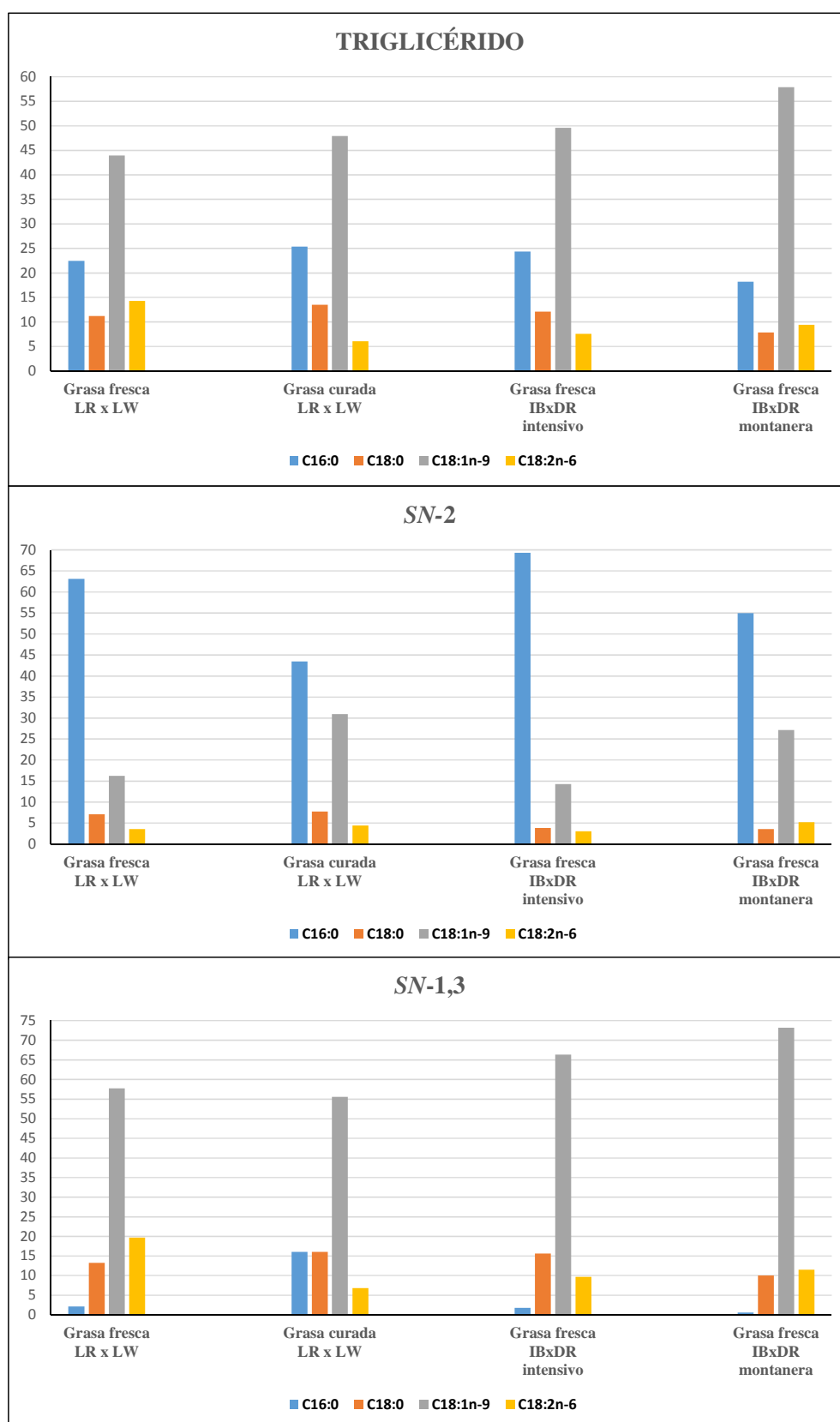
Por otra parte, en estas experiencias también se ha comprobado que la utilización de aceite de palma o manteca provoca pequeñas modificaciones en los ácidos grasos localizados en sn-1,3. En concreto, la utilización de palma como fuente de grasa en la dieta produce una tendencia a acumular mayor cantidad de ácidos grasos saturados (principalmente esteárico) en posiciones externas del

triglicérido (Figura 5.4). Tampoco existe bibliografía sobre esta cuestión aunque, King et al. (2004) concluyó que en cerdos alimentados con dietas enriquecidas con ácido linoleico conjugado se producía un aumento de ácidos grasos saturados (posiblemente por inhibición de enzimas desaturadas) en posiciones sn-1,3.

Por último, el desarrollo del tercer trabajo experimental (capítulo 7 del apartado de resultados) ha permitido observar que al suministrar una dieta rica en ácido oleico, (administrado como aceite de girasol alto oleico, con cerca del 62% del total de éste ácido distribuido con un ligero exceso en posición externa del triglicérido), se produce un aumento de la concentración de dicho ácido en posiciones sn-1,3 del triglicérido (Figura 5.4). Sin embargo, cuando el sistema de alimentación fue la montanera, que incluye alimentación fundamentalmente por bellotas (que también tienen aproximadamente un 62% de concentración total de oleico pero con exceso en sn-2), y hierba se produce un gran aumento de C18:1n-9 en posición sn-2. En la Figura 5.4 también se pueden observar diferencias sustanciales entre cerdo blanco e ibérico cruzado, en relación con una menor concentración de esteárico en estos últimos, localizada principalmente en sn-2. Estos resultados están en consonancia con los hallazgos de Barea et al. (2013), Ventanas et al. (2007), Muriel et al. (2002) o Isabel et al. (2003) y ponen de manifiesto el papel de la genética en la distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicéridos.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que las intervenciones sobre la grasa de la dieta puede modificar la ubicación de los ácidos grasos en las posiciones externas del triglicérido. Sin embargo, la posición sn-2 está sometida a un elevado control metabólico, no obstante, cuando el suministro de ácido oleico es muy elevado, y especialmente cuando se encuentra en la posición sn-2 de un triglicérido, se puede llegar a producir modificaciones de la concentración en sn-2. Por otra parte, el proceso de curado y la genética son también factores que pueden alterar la distribución posicional. Somos conscientes que con el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han dado los primeros pasos en un campo de investigación en el que es necesario seguir trabajando para esclarecer el papel de factores genéticos y metabólicos y determinar su potencial para la producción animal y la obtención de canales más saludables y con un mejor comportamiento tecnológico.

Figura 5.4. Análisis global de los distintos perfiles de distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de triglicéridos (promedio) obtenidos en los distintos trabajos experimentales realizados.



5.3.2.2 Efecto sobre el punto de deslizamiento.

En el análisis conjunto de los resultados obtenidos, no se han detectado diferencias significativas en el punto de fusión de la grasa, tanto fresca como procedente del producto curado, debidas al sexo o a la dieta (palma *vs* manteca y sus combinaciones con glicerol). En la grasa fresca el punto de fusión varió dentro del intervalo 27.9-28.3 °C, mientras que en la grasa de jamón curado el intervalo de valores estuvo comprendido entre 28.4 y 29.6 °C. Diversos autores, como Daza et al. (2009), López-Bote et al. (2002) y Olivares et al. (2010), ya habían comprobado que las variaciones en ácidos grasos producidas en la capa de grasa más externa por la fuente de grasa de la dieta no son suficientes para producir modificaciones notorias en el punto de fusión. En la grasa de jamón curada analizada en el segundo trabajo de la presente Tesis Doctoral se han encontrado interacciones entre el sexo y la fuente de grasa de la dieta y entre la fuente de grasa y el glicerol incorporado en la dieta. Las hembras alimentadas con aceite de palma mostraron mayores valores de punto de fusión que los machos mientras que en los cerdos alimentados con manteca el comportamiento fue opuesto. Por otra parte, los cerdos alimentados con palma mostraron grasa con menor punto de fusión que los alimentados con palma y glicerol. Sin embargo, cuando los animales fueron alimentados con manteca el resultado fue contrario. Isabel et al. (2003) encontraron un aumento del punto de fusión de la grasa cuando se sustituía una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados por una rica en ácidos grasos monoinsaturados y Wood et al. (2008) ya concluyeron que mayor proporción de C18:0 en el tejido y menor de C18:2n-6 conducía a mayores puntos de fusión.

Es interesante destacar que el curado es el proceso que mayor cambio ha incluido en la estructura de los triglicéridos. La determinación del punto de deslizamiento de la fracción de triglicérido aislada condujo a valores entre 26.6 y 28.1 °C, existiendo únicamente diferencias significativas para la grasa de cerdos alimentados con palma, que mostraron el mayor valor, y cuyo triglicérido contenía mayor concentración de C18:0 en posiciones externas. La diferencia existente entre el punto de fusión del triglicérido aislado y el del conjunto del tejido adiposo indica que los ácidos grasos libres, mono y diglicéridos formados durante el proceso de curado también tienen un papel importante y activo en la consistencia de la grasa y, por tanto en el valor del punto de fusión, como se ha observado.

En el trabajo realizado con cerdo ibérico, se ha podido comprobar que, si bien es cierto que el aumento de ácidos grasos insaturados disminuye el punto de fusión de la grasa, es necesaria una variación de la distribución posicional de ácidos grasos de mayor magnitud para provocar un cambio significativo en el valor del mismo.

No hay que olvidar que la grasa subcutánea está compuesta por adipocitos separados por una red de tejido conectivo, formado predominantemente por fibras de colágeno y pequeñas cantidades de fibras elásticas y reticulares (Sumena et al., 2010). Este aspecto se encuentra actualmente en estudio ya que a la vista de los resultados estas fibras, aunque se encuentran en una concentración minoritaria, muy probablemente también juegan un papel fundamental en la percepción punto de fusión.

5.3.2.3 Efecto sobre el perfil de textura.

El análisis del perfil de textura se realizó en muestras de grasa de jamón curado de cerdo blanco (capítulo 6 del apartado de resultados) y en grasa dorsal fresca de cerdo ibérico (capítulo 7 del apartado de resultados). La finalidad de estos estudios no fue tanto el obtener un conjunto de valores de dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad como el poder comprobar que mediante distintas estrategias nutricionales es posible cambiar la distribución posicional de ácidos grasos en los triglicéridos constituyentes de la grasa y, por consiguiente, modificar su comportamiento reológico.

Previamente ya se ha discutido la relación encontrada entre la dureza y la adhesividad con la distribución posicional de los ácidos grasos en los triglicéridos de la grasa subcutánea de jamón curado de cerdo blanco. Los modelos obtenidos en este caso presentaron coeficientes de determinación (R^2) con valores no superiores a 0.6. En el trabajo experimental con cerdos ibéricos (capítulo 7 del apartado de resultados) es en el que se ha observado con mayor claridad cómo las modificaciones de los ácidos grasos ubicados en las posiciones externas del triglicérido, inducidas por la dieta (aumento de C18:1n-9), se traducen en una disminución de la dureza. Sin embargo, el cambio producido en la posición sn-2 en los cerdos ibéricos de montanera (aumento de C18:1n-9) se traduce en una apreciable disminución de la adhesividad. En el caso de la cohesividad y la elasticidad, ya se había comprobado que la relación

y dependencia de los ácidos grasos era mucho menor. Cabe suponer que estas dos propiedades presenten una mayor dependencia del grado de desarrollo de las fibras de colágeno en el tejido adiposo, asociado al peso y edad de los animales de los que procedía el producto. Conforme aumenta la edad de sacrificio del animal, la red de tejido conectivo se hace más densa y el colágeno se vuelve más insoluble (Gerrard y Grant, 2003; Fang et al., 1999), aumentando así la resistencia de las estructuras.

En el caso de la grasa de jamón curado, la mayor dureza apreciada en la grasa de los cerdos alimentados con palma coincide con la presencia de mayor concentración de C18:0. Sin embargo, en este estudio lo más remarcable fue la variación que sufrieron las propiedades reológicas debido a la inclusión de glicerol en la dieta. Este efecto requiere mayores ya que, si bien existe bibliografía sobre el papel de la ingesta de glicerol en los músculos y en la carne cruda, no se han encontrado referencias sobre los cambios en la grasa de productos frescos o curados asociados a su inclusión en la dieta. Cabe añadir que existe cierta controversia sobre el efecto del consumo de glicerol en el musculo—Aunque la mayoría de los autores coinciden en que no se producen cambios significativos en parámetros de calidad de la carne (Linares et al., 2014) o en el perfil de textura (Schieck et al. 2010), otros investigadores, como Lammers et al. (2008) o De la Casa et al. (2009) han detectado un pequeño aumento de la terneza de la carne. En la mayoría de los estudios se ha detectado que el pH y la capacidad de retención de agua de la carne tienden a incrementarse cuando el glicerol es incluido en la dieta del animal (Mourot et al., 1994). Todo parece indicar que el consumo de este compuesto produce una hiperhidratación del tejido muscular, que se ha asociado a modificaciones de las propiedades osmóticas del mismo. A la luz de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral barajamos dos hipótesis para explicar los resultados obtenidos: la primera basada en que la mayor retención de agua podría haber permitido durante el proceso de curado una actividad proteolítica más prolongada en el tiempo y, una segunda centrada en la posibilidad de que la teórica hiperhidratación del tejido pudiera haber conducido a diferente disposición y desarrollo de la red de tejido conectivo, que su vez podría ser afectada de distinta forma durante el proceso de curado. En ambos caso, sería factible la reducción de las propiedades de textura que se ha detectado.

6 . CONCLUSIONES .

1. Gran parte de la variabilidad encontrada en la cuantificación de la grasa intramuscular se debe al procedimiento analítico empleado, pudiéndose reducir el coeficiente de variación desde un 30% hasta un 15% modificando las condiciones de muestreo y determinación.

2. La liofilización de muestras procedentes del corte transversal de músculo *Longissimus dorsi*, su posterior homogeneizado, extracción sucesiva con una mezcla diclorometano:metanol (8/2 v/v) y centrifugación minimizan la variabilidad, el tiempo de análisis y el gasto de disolventes en la cuantificación de grasa intramuscular. Esta forma de proceder se integra en el diseño de un nuevo método de determinación de esta fracción lipídica.

3. El empleo de lipasa pancreática, separación por cromatografía de capa fina de tri-, di- y monoglicéridos, metilación en medio ácido y posterior identificación de los ácidos grasos presentes por cromatografía de gases es un procedimiento fácilmente reproducible y preciso para la estimación de la distribución posicional de ácidos grasos en la grasa de porcino.

4. La distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido modifica el comportamiento reológico de la grasa subcutánea de jamón curado de la siguiente forma:

a) El punto de fusión de la grasa aumenta cuando en la posición interna se ubica principalmente el ácido palmítico y en las externas se combinan los ácidos palmítico y esteárico. Sin embargo, la presencia de ácido oleico en estas últimas posiciones lo disminuye.

b) La dureza de la grasa depende fundamentalmente de las posiciones externas y se encuentra incrementada cuando aumenta el grado de saturación y longitud de la cadena de los ácidos grasos presentes.

c) La adhesividad de la grasa se incrementa con el grado de saturación de los ácidos grasos ubicados en la posición interna.

5. La inclusión en el pienso de la última fase del cebo del cerdo de grasas con similar perfil de ácidos grasos pero diferente reparto de los mismos en la molécula de triglicérido (palma vs manteca)

produce la reorganización posicional de este mismo componente de la grasa subcutánea del animal, especialmente de las posiciones externas.

6. El proceso seguido para la producción de jamón curado produce una translocación de los ácidos grasos en la molécula de triglicérido de la grasa subcutánea reduciéndose en posición interna la concentración de ácido palmítico y aumentando la de oleico. No obstante, el comportamiento reológico de la grasa de jamón curado se relaciona con el tipo de grasa (manteca vs palma) utilizado en la alimentación en la última fase del cebo de los animales empleados para su producción, con mayor dureza en los productos procedentes del uso de aceite de palma frente a los derivados de la dieta con manteca. La inclusión de glicerol en el pienso reduce la dureza, adhesividad, elasticidad y gomosidad de los productos.

7. La alimentación de cerdos Ibéricos en la última etapa de cebo con piensos con aceite de girasol alto oleico incrementa la concentración de este ácido graso en las posiciones externas de la molécula de triglicérido de la grasa subcutánea y reduce la dureza, la adhesividad y el punto de fusión de este tejido.

8. La grasa subcutánea de los cerdos Ibéricos alimentados en montanera presentan mayor contenido de ácido oleico en las posiciones externas e interna de la molécula de triglicérido así como valores más bajos de dureza, adhesividad y punto de fusión que el mismo tejido de los animales alimentados con pienso.

Conclusión final:

Las variaciones convencionales de la fuente de grasa del pienso en la etapa de cebo conducen a reordenación o modificación de la concentración de ácidos grasos en posiciones externas de la molécula del triglicérido en la grasa subcutánea, la posición sn-2 parece tener una mayor regulación metabólica. La utilización de montanera como sistema de producción y/o el proceso de curado sí que lograron una modificación de la distribución posicional de ácidos grasos tanto en posición sn-2 como en sn-1,3. Las variaciones en la concentración de ácidos grasos conllevaron modificaciones en el comportamiento reológico de la grasa subcutánea estudiada.

7 . REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .

- Akesson, B., Gronowitz, S., Herslof, B., & Ohlson, R. (1978). Absorption of synthetic, stereochemically defined acylglycerols in rat. *Lipids*, 13(5), 338-343.
- Alonso, V., Campo, M. d. M., Espanol, S., Roncales, P., & Beltran, J. A. (2009). Effect of crossbreeding and gender on meat quality and fatty acid composition in pork. *Meat Science*, 81(1), 209-217.
- Andrikopoulos, N. K. (2002). Chromatographic and spectroscopic methods in the analysis of triacylglycerol species and regiospecific isomers of oils and fats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(5), 473-505.
- Apgar, J. L., Shively, C. A., & Tarka, S. M. (1987). Digestibility of cocoa butter and corn-oil and their influence on fatty-acid distribution in rats. *Journal of Nutrition*, 117(4), 660-665.
- Asghar, A., Gray, J. I., Buckley, D. J., Pearson, A. M., & Booren, A. M. (1988). Perspectives on warned-over flavor. *Food Technology*, 42(6), 102-108.
- Ayuso, D., Gonzalez, A., Hernandez, F., Corral, J. M., & Izquierdo, M. (2013). Prediction of carcass composition, ham and foreleg weights, and lean meat yields of Iberian pigs using ultrasound measurements in live animals. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1884-1892.
- Barea, R., Isabel, B., Nieto, R., Lopez-Bote, C., & Aguilera, J. F. (2013). Evolution of the fatty acid profile of subcutaneous back-fat adipose tissue in growing Iberian and Landrace X Large White pigs. *Animal*, 7(4), 688-698.
- Bartley, J. A., & Ward, R. (1985). Glycerol kinase-deficiency inhibits glycerol utilization in phosphoglyceride and triacylglycerol biosynthesis. *Pediatric Research*, 19(3), 313-314.
- Barton-gade, P. A. (1987). Meat and fat quality in boars, castrates and gilts. *Livestock Production Science*, 16(2), 187-196.
- Bauer, E., Jakob, S., & Mosenthin, R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(2), 282-295.

Bee, G., Gebert, S., & Messikommer, R. (2002). Effect of dietary energy supply and fat source on the fatty acid pattern of adipose and lean tissues and lipogenesis in the pig. *Journal of Animal Science*, 80(6), 1564-1574.

Bell, R. R., Spencer, M. J., & Sherriff, J. L. (1995). Diet-induced obesity in mice can be treated without energy restriction using exercise and/or a low-fat diet. *Journal of Nutrition*, 125(9), 2356-2363.

Bejerholm, C. y Barton-Grade, P.A. 1986. Effect of intramuscular fat level on eating quality of pig meat. In: 32nd European Meeting of Meat Research Workers. Ghent, p 389- 391.

Bird, R. B., Stewart, W. E., & Lightfoot, E. N. Fenómenos de transporte. Ed. Reverté, 1998,

Black, D. D. (2007). Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(3), G519-G524.

Blanchard, P. J., Ellis, M., Warkup, C. C., Hardy, B., Chadwick, J. P., & Deans, G. A. (1999). The influence of rate of lean and fat tissue development on pork eating quality. *Animal Science*, 68, 477-485.

Blanchard, P. J., Warkup, C. C., Ellis, M., Willis, M. B., & Avery, P. (1999). The influence of the proportion of Duroc genes on growth, carcass and pork eating quality characteristics. *Animal Science*, 68, 495-501.

Blasco, A. (1996). La base animal en las explotaciones porcinas intensivas. In: Buxadé, C (Ed). Zootecnia, bases de producción animal. Tomo VI, Porcinocultura intensiva y extensiva. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España, pp. 51-54.

Blasco, A., Gou, P., Gispert, M., Estany, J., Soler, Q., Diestre, A., & Tibau, J. (1994). Comparison of 5 types of pig crosses. 1. Growth and carcass traits. *Livestock Production Science*, 40(2), 171-178.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.

- Bottino, N. R., Vandenberg, & Reiser, R. (1967). Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase. *Lipids*, 2(6), 489-493.
- Boulard, J., Bouyssiére, M., Chevillon, P., Kerisit, R. y Jossec, P. (1995) *Techni-Porc* pp: 21-31.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32(7), 62-66.
- Bourne, M. C. (2002). Food texture and viscosity: concept and measurement. Academic Press, New York. USA
- Bracco, U. (1994). Effect of triglyceride structure on fat absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60(6), 1002S-1009S.
- Brenner, R. R. (1984). Effect of unsaturated-acids on membrane-structure and enzyme-kinetics. *Progress in Lipid Research*, 23(2), 69-96.
- Brouns, F., & van der Vusse, G. J. (1998). Utilization of lipids during exercise in human subjects: metabolic and dietary constraints. *British Journal of Nutrition*, 79(2), 117-128.
- Bruna, J. M., Fernández, M., Hierro, E. M., Ordoñez, J. A., & de la Hoz, L. (2000). Combined use of pronase E and a fungal extract (*Penicillium aurantiogriseum*) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat Science*, 54 (2), 135– 145.
- Buckley, D. J., Gray, J. I., Asghar, A., Price, J. F., Crackel, R. L., Booren, A. M., Pearson, A. M., & Miller, E. R. (1989). Effects of dietary antioxidants and oxidized oil on membranal lipid stability and pork quality. *Journal of Food Science*, 54(5), 1193-1197.
- Buchgraber, M., Ullberth, F., Emons, H., & Anklam, E. (2004). Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(9), 621-648.

Camara, M., Mourot, J., & Fevrier, C. (1996). Influence of two dairy fats on lipid synthesis in the pig: Comparative study of liver, muscle and the two-backfat layers. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 40(5), 287-295.

Carey, M. C., & Small, D. M. (1972). Micelle formation by bile salts – physical-chemical and thermodynamic considerations. *Archives of Internal Medicine*, 130(4), 506-527.

Carrión, D., Gispert, M., Fornos, J., & Plastow, G. (2002). Effect of melanocortin-4 receptor (MC4R) genotype on fat composition of Duroc-crossed slaughter pigs. 48th International Congress of Meat Science and Technology, 610-611

Cequier-Sanchez, E., Rodriguez, C., Ravelo, A. G., & Zarate, R. (2008). Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4297-4303.

Chang, S., Graham, B., Yakubu, F., Lin, D., Peters, J. C., & Hill, J. O. (1990). Metabolic differences between obesity-prone and obesity-resistant rats. *American Journal of Physiology*, 259(6), R1103-R1110.

Cheng, B., Karamizrak, O., Noakes, T. D., Dennis, S. C., & Lambert, E. V. (1997). Time course of the effects of a high-fat diet and voluntary exercise on muscle enzyme activity in Long-Evans rats. *Physiology & Behavior*, 61(5), 701-705.

Christie, W. W. (1985). Structure of the triacyl-sn-glycerols in the plasma and milk of the rat and rabbit. *Journal of Dairy Research*, 52(1), 219-222.

Christie, W. W. (1993). W. W. Christie (Ed.), *Advances in lipid methodology*, vol. 2 (pp. 69-111). Bridgwater: Oily Press.

Christie, W. W., & Clapperton, J. L. (1982). Structures of the triglycerides of cow's milk, fortified milks (including infant formulas), and human milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 35(1), 22-24.

Christie, W. W., Dobson, G., & Adlof, R. O. (2007). A practical guide to the isolation, analysis and identification of conjugated linoleic acid. *Lipids*, 42(12), 1073-1084.

Christie, W.W., & Han, X. (2010). *Lipid Analysis: isolation, separation, identification and Lipidomic Analysis*. Oily Press.

Christie, W. W., & Moore, J. H. (1970a). A comparison of structures of triglycerides from various pig tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 210(1), 46-56.

Christie, W. W., & Moore, J. H. (1970b). Variation of triglyceride structure with fatty acid composition in pig adipose tissue. *Lipids*, 5(11), 921-&.

Christie, W. W., Nikolovadamyanova, B., Laakso, P., & Herslof, B. (1991). Stereospecific analysis of triacyl-sn-glycerols via resolution of diastereomeric diacylglycerol derivatives by high-performance liquid-chromatography on silica. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(10), 695-701.

Chwalibog, A., & Thorbek, G. (1995). Quantitative partition of protein carbohydrate and fat pools in growing pigs. *Archives of Animal Nutrition-Archiv Fur Tierernahrung*, 48(1-2), 53-61.

Crawford, M.A., Hare, W.R. y Whitehouse, D.B. (1984) Nutrient partitioning in domesticated and non-domesticated animals. En: *Fats in Animal Nutrition*. Wiseman, J. (Ed). Butterworths. London, UK.

Cook, H.W. (1985) Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes. En: *Biochemistry of lipids and membranes*, pp. 181-212 Vance, D.E. y Vance, J.E. (ed.), Benjamin-Cummings Publishing Company Inc Menlo Park, California, US.

Davidson, N. O., Magun, A.M., Glickman, R.M. (1991). Enterocyte lipid absorption and secretion. In M. Field, Fizzell. R.A. (Ed.), *Handbook of Physiology.*, vol. IV: Intestinal absorption and secretion. (pp. 505-587). Bethesda, Maryland, US: American Physiological Society.

Daza, A & Mateos, A. (2004). Situación del sector porcino en España: importancia de la calidad. *Porci*, 84, 7-13.

Daza, A., Menoyo, D., & Bote, C. J. L. (2009). Carcass Traits and Fatty Acid Composition of Subcutaneous, Intramuscular and Liver Fat from Iberian Pigs Fed in Confinement only with Acorns or a Formulated Diet. *Food Science and Technology International*, 15(6), 563-569.

De la Hoz, L., D' Arrigo, M., Cambero, M. I., & Ordoñez, J. A. (2004). Development of an n-3 fatty acid and α -tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67 (3), 485–495.

De Vries, A. G., Van Der Wal, P. G., Eikelenboom, G., & Merks, J. W. M. (1992). Genetics parameters for pig meat quality. *Proceedings of the Australian Association of Animal Breeding and Genetics*, 10, 320-324.

De Vries, A. G., Van Der Wal, P. G., Eikelenboom, G., & Merks, J. W. M. (1994). Pork quality: only 20% genetic influence? *Pigs Misset*, 10, 14-15.

Della Casa, G., Bochicchio, D., Faeti, V., Marchetto, G., Poletti, E., Rossi, A., Garavaldi, A., Pandroli, A., & Brogna, N. (2009). Use of pure glycerol in fattening heavy pigs. *Meat Science*, 81(1), 238-244.

Denke, M. A., Fox, M. M., & Schulte, M. C. (1993). Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat-content and reduces serum-lipids in men. *Journal of Nutrition*, 123(6), 1047-1053.

Deschrijver, R., Vermeulen, D., & Backx, S. (1991). Digestion and absorption of free and esterified fish oil fatty acids in rats. *Lipids*, 26(5), 400-404.

Deschrijver, R., Vermeulen, D., & Viaene, E. (1991). Lipid-metabolism responses in rats fed beef tallow, native or randomized fish oil and native or randomized peanut oil. *Journal of Nutrition*, 121(7), 948-955.

Diaz, I., Regueiro, J. A. G., Casillas, M., & DePedro, E. (1996). Triglyceride composition of fresh ham fat from Iberian pigs produced with different systems of animal nutrition. *Food Chemistry*, 55(4), 383-387.

Dobson, G., & Christie, W. W. (2002). Mass spectrometry of fatty acid derivatives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(1), 36-43.

Dominguez, R., Martinez, S., Carballo, J., & Franco, I. (2014). Fatty acid profile and cholesterol and retinol contents in different locations of Celta pig breed. *Grasas y Aceites*, 65(3).

Doppenberg, J., & Van der Aar, P. (2007). Biofuels: implications for the feed industry, pp-1-10.

Drynan, L., Quant, P. A., & Zammit, V. A. (1996). The role of changes in the sensitivity of hepatic mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase in determining the onset of the ketosis of starvation in the rat. *Biochemical Journal*, 318, 767-770.

Dunstan, G. A., Volkman, J. K., & Barrett, S. M. (1993). The effect of lyophilization on the solvent-extraction of lipid classes, fatty acids and sterols from the oyster *crassostrea-gigas*. *Lipids*, 28(10), 937-944.

Duran-Montge, P., Realini, C. E., Barroeta, A. C., Lizardo, R., & Esteve-Garcia, E. (2008). Tissue fatty acid composition of pigs fed different fat sources. *Animal*, 2(12), 1753-1762.

Edwards, S. A., Wood, J. D., Moncrieff, C. B., & Porter, S. J. (1992). Comparison of the duroc and large white as terminal sire breeds and their effect on pigmeat quality. *Animal Production*, 54, 289-297.

Enser, M. (1984). The chemistry, biochemistry and nutritional importance of animal fats. In J. Wiseman (Ed.), *Fats in animal nutrition*, (pp. 23-52.). UK. Butterworths London.

Essengustavsson, B., Karlstrom, K., & Lundstrom, K. (1992). Muscle-fiber characteristics and metabolic response at slaughter in pigs of different halothane genotypes and their relation to meat quality. *Meat Science*, 31(1), 1-11.

Estevez, M., Morcuende, D., & Lopez, R. C. (2003). Physico-chemical characteristics of M-Longissimus dorsi from three lines of free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live-weight and commercial pigs: a comparative study. *Meat Science*, 64(4), 499-506.

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46(5), 839-861.

Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M. J. O., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50, S9-S14.

Fang, S. H., Nishimura, T., & Takahashi, K. (1999). Relationship between development of intramuscular connective tissue and toughness of pork during growth of pigs. *Journal of Animal Science*, 77(1), 120-130.

Faucitano, L., Rivest, J., Daigle, J. P., Levesque, J., & Gariépy, C. (2004). Distribution of intramuscular fat content and marbling within the longissimus muscle of pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(1), 57-61.

Fernandez, X., Monin, G., Talmant, A., Mourot, J., & Lebret, B. (1999). Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat - 1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum. *Meat Science*, 53(1), 59-65.

Fielding, B. A., & Frayn, K. N. (1998). Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 80(6), 495-502.

Flachowsky, G., Schulz, E., Kratz, R., & Glodek, P. (2008). Effects of different dietary fat sources on the fatty acid profile of backfat and intramuscular fat of pigs of various sire breeds. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17(3), 363-371.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.

Franco, D., Antonio Vazquez, J., & Manuel Lorenzo, J. (2014). Growth performance, carcass and meat quality of the Celta pig crossbred with Duroc and Landrance genotypes. *Meat Science*, 96(1), 195-202.

Freeman, C.P. (1984) The digestion absorption and transport of fats-non ruminants. En: Fats in animal nutrition, pp.: 23-51. Wiseman J. (ed.) Butterworths, London, UK.

Fuchs, B., Suess, R., Teuber, K., Eibisch, M., & Schiller, J. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2754-2774.

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

Garnier, J. P., Klont, R., & Plastow, G. (2003). The potential impact of current animal research on the meat industry and consumer attitudes towards meat. *Meat Science*, 63(1), 79-88.

Garton, G. A., & Duncan, W. R. H. (1954). Dietary fat and body fat - the composition of the back fats of pigs fed on a diet rich in cod-liver oil and lard. *Biochemical Journal*, 57(1), 120-125.

Gerbens, F., Rettenberger, G., Lenstra, J. A., Veerkamp, J. H., & tePas, M. F. W. (1997). Characterization, chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene. *Mammalian Genome*, 8(5), 328-332.

Gerrard, D. E., & Grant. A. L. (2003). Principles of animal growth and development, Kendall/Hunt Publishing.

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

Glaser, K. R., Wenk, C., & Scheeder, M. R. L. (2004). Evaluation of pork backfat firmness and lard consistency using several different physicochemical methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(8), 853-862.

Golding, M., & Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 90-101.

Gonzalez-Baro, M. R., Lewin, T. M., & Coleman, R. A. (2007). Regulation of triglyceride metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(5), G1195-G1199.

Gouk, S. W., Cheng, S. F., Mok, J. S. L., Ong, A. S. H., & Chuah, C. H. (2013). Long-chain SFA at the sn-1, 3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. *British Journal of Nutrition*, 110(11), 1987-1995.

Guerrero, L., Gou, P., Alonso, P., & Arnau, J. (1996). Study of the physicochemical and sensorial characteristics of dry-cured hams in three pig genetic types. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(4), 526-530.

Hanson, R. W., & Ballard, F. J. (1967). Relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. *Biochemical Journal*, 105(2), 529-&.

Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49(4), 447-457.

Horwitt, M. K. (1986). Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin-tryptophan, and vitamin-e plus comments on balance studies and vitamin-b6. *American Journal of Clinical Nutrition*, 44(6), 973-985.

Houben, J. H., & Krol, B. (1980). Acceptability and storage stability of port products with increased levels of polyunsaturated fatty acids. *Meat Science*, 5(1), 57-70.

Hrdinka, C., Zollitsch, W., Knaus, W., & Lettner, F. (1996). Effects of dietary fatty acid pattern on melting point and composition of adipose tissues and intramuscular fat of broiler carcasses. *Poultry Science*, 75(2), 208-215.

Huang, H., Liu, L., Ngadi, M. O., & Garipey, C. (2014). Rapid and non-invasive quantification of intramuscular fat content of intact pork cuts. *Talanta*, 119, 385-395.

Hugo, A., & Roodt, E. (2007). Significance of porcine fat quality in meat technology: A review. *Food Reviews International*, 23(2), 175-198.

Hunter, J. E. (2001). Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids*, 36(7), 655-668.

Hussain, M. M. (2014). Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Current Opinion in Lipidology*, 25(3), 200-206.

Ikeda, I., Sasaki, E., Yasunami, H., Nomiya, S., Nakayama, M., Sugano, M., Imaizumi, K., & Yazawa, K. (1995). Digestion and lymphatic transport of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids given in the form of triacylglycerol, free acid and ethyl ester in rats. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1259(3), 297-304.

Innis, S. M. (2011). Dietary Triacylglycerol Structure and Its Role in Infant Nutrition. *Advances in Nutrition*, 2(3), 275-283.

Innis, S. M., Dyer, R., Quinlan, P., & Diersenschade, D. (1995). Palmitic acid is absorbed as sn-2 monopalmitin from milk and formula with rearranged triacylglycerols and results in increased plasma triglyceride sn-2 and cholesteryl ester palmitate in piglets. *Journal of Nutrition*, 125(1), 73-81.

Innis, S. M., & Nelson, C. M. (2013). Dietary triacylglycerols rich in sn-2 palmitate alter postprandial lipoprotein and unesterified fatty acids in term infants. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89(4), 145-151.

Iqbal, J., & Hussain, M. M. (2009). Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(6), E1183-E1194.

Isabel, B., Lopez-Bote, C. J., de la Hoz, L., Timon, M., Garcia, C., & Ruiz, J. (2003). Effects of feeding elevated concentrations of monounsaturated fatty acids and vitamin E to swine on characteristics of dry cured hams. *Meat Science*, 64(4), 475-482.

ISO 5492-2008 Sensory analysis – Vocabulary.

ISO 6321:2002. 2002. Animal and vegetable fats and oils - Determination of melting point in open capillary tubes (slip point), Second edition. pp 2–15.

Iverson, S. J., Lang, S. L. C., & Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36(11), 1283-1287.

Jorgensen, H., & Fernandez, J. A. (2000). Chemical composition and energy value of different fat sources for growing pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science*, 50(3), 129-136.

Jorgensen, H., Jensen, S. K., & Eggum, B. O. (1996). The influence of rapeseed oil on digestibility, energy metabolism and tissue fatty acid composition in pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science*, 46(2), 65-75.

Kalo, P. J., & Kempainen, A. (2012). Regiospecific analysis of TAGs using chromatography, MS, and chromatography-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(4), 399-411.

Kato, T., Hayashi, Y., Inoue, K., & Yuasa, H. (2005). Glycerol absorption by Na⁺-dependent carrier-mediated transport in the closed loop of the rat small intestine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(3), 553-555.

Kijora, C., Bergner, H., Kupsch, R. D., & Hagemann, L. (1995). Glycerol as a feed component in diets of fattening pigs. *Archives of Animal Nutrition-Archiv Fur Tierernahrung*, 47(4), 345-360.

Kijora, C., & Kupsch, R. D. (1996). Evaluation of technical glycerols from "Biodiesel" production as a feed component in fattening of pigs. *Fett-Lipid*, 98(7-8), 240-245.

Kijora, C., Kupsch, R. D., Bergner, H., Wenk, C., & Prabucki, A. L. (1997). Comparative investigation on the utilization of glycerol, free fatty acids, free fatty acids in combination with glycerol and vegetable oil in fattening of pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition-Zeitschrift Fur Tierphysiologie Tierernahrung Und Futtermittelkunde*, 77(3), 127-138.

Kindel, T., Lee, D. M., & Tso, P. (2010). The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. *Atherosclerosis Supplements*, 11(1), 11-16.

King, D. A., Behrends, J. M., Jenschke, B. E., Rhoades, R. D., & Smith, S. B. (2004). Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols from subcutaneous adipose tissue of pigs fed diets enriched with conjugated linoleic acid, corn oil, or beef tallow. *Meat Science*, 67(4), 675-681.

Kouba, M., Bonneau, M., & Noblet, J. (1999). Relative development of subcutaneous, intermuscular, and kidney fat in growing pigs with different body compositions. *Journal of Animal Science*, 77(3), 622-629.

Kouba, M., & Sellier, P. (2011). A review of the factors influencing the development of intermuscular adipose tissue in the growing pig. *Meat Science*, 88(2), 213-220.

Krogdahl, A. (1985). Digestion and absorption of lipids in poultry. *Journal of Nutrition*, 115(5), 675-685.

Lammers, M., Dietze, K., & Ternes, W. (2011). Headspace volatiles of dry-cured ham: a comparison of different manufacturing styles by spme and gc/ms analysis. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(6), 850-860.

Lammers, P., Kerr, B., Weber, T., Dozier, W., Kidd, M., Bregenhahl, K., & Honeyman, M. (2007). Energy value of crude glycerol in 11 and 110 kg pigs. In I. OrtiguesMarty (Ed.), *Energy and Protein Metabolism and Nutrition*, (pp. 623-624).

Lammers, P. J., Honeyman, M. S., Kerr, B. J., Weber, T. E., & Bregendahl, K. (2007). Growth performance and carcass characteristics of growing pigs fed crude glycerol. *Journal of Animal Science*, 85, 508-508.

Lammers, P. J., Kerr, B. J., Weber, T. E., Bregendahl, K., Lonergan, S. M., Prusa, K. J., Ahn, D. U., Stoffregen, W. C., Dozier, W. A., III, & Honeyman, M. S. (2008). Growth performance, carcass characteristics, meat quality, and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin-supplemented diets. *Journal of Animal Science*, 86(11), 2962-2970.

Lands, B. (2012). Consequences of Essential Fatty Acids. *Nutrients*, 4(9), 1338-1357.

Lands, B. (2014). Historical perspectives on the impact of n-3 and n-6 nutrients on health. *Progress in Lipid Research*, 55, 17-29.

Langin, D. (2006). Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *Comptes Rendus Biologies*, 329(8), 598-607.

Latorre, M. A., Lazaro, R., Gracia, M. I., Nieto, M., & Mateos, G. G. (2003). Effect of sex and terminal sire genotype on performance, carcass characteristics, and meat quality of pigs slaughtered at 117 kg body weight. *Meat Science*, 65(4), 1369-1377.

Laws, B. M., & Moore, J. H. (1963). Lipase and esterase activities of pancreas and small intestine of chick. *Biochemical Journal*, 87(3), 632-&.

Le, H. D., Meisel, J. A., de Meijer, V. E., Gura, K. M., & Puder, M. (2009). The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(2-3), 165-170.

Lea, C. H., Swoboda, P. A. T., & Gatherum, D. P. (1970). A chemical study of soft fat in cross-bred pigs. *Journal of Agricultural Science*, 74, 279-284.

Lebret, B., Juin, H., Noblet, J., & Bonneau, M. (2001). The effects of two methods of increasing age at slaughter on carcass and muscle traits and meat sensory quality in pigs. *Animal Science*, 72, 87-94.

Lefaucheur, L., Ledividich, J., Mourot, J., Monin, G., Ecolan, P., & Krauss, D. (1991). Influence of environmental-temperature on growth, muscle and adipose-tissue metabolism, and meat quality in swine. *Journal of Animal Science*, 69(7), 2844-2854.

Linares, M. B., Rocio Teruel, M., Egea, M., Villodre, C. M., Hernandez-Ruiperez, F., Madrid, J., & Dolores Garrido, M. (2014). Fat, meat quality and sensory attributes of Large White x Landrace barrows fed with crude glycerine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(3), 717-726.

Lopez-Bote, C. J., Isabel, B., & Daza, A. (2002). Partial replacement of poly- with monounsaturated fatty acids and vitamin E supplementation in pig diets: effect on fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular fat and on fat and lean firmness. *Animal Science*, 75, 349-358.

López-Bote, C., Isabel, B., & Rey, A. I. (1999). Efecto de la nutrición y del manejo sobre la calidad de la grasa en el cerdo. In: Rebollar, P. G., Mateos, G. G. & De Blas, C (Eds). Avances en Nutrición y Alimentación Animal. XV Curso de Especialización. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). Madrid, España, pp. 223-252.

Luddy, F. E., Magidman, P., Herb, S. F., Riemenschneider, R. W., & Barford, R. A. (1964). Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by semimicro technique. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 41(10), 693-&.

Madsen, A., Jakobsen, K., & Mortensen, H. P. (1992). Influence of dietary-fat on carcass fat quality in pigs - a review. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science*, 42(4), 220-225.

Mancha, M., & Vázquez, A. (1970). Transformación de los glicéridos durante la maduración de la aceituna. III. Distribución de los ácidos grasos en los triglicéridos. *Grasas Aceites*, 21, 127-131.

Mansbach, C. M., II, & Gorelick, F. (2007). Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular

packaging and secretion of chylomicrons. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(4), G645-G650.

Mansbach, C. M., & Siddiqi, S. A. (2010). The Biogenesis of Chylomicrons. In *Annual Review of Physiology*, vol. 72 (pp. 315-333).

Marmer, W. N., & Maxwell, R. J. (1981). Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle-tissue. *Lipids*, 16(5), 365-371.

Martin, D., Antequera, T., Muriel, E., Perez-Palacios, T., & Ruiz, J. (2009). Volatile compounds of experimental liver pate from pigs fed conjugated linoleic acid in combination with monounsaturated fatty acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(12), 2096-2106.

Maw, S. J., Fowler, V. R., Hamilton, M., & Petchey, A. M. (2003). Physical characteristics of pig fat and their relation to fatty acid composition. *Meat Science*, 63(2), 185-190.

McGarry, J. D., Mills, S. E., Long, C. S., & Foster, D. W. (1983). Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-coa sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase-I in animal and human-tissues - demonstration of the presence of malonyl-coa in non-hepatic tissues of the rat. *Biochemical Journal*, 214(1), 21-28.

McMurray, R. G., & Hackney, A. C. (2005). Interactions of metabolic hormones, adipose tissue and exercise. *Sports Medicine*, 35(5), 393-412.

Mead, J. R., Irvine, S. A., & Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine*, 80(12), 753-769.

Mendoza, E., García, M. L., Casas, C., & Selgas, M. D. (2001). Inulin as fat substitute in lowfat, dry fermented sausages. *Meat Science*, 57 (4), 387-393.

Meservey, C. M., & Carey, G. B. (1994). Dietary-fat saturation and endurance exercise alter lipolytic sensitivity of adipocytes isolated from Yucatan miniature swine. *Journal of Nutrition*, 124(12), 2335-2343.

Metherel, A. H., Taha, A. Y., Izadi, H., & Stark, K. D. (2009). The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(5-6), 417-423.

Metz, S. H. M., & Dekker, R. A. (1981). The contribution of fat mobilization to the regulation of fat deposition in growing large white and pietrain pigs. *Animal Production*, 33(OCT), 149-157.

Miller, M. F., Shackelford, S. D., Hayden, K. D., & Reagan, J. O. (1990). Determination of the alteration in fatty-acid profiles, sensory characteristics and carcass traits of swine fed elevated levels of monounsaturated fats in the diet. *Journal of Animal Science*, 68(6), 1624-1631.

Miller, R. K. (1994) Quality characteristics. In: Miller, R. K (Ed). *Muscle Foods*. Chapman & Hall. New York-London, pp. 299-303.

Mitchaothai, J., Yuangklang, C., Wittayakun, S., Vasupen, K., Wongsutthavas, S., Srenanul, P., Hovenier, R., Everts, H., & Beynen, A. C. (2007). Effect of dietary fat type on meat quality and fatty acid composition of various tissues in growing–finishing swine. *Meat Science*, 76(1), 95-101.

Monsma, C. C., & Ney, D. M. (1993). Interrelationship of stearic-acid content and triacylglycerol composition of lard, beef tallow and cocoa butter in rats. *Lipids*, 28(6), 539-547.

Monziois, M., Bonneau, M., Davenel, A., & Kouba, M. (2007). Comparison of the lipid content and fatty acid composition of intermuscular and subcutaneous adipose tissues in pig carcasses. *Meat Science*, 76(1), 54-60.

Morrissey, P.A., Buckley, D.A., and Galvin, K. (2000). Vitamin E and the oxidative stability of pork and poultry. In *Antioxidants in muscle foods: nutritional strategies to improve quality* (eds EA Decker, C Faustman and CJ López-Bote), pp. 263-287. Wiley interscience, New York, USA.

Mourot, J., Aumaitre, A., Mounier, A., Peiniau, P., & Francois, A. C. (1994). Nutritional and physiological-effects of dietary glycerol in the growing pig - consequences on fatty tissues and postmortem muscular parameters. *Livestock Production Science*, 38(3), 237-244.

Mu, H. L., & Hoy, C. E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 43(2), 105-133.

Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J. G., & Astiasarán, I. (2001). Effect of replacing pork back fat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of chorizo de Pamplona – traditional Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 59 (3), 251–258.

Muriel, E., Ruiz, J., Ventanas, J., & Antequera, T. (2002). Free-range rearing increases (n-3) polyunsaturated fatty acids of neutral and polar lipids in swine muscles. *Food Chemistry*, 78(2), 219-225.

Nafikov, R. A., & Beitz, D. C. (2007). Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *Journal of Nutrition*, 137(3), 702-705.

Narvaez-Rivas, M., Vicario, I. M., Constante, E. G., & Leon-Camacho, M. (2007). Changes in the concentrations of free fatty acid, monoacylglycerol, and diacylglycerol in the subcutaneous fat of Iberian ham during the dry-curing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10953-10961.

Newsholme, E. A., Calder, P., & Yaqoob, P. (1993). The regulatory, informational, and immunomodulatory roles of fat fuels. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), S738-S751.

Nguyen, L. Q., Nuijens, M., Everts, H., Salden, N., & Beynen, A. C. (2003). Mathematical relationships between the intake of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and their contents in adipose tissue of growing pigs. *Meat Science*, 65(4), 1399-1406.

Nguyen, N. H., & McPhee, C. P. (2005). Responses in production and body composition traits in ad libitum fed pigs from lines selected for high and low growth rate on a fixed ration. *Livestock Production Science*, 97(2-3), 101-106.

Nikolowa-Damyanova, B. (1997)W. W. Christie (Ed.), *Advances in lipid methodology*, vol. 4 (pp. 193-251). Bridgwater: Oily Press.

Ockner, R. K. (1991). Fatty acid binding-proteins - considerable progress - more ground to cover - a citation-classic commentary on a binding-protein for fatty acids in cytosol of intestinal-mucosa, liver, Ho, W.K.L. *Current Contents/Life Sciences* (40), 9-9.

Ockner, R. K., Ho, W. K. L., Poppenha.Rb, & Manning, J. A. (1972). Binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal-mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*, 177(4043), 56-&.

Ockner, R. K., & Manning, J. A. (1974). Fatty acid-binding protein in small-intestine - identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty-acid transport. *Journal of Clinical Investigation*, 54(2), 326-338.

Ohea, E. K., & Leveille, G. A. (1968). Lipid metabolism in isolated adipose tissue of domestic pig (*sus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26(3), 1081-&.

O'hea, E. K., & Leveille, G. A. (1969). Significance of adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in pig and efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis. *Journal of Nutrition*, 99(3), 338-344.

Olivares, A., Daza, A., Rey, A. I., & Lopez-Bote, C. J. (2010). Effect of diet saturation on growth performance, carcass characteristics and fat quality of heavy pigs. *Food Science and Technology International*, 16(4), 321-327.

Orengo, J., Villodre, C., Madrid, J., Martinez, S., Lopez, M. J., Megias, M. D., Valera, L., & Hernandez, F. (2014). Effect of dietary crude glycerin on growth performance, nutrient digestibility and hormone levels of Iberian crossbred pigs from 50 to 100 kg body weight. *Livestock Science*, 165, 95-99.

Perez-Palacios, T., Ruiz, J., Martin, D., Muriel, E., & Antequera, T. (2008). Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chemistry*, 110(4), 1025-1029.

Perona JS, Ruiz-Gutiérrez V. 2004. Analysis of neutral lipids: triacylglycerols. In Nollet LML (Ed.) Handbook of food analysis. Marcel Dekker, New York, 275–312.

Ponnampalam, E. N., Lewandowski, P., Nesaratnam, K., Dunshea, F. R., & Gill, H. (2011). Differential effects of natural palm oil, chemically-and enzymatically-modified palm oil on weight gain, blood lipid metabolites and fat deposition in a pediatric pig model. *Nutrition Journal*, 10(53), 1-7.

Power, G. W., & Newsholme, E. A. (1997). Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. *Journal of Nutrition*, 127(11), 2142-2150.

Power, G. W., Yaqoob, P., Harvey, D. J., Newsholme, E. A., & Calder, P. C. (1994). The effect of dietary lipid manipulation on hepatic mitochondrial phospholipid fatty-acid composition and carnitine palmitoyltransferase-I activity. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 34(4), 671-684.

Raclot, T. (2003). Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 42(4), 257-288.

Rangan, V. S., Joshi, A. K., & Smith, S. (1998). Fatty acid synthase dimers containing catalytically active beta-ketoacyl synthase or malony/acetyltransferase domains in only one subunit can support fatty acid synthesis at the acyl carrier protein domains of both subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 34949-34953.

Roda, A., Hofmann, A. F., & Mysels, K. J. (1983). The influence of bile-salt structure on self-association in aqueous-solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 258(10), 6362-6370.

Romijn, J. A., Klein, S., Coyle, E. F., Sidossis, L. S., & Wolfe, R. R. (1993). Strenuous endurance training increases lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling at rest. *Journal of Applied Physiology*, 75(1), 108-113.

Ruiz-Carrascal, J., Ventanas, J., Cava, R., Andres, A. I., & Garcia, C. (2000). Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, 33(2), 91-95.

Saadoun, A., & Leclercq, B. (1983). Comparison of *in vivo* fatty-acid synthesis of the genetically lean and fat chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 75(4), 641-644.

Saggerson, D., Ghadiminejad, I., & Awan, M. (1992). Regulation of mitochondrial carnitine palmitoyl transferases from liver and extrahepatic tissues (Vol. 32).

Saltin, B., & Astrand, P. O. (1993). Free fatty-acids and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 752-758.

Sanz, M., Flores, A., de Ayala, P. P., & Lopez-Bote, C. J. (1999). Higher lipid accumulation in broilers fed on saturated fats than in those fed on unsaturated fats. *British Poultry Science*, 40(1), 95-101.

Sanz, M., Flores, A., & Lopez-Bote, C. J. (2000). The metabolic use of energy from dietary fat in broilers is affected by fatty acid saturation. *British Poultry Science*, 41(1), 61-68.

Schieck, S. J., Shurson, G. C., Kerr, B. J., & Johnston, L. J. (2010). Evaluation of glycerol, a biodiesel coproduct, in grow-finish pig diets to support growth and pork quality. *Journal of Animal Science*, 88(12), 3927-3935.

Segura, J., Escudero, R., Romero de Ávila, M. D., Cambero, M. I., & López-Bote, C. J. (2015). Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat. *Meat Science*, 103(0), 90-95.

Segura, J., & Lopez-Bote, C. J. (2014). A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis. *Food Chemistry*, 145, 821-825.

Seillier, P. (1998). Genetics of meat and carcass traits. In: Rothschild, M. F & Ruvinsky, A (Eds). *The genetics of the pig*. CAB International. New York, USA, pp. 463-510.

Seillier, P., & Monin, G. (1994). Genetics of pig meat quality. A review. *Journal of Muscle Foods*, 5, 187-219.

Sherma, J. (2000). Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), 129-147.

Shorland, F. B. (1952). Evolution of animal fats. *Nature*, 170(4335), 924-925.

Small, D. M. (1968). A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 45(3), 108-&.

Smith, S., & Tsai, S.-C. (2007). The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural Product Reports*, 24(5), 1041-1072.

Smith, S., Witkowski, A., & Joshi, A. K. (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progress in Lipid Research*, 42(4), 289-317.

Smith, S. B., & Crouse, J. D. (1984). Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. *Journal of Nutrition*, 114(4), 792-800.

Smith, S. B., Yang, A. J., Larsen, T. W., & Tume, R. K. (1998). Positional analysis of triacylglycerols from bovine adipose tissue lipids varying in degree of unsaturation. *Lipids*, 33(2), 197-207.

Sonwai, S., Kaphueakngam, P., & Flood, A. (2014). Blending of mango kernel fat and palm oil mid-fraction to obtain cocoa butter equivalent. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 51(10), 2357-2369.

Soto, E., Hoz, L., Ordonez, J. A., Hierro, E., Herranz, B., Lopez-Bote, C., & Cambero, M. I. (2010). Volatile profile and sensory characteristics of dry-cured loins as affected by feeding level in the period previous to the late fattening phase and by rearing system of iberian pigs. *Journal of Muscle Foods*, 21(4), 636-657.

Stangelo, A. J., Vercellotti, J. R., Legendre, M. G., Vinnett, C. H., Kuan, J. W., James, C., & Dupuy, H. P. (1987). Chemical and instrumental analyses of warmed-over flavor in beef. *Journal of Food Science*, 52(5), 1163-1168.

Stiebing, A., Kuhne, D., & Rodel, W. (1993). Fat quality - its influence on the storage stability of firm dry sausage. *Fleischwirtschaft*, 73(10), 1169-1172.

Stryer, L. (1988) *Biochemistry*, Freeman W. H. y Co. (ed.), New York, US.

Sukhija, P. S., & Palmquist, D. L. (1988). Rapid method for determination of total fatty-acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(6), 1202-1206.

Sumena, K.B., Lucy, K.M., Chungath, J.J., Ashok, N., y Harshan, K.R. (2010). Regional histology of the subcutaneous tissue and the sweat glands of Large White Yorkshire pigs. *Tamil Nadu Journal of Veterinary and Animal Science*, 6, 128-135.

Sweetser, D. A., Heuckeroth, R. O., & Gordon, J. I. (1987). The metabolic significance of mammalian fatty-acid-binding proteins - abundant proteins in search of a function. *Annual Review of Nutrition*, 7, 337-359.

Touchstone, J. C. (1995). Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 671(1-2), 169-195.

Tribout, T., Larzul, C., & Phocas, F. (2012). Efficiency of genomic selection in a purebred pig male line. *Journal of Animal Science*, 90(12), 4164-4176.

Tunick, M. H. (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal of Dairy Science*, 83, 1892–1898.

Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., Garcia, C., & Estevez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77(2), 246-256.

Vernon, R. G. (1981). Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. In W. W. Christie (Ed.), *Lipid metabolism in ruminant animals*, (pp. 279–362). Oxford: New York: Pergamon Press.

Vestergaard, C. S., Schivazappa, C., & Virgili, R. (2000). Lipolysis in dry-cured ham maturation. *Meat Science*, 55(1), 1-5.

Viera-Alcaide, I., Vicario, I. M., Graciani Constante, E., & León-Camacho, M. (2007). Authentication of fattening diet of Iberian pig according to their triacylglycerols profile from subcutaneous fat. *Analytica Chimica Acta*, 596(2), 319-324.

Visessanguan, W., Soottawat, B., Riebroy, S., & Thepkasikul, P. (2004). Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to ham characteristics. *Meat Science*, 66 (3), 579–588.

Wang, S., Soni, K. G., Semache, M., Casavant, S., Fortier, M., Pan, L., & Mitchell, G. A. (2008). Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 95(3), 117-126.

Warnants, N., Van Oeckel, M. J., & Boucque, C. V. (1999). Incorporation of dietary polyunsaturated fatty acids into pork fatty tissues. *Journal of Animal Science*, 77(9), 2478-2490.

Webb, E. C., & O'Neill, H. A. (2008). The animal fat paradox and meat quality. *Meat Science*, 80(1), 28-36.

Wendel, A. A., Lewin, T. M., & Coleman, R. A. (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 501-506.

Wilde, P. J., & Chu, B. S. (2011). Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 14-22.

Williams, J. P., Khan, M. U., & Wong, D. (1995). A simple technique for the analysis of positional distribution of fatty-acids on diacylglycerols and triacylglycerols using lipase and phospholipase-A(2). *Journal of Lipid Research*, 36(6), 1407-1412.

Winder, W. W., Arogyasami, J., Barton, R. J., Elayan, I. M., & Vehrs, P. R. (1989). Muscle malonyl-coa decreases during exercise. *Journal of Applied Physiology*, 67(6), 2230-2233.

Wiseman, J., & Agunbiade, J. A. (1998). The influence of changes in dietary fat and oils on fatty acid profiles of carcass fat in finishing pigs. *Livestock Production Science*, 54(3), 217-227.

Wiseman, J., Redshaw, M. S., Jagger, S., Nute, G. R., & Wood, J. D. (2000). Influence of type and dietary rate of inclusion of oil on meat quality of finishing pigs. *Animal Science*, 70, 307-315.

Wood, J. D. (1990). Consequences for meat quality of reducing carcass fatness. In: Wood, J. D & Fisher, A. V. Reducing fat in meat animals. Elsevier, London, UK, pp. 344-397.

Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Hughes, S. I., & Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78(4), 343-358.

Wood, J. D., Enser, M. B., Macfie, H. J., Smith, W. C., Chadwick, J. P., Ellis, M., & Laird, R. (1978). Fatty acid composition of backfat in large white pigs selected for low backfat thickness. *Meat Science*, 2(4), 289-300.

Wood, J. D., Jones, R. C. D., Francombe, M. A., & Whelehan, O. P. (1986). The effects of fat thickness and sex on pig meat quality with special reference to the problems associated with overleanness. *Animal Production*, 43, 535-544.

Wood, J. D., Nute, G. R., Richardson, R. I., Whittington, F. M., Southwood, O., Plastow, G., Mansbridge, R., da Costa, N., & Chang, K. C. (2004). Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Science*, 67(4), 651-667.

Wood, J. D., Wiseman, J., & Cole, D. J. A. (1994). Control and manipulation of meat quality. Nottingham University Press, 433-456.

Yen, C.-L. E., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C., & Farese, R. V., Jr. (2008). DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 49(11), 2283-2301.

Yusoff, M. M., Tan, C. P., Man, Y. B., Miskandar, M. S., Kanagaratnam, S., & Nehdi, I. A. (2013). Development of a Coconut- and Palm-Based Fat Blend for a Cookie Filler. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 90(1), 91-101.

Zou, X., Huang, J., Jin, Q., Guo, Z., Cheong, L., Xu, X., & Wang, X. (2014). Preparation of Human Milk Fat Substitutes from Lard by Lipase-Catalyzed Interesterification Based on Triacylglycerol profiles. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 91(12), 1987-1998.

8 . RESUMEN AMPLIADO / EXTENDED ABSTRACT¹ .

¹ Este resumen ampliado se presenta en cumplimiento de las directrices de la normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, que regula los estudios de doctorado en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº 14, de 21 de diciembre de 2012) y de acuerdo con las especificaciones establecidas por la Comisión de Doctorado de la UCM.

This extended abstract is included in fulfilment of the directives of the regulation of development of the Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, which regulates the studies of doctorate at the Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº14, de 21 de diciembre de 2012) and in agreement with the specifications established by the Commission of Doctorate of the UCM.

8.1 Resumen ampliado.

8.1.1 Introducción.

El perfil de ácidos grasos de la grasa subcutánea tiene una importante repercusión en la calidad nutricional, características sensoriales y propiedades tecnológicas de la carne y productos derivados, de aquí el interés de su control en la producción y cría animal. Cambios en la composición de la grasa se han relacionado con la dieta y el sexo del animal. Su efecto se ha comprobado en aspectos diversos como, la velocidad de salado y secado de los jamones o en la formación de compuestos aromáticos y en las propiedades organolépticas finales. Recientes estudios han demostrado que, además de la composición en ácidos grasos, su posición en la molécula de triglicérido está con las propiedades reológicas finales de los productos cárnicos y tiene importantes implicaciones nutricionales (Gouk et al. 2014).

La grasa corporal en el cerdo se acumula mayoritariamente debajo de la piel (grasa subcutánea) y en localizaciones intracavitarias (grasa perirrenal, mesentérica, etc.), pero también en adipocitos localizados entre las fibras musculares. Es la denominada grasa intramuscular (Kouba y Sellier 2011; Monziois et al., 2007). Esta última es un indicador de la calidad de la carne puesto que proporciona sabor, consistencia, aroma y jugosidad (Fernández et al., 1999), a la vez que reduce la percepción de dureza. Durante las últimas décadas, la industria porcina se ha encaminado a producir canales con un elevado contenido en tejido magro y baja presencia de adiposo. En la bibliografía se encuentran indicaciones que señalan que, para mantener los atributos de calidad, es preciso que la carne contenga al menos un 2% de grasa intramuscular (Bejerholm y Barton-Gade, 1986), si bien, nuestras costumbres gastronómicas y la tradición en el procesado de la carne hacen que en nuestra área de producción se prefieran carnes con un contenido claramente superior, especialmente en aquellas destinadas a la elaboración de derivados cárnicos. Así, estudios basados en análisis sensoriales, han mostrado que los consumidores prefieren carnes con un nivel de grasa no inferior al 3% (Fernández et al., 1999).

En la producción porcina actual se tiende a utilizar piensos con un elevado contenido energético y alta concentración de nutrientes. En este contexto, es frecuente adicionar, como principal aporte calórico, cantidades relativamente elevadas (4-6%) de grasa, ya sean de origen animal, como sebo

o manteca, o vegetal, como aceite de soja o de girasol (Flachowsky et al., 2008). Las principales diferencias entre las grasas animales más comunes y los aceites vegetales residen en el grado de saturación de sus ácidos grasos y en la distribución posicional de los mismos en las moléculas de triglicéridos

Los ácidos grasos presentes en los tejidos animales provienen, bien de la acumulación directa de los presentes en el pienso, sin apenas modificación, o de la síntesis *de novo* a partir de hidratos de carbono y aminoácidos (Shorland, 1952). Los animales monogástricos sólo sintetizan *de novo* ácidos grasos saturados y monoinsaturados a partir de estos precursores y el perfil de ácidos grasos de la grasa de la dieta se refleja marcadamente en la composición de ácidos grasos de los tejidos (Jorgensen et al., 1996). Por tanto, en porcino el tipo de grasa incluido en la dieta afecta considerablemente la calidad de su carne y, en general, se ha relacionado la síntesis de grasa endógena con la elevada inclusión de carbohidratos en la dieta. En la actualidad, se está incrementando la inclusión en la dieta de glicerol, que también promueve la lipogénesis.

Para la cuantificación de la grasa intramuscular durante décadas se ha recurrido fundamentalmente a la extracción sólido-líquido. Los métodos desarrollados por Folch (1957) y por Bligh y Dyer (1959) han sido los más referenciados y usados en la extracción cuantitativa de los lípidos durante años. Marmer y Maxwell (1981) desarrollaron un método que permitía la separación, en columna de gel de sílice, de lípidos neutros (mayormente colesterol y triglicéridos) y lípidos polares (sobre todo fosfolípidos) a partir de una muestra de carne o producto cárnico y, por adición, la determinación de contenido total de grasa. Otros métodos, como el propuesto por Sukhija y Palmquist (1988), extraen y metilan los ácidos grasos en un solo paso mediante la utilización de disoluciones ácidas y mezclas de tolueno-metanol.

La búsqueda de nuevos y más precisos métodos de extracción de lípidos en carne y productos cárnicos es un campo que no pierde vigencia. De hecho, cada grupo de investigación adapta los métodos tradicionales a las características de las muestras estudiadas y condiciones de trabajo, desarrollando nuevos protocolos. Pérez-Palacios et al. (2008) realizaron un análisis comparativo de los distintos utilizados para la cuantificación de lípidos totales en carne y productos cárnicos e Iverson et al. (2001)

compararon entre las metodologías de Folch et al. (1957) y Bligh y Dyer (1959) aplicadas a tejidos marinos.

En la comercialización de la carne fresca la grasa subcutánea juega un importante papel; cabe indicar que su consistencia condiciona la apariencia de un determinado corte y contribuye a su manipulación. De todos los ácidos grasos, el que muestra una correlación más elevada con la consistencia de la grasa del cerdo es el C18:0 seguido del C18:2n-6, si bien en los límites de variación más próximo a los valores comerciales es éste último el principal responsable (Bosi y Russo, 2004). El control de la concentración de C18:2n-6 en la grasa del cerdo puede abordarse desde dos perspectivas diferentes, ambas desde la intervención de su dieta. Por una parte, el nivel de inclusión de ese ácido graso en la grasa de la ración y, por otra, el tiempo de administración de cierta dieta. Serán los requerimientos del mercado en cada caso, y el nivel de exigencia de la concertación final de C18:2n-6, los que condicionarán el diseño de la estrategia más adecuada, como la elaboración de mezclas de grasas para su administración durante toda la fase de crecimiento/cebo o el suministro de raciones de alto contenido en C18:2n-6 hasta un momento determinado y restringir a partir de ahí su aporte, añadiendo o no nutrientes que incrementen la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

Los triglicéridos constituyen cuantitativamente la fracción lipídica mayoritaria de la carne y productos derivados, mientras que constituyentes menores son los mono y diglicéridos, fosfolípidos, glicolípidos, esteroides, ácidos grasos libres y vitaminas liposolubles. Se ha demostrado que tanto la composición de ácidos grasos de la dieta como la distribución posicional estereoespecífica de éstos en la molécula de triglicérido son factores de importancia en la digestión y absorción de ácidos grasos (Mu y Hoy, 2004). Además, la distribución posicional también afecta a las propiedades físicas del tejido adiposo lo cual tiene diversas implicaciones tecnológicas en el procesado de carnes y, por tanto, en la calidad de los productos finales (Smith et al., 1998). También se ha comprobado en estudios recientes que la posición de los ácidos grasos en la molécula de triglicérido podría afectar al desarrollo de enfermedades como obesidad, diabetes o hipertensión (Gouk et al., 2013; Ponnampalam et al., 2011).

Las técnicas cromatográficas (gases y líquidos) para la caracterización de los triglicéridos fueron ampliamente revisadas por Andrikopoulos (2002), Buchgraber et al. (2004), Perona y Ruiz-

Gutiérrez (2004) y más recientemente por Kalo y Kemppinen (2012). Otra técnica con frecuencia utilizada en la gran mayoría de laboratorios es la cromatografía de capa fina (TLC). Touchstone (1995), Sherma (2000) y Fuch et al. (2011) han llevado a cabo excelentes revisiones de las aplicaciones de esta técnica en el análisis lipídico.

Para obtener la información estructural de los triglicéridos de una grasa, más allá del mero perfil de ácidos grasos, se requiere un procedimiento de análisis más o menos complejo, que podría incluir los siguientes pasos: (1) análisis por cromatografía de gases para obtener la composición en ácidos grasos previo aislamiento de los triglicéridos, (2) degradación de la fracción de triglicéridos en sn-2-monoacilglicerol, mediante hidrólisis enzimática (o una degradación de Grignard), (3) aislamiento del monoglicérido, por ejemplo por TLC y (4) posterior análisis de los ácidos grasos de esta fracción por cromatografía de gases. Este procedimiento proporciona el perfil de ácidos grasos total, el de los que ocupan la posición interna (sn-2) y, por diferencia, los que están ocupando las posiciones externas (sn-1 o sn-3).

La composición de la grasa está relacionada con su comportamiento reológico y más concretamente con su textura. Esta característica del alimento se define como el conjunto de atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto, perceptibles mediante receptores mecánicos, táctiles y, si es apropiado, visuales y auditivos (ISO 5492-2008). La textura es una de las características sensoriales más valoradas por el consumidor (Bourne, 2002) y juega un importante papel en el establecimiento de preferencias individuales por determinados alimentos. En este sentido, pequeñas diferencias de textura entre productos similares pueden ser determinantes en el grado de aceptación del alimento por el consumidor.

Entre los métodos instrumentales empleados para la determinación de la textura, el más extendido es, sin duda, el ensayo de imitación de doble compresión denominado de forma genérica análisis de perfil de textura (TPA, Texture Profile Analysis). Diversos estudios (Bourne 1982; Honikel, 1998) recogen su empleo en una amplia gama de alimentos, junto con las condiciones de ensayo. El éxito de este método se debe a que proporciona datos del comportamiento mecánico (dureza, cohesividad, viscosidad, elasticidad, adhesividad, fracturabilidad, masticabilidad y gomosidad) que

pueden relacionarse de forma razonablemente precisa con el proceso de masticación (Bourne, 1978 y 2002) y con la percepción sensorial.

Como es conocido, cambios en la composición del tejido adiposo de cerdo pueden causar problemas en los procesos tecnológicos de elaboración de productos cárnicos, debido fundamentalmente a modificaciones en la consistencia y en la estabilidad oxidativa de los mismos. Houben y Kroll (1980) analizaron el efecto del almacenamiento en la consistencia de la grasa, Gandemer (2002) y Maw et al. (2003) observaron que los productos cárnicos manufacturados con grasas blandas mostraban defectos de calidad como: secado insuficiente, apariencia oleosa, rancidez temprana o falta de cohesividad entre músculos y tejido adiposo al cortar.

8.1.2 Objetivos.

El desarrollo de esta tesis doctoral engloba dos partes, una metodológica orientada a la optimización de los métodos de extracción y cuantificación de la grasa intramuscular y otra en la que se analiza el efecto de distintos factores del animal y de la dieta en la composición de ácidos grasos, estructura de los triglicéridos y comportamiento reológico de la grasa intramuscular y de depósito subcutáneo, afrontándose los siguientes objetivos:

- Desarrollar un método preciso, rápido y de bajo coste de ejecución para la cuantificación de grasa intramuscular.
- Seleccionar el método más adecuado para el análisis estructural de triglicéridos de la grasa de porcino.
- Determinar el efecto de la fuente de grasa utilizada en la alimentación de los animales en la cantidad de grasa intramuscular.
- Analizar la distribución de ácidos grasos en los triglicéridos de animales cebados con distintos tipos de grasas.
- Estudiar las características reológicas de la grasa subcutánea de cerdos alimentados con distintos tipos de grasa y establecer su relación con la morfología de los triglicéridos.

8.1.3 Material y Metodología.

Para el desarrollo de un nuevo método de extracción de grasa se utilizó como material de estudio músculo *Longissimus dorsi* de cerdo blanco y el mismo músculo de cerdo Ibérico y pechuga de pavo, como muestras con alto y bajo nivel de grasa intramuscular, para la adecuación de dicho método al empleo de materiales comunes de uso. La grasa subcutánea de jamón curado a la altura del músculo *Biceps femoris* fue recogida para la comparación de métodos de obtención de la distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido.

Los métodos para la extracción de grasa intramuscular utilizados como referencia fueron: Folch et al (1957), Marmer y Maxwell (1981) y Sukhija y Palmquist (1988). El análisis de la distribución posicional de ácidos grasos se llevó a cabo con los protocolos descrito por Luddy et al. (1964) y Williams et al. (1995).

Para el análisis del efecto de distintos factores en la composición y propiedades físicas de la grasa, se utilizaron:

a) Cerdos cruzados (40.3 ± 0.75 kg de peso vivo) obtenidos de una granja comercial. La línea hembra (Syra, Gene+, Enrin, Francia) utilizada incluía sangre de Large White, Landrace y Duroc y la línea macho fue PIC L65 (PIC, Barcelona, España). Todos los animales recibieron una dieta común pre-experimental que contuvo 20 g C18:2n-6/ kg de dieta durante 38 días (79.0 ± 0.58 kg peso vivo). Luego recibieron durante 32 días su respectiva dieta experimental a voluntad y consistente en cuatro dietas de acabado con similar valor nutritivo pero con diferente fuente de grasa (aceite de palma o manteca) y concentración de glicerol incluido (0 vs 50 g/kg). Todas las dietas de acabado contuvieron baja concentración de C18:2n-6 (10g/kg). Las dietas se formularon de acuerdo a De Blas et al. (2013). Los cerdos se sacrificaron con aproximadamente 110 (± 2.98 kg) kg de peso vivo. Por una parte se tomaron muestras de músculo *Longissimus dorsi* y grasa subcutánea en el matadero y, por otra, se separó por corte el pernil derecho de cada cerdo (24 h tras el sacrificio) y se procesó de manera tradicional durante aproximadamente 12 meses para producir el jamón curado (Santos et al., 2008). Se deshuesó la pieza y se tomó cuidadosamente la grasa subcutánea a nivel del músculo *Biceps femoris*. Todas las muestras se guardaron a 4 °C hasta su análisis.

b) Cerdos cruzados Ibéricos x Duroc. Tres grupos se alimentaron con pienso con manteca o aceite de girasol alto oleico como fuente de grasa durante la etapa de cebo y un cuarto grupo tuvo su etapa de cebo en montanera. También se tomaron muestras de músculo *Longissimus dorsi* y grasa subcutánea dorsal en el matadero tras el sacrificio y se guardaron a 4°C hasta su análisis.

De las muestras anteriores se estudió la composición de la molécula de triglicérido por el método de Luddy et al. (1964) actualizado por Perona y Ruíz-Gutiérrez (2004), se analizó el punto de fusión (ISO 63321-2002) y se obtuvo el perfil de textura (Bourne, 1978).

8.1.4 Resultados.

Los resultados obtenidos se recogen en los 7 artículos en los que se ha estructurado esta memoria. A lo largo de dos trabajos metodológicos se ha desarrollado un nuevo procedimiento para extraer grasa intramuscular que permitió reducir la cantidad de muestra empleada, el disolvente utilizado y el tiempo de análisis. Se basa en la liofilización de la muestra, posterior homogeneizado, extracción de la grasa mediante una mezcla diclorometano:metanol (8:2) y posterior centrifugación.

En un tercer trabajo metodológico se ha realizado un estudio comparativo los dos métodos más utilizados en la determinación de la distribución posicional de ácidos grasos en las moléculas de triglicérido de grasas de origen animal. Uno de ellos (método A) consiste en la incubación de triglicéridos con una suspensión acuosa de la enzima lipasa, la separación de los productos por cromatografía de capa fina y el posterior análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos de cada fracción mediante cromatografía gas-líquido. El otro procedimiento (método B) se basa en que la metilación básica únicamente metila los ácidos grasos esterificados al glicerol, por lo que no es necesaria la separación previa de los triglicéridos. El método A mostró una buena correlación entre la distribución de los ácidos grasos y el punto de fusión y dureza de las grasas analizadas. Sin embargo, el método B condujo a una subestimación del ácido palmítico y a resultados carentes de correlación con las propiedades físicas citadas.

En el estudio de la relación de ciertas propiedades reológicas de la grasa con la distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de triglicérido, cuyos resultados se recogen en un cuarto

artículo, se ha encontrado que el punto de fusión (medido como punto de deslizamiento) se relaciona tanto con la concentración como con la distribución posicional de ácidos grasos. Sin embargo, la dureza se relacionó exclusivamente con los ácidos grasos presentes en las posiciones externas (sn-1 y sn-3) del triglicérido mientras que la adhesividad lo hizo únicamente con los presentes en la posición interna (sn-2).

Los últimos tres trabajos de la presente tesis doctoral se centraron en la modificación del tipo de grasa de la dieta y/o la inclusión de glicerol en la misma y se analizó tanto los cambios en la distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de triglicérido como las repercusiones que tenían estos cambios sobre las propiedades reológicas de la grasa. Un primer experimento se llevó a cabo con cerdos blancos alimentados con 4 dietas caracterizadas por la inclusión de 2 tipos de grasa, con similar perfil de ácidos grasos (palma y manteca) pero distinta distribución posicional en la molécula de triglicérido, y la inclusión o no de glicerol en las mismas. En líneas generales se comprobó que con esta estrategia de alimentación, la posición sn-2 experimentaba pocas modificaciones mientras que en las posiciones sn-1 y sn-3 se producía cierta reordenación.

En el análisis de las propiedades reológicas de la grasa subcutánea de jamón curado, se volvió a comprobar que únicamente las posiciones externas se veían afectadas por el tipo de grasa. La dureza de la grasa se vio incrementada en cerdos alimentados con aceite de palma, y tanto ésta como las otras tres características de textura (adhesividad, elasticidad y gomosidad) disminuyeron con la inclusión de un 5% de glicerol en el pienso.

Para finalizar, se realizó un trabajo experimental en el que se alimentaron cerdos ibéricos en montanera y con tres dietas diferentes de cebo. Con este estudio se pretendía comprobar si la inclusión en la dieta de grasas con sustanciales diferencias en perfil total de ácidos grasos (manteca vs aceite de girasol alto oleico vs montanera) podía modificar significativamente la distribución de los ácidos grasos en la molécula de triglicéridos y las propiedades reológicas de la grasa. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la administración de los distintos piensos provocaba únicamente cambios en las posiciones externas del triglicérido, con un incremento significativo de la concentración de C18:1n-

9 mientras que la montanera afectaba también la posición interna. Estos cambios también produjeron una reducción de las propiedades de la grasa anteriormente mencionadas.

8.1.5 Discusión.

En la presente tesis doctoral se ha afrontado por una parte, mejoras metodológicas en el campo de análisis de la fracción lipídica y por otra, el estudio de distintos factores de la dieta y del animal en la composición, estructura y comportamiento reológico de la grasa.

Respecto al primer punto, la determinación precisa de la grasa intramuscular presenta considerables dificultades, ya que varía tanto dentro del propio músculo como con la localización anatómica (Faucitano et al., 2004), obteniéndose con frecuencia coeficientes de variación elevados (25-30 %). Este hecho, no sólo complica su cuantificación, también obstaculiza el desarrollo de estrategias de producción animal para tratar de modificarla. Sin embargo, se ha comprobado que gran parte de la variabilidad asociada a su cuantificación se debe al procedimiento analítico empleado. Teniendo en cuenta la metodología existente en este campo, se han desarrollado nuevos protocolos de determinación de la grasa intramuscular, en los cuales se parte de una toma de muestras representativa (corte transversal de la zona anatómica a analizar) previamente liofilizadas y se procede a la extracción del componente lipídico con una mezcla diclorometano-metanol. Para la homogenización de la muestra y extracción sólido-líquido se propone el uso de un sistema Mixer Mill MM400 (Retsch technology, Haan, Alemania) que permite la disgregación de las muestras en partículas muy finas y procesar varias muestras a la vez. La separación de sólido y disolvente de extracción se realiza en eppendorf por centrifugación. Para adaptar este procedimiento a material de laboratorio más asequible, el sistema Mixer-mill/Mixer-mill puede sustituirse por la reducción a polvo de las muestras liofilizadas en un Molinillo y un sistema de agitación de tubos tipo Vórtex. En conjunto, el nuevo procedimiento de análisis reduce los requerimientos de disolvente, la variabilidad de los resultados y el tiempo de análisis, con una elevada eficacia en la extracción de grasa. Se propone, por todo ello, como un método alternativo para la extracción de grasa intramuscular.

Otro de los campos donde existe considerable discrepancia en la metodología empleada y sobre todo en los resultados obtenidos, es en el análisis de la distribución posicional de los ácidos grasos

en las moléculas de triglicéridos. Con este objetivo, en el desarrollo de la presente tesis doctoral se ha elegido un procedimiento basado en la digestión del triglicérido con una lipasa, la obtención del perfil de ácidos grasos en la posición 2 de forma directa y el correspondiente a las posiciones 1 y 3 por diferencia. Se trata de una metodología sencilla y relativamente barata y rápida.

Respecto al estudio del efecto de factores alimenticios en particularidades de la grasa, tomando como punto de partida la hipótesis en la que se considera que el empleo de grasas saturadas con similar energía neta pero con distinta distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido, conllevaría variaciones de la digestión y absorción de los mismos y, por tanto, podría conducir a diferentes estructuras del triglicérido almacenado en la grasa del cerdo, se ha podido comprobar, con distintas dietas, que el C16:0 se localiza principalmente en sn-2 mientras que el C18:0 esterifica las posiciones externas del triglicérido. Los ácidos grasos mono (principalmente C18:1n-9) y poliinsaturados (principalmente C18:2n-6) se localizan preferentemente en posiciones externas. Es conocido que los ácidos grasos no esterifican de forma aleatoria los grupos hidroxilo del glicerol en grasas animales. En contraste con otras especies, la posición sn-2 del triglicérido en grasa de cerdo y en leche materna, tanto de cerdos como de humanos, está ocupada principalmente por C16:0 (Christie y Moore 1970; Innis y Nelson 2013).

En concreto se ha observado que la utilización de palma como fuente de grasa en la dieta produce una tendencia a acumular mayor cantidad de ácidos grasos saturados (principalmente esteárico) en posiciones externas del triglicérido. Aunque no se ha encontrado bibliografía relacionada, King et al. (2004) concluyeron que en cerdos alimentados con dietas enriquecidas con ácido linoleico conjugado se producía un aumento de ácidos grasos saturados (posiblemente por inhibición de enzimas desaturadas) en las posiciones sn-1 y sn-3. Con el suministro de una dieta rica en ácido oleico se consigue un aumento de la concentración de dicho ácido en las posiciones externas del triglicérido. Sin embargo, en cerdos ibéricos, cuando el sistema de alimentación es la montanera, se produce un gran aumento de C18:1n-9 en posición sn-2.

La utilización de glicerol en la dieta no ha podido relacionarse con modificaciones en la distribución posicional de ácidos grasos en la grasa subcutánea. No existe información previa al

respecto, por lo que estos resultados apoyan las conclusiones de los recientes trabajos de Linares et al. (2014) y Orengo et al. (2014) que afirman que el glicerol puede utilizarse en alimentación porcina sin alteraciones en la calidad de la grasa del cerdo.

Por otra parte, se ha podido apreciar que existe una diferencia muy considerable entre la distribución posicional de ácidos grasos de la grasa de jamón curado y las grasas frescas, aunque sigue manteniéndose la relación de concentraciones en sn-2 $C16:0 > C18:1n-9 > C18:0 \sim C18:2n-6$. Se es consciente de que se trata de dos localizaciones anatómicas diferentes, no obstante, diversos autores como Domínguez et al. (2014) y Franco et al. (2006), han observado que las diferencias a ese nivel son como máximo de 1-2%, en ácidos grasos como $C18:1n-9$ y/o $C18:2n-6$. Por tanto, las diferencias mayores se podrían atribuir a procesos de oxidación y lipólisis ocurridos durante el curado. En este contexto, se ha podido deducir que el proceso de curado produce una modificación sustancial de la distribución de ácidos grasos. Fundamentalmente se ha observado una disminución muy destacable del ácido linoleico total tras el proceso de curado y centrado sobre todo en las posiciones externas del triglicérido y una reubicación de ácido palmítico desde sn-2 a posiciones externas. Estos procesos coinciden con la descripción de Narváez-Rivas et al (2007), Raclot (2003) y Vestergaard et al. (1999) que concluyen que, si bien las enzimas lipolíticas actúan sobre las posiciones 1 y 3 del triglicérido, existe cierto control hacia la hidrólisis previa de triglicéridos más polares (más insaturados); de ahí la disminución de $C18:2n-6$, y, si las condiciones son las adecuadas, se produce una translocación del ácido graso presente en posición 2 hacia una posición externa. Este hecho conduciría a la reubicación en especial del $C16:0$, por ser el mayoritario en sn-2 y por tener un peso molecular inferior a los ácidos grasos de mayor longitud de cadena. Ambos hechos, favorecerían su movilidad.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que las intervenciones sobre la grasa de la dieta puede modificar la ubicación de los ácidos grasos en las posiciones externas del triglicérido. Sin embargo, la posición sn-2 está sometida a un elevado control metabólico, no obstante, cuando el suministro de ácido oleico es muy elevado, y especialmente cuando se encuentra en la posición sn-2 de un triglicérido, se puede llegar a producir modificaciones de la concentración en sn-2. Por otra parte, el proceso de curado y la genética son también factores que pueden modificar la distribución posicional.

Respecto a las características físicas de la grasa, se ha encontrado una relación entre la posición de los ácidos grasos en los triglicéridos y distintas características físicas de la grasa de jamones curados. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el punto de fusión se correlaciona tanto con la posición interna como con las externas del triglicérido. Los modelos de regresión obtenidos podrían utilizarse para estimar el punto de fusión de la grasa conociendo la composición y posición de los ácidos grasos de la grasa de porcino. Estos resultados están en concordancia con las conclusiones de Enser (1983), Glaser et al. (2004) o Lea et al. (1970) en las que, los ácidos grasos saturados generalmente aumentan el punto de fusión mientras que los mono y poliinsaturados lo disminuyen. Por otra parte, Wood et al. (2004) encontraron que el ácido graso con mayor relación con el punto de fusión y con otras propiedades físicas era el C18:0. Sin embargo, resulta destacable que, en este último ácido graso, el comportamiento es diferente en función de la posición que ocupa en el triglicérido.

El análisis de regresión lineal ha revelado que la dureza únicamente se relaciona significativamente con los ácidos grasos en las posiciones externas del triglicérido, sin embargo, los posicionados en el interior lo hacen con la adhesión. La dureza resultó directamente proporcional a la concentración de C18:0 y SFA e inversamente proporcional a C18:1, C18:2n-6, MUFA, PUFA y UI. La adhesividad fue directamente proporcional a C18:0 y C18:2n-6 mientras presentó una relación inversa con C18:1n-9 en sn-2. En el caso de la elasticidad y de la cohesividad, no se encontró una relación clara con los ácidos grasos y la estructura de los triglicéridos. De hecho, Sumena et al. (2010) concluyeron que ambas variables, principalmente la cohesividad, estaban relacionadas con la red de tejido conectivo, predominantemente fibras de colágeno y pequeñas cantidades de fibras reticulares y elásticas y no con la composición lipídica del adipocito.

8.1.6 Conclusiones.

1. Gran parte de la variabilidad encontrada en la cuantificación de la grasa intramuscular se debe al procedimiento analítico empleado, pudiéndose reducir el coeficiente de variación desde un 30% hasta un 15% modificando las condiciones de muestreo y determinación.

2. La liofilización de muestras procedentes del corte transversal de músculo *Longissimus dorsi*, su posterior homogeneizado, extracción sucesiva con una mezcla diclorometano:metanol (8/2 v/v) y

centrifugación minimizan la variabilidad, el tiempo de análisis y el gasto de disolventes en la cuantificación de grasa intramuscular. Esta forma de proceder se integra en el diseño de un nuevo método de determinación de esta fracción lipídica.

3. El empleo de lipasa pancreática, separación por cromatografía de capa fina de tri-, di- y monoglicéridos, metilación en medio ácido y posterior identificación de los ácidos grasos presentes por cromatografía de gases es un procedimiento fácilmente reproducible y preciso para la estimación de la distribución posicional de ácidos grasos en la grasa de porcino.

4. La distribución posicional de ácidos grasos en la molécula de triglicérido modifica el comportamiento reológico de la grasa subcutánea de jamón curado de la siguiente forma:

a) El punto de fusión de la grasa aumenta cuando en la posición interna se ubica principalmente el ácido palmítico y en las externas se combinan los ácidos palmítico y esteárico. Sin embargo, la presencia de ácido oleico en estas últimas posiciones lo disminuye.

b) La dureza de la grasa depende fundamentalmente de las posiciones externas y se encuentra incrementada cuando aumenta el grado de saturación y longitud de la cadena de los ácidos grasos presentes.

c) La adhesividad de la grasa se incrementa con el grado de saturación de los ácidos grasos ubicados en la posición interna.

5. La inclusión en el pienso de la última fase del cebo del cerdo de grasas con similar perfil de ácidos grasos pero diferente reparto de los mismos en la molécula de triglicérido (palma vs manteca) produce la reorganización posicional de este mismo componente de la grasa subcutánea del animal, especialmente de las posiciones externas.

6. El proceso seguido para la producción de jamón curado produce una translocación de los ácidos grasos en la molécula de triglicérido de la grasa subcutánea reduciéndose en posición interna la concentración de ácido palmítico y aumentando la de oleico. No obstante, el comportamiento reológico de la grasa de jamón curado se relaciona con el tipo de grasa (manteca vs palma) utilizado en la

alimentación en la última fase del cebo de los animales empleados para su producción, con mayor dureza en los productos procedentes del uso de aceite de palma frente a los derivados de la dieta con manteca. La inclusión de glicerol en el pienso reduce la dureza, adhesividad, elasticidad y gomosidad de los productos.

7. La alimentación de cerdos Ibéricos en la última etapa de cebo con piensos con aceite de girasol alto oleico incrementa la concentración de este ácido graso en las posiciones externas de la molécula de triglicérido de la grasa subcutánea y reduce la dureza, la adhesividad y el punto de fusión de este tejido.

8. La grasa subcutánea de los cerdos Ibéricos alimentados en montanera presentan mayor contenido de ácido oleico en las posiciones externas e interna de la molécula de triglicérido así como valores más bajos de dureza, adhesividad y punto de fusión que el mismo tejido de los animales alimentados con pienso.

Conclusión final:

La intervención nutricional en la última etapa del cebo del cerdo permite la reorganización posicional de los triglicéridos de la grasa subcutánea y modificar su comportamiento reológico tanto del tejido fresco como de los productos elaborados (jamón curado).

8.2 Extended abstract.

8.2.1 Introduction.

Fatty acid profile has as significant impact in nutritional quality, sensorial characteristics and technological properties of meat and meat products hence the interest of its control in animal production. Changes in fat composition have been related to the diet and sex of the animal. Their effect has been proven in several aspects such as salting and drying kinetics of hams or in the formation of volatile compounds that affect final organoleptic properties. Recent studies have demonstrated that not only the composition but also the molecular structure of the fat seem to be related to the final rheological properties and even to important nutritional implications (Gouk et al. 2014).

Pig fat is mainly located under the skin (subcutaneous fat), in intracavitary locations (perirrenal, mesenteric fat ...) and in adipocytes located in muscular fibers (intramuscular fat) (Kouba y Sellier 2011; Monziois et al., 2007). This last type of fat is an indicator of meat quality since it provides flavor, aroma, consistency and juiciness and reduces hardness perception (Fernández et al., 1999). Over the last decades, pork industry has been focused in high-lean carcasses production. In the literature, indications that it is necessary to keep at least a 2% of intramuscular fat (Bejerholm y Barton-Gade, 1986) can be found. Nevertheless, our gastronomic customs and tradition in meat processing make that, in our production area, meats with higher intramuscular fat are preferred. Studies based on sensorial analysis have demonstrated that consumers prefer pork with fat level not under 3 % (Fernández et al., 1999).

In current swine production, it is tended to use feeds with high energetic content and high concentration of nutrients. In this context, it is frequent to add relatively high fat amount (4-6 %), of either animal (beef tallow or lard) or plant origin (soya or sunflower oils) (Flachowsky et al., 2008). The main differences between common animal fats and plant oils lie in the saturation degree of their fatty acids and the positional distribution within the triglyceride molecule of them.

The sources of the fatty acids of tissues are the direct deposition of the fatty acids present in dietary fat or *de novo* synthesis from aminoacids and carbohydrates (Shorland, 1952). The monogastric animals only synthesize saturated and monounsaturated fatty acids from such precursors and, together with fatty acids of dietary fat, are reflected in tissue composition (Jorgensen et al., 1996). Therefore, in swine production, dietary fat significantly affects pork quality and, in general, the endogenous fat synthesis has been related with a high inclusion of carbohydrates in the diet. At present, the inclusion of glycerol in the diet has increased, that also promotes lipogenesis.

The standard methodology has been for decades solid-liquid extraction procedures. For decades, the most referenced and used methods in quantitative lipids extraction have been Folch et al. (1957) and Bligh & Dyer (1959). Marmer & Maxwell (1981) developed a dry column method for the determination of the total fat content of meat and meat products as an alternative, allowing the separation in neutral (mostly cholesterol and triacylglycerols) and polar lipids (mostly phospholipids). Other methods, such as the one proposed by Sukhija & Palmquist (1988), extract and methylate fatty acids in a Toluene-Methanol/HCl solution in a rapid one-step procedure.

The search for new and accurate lipid extractions methods in meat and meat products is a very demanded topic. In fact, depending on the tissue source, multiple groups adapted the conventional protocols or developed new ones. Pérez-Palacios et al. (2008) compared some methods for total lipid quantification in meat and meat products and Iverson et al. (2001) developed a comparison between Folch et al. (1957) and Bligh & Dyer (1959) methodologies applied to marine tissues.

Subcutaneous fat plays an important role in fresh meat processing and marketing, as it conditions the cut appearance and manipulation. High linoleic acid (C18:2 n-6) and low saturated fatty acid (mainly C18:0) concentration have been associated to low consistency, oiliness and soft texture (Bosi & Russo, 2004). The regulation of C18:2n-6 concentration in pig fat can be approached from two different perspectives, both based on dietary intervention. On one part, the level of inclusion of such fatty acid on dietary fat and, on the other, the administration time. It would be the market requirements in each case and the level of exigency of final C18:2n-6 concentration, which will determine the most adequate strategy, such as the elaboration of fat mixtures for their administration during the whole fase

(growing and/or fattening) or the supply of a linoleic enriched diet during certain period and a subsequent restriction, adding or not nutrients which increase fatty acid *de novo* synthesis.

Quantitatively, the triglyceride fraction constitutes the most important lipid component in meat and meat products. Other minor fat constituents will be phospholipids, free fatty acids, sterols (including cholesterol) and fat-soluble vitamins. Under normal circumstances, the human digestive system is able to digest triglycerides and to absorb them with high efficiency (more than 95%). It has been proven that dietary fatty acid composition and stereo-specific positioning of these FAs in triglyceride molecules are important factors in fatty acid digestion and absorption (Mu and Hoy, 2004). Besides that, the distribution of fatty acids within the triglyceride molecules also affects the physical properties of the adipose tissue and this has many technological implications in the processing of meats, which are closely linked to quality features of the final products (Smith et al., 1998). Recent studies have shown that the position of the FAs within the triglyceride molecule might affect the incidence of illnesses such as obesity, diabetes or hypertension (Ponnampalam et al., 2011; Gouk et al., 2013) in humans.

Andrikopoulos (2002), Buchgraber et al. (2004), Perona & Ruiz-Gutiérrez (2004) and more recently by Kalo & Kemppinen (2012) reviewed the chromatographic techniques for triglyceride characterization. Another frequent technique used in most laboratories is thin-layer chromatography (TLC). Touchstone (1995), Sherma (2000) and Fuch et al. (2011) have carried out excellent revisions.

In order to obtain structural information of triglycerides, a complex analysis procedure is required: (1) acquisition of fatty acid profile of triglycerides by gas-liquid chromatography, (2) degradation of triglycerides in sn-2-monoacylglycerides by enzymatic hydrolysis (or Grignard degradation), (3) monoglyceride isolation by TLC and (4) analysis of fatty acid profile of 2-monoglyceride fatty acids. Total and 2-monoglyceride fatty acid profile are obtained with this procedure, fatty acids of external positions (sn-1 or sn-3) are obtained by difference.

Rheological behavior (mainly texture) is dependent on fat composition. This food characteristic is defined as the set of mechanical, geometrical and surface attributes of a product, measurable by mechanical, tactile, visual or acoustic receptors (ISO 5492-2008). The texture is one of

the sensory qualities most valued by the consumer (Bourne, 2002) and plays an important role in the establishment of individual preferences for a particular food. In this way, small differences in texture parameters between similar products can be determinant in the consumer's degree of acceptance.

Among the instrumental methods used for texture determination, the most spread assay is the double compression technique, generically referred as Texture Profile Analysis (TPA). Several studies (Bourne 1982; Honikel, 1998) collect information on its uses in foods. The success of such methodology comes from the fact that provides data of mechanical behavior (hardness, adhesiveness, cohesiveness, viscosity, springiness, breakage, gumminess and chewiness) that can be related to the chewing process (Bourne 1978 and 2002) and sensory perception.

It is well known that changes in composition of adipose tissue of pigs can cause some problems on technological processes of meat products elaboration, mainly due to changes in consistency and oxidative stability. Houben and Kroll (1980) analyzed the effect of storing on fat consistency and Gandemer (2002) and Maw et al. (2003) observed that meat products manufactured with soft fats showed quality defects as inadequate drying, oily appearance, early rancidity or lack of cohesiveness between muscles and adipose tissue when cutting.

8.2.2 Objectives.

The development of this doctoral thesis is funded in two parts, a methodological one focused on the optimization of extraction methods and quantification of intramuscular fat, and other based on the analysis of the effect of different animal and dietary factors on the fatty acid composition, triglyceride structure and rheological behavior of fat, dealing with the following objectives:

- Development of a precise, fast and low-cost method for intramuscular fat quantification.
- Selection of the most adequate methodology for structural analysis of triglycerides from pig fat.
- Analysis of the effect of dietary fat source used in animal nutrition on intramuscular fat concentration.

-
- Analysis of positional distribution of fatty acids in the triglycerides of animals fattened with different fat types.
 - Rheological behavior of subcutaneous fat from pigs fed with different fat sources and establishment of triglyceride morphology.

8.2.3 Material and Methods.

In the development of a new method for extraction of intramuscular fat, *Longissimus dorsi* muscle of white pig was used as work material and, the same muscle of Iberian pig and turkey breast as samples with high and low level of intramuscular fat for the development of an alternative method for analysis using common laboratory equipment. Subcutaneous fat of dry-cured ham at *Biceps femoris* level was taken for the comparison of methods to obtain the fatty acid positional distribution within the triglyceride molecule.

Reference methods for intramuscular fat extraction were Folch et al (1957), Marmer & Maxwell (1981) and Sukhija & Palmquist (1988). The analysis of fatty acid positional distribution was carried out with the protocols described by Luddy et al. (1964) and Williams et al. (1995).

In the analysis of the effect of different factors on the composition and rheological properties of fat were used:

a) Crossbred pigs (40.3 ± 0.78 kg body weight (BW)) obtained from a commercial farm were used. The female line (Syra, Gene+, Erin, France) used included blood from Large White, Landrace and Duroc and the sire line was PIC L65 (PIC, Barcelona, Spain). All pigs received a common pre-experimental diet containing 20 g C18:2n-6/ kg diet for 38 days (79.0 ± 6.58 kg BW). Then, pigs received for 32 days their respective experimental diets consisted in four finishing diets with similar nutritive value but differed in the fat source (palm oil or lard) and the concentration of glycerol (0 vs 50g/kg). All diets in the finishing period contained low concentration of C18:2n-6 (10 g/kg). Diets were provided for ad libitum consumption and were formulated according to Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal (De Blas et al., 2013). At $110 (\pm 2.98)$ kg of BW, the pigs were slaughtered. On one hand, samples of *Longissimus dorsi* muscle and subcutaneous fat were taken and, on the other,

the right thigh from each pig was obtained at cutting (24 h after slaughter) and processed in a traditional manner for approximately 12 months to produce a dry-cured ham (Santos et al., 2008), which were subsequently deboned. The subcutaneous fat at level of *biceps femoris* muscle was carefully taken from each deboned dry-cured ham and samples were stored at 4 °C until use.

b) Crossbred pigs Iberian × Duroc were used. Three groups were fed with feed with lard or high oleic sunflower oil as fat source during fattening period and a fourth group had fattening period in montanera. *Longissimus dorsi* muscle and subcutaneous fat samples were taken at slaughter and stored at 4 °C until use.

In mentioned subcutaneous fat samples, the structure of triglyceride molecule was carried out by methodology described by Luddy et al (1964) updated by Perona and Ruíz-Gutiérrez (2004), the melting point (ISO 63321-2002) and texture profile (Bourne, 1978) were obtained as well.

8.2.4 Results.

The obtained results are recorded on the seven scientific papers contained in this memorandum. Along two methodological works, a new procedure for extraction of intramuscular fat was developed. It let to minimize the sample amount, and solvent and time used. It is based on the lyophilization of the sample, subsequent homogenization, fat extraction with a mixture dichloromethane:methanol (8:2) and finally a centrifugation.

In a third methodological work, a comparative study of two methods for fatty acid positional distribution within triglyceride molecule in animal fats was carried out. Two enzymatic procedures are extensively used for triglyceride molecules studies. One of the methods uses the lipase treatment followed by thin-layer chromatography (TLC) separation of the reaction products and the acid methylation of the 2-monoglyceride fraction (Luddy et al. 1964). The second method is faster and easier to use as it eliminates the separation of the fractions by TLC used in the standard technique. This second method makes use of a basic methylation procedure. After lipase reaction, it is possible to determine the free fatty acids by comparing the FA contents of the two reactions of methylation (Williams et al. 1995). Method B underestimated the proportion of palmitic acid in *sn*-2 position of triglycerides from pig fat

samples. For that reason, it was not possible to get any high-quality correlation of the fatty acids with fat melting point or hardness when this method was used.

In a fourth article, the existing dependence between fat physical properties and the structure of triglyceride was analyzed. The melting point (slip point) of the subcutaneous fat is related to the concentration and positional distribution of fatty acids. Correlation between hardness and fatty acids in sn-1,3 positions exists. Adhesiveness is related to fatty acids in sn-2 position.

The last three works of this doctoral thesis were focused on the modification of dietary fat source and/or the inclusion of glycerol and were analyzed both: changes in fatty acid positional distribution and their implications in rheological behavior of fat. A first experiment was carried out with white pigs with four different diets based in 2 different types of fat with similar fatty acid profile (palm oil and lard) but different positional distribution in triglyceride molecule, and the inclusion or not of glycerol. Overall, it was proven that, with this feeding strategy, sn-2 position suffered little modifications while sn-1,3 positions suffered a reorganization.

In the analysis of subcutaneous fat of dry-cured hams, it was also proven that only external positions were affected by dietary fat. Hardness was increased in pigs fed with palm oil and either hardness or adhesiveness and springiness were decreased with the inclusion of 5 % glycerol.

To complete, an experimental work with Iberian pigs fed in fattening period in montanera or with three different diets was developed. This study was used to check whether the inclusion in the diet of fats with substantial differences in total fatty acid profile (lard *vs* high oleic sunflower *vs* montanera) could significantly modify the distribution of fatty acids within the triglyceride molecule and the rheological properties of the fat. The obtained results brought to light that the supply of different feedstuffs only altered sn-1,3 positions, with a significant increase of C18:1n-9 concentration while montanera feeding system also affected sn-2 position. These changes also led to a decrease of textural properties of fat.

8.2.5 Discussion.

In the present doctoral thesis, it has been tackled, on one hand, methodological improvements in the field of the analysis of lipids and, on the other, the study of the effect of different factors of the diet and the animal on the composition, structure and rheological behavior of fat.

With regard to the first point, the precise quantification of intramuscular fat presents several difficulties, since it varies in both inside the own muscle and with anatomical location (Faucitano et al., 2004). This fact leads frequently to high coefficient of variation (25-30%) and complicates not only the quantification but also the development of strategies in animal production to modify the intramuscular fat. Nevertheless, it has been proven that a large part of variability found in the quantification of intramuscular fat is due to the analytical procedure used. Having in mind the existing methodology in this field, new protocols for intramuscular fat extraction have been developed. They depart from representative sampling (a cross-section cut from the anatomical part to analyze) and previously lyophilized and the extraction is carried out with a mixture of dichloromethane:methanol. For the homogenization of the sample and the solid-liquid extraction, it is proposed the use of the Mixer Mill MM400 technology (Retsch technology, Haan, Germany) that allows the disaggregation of the samples in very fine particles, shaking and processing several samples at the same time. The separation of the solid from the extraction solvent is carried out in eppendorf by centrifugation. In order to adapt this procedure to common laboratory equipment, the Mixer mill system can be substituted by the reduction to dust of the lyophilized samples in a common coffee Grinder and a Vortex as a shaking system.

The analysis of fatty acid positional distribution within the triglyceride molecules is another field where also exists a discrepancy in both used methodology and obtained results. With such objective, along the development of this doctoral thesis, it has been chosen a procedure based on the digestion of the triglyceride with a lipase, the acquisition of the fatty acid profile of sn-2 position directly and the correspondent to sn-1,3 by difference. It is a methodology simple, fast and relatively cheap.

Attending to the study of the effect of dietary factors on the fat characteristics, it was taken as a starting point the hypothesis, which considers that the use of saturated fats with similar gross energy but different fatty acid positional distribution within the triglyceride molecule would lead to changes in

the digestion and absorption of them, thus leading to different structures of the triglyceride stored in pig fat. Despite the different diets, it was observed that palmitic acid was located mainly in the sn-2 position, while stearic acid esterified the external positions. Mono (mainly oleic acid) and polyunsaturated fatty acids (mainly C18:2n-6) were also located preferentially at the sn-1,3 position. As is known, fatty acids are not esterified at random to the glycerol hydroxyl groups in animals. In pigs and human milk, as opposed to most species, the 2-position in the adipose tissue is occupied by a saturated fatty acid, mainly C16:0 (Christie & Moore, 1970; Innis & Nelson 2013).

Specifically, it has been observed that when palm oil was used as dietary fat source a trend to accumulate higher concentration of saturated fatty acids (mainly stearic) in sn-1,3 appeared. Little information exists about this topic, King et al. (2004) concluded that in pigs fed with enriched diets with conjugated linoleic acid, an increase of saturated fatty acids (probably due to inhibition of desaturase enzymes) in sn-1 and sn-3 was observed.

With the supply of an oleic acid enriched diet, an increase of such fatty acid was observed in sn-1,3 positions of the triglyceride. Nevertheless, in Iberian pigs, when the feeding system was montanera, an increase also in sn-2 position was shown.

The use of dietary glycerol did not affect fatty acid positional distribution in subcutaneous fat. There is no previous information; consequently, these results support the conclusions of recent works of Linares et al. (2014) and Orengo et al (2014) who assert that glycerol can be used in swine nutrition without alterations in fat quality.

Moreover, it can be appreciated that exists a significant difference between fatty acid positional distribution of dry-cured ham fat and fresh one, although the concentrations ratio in sn-2 C16:0 > C18:1n-9 > C18:0 ~ C18:2n-6 is still shown. Although there is sense that these are two different anatomical locations, authors as Domínguez et al. (2014) and Franco et al. (2006) have observed that differences at that lever are at most of 1 – 2 % in C18:1n-9 and/or C18:2n-6. Therefore, the largest differences could be attributable to oxidation and lipolysis processes occurred when curing. In this context, it has been able to deduce that the curing process produce a substantial change of fatty acid positional distribution. Mainly, it has been observed a remarkable decrease of linoleic acid concentration in sn-1,3 positions and a relocation of palmitic acid from sn-2 to external positions. These processes are

coincident with the results of Narváez-Rivas et al (2007), Raclot (2003) y Vestergaard et al. (1999) who concluded that, even though lipolytic enzymes act on sn-1,3 positions, a preference for hydrolysis in first place of more polar (more unsaturated) triglycerides was observed; hence the decrease of C18:2n-6 concentration, and, when the conditions are adequate, a translocation of the sn-2 fatty acid to external positions can take place. This fact would lead to a relocation mainly of C16:0 because it is majoritarian in sn-2 position and has less molecular weight than their longer analogous. Both facilitating its mobility.

Altogether, the results lead to the conclusion that dietary fat interventions can modify fatty acid location in external positions of the triglyceride. Nevertheless, sn-2 position is subjected to a strong metabolic control. However, when the supply of oleic acid is very high, and especially when it is located in sn-2 position of a triglyceride, modifications of its concentration in sn-2 can be achieved. Besides, dry-curing process and genetics are also determining factors of the positional distribution.

Attending to rheological behavior of fat, it has been found a relationship between fatty acid location in the triglyceride and different physical properties in dry-cured ham subcutaneous fat. The obtained results bring to light that the melting point is correlated with both internal and external positions of the triglyceride. The developed regression models could be used to estimate the melting point of the pig fat in knowledge on the compositions and fatty acid positional distribution. These results are in concordance with the conclusion of Enser (1983), Glaser et al. (2004) or Lea et al. (1970). They concluded that saturated fatty acids usually increase the melting point value while mono and polyunsaturated ones decrease it. Wood et al. (2004) found that C18:0 concentration showed the highest correlation with melting point and other physical properties. Nevertheless, it is remarkable that, in this last case, the behavior is different depending on its location in the triglyceride molecule.

The regression analysis also revealed that hardness is only significantly correlated with fatty acids located in external positions while adhesiveness made with the ones located in sn-2 position. Hardness was directly proportional to C18:0 and total saturated fatty acid concentration and inversely proportional to unsaturated fatty acids. Adhesiveness was positively correlated with C18:0 and C18:2n-6 and presented a negative correlation with C18:1n-9 in sn-2 position. The relationship with the fatty acid composition of springiness and cohesiveness was not clear. In fact, Sumena et al (2010) concluded

that both variables, mainly cohesiveness, were related to the connective tissue net (mainly collagen fibers and small quantities of reticular and elastic fibers and not to the lipid composition of the adipocyte.

8.2.6 Conclusions.

1. A large part of variability found in the quantification of intramuscular fat is due to the analytical procedure used. The coefficient of variation can be decreased from a 30% to a 15 % by modifying the sampling and analysis conditions.

2. The lyophilization of a cross-section of *Longissimus dorsi* muscle samples, subsequent homogenization, successive extraction with dichloromethane:methanol (8:2 v/v) mixture and centrifugation minimize the variability, analysis time and used solvent in the quantification of intramuscular fat. This procedure is integrated in the development of a new method for determination of this lipid fraction.

3. The use of pancreatic lipase, thin-layer chromatography separation of tri-, di- and monoglycerides, acid metilation and subsequent fatty acid identification by gas-liquid chromatography is an easily reproducible and precise method to estimate the fatty acid positional distribution in pig fat.

4. The fatty acid positional distribution within the triglyceride molecule modifies the rheological behavior of dry-cured ham subcutaneous fat as follows:

a) The melting point of fat increases when in the internal position locates mainly palmitic acid and in the external palmitic and stearic acid are combined. Nevertheless, the presence of oleic acid in such positions causes a decrease.

b) Hardness of fat depends mainly on the external positions and increases when the saturation degree or chain length of present fatty acids increase.

c) Adhesiveness increases with the saturation degree of fatty acids located in internal position.

5. The inclusion of fats during late fattening period with similar fatty acid profile but different distribution in the triglyceride molecule (palm oil vs lard) causes a positional reorganization, mainly in external positions.

6. The followed process to the production of dry-cured ham produces a translocation of the fatty acids in the triglyceride molecule of subcutaneous fat decreasing the concentration of palmitic acid in internal position and increasing oleic acid one. However, the rheological behavior of dry-cured ham subcutaneous fat is related with the dietary fat source (palm oils vs lard) used in late fattening period of the animal, with larger hardness in the products that derive from the use of palm oil over those coming from lard. The inclusion of glycerol decreases the hardness, adhesiveness, springiness, cohesiveness, gumminess and chewiness.

7. The feeding of Iberian pigs during late fattening period with feedstuffs with high oleic sunflower oil increases the concentration of such fatty acid in external positions of triglyceride molecule of subcutaneous fat and decreases the hardness, adhesiveness and melting point of such tissue

8. The subcutaneous fat of Iberian pigs fed in montanera shows larger concentration of oleic acid in both external and internal positions of the triglyceride molecule as well as lower values of hardness, adhesiveness and melting point than the same tissue of animals fed with feedstuff.

Final conclusion:

The nutritional interventions during late fattening period allow a positional reorganization of subcutaneous fat triglycerides and the modification of the rheological behavior in both fresh and dry-cured tissue.

8.2.7 References.

Andrikopoulos, N. K. (2002). Chromatographic and spectroscopic methods in the analysis of triacylglycerol species and regiospecific isomers of oils and fats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(5), 473-505.

Bejerholm, C., & Barton-Gade, P.A. (1986) Proc 32 nd E.A.A ENNRW, pp. 389.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959).A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.

Bosi, P., & Russo, V. (2004). The production of the heavy pig for high quality processed products. *Italian Journal of Animal Science*, 4, 309-321.

Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62-66.

Bourne, M. C. (2002). *Relationship between rheology and food texture*.

Buchgraber, M., Ullberth, F., Emons, H., & Anklam, E. (2004). Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(9), 621-648.

Christie, W. W., & Moore, J. H. (1970). A comparison of structures of trilycerides from various pig tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 210(1), 46-56.

De Blas, C., Gasa, J., & Mateos, G.G. (2013). *Necesidades Nutricionales para Ganado Porcino*. Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal, Madrid, Spain.

Dominguez, R., Martinez, S., Carballo, J., & Franco, I. (2014). Fatty acid profile and cholesterol and retinol contents in different locations of Celta pig breed. *Grasas y Aceites*, 65(3): e036. Doi: [dx.doi.org/10.3989/gya.0115141](https://doi.org/10.3989/gya.0115141).

Enser, M.B. (1983). The relationship between the composition and the consistency of pig backfat. In Wood JD (Ed.), *Fat quality in lean pigs*, Meat Research Institute Special report No. 2, (pp. 53-57). Document number EUR 8901 EN, CEC Workshop, Brussels, Belgium.

Enser, M.B. (1984). The chemistry, biochemistry and nutritional importance of animal fats. In J. Wiseman (Ed.), *Fat in animal nutrition*, (pp. 23-52.). UK.: Butterworths London.

Faucitano, L., Rivest, J., Daigle, J. P., Levesque, J., & Garipey, C. (2004). Distribution of intramuscular fat content and marbling within the longissimus muscle of pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(1), 57-61.

Fernandez, X., Monin, G., Talmant, A., Mourot, J., & Lebret, B. (1999). Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat - 2. Consumer acceptability of m. longissimus lumborum. *Meat Science*, 53(1), 67-72.

Flachowsky, G., Schulz, E., Kratz, R., & Glodek, P. (2008). Effects of different dietary fat sources on the fatty acid profile of backfat and intramuscular fat of pigs of various sire breeds. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17(3), 363-371.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.

Franco, I., Cristina Escamilla, M., García, J., Camino García Fontán, M., & Carballo, J. (2006). Fatty acid profile of the fat from Celta pig breed fattened using a traditional feed: Effect of the location in the carcass. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), 792-799.

Fuchs, B., Suess, R., Teuber, K., Eibisch, M., & Schiller, J. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2754-2774.

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

Glaser, K. R., Wenk, C., & Scheeder, M. R. L. (2004). Evaluation of pork backfat firmness and lard consistency using several different physicochemical methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(8), 853-862.

Gouk, S. W., Cheng, S.-F., Ong, A. S.-H., & Chuah, C.-H. (2014). Stearic acids at sn-1, 3 positions of TAG are more efficient at limiting fat deposition than palmitic and oleic acids in C57BL/6 mice. *The British journal of nutrition*, 111(7), 1174-1180.

Gouk, S. W., Cheng, S. F., Mok, J. S. L., Ong, A. S. H., & Chuah, C. H. (2013). Long-chain SFA at the sn-1, 3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. *British Journal of Nutrition*, 110(11), 1987-1995.

Houben, J. H., & Krol, B. (1980). Acceptability and storage stability of pork products with increased levels of poly-unsaturated fatty acids. *Meat Science*, 5(1), 57-70.

Innis, S. M., & Nelson, C. M. (2013). Dietary triacylglycerols rich in sn-2 palmitate alter post-prandial lipoprotein and unesterified fatty acids in term infants. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89(4), 145-151.

ISO 5492-2008 Sensory analysis – Vocabulary.

ISO 6321:2002. 2002. Animal and vegetable fats and oils - Determination of melting point in open capillary tubes (slip point), Second edition. pp 2–15.

Iverson, S. J., Lang, S. L. C., & Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36(11), 1283-1287.

Jorgensen, H., Jensen, S. K., & Eggum, B. O. (1996). The influence of rapeseed oil on digestibility, energy metabolism and tissue fatty acid composition in pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science*, 46(2), 65-75.

Kalo, P. J., & Kempainen, A. (2012). Regiospecific analysis of TAGs using chromatography, MS, and chromatography-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(4), 399-411.

King, D. A., Behrends, J. M., Jenschke, B. E., Rhoades, R. D., & Smith, S. B. (2004). Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols from subcutaneous adipose tissue of pigs fed diets enriched with conjugated linoleic acid, corn oil, or beef tallow. *Meat Science*, 67(4), 675-681.

Kouba, M., & Sellier, P. (2011). A review of the factors influencing the development of intermuscular adipose tissue in the growing pig. *Meat Science*, 88(2), 213-220.

Kuklev, D.B. & Smith, W.L. (2006). Chemical C-2 elongation of polyunsaturated fatty acids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44(2), 172-177.

Lea, C. H., Swoboda, P. A. T., & Gatherum, D. P. (1970). A chemical study of soft fat in cross-bred pigs. *Journal of Agricultural Science*, 74, 279-284.

Linares, M. B., Rocio Teruel, M., Egea, M., Villodre, C. M., Hernandez-Ruiperez, F., Madrid, J., & Dolores Garrido, M. (2014). Fat, meat quality and sensory attributes of Large White x Landrace barrows fed with crude glycerine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(3), 717-726.

Luddy, F. E., Magidman, P., Herb, S. F., Riemenschneider, R. W., & Barford, R. A. (1964). Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by semimicro technique. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 41(10), 693-696.

Marmer, W. N., & Maxwell, R. J. (1981). Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle-tissue. *Lipids*, 16(5), 365-371.

Maw, S. J., Fowler, V. R., Hamilton, M., & Petchey, A. M. (2003). Physical characteristics of pig fat and their relation to fatty acid composition. *Meat Science*, 63(2), 185-190.

Monziois, M., Bonneau, M., Davenel, A., & Kouba, M. (2007). Comparison of the lipid content and fatty acid composition of intermuscular and subcutaneous adipose tissues in pig carcasses. *Meat Science*, 76(1), 54-60.

Mu, H. L., & Hoy, C. E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 43(2), 105-133.

Narvaez-Rivas, M., Vicario, I. M., Constante, E. G., & Leon-Camacho, M. (2007). Changes in the concentrations of free fatty acid, monoacylglycerol, and diacylglycerol in the subcutaneous fat of Iberian ham during the dry-curing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10953-10961.

Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., D'arrigo, M. y De la Hoz, L. (2003a). Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la salud humana y enriquecimiento de la carne y productos cárnicos en ácidos grasos de la familia n-3 (1ª Parte). *Alimentación, Nutrición y Salud*. Enero-Marzo. 10 (1), 10-18.

Ordoñez, J.A., Cambero, M.I., D'Arrigo, M. y de la Hoz, L. (2003b). Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la salud humana y enriquecimiento de la carne y productos cárnicos en ácidos grasos de la familia n-3 (2ª Parte). *Alimentación, Nutrición y Salud*. Abril-Junio. 10 (2), 31-40.

Orengo, J., Villodre, C., Madrid, J., Martinez, S., Lopez, M. J., Megias, M. D., Valera, L., & Hernandez, F. (2014). Effect of dietary crude glycerin on growth performance, nutrient digestibility and hormone levels of Iberian crossbred pigs from 50 to 100 kg body weight. *Livestock Science*, *165*, 95-99.

Perez-Palacios, T., Ruiz, J., Martin, D., Muriel, E., & Antequera, T. (2008). Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chemistry*, *110*(4), 1025-1029.

Perona, J.S., Ruiz-Gutiérrez, V. (2004). Analysis of neutral lipids: triacylglycerols. In Nollet LML (Ed.) *Handbook of food analysis*. Marcel Dekker, New York, 275–312.

Ponnampalam, E. N., Lewandowski, P., Nesaratnam, K., Dunshea, F. R., & Gill, H. (2011). Differential effects of natural palm oil, chemically-and enzymatically-modified palm oil on weight gain, blood lipid metabolites and fat deposition in a pediatric pig model. *Nutrition Journal*, *10*(53), 1-7.

Raclot, T. (2003). Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, *42*(4), 257-288.

Santos, C., De la Hoz, L., Cambero, I., Cabeza, C., & Ordóñez, J.A. (2008). Enrichment of dry cured ham with α -linolenic acid and α -tocopherol by the use of linseed oil and α -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Science*, *80*, 668–674.

Sherma, J. (2000). Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*, *880*(1-2), 129-147.

Shorland, F. B. (1952). Evolution of animal fats. *Nature*, *170*(4335), 924-925.

Smith, S. B., Yang, A. J., Larsen, T. W., & Tume, R. K. (1998). Positional analysis of triacylglycerols from bovine adipose tissue lipids varying in degree of unsaturation. *Lipids*, *33*(2), 197-207.

Sukhija, P. S., & Palmquist, D. L. (1988). Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(6), 1202-1206.

Sumena, K.B., Lucy, K.M., Chungath, J.J., Ashok, N., & Harshan, K.R. (2010). Regional histology of the subcutaneous tissue and the sweat glands of Large White Yorkshire pigs. *Tamil Nadu J Vet Anim Sci*, 6, 128-135.

Touchstone, J. C. (1995). Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 671(1-2), 169-195.

Vestergaard, C. S., Schivazappa, C., & Virgili, R. (2000). Lipolysis in dry-cured ham maturation. *Meat Science*, 55(1), 1-5.

Williams, J. P., Khan, M. U., & Wong, D. (1995). A simple technique for the analysis of positional distribution of fatty acids on diacylglycerols and triacylglycerols using lipase and phospholipase-A(2). *Journal of Lipid Research*, 36(6), 1407-1412.

Wood, J. D., Nute, G. R., Richardson, R. I., Whittington, F. M., Southwood, O., Plastow, G., Mansbridge, R., da Costa, N., & Chang, K. C. (2004). Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Science*, 67(4), 651-667.