

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA, SALUD
PÚBLICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA
LEGAL

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PROTEOLÍTICO DE
DEBARYOMYCES HANSENI Aislada de embutidos
curados

JOSÉ TOMÁS BOLUMAR GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 17 de Juny de 2004 davant un tribunal format per:

- D. Juan Antonio Ordóñez Pereda
- D. Pedro Roncales Rabinal
- D. Lorenzo de la Hoz Perales
- D^a. Amparo Querol Simón
- D^a. Amparo Alegría Torán

Va ser dirigida per:

D. Fidel Toldrà Vilardell

D^a. Yolanda Sanz Herranz

D^a. M^a Concepción Aristoy Albert

©Copyright: Servei de Publicacions
José Tomás Bolumar García

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6271-3

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

**Caracterización del sistema proteolítico de *Debaryomyces
hansenii* aislada de embutidos curados**

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE FARMACIA**

TESIS DOCTORAL

Realizada por

José Tomás Bolumar García

Caracterización del sistema proteolítico de *Debaryomyces hansenii* aislada de embutidos curados

Trabajo realizado por **José Tomás Bolumar García** en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología los Alimentos por la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia.

Fdo. José Tomás Bolumar García

Valencia, 2004



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE AGROQUÍMICA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

FIDEL TOLDRÁ VILARDELL, DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS Y PROFESOR DE INVESTIGACION DEL CSIC, YOLANDA SANZ HERRANZ, DOCTORA EN FARMACIA Y CIENTÍFICO TITULAR DEL CSIC Y M^a CONCEPCION ARISTOY ALBERT, DOCTORA EN FARMACIA E INVESTIGADORA TITULAR DE OPIS DEL MCyT, TODOS EN EL INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

HACEN CONSTAR: Que el trabajo de Investigación, titulado: “Caracterización del sistema proteolítico de *Debaryomyces hansenii* aislada de embutidos curados”, realizado por el Licenciado en Ciencia y Tecnología de Alimentos **D. JOSE TOMAS BOLUMAR GARCIA**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Ciencia de Alimentos de este Instituto, reuniendo las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

En Paterna, a 20 de Febrero de 2004

Dr. Fidel Toldrá

Dra. Yolanda Sanz

Dra. M^a Concepción Aristoy

www.iata.csic.es

Direc. Postal: APARTADO DE CORREOS, 73
46100 BURJASSOT, VALENCIA
Domicilio Social: POLIGONO LA COMA, S/N
46980 PATERNA, VALENCIA
TEL.: +34 96 390 00 22
FAX: +34 96 363 63 01

A toda mi familia y sobre todo a mis padres,
y a mi bonita mujer, Natalia

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento al Doctor José Flores por darme la oportunidad de ingresar en el mundo de la investigación. Sin su ayuda inicial a un joven inquieto, ésta tesis no hubiese sido posible.

En segundo lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis; al Doctor Fidel Toldrá por darme una visión amplia y eficiente de la investigación actual en tecnología de alimentos, a la Doctora Yolanda Sanz por su excelencia en el diseño e interpretación de los experimentos y a la Doctora Margarita Aristoy por guiarme en todas las técnicas instrumentales utilizadas en ésta tesis.

A Amparo Feria y Carmen Laosa, por su amabilidad y sus consejos de microbiología, y al resto del personal del grupo de carnes; Natalia Batlle, Asun Durá, José Manuel Ferrer, Mónica Flores, María Angeles García, Pía Gianelli, Aurora Marco, Maribel Nadal, José Luis Navarro, Nelson Nebel, Pablo Nieto, María Pérez, Milagro Reig, Miguel Angel Sentandreu y María Pilar Valero, por su compañía y por su ayuda a nivel técnico y científico.

A la Doctora Elizabeth Jones y a su grupo de investigación en proteasas de levaduras del Mellon Institute of Science (Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania). A Carol Woolford, David Hill, Collin Bachert, Tania, Katie y Shoba, por su buen trato y por trasmitirme una gran cantidad de conocimientos que yo desconocía.

A los grupos de la merienda por los gratos momentos compartidos y a todas las personas que me apoyaron.

Por último, al Ministerio de Educación y Cultura por la concesión de la beca y al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación de mis experimentos.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Embutidos curados fermentados | 4 |
| 1.1.1. Definición | 4 |
| 1.1.2. Tecnología | 5 |
| 1.2. Cambios bioquímicos durante la maduración de embutidos curados fermentados | 6 |
| 1.2.1. Fermentación de hidratos de carbono | 6 |
| 1.2.2. Lipólisis | 7 |
| 1.2.3. Proteólisis | 8 |
| 1.3. Microbiología de embutidos curados fermentados y uso de cultivos iniciadores | 12 |
| 1.3.1. Bacterias lácticas | 13 |
| 1.3.2. <i>Micrococcaceae</i> | 14 |
| 1.3.3. Mohos | 15 |
| 1.3.4. Levaduras | 16 |
| 1.4. El género <i>Debaryomyces</i> | 18 |
| 1.4.1. Descripción del género <i>Debaryomyces</i> | 18 |
| 1.4.2. Propiedades e importancia de <i>Debaryomyces</i> <i>hansenii</i> en los procesos de curado | 19 |
| 1.5. El sistema proteolítico de levaduras | 21 |
| 1.5.1. Clasificación de las enzimas proteolíticas | 21 |
| 1.5.2. El sistema proteolítico de <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> | 22 |

| | |
|---|------------|
| 1.6. Presentación de los trabajos y justificación de la unidad temática..... | 27 |
| 2. OBJETIVOS | 29 |
| 3. TRABAJOS PUBLICADOS Y PENDIENTES DE PUBLICACIÓN .. | 33 |
| 3.1. Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by <i>Debaryomyces hansenii</i> | 35 |
| 3.2. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from <i>Debaryomyces hansenii</i> | 51 |
| 3.3. Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from <i>Debaryomyces hansenii</i> | 71 |
| 3.4. Protease B from <i>Debaryomyces hansenii</i> : Purification and biochemical properties | 95 |
| 3.5. Protease (PrA and PrB) and prolyl and arginyl aminopeptidase activities from <i>Debaryomyces hansenii</i> as a function of growth phase and nutrient sources | 117 |
| 4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GLOBAL | 143 |
| 4.1. Selección de cepas de <i>D. hansenii</i> en base a su actividad proteolítica | 145 |
| 4.2. Hidrólisis de proteínas sarcoplásmicas por <i>D. hansenii</i> | 147 |
| 4.3. La prolín aminopeptidasa (PAP) de <i>D. hansenii</i> | 148 |
| 4.4. La arginín aminopeptidasa (AAP) de <i>D. hansenii</i> | 149 |
| 4.5. La proteasa B (PrB) de <i>D. hansenii</i> | 150 |
| 4.6. Efecto de la fuente de nitrógeno y de carbono y de la fase de crecimiento sobre la síntesis de enzimas proteolíticas en <i>D. hansenii</i> | 152 |

| | |
|---|------------|
| 4.7. Efecto del uso de proteínas sarcoplásmicas como fuente de nitrógeno sobre la síntesis de enzimas proteolíticas en <i>D. hansenii</i> | 152 |
| 5. CONCLUSIONES | 155 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 159 |

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria tiene una gran importancia económica, siendo el sector de la carne y sus derivados el que se sitúa en primer lugar en cuanto al consumo, que fue de 68 kg per cápita y representó el 22 % del gasto total en alimentación de los hogares españoles en el año 2002 (Barreiro, 2003). La producción de embutidos curados fermentados en España es de alrededor de 120.000 toneladas/ año, siendo el salchichón y el chorizo los más importantes (Encinas *et al.*, 2000).

Socialmente, los embutidos curados fermentados son productos tradicionales que cuentan con una larga historia y un inestimable valor gastronómico. Las características del producto final vienen definidas por complejas transformaciones químicas y enzimáticas (musculares y microbianas) de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos de la masa cárnica inicial, todas ellas moduladas por las condiciones físicas concretas en las que se lleva a cabo el proceso, así como por el efecto de las especias y de los agentes de curado. Así pues, la inoculación de microorganismos seleccionados y caracterizados, (cultivos iniciadores o “starters”), a la masa cárnica, constituye una alternativa para controlar y dirigir tales transformaciones y, por consiguiente las características finales del embutido.

Una de las transformaciones con mayor impacto en la percepción sensorial, es la hidrólisis de las proteínas que ocurre durante el proceso de curado de embutidos fermentados, y que origina un incremento en la concentración de péptidos y aminoácidos, estrechamente relacionados con el sabor e indirectamente con el aroma. Estos cambios bioquímicos son fruto de las actividades proteolíticas de enzimas endógenas y microbianas (Molly *et al.*, 1997, Ordóñez *et al.*, 1999). Hasta la fecha, muchas investigaciones se han centrado en los sistemas proteolíticos de los microorganismos que intervienen en la fermentación de embutidos, como las bacterias lácticas, las micrococáceas y los mohos, pero se dispone de una información muy limitada sobre el sistema proteolítico de levaduras autóctonas aisladas de embutidos, como *Debaryomyces spp.*, y los efectos que éstas puedan tener en los cambios proteolíticos que acontecen durante la maduración de productos cárnicos curados. Por todo lo expuesto, el estudio

bioquímico del sistema proteolítico de la levadura *Debaryomyces hansenii*, que es la más competitiva en embutidos fermentados, resulta de gran importancia para establecer su función durante el curado y en su caso para mejorar el desarrollo del sabor y aroma en la fabricación de productos cárnicos curados.

1.1. Embutidos curados fermentados

1.1.1. Definición

El curado fue en sus orígenes, una técnica de conservación derivada de la salazón pero, hoy en día, ha perdido importancia en cuanto a su aplicación exclusiva como método de conservación, debido al uso generalizado de técnicas frigoríficas, y ha adquirido una nueva dimensión como proceso de obtención de una extensa gama de productos con características de calidad muy diferentes y variadas.

Según la Directiva 92/5/CEE, se entiende por “curado”, el tratamiento de carnes crudas saladas, aplicado en condiciones climáticas que puedan provocar, en el transcurso de una lenta y gradual reducción de la humedad, la evolución de procesos de fermentación y/o enzimáticos naturales que supongan con el tiempo modificaciones que aporten al producto características organolépticas típicas y que garanticen la conservación y la salubridad en condiciones normales de temperatura ambiente.

En los países mediterráneos, el término curado se aplica a aquellos productos cárnicos que se han sometido a un largo proceso de maduración y secado. Sin embargo, en el ámbito internacional, el término curado se aplica a todos los productos cárnicos que han sido tratados con sal, nitratos y/o nitritos. Actualmente, en la bibliografía internacional se utiliza el término de “dry-cured” para referirse a los productos que han experimentado un proceso de maduración y secado, como son los productos curados españoles (Flores y Toldrá, 1993).

El embutido crudo curado fermentado es un producto de charcutería, constituido por una mezcla de magro y de grasa, previamente fragmentados, y por ingredientes y aditivos diversos, como la sal, nitratos, nitritos, azúcares, ácido ascórbico, cultivos iniciadores y especias. Esta masa cárnica es embutida en una

tripa, natural o sintética, y sometida a un proceso de fermentación y posteriormente de secado.

1.1.2. Tecnología

Debemos distinguir dos tipos generales de embutidos curados fermentados:

- *Productos anglosajones o del norte de Europa*, que contienen carne de vacuno y cerdo y son sometidos a periodos de maduración relativamente cortos, hasta tres semanas, en los que se produce una fermentación de aproximadamente 3 días a temperaturas superiores a 25 °C, sin sobrepasar los 30-35 °C, y claramente separada de los periodos de secado. En el caso particular de Estados Unidos, algunos productos no se someten a periodos de secado y son pasteurizados después de la fermentación. Finalmente, se les aplica un proceso de ahumado que les confiere unas peculiares características organolépticas.
- *Productos mediterráneos o del sur de Europa*, que predominantemente contienen sólo carne de cerdo y son sometidos a periodos más largos de secado. La operación de fermentación o estufaje dura entre 5-10 días y se realiza a 18-22 °C y humedad relativa entre el 80-90 % (Toldrá, 2001). La operación de secado se realiza a una temperatura entre 10-15 °C y una humedad relativa del 65-80 %, y no siempre está claramente separada de la fermentación. La duración del secado es variable, de 20 a 90 días (Flores, 1997), según se pretenda elaborar un producto de curado rápido o lento (tradicional) y en función del diámetro del embutido. El ahumado no suele aplicarse por no ser típico de estos productos.

La seguridad y estabilidad microbiológica de los embutidos se logra en las distintas fases del proceso por: (i) la adición de nitritos y sal, (ii) el bajo potencial redox (ambiente anaerobio), (iii) la competitividad que ejercen los microorganismos responsables de la fermentación, (iv) la reducción del pH y (v) la reducción de la actividad de agua a lo largo del secado que da lugar a un producto de humedad intermedia (~ 30%). Los embutidos crudos curados y fermentados sufren diferentes transformaciones físicas, químicas, bioquímicas y microbiológicas a lo largo del proceso de elaboración que le confieren, además, su aroma y sabor característicos.

1.2. Cambios bioquímicos durante la maduración de los embutidos curados fermentados

Los cambios bioquímicos que se suceden a lo largo de la maduración de embutidos van a ser responsables de las características que se percibirán sensorialmente: textura, sabor y aroma. En la figura 1, pueden observarse los principales mecanismos de generación de sabor y aroma que se producen a lo largo de la maduración de los embutidos curados fermentados.

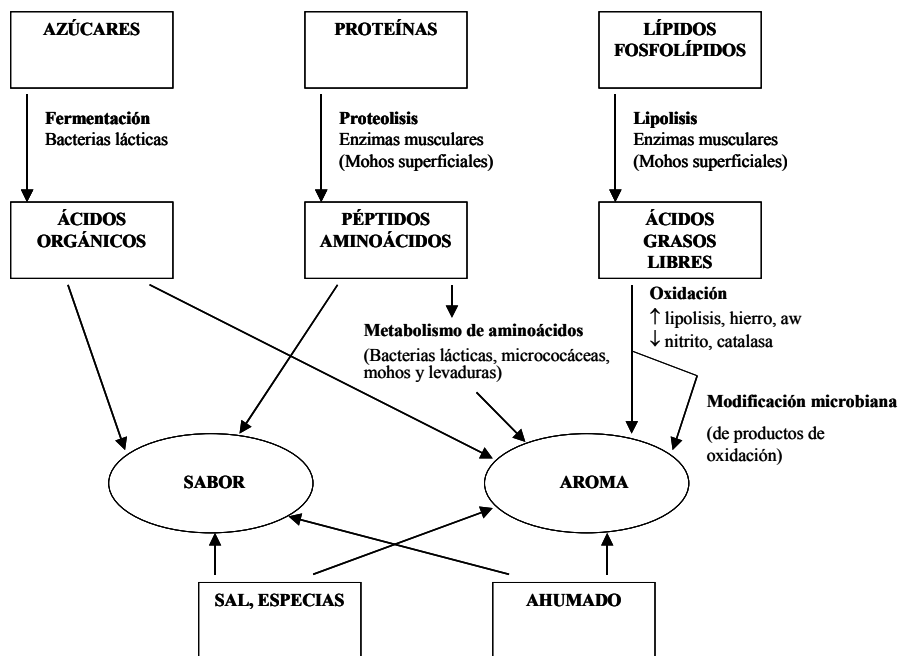


Figura 1. Principales mecanismos de generación de sabor y aroma a lo largo de la maduración de embutidos fermentados (adaptado de Hammes *et al.*, 2003)

1.2.1. Fermentación de hidratos de carbono

Las bacterias lácticas, integrantes de la flora natural o inoculada como iniciadores son las principales responsables de la fermentación que se lleva a cabo generalmente por vía homofermentativa (ver apartado 1.3.1). Para favorecer el desarrollo de la flora láctica y la acidificación se adiciona una adecuada fuente de carbono, generalmente glucosa, dextrinas o lactosa (Garriga *et al.*, 1988). Este

proceso va a producir la reducción del pH necesaria para evitar el crecimiento de los microorganismos alterantes y patógenos y garantizar la seguridad sanitaria del producto (Lücke, 2000). También ejerce una función tecnológica ya que de este modo se alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas reduciendo la capacidad de retención de agua, lo que facilita el secado y el desarrollo de la consistencia típica de estos productos. Los ácidos mayoritarios generados son, el láctico y en mucha menor medida al acético, y son también responsables del sabor ácido del embutido. Ramihone *et al.* (1988) encontró una correlación positiva entre el sabor ácido y el isómero D- del ácido láctico, cuyo origen es microbiano. Además, el metabolismo de los azúcares, que parcialmente puede ocurrir por vía heterofermentativa, puede generar distintos compuestos, como el etanol que, tras reacciones secundarias es convertido en ésteres de etilo dándole al embutido un matiz afrutado (Stahnke, 1994, Montel *et al.*, 1996), o el diacetilo y la acetoina resultantes del metabolismo del piruvato que confiere aromas a mantequilla (Berdagué, *et al.*, 1993).

1.2.2. Lipolisis

Los lípidos están estrechamente relacionados con la calidad de la carne y los productos cárnicos, no solamente por su valor nutritivo sino también por sus propiedades sensoriales como la terneza, el color, y especialmente la jugosidad, aroma y sabor (Allen y Foegeding 1981). Las modificaciones de los lípidos comienzan inmediatamente después de la muerte del animal, y en estos cambios van a estar involucrados fenómenos de lipolisis y oxidación.

En la elaboración de embutidos curados fermentados se observa una intensa lipolisis, como es el caso del sachichón y el chorizo (Lois *et al.*, 1987; Dominguez y Zumalacarregui, 1991, Navarro *et al.*, 1997). Dicha lipolisis produce ácidos grasos que, cuando son insaturados, son muy sensibles a los fenómenos de oxidación. Los productos que se forman a partir de la oxidación, tales como las cetonas, aldehídos, alcoholes, ésteres y alcanos, contribuyen al aroma de los embutidos fermentados (Johansson *et al.*, 1994, Marco *et al.*, 2004).

La lipolisis en embutidos curados fermentados es debida casi en su totalidad a la acción de enzimas endógenas musculares (Montel *et al.*, 1993). Diversos

autores, no encontraron diferencias en la producción de ácidos grasos libres en embutidos fabricados con la presencia de antibióticos que suprimen el crecimiento microbiano, en relación a los producidos normalmente (Molly *et al.*, 1996, Hierro *et al.*, 1997 y Kenneally *et al.*, 1998). La adición de microorganismos lipolíticos tiene un efecto poco pronunciado sobre la formación de ácidos grasos libres y según Molly *et al.*, (1997) entre el 60-80 % de dicha formación es debida a las enzimas endógenas musculares. Esto parece deberse a que las lipasas de los microorganismos son inhibidas por el pH ácido del embutido (Montel *et al.*, 1996 y Hierro *et al.*, 1997). Sin embargo, una vez formados los ácidos grasos libres, los microorganismos sí parecen ejercer gran influencia sobre su conversión en compuestos aromáticos. Así, combinaciones de cultivos iniciadores que incluyen cepas de *Staphylococcus carnosus* o *S. xylosus* se han utilizado para modular el aroma del embutido actuando en la formación de compuestos volátiles mediante distintos mecanismos (Berdagué *et al.*, 1993, Stahnke, 1994, Montel *et al.*, 1996).

1.2.3. Proteolisis

El sabor de la carne viene determinado por compuestos hidrosolubles, entre los que se encuentran los aminoácidos, péptidos, nucleótidos, azúcares y ácidos orgánicos (Nishimura *et al.*, 1988a). Nishimura y Kato (1988b) han revisado la función que los aminoácidos y los péptidos tienen en el sabor, estableciendo cinco sabores primarios; dulce, ácido, salado, amargo y umami. El sabor “umami” o de caldo de carne, es también descrito como una sensación de llenado de boca o “mouthfilling” y su representante más típico lo encontramos en la sal sódica del ácido glutámico (glutamato monosódico), ampliamente utilizado en la industria como potenciador del sabor. Otros compuestos, como son los dos dipéptidos naturales carnosina (β -Alanina-Histidina) y anserina (β -Alanina-1-metil-histidina) presentes en la carne, contribuyen al sabor amargo (Nishimura *et al.*, 1988a). En la tabla 1, se muestra el sabor que pueden proporcionar diferentes sustancias presentes o generadas en el curado de embutidos.

Tabla 1. Sabores de los componentes resultantes de la actuación enzimática (adaptado de Nishimura y Kato, 1988).

| Sabor | Componentes |
|--------|--|
| Dulce | Glicina, alanina, serina, treonina, lisina, prolina, hidroxiprolina Glucosa |
| Ácido | Ácidos aspártico y glutámico, histidina, asparagina Ácidos láctico, succínico y pirúvico Péptidos |
| Amargo | Fenilalanina, arginina, metionina, histidina, valina, leucina, isoleucina, triptófano, tirosina Anserina, carnosina, otros péptidos Creatina, creatinina, hipoxantina |
| Salado | Glutamato y aspartato Péptidos |
| Umami | Glutamato y aspartato monosódico, 5'-mononucleótidos Péptidos |

En los embutidos, la cantidad de aminoácidos libres aumenta a lo largo del proceso de maduración (DeMasi, *et al.*, 1990, Díaz *et al.*, 1993 y 1996, Mateo J. *et al.*, 1996, Zapelena M.J. *et al.*, 1997 y Bolumar *et al.*, 2001). Henriksen y Stahnke (1997) estudiaron las fracciones peptídicas de embutidos fermentados, analizando su composición y su relación con el sabor, concluyendo que las fracciones que contenían los péptidos más pequeños y aminoácidos potenciaban los sabores amargo, ácido y salado; que la mayoría de péptidos estaban compuestos por aminoácidos hidrofílicos; y que el sabor amargo se correlacionaba con el nivel de aminoácidos hidrofóbicos. Sin embargo, también existen estudios que indican que una mayor producción de aminoácidos no siempre implica un sabor más intenso. De Masi *et al.*, (1990) encontraron que productos con una composición de aminoácidos diferente, poseían idénticas características sensoriales y Diez *et al.*,(1996) consiguieron acelerar la maduración adicionando “papaína” lo que

producía una mayor cantidad de aminoácidos libres, sin que se viera afectada la percepción sensorial final.

En el embutido, la proteólisis se debe a la acción conjunta de los sistemas enzimáticos muscular y microbiano (Figura 2) pero hasta la fecha no se conoce totalmente cuál es la participación de cada uno de estos sistemas. La hidrólisis primaria de proteínas a polipéptidos es realizada mayoritariamente por enzimas musculares endógenas, ya que la degradación proteica observada en un embutido, sin o con antibióticos que inhiben el crecimiento microbiano, fue similar (Verplaetse, 1994). Además, los embutidos con antibióticos, acidificados con gluconolactona hasta un pH por debajo de 5.0, mostraron mayor grado de hidrólisis proteica lo que indicaba que las proteasas musculares activas a pH ácido estaban involucradas en el proceso (Verplaetse, 1994). Así, uno de los parámetros que controlan en mayor medida el grado de hidrólisis es el pH. Con el uso de inhibidores específicos de proteasas pudo averiguarse que las enzimas responsables eran principalmente la catepsina D y, en segundo lugar, las cisteín proteasas, catepsinas B y L. Esto fue confirmado por Molly *et al.* (1997), quienes observaron que la adición del inhibidor de la catepsina D (pepstatina) reducía el grado de hidrólisis de las proteínas musculares y, por extensión, la producción de péptidos, aminoácidos libres y amoníaco, al detener la cadena proteolítica en su primera fase. No obstante, algunos autores han sugerido la posibilidad de que los microorganismos participen, al menos, en la hidrólisis primaria de proteínas sarcoplásmicas musculares (Sanz *et al.*, 1999, Fadda *et al.*, 2001).

La hidrólisis secundaria de los polipéptidos a pequeños péptidos y aminoácidos se estableció que era debida en un 40 % a la acción de enzimas de origen microbiano y en un 60 % de origen muscular (Verplaetse, 1994). Esto fue reafirmado por Molly *et al.* (1997) ya que volvieron a observar que la adición de antibióticos se traducía en una reducción de la producción de aminoácidos libres (50 %) y amoníaco, y una mayor acumulación de polipéptidos. La identificación de las peptidasas responsables de esta hidrólisis secundaria es bastante más compleja ya que intervienen ambos sistemas y es difícil discernir entre enzimas de origen muscular o de origen microbiano. Cabe destacar que el pH es también decisivo en la proteólisis. Así, los embutidos fermentados con pH más ácidos (4.6) se caracterizan por una alta concentración de péptidos y poca producción de

amoniaco, mientras que los embutidos menos ácidos (pH = 5.8) tienen bajas concentraciones de péptidos y aminoácidos libres y altas concentraciones de amoniaco. Los embutidos de pH intermedio (4.9) combinan una baja concentración de péptidos con una alta concentración aminoácidos libres y de amoniaco (Verplaetse, 1994).

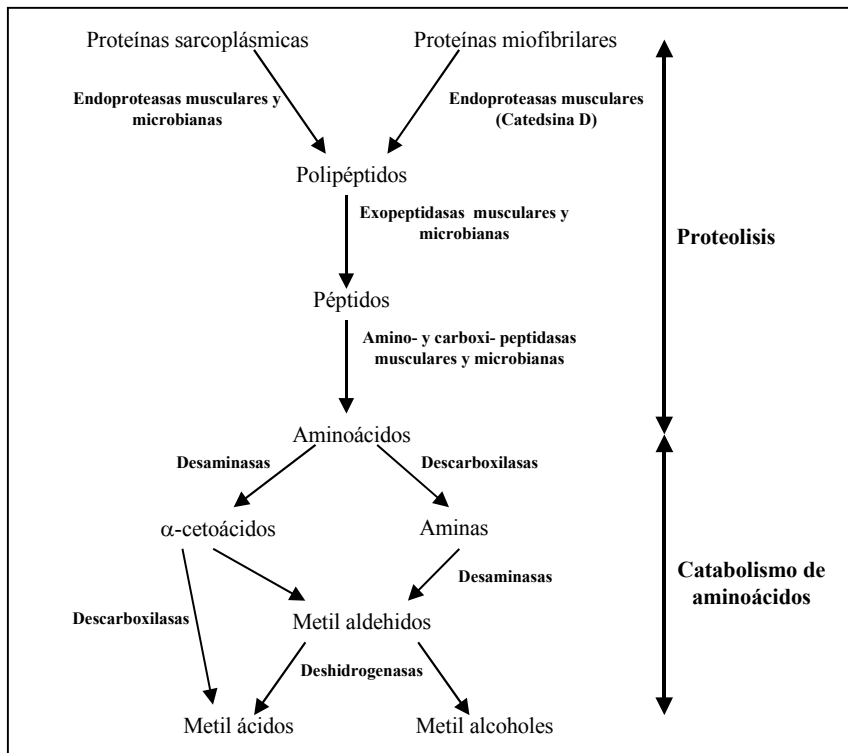


Figura 2. Principales mecanismos y enzimas involucradas en la degradación de las proteínas musculares y en el catabolismo de aminoácidos (adaptado de Talon *et al.*, 2002)

La metabolización de los aminoácidos libres puede generar aminas, α -cetoácidos, amoniaco y compuestos aromáticos mediante reacciones químicas como la reacción de Strecker (Ventanas *et al.*, 1992) y enzimáticas por acción de descarboxilasas, desaminasas, desamidadas y transaminasas (Ordóñez *et al.*, 1999, Talon *et al.*, 2002). Las aminas biógenas se originan por acción de descarboxilasas

bacterianas (Hernandez-Jover *et al.*, 1996) y, dado que son tóxicas, debe evitarse su formación a través de la selección y utilización de cultivos iniciadores que no las produzcan o que las metabolizen. Por otro lado, la formación de compuestos volátiles a partir de aminoácidos tiene gran importancia en el desarrollo de las propiedades sensoriales (Stahnke, 1995). Así, la degradación de los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina, valina), fenilalanina y metionina genera aldehidos, alcoholes y ácidos importantes en el aroma de embutidos fermentados como son; 2- y 3- metilbutanal, 2- metilpropanal, y 2- y 3- metilbutanol (Stahnke, 2002). Aunque no está claramente establecida la función relativa de las enzimas musculares y microbianas en el catabolismo de aminoácidos, se ha observado que puede ser modulada por la flora inoculada destacando la función, en este caso, de los miembros del género *Staphylococcus*, como *S. warneri*, *S. saprophyticus* y *S. carnosus* que parecen tener una repercusión más importante que las bacterias lácticas, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentosaceus* (Berdagué *et al.*, 1993 Montel *et al.*, 1996). Existen pruebas que indican que los mohos y las levaduras también parecen estar implicados de forma significativa en estas transformaciones catabólicas (Bruna *et al.*, 2001b, Durá, 2003).

En resumen, la hidrólisis de tipo endoproteolítico es debida en gran medida a la catepsina D muscular, que es activada a pH ácido, y la principal contribución de los microorganismos está relacionada con la hidrólisis secundaria de oligopéptidos y péptidos pequeños y con la generación de aminoácidos libres, y su degradación generando amoniaco, aminas y compuestos aromáticos (Molly *et al.*, 1997, Ordóñez *et al.*, 1999).

1.3. Microbiología de embutidos curados fermentados y uso de cultivos iniciadores

La flora inicial del embutido es extremadamente variable y depende en gran medida de la carga microbiana de la carne utilizada como materia prima y de la contaminación ambiental. La carne es muy rica en nutrientes y factores de crecimiento, que junto a una alta actividad de agua 0.96-0.97 y un pH próximo a la neutralidad (5.6-5.8), constituye un sustrato idóneo para el crecimiento de un gran número de microorganismos. No obstante, las condiciones de la mezcla cárnica una vez embutida favorecen el crecimiento de bacterias lácticas y *Micrococcaceas*.

Rápidamente, se produce la acidificación por fermentación alcanzándose un bajo pH que evita el crecimiento de las bacterias indeseables, fundamentalmente el de las enterobacterias y entre ellas, *Salmonella* y *Escherichia coli*.

Las bacterias lácticas, especialmente de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* integrantes de la flora natural o bien inoculados como cultivos iniciadores, se convierten rápidamente en la flora predominante. Este grupo microbiano es el responsable de la fermentación además de ser el más competitivo. El segundo grupo bacteriano predominante está integrado por micrococáceas como *Kocuria* (ex *Micrococcus*) o *Staphylococcus* que frecuentemente se adicionan junto a las bacterias lácticas como cultivos iniciadores. En ocasiones se aplican también superficialmente mohos, especialmente, *Penicillium nalgiovensis*, y levaduras como *Debaryomyces hansenii* que imparten unas características sensoriales típicas. Las implicaciones del uso de cada uno de ellos se describen en los sucesivos apartados correspondientes.

En general, el uso de cultivos iniciadores presenta importantes ventajas ya que garantizan la seguridad sanitaria del producto, permiten acelerar el proceso de fabricación y se logra una mayor homogeneidad de la calidad global del producto, mejoras de las propiedades sensoriales e incluso mejoras nutritivas o de salud mediante la incorporación de bacterias lácticas funcionales.

1.3.1. Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas (BL) crecen rápidamente durante la fermentación alcanzando niveles de 10^8 - 10^9 u.f.c./ g, que se mantienen prácticamente estables hasta el final del secado. Las principales bacterias lácticas implicadas en estos procesos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, y se caracterizan por producir ácido láctico como principal producto final de la fermentación de carbohidratos. Las especies más utilizadas como cultivos iniciadores en embutidos curados fermentados son: *Lactobacillus plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* y *P. acidilactici* (Leistner, 1995),.

La participación de este grupo microbiano es decisiva para el aseguramiento de la calidad higiénico-sanitaria del embutido pues son las responsables de la reducción del pH y producción de ácidos orgánicos (láctico y acético). Además, producen compuestos de bajo peso molecular (< 1000 Daltons) (ácidos orgánicos)

y otros de naturaleza proteica (bacteriocinas) que también contribuyen a su actividad antimicrobiana, facilitando su implantación e inhibiendo el desarrollo de microorganismos no deseados como *Listeria*, *Clostridium* y *Staphylococcus* (Stiles, 1996, Schillinger, *et al.*, 1996, Hugas *et al.*, 1998).

Algunas especies, particularmente *L. sake* y *L. curvatus*, pueden producir peróxido de hidrógeno que conduce a la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y de los compuestos responsables del color, generando rancidez y decoloración (Geisen *et al.*, 1992). No obstante, la producción simultánea de catalasa evita la acumulación de peróxido de hidrógeno y su presencia o ausencia también depende de las especies. Así, son catalasa positivas *L. casei* y *L. plantarum*, y es catalasa negativa, *L. curvatus* (Hammes y Hertel, 1998).

La actividad lipolítica de las bacterias lácticas se considera débil, pero no así su actividad proteolítica, que ha sido estudiada especialmente en diferentes especies de *Lactobacillus* como *L. curvatus*, *L. sake* y *L. plantarum* (Fadda *et al.*, 1999 a y b). Las cepas estudiadas fueron capaces de hidrolizar proteínas de músculo porcino y, concretamente, la cepa *L. casei* CRL 705 fue capaz además, de utilizar los péptidos liberados a partir de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares en las condiciones de maduración de embutidos fermentados (Sanz *et al.*, 1999, Fadda *et al.*, 2001).

1.3.2. *Micrococcaceae*

Las bacterias pertenecientes a la familia *Micrococcaceae* alcanzan en el embutido densidades de 10^5 – 10^7 u.f.c./g. Las especies predominantes son *Kocuria varians* (ex *Micrococcus varians*; Stackebrandt *et al.* 1995), *Staphylococcus carnosus* y *S. xylosus* (Hammes *et al.*, 2003). El crecimiento de estos microorganismos se ve inhibido por la reducción de pH y se encuentran fundamentalmente en las capas superficiales del embutido donde existe una más alta presión parcial de oxígeno.

Este grupo microbiano es muy importante en la producción de embutidos curados fermentados por su actividad nitrato reductasa que es la responsable de la reducción del nitrato a nitrito, compuesto que tiene un efecto antimicrobiano y antioxidante con lo cual previene la oxidación lipídica. Posteriormente, el nitrito se reduce a óxido nítrico, por reducción química o enzimática, que al unirse a la

mioglobina da el color típico del embutido. Además, las micrococáceas contribuyen a la reducción del nitrito residual en el producto final. También, poseen actividad catalasa de importancia como se señalaba, para la protección del color y prevención de la rancidez.

Cepas de *Kocuria varians*, *S. carnosus* y *S. xylosus* han demostrado tener actividad lipolítica aunque esta actividad, era inhibida a valores de pH inferiores a 6, lo que limita su actividad en productos fermentados (Montel *et al.*, 1996, Hierro *et al.*, 1997). Sin embargo, su actuación a nivel de la oxidación lipídica y formación de compuestos volátiles parece tener influencia en el desarrollo del aroma. Por ejemplo, el aroma a salami se ha correlacionado con mayores niveles de ésteres de etilo y 2-alcanonas y con niveles altos de *S. xylosus* (Stahnke, 1995). Diferentes cepas de *Staphylococcus* han demostrado ejercer distintos efectos sobre la formación de compuestos volátiles (Berdagué *et al.*, 1993). Además, las micrococáceas tienen cierta actividad proteolítica (Selgas *et al.*, 1993) y su implicación en la hidrólisis proteica ha sido sugerida por Chen y Guo (1992) y Kenneally *et al.*, (1999), señalando concretamente que *K. varians* podría tener importancia en la formación de aminoácidos libres. No obstante, se sabe que la actividad aminopeptidásica de *Staphylococcus* y *Kocuria* es considerablemente más baja que la de las bacterias lácticas (Montel *et al.*, 1992). Las micrococáceas también se han relacionado con el catabolismo de aminoácidos y así, por ejemplo, *S. warneri*, *S. saprophyticus* y *S. carnosus* son capaces de producir compuestos aromáticos derivados del catabolismo de la leucina como el 3-metil butanoico, 3-metil butanal y 3 metil butanol (Montel *et al.*, 1998, Talon *et al.*, 2002).

1.3.3. Mohos

Los mohos son microorganismos aerobios por lo que su crecimiento es fundamentalmente superficial alcanzando valores de 10^5 – 10^7 u.f.c./ cm². Las especies dominantes en estos productos son las pertenecientes al género *Penicillium* y, dentro de éste, *P. nalgiovensis* y, en menor medida, *P. chrysogenum*. Estas especies, junto a *P. camemberti*, son las empleadas como cultivos iniciadores superficiales (López *et al.*, 2001). Estos mohos metabolizan los ácidos orgánicos y ejercen una desaminación oxidativa de los aminoácidos

produciendo amonio que eleva el pH de los embutidos y potencia el aroma y sabor típicos (Marchesini *et al.* 1992).

Además, su inoculación en superficie previene la colonización por hongos no deseables productores de antibióticos o micotoxinas, contribuyen a la apariencia externa formando un velo generalmente blanco y al desarrollo del sabor y del aroma mediante sus actividades proteolíticas y lipolíticas, y la posterior transformación de aminoácidos y ácidos grasos libres. Sus actividades proteolítica y lipolítica han sido constatadas en especies de *Penicillium*, *Mucor* y *Aspergillus* (Trigueros *et al.*, 1995, Toledo *et al.*, 1997, Selgas *et al.*, 1999, Lücke *et al.*, 2000). Bruna *et al.*, (2000 y 2001 a y b) consiguieron mejorar las características sensoriales de un embutido fermentado inoculando *Mucor racemosus* o *Penicillium aurantiogriseum* superficialmente, adicionando extractos intracelulares del mismo o por una combinación de ambos tratamientos.

1.3.4. Levaduras

La flora de levaduras de los embutidos curados fermentados ha sido escasamente estudiada debido a que los géneros más comunes se encuentran en baja proporción en comparación con la flora bacteriana y, por tanto, algunos autores han indicado que su participación en el curado debe ser mínima (Cook, 1995). No obstante, la alta concentración de sal y baja actividad de agua, junto a la acidez típica de un embutido fermentado, favorecen el crecimiento de ciertas especies de levadura. Por otro lado, el tamaño de una célula de levadura es aproximadamente 100 veces mayor que el de una célula bacteriana (Dillon y Board, 1991). Las levaduras se encuentran en embutidos fermentados en una densidad que varía entre 10^3 y 10^5 u.f.c/ g a lo largo del proceso de fabricación siendo *D. hansenii* (teleomorfo o forma perfecta de *Candida famata*) la especie dominante en el proceso (Metaxapoulus *et al.*, 1996, Santos-Mendoza, 2000, Encinas *et al.*, 2000, Coppola *et al.* 2000). El crecimiento de levaduras se ve favorecido en procesos tradicionales, sin ahumado, y en embutidos de diámetro pequeño y se ve perjudicado en procesos acelerados (industriales), con ahumado, con diámetros gruesos y por el uso de sorbatos (Encinas *et al.*, 2000).

Los géneros más frecuentemente aislados de embutidos fermentados varían en función del estudio considerado. Comi y Cantoni, (1980), detectaron

Debaryomyces, *Rhodotorula*, *Hansenula* y *Torulopsis* como géneros mayoritarios. Samelis *et al.*, (1994) apreciaron un predominio de *Debaryomyces* en embutidos griegos seguido de *Candida* y *Pichia*, y en proporción muy pequeña *Cryptococcus*, *Torulopsis* y *Trichosporon*. Buzzini y Haznedari (1995) encontraron un 62,1 % de aislados del género *Debaryomyces* en salamis italianos, de los cuales un 50,0 % pertenecían a la especie *D. hansenii*, un 18,2 % de *Candida*, un 12,9 % de *Rhodotorula*, un 4,3 % de *Zygosaccharomyces* y un 2,6 % de *Trichosporon*. Santos-Mendoza (2000) detectó en embutidos fermentados españoles los siguientes géneros en orden de abundancia *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Yarrowia*, *Trichosporon* y *Pichia*. En concreto, la masa cárnica inicial de un embutido artesanal tras 24 horas de premaduración presentó un 40 % de aislados del género *Debaryomyces*, un 30 % de *Rhodotorula* y un 20 % de *Candida*, el resto de géneros no sobrepasaron el 10 %. Similares valores se observaron para embutidos industriales, con la excepción de que en éstos, *Debaryomyces* supuso el 50 % de la flora levaduriforme. *Debaryomyces* se impuso también a lo largo del curado alcanzando valores del 90 % del total de levaduras y observando, por tanto, una menor variedad de especies que en el embutido artesanal (Santos-Mendoza, 2000).

Diversos autores han indicado que la utilización de levaduras en combinación con bacterias lácticas produce un incremento del contenido de amonio y una reducción de los ácidos láctico y acético que favorece el desarrollo del aroma y sabor de los embutidos (Coretti, 1977; Gehlen *et al.* 1991; Larpent-Gourgaud *et al.* 1993, Santos-Mendoza, 2000, Durá *et al.*, 2002 y Durá, 2003). Además, las levaduras contribuyen a la estabilización del color desplazando el oxígeno y degradando peróxidos gracias a su actividad catalasa. Por otro lado, la contribución al aroma y al sabor se atribuye a su actividad proteolítica y lipolítica por lo que resultan de gran interés para el curado (Leistner, 1986, Geisen *et al.*, 1992, Hammes y Knauf, 1994, Jessen, 1995, Encinas *et al.*, 2000 y Olensen y Stahnke, 2000).

1.4. El género *Debaryomyces*

1.4.1. Descripción del género *Debaryomyces*

El género *Debaryomyces* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae* y, dentro de él se reconocen 15 especies: *D. carsonii*, *D. castellii*, *D. coudertii*, *D. etchellsii*, *D. hansenii*, *D. maramus*, *D. melissophilus*, *D. nepalenses*, *D. occidentalis*, *D. polymorphus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. robertsiae*, *D. udenii*, *D. vanrijiae* y *D. yamadae* (Kurtzman y Fell, 1998, Barnet *et al.* 2000). La comparación de las secuencias de ARN ribosomal dio lugar a la transferencia de varias especies de otros géneros y, principalmente, de la especie *Schwanniomyces occidentalis* al género *Debaryomyces* (Kurtzman y Robnett, 1991). La especie *Debaryomyces hansenii* se subdivide en dos subespecies, *hansenii* y *fabryii* (Kurtzman y Fell, 1998, Barnet *et al.* 2000). Estas subespecies se pueden distinguir por la diferente movilidad electroforética de sus respectivas glucosa-6-fosfato deshidrogenasas y por las temperaturas máximas de crecimiento que presentan, 31-35 °C para la subespecie *hansenii* y 36-39 °C para la subespecie *fabryii* (Kurtzman y Fell, 1998 y Barnet *et al.*, 2000).

D. hansenii es un ascomiceto, esto es, una levadura con capacidad de reproducción sexual por ascosporas. *Candida famata* es la forma imperfecta (carece de reproducción sexual) de *D. hansenii*. Su reproducción asexual es por gemación multipolar. Se aísla de diversos ecosistemas como el suelo, plantas, alimentos y muestras clínicas. En alimentos, este género se ha encontrado fundamentalmente en carne y productos cárnicos, productos lácteos, frutas y granos de café fermentados (Boekhout y Robert, 2003).

En general, no se conoce mucho acerca del metabolismo del género *Debaryomyces*. No obstante, se sabe que las especies de este género son anaerobias facultativas y que pueden metabolizar diferentes azúcares como la glucosa, sacarosa, galactosa, lactosa, almidón soluble, etanol, glicerol, succinato, D y L-lactato y citrato (Nakase *et al.*, 1998). La especie *D. hansenii* posee lipasas intra- y extracelulares que hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos, que posteriormente son metabolizados fundamentalmente por β -oxidación (Besançon *et al.*, 1992, Sorensen y Samuelsen, 1996, Sorensen, 1997.). Son capaces de

asimilar numerosas fuentes de nitrógeno como sulfato amónico, urea, nitrito, bases púricas y aminoácidos (Kurtzman y Fell, 1998, Barnet *et al.* 2000).

Recientemente se ha secuenciado el genoma completo de *D. hansenii*, con lo que se abre paso a futuras exploraciones sobre las funciones de los genes que en su mayoría son desconocidas (Prista *et al.*, 2002, Sherman *et al.*, 2004).

1.4.2. Propiedades e importancia de *Debaryomyces hansenii* en procesos de curado

Las levaduras de embutidos fermentados se encuentran fundamentalmente en la superficie o en las capas más externas del embutido al ser aerobias o microaerófilas. *D. hansenii* es una especie caracterizada por su tolerancia a la sal (Kurita y Yamazaki, 2002), que junto con la resistencia al pH ácido y a las bajas actividades de agua (Wyder y Puhán, 1999) y su capacidad para crecer a bajas temperaturas (Fleet, 1990) explican su presencia en los embutidos fermentados, así como en la maduración de quesos, (Pereira-Dias *et al.*, 2000, Petersen *et al.*, 2002). Su actividad metabólica permite el consumo de oxígeno, produciendo una estabilización del color del embutido (Jessen, 1995). También ejerce un efecto protector frente a la luz y el oxígeno, que junto a su actividad catalasa puede retrasar el comienzo del enranciamiento (Leistner, 1995). Además, produce una mejora del aroma gracias a su acción sobre las proteínas y las lípidos (Jessen, 1995) y metaboliza ácidos orgánicos (láctico y acético fundamentalmente) y aminoácidos generando amoníaco, lo que globalmente incrementa el pH y modifica el sabor (Coretti, 1977; Gehlen *et al.* 1991; Larpent-Gourgand *et al.* 1993, Santos-Mendoza, 2000, Durá *et al.*, 2002 y Durá, 2003).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado el posible efecto protector de esta especie frente a la microbiota no deseada. Droby y Chalutz (1989) demostraron su efectividad en el control de *Penicillium digitatum* en las uvas. Fatichente *et al.*, (1983) comprobaron el efecto antagónico de estas levaduras frente a dos bacterias alterantes del queso (*Clostridium tyrobutyricum* y *Cl. butyricum*). En estudios posteriores, se demostró que una cepa de *D. hansenii* era capaz de inhibir a *Staphylococcus aureus* en embutidos fermentados mediante el consumo del oxígeno (Meisel *et al.*, 1989). Sin embargo, Gehlen *et al.*, (1991) señalaron también el efecto inhibitorio que *D. hansenii* ejercía sobre el crecimiento

de otras especies del género *Staphylococcus*, lo cual no es deseable porque estos microorganismos resultan esenciales en el proceso. Actualmente, se utilizan cepas de *D. hansenii* como cultivo iniciador para aplicación en superficie y en masas. Los mejores resultados se obtienen cuando se combinan cultivos de bacterias lácticas, micrococáceas y levaduras (Gehlen *et al.*, 1991, Jessen, 1995).

La mayoría de estudios relacionados con la aplicación tecnológica de *D. hansenii* para mejorar el aroma y el sabor a lo largo de la maduración, han sido llevados a cabo en productos lácteos. La actividad lipolítica y proteolítica de levaduras ha sido objeto de varios estudios relacionados con el proceso de maduración de quesos (Wyder y Puhan, 1999, Freitas *et al.*, 1999, van den Tempel y Jakobsen, 2000, Leclercq-Perlat *et al.*, 2000, Addis *et al.*, 2001, Corseti *et al.*, 2001, Ferreira y Viljoen, 2003), y de embutidos curados (Gehlen *et al.*, 1991, Sorensen y Samuelson, 1996, Sorensen, 1997, Olensen y Stahnke, 2000, Durá, 2003 y Martín *et al.*, 2003).

Sorensen y Samuelson, (1996) y Sorensen, (1997) comprobaron la capacidad de ésta especie para hidrolizar la grasa de cerdo aunque dicha capacidad se veía limitada a pH ácido. Martín *et al.*, (2003) atribuyeron a esta especie la generación de alcoholes cíclicos y aromáticos de interés para el desarrollo del aroma de productos curados. Durá (2003) demostró que *D. hansenii* ejercía un efecto positivo en el aroma, al inhibir la oxidación lipídica y promover la generación de ésteres de etilo; aunque señaló que su inoculación en exceso podía producir una alta generación de ácidos, enmascarando su efecto positivo. La producción de diacetilo y acetoína a partir de ácido láctico fue probada por Deiana *et al.*, (1990) lo que también podría resultar de interés para el aroma del embutido.

El conocimiento de la importancia de *D. hansenii* en la proteólisis de los productos curados es muy limitado. Existen algunos estudios en jamón curado. Por ejemplo, Comi *et al.*, (1982), atribuyó la presencia de los cristales de tirosina a la actividad proteolítica de cepas de *D. hansenii* y Martín (2000) concluyó que la inoculación conjunta de *D. hansenii* y *P. chrysogenum* en la superficie del jamón provocaba, durante su maduración, una mayor hidrólisis de proteínas miofibrilares con aumento significativo de aminoácidos libres. En embutidos fermentados, los estudios se han limitado a evaluar, mediante estudios en placa, la capacidad potencial de determinadas cepas para hidrolizar proteínas (Comi y Cantoni, 1980,

Buzzini y Haznedari, 1995 y Santos-Mendoza, 2000), ensayos que evalúan fundamentalmente la actividad de tipo endoproteolítico extracelular. Kumura *et al.*, (2002) demostraron que una cepa de *D. hansenii* aislada de quesos era capaz de hidrolizar caseína señalando que su actividad proteolítica era mayoritariamente intracelular y que, por tanto, su contribución a la proteólisis dependería del grado de lisis así como del nivel de dicha actividad. En resumen, la mayoría de estudios sobre el sistema proteolítico de *D. hansenii* se han llevado a cabo en quesos y con cepas aisladas de estos productos y, en menor medida, en productos cárnicos. Además, son estudios que tan sólo han abordado sus efectos globales, sin que existan estudios bioquímicos en los que se describan las características del sistema proteolítico de *D. hansenii* responsable de estos cambios.

Cepas de la especie *D. hansenii* se comercializan actualmente como cultivos iniciadores pese a que su caracterización metabólica es todavía muy limitada. El aislamiento de nuevas cepas a partir del ecosistema al que se va a aplicar constituye una alternativa para diversificar y/o mejorar las actuales. Con este propósito, Santos-Mendoza (2000) en la Tesis doctoral que precedió a ésta, estudió la flora levaduriforme autóctona de embutidos curados fermentados. Inicialmente, se aislaron alrededor de 250 cepas, y tras su caracterización molecular, se demostró que mayoritariamente pertenecían a la especie *D. hansenii*. Después de una serie de pruebas fisiológicas se seleccionaron 8 cepas del género *Debaryomyces* con las que se estudió su implantación en un proceso de fabricación de embutidos lo que permitió la selección de las cepas de *D. hansenii* CECT 12487 y CECT 12488 con miras a su posible utilización como cultivos iniciadores por su mayor competitividad (porcentaje de aislamiento superior al 80 %) y porque correspondían a patrones mitocondriales distintos (aumento de la diversidad).

1.5. El sistema proteolítico de levaduras

1.5.1. Clasificación de las enzimas proteolíticas

El término proteasas fue introducido a finales del siglo XIX y comprende un grupo importante de enzimas codificados por aproximadamente el 2 % de los genes (Rawlings y Barret, 1999) siendo de gran importancia en medicina y biotecnología. Una primera clasificación las divide en proteinasas o endoproteasas,

las cuales cortan las cadenas polipeptídicas internamente produciendo grandes fragmentos (Grassmann y Dyckerhoff, (1928); y exopeptidasas, que cortan las cadenas polipeptídicas actuando en los extremos o cerca de éstos liberando pequeños péptidos o aminoácidos (Bergmann y Ross, 1936). Estas últimas se dividen en amino- o carboxi- peptidasas según actúen en uno u otro extremo de la cadena polipeptídica. El término recomendado por el “Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) para referirse de forma general a las enzimas proteolíticas es el de peptidasa, que significa hidrolasa que corta el enlace peptídico. Pese a esto, el término utilizado más comúnmente para todo este grupo de enzimas es el de proteasas o enzimas proteolíticas. Éstas también pueden clasificarse dependiendo de la naturaleza química del centro catalítico y, actualmente, se establecen 5 grupos; aspártico-, cisteín-, metalo-, serín- y treonín- proteasas. Las treonín proteasas fueron recientemente añadidas a los 4 grupos que clásicamente se reconocían (Seemuller *et al.*, 1995).

Hasta la actualidad, se han investigado muy poco los sistemas proteolíticos de levaduras a excepción del de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, que ha sido estudiada ampliamente en todos los sentidos ya que sirve como modelo de eucariotas. También han sido objeto de estudio las enzimas del sistema proteolítico de *Candida*, sobre todo de la especie *C. albicans* por su relación con la patogenicidad (Farley *et al.*, 1986) y de otras especies como *Kluyveromyces lactis* y *K. marxianus* por su interés en fermentaciones alimentarias (Flores *et al.*, 1999, Ramírez-Zavala *et al.*, 2003). No obstante, el único sistema proteolítico que se conoce con detalle es el de *S. cerevisiae* y, por ello, se ha considerado como referencia para el desarrollo y discusión de esta Tesis Doctoral.

1.5.2. El sistema proteolítico de *Saccharomyces cerevisiae*

Los compuestos nitrogenados son esenciales para el crecimiento y metabolismo de levaduras. Éstas pueden utilizar una gran variedad de fuentes de nitrógeno como sulfato amónico, urea, bases nitrogenadas, aminoácidos y también péptidos gracias a que poseen actividades peptidásicas que permiten la hidrólisis de éstos en aminoácidos libres (Hofman-Bang, 1999). De hecho es conocido que la adición de peptonas, triptonas y otros hidrolizados de origen animal o vegetal

estimulan el crecimiento de las levaduras. Las principales enzimas proteolíticas se localizan en la vacuola (lisosoma), aunque no exclusivamente ya que existen proteasas en el citoplasma, en el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi, en las mitocondrias y en las membranas que rodean a todos estos orgánulos (Achstetter y Wolf, 1985, Leonhard *et al.*, 2000).

Las enzimas proteolíticas participan en numerosos procesos esenciales para la célula como el recambio proteico, la degradación de proteínas aberrantes, el correcto procesamiento de proteínas, la adaptación a condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno o alta demanda (esporulación o meiosis) y la inactivación catabólica. Más de 40 enzimas proteolíticas han sido descritas en *S. cerevisiae*, algunas de ellas están bien caracterizadas mientras que muchas otras, por el contrario, sólo han sido identificadas y se desconocen sus características y sus funciones. No hay duda que el conocimiento sobre los procesos proteolíticos conocidos hasta la fecha representan sólo la punta del iceberg. A continuación, se detallan los aspectos más importantes del sistema proteolítico de *S. cerevisiae*.

En función de su localización, las proteasas se pueden clasificar en 3 grandes grupos; los proteasomas (citoplásmico), las proteasas vacuolares y las proteasas de la ruta secretora.

Los proteasomas

Los proteasomas son proteasas citoplásmicas de gran tamaño, también denominadas proteasas multicatalíticas. En *S. cerevisiae* se han descrito dos proteasomas. El proteasoma 20S de 700 kDa, constituido por 14 subunidades no idénticas y que muestra homología con el proteasoma 20S de muchas células eucariotas (Zwickl *et al.*, 1992), y el proteasoma 26S que es más grande y está constituido por el proteasoma 20S como centro y 2 complejos adicionales 19S a ambos extremos (Hilt y Wolf, 1995). Se conoce la secuencia de 10 genes que codifican para subunidades del proteasoma de levaduras (Jones y Murdock, 1994). Su especificidad de corte es muy amplia, siendo capaz de hidrolizar enlaces peptídicos con residuos neutros/hidrofóbicos, básicos y ácidos (Jones a, 1991). Su papel biológico se ha relacionado con la degradación de proteínas marcadas con ubiquitina, participando en el recambio proteico y en la adaptación de la célula a condiciones de limitación del nitrógeno (Jones, 1991 a).

Las proteasas vacuolares

La vacuola es un orgánulo homólogo al lisosoma de las células animales donde se dan procesos de hidrólisis controlados, entre ellos de proteínas. Las proteasas vacuolares son las más abundantes, fueron las primeras que se conocieron y las más estudiadas (Jones, 1983 y 1991b). Hasta ahora se han descrito: 2 endoproteasas, las proteasas A y B (PrA, PrB); 2 carboxipeptidasas, Y y S (CpY, Cp S); 2 aminopeptidasas, I y Co (ApI, ApCo) y la dipeptidil aminopeptidasa B (DPAP-B), esta última localizada en la membrana de la vacuola.

Proteasa A. La PrA es una aspártico endoproteasa, codificada por el gen *PEP4* que muestra homología con la pepsina, la renina y la catepsina D (Jones, 1991 a). Es una glicoproteína de 42 kDa, cuya actividad ha sido determinada usando hemoglobina ácida desnaturalizada o caseína a pH de 3 y 6 respectivamente (Jones *et al.*, 1991 b). Es inhibida por pepstatina y posee un inhibidor específico intracelular (I^A) (Achstetter y Wolf, 1985, Klionsky *et al.*, 1990, Jones *et al.*, 1997, Van den Hazel *et al.*, 1996).

Proteasa B. La PrB es una serina endoproteasa, codificada por el gen *PRB1* perteneciente a la familia de las subtilisinas (Moehle et el., 1987). La PrB es una glicoproteína de 33 kDa, que puede ensayarse frente a azocoll (derivado coloreado del colágeno) (Jones *et al.*, 1991 b). Debido a su baja especificidad de sustrato es capaz de hidrolizar diversas proteínas, como gelatina, hemoglobina y caseína. Su pH óptimo de actuación es neutro y también tiene un inhibidor específico intracelular (I^B) (Achstetter y Wolf, 1985, Klionsky *et al.*, 1990, Jones *et al.*, 1997, Van den Hazel *et al.*, 1996).

Carboxipeptidasa Y. La CpY es una serina proteasa, codificada por el gen *PRCI*. Esta exopeptidasa es una glicoproteína de 61 kDa que posee una amplia especificidad de sustrato, un pH óptimo neutro ligeramente ácido. Su actividad puede determinarse frente a N-benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida (Jones, 1991 b). También posee un inhibidor específico (I^C) en el citoplasma (Achstetter y Wolf, 1985, Jones *et al.*, 1997, Van den Hazel *et al.*, 1996).

Carboxipeptidasa S. CpS es una metalo carboxipeptidasa, codificada por el gen *CPS1*, con un tamaño de 74-77 kDa, glicosilada y con pH de actuación neutro. La enzima corta el sustrato oxibencil-carbonil-glicil-leucina con elevada eficiencia. (Achstetter y Wolf, 1985, Jones *et al.*, 1997)

Aminopeptidasa I. ApI es una metalo exopeptidasa, codificada por el gen *LAP4*. También está glicosilada y tiene una masa molecular de 640 kDa y 12 subunidades. Tiene alta especificidad por leucina pero también libera otros aminoácidos. El pH óptimo de actuación es neutro-básico (Klionsky *et al.*, 1990, Van den Hazel *et al.*, 1996, Jones *et al.*, 1997).

Aminopeptidasa Co. ApCo es una metalo exopeptidasa de 100 kDa codificada por el gen *APE3*, activada por cobalto, con pH óptimo neutro-alcalino y con preferencia por aminoácidos básicos, arginina y lisina. También ha sido descrita como ApY, una enzima de similares características pero que difiere en la masa molecular asignada, que es de 70-75 kDa (Klionsky *et al.*, 1990, Van den Hazel *et al.*, 1996, Jones *et al.*, 1997).

Dipeptidil aminopeptidasa B. DPAP-B está codificada por el gen *DAP2*, y es una serín glicoproteína de la membrana vacuolar con una masa molecular de 120 kDa. La DPAP-B corta enlaces peptídicos que contienen prolina en la penúltima posición del extremo carboxilo y cualquier otro aminoácido en el extremo amino terminal con la excepción de arginina. Actúa a pH neutro (Achstetter y Wolf, 1985 Jones, 1991 a, Jones *et al.*, 1997).

Las proteasas de la ruta secretora

Endoproteasa Kex2. Esta serín endoproteasa es una glicoproteína anclada a la membrana del aparato de Golgi, codificada por el gen *KEX2*, que actúa a pH neutro. Tiene una alta especificidad actuando sobre el grupo carboxilo de una proteína cuando reconoce un par de residuos básicos, lisina-arginina o arginina-arginina (Jones, 1991 a). *Carboxipeptidasa Kex1.* La carboxipeptidasa Kex1 es una serín proteasa, codificada por el gen *KEX1* (Jones, 1991 a). Es también una glicoproteína integral de membrana localizada en el aparato de Golgi y libera aminoácidos básicos (lisina y arginina), a pH neutro (Achstetter y Wolf, 1985).

Dipeptidil aminopeptidasa A. DPAP-A es una serín proteasa activa a pH neutro, codificada por el gen *STE13*, y anclada en el aparato de Golgi. La DPAP-A actúa liberando los dipéptidos glutámico-alanina o aspático-alanina y participa en el procesamiento del precursor del factor α (Achstetter y Wolf, 1985, Jones, 1991 a).

Aspártico proteasa III. Esta endoproteasa, codificada por el gen *YAP3*, es capaz de catalizar la misma actividad que la proteasa Kex2 cuando ésta no está presente (Jones, 1991 a).

En resumen, el proteasoma y las proteasas vacuolares tienen unas especificidades amplias y participan conjuntamente en la degradación masiva de proteínas, necesaria para el recambio proteico, siendo estimuladas cuando existe una limitación de nitrógeno o alta demanda de éste, por ejemplo, en la meiosis o en la esporulación. Los datos bioquímicos de que disponemos indican que las proteasas vacuolares se encargan de mantener el nivel basal de recambio proteico de las proteínas de vida larga y de las grandes adaptaciones necesarias cuando se produce un estrés por limitación de nutrientes, y que el proteasoma es el responsable de la degradación rápida de proteínas de vida corta, incluyendo las proteínas aberrantes (Hilt y Wolf, 1992, Knop *et al.*, 1993, Van den Hazel *et al.*, 1996). Por el contrario, las proteasas de la ruta secretora tienen unas especificidades muy restringidas y actúan en el procesamiento de proteínas a lo largo de su maduración y de péptidos tales como la feromona o factor α y la toxina “killer”.

1.7. Presentación de los trabajos y justificación de la unidad temática

Las publicaciones incluidas en esta Tesis “ **Caracterización del sistema proteolítico de *Debaryomyces hansenii* aislada de embutidos curados**” se dividen en 5 trabajos:

- Trabajo 1. Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Debaryomyces hansenii*. Santos, N.N., Santos-Mendoça, R.C., Sanz, Y., **Bolumar, T.**, Aristoy, M.C. y Toldrá, F. 2001. International Journal of Food Microbiology 68: 199-206.
- Trabajo 2. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. **Bolumar, T.**, Sanz, Y., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. 2003. Applied and Environmental Microbiology 69: 227-232.
- Trabajo 3. Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. **Bolumar, T.**, Sanz, Y., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. 2003. International Journal of Food Microbiology 86: 141-151.
- Trabajo 4. Protease B from *Debaryomyces hansenii*: Purification and biochemical properties. **Bolumar, T.**, Sanz, Y., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. 2003. International Journal of Food Microbiology (enviado para su publicación).
- Trabajo 5. Protease (PrA and PrB) and prolyl and arginyl aminopeptidase activities from *Debaryomyces hansenii* as a function of growth phase and nutrient sources. **Bolumar, T.**, Sanz, Y., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. 2004. Applied and Environmental Microbiology (enviado para su publicación).

En el primer trabajo se ha incluido la selección de cepas de la especie *Debaryomyces hansenii* en función de su actividad endo y exoproteolítica sobre sustratos sintéticos. Posteriormente, se estudió la capacidad de la cepa más activa *D. hansenii* CECT 12487, para hidrolizar las proteínas sarcoplásmicas musculares, utilizadas como modelo del sustrato real presente en sistemas cárnicos.

En el segundo y tercer trabajo se ha descrito la purificación y la caracterización de las dos aminopeptidasas más importantes de *D. hansenii*; una prolina aminopeptidasa (PAP) y una arginina aminopeptidasa (AAP), incluyendo la discusión sobre su importancia y posible implicación en el curado de embutidos.

En el cuarto trabajo se ha incluido la purificación y caracterización de la proteasa B (PrB) de *D. hansenii* y se ha evaluado su capacidad para hidrolizar las proteínas sarcoplásmicas.

En el quinto trabajo se ha estudiado el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno, y de la fase de crecimiento, sobre la producción de las enzimas proteolíticas, previamente caracterizadas en *D. hansenii*, PrA, PrB, PAP y AAP, como fase preliminar para el establecimiento de su posible regulación y función durante el curado de embutidos, así como para la optimización de la síntesis de altos niveles de proteasas en cultivos iniciadores o extractos aplicables a procesos industriales.

Todos los trabajos incluidos en la presente Tesis tienen como nexo común el estudio bioquímico del sistema proteolítico de *D. hansenii*, mediante la purificación y caracterización de las proteasas más importantes y el estudio de los factores que regulan su producción como base para el establecimiento de su posible función tecnológica en las condiciones ecológicas propias de los productos cárnicos curados y su potencial aplicación industrial justificada, por su contribución a la hidrólisis de proteínas y polipéptidos generando péptidos y aminoácidos que influyen en el desarrollo del sabor y del aroma.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente tesis ha sido el estudio de la composición del sistema proteolítico de *Debaryomyces hansenii* mediante la purificación y caracterización de las enzimas más importantes así como de los factores que afectan a su síntesis, sentando las bases bioquímicas y fisiológicas para posteriores estudios sobre su efecto y aplicaciones en embutidos curados.

Así pues, los **objetivos parciales** han sido los siguientes:

1. Seleccionar las cepas de la especie *Debaryomyces hansenii* previamente aisladas de embutidos curados, en base a su actividad proteolítica sobre sustratos sintéticos y sobre las proteínas sarcoplásmicas musculares.
2. Purificar y caracterizar las principales enzimas exoproteolíticas.
3. Purificar y caracterizar las principales enzimas endoproteolíticas.
4. Estudiar la producción de las enzimas caracterizadas, en función de la fase de crecimiento y de distintas fuentes de carbono y nitrógeno incluyendo, las proteínas sarcoplásmicas.

3. Trabajos publicados y pendientes de publicación

3.1. Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Debaryomyces hansenii*

Nelson N. Santos, Regina C. Santos-Mendonça, Yolanda Sanz, Tomás Bolumar,
M-Concepción Aristoy and Fidel Toldrá

International Journal of Food Microbiology **68** (2001) 199-206

3.2. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*

Tomás Bolumar, Yolanda Sanz, M-Concepción Aristoy and Fidel Toldrá.

Applied and Environmental Microbiology **69** (2003) 227-232

3.3. Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*

Tomás Bolumar, Yolanda Sanz, M-Concepción Aristoy and Fidel Toldrá.

International Journal of Food Microbiology **86** (2003) 141-151

3.4. Protease B from *Debaryomyces hansenii*: Purification and biochemical properties

Tomás Bolumar, Yolanda Sanz, M-Concepción Aristoy and Fidel Toldrá.

International Journal of Food Microbiology **98** (2005) 167-177

3.5. Protease (PrA and PrB) and prolyl and arginyl aminopeptidase activities from *Debaryomyces hansenii* as a function of growth phase and nutrient sources

Tomás Bolumar, Yolanda Sanz, M-Concepción Aristoy and Fidel Toldrá.

Applied and Environmental Microbiology (2004) (enviado para su publicación)

**Protease (PrA and PrB) and prolyl and arginyl aminopeptidase activities
from *Debaryomyces hansenii* as a function of
growth phase and nutrient sources**

Tomás Bolumar, Yolanda Sanz, M-Concepción Aristoy and Fidel Toldrá.

*Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (C.S.I.C.), Apt. 73, 46100
Burjassot (Valencia), Spain*

ABSTRACT

The effects of the nutrient sources and the phase of growth of *Debaryomyces hansenii* on the protease (PrA and PrB) and aminopeptidase (prolyl- [PAP] and arginyl- [AAP] aminopeptidases) activities were investigated. These activities were also monitored during growth on a whole sarcoplasmic muscle protein extract (WSPE) and on an equivalent medium but free of compounds under 10 kDa (SPE > 10 kDa). The levels of specific protease and aminopeptidase activities were higher when cells were grown in urea and di-peptides than when grown in ammonium or free amino acids as nitrogen sources. The level of each aminopeptidase (PAP or AAP) activity was preferentially induced by its own substrate (ProLeu or LysAla), suggesting a role in the utilization of exogenous peptides. The specific activities of all proteolytic enzymes were higher when using acetate as carbon source. The time course experiments carried out on urea- or sarcoplasmic protein-containing media revealed an increase in all activities during transition and advanced stages of stationary phase of growth. In muscle protein extracts the absence of nutrients of low molecular mass (SPE > 10 kDa), initially induced the production of PrA, PrB, and AAP activities, possibly involved in the breakdown of muscle oligopeptides. In *D. hansenii* the overall increase in proteolytic activities seems to be an adaptive

response to stationary phase growth phase and to poor or limiting concentration of basic nutrients, which point to a role in their supply through exogenous and endogenous protein degradation.

INTRODUCTION

Nowadays, the interest in non-saccharomyces yeasts has been increased as related to its physiology, biochemistry and genetic aspects with impact in industrial fermentations (4, 22, 24, 29, 33). Such yeasts are involved for instance in a wide variety of food fermentation processes such as baking, brewing and cheese and sausages making (3). *Debaryomyces hansenii* is an halo-tolerant yeast oftenly found in meat and dairy products whose implications in food fermentations remain fairly unknown (2, 7, 9, 25, 38).

Nitrogen metabolism is one of the most important biochemical pathways involved in yeast physiology and with deep repercussions in the processing of fermented foodstuffs. Indeed, proteases are partially responsible for the physiological adaptations that allow the cell to survive and also have an indirect effect on flavor development due to the activation of different metabolic routes (18).

In *Saccharomyces cerevisiae* the expression of nitrogen catabolite genes is controlled in response to the quality of the nitrogen source available. The presence of easily metabolized nitrogen sources (ammonia, glutamine, asparagine and so on) repress the expression of genes encoding transporters and catabolic enzymes (proteases) necessary for the uptake and utilization of more poorly nitrogen sources (39). This phenomenon is called nitrogen catabolite repression (NCR) (15). On the other hand, when cells are transferred to a glucose-based medium that lacks a nitrogen source, the rate of protein degradation markedly increases by the higher production of proteolytic activities (17). In addition, the regulation of nitrogen metabolism in yeast could affect the proteolytic chain during food fermentation processes of protein-rich materials. Proteolysis leads to an increase of small peptides and free amino acids, which could be further converted into volatile aroma compounds, altogether affecting sensory perception. In addition, the generated peptides and free amino acids have an influence on the microbial physiology and

ability to survive where the microorganism are adapting, that contribute to regulate the microbial succession and the whole fermentation process (35). For these reasons, it will be of interest to know how proteolytic enzymes are regulated in *D. hansenii* as a function of environmental factors, especially those close to the meat ecosystem.

Recently, our group has carried out the purification and characterization of the most important proteases of *D. hansenii*. These are the endoproteases A (PrA) (T. Bolumar, Y. Sanz, M.C. Aristoy, F. Toldrá, unpublished data) and B (PrB) (T. Bolumar, Y. Sanz, M.C. Aristoy, F. Toldrá, submitted for publication) and a prolyl aminopeptidase (PAP) (4) and an arginyl aminopeptidase (AAP) (5) constituting the basis for further studies. In addition, the presence of endogenous intracellular inhibitors, I^A and I^B, for PrA and PrB, respectively were detected (T. Bolumar, Y. Sanz, M.C. Aristoy, F. Toldrá, submitted for publication).

All these researches constitute the basis for the present work whose aim has been to study the production of PrA and PrB activities as well as those of PAP and AAP in *D. hansenii* growing under different carbon and nitrogen sources, during different growth phases and on sarcoplasmic proteins, in order to obtain valuable data related to the regulation of nitrogen catabolic enzymes and their possible roles in meat fermentation.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strain and culture conditions

The studied strain was *Debaryomyces hansenii* CECT 12487 which was isolated from the natural microflora of fermented sausages and selected as possible starter culture on the basis of its physiological and biochemical properties and its ability to compete during sausage manufacturing processes (27). It was routinely grown in malt extract agar (Scharlau, Barcelona, Spain) at 31 °C, for 48-72 h and, then, stored at 4 °C or at -80 °C in 15 % glycerol. The strain was grown on YPD broth at 37 °C for 48 hours. Then, cells were harvested by centrifugation at 5,000 × g at 4 °C for 10 min and washed in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. The final pellet was resuspended in sterile water and used to inoculate all the different

media at initial optical density (O.D) of 0.01 at 600 nm. Flasks containing media of different composition were incubated without shaking at 31 °C for a maximum period of time of 14 days. Chloranphenicol (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) was added in the medium at 0.01 g/ 100 mL to avoid contamination. Two independent experiments were done for each particular case. The growth of the different cultures was monitored by measuring the absorbance at 600 nm.

Studies of the effects of different nitrogen and carbon sources

In order to assess the effect of different nitrogen and carbon sources, Yeast carbon base and Yeast nitrogen base (Difco Laboratories, Detroit, USA) were used. Yeast carbon base was supplemented at 0.5 g/ 100 mL with the following nitrogen sources: ammonium sulphate, urea, proline, ProLeu, LysAla, ProLeu plus an amino acid mixture (1 g/ mL), and LysAla plus an amino acid mixture (1 g/ mL). The composition of the amino acid mixture was previously designed for *Saccharomyces cerevisiae* (E.W. Jones, personal communication) and included in mg/ L; 530 arginine, 530 histidine, 490 leucine, 500 lysine, 510 methionine, 500 serine, 480 phenylalanine, 510 tryptophan, 350 threonine and 530 tyrosine. Ammonium sulphate and urea were purchased from Panreac (Barcelona, Spain), proline from Scharlau (Barcelona, Spain) and the dipeptides and free amino acids from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Yeast nitrogen base was supplemented at 1 g/ 100 mL with the following carbon sources: glucose (Panreac, Barcelona, Spain), galactose (Sigma, St. Louis, MO, USA) and acetate (Scharlau, Barcelona, Spain). All the components were freshly prepared and sterilized by filtration through a 0.22 µm pore-size membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). Samples were taken in the exponential phase of growth for proteolytic activity assays.

Studies of the effects of the phase of growth in media with different nitrogen sources

To study the levels of proteolytic activities during different phases of growth, the strain was grown on yeast carbon base complemented at 0.5 g/ 100 mL with urea and sarcoplasmic muscle protein as nitrogen sources. Sarcoplasmic proteins were extracted from pork *Longissimus dorsi* muscles as previously described (28).

In the case of sarcoplasmic proteins based medium, two different media were prepared: in the first one a whole sarcoplasmic protein extract (WSPE) was added and in the second a sarcoplasmic protein extract in which the components under 10 kDa were eliminated by ultrafiltration (SPE > 10 kDa) by using Amicon Centrifugal Filter Devices of 10 kDa cut off (Millipore, Bedford, MA, USA). The protein content of the sarcoplasmic extract was around 0.68 g/ 100 mL. Samples were taken every two days (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 days) during a total incubation period of 14 days and used for activity assays.

Preparation of cell extracts

Cells were harvested at $8,500 \times g$ for 10 min, at 4 °C, washed in 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, and then suspended in a volume of buffer to reach a final O.D. of 25 at 600 nm. This cell-suspension was immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C till use. Cell disruption was carried out in a Mini Bead-Beater (Biospec Products, Washington, N.C., USA). A volume of 0.750 mL glass beads (0.5 mm diameter, Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to the same volume of cell suspension. This mixture was submitted to four shakings for 30 seconds, with 2 minutes intervals on ice. Then, it was centrifuged twice ($27000 \times g$, 15 min, at 5 °C) and the obtained supernatant constituting the cell extract was used for activity assays and assessment of the presence of inhibitors as described below.

Enzyme assays

The endoproteolytic activity was measured against 0.21 mM N-Succinyl-Leucine-Tyrosine-7-amido-4-methylcoumarin (N-Succinyl-Leu-Tyr-AMC; Sigma, St. Louis, MO, USA) in McIlvaine buffer (0.1M citric acid, 0.2 M disodium phosphate), pH 7.5. The reaction mixture consisted of 100 μ L cell extract plus 150 μ L substrate solution. The total endoprotease activity against N-Succinyl-Leu-Tyr-AMC was determined without adding inhibitors whereas to differ protease A (PrA) from protease B (PrB) activity specific inhibitors were included in the reaction mixture. PrA activity was determined in the presence of 0.5 mM 3,4-dichloroisocoumarin (3,4-DCI) and PrB was measured in the presence of 1 mM pepstatin.

Prolyl aminopeptidase (PAP) and arginyl aminopeptidase (AAP) activities were determined as described by Bolumar et al. (2003) (4, 5) in McIlvaine buffer (0.1M citric acid, 0.2 M disodium phosphate), at pH 7.5 or 7.0 respectively, containing 0.12 mM of either Proline-7-amido-4-methylcoumarin (Pro-AMC) or Arginine-7-amido-4-methylcoumarin (Arg-AMC). AAP activity was enhanced including 0.5 mM CoCl₂ in the substrate solution. The reaction mixture consisted of 50 µL of enzymatic extract plus 250 µL of substrate solution in both cases. The reaction mixtures were incubated at 37 °C, for 10 min to measure the endoproteolytic activities and for 5 min to measure the aminopeptidase activities. Fluorescence was measured in a multiscan fluorometer (Fluoroskan II, Labsystem, Finland) using excitation and emission wavelengths of 355 and 460 nm, respectively. All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except for CoCl₂ that was from Panreac (Barcelona, Spain). Three replicates were measured for each experimental point. One unit of enzyme activity (U) was defined as the release of 1 nmol of substrate per hour at 37 °C.

Determination of protein concentration

Protein concentration of the cell extracts was determined by the BCA (bicinchoninic acid) method (32) with the BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA). Bovine serum albumin was used as standard.

Detection of endogenous protease inhibitors I^A and I^B

The cell extracts obtained in 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, were spliced into two aliquots. One was diluted to half with McIlvaine buffer (0.1M citric acid, 0.2 M disodium phosphate), pH 7.5, and used for activity determination at time zero. The other was diluted with McIlvaine buffer to reach a final pH of 5.0 and incubated at 25 °C overnight to inactivate endogenous inhibitors (23). Then, they were employed to determine the proteolytic activity against N-Succinyl-Leu-Tyr-AMC in the absence and the presence of specific inhibitors of proteases A and B as previously described. An increase in activity reflected the destruction of the cited inhibitors by prolonged incubation at 25 °C and/ or acid pH (31, 34, T. Bolumar, Y. Sanz, M.C. Aristoy, F. Toldrá, submitted for publication).

Hydrolysis of sarcoplasmic muscle proteins

The hydrolysis of sarcoplasmic proteins during growth of *D. hansenii* in a medium containing this protein extract as nitrogen source was determined by sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis (21). 3 % stacking and 10 % resolving polyacrylamide gels were used. Broad range molecular weight standards were run simultaneously (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250.

RESULTS

Effects of the different nitrogen and carbon sources on endoprotease activities

The endoproteolytic activities from cells grown in different nitrogen and carbon sources are shown in Figure 1. The obtained values of the total specific endoprotease activity against N-Succinyl-LeuTyr-AMC without the use of inhibitors (Figure 1 A) was approximately the sum of the values obtained in the presence of 3,4-DCI (Figure 1 B) and in the presence of Pepstatin (Figure 1 C). This is common for all the cases studied (Figures 1, 3 and 5) confirming the existence of two endoproteases, PrB (T. Bolumar, Y. Sanz, M.C. Aristoy, F. Toldrá, submitted for publication) and PrA (T. Bolumar, Y. Sanz, M.C. Aristoy, F. Toldrá, unpublished results) similar to those described in *S. cerevisiae* (18, 19) and the suitability of the method for the measurement of each one in crude extracts. The second general observation is that, both activities increased after incubation at pH 5.0, suggesting that this procedure allowed the destruction of their respective endogenous inhibitors (Figure 1).

In general, total specific endoprotease activity was higher when the yeast was grown on dipeptides (media 4 and 5) or proline (medium 3) as sole nitrogen source than when grown in a easily metabolized nitrogen source as ammonium sulphate (Figure 1 A). This fact results more evident when comparing the obtained activities after incubation overnight to inactivate the endogenous inhibitors. The use of urea (medium 2) as nitrogen source also resulted in high specific endoproteolytic activity (Figure 2A) especially due to PrB (Figure 1 C). Media 6 and 7, containing dipeptides plus the amino acids mixture displayed lower activities than the

respective media which only contain dipeptides (media 4 and 5), the only exception was the PrA activity detected in cells grown on ProLeu. In brief, media containing ammonium (1, 8, 9 and 10) or free amino acids (6 and 7) displayed the lower total specific endoprotease activity (see figure 1 A).

With regard to the use of different carbon sources in the growth medium (8, 9, 10), the highest total endoprotease and PrB specific activities were found in cells grown on acetate (Figure 1 A and B, medium 10). This effect was especially outstanding when considering the level of the total specific endoproteolytic activity after inactivation of the endogenous inhibitors (Figure 1 A). In this last case, the presence of acetate also resulted in higher expression of PrA (Figure 1 B).

Effect of the different nitrogen and carbon sources on aminopeptidase activities

The aminopeptidase activity levels found as a function of the medium composition are shown in Figure 2. The activities of both peptidases were not promoted after the incubation overnight at pH 5.0. AAP activity diminished 50 % (data not shown) and PAP activity remained constant proving better stability than AAP (data not shown). The peptides, ProLeu and LysAla, were previously demonstrated to be substrates for PAP and AAP, respectively (4, 5). Higher PAP and AAP specific activities were observed in the presence of ProLeu (medium 4), LysAla (medium 5), urea (medium 2) and proline (medium 3) than in the presence of ammonium sulfate (medium 1) as nitrogen sources (Figure 2 A y B, respectively). Remarkably, the highest PAP and AAP activities were expressed in cells grown in the presence of their specific substrates ProLeu and LysAla, respectively. These results suggest that substrates of both aminopeptidases could induce the expression of their respective activities. However, when amino acids were added to the media containing only a dipeptide as nitrogen source, both aminopeptidases activities were remarkably reduced (Figure 2 A and B, media 4, 5 versus 6, 7).

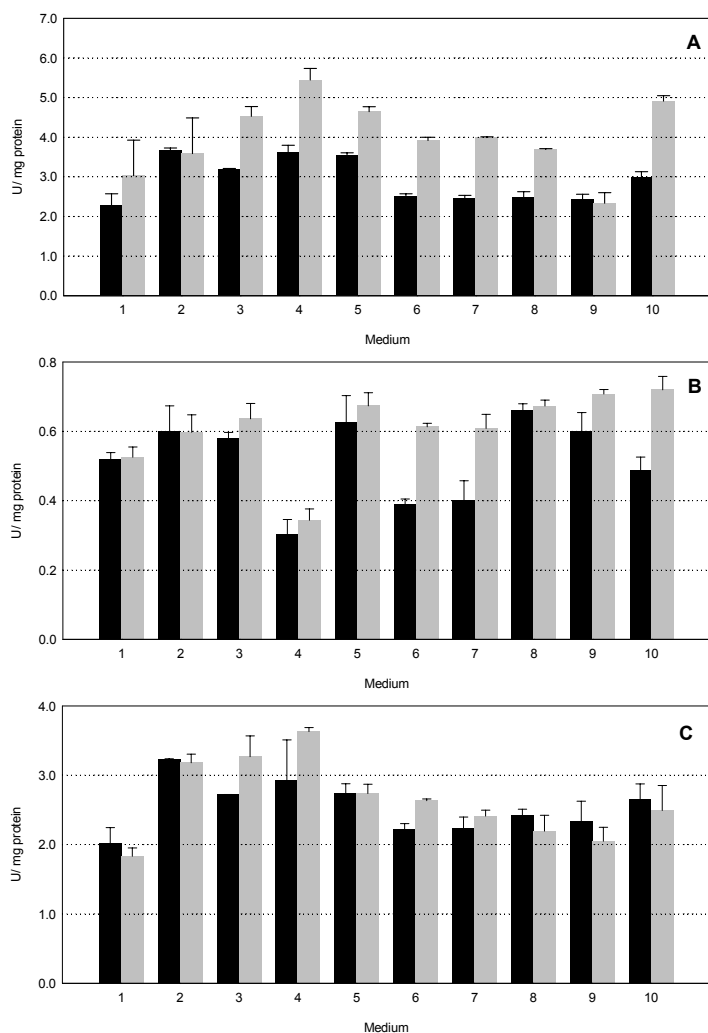


Figure 1. Specific endoproteinase activities (U/ mg protein) of *D. hansenii* grown in media containing different nitrogen and carbon sources. Total endoproteolytic activity against N-Succinyl-LeuTyr-AMC (A), protease A (PrA) activity (B), and protease B (PrB) activity (C). Sole nitrogen or carbon source employed in each corresponding media: 1, ammonium sulfate; 2, urea; 3, proline; 4, ProLeu; 5, LysAla; 6, ProLeu plus amino acid mixture; 7, LysAla plus amino acid mixture; 8, glucose; 9, galactose, and 10, acetate. Activities measured at time zero, Activities measured after incubation overnight for inactivation of endogenous inhibitors.

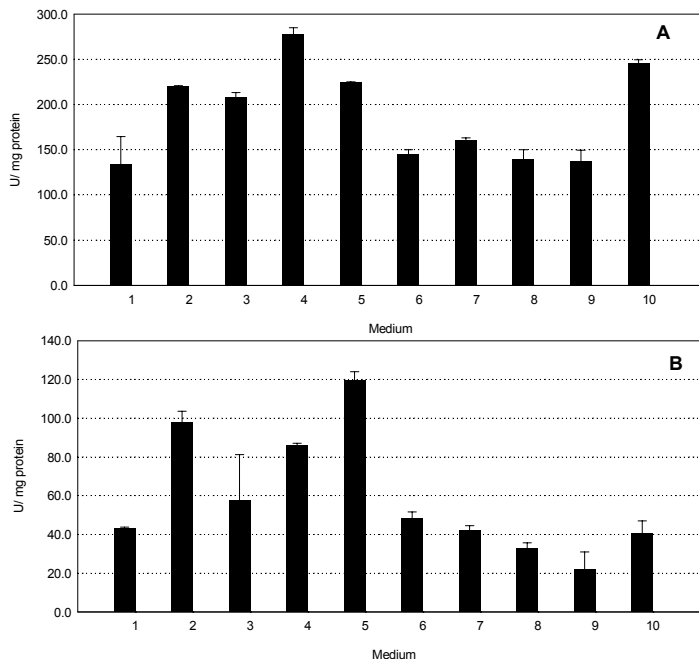


Figure 2. Specific aminopeptidase activities (U/ mg protein) of *D. hansenii* grown in media containing different nitrogen and carbon sources. Prolyl aminopeptidase activity (PAP) (A), and arginyl aminopeptidase activity (AAP) (B). Sole nitrogen or carbon source employed in each corresponding media: 1, ammonium sulphate; 2, urea; 3, proline; 4, ProLeu; 5, LysAla; 6, ProLeu plus amino acid mixture; 7, LysAla plus amino acid mixture; 8, glucose; 9, galactose, and 10, acetate.

In the case of the use of different carbon sources, the addition of acetate (medium 10) was responsible for production of the highest specific aminopeptidase activities, being the PAP more clearly induced than the AAP (Figure 2 A and B). PAP specific activity ranges from 140 U/ mg protein when cells were grown on glucose to 250 U/ mg protein when cells were grown on acetate (Figure 2 A) while the AAP specific activity varied from 35 U/ mg protein in glucose to 40 U/ mg protein in acetate (Figure 2 B).

Effect of the phase of growth on the proteolytic activities

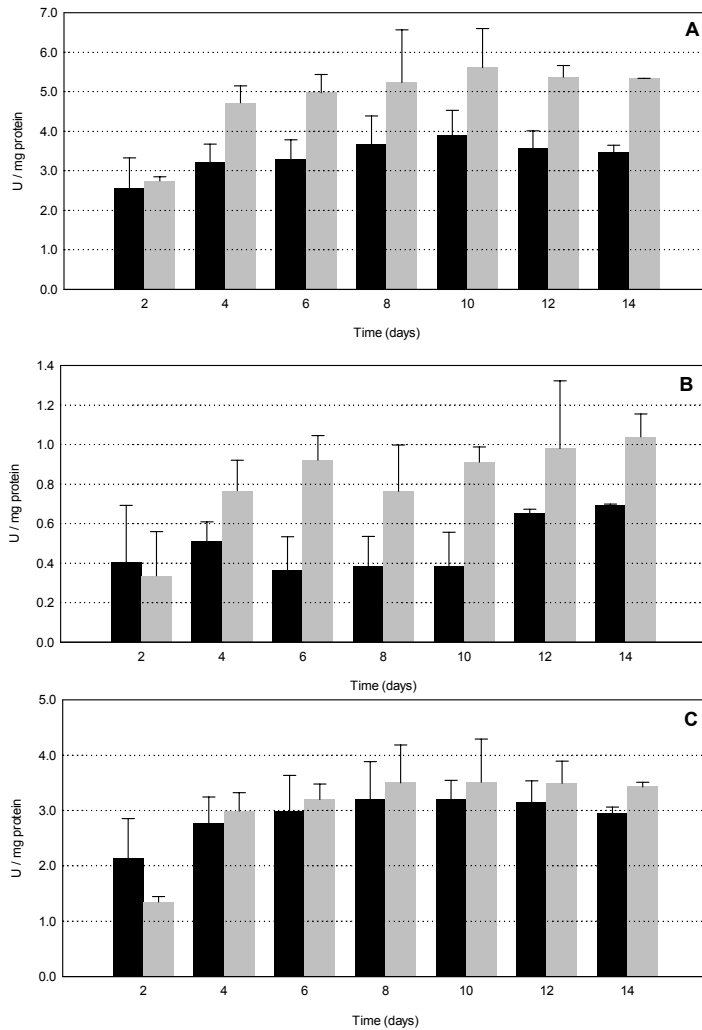


Figure 3. Evolution of specific endoprotease activities (U/ mg protein) in *D. hansenii* during growth on urea as sole nitrogen source. Total endoproteolytic activity against N-Succinyl-LeuTyr-AMC (A), protease A (PrA) activity (B), and protease B (PrB) activity (C). ■ Activities measured at time zero, ▒ Activities measured after incubation overnight for inactivation of endogenous inhibitors.

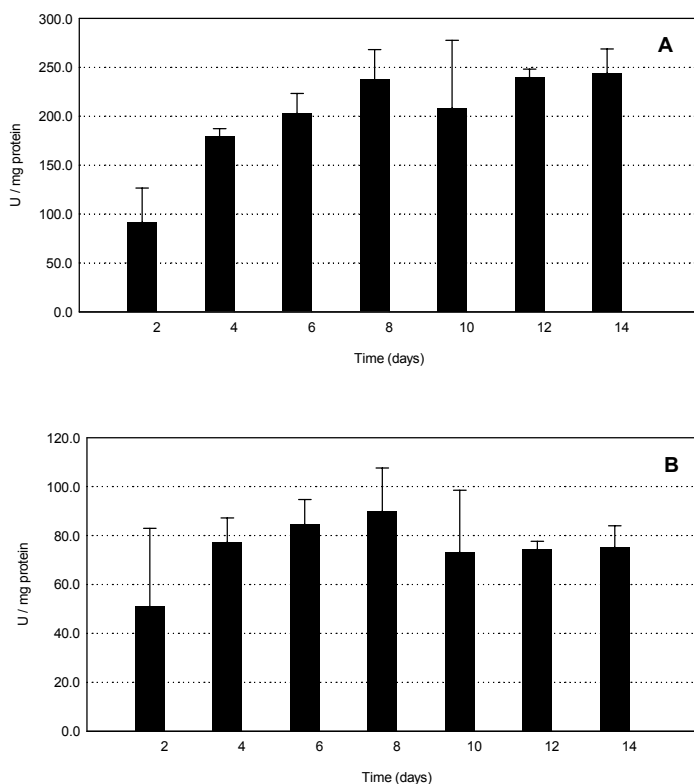


Figure 4. Evolution of specific aminopeptidase activities (U/ mg protein) in *D. hansenii* during growth on urea as sole nitrogen source. Prolyl aminopeptidase activity (PAP) (A), and arginyl aminopeptidase activity (AAP) (B).

Cells grown in yeast carbon base supplemented with urea as sole nitrogen source had both good specific activities (Figures 1 and 2), and the highest values of total activity (data not shown). For this reason this culture medium was selected to monitor the proteolytic activity levels during different phases of growth. This was, in fact, the medium used for purification purposes (4, 5, T. Bolumar, Y. Sanz, M.C. Aristoy, F. Toldrá, submitted for publication).

The endoprotease activity levels during growth of *D. hansenii* are shown in the figure 3. All specific activities tend to increase from the initial sampling time (day 2) to the end of the incubation period (day 14) (Figure 3) when certain nutrient limitation might occur. PrA activity showed a higher activation level after incubation overnight than PrB (Figure 3 B y C) as also shown in the study of the

effects of different nitrogen and carbon sources (Fig. 1). The specific activity of PrA after the incubation at 25 °C overnight ranged from 0.35 U/ mg protein to 1.0 U/ mg protein (3-fold increase) (Figure 3 B). PrB specific activity increased as well, from 2.0 U/ mg protein to 3.0 U/ mg protein at the end of the incubation (1.5-fold increase) (Figure 3 C), but reached a maximum by the eightieth day of incubation and then remained constant or was slightly reduced. Total endoprotease activity ranged from 0.5 U at the beginning to 4.0 U at the end of the incubation time that represents 8 times more activity. The same increasing pattern was observed for the total activity of PrA and PrB (data not shown).

When analyzing the results of the aminopeptidase activities, similar conclusions were inferred. There was an increase in specific activity for both enzymes, PAP and AAP (Figure 4), from day 2 to day 8. Then, the levels of PAP activity remained constant while those of AAP were slightly reduced to the end of the incubation time (Figure 4 A and B). The specific activity for PAP varied from 100 to 250 U/ mg protein from the beginning (day 2) to the end (day 14) (2.5-fold higher) whereas for the AAP the activity varied from 50 U/ mg protein to 75 U/ mg protein (1.5 fold higher). Also, total PAP activity ranged from 25 U at the beginning to 200 U at the end (8.0 fold higher) and total AAP activity varied from 15 U to 60 U (4.0 fold higher).

Production of proteolytic activities in *D. hansenii* during growth in the presence of sarcoplasmic proteins as nitrogen sources

Sarcoplasmic protein extracts supported very well the growth of *D. hansenii* when used as nitrogen source. However, the growth yield was clearly diminished when the components under 10 kDa such as vitamins, free minerals, sugars, free amino acids and small peptides were eliminated (data not shown). In these conditions, cells initially (day 2) showed higher specific proteolytic activities than when grown in the presence of the complete protein extract (Figure 5 A, B and C and figure 6 A and B). This induction suggested an adaptive cell response to an initial limitation of rapidly metabolized nitrogen sources.

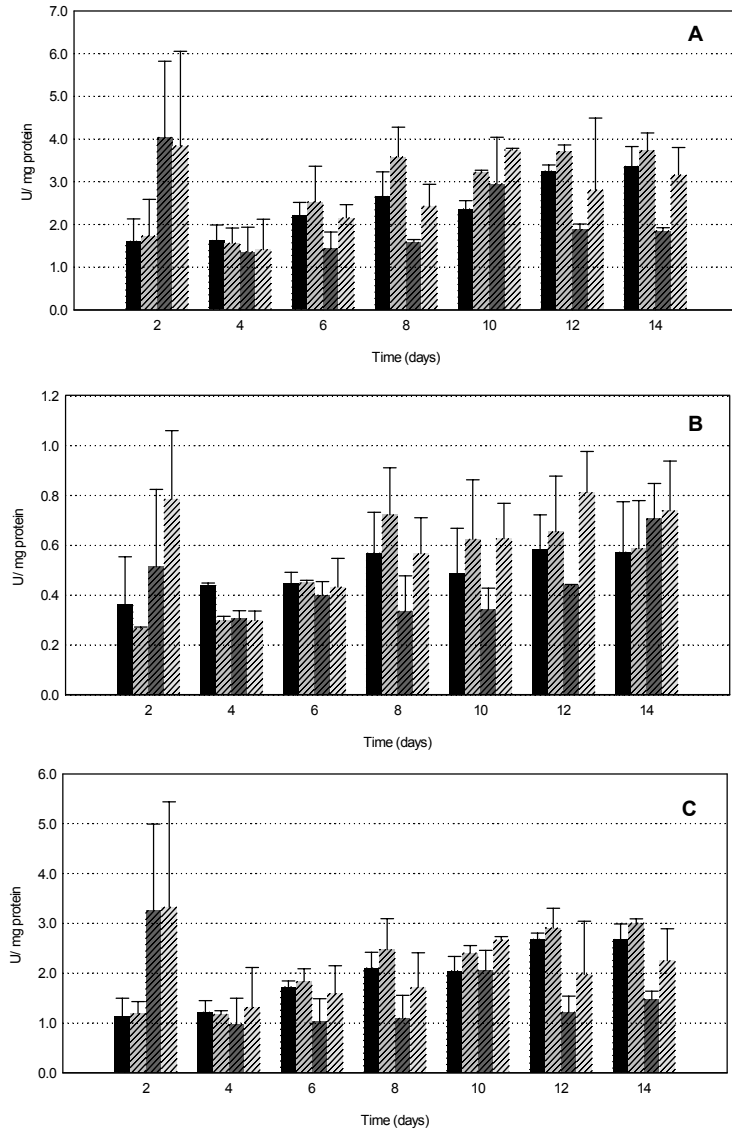


Figure 5. Evolution of specific endoproteinase activities (U/ mg protein) in *D. hansenii* during growth on either whole sarcoplasmic proteins extract (WSPE) or sarcoplasmic proteins extract in which components of less than 10 kDa were eliminated (SPE > 10 kDa) as sole nitrogen source. Total endoproteolytic activity against N-Succinyl-LeuTyr-AMC (A), protease A (PrA) activity (B), and protease B (PrB) activity (C). ■ Activities measured at time zero in WSPE, ▨ Activities measured after incubation overnight for inactivation of endogenous inhibitors in WSPE, ▩ Activities measured at time zero in SPE > 10 kDa, ▪ Activities measured after incubation overnight for inactivation of endogenous inhibitors in SPE > 10 kDa.

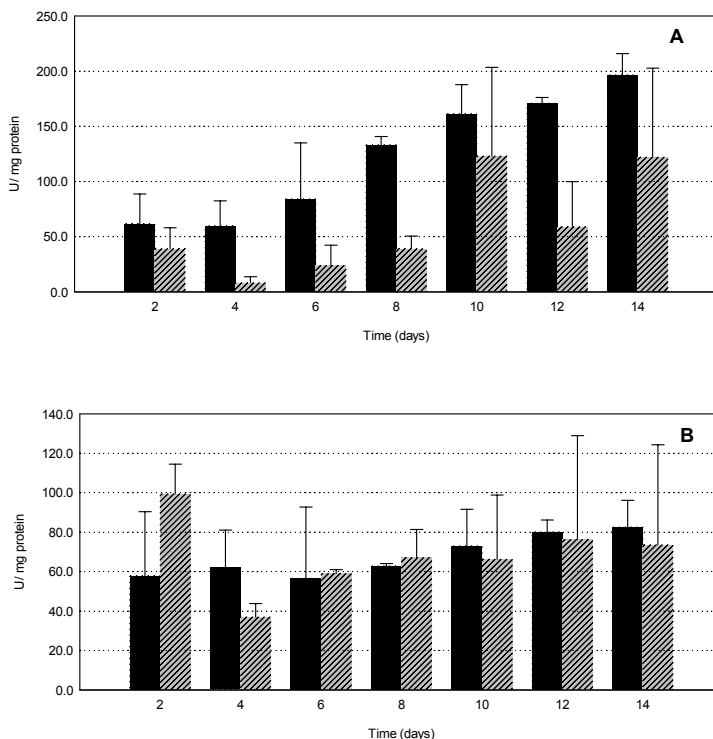


Figure 6. Evolution of specific aminopeptidase activities (U/ mg protein) in *D. hansenii* during growth on either whole sarcoplasmic proteins extract (WSPE) or sarcoplasmic proteins extract in which components of less than 10 kDa were eliminated (SPE > 10 kDa) as sole nitrogen source. Activity levels of prolyl aminopeptidase, PAP, (A) and arginyl aminopeptidase, AAP, (B). ■ Activities measured at time zero in WSPE, ▨ Activities measured at time zero in SPE > 10 kDa.

Protease and aminopeptidase activities from cells grown in the WSPE increased during the incubation time (Figure 5 A, B and C and Figure 7 A and B) as happened for urea. In the case of the use of SPE > 10 kDa (Figures 6 and 7), the initial total specific endoprotease activity was reduced by day 4, then started a progressive increase up to day 10 (Figure 5 A). The same pattern was observed for PrB (Figure 5 C) whereas PrA seems to increase from day 4 till the end of the incubation time (Figure 6B). The expression of aminopeptidase activities followed a similar trend as found for endoproteases (Figure 6 A and B) although PAP was not initially induced by the absence of compounds under 10 kDa in protein

extracts. Once again as well as happened in the presence of urea, the expression of PAP activity was affected to a higher extent by the phase of growth showing nearly 4-fold times higher specific activity at the end than at the beginning of the incubation period (from 50 U/ mg protein to 200 U/ mg protein, respectively, Figure 6 A) while AAP activities varied from 60 U/mg protein to 80 U/ mg protein being just 1.3-fold higher at the end of the incubation (Figure 6 B). Total activities were higher when cells were grown on WSPE than on SPE > 10 kDa due to the better growth yields (data not shown).

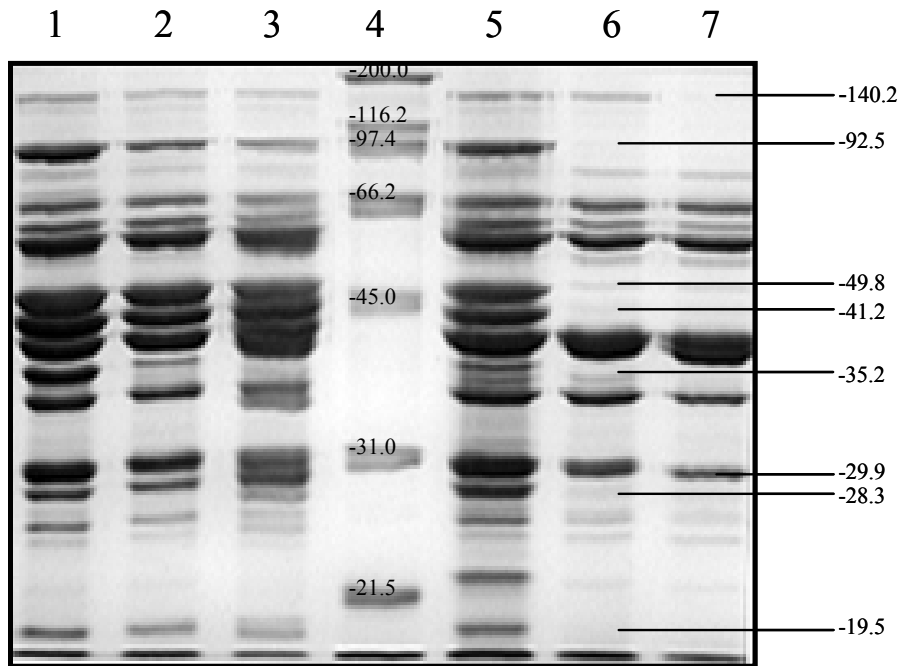


Figure 7. SDS-PAGE of sarcoplasmic proteins of the *D. hanseii* culture supernatants obtained during growth on either whole sarcoplasmic proteins extract (WSPE) or sarcoplasmic muscle proteins extract in which components of less than 10 kDa were eliminated (SPE > 10 kDa) as sole nitrogen source.

1, WSPE at day 4; **2**, WSPE at day 8; **3**, WSPE at day 12; **4**, standard proteins (kDa); **5**, SPE > 10 kDa at day 4; **6**, SPE > 10 kDa at day 8; **7**, SPE > 10 kDa at day 12.

Sarcoplasmic proteins from the grown medium were hydrolyzed in both cases as shown by SDS-PAGE (Figure 7). Most noticeable hydrolyzed bands corresponded to proteins of the following molecular masses: 140.2, 92.5, 49.8, 41.2, 35.2, 29.9, 28.3 and 19.5 kDa. However, in the medium containing the sarcoplasmic proteins extract without compounds of lower molecular mass (< 10 kDa) underwent a more intense degradation.

DISCUSSION

The present study constitutes the first attempt to understand the regulation of the expression of the endoproteases and aminopeptidases activities in *D. hansenii*. Currently, there is scarce information about the putative roles of the proteolytic system of *D. hansenii* despite the fact that could have several implications in food fermentations, mainly of meat and dairy products, which are protein rich food matrixes.

All the proteolytic enzyme activities, PrA, PrB, PAP and AAP, have been measured using fluorescence methods that can represent an increase in the sensitivity and accuracy in relation to previous studies carried out with *Saccharomyces* (31, 34). These methods, optimized for *D. hansenii* perhaps could be applied to other yeast species, considering the similarities that have been found with the proteolytic systems of *S. cerevisiae* (37) and *Kluyveromyces lactis* (10).

The activation of both *D. hansenii* endoproteases, PrA and PrB, after incubation overnight at 25 °C at pH 5.0 (o/n) was according to what observed for *S. cerevisiae* (37) and *Kluyveromyces lactis* (10) suggesting the existence of similar endogenous proteinase inhibitors in every species. In general, inhibitor levels seemed to be proportional to the activity levels as pointed out by Slaughther and Nomura (1992) and Tanimizu and Hayashi (1996). This means that they could not regulate the endoproteinase activities but protect the intracellular proteins from proteolytic degradation during their transport to the vacuole. In *S. cerevisiae* protease inhibitors are located in the cytoplasm whereas the final destination for the endoproteases, PrA and PrB, is the vacuole (31). The PrA activity experienced major modifications as a function of the medium composition (Figure 1). Physiologically speaking that could mean that PrA would be more regulated by

environmental factors than PrB. In *S. cerevisiae*, PrA catalyzes cleavages involved in maturation of precursors and activation of zymogens of other vacuolar proteases and hydrolases triggering the activation of the protease cascade (16).

Specific endoprotease and aminopeptidase activities were higher when cells were grown on complex nitrogen source as dipeptides than on a ready assimilated source such as amino acids. On the other hand, media containing ammonium (media 1, 8, 9 and 10) or amino acids (media 6 and 7) displayed the lower total specific endoprotease and aminopeptidase activities (see figure 1 A and 2) suggesting that those molecules could act as promoters of the NCR of proteases. Accordingly, NCR has been reported to be induced in yeast by rapid metabolized nitrogen sources for example free amino acids and ammonium sulphate (15). Thus, the activity level of the carboxypeptidase S of *S. cerevisiae* was reduced in the presence of amino acids and induced in the presence of a dipeptide hydrolyzed by this enzyme (40). In *S. cerevisiae* there are also evidences that ammonium ion induces NCR, which also plays a role in the regulation of the synthesis and activities of cellular proteases (1). It has also been proved that aminopeptidase activities (PAP and AAP) of *D. hansenii* were induced by peptides. ProLeu induces PAP preferably and LysAla induces AAP preferably, indicating that each enzyme is mainly induced by its own substrate. These results indicated that both aminopeptidases could have a role in the utilization of exogenous peptides as a nitrogen source when free amino acids are not available. In addition, in *S. cerevisiae*, it is also described that exogenous dipeptides bearing a destabilizing N-terminal residue (basic or hydrophobic) derepress the synthesis of its transporter and enhance the cell's ability to import di- and tripeptides (36). Overall, PAP activity of *D. hansenii* seemed to be more regulated than AAP, showing higher modifications as a function of the medium composition and during different stages of growth. Acetate clearly promotes *D. hansenii* protease activities what it is according to that found by Hansen et al. (1977). So that, the protease levels studied, seems to be also dependent on the availability of good or bad carbon sources for the cell.

The experiment on urea during different growth stages revealed that specific activities of the four studied enzymes, PrA, PrB, PAP and AAP, increased clearly during transition from exponential to stationary phase of growth. In *S. cerevisiae*

has also been shown that resting cells display higher rates of protein turnover than growing cells, and rates of protein degradation increase several-fold as cells enter stationary phase (18). There are two ways of supplying the cell with nitrogen, one by uptake of exogenous nitrogen containing compounds and the second by degradation of endogenous proteins (protein turnover). PrA and PrB of *S. cerevisiae* participate in the protein turnover, degrading ubiquitinated proteins together with proteasomes since cells deficient for PrA or PrB result in accumulation of large amounts of ubiquitinated proteins in the vacuoles (16, 30). The vacuolar proteases PrA and PrB in *S. cerevisiae* account for the bulk of the protein degradation that takes place when cells are in starvation-induced conditions and are essential to survive nitrogen limitation (16). Such role for the proteases from *D. hansenii* could explain their increased specific activities observed at the latest incubation time when cells are in advanced stationary phase and nutrient limitation could occur. At this stage, the PAP and AAP should participate in the peptide metabolism although a more prominent role of PAP could be inferred from its higher increase in activity levels.

In addition, the total endoproteolytic and total aminopeptidase activities were increased many times (up to eight-fold) at the end of the incubation period. These are results to be taken into account for purification purposes, since initial activity is always a limiting factor. In addition, it could be important to obtain rich protease cells or extracts for other industrial applications such as optimization of production and utilization of yeast enzymes for food fermentation processes (26, 41). For such purpose, *D. hansenii* should be grown on nitrogen sources that induce protease expression, such as urea, and cells should be harvested in an advanced phase of growth.

Meat is a very rich matrix containing proteins of high value and micronutrients such as iron, zinc, vitamin B₁, niacin equivalents and vitamin B₁₂, sugars, free amino acids and peptides supporting good growth (12). The present work has proved that sarcoplasmic muscle proteins efficiently support the growth of *D. hansenii* and that an abrupt protein hydrolysis occurred specially when lower molecular mass compounds (< 10 kDa) were not present. In this case, activities of the endoproteases were expressed at high levels at the beginning of the incubation period (4.0 U/ mg protein in SPE > 10 kDa versus 1.5 U/ mg protein in WSPE) that

could be due to the lack of ready assimilable nitrogen sources in the growth medium. So, *D. hansenii* regulates endoprotease expression depending on the complexity of the available nitrogen source as demonstrated for PrA and PrB expressions in *S. cerevisiae* that are sensitive to NCR (6). AAP activity follows the same pattern being initially (day 2) higher when growing on SPE > 10 kDa (100 U/ mg protein) than when growing on WSPE (50 U/ mg protein). PAP followed different regulation pattern being higher at day 2 grown on WSPE (60 U/ mg protein) than grown on SPE > 10 kDa (40 U/ mg protein) although at the latest stages a higher increase of PAP took place. Thus, a more prominent role of AAP in the initial degradation of muscle derived peptides and their use as nutrients could be inferred while the role of PAP could be more related to the growth phases. In *S. cerevisiae*, aminopeptidase I is to some extent regulated by NCR as could be the case for *D. hansenii* aminopeptidases (8).

It is known that in *S. cerevisiae* large peptides and proteins do not support growth since it appears to be neither capable of hydrolyzing nor accumulating these macromolecules. However, extracellular proteolytic activity has been described in other species, which could cover this nutritional role (14). In *D. hansenii*, despite the fact that major proteases are intracellular, the existence of endoproteolytic activity attached to the cell-wall has also been detected as responsible for casein or muscle proteins digestion (20, 28). Partial lysis and subsequent leakage of proteolytic enzymes to the medium (20) could also promote the breakdown of large-proteins.

Yeasts trigger general and specific stress responses to particular environmental conditions such as nitrogen limitation (11, 39). In this situation, protease levels are increased dramatically for improved protein degradation and a better utilization of the available nitrogen sources (17). Limited nutritional conditions or very competitive interactions are typical of food fermentation processes. For example, lactic acid bacteria compete very efficiently for the available nitrogen sources during meat fermentation while yeasts could be more susceptible to nitrogen limitation. Therefore, the mechanism evolved by the species of *D. hansenii* to adapt to limiting nitrogen concentrations could be critical for survival in such processes. The regulation of the studied proteases (PrA, PrB, PAP and AAP) seems to respond to a general mechanism that depends on the available

nitrogen source and its complexity, and could have an enormous impact in yeast physiology and the outcome of the industrial food processing.

Acknowledgements

This work has been supported by grant AGL2001-1141 from CICYT (Spain). FPU/MEC scholarship to Tomás Bolumar is fully acknowledged.

REFERENCES

1. **Becker, JM, and F. Naider.** 1980. Transport and utilization of peptides by yeast. pp. 257-279. In J.W. Payne (Ed.), *Microorganisms and nitrogen sources*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, USA;.
2. **Bintsis, T., A. Vafopoulou-Mastrojiannaki, E. Litopoulou-Tzanetaki, and R.K Robinson.** 2003. Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine. *J. Appl. Microbiol.* **95**:68-77.
3. **Boekhout, T. and V. Robert.** (Eds). 2003. *Yeast in food*. pp. 1-488. Woodhead Publishing in Food Science and Technology Ltd and CRC Press LLC. © 2003, B. Behr's Verlag Gmbh & Co. KG, Averhoffstraße 10, 22085 Hamburg, Germany.
4. **Bolumar, T., Y. Sanz, M.C. Aristoy, and F. Toldrá.** 2003 a. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:227-232.
5. **Bolumar, T., Y. Sanz, M.C. Aristoy, and F. Toldrá.** 2003 b. Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Int. J. Food Microbiol.* **86**:141-151.
6. **Coffman, J.A., and T.G. Cooper.** 1997. Nitrogen GATA factors participate in transcriptional regulation of vacuolar protease genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:1469-1474.
7. **Cook, P.E.** 1995. Fungal ripened meats and meat products, pp. 110-129. In G. Campbell-Platt, and P.E. Cook (eds.), *Fermented meats*. Blackie Academic & Professional. Chapman & Hall. London, UK.

8. **Cueva, R., N. García-Álvarez, and P. Suárez-Rendules.** 1989. Yeast vacuolar aminopeptidase yscI. Isolation and regulation of the APE1 (LAP4) structural gene. *FEBS Lett.*, **259**:125-129.
9. **Encinas, J-P., T.M. Lopez-Díaz, M.L. García-Lopez, A. Otero, and B. Moreno.** 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* **54**:203-208.
10. **Flores, M.V., A. Cuellas, and C.E. Voget.** 1999. The proteolytic system of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast.* **15**:1437-1448.
11. **Gasch, A.P., P.T. Spellman, C.M. Kao, O. Carmel-Harel, M.B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, and P. Brown.** 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* **11**:4241-4257.
12. **Hammes, W.P., D. Haller, and M.G. Gänzle.** 2003. Fermented meat, pp. 251-275.. *In* E.R. Farnworth, (ed.), *Handbook of fermented functional foods, Foods and nutraceuticals series.* CRC press LLC, Corporate Blvd., Boca Raton, Florida, USA,.
13. **Hansen, R.J., R.L. Switzer, H. Hinze, and H. Holzer.** 1977. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, **496**:103-114.
14. **Henschke, P.A., and Jiranek, V.** 1993. Yeasts-Metabolism of nitrogen compounds, pp. 77-164. *In* G.H. Fleet (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology.* Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Switzerland.
15. **Hofman-Bang, J.** 1999. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biotechnology.* **12**:35-73.
16. **Jones, E.W.** 1991. Three proteolytic systems of the yeast *Saccharomyces cerevisie*. *J. Biol. Chem.* **266**:7963-7966.
17. **Jones, E.W., and D.G. Murdock.** 1994. Proteolysis in the yeast vacuole, pp. 115-134. *In* A.J. Ciechanovo, and A.L. Schwartz (Eds), *Cellular proteolytic systems.* Wiley – Liss, Inc. New York, USA.

18. **Jones, E.W., Webb, G.C., Hiller, M.A.** 1997. Biogenesis and function of the yeast vacuole, pp. 363-470. *In* J.R. Pringle, J.R. Broach, and E.W. Jones (eds.), *Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: cell cycle and cell biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
19. **Jones, E.W.** 2002. Vacuolar proteases and proteolytic artifacts in *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 127-150. *In* C. Guthrie, and G.R. Fink (eds.), *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*, *Methods in Enzymology*. vol. 351 Academic press, Elsevier Science, California, USA.
20. **Kumura, H., K. Takagaki, T. Sonb, M. Tsukahara, T. Tanaka, and K. Shimazaki.** 2002. Casein digestion by *Debaryomyces hansenii* isolated from cheese. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**:1370-1373.
21. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
22. **Lépingle, A., S. Casaregola, C. Neuvéglise, E. Bon, H.V. Nguyen, F. Artiguenave, P. Wincker, and C. Gaillardin.** 2000. Genomic exploration of the Hemiascomycetous Yeast: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. *FEBS Letters.* **487**:82-86.
23. **Magni G., M. Drewniak, I. Santarelli, and C.Y. Huang.** 1986. Reexamination of the activation of yeast proteinase B at pH 5, loss of inhibition effect of proteinase B inhibitors. *Biochem. Int.* **12**:557-565.
24. **Nobre, A., C. Lucas, and C. Leao.** 1999. Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *App. Environ. Microbiol.* **65**: 3594-3598.
25. **Petersen, K.M., S. Westall, and L. Jespersen.** 2002. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surface-ripened cheeses. *J. Dairy Sci.* **85**:478-486.
26. **Samelis, J., and J.N. Sofos.** 2003. Yeasts in meat and meat products, pp. 239-257. *In* T. Boekhout, and V. Robert (Eds.), *Yeasts in food*. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Averhoffstraße 10, 22085 Hamburg, Germany,.

27. **Santos-Mendoza, R.C.** 2000. Ph.D. Thesis. Aislamiento, selección y caracterización de levaduras de embutidos con vistas a su utilización como coadyuvante en el proceso de curado. Universidad de Valencia, Valencia, Spain.
28. **Santos, N., R.C. Santos-Mendoça, Y. Sanz, T. Bolumar, M.C. Aristoy, and F. Toldrá.** 2001. Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Debaryomyces hansenii*. *Int. J. Food Microbiol.* **68**:199-206.
29. **Sherman, D., P. Durrens, E. Beyne, M. Nikolski, J.L. Souciet, and Genolevures Consortium.** 2004. Genolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res.* **32**:315-318.
30. **Simeon, A., I.J. van der Klei, M. Veenhuis, and D.H. Wolf.** 1992. Ubiquitin, a central component of selective cytoplasmic proteolysis is linked to proteins residing at the locus of non-selective proteolysis, the vacuole. *FEBS Lett* **301**:231-235.
31. **Slaughter, J.C., and T. Nomura.** 1992. Activity of the vacuolar proteases of yeast and the significance of the cytosolic protease inhibitors during the post-fermentation decline phase. *J. Inst. Brew.* **98**:335-338.
32. **Smith, P. K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Garthner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchininic acid. *Analytical Biochem.* **150**:76-85.
33. **Strauss M.L., N.P. Jolly, M.G. Lambrechts, and P. van Rensburg.** 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeast. *J. Appl. Microbiol.* **91**:182-190.
34. **Tanimizu N., and R. Hayashi.** 1996. Changes in vacuolar protease activities during synchronous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 1526-1527.
35. **Toldrá, F., Y. Sanz and M. Flores.** 2001. Meat Fermentation Technology. Chapter 27, pp.537-561. *In*: Y.H. Hui, R. Shorthose, O. Young, M. Koohmaraie, and R. Rogers (eds.), *Meat Science and Applications*. Marcel Dekker INC. New York, USA.

36. **Turner, G.C., D. Fangyong, and A. Varshavsky.** 2000. Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Letters to Nature.* **405**:579-583.
37. **Van Den Hazel, H., M.C. Kielland-Brandt, and J.R. Winther.** 1996. Review: Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast.* **12**:1-16.
38. **Van Den Tempel, T., and M. Jakobsen.** 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int. Dairy J.* **10**:263-270.
39. **Winderickx, J., I. Holsbeeks, O. Lagatie, K. Giots, J. Thevelein, and H. Winde.** 2003. From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast, pp 307-386.. *In*: S. Hohmann, and W.H. Mager (Eds.), *Yeast stress responses. Topics in current genetics.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
40. **Wolf, D.H., and C. Ehmman.** 1978. Carboxypeptidase S from yeast: Regulation of its activity during vegetative growth and differentiation. *FEBS Letters.* **91**:59-62.
41. **Zambonelli, C., S. Rainieri, G. Chiavari, G. Montanari, M. Benevelli, and L. Grazia.** 2000. Autolysis of yeast and bacteria in fermented foods. *Ital. J. Food Sci.* **12**:9-21.

4. Resumen de resultados y discusión global

4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GLOBAL

Las proteasas de las levaduras están involucradas en numerosas funciones biológicas esenciales para la célula como el recambio proteico, la degradación de proteínas aberrantes, el correcto procesamiento de proteínas, la inactivación catabólica y la adaptación a condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno o alta demanda (esporulación o meiosis; apartado 1.5.2.). Por otra parte, *D. hansenii* es la levadura más abundante en embutidos fermentados (Metaxapoulos *et al.*, 1996, Santos-Mendoza, 2000, Encinas *et al.*, 2000, Coppola *et al.* 2000) y en condiciones adecuadas sus actividades metabólicas pueden mejorar las propiedades sensoriales de los productos cárnicos fermentados (Leistner, 1986, Gehlen *et al.*, 1991, Geisen *et al.*, 1992, Hammes y Knauf, 1994, Jessen, 1995, Encinas *et al.*, 2000, Olsen y Stahnke, 2000, Samelis y Sofos, 2003 y Dura, 2003). En este sentido, la proteólisis es uno de los factores determinantes del desarrollo del sabor y del aroma (apartado 1.2.3). Sin embargo, no existen estudios bioquímicos en los que se describan las características y posibles funciones del sistema proteolítico de *Debaryomyces hansenii*. El objetivo de esta Tesis ha sido la caracterización del sistema proteolítico de *D. hansenii*, dada la importancia del metabolismo proteico, tanto en la fisiología de las levaduras como en la tecnología de los productos cárnicos curados, y la escasez de estudios con relación al tema propuesto existentes hasta la fecha.

El punto de partida fueron las cepas de levaduras de la especie *D. hansenii* CECT 12487 y CECT 12488, aisladas de la flora natural del centro de un embutido fabricado de acuerdo con prácticas industriales y seleccionadas con vistas a su posible utilización como cultivos iniciadores por su mayor competitividad (representaron > 80 % de los aislados al final del proceso) y por corresponder a patrones mitocondriales distintos (aumento de la diversidad) (Santos-Mendoza, 2000, ver apartado 1.4.2).

4.1. Selección de cepas de *D. hansenii* en base a su actividad proteolítica

Inicialmente, se valoraron las actividades endo y exoproteolíticas de distintas cepas de *D. hansenii*. Para ello, se utilizó un buen número de sustratos fluorescentes con el objeto de detectar las diferentes actividades y seleccionar

técnicas para su medida lo suficientemente sensibles a fin de poder afrontar la purificación y caracterización de las enzimas más importantes. La actividad proteolítica (endo y exo) de *D. hansenii* fue detectada mayoritariamente a nivel intracelular y no se observó la secreción de proteasas al medio extracelular (sobrenadante del cultivo) lo que concuerda con las conclusiones de Choisy *et al.* (1987). No obstante, los ensayos realizados con suspensiones celulares frente a sustratos de endoproteasas permitieron detectar cierta actividad proteolítica, posiblemente asociada a la pared o membrana celular. Todas las cepas ensayadas mostraron actividad endo y, de forma más apreciable, exoproteolítica. La hidrólisis frente a sustratos fluorescentes específicos de aminopeptidasas de tipo aminoacil-amidometilcoumarina (aminoacil-AMC) puso de manifiesto similitudes entre los sistemas proteolíticos de todas las cepas estudiadas. Para las tres, los aminoácidos liberados preferentemente fueron arginina, lisina, leucina y metionina, en segundo término, fenilalanina y alanina y, en tercer término, tirosina y ácido glutámico. La hidrólisis de serina y glicina fue prácticamente inapreciable.

Con el objeto de ampliar la información de las actividades proteolíticas presentes en el contenido intracelular de *D. hansenii*, se midió la actividad endoproteolítica de extractos intracelulares frente a caseína como proteína tipo en función del pH, obteniéndose máxima actividad, a pH = 5.5 y a pH = 9.0. Además, se detectó actividad endoproteolítica máxima frente al sustrato N-Succinyl-LeucinaTirosina-AMC a pH = 8.0. Asimismo, se estudió la actividad exoproteolítica en función del pH frente a los siguientes sustratos derivados de la metilcoumarina (aminoacil-AMC): Arg-AMC como aminoácido básico, Leu-AMC y Ala-AMC como aminoácidos neutros y Pro-AMC como aminoácido que, dada su estructura cíclica, sólo es hidrolizado por un tipo específico de peptidasas. El pH óptimo de actuación para estas actividades fue neutro y solo la actividad que hidrolizaba prolina era capaz de actuar a pH ácido, manteniendo un 50 % de su actividad a pH = 5.5.

La cepa *D. hansenii* CECT 12487 fue la que mostró mayor actividad exoproteolítica que, de acuerdo con los estudios disponibles hasta la fecha, es el tipo de actividad que podría tener una mayor importancia en procesos de curado de embutidos (Molly *et al.*, 1997, Ordóñez *et al.*, 1999). Así pues, esta cepa fue

seleccionada para la realización de estudios más específicos acerca de la composición de su sistema proteolítico y con miras a futuras aplicaciones.

4.2. Hidrólisis de proteínas sarcoplásmicas por *D. hansenii*

A continuación, se evaluó la capacidad de actuación de la cepa seleccionada *D. hansenii* CECT 12487 sobre proteínas reales, como son las proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino, mediante el análisis de los fragmentos proteicos, los péptidos y los aminoácidos generados tras incubar las proteínas sarcoplásmicas con suspensiones celulares de esta cepa, con extractos intracelulares o la combinación de ambos.

El análisis de los fragmentos proteicos resultantes realizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) reveló una degradación de proteínas similar en los tres casos, demostrando su capacidad hidrolítica frente a este sustrato. El análisis de los perfiles peptídicos permitió observar diferencias en la distribución de péptidos en cuanto a la hidrofobicidad de éstos, en los tres ensayos. El extracto intracelular generó más péptidos polares y de polaridad intermedia y menos péptidos hidrofóbicos que las células. La combinación de células y extractos intracelulares generó un perfil intermedio. La incubación con células dio lugar a una producción de aminoácidos libres, mientras que la adición de extracto intracelular provocó una menor generación de los mismos, observándose aumentos significativos sólo en el caso del ácido aspártico e histidina y, en menor proporción, leucina e isoleucina. En general, los aminoácidos libres fueron degradados por el extracto intracelular. La combinación de ambos (células y extractos intracelulares) produjo un efecto similar al de las células aunque la generación de aminoácidos fue ligeramente inferior, debido presumiblemente, a su posterior catabolismo por acción de las enzimas intracelulares. Este dato concuerda con el mayor incremento de pH detectado en el extracto de proteínas al que se adicionó el extracto intracelular de *D. hansenii* con respecto al detectado en el caso en que se incorporaron suspensiones celulares (pH = 7.4 frente a pH = 6.6-6.7), fruto de una mayor producción de amoniaco como consecuencia del catabolismo de aminoácidos.

4.3. La prolín aminopeptidasa (PAP) de *D. hansenii*

Se ha conseguido purificar una prolín aminopeptidasa (PAP) (E.C. 3.4.11.5) de *D. hansenii* que es una enzima que no había sido descrita con anterioridad en levaduras. Se trata de una cisteín peptidasa inhibida por iodoacetato, con una masa molecular en estado nativo de 370 kDa, compuesta por subunidades de 53.5 kDa, activa en un amplio rango de pH (5.0-9.5), y que libera exclusivamente el aminoácido prolina del extremo amino terminal.

De su proceso de purificación, merece una mención especial el fraccionamiento con protamina realizado inicialmente ya que fue un método efectivo de purificación de proteínas previo a las etapas cromatográficas más sofisticadas. Las protaminas son polipéptidos de 5000-6000 Da, ricos en residuos de arginina, que pueden representar el 60-70 % de la molécula (Saperas *et al.*, 1996). Debido a su carga positiva tienen alta afinidad por moléculas cargadas negativamente y, por eso, se utilizan comúnmente para la eliminación del ADN de los extractos intracelulares. Además, también pueden unirse a proteínas y esta unión, que es reversible, puede deshacerse al suspender el complejo proteína-protamina en un tampón de alta fuerza iónica y añadir ADN por el que tiene una afinidad más alta. Este método posee la ventaja de que no es agresivo con las proteínas ya que se basa en una interacción iónica, es rápido y no necesita equipos sofisticados. Su aplicación resultó ser muy efectiva en la purificación de la PAP (fraccionamiento entre 40 y 100 mg/ g proteína) permitiendo la eliminación del 95 % de las proteínas contaminantes.

La existencia de esta enzima, PAP, con una especificidad tan restringida se debe a la especial estructura cíclica de la prolina que limita la hidrólisis del enlace peptídico por acción de otras peptidasas de amplia especificidad. La PAP ha demostrado ser activa a pH ácido (30% de su actividad a pH = 5.0, 50 % a pH = 5.5 y 75 % a pH = 6.0) y muy estable (meses a temperaturas de refrigeración) por lo que podría contribuir a la liberación de este aminoácido del extremo amino permitiendo la actuación a otras aminopeptidasas y así el progreso de la cadena proteolítica en productos curados fermentados. Además, esta enzima podría estar implicada en la eliminación del sabor amargo en diversos alimentos fermentados. El sabor amargo está relacionado con el contenido de aminoácidos hidrofóbicos, como la leucina, isoleucina y la prolina, encontrados en ciertos péptidos aislados de

embutidos fermentados (Henriksen y Stahnke, 1997) y de quesos (Kai-Ping y Warthesen, 1996). El problema es particularmente importante en quesos (Habibi-Najafi y Lee, 1996) ya que la caseína es una proteína rica en prolina. En este caso, la efectividad de este tipo de enzimas ha sido probada como mecanismo de eliminación del sabor amargo (Habibi-Najafi y Lee, 1996). *D. hansenii* también es una especie aislada con frecuencia, e incluso de forma mayoritaria en quesos (Pereira-Dias *et al.*, 2000, Petersen *et al.*, 2002). Por todo ello, la PAP caracterizada podría tener importancia en este sentido.

4.4. La arginín aminopeptidasa (AAP) de *D. hansenii*

Se ha purificado y caracterizado la arginín aminopeptidasa (AAP) (EC 3.4.11.6) de *D. hansenii*. Se trata de una metalo peptidasa, con masa molecular de 101 kDa, estructura dimérica y con un pH de actuación neutro-básico (6.0-9.0) y óptimo a pH = 7.0 y 37 °C. La AAP de *D. hansenii* es homóloga de la ApCo o ApY descritas en *Saccharomyces cerevisiae*, que son activadas por cobalto e hidrolizan preferentemente aminoácidos básicos, arginina y lisina (Klionsky *et al.*, 1990, Van den Hazel *et al.*, 1996, Jones *et al.*, 1997). Además, la AAP de *D. hansenii* es capaz de liberar, aunque con menor velocidad, aminoácidos no polares (leucina y metionina) y aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina), coincidiendo con la especificidad descrita para la enzima homóloga en *S. cerevisiae* por Achstetter *et al.* (1982) y Yasuhara *et al.* (1994).

La enzima es inhibida por inhibidores típicos de aminopeptidasas (puromicina y bestatina), por agentes quelantes (EDTA, EGTA y especialmente fenantrolina) y por iodoacetato, compuesto que reacciona con los grupos sulfidrilo. El cobalto, manganeso y calcio activan la enzima en proporción al tamaño del átomo, es decir, cuanto más grande producen mayor activación. Por el contrario, los metales pesados cobre, cadmio y mercurio la inhiben dependiendo también del tamaño del átomo, es decir, cuanto más grande producen mayor inhibición. Por otra parte, la actividad frente a dipéptidos de AAP de *D. hansenii* resultó ser máxima cuando el residuo en posición carboxi terminal era un aminoácido ácido. Por lo tanto, se concluye que la carga neta en el centro activo es esencial para la catálisis, lo cual es típico de metalo proteasas. De hecho, Yasuhara *et al.*, (1994) demostraron la presencia de zinc en la enzima de *S. cerevisiae*.

La arginina es el aminoácido liberado preferentemente por los extractos intracelulares de *D. hansenii*, siendo muy probablemente la AAP la enzima responsable, lo que indica que es una de las aminopeptidasas más importantes del sistema proteolítico de *D. hansenii*. La arginina juega un papel fundamental en el metabolismo del nitrógeno en *S. cerevisiae*. Ésta puede acumularse en la vacuola sirviendo como reserva, ser degradada a ornitina y posteriormente convertida en prolina o alternativamente degradarse a urea la cual puede ser excretada al medio exterior, o actuar como precursor en la formación de serina, treonina, tirosina, fenilalanina y bases púricas, convirtiéndose en uno de los aminoácidos centrales del metabolismo del nitrógeno en levaduras (Klionsky *et al.*, 1990, Henschke y Jiranek, 1993 y Hofman-Bang, 1999).

De acuerdo con las propiedades bioquímicas de la AAP de *D. hansenii*, su función en la generación de aminoácidos libres durante los procesos de fermentación y curado sería limitada debido a que su intervalo de pH de actuación es neutro-alcalino, lejos de los pH ácidos de embutidos. Sin embargo, sí podría tener importancia en otros productos cárnicos con pH más neutro como el jamón, donde Martín (2000) concluyó que la inoculación conjunta de *D. hansenii* y *P. chrysogenum* en la superficie del jamón provocaba una mayor hidrólisis de proteínas miofibrilares durante su maduración con un aumento significativo de aminoácidos libres. Bintsis *et al.*, (2002) encontraron niveles superiores de aminoácidos libres comparándolos con el control después de 60 días de maduración en quesos a los que se adicionó *D. hansenii* como cultivo iniciador

4.5. La proteasa B (PrB) de *D. hansenii*

Se ha purificado y caracterizado la proteasa B (PrB) (EC 3.4.21.48) de *D. hansenii*. Se trata de una serín endoproteasa inhibida también por compuestos que reaccionan con los grupos sulfidrilo, de 30 kDa y pH de actuación neutro-alcalino (6.0-12.0) con un óptimo a pH = 8.0. Por sus propiedades bioquímicas, la PrB de *D. hansenii* es homóloga a la PrB de *S. cerevisiae* (Achstetter y Wolf, 1985, Moehle *et al.*, 1987, Klionsky *et al.*, 1990, Jones *et al.*, 1997, Van den Hazel *et al.*, 1996, Jones, 2002) y, de hecho, los anticuerpos policlonales para la PrB de *S. cerevisiae*, presentaron reacción positiva frente a la PrB purificada de *D. hansenii*, lo que confirma su homología.

Se detectó la presencia de un inhibidor endógeno (I^B) para la PrB en el citoplasma que pudo eliminarse tras una incubación de 24 horas a 25 °C. Este inhibidor está ampliamente descrito en *S. cerevisiae* (Achstetter y Wolf, 1985, Klionsky *et al.*, 1990, Jones *et al.*, 1997, Van den Hazel *et al.*, 1996). Además, se observó que la actividad total del extracto frente al sustrato utilizado en su caracterización (N-Succinyl-LeucinaTirosina-AMC) podía deberse a dos actividades, una inhibida por pepstatina (inhibidor de aspártico proteasas) y la otra inhibida por 3,4-dicloroisocoumarina (inhibidor de serín proteasas). Asimismo, se han descrito la existencia de dos endoproteasas mayoritarias en *S. cerevisiae*, la proteasa A (PrA), aspártico proteasa, y la proteasa B (PrB), serín proteasa (Achstetter y Wolf, 1985, Klionsky *et al.*, 1990, Jones *et al.*, 1997, Van den Hazel *et al.*, 1996). También se detectó un inhibidor endógeno (I^A) para la PrA de *D. hansenii* que fue, al menos, parcialmente eliminado tras una incubación de 24 horas a 25 °C. La purificación de la PrB se inició también con un fraccionamiento con protamina (30 y 80 mg/g proteína) que permitió la eliminación del 90 % de las proteínas contaminantes lo que facilitó enormemente la purificación total de ésta enzima.

La PrB purificada presentó capacidad para hidrolizar las proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino por lo que podría estar involucrada en los cambios observados en la hidrólisis de proteínas sarcoplásmicas al adicionar células o extractos intracelulares de *D. hansenii* realizados inicialmente (apartados 3.1 y 4.2). No obstante, la actuación de esta enzima en el embutido fermentado no se presupone importante ya que su pH de actuación es neutro-alcálico y no es activa a valores de pH inferiores a 6.0. Podría tener mayor relevancia en otros productos cárnicos como el jamón donde el pH es más alto (Martín, 2000). Por el contrario, la proteasa A (PrA) podría tener una función más relevante en la hidrólisis de proteínas musculares durante la maduración de embutidos fermentados. Esta enzima pertenece a la misma familia que la catepsina D muscular (Jones *et al.*, 1991a), a la que se le atribuye gran parte de la hidrólisis de tipo endoproteolítico observada en estos productos (Verplaetse, 1994, Molly *et al.*, 1997). Lurton *et al.* (1989) demostró que la proteólisis observada durante la autólisis de levaduras a pH ácido (pH = 3), que ocurre en vinos, se debía casi exclusivamente a la PrA de *S. cerevisiae*. La purificación y caracterización de la

PrA de *D. hansenii* aportaría datos fundamentales para establecer su posible función en procesos de maduración de embutidos.

4.6. Efecto de la fuente de nitrógeno y de carbono y de la fase de crecimiento sobre la síntesis de enzimas proteolíticas en *D. hansenii*

Los niveles de las actividades proteolíticas de las enzimas caracterizadas, PrA, PrB, PAP y AAP, fueron diferentes en función de las fuentes de nitrógeno y de carbono utilizadas en el medio de cultivo. Las actividades específicas de las dos endoproteasas y de las dos aminopeptidasas estudiadas fueron máximas en presencia de urea y dipéptidos. Por el contrario, dichas actividades específicas fueron mínimas cuando se utilizaron fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables como el sulfato amónico y los aminoácidos libres, lo que indica que su expresión podría estar sujeta a los mecanismos de represión catabólica por nitrógeno (RCN) descritos en *S. cerevisiae* (Hofman-Bang, 1999). El dipéptido prolina-leucina indujo preferentemente la actividad de la PAP, enzima involucrada en su hidrólisis, al igual que el dipéptido lisina-alanina indujo preferentemente la actividad de la AAP. De acuerdo con estos resultados, ambas aminopeptidasas podrían estar implicadas en la utilización de péptidos exógenos como nutrientes. Con relación a las fuentes de carbono, las actividades específicas de las cuatro enzimas estudiadas fueron más bajas en las células crecidas en buenas fuentes de carbono, como la glucosa y la galactosa, que las desarrolladas en una mala fuente, como el acetato.

Los niveles de actividad específica y total de las distintas enzimas caracterizadas aumentaron al pasar de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria y en etapas avanzadas de ésta, en las que podría haber limitación de nutrientes. Estos resultados son de especial interés para la obtención optimizada de cultivos y extractos ricos en proteasas que facilitarían, tanto los procesos de purificación, como las aplicaciones en el ámbito industrial.

4.7. Efecto del uso de proteínas sarcoplásmicas como fuente de nitrógeno sobre la síntesis de enzimas proteolíticas en *D. hansenii*

D. hansenii creció muy bien en un medio de cultivo que contenía como única fuente de nitrógeno un extracto completo de proteínas sarcoplásmicas (ECPS) de músculo porcino, y en un extracto de proteínas sarcoplásmicas del que

se eliminaron los componentes de tamaño inferior a 10 kDa (EPS > 10 kDa), es decir las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables como son los aminoácidos y los péptidos pequeños, además de otros nutrientes. En este segundo caso (EPS > 10 kDa), los niveles iniciales de actividad proteolítica específica de las enzimas PrA, PrB y AAP fueron más altos, como respuesta a la escasa disponibilidad de una fuente de nitrógeno fácilmente metabolizable. Asimismo, al avanzar el periodo de incubación se observó una hidrólisis más intensa de las proteínas sarcoplásmicas en estas condiciones, presumiblemente, iniciada por proteasas asociadas a la envoltura celular y/ o por la acción de las intracelulares que pudieran ser liberadas por lisis celular (Kumura et al., 2002). La importancia de la contribución de la lisis celular de levaduras a la proteólisis mediante liberación de enzimas intracelulares ha sido descrita en distintas matrices como quesos, pan, cerveza, y vinos (Dreyer *et al.*, 1983, Ormrod *et al.*, 1991, Roostita y Fleet, 1991, Wyder y Puhán, 1999, Leclercq-Perlat *et al.*, 2000, Zambonelli *et al.*, 2000). Los niveles de actividad específica de las proteasas, (PrA y PrB), y las aminopeptidasas, (PAP y AAP), también aumentaron a lo largo del tiempo de incubación en proteínas sarcoplásmicas, como consecuencia posiblemente de cambios en la fase de crecimiento y del incremento en el recambio proteico que conlleva la entrada en fase estacionaria.

Estos resultados son de gran importancia ya que en la mayoría de fermentaciones alimentarias hay una gran competitividad con otros microorganismos por los nutrientes disponibles y su supervivencia puede depender de la capacidad de éstos para adaptar su metabolismo a dichas condiciones. En embutidos fermentados, las bacterias lácticas compiten muy eficientemente por las fuentes de nitrógeno y los mecanismos de adaptación de *D. hansenii* podrían ser relevantes para su implantación, supervivencia y contribución tecnológica.

Recientemente, también se ha señalado la importancia que podría tener la adición de extractos de microorganismos en la mejora de la percepción sensorial de los embutidos fermentados (Hagen *et al.*, 1996, Bruna *et al.*, 2000, Bruna *et al.*, 2001 a y b). Concretamente, la adición de extractos intracelulares de *D. hansenii* implicaría el aporte de una combinación de actividades endo y exoproteolíticas necesarias para una completa hidrólisis de las proteínas y generación de péptidos y aminoácidos libres en embutidos curados, lo que se ha relacionado con el sabor (Nishimura *et al.*, 1988a, Nishimura y Kato, 1988b). Además, estos extractos

actuarían también en la degradación de los aminoácidos, previamente generados por las peptidasas, aumentando el pH y generando, posiblemente, compuestos aromáticos (apartado 1.2.3).

El presente estudio bioquímico básico de purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas de *D. hansenii* es clave para conocer los mecanismos en los que se basan los efectos observados en los productos curados, así como para optimizar la actuación de levaduras y sus enzimas en los mismos.

5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. *Debaryomyces hansenii* es capaz de hidrolizar las proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino y, por tanto, generar cantidades significativas de péptidos y aminoácidos libres de importancia para el sabor. La inoculación de cultivos viables o extractos celulares permite modular cualitativa y cuantitativamente los productos resultantes.
2. La prolín aminopeptidasa (PAP) de *D. hansenii* es una cisteín peptidasa de 370 kDa, compuesta por subunidades de 53.5 kDa, activa en un amplio intervalo de pH (5.0-9.5), con un óptimo de actividad a pH = 7.5 y 45 °C, y que libera exclusivamente prolina del extremo amino. La PAP no había sido descrita previamente en levaduras.
3. La arginín aminopeptidasa (AAP) de *D. hansenii* es una metalo peptidasa de 101 kDa y estructura dimérica, con pH de actuación neutro-básico (6.0-9.0) y óptimo de actividad a pH = 7.0 y 37 °C. La AAP de *D. hansenii* es homóloga a la ApY, también denominada ApCo, descrita en *Saccharomyces cerevisiae*, activada por cobalto y con preferencia por aminoácidos básicos (arginina y lisina).
4. La proteasa B (PrB) de *D. hansenii* es una serín proteinasa de 30 kDa y con un pH de actuación neutro-básico (6.0-12.0) y óptimo de actividad a pH = 8.0 y 37 °C. Esta enzima es capaz de hidrolizar algunas proteínas sarcoplásmicas. Por sus propiedades bioquímicas, la PrB de *D. hansenii* es homóloga a la PrB de *S. cerevisiae*.
5. La producción de las enzimas proteolíticas estudiadas, PAP, AAP, PrB y PrA, depende de las fuentes de nitrógeno y carbono utilizadas en el medio de cultivo y de la fase de crecimiento. Las actividades específicas aumentan como respuesta a la presencia de fuentes pobres o complejas de nitrógeno y carbono, y a medida que el crecimiento celular avanza hacia la fase estacionaria. La obtención de cultivos o extractos de *D. hansenii*

utilizando urea como fuente de nitrógeno, así como la prolongación del tiempo de incubación para alcanzar niveles máximos de actividad total, podría constituir una buena alternativa de incorporación a la masa cárnica y así acelerar la maduración de embutidos curados.

6. Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

Achstetter, T. y Wolf, D.H. 1985. Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1: 139-157.

Addis, E., Fleet, G.H., Cox, J.M., Kolak, D. y Leung, T. 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 25-36.

Allen, E. y Foegeding, A. 1981. Some lipid characteristic and interactions in muscle foods. A review. *Food Technol.* 1: 253-257.

Barnet, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. 2000. *Yeast: Characterization and identification*. Third edition. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. (pp. 336-337)

Barreiro, D. 2003. Presentado el panel de consumo alimentario de 2002. *Eurocarne*. N° 116 Mayo: 21-26.

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

Bergmann, M. y Ross, W.F. 1936. On proteolytic enzymes. X. The enzymes of papain and their activation. *J. Biol. Chem.* 114: 717-726.

Besançon, X., Ratomahenina, R. y Galzy, P. 1995. Isolation and partial characterization of an esterase (EC 3.1.1.1) from a *Debaryomyces hansenii* strain. *Neth. Milk and Dairy J.* 49: 97-110.

Bintsis, T., Chissimelli, E.Z., Papadimitriou, A., y Robinson, R.K. 2002. Brine microbiology and the chemical and sensory properties of mature feta-type cheese. *Australian Dairy Foods*. 8: 30-32.

Bintsis, T., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Robinson, R.K. 2003. Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine. *J. Appl. Microbiol.* 95: 68-77.

Boekhout, T. y Robert, V. 2003. Yeast in Food. Woodhead Publishing in Food Science and technology Ltd and CRC Press. Behr's Verlag GmbH. Hamburg, Germany. pp 1-488.

Bolumar, T., Nieto, P. y Flores, J. 2001. Acidity, proteolysis and lipolysis changes in rapid cured fermented sausage dried at different temperatures. Food Sci. Technol. Int. 7: 269-276.

Bruna, J.M., Fernández, M., Hierro, E.M., Ordóñez, J.A., y de la Hoz, L. 2000. Improvement of the sensory properties of dry fermented sausages by the superficial inoculation and/or the addition of intracellular extracts of *Mucor racemosus*. J. Food Sci. 65: 731-738.

Bruna, J.M., Ordóñez, J.A., Fernández, M., Herranz, B. y de la Hoz, L. 2001 a. Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added and intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. Meat Sci. 59: 87-96.

Bruna, J.M., Hierro, E.M., de la Hoz, L., Mottram, D.S., Fernández, M., y Ordóñez, J.A. 2001 b. The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. Meat Sci. 59: 97-107.

Buzzini, O. y Haznedari, S. 1995. Characterization of yeasts isolated from fermented sausages produces in Umbria (Italia) and preliminary evaluation of their proteolytic and lipolytic activity. Ind. Alimentari. 34: 620-625.

Chen, M.T. y Guo, S.L. 1992. Studies on the microbial flora of Chinese-style sausage. II. Action of selected organism isolated from Chinese-style sausage on porcine muscle proteins. Fleischwirtsch, 72: 1126-1131.

Choisy, C., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J.L., y Tourneur, C. 1987. Microbiological aspects. En Cheesemaking. Science and Technology, 2nd edition, Eck, A. (Ed.). Technique et Documentation Lavoisier. Paris. France. pp. 259-292.

Comi, G. y Cantoni, C. 1980. I lieviti in insaccati crudi stagionati. Ind. Alimentari. Novembre: 857-860.

- Comi, G., Cantoni, C. y Traldi, C. 1982. Attività proteolitica di lieviti isolati da granuli di tirosina di prosciutti crudi stagionati. *Ind. alimentari*. Julio-agosto: 524-531.
- Cook, P.E. 1995. Fungal ripened meats and meat products. En *Fermented Meats*, Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. (Eds.). Blackie Academic & Professional, Glasgow, Reino Unido, pp. 110-129.
- Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M, Moschetti, G. y Villani, F. 2000. Microbial succession during ripening of Naples-Type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Sci.* 56: 321-329.
- Coretti, K. 1977. Starterkulturen in der Fleischwirtschaft. *Fleischwirtschaft*, 3: 386-388.
- Corsetti, A., Rossi, J. y Gobbetti, M. 2001. Interactions between yeast and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 1-10.
- Deiana, P., Cecchi, L., Lodi, R., Berardi, E., Farris, G.A. y Fatichenti, F. 1990. Some aspects of diacetyl and acetoin production by *Debaryomyces hansenii*. *Ital. J. Food Sci.* 1: 35-42.
- DeMasi, T., Warlaw, F.B., Dick, R.L. y Acton, J.C. 1990. Nonprotein nitrogen (NPN) and free amino acids contents of dry fermented and nonfermented sausages. *Meat Sci.* 27: 1-12.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., De la Hoz L. y Ordóñez, J.A. 1993. Effect of the addition of Pronase E on the proteolysis in dry fermented sausages. *Meat Sci.* 34: 205-216.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., De la Hoz L. y Ordóñez, J.A. 1996. Effect of the addition of Papain on the dry fermented sausages proteolysis. *J. Sci Food Agric.* 71: 13-21.
- Dillon, V.M. y Board, R.G. 1991. Yeasts associated with red meats. *J. Applied Bacteriol.* 71: 93-108.
- Domínguez, M.C. y Zumalacarregui, J.M. 1991. Lipolytic and oxidative changes in "chorizo" during ripening. *Meat Sci.* 29: 99-107.

- Dreyer, T., Biederman, K. y Ottensen, M. 1983. Yeast proteinase in beer. *Carlsberg Res. Commun.* 48, 249-253.
- Droby, S. y Chalutz, E. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* 35: 794-800.
- Durá, M.A. 2003. Estudio de la actividad glutaminasa de *Debaryomyces* spp. y su implicación en el curado de embutidos. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Durá, M.A., Flores, M. y Toldrá, F. 2002. Purification and characterization of a glutaminase from *Debaryomyces* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 76:117-126.
- Encinas, J.P., López-Díaz, T.M., García-López, M-L., Otero, A. y Moreno, B. 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* 54: 203-208.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C, Oliver, G. y Toldrá, F. 1999 a. Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*. *Appl. Environment. Microbiol.* 65: 578-584.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. y Toldrá, F. 1999 b. Characterization of muscle sarcoplasmic and miofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environment. Microbiol.* 65: 3540-3546.
- Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. y Toldrá, F. 2001. Effect of curing conditions and *Lactobacillus casei* CRL705 on the hydrolysis of meat proteins. *J. Appl. Microbiol.* 91: 478-487.
- Farley, P.C., Shepherd, M.G. y Sullivan, P.A. 1986. The purification and properties of yeast proteinase B from *Candida albicans*. *Biochem. J.* 236, 177-184.
- Fatichenti, E., Gergere, J.L., Pietrino, D. y Giovaunnii, A.F. 1983. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. *J. Dairy Res.* 80: 449-457.
- Ferreira, A.D. y Viljoen, B.C. 2003. Yeast as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 131-140.

- Fleet, G.H. 1990. Yeast in dairy products. *J. Applied Bacteriol.* 68: 199-221.
- Flores, J. y Toldrá, F. 1993. Curing. En : *Encyclopedia of Food Science, Technology and Nutrition*. R. Macrae, R. Robinson, M. Sadle y G. Fullerlove (Eds.), Academic Press, Londres, Reino Unido, pp. 1277-1282.
- Flores, J. 1997. Mediterranean vs northern European meat products. Processing technologies and main differences. *Food Chem.* 59: 505-510.
- Flores, M., Cuellas, A. y Voget, C.E. 1999. The proteolytic system of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast.* 15: 1437-1448.
- Freitas, A.C., Pintado, A.E., Pintado, M.E., y Malcata, F.X. 1999. Role of dominant microflora of *picante* cheese on proteolysis and lipolysis. *Int. Dairy J.* 593-603.
- Garriga, M., Compte, M., Casademont, G. y Moreno-Amich, R. 1988. Influencia de los carbohidratos en el proceso de fermentación del salchichón. *Rev. Agroquím. y Tecnol. de Aliment.* 28: 548-557.
- Gehlen, K.H., Meisel, C., Fischer, A. y Hammes, W.P. 1991. Influence of the yeast *Debaromyces hansenii* on dry sausage fermentation. En *Proc. 37th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Kulmbach, Germany. pp. 871-876.
- Geisen, R., Lücke, F.K. y Kröckel, L. 1992. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch.* 72: 894-898.
- Grassmann, W. y Dyckerhoff, H. 1928. Über die Proteinase und die Polypeptidase der Hefe. 13. Abhandlung über pflanzen proteasen in der von R. Willstätter und Mitarbeitern begonnenen Untersuchungsreihe. *Hoppe-Seylers. Z. Physiol. Chem.* 179: 41-78.
- Habibi-Najafi, M.B. y Lee, B.H. 1996. Bitterness in cheese: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 36: 397-411.
- Hagen, B.F., Berdagué, J.L., Holck, A.L., Naes, H. y Blom, H. 1996. Bacterial proteinase reduces maturation time of dry fermented sausages. *J. Food Sci.* 61: 1024-1029.

Hammes, W.P. y Hertel, C. 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* 49: Suppl. 1, S125-S138.

Hammes, W.P. y Knauf, H.J. 1994. Starters in the processing of meat products. *Meat Sci.* 36: 155-168.

Hammes, W.P., Haller, D. y Gänzle, M.G. 2003. Fermented meat. En: Handbook of fermented functional foods. Farnworth, E.R. (Ed.). Food and Nutraceuticals Series. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, USA. pp. 251-275.

Henriksen, A.P. y Stahnke, L.H. 1997. Sensory and chromatographic evaluations of water soluble fractions from dried sausages. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2679-2684.

Henschke, P.A. y Jiranek, V. 1993. Yeast metabolism of nitrogen compounds. En: Wine Microbiology and Biotechnology, Fleet, G.H. (Ed.). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. pp. 77-163.

Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A. y Vidal-Carou, M.C. 1996. Ion pair high performance chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2710-2715.

Hierro, E., de la Hoz, L., y Ordóñez, J.A. 1997. Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the lipolysis of dry fermented sausages. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2989-2995.

Hilt, W. y Wolf, D.H. 1992. Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* 6: 2437-2442.

Hilt, W y Wolf, D.H. 1995. Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol. Biol. Rep.* 21: 3-10.

Hofman-Bang, J. 1999. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biotechnol.* 12: 35-73.

Hugas, M., Pagés, F., Garriga, M. y Monfort, J.M. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packaged with different atmospheres. *Food Microbiol.* 15: 639-650.

Jessen, B. 1995. Starter cultures for meat fermentation En *Fermented Meats*, Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. (Eds.). Blackie Academic & Professional, Glasgow, Reino Unido, pp. 130-159.

Johansson, G., Berdagué, J.L., Larsson, M., Tran, N. y Borch, E. 1994. Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Sci.* 38: 203-218.

Jones, E.W. 1983. Genetic approaches to the study of protease function and proteolysis in *saccharomyces cerevisiae*. En *Yeast genetics. Fundamental and applied aspects*, Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. y Smith, A.R.W. (Eds.). Springer-Verlag. New-York. USA. pp. 165-203.

Jones, E.W. 1991 a. Three proteolytic systems of the yeast *Saccharomyces cerevisie*. *J. Biol. Chem.* 266: 7963-7966.

Jones, E.W. 1991 b. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisie*. En *Guide to yeast genetics and molecular biology*, Guthrie, C. y Fink, G.R. (Eds.). *Methods in Enzymology*, vol. 194. Academic press Elsevier Science, California, USA. pp. 428-453.

Jones, E.W. y Murdock, D.G. 1994. Proteolysis in the yeast vacuole. En *Cellular proteolytic systems*. Ciechanovo, A.J. y Schwartz, A.L. (Eds.). Wiley –Liss, Inc. New York, USA. pp. 115-134.

Jones, E.W., Webb, G.C. y Hiller, M.A. 1997. Biogenesis and function of the yeast vacuole. En: *Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces, cell cycle and cell biology*. Pringle, J.R., Broach, J.R. and Jones, E.W. (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. pp. 363-470.

Jones, E.W. 2002. Vacuolar proteases and proteolytic artifacts in *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*. Guthrie C. y Fink, G.R. (Eds.). *Methods in Enzymology*. Vol. 351, Academic press, Elsevier Science, California, USA. pp. 127-150.

Kai-Ping, D.L. y Warthesen, J.J. 1996. Preparative methods of isolating peptides from Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1058-1063.

- Kenneally, P.M., Schwarz, G., Fransen, N.G., y Arendt, E.K. 1998. Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages. *J. Food Sci.* 63: 538-543.
- Kenneally, P.M., Fransen, N.G., Grau, H., O'Neill, E.E. y Arendt, E.K. 1999. Effects of environmental conditions on microbial proteolysis in a pork myofibril model system. *J. Appl. Microbiol.* 87: 794-803.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K. y Emr, S.D. 1990. The fungal vacuole, composition, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54: 266-292.
- Knop, M., Schiffer, H.H., Rupp, S. y Wolf, D.H. 1993. Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 990-996.
- Kumura, H., Takagaki, K., Sone, T., Tsukahara, M. Tanaka, T. y Shimazaki, K. 2002. Casein digestion by *Debaryomyces hansenii* isolated from cheese. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1370-1373.
- Kurita, O. y Yamazaki, E. 2002. Growth under alkaline conditions of the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939. *Curr. Microbiol.* 45: 277-280.
- Kurtman, C.P. y Robnett, C.J. 1991. Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast.* 7: 61-72.
- Kurtzman, C.P. y Fell, J.W. 1998. *The yeast. A taxonomic study.* Fourth edition. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands. (pp 157-163)
- Larpent- Gourgaud, M., Michaux, O.O., Callon, C., Brenot, O., Sirami, J., Bonnin, C. y Boissonnet, B. 1993. Etude comparée des flores d'aromatization du saucisson de fabrication industrielle ou artisanale. *Viandes Prod. Carnés*, 14: 23-27.
- Leclercq-Perlat, M.N., Oumer, A., Buono, F., Bergere, J.L., Spinnier, H.E. y Corrieu, G. 2000. Behavior of *Brevibacterium* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of soft smear cheese from reconstituted milk: Protein degradation. *J. Dairy Sci.* 83: 1674-1683.
- Leistner, L. 1986. Mould-ripened foods. *Fleischwirtschaft.* 66: 1385-1388.

Leistner, L. 1995. Stable and safe fermented sausages world-wide. En *Fermented Meats*. Eds. Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. Blackie Academic & Professional, Glasgow, Reino Unido, pp. 160-175.

Leonhard, K., Guiard, B., Pellecchia, G. Tzagoloff, A., Neupert, W. y Langer, T. 2000. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Molecular Cell*. 5: 629-638.

Lois, A.L., Gutiérrez, L.M., Zumalacarregui, J.M. y López, A. 1987. Changes in several constituents during ripening of "chorizo" a Spanish dry sausage. *Meat Sci*. 19: 169-177.

López, T.M., González, C.J., Rodríguez, R. Encinas J.P. y Otero, A. 2001. Utilización de mohos y levaduras en la elaboración de embutidos cárnicos fermentados. *Alimentaria*. Marzo: 25-31.

Lücke, F.K. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci*. 56: 105-115.

Lurton, L., Segain, J.P. y Feuillat, M. 1989. Étude de la protéolyse au cours de l'autolyse de levures en milieu acide. *Sciences des Aliment*. 9: 111-124.

Marchesini, B., Bruttin, A., Romailier, N., Moreton, R.S., Stuchi, C. y Sozzi, T. 1992. Microbiological events during commercial meat fermentations. *J.Applied Bacteriol*. 73: 203-209.

Marco, A., Navarro, J.L. y Flores, M. 2004. Volatile compounds of dry-fermented sausages as affected by solid-phase microextraction (SPME). *Food Chem*. 84: 633-641.

Martín, A. 2000. Contribución de la población fúngica seleccionada al desarrollo de características deseables del jamón curado. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. En capítulo XII, Población microbiana del jamón ibérico y su contribución en la maduración. Cultivos iniciadores, Rodríguez, M., Martín, A. y Nuñez, F. En *Tecnología del jamón curado*. Ventanas, J (Ed.). Mundi-Prensa. Madrid. España. pp. 343-366.

Martín, A., Córdoba, J.J., Benito, M.J., Aranda, E. y Asensio, M.A. 2003. Effect of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* on the volatile compounds during controlled ripening of pork loins. *Int. J. Food Microbiol*. 84: 327-338.

Mateo, J., Domínguez M. C., Aguirrezábal M. M. y Zumalacarreñui J. M. 1996. Taste compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Sci.* 44: 245-254.

Meisel, C., Gehlen, K.H., Fischer, A. y Hammes, W.P. 1989. Inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* in dry sausages by *Lactobacillus curvatus*, *Micrococcus varians* and *Debaryomyces hansenii*. *Food Biotechnol.* 3: 145-168.

Metaxapoulus, J., Stavropoulus, S., Kakouri, A. y Samelis, J. 1996. Yeast isolated from traditional Greek dry salami. *Ital. J. Food Sci.* 8: 25-32.

Moehle, C. M., Tizard, R., Lemmon, S. K., Smart, J. y Jones, E.W. 1987. Protease B of the lysosomelike vacuole of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to the subtilisin family of serine proteases. *Mol. Cell. Biol.* 7: 4390-4399.

Molly, K., Demeyer, D., Civera, T., y Verplaetse, A. 1996. Lipolysis in a Belgium sausage: relative importance of endogenous and bacterial enzymes. *Meat Sci.* 43: 235-244.

Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. y Geenen, I. 1997. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chem.* 59: 539-545.

Montel, M.C., Masson, F. y Talon, R. 1998. Bacterial role in flavour development. *Meat Sci.* 49: No. Suppl. S111-S123.

Montel, M.-C., Reitz, J., Talon, R., Berdague, J.-L. y Rousset-Akrim, S. 1996. Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiol.* 13: 489-499.

Montel, M.C., Talon, R. Cantonnet, M. y Cayroal, J. 1992. Peptidasic activities of starter cultures. En Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci. Technol. Clermont-Ferrand, France. pp. 811-813.

Montel, M.C., Talon, R., Berdagué, J.L., y Cantonnet, M. 1993. Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of french dry sausages. *Meat Sci.* 35: 229-240.

- Nakase, T., Suzuki, M., Phaff, H.J. y Kurtzman, C.P. 1998. *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. En: The yeast. A taxonomic study. Kurtzman, C.P. y Fell, J.W. (Eds.). Fourth edition. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands. pp. 157-173.
- Navarro, J.L., Nadal, M.I., Izquierdo, L. y Flores, J. 1997. Lipolysis in dry cured sausages as affected by processing conditions. *Meat Sci.* 45: 161-168.
- Nishimura, T., Rhue, M.R., Okitani, A. y Kato, H. 1988 a. Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agric. Biol. Chem.* 52: 2323-2330.
- Nishimura, T. y Kato, H. 1988 b. Taste of free amino acids and peptides. *Food Reviews Int.* 4: 175-194.
- Olsen, P.T. y Stahnke, L.H. 2000. The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat Sci.* 56: 357-368.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M. y de la Hoz, L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39: 329-367.
- Ormrod I.H.L., Lalor, E.F., Sharpe, F.R. 1991. The release of yeast proteolytic enzymes into beer. *J. Inst. Brew.* 97: 441-443.
- Pereira-Dias, S., Potes, M.E., Marinho, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. 2000. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 55-63.
- Petersen, K.M., Westall, S. y Jespersen, L. 2002. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses. *J. Dairy Sci.* 85: 478-486.
- Prista, C., Soeiro, A., Vesely, P., Almagro, A., Ramos, J. y Loureiro-Dias, M.C. 2002. Genes from *Debaryomyces hansenii* increase salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* W303. *FEMS Yeast Res.* 2: 151-157.
- Ramihone, M., Sirami, J., Larpent, J.P. y Girard, J.P. 1988. Gout acide des saucissons secs. *Viandes Prod. Carnés.* 9: 291-298.

Ramírez-Zavala, B., Mercado-Flores, Y., Hernández-Rodríguez, C. y Villa-Tanaca, L. 2003. Purification and characterization of a serine carboxypeptidasa from *Kluyveromyces marxianus*. Int. J. Food Microbiol. xx: xxx-xxx. (en prensa, disponible online en www.sciencedirect.com)

Rawlings, N.D. y Barret, A.J. 1999. MEROPS: the peptidase database. Nucl. Acids Res. 27: 325-331. (y <http://www.merops.co.uk>)

Roostita, R. y Fleet, G.H. 1996. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. Int. J. Food Microbiol. 28: 393-404.

Samelis, J., Stavropoulos, S., Kakouri, A. y Metaxopoulos, J. 1994. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. Food Microbiol. 11: 447-460.

Samelis, J. y Sofos, J. N. 2003. Yeasts in meat and meat products. En: Yeasts in food. Boekhout, T. y Robert, V. (Eds.). Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Averhoffstraße 10, 22085 Hamburg, Germany. pp. 239-257.

Santos-Mendoza, R.C. 2000. Aislamiento, selección y caracterización de levaduras de embutidos con vistas a su utilización como coadyuvante en el proceso de curado. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.

Sanz, Y., Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. y Toldrá, F. 1999. Hydrolytic action of *Lactobacillus casei* CRL 705 on pork muscle sarcoplasmic and myofibrillar proteins. J. Agric. Food Chem. 47: 3441-3448.

Saperas, N., Buesa, C., Abián, J., Vanderkerckhove, J., Kasinsky, H.E., y Chiva, M. 1996. The primary structure of cholrichthyan protamine: a new apparent contradiction in protamine evolution. J. Mol. Evol. 43: 528-535.

Schillinger, U., Geisen, R. y Holzapfel, W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends Food Sci. Technol. 7: 158-164.

Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., y Baumeister, W. 1995. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A threonine protease. Science. 268: 579-582.

- Selgas, D., García, L., García de Fernando, G. y Ordóñez, J.A. 1993. Lipolytic activity and proteolytic activity of micrococci isolated from dry-fermented sausages. *Fleischwirtsch.* 73: 1164-1170.
- Selgas, M.D., Casas, C., Toledo, V.M. y García, M.L. 1999. Effect of selected mould strains on lipolysis in dry fermented sausages. *Eur. Food Res. Technol.* 209: 360-365.
- Sherman, D., Durrens, P., Beyne, E., Nikolski, M., Souciet, J.L. y Genolevures Consortium. 2004. Genolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res.* 32: 315-318.
- Sorensen, B.B y Samuelsen, H. 1996. The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat lipases of the meat starter culture organisms *staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 59-71.
- Sorensen, B.B. 1997. Lipolysis of pork fat by the meat starter culture *Dbaryomyces hansenii* at various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 187-193.
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. y Schumann, P. 1995. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonina* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermaococcus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 682-692.
- Stahnke, L.H. 1994. Aroma components from dried sausages fermented with *staphylococcus xylosus*. *Meat Sci.* 38: 39-44.
- Stahnke, L.H. 1995 a. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. Part II. Volatile components. *Meat Sci.* 41: 193-209.
- Stahnke, L.H. 1995 b. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. III. Sensory evaluation. *Meat Sci.* 41: 211-223.
- Stahnke, L.H. 2002. Flavour formation in fermented sausage. En: Research advances in the quality of meat and meat products. Toldrá F. (Ed.). Research signpost, Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India. pp. 193-223

Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 331-345.

Talon, R. Leroy-Sétrin, S. y Fadda, S. 2002. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. En: *Research advances in the quality of meat and meat products*. Toldrá, F. (Ed.). Research Signpost, Kerala, India. pp. 175-191.

Toldrá, F., Sanz, Y. y Flores, M. 2001. Meat fermentation technology. En: *Meat science and applications*. Y.H. Kui, W.-K. Nip, R.W. Rogers, O.A. Young (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp. 537-561.

Toledo, V.M., Selgas, M.D., Casas, C., Ordóñez, J.A. y García, M.L. 1997. Effect of selected mould strains on proteolysis in dry fermented sausages. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* 204: 385-390.

Trigueros, G., García, M.L., Casas, C., Ordóñez, J.A. y Selgas, M.D. 1995. Proteolytic and lipolytic activities of mould strains isolated from Spanish dry fermented sausages. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* 201: 298-302.

Van den Hazel, H., Kielland-Brandt, M.C. y Winther, J. R. 1996. Review: Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*. 12: 1-16.

Van den Tempel, T. y Jakobsen, M. 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potencial as starter cultures for production of Danablu. *Int. Dairy J.* 10: 263-270.

Ventanas, J., Córdoba, J.J., Antequera, C., García, C., López-Bote, C. y Asensio, M.A. 1992. Hydrolysis and maillard reactions during ripening of Iberian ham. *J. Food Sci.* 57: 813-815.

Verplaetse, A. 1994. Influence of raw meat properties and processing technology on aroma quality of raw fermented meat products. En *Proc. of the 40th Int. Congr. Meat Sci. and Technol.* pp. 45-65, The Hague, Netherlands.

Wyder, M.Y. y Puhán, Z. 1999. Role of selected yeast in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *Int. Dairy J.* 9: 117-124.

Yasuhara, T., Nakai, T. y Ohashi, A. 1994. Aminopeptidase Y, a new aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, properties, localization and processing by protease B. J. Biol. Chem. 269: 13644-13650.

Zambonelli, C., Rainieri, S., Chiavari, G., Montanari, G., Benevelli, M. y Grazia, L. 2000. Autolysis of yeast and bacteria in fermented foods. Ital. J. Food Sci. 12: 9-21.

Zapelena, M.J., Zalacaín, I., De Peña M.P., Astiasarán, I. y Bello, J. 1997. Addition of a neutral proteinase from *Bacillus subtilis* (Neutrase) together with a starter to a dry fermented sausage elaboration and its effect on the amino acid profiles and the flavor development. J. Agric. Food Chem. 45: 472-475.

Zwickl, P., Grziwa, A., Pühler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F. y Baumeister, W. 1992. Primary structure of the *thermoplasma* proteasome and its implications for the structure and evolution of the multicatalytic proteinase. Biochem. 31: 964-972.