



DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL  
Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

# **CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS DE INTERÉS EN JAMÓN IBÉRICO MEDIANTE TÉCNICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

**María Jesús Andrade Gracia**

**Cáceres, 2009**

***Edita: Universidad de Extremadura  
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3<sup>a</sup>  
Cáceres 10071  
Correo e.: [publicac@unex.es](mailto:publicac@unex.es)  
<http://www.unex.es/publicaciones>

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

**Facultad de Veterinaria**

**Departamento de Producción Animal  
y Ciencia de los Alimentos**



**CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS DE  
INTERÉS EN JAMÓN IBÉRICO MEDIANTE  
TÉCNICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Memoria presentada por la Licenciada María Jesús Andrade Gracia  
para optar al grado de Doctora en Veterinaria





**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**HIGIENE DE LOS ALIMENTOS**

Avda. de la Universidad s/n  
E-10071- Cáceres (Spain)  
Teléfono: +34 927 257125  
Fax: + 34 927 257110  
<http://veterinaria.unex.es>

D. JUAN JOSÉ CÓRDOBA RAMOS, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL  
ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE  
PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA  
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA,

INFORMA:

Que el trabajo presentado por D<sup>a</sup>. María Jesús Andrade Gracia titulado  
"Caracterización de levaduras de interés en jamón ibérico mediante técnicas de  
ácidos nucleicos" ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de  
Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de esta Universidad. Hallándose  
concluido y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su  
presentación ante el tribunal que ha de juzgarla.

Y para que así conste firmo el presente informe en Cáceres, a 14 de enero de 2009.

Fdo.: Juan José Córdoba Ramos





**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**HIGIENE DE LOS ALIMENTOS**

Avda. de la Universidad s/n  
E-10071- Cáceres (Spain)  
Teléfono: +34 927 257125  
Fax: + 34 927 257110  
<http://veterinaria.unex.es>

D<sup>a</sup>. MAR RODRÍGUEZ JOVITA, PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL  
ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE  
PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA  
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA,

INFORMA:

Que el trabajo presentado por D<sup>a</sup>. María Jesús Andrade Gracia titulado  
“Caracterización de levaduras de interés en jamón ibérico mediante técnicas de  
ácidos nucleicos” ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de  
Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de esta Universidad. Hallándose  
concluido y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su  
presentación ante el tribunal que ha de juzgarla.

Y para que así conste firmo el presente informe en Cáceres, a 14 de enero de 2009.

Fdo.: Mar Rodríguez Jovita





## Agradecimientos

*Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas y entidades que directa o indirectamente han participado en la realización de esta Tesis Doctoral:*

*Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la subvención concedida al proyecto AGL2001-0804 que ha permitido el desarrollo del presente trabajo.*

*A la Junta de Extremadura por la concesión de una Beca Predoctoral para la Formación de Personal Investigador para la realización de esta Tesis Doctoral*

*A mis directores el Dr. Juan José Córdoba Ramos y la Dra. Mar Rodríguez Jovita, por su asesoramiento, su dedicación y sus ánimos durante la realización de esta Tesis Doctoral.*

*A la Dra. Elena Bermúdez Polo y a los Dres. Miguel Ángel Asensio y Félix Núñez por su apoyo en todo momento.*

*A los Dres. M<sup>a</sup> Guía Córdoba Ramos y Alberto Martín González, del grupo de investigación Bromatología y Microbiología de los Alimentos, por la gran ayuda prestada en el ensayo de generación de compuestos volátiles.*

*Al Dr. Juan Carlos Parejo Rosas, del grupo de investigación de Genética y Tecnología Animal, por su asesoramiento en la elaboración de dendrogramas.*

*Al Dr. Manuel Ramírez Fernández, del grupo de investigación de Microbiología enológica, edáfica, acuática y aplicaciones biotecnológicas de la biodiversidad microbiana, por su asesoramiento en el análisis de restricción del ADN mitocondrial.*

*A las siguientes industrias elaboradoras de jamón ibérico que han colaborado como Entes Promotores Observadores (E.P.O.) en el desarrollo de este trabajo de investigación: Navidul (Grupo Campofrío), Resti S.A., Cardisán S.L, Pedro Nieto, Sánchez Nieto, Francisco Martín, Delagón S.L., Hermanos Velázquez, Lazo, Maximino Romero e Hijos, La Jabugueña, Vázquez Romero, Embutidos Jabugo S.A., Dehesa de Cuyar, Sánchez Romero Carojal Jabugo S.A., Industrias Artesanas de Jabugo S.A., Jamones La Joya-Jabugo, S.L., Jamones Blasco, Jeisa, CCVIPS, Señorío de los Pedroches e IBESA.*

*A los licenciados en Veterinaria Miguel Ángel Gómez Castaño, Agustín Sánchez Nieto y Luis Rojas Recio por su colaboración en los muestreos realizados en las diferentes industrias cárnicas.*

*A todas las personas que forman o han formado parte de los grupos de investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria, y Tecnología y Calidad de los Alimentos, por la ayuda y estima mostrada. Un agradecimiento especial para mis compañeras Raquel, Beatriz y Eva, por los buenos momentos que hemos pasado juntas en el laboratorio, y por su supuesto a Librada. Gracias por haber estado siempre dispuestas a ayudarme cuando lo he necesitado.*

*A mis amigas por su amistad y el interés por mi trabajo que siempre me han manifestado.*

*A mi familia por su apoyo incondicional, esencial en los momentos difíciles, y en especial a mi madre, por su paciencia y cariño.*

*A mi padre y a mi abuela porque los he tenido presente durante la realización de esta Tesis.*

*A José Juan por su cariño, apoyo, comprensión y tanta paciencia durante la realización de esta Tesis.*

*Seguramente me habré olvidado de muchas personas que me han ayudado en este largo camino. Lo siento pero esta Tesis está también dedicada a vosotros.*

***A TODOS: ¡GRACIAS!***

*A mi madre*

*A José Juan*



**ÍNDICE**

---



<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I.1. El jamón curado</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Población de levaduras en productos cárnicos madurados</b>	<b>5</b>
<b>I.3. Efectos deseables de la población de levaduras en la maduración de los productos cárnicos madurados</b>	<b>7</b>
I.3.1. Actividad proteolítica	8
I.3.2. Actividad lipolítica	9
I.3.3. Generación de compuestos volátiles	10
<b>I.4. Cultivos iniciadores en la industria cárnica</b>	<b>12</b>
<b>I.5. Caracterización de levaduras de interés en la industria alimentaria</b>	<b>15</b>
I.5.1. Caracterización fenotípica de levaduras	15
I.5.2. Caracterización de levaduras por técnicas de ácidos nucleicos	18
I.5.2.1. Extracción de ácidos nucleicos	20
I.5.2.2. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR	20
I.5.2.3. PCR aleatoria o RAPD-PCR	22
I.5.2.4. Métodos basados en el estudio del ADN ribosómico	24
I.5.2.5. Análisis de restricción del ADN mitocondrial	28
<b>I.6. Objetivos</b>	<b>30</b>
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>II.1. Material</b>	<b>33</b>
II.1.1. Reactivos químicos y medios de cultivo	33
II.1.1.1. Medios de cultivo	33
II.1.1.2. Tampones	34
II.1.2. Aparatos	35
II.1.3. Material biológico	37
II.1.3.1. Material biológico empleado en la optimización de técnicas de ácidos nucleicos para la identificación de levaduras aisladas de productos cárnicos	37
II.1.3.2. Aislados de levaduras de jamón curado de cerdo ibérico	37

<b>II. 2. Métodos</b>	<b>39</b>
II.2.1. Optimización de técnicas de ácidos nucleicos para la identificación de levaduras aisladas de productos cárnicos	39
II.2.1.1. Extracción de ADN total	39
II.2.1.2. Análisis de los perfiles de restricción de la región ITS del ADN ribosómico	40
II.2.1.3. Análisis de los perfiles de restricción de la región 18S del ADN ribosómico	41
II.2.1.4. RAPD-PCR	42
II.2.1.5. Análisis de los perfiles de restricción del ADN mitocondrial	43
II.2.1.6. Electroforesis en gel de agarosa de ADN, productos de amplificación y de restricción	44
II.2.1.7. Análisis de patrones de bandas y elaboración de dendrogramas	44
II.2.2. Caracterización genotípica de los aislados de levaduras obtenidos de jamón curado de cerdo ibérico	45
II.2.2.1. Extracción del ADN total	45
II.2.2.2. RAPD-PCR con (GACA) <sub>4</sub> y (GAC) <sub>5</sub>	46
II.2.2.3. Análisis de restricción del ADN mitocondrial con la endonucleasa de restricción <i>HaeIII</i> .	46
II.2.2.4. Electroforesis en gel de agarosa de ADN, productos de amplificación y de restricción	46
II.2.2.5. Análisis de los patrones de bandas y elaboración de dendrogramas	46
II.2.2.6. Secuenciación de los genes de la región 18S del ADN ribosómico	46
II.2.3. Identificación bioquímica de aislados de levaduras obtenidos de jamón curado de cerdo ibérico	47
II.2.4. Evaluación de la formación de compuestos volátiles de aislados de levaduras obtenidos de jamón curado de cerdo ibérico	47
II.2.5. Evaluación de la capacidad de formación de compuestos volátiles por levaduras inoculadas en productos cárnicos madurados (salchichones)	49
II.2.5.1. Preparación de los inóculos de levaduras e inoculación de salchichones	49
II.2.5.2. Análisis microbiológico de salchichones	50
II.2.5.3. Análisis físico-químico de salchichones	51
II.2.5.4. Análisis de restricción del ADN mitocondrial de levaduras aisladas de salchichones	51
II.2.5.5. Análisis de compuestos volátiles generados en salchichones inoculados con aislados de levaduras	52
II. 2. 6. Análisis estadístico	52



<b>III. RESULTADOS</b>	53
<b>III.1. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products</b>	55
<b>III.2. Efficiency of mitochondrial DNA restriction analysis and RAPD-PCR to characterize yeasts growing on dry-cured Iberian ham at the different geographic areas of ripening</b>	69
<b>III.3. Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production</b>	93
<b>III.4. Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compound production</b>	103
<b>III.5. Effect of selected strains of <i>Debaryomyces hansenii</i> on the volatile compound production of dry fermented sausage "salchichón"</b>	129
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	157
<b>IV.1. Evaluación de métodos de ácidos nucleicos para la caracterización de levaduras aisladas de jamón ibérico</b>	159
<b>IV.2. Caracterización de levaduras aisladas de jamón ibérico</b>	165
<b>IV.3. Distribución de la población de levaduras aisladas de jamón ibérico en función del área geográfica de procesado</b>	169
<b>IV.4. Evaluación de la producción de compuestos volátiles de levaduras aisladas de jamón ibérico</b>	171
<b>IV.5. Evaluación de la población de levaduras de jamón ibérico en función de la fase de maduración</b>	177
<b>IV.6. Evaluación de las modificaciones en el perfil de compuestos volátiles de productos cárnicos madurados inoculados con levaduras</b>	183
<b>V. CONCLUSIONES</b>	193
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	197
<b>VII. RESUMEN</b>	225
<b>ANEXO</b>	231



## I. INTRODUCCIÓN

---



## **I.1. EL JAMÓN CURADO**

El jamón curado, alimento de reconocido prestigio, es un producto cárnico elaborado mediante salazonado y posterior secado-maduración de perniles de cerdos.

El proceso de elaboración del jamón curado comienza, tras el sacrificio de los cerdos, y recorte de los perniles para eliminar parte del tejido muscular, grasa y corteza. Tras estas operaciones los perniles pasan por las etapas sucesivas de salado, postsalado, secado y maduración en bodega. En las etapas de salado y postsalado, realizadas a temperaturas de refrigeración, se persigue básicamente alcanzar la estabilidad microbiológica de las piezas cárnicas. En las etapas posteriores de secado y maduración tienen lugar la mayor parte de las reacciones que conducen a la formación de compuestos sápidos y aromáticos responsables de las propiedades sensoriales características del jamón curado. El proceso completo de elaboración tiene una duración diferente según el tipo de jamón curado fabricado; así en el caso de los jamones blancos no suele superar los 12 meses mientras que en el jamón ibérico puede llegar hasta los 24 meses (Ventanas y col., 2001).

En España, se elaboran tanto jamones de cerdo blanco como de cerdo ibérico. En el caso del jamón ibérico, el proceso de elaboración ha incorporado numerosas innovaciones tecnológicas, consistentes fundamentalmente en la utilización de cámaras de maduración con control de temperatura y humedad relativa. Estas técnicas se encuentran casi plenamente instauradas en las fases de salado y postsalado; sin embargo, las fases de secado y maduración en bodega siguen siendo mayoritariamente dependientes de las condiciones climáticas naturales. De esta manera, se distinguen diferentes áreas geográficas tradicionalmente elaboradoras de jamón de cerdo ibérico en función de las condiciones climáticas del procesado. El esfuerzo de las industrias elaboradoras de dichas zonas para garantizar la calidad del jamón ibérico se refleja en la concesión de la mención de Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), figura comunitaria de calidad ligada al origen geográfico. Así las D.O.P. se corresponden con las áreas geográficas con las condiciones climáticas más óptimas para el procesado del jamón ibérico, con inviernos fríos, veranos calurosos y un buen nivel de vientos.

Según el Reglamento 510/2006, una D.O.P. acoge a productos de una región o un lugar determinado, que sirve para designar un producto alimenticio originario de dicha zona, cuya calidad o características se deben fundamentalmente al medio

geográfico, con sus factores naturales y humanos, y cuya producción, transformación y elaboración se realicen en la zona geográfica.

Actualmente existen en España 4 D.O.P. de jamón curado de cerdo ibérico reconocidas por la Unión Europea en base al Reglamento 510/2006: Guijuelo, Dehesa de Extremadura, Jamón de Huelva y Los Pedroches. La primera D.O.P. de paleta y jamón ibéricos reconocida con dicha figura de calidad fue la D.O.P. Guijuelo en 1986. Más tarde se consolidaron otras, como Dehesa de Extremadura en 1987 y Jamón de Huelva en 1995. La última reconocida ha sido la D.O.P. Los Pedroches.

La zona de producción de los cerdos protegidos por la D.O.P. Guijuelo comprende las dehesas de encinas y alcornoques ubicadas en Extremadura, Andalucía, Castilla-León y Castilla-La Mancha (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). La zona de elaboración queda limitada a 77 municipios de la provincia de Salamanca, situados en el sudeste de la misma, en la zona de Guijuelo.

La zona de producción de los cerdos amparados por la D.O.P. Dehesa de Extremadura comprende las dehesas arboladas a base de encinas y/o alcornoques situadas en las provincias de Cáceres y Badajoz (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). La zona de elaboración está constituida por municipios extremeños, situados principalmente en las comarcas del sudoeste de Badajoz, Ibores-Villuercas, Cáceres-Gredos Sur, Sierra de Montánchez y Sierra de San Pedro (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).

La zona de producción de los cerdos protegidos por la D.O.P. Jamón de Huelva comprende las dehesas de encinas, alcornoques y quejigos situadas en las provincias de Sevilla, Córdoba, Huelva, Cádiz y Málaga, así como en las provincias extremeñas de Cáceres y Badajoz. Las piezas amparadas bajo esta D.O.P. son elaboradas en empresas localizadas en 31 municipios enclavados en la Sierra de Huelva (Consejo Regulador de la D.O.P. Jamón de Huelva).

La zona de producción, así como la de elaboración, de la D.O.P. Los Pedroches abarca más de 30 términos municipales de la comarca del Valle de Los Pedroches, situada al norte de la provincia de Córdoba (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa alcanzadas durante la maduración del jamón curado, influyen en el contenido acuoso de los perniles. Esto, junto con los valores de concentración de cloruro sódico, nitratos y nitritos, y el pH alcanzado condicionan la estabilidad microbiológica de las piezas y

determinan la población microbiana capaz de desarrollarse en dichas condiciones ecológicas. Dentro de los principales grupos microbianos que se desarrollan durante el procesado del jamón curado se encuentran las levaduras (Rodríguez y col., 1994; Núñez y col., 1996), las cuales parecen tener una participación importante en las características sensoriales del producto final. Además, se ha descrito la existencia de una relación de la población de levaduras aisladas de jamón curado de cerdo ibérico con el área geográfica en la cual se realizó el aislamiento y con el tiempo de maduración (Núñez y col., 1996).

## **I.2. POBLACIÓN DE LEVADURAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS**

Las levaduras, organismos eucariotas pertenecientes al Reino Fungi, son muy abundantes en la naturaleza, pudiéndose encontrar en multitud de reservorios (agua, suelo, hojas, flores, frutos, piel, plumas, tracto digestivo de animales, insectos, ...) en los que pueden sobrevivir y a partir de los cuales pueden diseminarse a los alimentos (Deak y Beuchat, 1996). Además, debido a que sus condiciones de crecimiento son poco estrictas, este grupo microbiano puede desarrollarse en una gran variedad de alimentos y ejercer sobre ellos una serie de modificaciones, tanto positivas como negativas. Tradicionalmente, las levaduras sólo han sido asociadas a procesos positivos; sin embargo, la aplicación de las nuevas tecnologías de conservación en la industria alimentaria, diseñadas en determinadas ocasiones para inhibir la proliferación de bacterias y en otras para mantener las propiedades sensoriales de los productos, ha favorecido la aparición de levaduras contaminantes (Samelis y Sofos, 2003). Así diversas especies de levaduras pueden intervenir en la alteración de carnes y derivados cárnicos originando pérdidas económicas siendo necesario un adecuado control de su desarrollo. Por el contrario, muy pocas especies de levaduras patógenas han llegado a ser detectadas en alimentos por lo que el riesgo fundamental de la contaminación no es sanitario sino que se basa en su potencial como agentes alterantes.

En carne fresca el género de levaduras predominante es *Candida*, encontrándose también especies pertenecientes a los géneros *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* (Hsieh y Jay, 1984; Nychas, 1984; Dillon y Board, 1991), *Debaryomyces* y *Pichia* (Nychas, 1984). Las levaduras presentes en las canales pueden proceder de los pastos, de los suelos de los corrales y de los equipos y utensilios utilizados en el sacrificio, faenado y despiece tanto en el matadero como en las salas de despiece. Las especies *Cryptococcus*

*laurentii*, *Cryptococcus luteolus*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Debaryomyces hansenii* suelen hallarse en canales de cerdo y cordero (Deak y Beuchat, 1996).

La evolución de las condiciones ambientales a lo largo del proceso de maduración de los productos cárnicos va limitando el desarrollo de las levaduras. En el caso del jamón curado de cerdo ibérico, los recuentos de levaduras detectados en el pernil fresco, antes de ser sometido a salado, se encuentran en torno a  $10^4$  ufc/g (Núñez, 1995). El incremento de la temperatura, a final del postsalado y durante la etapa de secadero, favorece el aumento de la población de levaduras llegando a alcanzar recuentos de  $10^6$  y  $10^7$  ufc/g. A medida que avanza el procesado se produce una disminución de las levaduras a favor de los mohos, relacionada principalmente con la reducción de la actividad de agua ( $a_w$ ) del producto; así, en bodega, se observa un descenso de estos recuentos hasta valores que se encuentran entre  $10^4$  y  $10^6$  ufc/g (Monte y col., 1986; Núñez, 1995; Núñez y col., 1996). En el caso de los embutidos crudos madurados, las levaduras alcanzan sus recuentos máximos al finalizar la etapa de fermentación, la cual precede al curado, encontrándose dichos recuentos en torno a  $10^6$  ufc/g (Samelis y col., 1994; Encinas y col., 2000). En el producto final los recuentos de levaduras descienden alcanzando valores de  $10^4$  ufc/g o incluso menores (Encinas y col., 2000).

El género *Debaryomyces* ha sido el aislado con mayor frecuencia en los diferentes tipos de jamones curados, excepto en jamones elaborados en condiciones ambientales controladas (Molina y col., 1990). En jamón ibérico la población de levaduras está constituida por especies de los géneros *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Rhodotorula* (Monte y col., 1986; Núñez y col., 1996); en el jamón curado de cerdo blanco las levaduras aisladas pertenecen a los géneros *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Saccharomycopsis* (Huerta y col., 1988), y en el jamón de Parma a los géneros *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Toluropsis* y *Trichosporon* (Comi y Cantoni, 1983).

Núñez y col. (1996) observaron que las especies de levaduras que se desarrollan en jamón curado de cerdo ibérico presentan una gran variedad de biotipos en base a sus características fenotípicas y que a lo largo del proceso de maduración del jamón su diversidad va disminuyendo, debido a la selección de la población microbiana que tiene lugar en base, fundamentalmente, a los cambios en los parámetros ecológicos. Estos autores identificaron a *Candida zeylanoides* como la principal especie en las primeras etapas de procesado, y aunque su proporción disminuye posteriormente, permanece hasta el final de secadero e incluso hasta el final de la maduración cuando



la  $a_w$  se mantiene por encima de 0,85. En estas dos últimas etapas, la especie predominante fue *D. hansenii*, al ser una de las pocas especies capaces de crecer a valores de  $a_w$  inferiores a 0,85. Esta especie ha sido también la aislada mayoritariamente tanto en jamón blanco (Huerta y col., 1988) como en jamón de Parma (Comi y Cantoni, 1983; Simoncini y col., 2007). Sin embargo, Monte y col. (1986) establecieron que *Debaryomyces maramba* fue la única especie presente en jamones ibéricos al final de la maduración. En otros tipos de productos cárnicos madurados o fermentados *D. hansenii* es igualmente la especie dominante en el proceso (Cook, 1995; Metaxopoulos y col., 1996; Coppola y col., 2000; Encinas y col., 2000; Cocolin y col., 2006; Aquilanti y col., 2007). La presencia de *D. hansenii* en los diferentes tipos de productos cárnicos madurados está justificada por su tolerancia a la sal (Kurita y Yamazaki, 2002), así como por su capacidad de crecer a bajas temperaturas (Fleet, 1990) y por su resistencia a valores bajos de  $a_w$  y pH ácidos.

En embutidos fermentados españoles, además se han aislado otras especies de levaduras con menor frecuencia, como *Trichosporon ovoides*, *Yarrowia lipolytica*, *Citeromyces matritensis* y algunas especies del género *Candida*, entre las que se incluye *C. zeylanoides* (Encinas y col., 2000).

Ocasionalmente, en productos cárnicos se han aislado e identificado cepas de levaduras de las especies *Y. lipolytica*, *C. zeylanoides*, e incluso *D. hansenii* relacionadas con procesos de alteración (Diriye y col., 1993; Ismail y col., 2000; Martínez y col., 2004).

### **I.3. EFECTOS DESEABLES DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS EN LA MADURACIÓN DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS**

A lo largo de la historia, el efecto beneficioso de muchas especies de levaduras ha sido utilizado en los procesos de elaboración de numerosos productos fermentados como productos de panadería, bebidas alcohólicas, quesos y embutidos madurados. Incluso fueron utilizadas por el hombre, antes de ser identificadas como microorganismos y de ser conocido su papel como agentes fermentadores, para la producción de bebidas alcohólicas y de alimentos fermentados (Deak y Beuchat, 1996). Por otro lado, el metabolismo de las levaduras conduce a la producción de etanol,  $\text{CO}_2$  y una gran variedad de compuestos como alcoholes, ésteres, cetonas, aldehídos, y compuestos azufrados, que participan de manera importante en el desarrollo del sabor y aroma de los productos fermentados y madurados.

En este sentido, durante el proceso de curado de los productos cárnicos una de las principales vías de la formación de los compuestos responsables de su sabor y aroma, junto con las reacciones endógenas de proteólisis y lipólisis, la constituye el crecimiento de una población microbiana interna y externa de la que forman parte las levaduras.

### **I.3.1. Actividad proteolítica**

La población microbiana que se desarrolla en los productos cárnicos durante su proceso de maduración participa, junto con los enzimas tisulares, en la proteólisis que afecta a este tipo de productos durante su maduración (Verplaetse y col., 1992; Molly y col., 1997; Hughes y col., 2002).

De esta forma, la actividad de las proteasas endógenas de la carne como único agente no justifica algunos de los fenómenos proteolíticos que tienen lugar durante el proceso de maduración del jamón, que sí podrían explicarse por la actividad de la población microbiana que se desarrolla durante el mismo. Así, algunos aminoácidos, como el triptófano, muestran un aumento muy superior a lo que cabría esperar teniendo en cuenta su proporción en las proteínas musculares cárnicas. Por el contrario, la arginina, uno de los aminoácidos más abundantes en estas proteínas, aparece en cantidades menores a las de otros aminoácidos como la tirosina o la metionina (Córdoba y col., 1994a). Cunin y col. (1986) describen que los microorganismos poseen la capacidad de transformar unos aminoácidos en otros o producir algún aminoácido como metabolito final de sus rutas metabólicas. De este modo podría atribuirse a la actividad microbiana la evolución de la cantidad de aminoácidos libres detectados a lo largo de la maduración del jamón curado. Además, Córdoba y col. (1994a) encontraron mayor concentración de determinados aminoácidos libres en los músculos superficiales que en los profundos del jamón, lo cual podría deberse a la mayor carga microbiana superficial.

Durante la maduración de jamón curado el mayor incremento de nitrógeno no proteico se ha detectado en la fase de salado, atribuyéndose a la acción de los enzimas propios del músculo (Córdoba y col., 1994a; Toldrá y Flores, 1998). En las etapas posteriores de postsalado y secadero el incremento de nitrógeno no proteico es menor y se podría relacionar con la actividad proteolítica microbiana, debido a que la

concentración de sal junto con la disminución de la  $a_w$  reducen la actividad de las proteasas tisulares al provocar su desnaturalización (Flores y col., 1997).

Determinadas cepas de *D. hansenii* aisladas de productos cárnicos han mostrado actividad proteolítica en sistemas modelos con sustratos específicos como la miosina (Núñez, 1995; Rodríguez y col., 1998; Sosa, 2005) e incluso cuando se han inoculado en carne (Rodríguez y col., 1998) y en jamón curado (Martín y col., 2004). Bolumar y col. (2003a, 2003b, 2005, 2008) han purificado y caracterizado algunas de los principales enzimas exo y endoproteolíticos de una cepa autóctona de embutidos crudos curados, perteneciente a la especie *D. hansenii* (Santos y col., 2001). Otros autores han estudiado la capacidad de hidrólisis sobre proteínas cárnicas de cepas de levaduras aisladas de productos cárnicos obteniendo resultados diversos, posiblemente debidos a la variabilidad de los sustratos empleados (Comi y Cantoni, 1983; Huerta y col., 1988; Olesen y Stahnke, 2000; Santos y col., 2001; Martín y col., 2002).

La actividad proteolítica, que ocurre fundamentalmente sobre las proteínas miofibrilares, provoca un incremento del nitrógeno no proteico debido a la liberación de péptidos y aminoácidos (Córdoba y col., 1994a; Martín y col., 2001), que, junto a otros compuestos nitrogenados solubles, contribuyen directamente al sabor y aroma característicos del jamón ibérico (Ruiz y col., 1999). Los aminoácidos liberados pueden contribuir, además, de forma indirecta al aroma participando en reacciones posteriores que implican la generación de compuestos volátiles. Así, algunos de los aminoácidos liberados constituyen, junto con los carbonilos procedentes de hidratos de carbono o de la oxidación lipídica, el sustrato de las reacciones de Maillard, siendo precursores de los compuestos más aromáticos del jamón curado que se forman al final del procesado (Ventanas, 2006).

### **I.3.2. Actividad lipolítica**

Los ácidos grasos libres generados por la hidrólisis de los lípidos son el sustrato para reacciones oxidativas que dan lugar a la formación de una serie de compuestos volátiles de gran importancia en el aroma del jamón curado. Estos pueden ser oxidados a hidroxiperóxidos, los cuales pueden reaccionar con las proteínas, entre ellos o dar lugar a moléculas de bajo peso molecular, algunas de las cuales pueden contribuir al aroma de los productos cárnicos (Johansson y col., 1994; Toldrá, 1998; Marco y col., 2004).

Según Montel y col. (1993), la lipólisis en embutidos curados fermentados es debida casi en su totalidad a la acción de enzimas endógenos musculares. Otros autores señalan la contribución de las levaduras al aroma típico de estos productos cárnicos a través de su actividad lipolítica (Sorensen y Samuelson, 1996; Sorensen, 1997). *D. hansenii* ha mostrado capacidad lipolítica (Saldanha-da-Gama y col., 1997), incluso a temperaturas de 4°C y a valores de  $a_w$  de 0,87 (Sorensen, 1997). Esta característica la hace muy interesante para la elaboración de productos cárnicos curados que, como el jamón curado, se caracterizan por un largo periodo de maduración con etapas prolongadas a bajas temperaturas. La mayoría de los estudios relacionados con la aplicación tecnológica de *D. hansenii* para mejorar el aroma y el sabor han sido desarrollados en productos lácteos, en los cuales cepas de *D. hansenii* también han presentado actividad lipolítica (van den Tempel y Jacobsen, 2000; Addis y col., 2001). Sin embargo, cepas de levaduras aisladas de jamón ibérico, entre ellas de *D. hansenii*, se mostraron incapaces de hidrolizar trioleína *in vitro* (Núñez, 1995); posteriormente una de dichas cepas de *D. hansenii* mostró capacidad lipolítica al ser inoculada en carne madurada en condiciones similares a las de la maduración de los productos cárnicos (Alonso, 2004). Probablemente las condiciones en que se desarrolla la levadura resulta determinante en la generación de lipasas. Diversos autores han detectado cepas de otras especies de levaduras con actividad lipolítica aisladas tanto de embutidos (Comi y Cantoni, 1980; Dalton y col., 1984) como de jamón curado (Huerta y col., 1988).

### **I.3.3. Generación de compuestos volátiles**

El aroma es una de las características sensoriales más importantes de los alimentos. En los productos cárnicos madurados, el aroma, determinado fundamentalmente por los compuestos volátiles (Mottram, 1998), es uno de los principales condicionantes para el consumidor.

En el caso del jamón curado el desarrollo del aroma es un proceso complejo. Gran parte de los compuestos volátiles descritos derivan de las reacciones proteolíticas y lipolíticas que acontecen durante la maduración; asimismo se han detectado otros compuestos derivados de las reacciones de Maillard y de la degradación de aminoácidos mediante las reacciones de Strecker, así como otros compuestos cuyo origen puede encontrarse en la alimentación de los animales. Por otra parte, los

microorganismos, con su actividad metabólica, participan en la producción de compuestos volátiles a partir ácidos grasos y aminoácidos (Janssens y col., 1992), generados por los fenómenos lipolíticos y proteolíticos comentados con anterioridad. Estos compuestos son principalmente metil cetonas, ácidos, alcoholes, ésteres y pirazinas (Hinrichsen y Andersen, 1994; Hinrichsen y col., 1994; Stahnke, 1994; Hinrichsen y Pedersen, 1995). En este sentido, las levaduras parecen tener un papel destacado en la génesis de compuestos volátiles que contribuyen al aroma característico de los productos cárnicos madurados, aprovechando los productos resultantes de la proteólisis y lipólisis que tienen lugar durante la maduración (Martín y col., 2003; Alonso, 2004). Así, los aminoácidos, fundamentalmente ramificados, liberados en fenómenos proteolíticos pueden ser metabolizados por levaduras del género *Debaryomyces* dando lugar a compuestos volátiles (Durá y col., 2004) que participan en el aroma característico de los embutidos fermentados (Montel y col., 1998). Entre estos compuestos, también relevantes en el aroma del jamón curado, se encuentran el 2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal, sintetizados a partir de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina, y los correspondientes alcoholes, cetonas y ácidos. Estos compuestos derivados de aminoácidos han sido descritos con más abundancia en jamones con recuentos microbianos altos (Hinrichsen y Pedersen, 1995). En jamón curado, su formación por esta vía es más probable que por la degradación de Strecker al necesitar ésta un pH alcalino y unas temperaturas altas que no se alcanzan normalmente en este producto (Andersen, 1994).

Tanto en embutidos fermentados como en jamón curado se han detectado una importante concentración de ésteres esenciales para el desarrollo del aroma a producto curado (García y col., 1991; Stahnke, 1995a; Mateo y col., 1996). Estos compuestos se forman por esterificación de ácidos carboxílicos y alcoholes, donde pueden intervenir enzimas microbianos, entre ellos los de las levaduras (Gatfield, 1998). Alonso (2004) detectó ésteres de ácidos grasos ramificados sólo cuando inoculó *D. hansenii* en carne sometida a maduración. Además, Flores y col. (2004) demostraron que *D. hansenii*, al ser inoculada en salchichones, ejerce un efecto positivo en el aroma al inhibir la oxidación lipídica y promover la generación de ésteres de etilo; aunque señalaron que su inoculación en exceso podía producir una alta generación de ácidos, enmascarando dicho efecto positivo. Por otra parte, Martín y col. (2003) también atribuyeron a *D. hansenii* la generación de alcoholes cíclicos y aromáticos de interés para el desarrollo del aroma de los productos cárnicos curados.

Dentro de la población de levaduras desarrollada en el jamón de cerdo ibérico se han identificado distintos biotipos de *D. hansenii* que han generado diferentes perfiles y concentraciones de compuestos volátiles, a partir del mismo sustrato (Alonso y col., 2001). Este aspecto puede ser interesante dado que se ha descrito una gran diversidad de biotipos entre las levaduras aisladas de jamón ibérico, existiendo, en la mayoría de las ocasiones, relación con el área geográfica en la cual se realizó el aislamiento y con el tiempo de maduración (Núñez y col., 1996). Esto podría traducirse en diferencias en el aroma de los jamones en función de la industria de procedencia o de la localización geográfica de procesado, debido a su vez a los biotipos de levaduras predominantes en cada una de las etapas de procesado. Así las diferencias podrían estar vinculadas incluso a las D.O.P. en las que se amparan las industrias elaboradoras de jamón curado de cerdo ibérico, pudiendo existir diferencias entre éstas en función de los biotipos de levaduras presentes. Por todo ello, la caracterización de la población de levaduras predominante en las diferentes etapas de elaboración en una determinada industria elaboradora de jamones de cerdo ibérico y su asociación a un perfil de generación de compuestos volátiles sería de gran utilidad, pues permitiría conocer el tipo de levadura deseada en sus secaderos, e incluso emplearla como cultivo iniciador.

#### **I.4. CULTIVOS INICIADORES EN LA INDUSTRIA CÁRNICA**

Los cultivos iniciadores son microorganismos que se presentan en estado puro o mixto, seleccionados de acuerdo con sus propiedades específicas y que se agregan a determinados alimentos con la finalidad de mejorar su aspecto, aroma y sabor (Leistner y Echardt, 1979). Su uso, ampliamente difundido, ha mejorado la eficacia, así como la automatización y el control de calidad de los procesos fermentativos que tienen lugar en la industria alimentaria.

Las levaduras se encuentran entre los grupos microbianos que se utilizan en la industria alimentaria como cultivos iniciadores. La mayor parte de las levaduras de importancia industrial pertenecen al género *Saccharomyces* y fundamentalmente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada en la fabricación de pan, cerveza, vino y en destilerías. El empleo de las levaduras como cultivo iniciador en la elaboración de productos derivados de la carne es más limitado. Sin embargo, se ha convertido en una práctica industrial cada vez más extendida, fundamentalmente en el proceso de elaboración de productos cárnicos fermentados, tales como el chorizo o el salchichón,

siendo menos frecuente su uso en el curado del jamón. El empleo de cultivos iniciadores cárnicos permite obtener unas características más homogéneas en el producto acabado, así como incrementar el tiempo de conservación, e incluso la producción, al disminuirse los tiempos de procesado (Wigley, 1999).

Los cultivos iniciadores actualmente empleados en la industria cárnica se componen de diferentes géneros microbianos en cultivos individuales o mixtos; los más usados son las bacterias ácido-lácticas, micrococáceas y levaduras, para inoculación en profundidad, y mohos y levaduras, como población microbiana de superficie.

Las levaduras empleadas como cultivos iniciadores pueden tener efecto bioprotector al inhibir por exclusión competitiva el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes (Carrascosa, 2001). Así, se ha demostrado que una cepa de *D. hansenii* posee la capacidad de inhibir a *Staphylococcus aureus* en embutidos fermentados mediante el consumo del oxígeno (Meisel y col., 1989). Gehlen y col. (1991) señalaron el efecto inhibitorio que *D. hansenii* ejercía también sobre el crecimiento de otras especies del género *Staphylococcus*, lo cual no es deseable pues estos microorganismos pueden resultar esenciales en el proceso (Carrascosa, 2001). En inoculaciones *in vitro*, *Candida guilliermondii* aislada en jamón curado portugués (Saldanha-da-Gama y col., 1997) reduce la formación de ocratoxina A (Virgili y col., 2004), micotoxina detectada en jamón curado italiano (Pietri y col., 2006). Además, en quesos, se ha descrito que los metabolitos antibacterianos producidos por *D. hansenii*, especie predominante en estos productos lácteos, permite reducir el riesgo del desarrollo de especies de bacterias alterantes del género *Clostridium* (Fatichenti y col., 1983).

Por otra parte, el uso de cultivos iniciadores, en los cuales la especie de levadura más comúnmente empleada es *D. hansenii*, contribuye al desarrollo del color y del aroma de productos cárnicos fermentados (Jessen, 1995), debido a su capacidad para degradar peróxidos, a sus propiedades lipolíticas y, en menor medida, proteolíticas (Lücke, 1985; Leistner, 1986; Rodríguez y col., 1998; Martín y col., 2002, 2003). La capacidad de degradación de peróxidos, gracias a la actividad catalasa, puede retrasar el comienzo de los fenómenos de enranciamiento, evitándose desviaciones de sabor y color. Las capacidades lipolítica y proteolítica, además de contribuir al aroma y sabor, incrementan la digestibilidad de las proteínas y lípidos de los productos cárnicos, con el consiguiente aumento de su valor nutritivo (Carrascosa, 2001).

Además, las levaduras pueden aprovechar los productos resultantes de los fenómenos lipolíticos y proteolíticos desencadenados durante la maduración de los productos cárnicos curados para la formación de compuestos volátiles de relevancia en el aroma del producto final. Por ello, el empleo de cultivos iniciadores que incluyan cepas de levaduras con capacidad de formación de compuestos volátiles relacionados con el aroma a curado es de gran interés para la industria cárnica. No obstante, es necesario considerar que la utilización como cultivos iniciadores de cepas de levaduras que generan compuestos azufrados como metanotiol o dimetildisulfuro, en lugar de aldehídos, alcoholes, cetonas y ácidos ramificados, puede aportar notas negativas a las cualidades aromáticas de los productos cárnicos madurados.

El uso de cultivos iniciadores en la elaboración del jamón ibérico no se encuentra extendido, sin embargo, permitiría evitar diferencias entre lotes en función de la contaminación microbiana presente en ellos, redundando en la estandarización de su proceso de maduración. Los microorganismos seleccionados para ser empleados como cultivos iniciadores en jamón curado deben ser capaces de desarrollarse a 4°C, ser preferiblemente aerobios facultativos, halotolerantes y nitritotolerantes (Lücke y Hechelmann, 1987).

Debido a que es la especie de levadura más comúnmente aislada en productos cárnicos y a sus efectos positivos sobre el color y el aroma, *D. hansenii* es la más usada como integrante de los cultivos iniciadores empleados en la industria cárnica. Además, en el caso del jamón, *D. hansenii* es la única especie de levadura capaz de desarrollarse durante todas las etapas de su elaboración (Núñez y col., 1996).

A pesar de la existencia de levaduras comerciales, para diversificar y mejorar los cultivos iniciadores de levaduras con uso en la industria cárnica sería preciso llevar a cabo el aislamiento de nuevas cepas a partir del mismo ecosistema en el que se van a aplicar. De esta manera se podrían elaborar cultivos iniciadores con microorganismos autóctonos adaptados a las condiciones ecológicas de elaboración y maduración tradicionales. El primer paso en la selección de la cepa o cepas de levaduras adecuadas para una zona geográfica de elaboración de productos cárnicos consiste en conocer la población microbiana autóctona de dicha zona mediante su aislamiento e identificación, primero a nivel de especie y después a nivel de cepa. Posteriormente es necesario realizar el análisis de la aptitud tecnológica de las diferentes cepas obtenidas e identificadas. Por último, las cepas de levaduras que superan esta fase deben ser



sometidas a la inoculación experimental a nivel industrial y al estudio de su comportamiento como cultivos iniciadores.

Determinadas cepas de *D. hansenii* aisladas de jamón curado de cerdo ibérico fueron sugeridas por Núñez (1995) para ser utilizadas como cultivos iniciadores en dicho producto, ya que mostraron actividades aminopeptidasa y proteolítica relevantes, además de una gran adaptación a las condiciones ambientales durante todo el procesado. Martín y col. (2004, 2006) inocularon una de estas cepas en perniles de cerdo blanco al inicio de la maduración para evaluar su aptitud como cultivos iniciadores. Para ello realizaron el estudio de sus propiedades proteolíticas y de su contribución a la formación de compuestos volátiles responsables del aroma, así como el análisis sensorial de las piezas obtenidas.

Por otra parte, para la selección adecuada de cepas de levaduras propias de una zona geográfica con buenas aptitudes tecnológicas como integrantes de cultivos iniciadores así como para el control del proceso de implantación de las mismas durante la maduración de los productos cárnicos es necesario disponer de métodos de identificación precisos que permitan la diferenciación rápida y sensible a nivel de especie y cepa. Estos métodos serían de gran interés también para la diferenciación de levaduras con buenas aptitudes tecnológicas de otras no deseables que incluso podrían comportarse como alterantes.

## **I.5. CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

### **I.5.1. Caracterización fenotípica de levaduras**

La identificación y caracterización de las diferentes especies de levaduras, así como de las variedades o cepas de una misma especie, se han basado tradicionalmente en sus características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas (Kreger-van Rij, 1984; Barnett y col., 1990). Los aislados de levaduras pueden identificarse empleando claves basadas en la descripción de especies conocidas (Deak y Beuchat, 1996), una vez se han determinado los caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Las condiciones de cultivo pueden hacer variar esos caracteres (Yamamoto y col., 1991) y, en ocasiones, las especies han sido delimitadas por una única característica fisiológica que en algunos casos estaba controlada sólo por un gen, originando resultados poco fiables.

Suelen ser técnicas laboriosas y lentas, que habitualmente sólo permiten la identificación de aislados de levaduras a nivel de especie, sin llegar a nivel de cepa.

Las características morfológicas y sexuales de las levaduras se determinan por examen microscópico. Las más empleadas consisten en el estudio de la formación de clamidosporas, la producción de pseudohifas o hifas verdaderas, el modo de reproducción vegetativa y la morfología de las células vegetativas.

Las levaduras, cuando crecen sobre medios sólidos, forman colonias de aspecto similar a las bacterianas, aunque más cremosas y de color blanco, beige o algo más oscuros; algunas son rosadas o rojas al producir un pigmento carotenoide. El aspecto de las colonias de levaduras en cultivos sobre medios sólidos no es útil para su identificación, en la mayoría de los casos. Además es difícil distinguir las colonias de levaduras de las bacterianas; la única forma segura es mediante el uso del microscopio. Las células típicas de las levaduras poseen un diámetro que oscila entre 5 y 8  $\mu\text{m}$ , siendo algunas de tamaño superior. Al microscopio se observan células con formas muy variadas: esférica, alargada, ovoidea, piriforme, apiculada, triangular, cilíndrica o incluso alargada en forma de micelio verdadero (Figura 1).

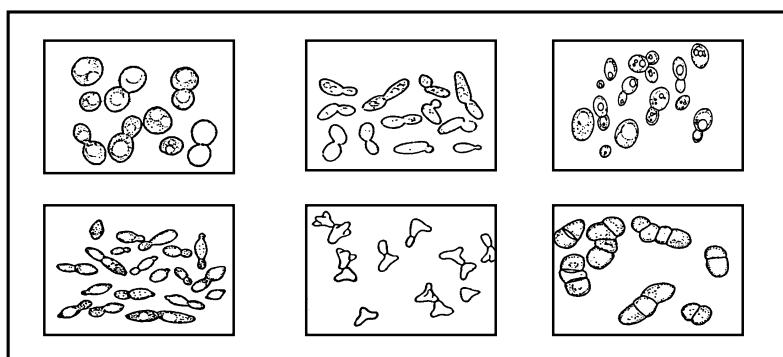


Figura 1. Morfología de las células de levaduras (Según Kreger-van Rij, 1984).

El estudio de las características fisiológicas y bioquímicas consiste en realizar pruebas de asimilación y fermentación de compuestos carbonados, de utilización de sustancias nitrogenadas, de resistencia a antibióticos, de necesidades vitamínicas, de actividad ureasa, de crecimiento a diferentes temperaturas, de desarrollo en presencia de etanol y de fenotipo Killer, entre otras (Deak y Beuchat, 1987).

Con la finalidad de disminuir la laboriosidad de los métodos convencionales utilizados en la identificación de levaduras se han desarrollado diversos kits

comerciales, basados en ensayos de asimilación de carbohidratos y otras pruebas bioquímicas, que se encuentran estandarizadas y simplificadas en forma de sustratos liofilizados. Los resultados pueden obtenerse manual o, incluso automáticamente mediante el empleo del software adecuado. Estos sistemas miniaturizados permiten realizar numerosas pruebas bioquímicas simultáneamente con lo que se reduce considerablemente el tiempo necesario para la identificación. La mayor parte de estos métodos fueron diseñados y comercializados para la identificación de levaduras de importancia clínica, lo cual ha originado resultados erróneos, en determinadas ocasiones, al ser empleados en la identificación de levaduras de origen alimentario (Esteve-Zarzoso y col., 1999; Prillinger y col., 1999; Hierro y col., 2004).

Entre los kits empleados para la identificación de levaduras de interés alimentario se encuentran el API® 20 C AUX (Esteve-Zarzoso y col., 2000; Succi y col., 2003; Oguntoyinbo, 2008), el ATB™ ID 32 C (Rohm y col., 1990; Baleiras Couto y col., 1996a,b; Andrighetto y col., 2000; Pereira-Dias, y col., 2000; Petersen y col., 2001, 2002; Senses-Ergul y col., 2006) y el sistema Vitek (Encinas y col., 2000; Álvarez-Martín y col., 2007). Más recientemente, se ha desarrollado un método semiautomático denominado Biolog YT Microplate®, el cual permite la identificación rápida de hasta un total de 267 especies diferentes de levaduras pertenecientes a 53 géneros, mediante 94 pruebas bioquímicas, entre las que se incluyen tanto pruebas de asimilación como de oxidación de fuentes de carbono. Esta técnica fenotípica, significativamente más rápida que los métodos tradicionales, igualmente ha sido empleada en la identificación de levaduras aisladas de alimentos (Praphailong y col., 1997; Heard y col., 2000; Addis y col., 2001; Foschino y col., 2004; Simoncini y col., 2007).

Otras pruebas empleadas en la identificación de levaduras de origen alimentario, con el objetivo de eliminar las dificultades de la taxonomía tradicional consisten en el análisis bioquímico de determinados componentes celulares. Entre otras, cabe citar el análisis de proteínas totales de la célula mediante electroforesis (Van Vuuren y Van der Meer, 1988; Vacanneyt y col., 1991; Guillamón y col., 1993), el análisis de los patrones isoenzimáticos (Duarte y col., 1999; Loureiro, 2000), el análisis de la coenzima Q (Yamada y Kondo, 1972; Molnár y col., 1996; Prillinger y col., 1999) y el análisis de los ácidos grasos celulares mediante cromatografía gaseosa (Abel y col., 1963; Kreger-van Rij, 1984; Botha y Kock, 1993; Moreira da Silva y col., 1994; Khachatourians, 1999; Loureiro, 2000). Estos métodos son más rápidos y más fáciles de aplicar que los citados con anterioridad. No obstante, su reproducibilidad también es cuestionable al

depender igualmente del estado fisiológico de las levaduras, el cual está condicionado por las condiciones de cultivo (Golden y col., 1994).

En los últimos 10 años, se han desarrollado medios cromogénicos para la detección específica y diferencial de sólo unas pocas especies de levaduras de interés alimentario (Tabla 1). Estos medios incluyen en su composición sustratos cromogénicos que permiten la detección de características enzimáticas particulares mediante la aparición de colonias con un color característico. Su utilización es bastante sencilla, y presentan una lectura rápida y objetiva, haciéndolos bastante accesibles para laboratorios industriales.

Tabla 1. Medios de cultivo cromogénicos desarrollados para la detección de levaduras de interés alimentario.

Medio	Especie	Alimento	Referencia bibliográfica
YLM	<i>Y. lipolytica</i>	Quesos	Carreira y Loureiro, 1998
KDM	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	Productos lácteos	Valderrama y col., 1999
ZDM	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Vino	Schuller y col., 2000
	<i>D. hansenii</i> <i>K. marxianus</i> <i>Pichia anomala</i>	Alimentos de $a_w$ intermedia	de Silóniz y col., 2000
DBDM	<i>Dekkera</i> spp. <i>Bretanomyces</i> spp.	Vino	Rodrigues y col., 2001
DDM	<i>D. hansenii</i>	Carne, quesos	Quirós y col., 2005

Datos obtenidos de Martorell (2006).

Además, el medio CHROMagar Candida®, inicialmente desarrollado para la detección de las especies *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei* entre los aislamientos clínicos de levaduras, ha resultado apropiado para el aislamiento y la identificación presuntiva de especies de levaduras presentes tanto en ensaladas (Tornai-Lehoczki y col., 2003) como en sus aliños (Fujikawa y col., 1998).

### **1.5.2. Caracterización de levaduras por técnicas de ácidos nucleicos**

Dentro de las técnicas alternativas a las convencionales basadas principalmente en características fenotípicas para la identificación y caracterización de levaduras, actualmente, la mejor opción la constituyen las técnicas de ácidos nucleicos. Se basan en el estudio de las características del material genético, es decir, de las moléculas de

ADN y de ARN. Son técnicas más reproducibles que las convencionales, al no depender del estado fisiológico de la célula; además son más precisas y más rápidas.

La estructura del ADN, descrita por Watson y Crick en 1.953, fue la base para el desarrollo de las técnicas genéticas para la identificación de los diferentes grupos microbianos. La aplicación de las técnicas de ácidos nucleicos a la identificación de levaduras ha provocado incluso reordenaciones y cambios en la taxonomía tradicional (Kurtzman y Robnett, 1998; Fell y col., 2000).

En concreto, para la identificación y caracterización de levaduras de interés en la industria alimentaria se han empleado técnicas basadas en la biología molecular como la hibridación ADN-ADN (Vaughan-Martini y Martini, 1987; Török y col., 1993) o el cariotipo electroforético determinado mediante la técnica de electroforesis de cromosomas en campo pulsante (Versavaud y col., 1995; Hayford y Jakobsen, 1999; Mitrakul y col., 1999; Deak y col., 2000; Corredor y col., 2003; Petersen y Jespersen, 2004). Ambas presentan la desventaja de no ser técnicas demasiado rápidas, a pesar de ser muy válidas para la identificación.

En la última década, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real se ha revelado como una herramienta valiosa para la detección de microorganismos. En el ámbito alimentario ha sido ampliamente empleada para la detección y enumeración de bacterias, especialmente patógenas; no ha ocurrido lo mismo con la población de levaduras aunque cada vez está siendo más aplicada para la detección de levaduras de interés alimentario (Bleve y col., 2003; Phister y Mills, 2003; Casey y Dobson, 2004; Martorell y col., 2005a; Hierro y col., 2006; Larpin y col., 2006; Rawsthorne y Phister, 2006; Agnolucci y col., 2007). Se caracteriza por ser una técnica con alta especificidad y sensibilidad, además de rápida al evitar un análisis posterior de los productos de amplificación mediante electroforesis; por otra parte, permite una cuantificación de forma simultánea a la detección específica. No obstante, esta técnica no permite la caracterización de microorganismos.

Métodos moleculares basados en la PCR como la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR), y en el análisis de restricción, tanto del ADN mitocondrial como de diferentes regiones del ADN ribosómico (ADNr), han mostrado ser herramientas adecuadas para la identificación y diferenciación rápida y sensible de levaduras de origen alimentario. Estas técnicas han sido ampliamente utilizadas en aislados del género *Saccharomyces* de origen enológico, sobre todo en cepas de la especie *S. cerevisiae* (Querol y col., 1992a; Schütz y Gafner, 1993; Guillamón y col., 1994,

1996; Quesada y Cenis, 1995). En los últimos años se ha extendido su uso para la identificación y caracterización de levaduras presentes en otros productos alimentarios, entre los que fundamentalmente se encuentran los productos lácteos (Romano y col., 1996; Wyder y Puhan, 1996; Prillinger y col., 1999; Andrighetto y col., 2000; Suzzi y col., 2000).

#### **I.5.2.1. Extracción de ácidos nucleicos**

El primer paso para el desarrollo de las técnicas moleculares consiste normalmente en la extracción de los ácidos nucleicos, que en las levaduras requiere de la disgregación de la pared celular. Para ello se pueden emplear diversos métodos, como los métodos físicos entre los que se encuentran la congelación/descongelación, la sonicación y el cizallamiento, y los métodos químicos, como el choque osmótico y la lisis enzimática. Cuando la ruptura se realiza mecánicamente el ADN puede resultar dañado, por lo que para una obtención adecuada de esferoplastos es más conveniente emplear preparados enzimáticos como gluconasa, zimolasa o liticasa.

Posteriormente se realizan procedimientos de purificación del ADN, mediante la utilización de diferentes enzimas y solventes orgánicos.

El ADN mitocondrial puede ser separado del ADN nuclear mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Cuando ambos se han separado, la determinación de la composición de bases del ADN nuclear, expresada en porcentaje molares de guanina y citosina (G+C) es una técnica molecular que permite identificar ciertos taxones (Meyer y Phaff, 1970).

#### **I.5.2.2. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR**

La técnica de PCR (Saiki y col., 1985; Mullis y col., 1986) consiste en un proceso en el que una cadena de oligonucleótidos con una secuencia específica, hibrida con otra de ADN más larga y, un enzima termoestable, la ADN polimerasa, incorpora nucleótidos en un extremo del cebador formando una secuencia de ADN complementario. La reacción permite imitar un proceso fundamental en todas las células, como es el mecanismo de replicación del ADN.

La PCR se basa en la reiteración cíclica de tres etapas (Figura 2):

1. Desnaturalización del ADN de cadena doble presente en la muestra para separarlo en dos cadenas sencillas. Se consigue aplicando temperaturas superiores a 90°C.

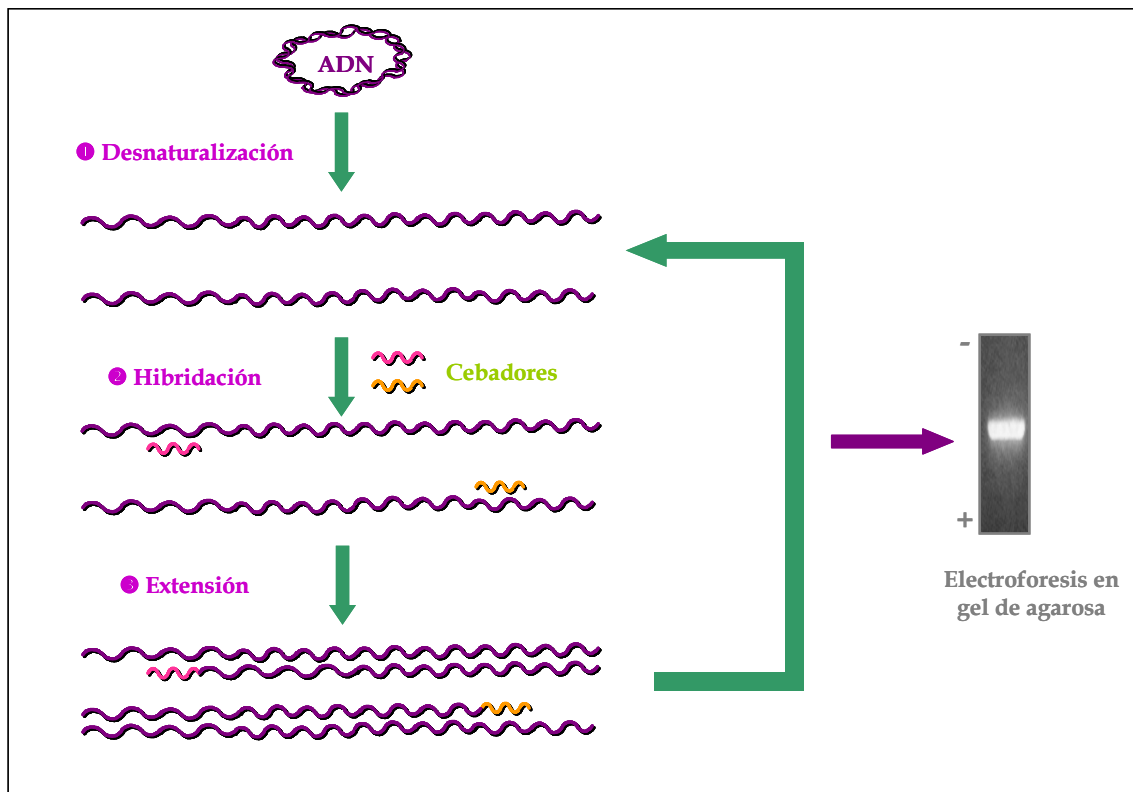


Figura 2. Sucesión de secuencias en el desarrollo de la PCR.

2. Hibridación específica de los cebadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. Se deben emplear al menos dos cebadores que tras unirse cada uno a una cadena diferente delimitan la secuencia diana que se desea amplificar. La temperatura a la que se efectúa la unión es crítica para controlar la especificidad de la reacción, y depende de la composición de bases, tamaño y concentración de los cebadores. Normalmente oscila entre 37 y 55°C. A temperaturas de hibridación excesivamente elevadas o bajas se pueden producir errores en la unión del cebador al ADN o puede originar la incorporación errónea de nucleótidos en la etapa posterior.

3. Extensión enzimática de los cebadores mediante la ADN polimerasa que inicia la polimerización tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la

muestra. Este enzima sintetiza una nueva cadena de ADN complementaria a la cadena molde.

La PCR tiene dos importantes características que explican su utilidad en un rango muy amplio de aplicaciones. Por una parte, la amplificación se realiza de forma exponencial debido a la repetición del ciclo de PCR. Así, en cada ciclo se duplica el número de moléculas de una secuencia concreta de ADN, y éstas serán nuevamente duplicadas en el ciclo siguiente; este proceso se repite un número determinado de veces o ciclos y se consigue un incremento exponencial del número de copias del fragmento de ADN molde. Una amplificación típica suele tener de 20 a 40 ciclos siendo el resultado de alrededor de un millón de copias de la zona de ADN originalmente amplificada (Parson, 1988). Por otra parte, la PCR es una técnica altamente selectiva. El fragmento de ADN que se amplifica es únicamente el de la región comprendida entre los dos cebadores empleados. Estos consisten en dos secuencias cortas, de unos 10 a 20 nucleótidos de longitud, que han de ser complementarios en la cadena de ADN que se emplea como molde en los extremos del fragmento que se quiere amplificar.

El uso de la PCR es interesante debido a su relativa sencillez, pero presenta el inconveniente de tener que conocer de antemano la secuencia de la zona que se quiere amplificar, lo que requiere una cantidad considerable de trabajo previo.

Para detectar los productos de PCR se pueden emplear diversos métodos. Pueden ser separados electroforéticamente en geles de agarosa o de acrilamida, teñidos con bromuro de etidio o plata, o pueden hibridarse con sondas marcadas, por ejemplo construidas con nucleótidos que contienen fluoresceína o digoxigenina.

### **I.5.2.3. PCR aleatoria o RAPD-PCR**

La técnica de RAPD-PCR (Williams y col., 1990) permite la detección de polimorfismos del ADN, por medio de amplificaciones aleatorias de múltiples regiones del genoma mediante PCR, que pueden ser útiles como marcadores genéticos; se pueden llegar a detectar incluso cambios en una sola base en el ADN genómico, lo que hace que esta técnica sea muy sensible.

La principal diferencia entre la técnica de RAPD-PCR y la PCR normal consiste en la intervención de un único cebador, de corta longitud y con secuencia de nucleótidos elegida de manera aleatoria (Figura 3). Ésta es una ventaja que presenta frente a la PCR convencional puesto que no es necesario disponer de información



previa a la elección del cebador a usar. El cebador hibrida en distintos sitios repartidos aleatoriamente por todo el genoma.

Realizando la amplificación en estas condiciones, se obtienen diversos productos de PCR que pueden ser detectados mediante electroforesis en gel de agarosa. Los patrones de bandas obtenidos son característicos para cada cebador, temperaturas y tiempos elegidos, y lo que es más importante, para cada ADN molde amplificado.

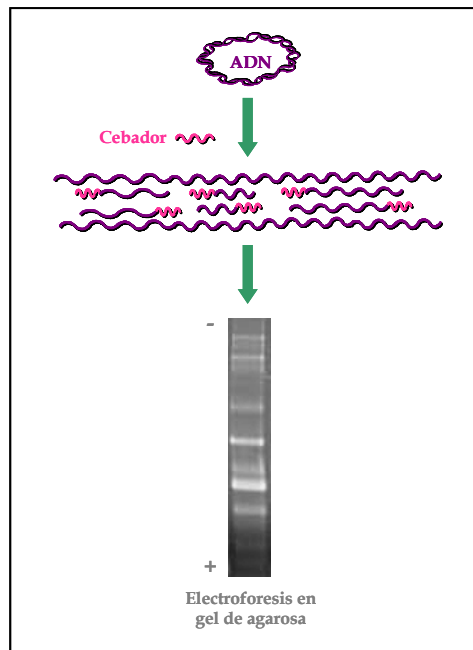


Figura 3. Esquema de la técnica de RAPD-PCR.

La técnica de RAPD-PCR permite amplificar regiones de ADN microsátélites y minisátélites. Las primeras consisten en regiones hipervariables, de no más de 10 nucleótidos, repetidas en serie a lo largo de todo el genoma. Las regiones minisátélites en cambio son regiones hipervariables con un número de nucleótidos que oscila entre 10 y 100 pares de bases (pb). Estas zonas se repiten en tándem y al azar a lo largo del genoma.

Una vez optimado el método, éste se caracteriza por su rapidez, sencillez y eficiencia, permitiendo, a partir de cantidades muy pequeñas de ADN, obtener polimorfismos genéticos que podrían permitir la diferenciación de levaduras. De hecho esta técnica ha sido empleada para la diferenciación de levaduras en alimentos, fundamentalmente de origen vínico (Lieckfeldt y col., 1993; Lavalley y col., 1994;

Baleiras Couto y col., 1995, 1996a; Quesada y Cenis, 1995; Andrighetto y col., 2000; Tornai-Lehoczki y Dlauchy, 2000; Pérez y col., 2001; Succi y col., 2003).

Las críticas más generalizadas a esta técnica, se centran en la baja reproducibilidad observada en algún caso; ello es debido al fundamento mismo de la técnica, ya que la sustitución de un único nucleótido puede ser determinante en la amplificación o no de un fragmento concreto, por lo que pequeñas variaciones metodológicas en la reacción de PCR pueden tener el mismo efecto (Taylor y col., 1999). No obstante, la técnica es reproducible si se controlan cuidadosamente sus componentes y sus condiciones.

#### I.5.2.4. Métodos basados en el estudio del ADN ribosómico

Los genes que codifican el ARN ribosómico (ARNr) pueden ser empleados en la identificación de organismos en general, y de levaduras en particular. Están localizados en una región genómica individual compuesta de 100 a 150 repeticiones en tándem de un fragmento de 9 kb (White y col., 1990; Kurtzman, 1992). Presentan la ventaja de que en los organismos eucariotas hay cientos e incluso miles de copias de ADNr. En las levaduras, la familia de genes del ADNr codifica los tres componentes ribosómicos 5,8S, 18S y 26S, así como los espaciadores internos, situados entre las tres regiones anteriores, y los externos. Estos espaciadores se transcriben, por lo que se denominan, respectivamente, espaciadores internos y externos que se transcriben (ITS y ETS). Las diferentes unidades de repetición se encuentran separadas por los espaciadores intergénicos (IGS); además, existen espacios que no se transcriben denominados NTS (Figura 4).

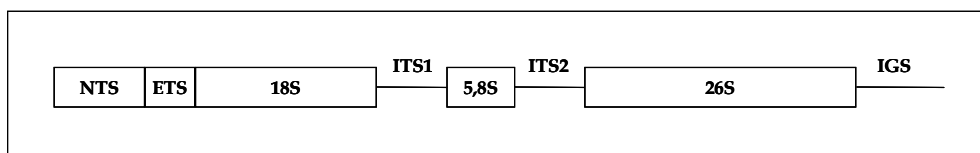


Figura 4. Esquema de la estructura de las subunidades de los genes que codifican el ARN ribosómico en levaduras.

NTS: espaciadores que no se transcriben; ETS: espaciadores externos que se transcriben; ITS: espaciadores internos que se transcriben; IGS: espaciador intergénico.

Los genes ribosómicos 5,8S, 18S, y 26S, así como los espaciadores ITS, IGS y NTS constituyen herramientas eficaces para el establecimiento de las relaciones filogenéticas y la identificación de especies (Kurtzman y Robnett, 1998) por contener secuencias relativamente conservadas (26S, 18S, y 5,8S), así como otras de mayor variabilidad (ITS1, ITS2 e IGS). De este modo, empleando la información de estas regiones ribosómicas se han desarrollado distintas técnicas para la identificación de levaduras de interés alimentario.

#### Secuenciación de regiones ribosómicas

Los métodos de identificación basados en la secuenciación del ADNr están siendo ampliamente aplicados para la identificación de especies de levaduras de interés alimentario. Se basan en la determinación y comparación de las secuencias nucleotídicas de las regiones ribosómicas del ADN de los aislados de levaduras en estudio con las secuencias disponibles en bases de datos electrónicas (GenBank, EMBL, DDBJ, ...).

Las dos regiones más utilizadas son las correspondientes a los dominios 1 y 2 (D1 y D2) situados en el extremo 5' del gen 26S ADNr (Kurtzman y Robnett, 1998; Arias y col., 2002; de Llanos y col., 2004; Lopandic y col., 2006; Quirós y col., 2008) y el gen 18S ADNr (James y col., 1997; Oguntoyinbo, 2008). El gen 26S es el que posee un mayor tamaño, con alrededor de 3.400 pb, y presenta tanto regiones variables como conservadas. Las regiones variables, y especialmente los dominios D1 y D2, han permitido delimitar especies e incluso categorías taxonómicas superiores (Kurtzman y Robnett, 1998; Fell y col., 2000). El gen 18S tiene alrededor de 1.800 pb de tamaño, poseyendo también tanto regiones variables como conservadas. Con menor frecuencia se ha empleado la secuenciación de la región ITS, constituida por el espaciador ITS1, el gen que codifica el ARNr 5,8S y el espaciador ITS2, en la identificación de levaduras de origen alimentario (Foschino y col., 2004; Martorell y col., 2005b; Quirós y col., 2008).

La disponibilidad de las secuencias de estas regiones en bases de datos, sobre todo en el caso de la región D1/D2 del ADNr 26S, hacen que esta técnica sea muy útil para asignar una levadura desconocida a una especie concreta cuando el porcentaje de homología de sus secuencias es superior o igual a 99% (Kurtzman y Robnett, 1998).

La aparición de la PCR, que permite la amplificación directa de las regiones de interés, junto con las modernas tecnologías de secuenciación automática, hacen que la aplicación de esta técnica en la identificación de levaduras sea relativamente rápida.

### Análisis de regiones ribosómicas con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas o enzimas de restricción tienen la capacidad de fragmentar el ADN por secuencias de bases específicas. Se generan fragmentos de ADN de longitud variable que se separan electroforéticamente en geles de agarosa. La elección de los enzimas a emplear es un factor de suma importancia, basándose en la composición conocida de bases de la región diana y, con frecuencia, en la obtención de un pequeño número de fragmentos.

En el caso del análisis de restricción del ADNr lo que se hace es amplificar, mediante la técnica de PCR, la región o regiones del ADNr a estudiar a partir de ADN parcialmente purificado y cebadores especialmente diseñados (Figura 5). En la reacción de amplificación normalmente se usa como molde ADN extraído; sin embargo, se ha conseguido emplear una pequeña cantidad de colonia aislada como molde, acortándose así el proceso (Belloch y col., 2002). Tanto por las medidas de los fragmentos amplificados de ADNr como por las de los fragmentos que resultan de su digestión con diferentes enzimas de restricción se puede distinguir entre levaduras de diferentes géneros y de diferentes especies. Cuando los amplificados son del mismo tamaño no siempre corresponden a la misma especie y es necesario recurrir a su digestión para llegar a la identificación definitiva.

La región del ADNr más empleada en la identificación de levaduras de interés alimentario mediante análisis de restricción ha sido la región ITS (White y col., 1990) (Figura 5). Dentro de ésta, la región 5,8S es codificadora y conservada, sin embargo la zona de los espaciadores ITS es no codificadora e hipervariable, permitiendo el reconocimiento a nivel interespecífico. Guillamón y col. (1998) aplicaron este método para la identificación rápida de levaduras de interés vínico. Posteriormente, Esteve-Zarzoso y col. (1999) emplearon el análisis de restricción de la región ITS en la identificación de aislados pertenecientes a un gran número de especies de levaduras de origen alimentario. Los datos generados han permitido desarrollar una base de datos de identificación rápida de levaduras disponible en la dirección electrónica <http://yeast-id.com/>. Comparando el tamaño de la región ITS amplificada para los aislados de levaduras, así como el perfil de restricción de los mismos con los disponibles en dicha base de datos se pueden identificar más de 200 especies de una manera rápida y sencilla. Por ello, el análisis de restricción de la región ITS ha sido ampliamente utilizado en la identificación rápida de levaduras presentes en diversos alimentos (Deak y col., 2000; Fernández-Espinar y col., 2000; Caggia y col., 2001; Las

Heras-Vázquez y col., 2003; Naumova y col., 2003; de Llanos y col., 2004; Coton y col., 2006; Álvarez-Martín y col., 2007). Numerosos autores sugieren el empleo conjunto de los resultados obtenidos con varias endonucleasas de restricción. En la mayor parte de las ocasiones esta técnica permite establecer diferencias a nivel de especie pero no a nivel de cepa.

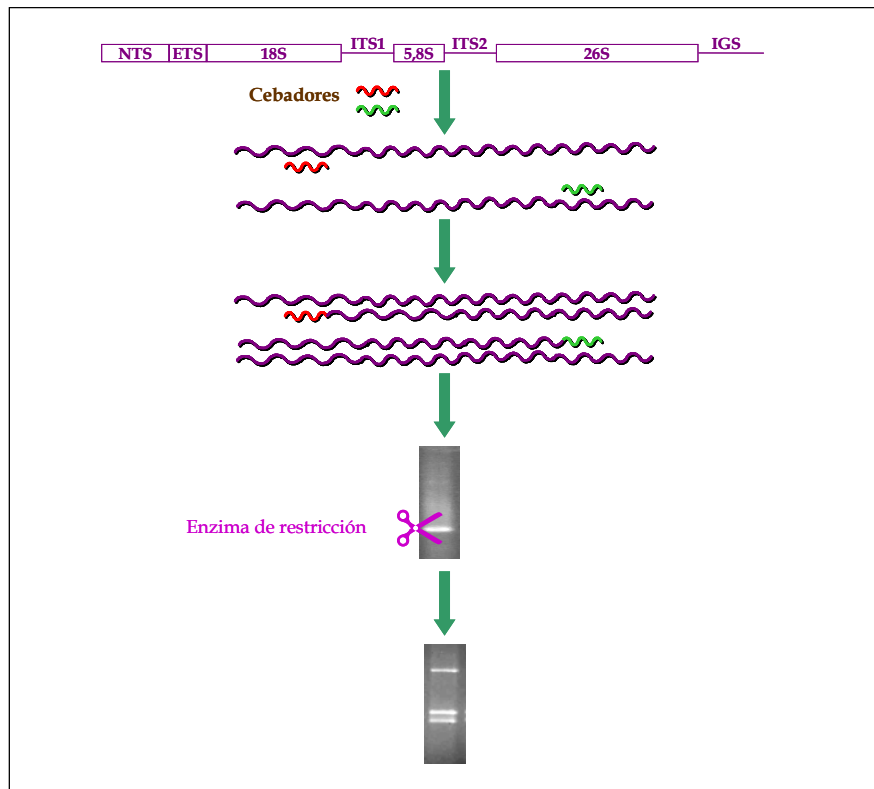


Figura 5. Esquema del análisis de restricción del ADN ribosómico.

Utilizando la misma metodología, pero amplificando el gen ribosómico 18S y la región intergénica ITS1, Dlauchy y col. (1999) construyeron una base de datos con los patrones de restricción de 128 especies de levaduras asociadas a alimentos y bebidas. Posteriormente, la amplificación conjunta de estas regiones ha sido empleada por diversos autores (Tornai-Lehoczki y Dlauchy, 2000; Redzepovic y col., 2002; Vasdinyei y Deák, 2003; Senses-Ergul y col., 2006) para la identificación de levaduras. También se ha empleado la amplificación conjunta de la región 18S junto con la región ITS adyacente completa (Raspor y col., 2002).

Además se ha usado el análisis de restricción de otras regiones ribosómicas para la identificación de levaduras de interés alimentario, como la región NTS (Baleiras

Couto y col., 1996a; Pulvirenti y col., 2000; Caruso y col., 2002; Capece y col., 2003), la región 18S (Capece y col., 2003) y la región 26S (Baleiras Couto y col., 2005) o algunos de los diferentes dominios de ésta (van Keulen y col., 2003).

Más recientemente se ha abordado el análisis de restricción de la región ribosómica IGS para la diferenciación de aislados de levaduras encuadrados dentro del género *Debaryomyces* (Romero y col., 2005; Quirós y col., 2006).

#### **I.5.2.5. Análisis de restricción del ADN mitocondrial**

La mitocondria, la fábrica energética de los eucariotas, contiene una molécula circular de ADN de doble cadena como un relicto de su origen procariótico. Ésta presenta una gran variabilidad de secuencia, característica que la convierte en un instrumento valioso para la identificación de levaduras. Además, debido a las diferencias existentes en la composición en pares de bases entre el ADN mitocondrial y el ADN genómico, es posible realizar digestiones enzimáticas que degraden completamente este último y de producir bandas provenientes exclusivamente del ADN mitocondrial. Para ello, se emplean enzimas de restricción que reconocen secuencias ricas en GC, con pocas dianas en el ADN mitocondrial (Zamarocky y Bernardi, 1986), al contener éste un 95% de pares AT; dichas enzimas poseen así muchas dianas en el ADN nuclear que se degradará en pequeños fragmentos, pero pocas en el ADN mitocondrial. Por tanto, se obtienen fragmentos de mayor tamaño del ADN mitocondrial que pueden visualizarse claramente en bandas definidas, por encima de los fragmentos degradados del ADN cromosómico, indetectables en un gel de agarosa (Figura 6). El grado de polimorfismo generado depende de las endonucleasas de restricción empleadas y de las especies analizadas. Las medidas de los fragmentos de restricción, detectados mediante electroforesis en gel de agarosa, varían entre especies e incluso cepas de levaduras.

Inicialmente el análisis de restricción del ADN mitocondrial se basaba en el empleo de gradientes de cloruro de cesio y ultracentrifugación, para la separación del ADN mitocondrial del ADN nuclear. Así fue utilizada para la caracterización de levaduras de panadería (Aigle y col., 1984) y cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Venzinhet y col., 1990). Esta técnica resultaba bastante lenta, haciéndola impracticable para ser usada cuando se dispone de una gran cantidad de muestras. Querol y col. (1992b) desarrollaron un método simplificado de obtención de ADN mitocondrial para la

caracterización de aislados de origen vínico de *S. cerevisiae*. Éste no requiere un aislamiento previo de la mitocondria ni la purificación de su ADN, evitándose así la utilización de gradientes en cloruro de cesio y el uso de una ultracentrífuga.

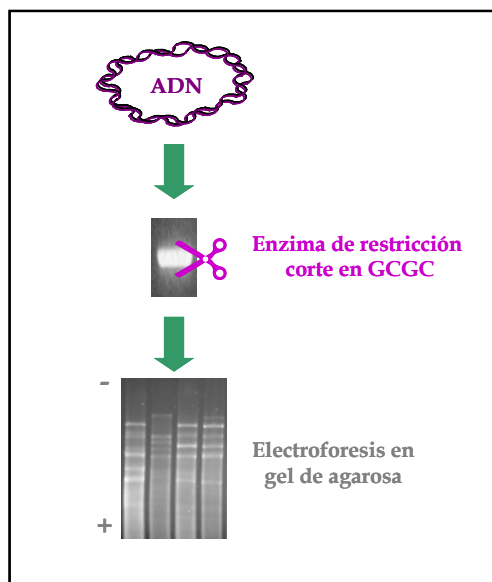


Figura 6. Esquema del análisis de restricción del ADN mitocondrial.

Esta metodología fue inicialmente empleada para la identificación y caracterización de cepas de origen vínico de la especie *S. cerevisiae* (Querol y col., 1992a; Guillamón y col., 1997), e incluso para realizar el seguimiento de la población de levaduras durante la fermentación vínica (Querol y col., 1992a; Torija y col., 2001). En la actualidad éste sigue siendo su uso mayoritario (Nikolaou y col., 2007; Schüller y Casal, 2007; Jeyaram y col., 2008), pero ha sido adaptado a otras especies de levaduras y a otros productos de origen alimentario. Así, ha sido empleada en quesos (Romano y col., 1996; Suzzi y col., 2000; Petersen y col., 2001, 2002; Mounier y col., 2005) y, en menor medida, en otros productos como masa fermentada de panadería (Foschino y col., 2004), turrónes de frutas confitadas (Martorell y col., 2005c) y sidra (Suárez y col., 2008).

López y col. (2001) propusieron un método rápido basado en el método descrito por Querol y col. (1992b), con el objeto de disminuir de forma considerable el tiempo de análisis lo cual resulta de gran interés para el control rutinario de la población de levaduras en la industria alimentaria. El método desarrollado se basa en el uso del horno microondas para realizar la digestión enzimática y ha resultado ser de utilidad

en la identificación de levaduras de interés en productos cárnicos madurados (Casado, 2006) y de levaduras vínicas (López y col., 2001).

La eficacia de esta técnica, el análisis de restricción del ADN mitocondrial, así como del análisis de restricción del ADN ribosómico y la técnica de RAPD-PCR para la caracterización de levaduras que se desarrollan en jamón ibérico debería ser determinada. El análisis de los resultados debe permitir encontrar un método razonablemente rápido y sensible que pueda ser aplicado como técnica rutinaria en la diferenciación de levaduras de interés en la industria cárnica.

## **I.6. OBJETIVOS**

Este trabajo forma parte de un proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y desarrollado en el grupo de investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura con el título "Desarrollo de un método para la caracterización molecular de levaduras de interés tecnológico en jamón ibérico" (AGL2001-0804), y en el que colaboraron diversas industrias elaboradoras de jamón ibérico como Entes Promotores Observadores (E.P.O.).

Los objetivos concretos planteados son los siguientes:

① Elección de un método simple o combinado basado en la metodología de ácidos nucleicos para la diferenciación de aislados de levaduras de interés en la industria cárnica a nivel de especie y cepa.

② Evaluar la producción de compuestos volátiles de los biotipos de levaduras que se desarrollan durante el proceso de maduración del jamón ibérico para la selección de los más adecuados como cultivos iniciadores.

③ Analizar la eficacia del método de ácidos nucleicos propuesto para diferenciar biotipos de levaduras que se desarrollan en jamón ibérico con distinta capacidad de producción de compuestos volátiles.

④ Analizar la distribución de los biotipos de levaduras más frecuentemente encontrados en las distintas áreas geográficas de producción y fases de maduración del jamón ibérico.

⑤ Evaluar el efecto de los biotipos de levaduras seleccionados en el perfil de compuestos volátiles de un producto cárnico madurado.



## II. MATERIAL Y MÉTODOS

---



## **II.1. MATERIAL**

### **II.1.1. Reactivos químicos y medios de cultivo**

Para la realización de la parte experimental de esta Tesis Doctoral se han empleado productos químicos de calidad reactivo suministrados por las firmas comerciales SCHARLAU, MERCK, PANREAC y SIGMA-ALDRICH.

Los reactivos utilizados para el desarrollo de las técnicas moleculares fueron de las marcas FINNZYMES, AMERSHAN BIOSCIENCES, SIGMA-ALDRICH, ROCHE, PRONADISA y VITRO.

La región 18S del ADNr amplificada fue purificada, antes de ser secuenciada, mediante el kit MinElute® PCR de QIAGEN.

Los medios de cultivo y productos empleados en las pruebas microbiológicas fueron de las marcas OXOID, DIFCO, BIOLOG, SCHARLAU, SIGMA-ALDRICH y MERCK.

Los gases utilizados fueron suministrados por AIR LIQUIDE.

#### **II.1.1.1. Medios de cultivo**

La preparación de los medios de cultivo comerciales se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos fueron esterilizados en autoclave antes de su uso.

##### **A) Agar Extracto de Malta (AEM):**

Extracto de Malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1.000 mL

El Caldo Extracto de Malta (CEM) contiene los mismos componentes de AEM, excepto el agar bacteriológico.

**B) Caldo Extracto de Levadura y Peptona (YPD):**

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1.000 mL

**C) Agar Dichloran 18% con cloranfenicol (DG18):**

DG18	31,7 g
Agua destilada	840 mL
Glicerol	160 mL

**D) Agar BUY™:**

Agar BUY	60 g
Agua destilada	1.000 mL
pH a 25°C	5,6 ± 0,4

**E) Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS):**

Agar MRS	66 g
Agua destilada	1.000 mL

**F) Agar Manitol Hipersalino (MSA):**

Agar MSA	111 g
Agua destilada	1.000 mL

**II.1.1.2. Tampones**

**A) Tampón TE:**

10mM Tris-HCl pH 7,4  
1mM Ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) pH 8,0

**B) TAE 50x:**

242 g/L Tris base  
57,1 mL ácido acético glacial  
100 mL EDTA 0,5M pH 8,0

**C) Tampón de carga 2x:**

50% glicerol  
0,25% azul de bromofenol  
EDTA 25mM

**II.1.2. Aparatos**

Las pesadas se efectuaron en una balanza electrónica KERN mod. 440-33, de precisión 10 mg y en una balanza analítica SARTORIUS mod. 1601A, de precisión  $\pm 0,1$  mg.

La preparación de los medios de cultivo y de las disoluciones se realizó en agitadores magnéticos con calefacción JENWAY 1000 y Ag-2 de RAYPA.

El agua destilada fue obtenida mediante el tratamiento con un destilador de Usf mod. PURELAB pRO. El agua destilada destinada a la preparación de tampones y soluciones fue tratada previamente con un desionizador mod. Elgastat Uhq MkII de ELGA.

Las mediciones de pH se realizaron con un pHmetro CRISON mod. Microph 2002.

Las pipetas automáticas empleadas fueron de las marcas BIOHIT y EPPENDORF.

Las esterilizaciones del material de laboratorio, medios de cultivo y disoluciones se efectuaron en un autoclave mod. Autester S-437-G de SELECTA.

Para las esterilizaciones por filtración se utilizaron filtros de acetato de celulosa de 0,20  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro de ALBET.

La homogeneización de las muestras de raspado superficial de jamones así como de las muestras de los embutidos inoculados fue realizada en un homogeneizador de paletas mod. LAB-BLENDER 400.

Las siembras y otras operaciones que requerían condiciones de esterilidad fueron realizadas en campanas de flujo laminar TELSTAR mod. Bio-II-A, con lámpara UVA SILVANA 46320 (1x15 W) con tubo PHILIPS ultra-violet 15 W, y mod. AV-30/70.

Para las incubaciones de los microorganismos sembrados se utilizó una estufa con temperatura regulable SELECTA mod. 207, una estufa refrigerada AQUALYTIC de FISHER BIOBLOCK SCIENTIFIC y un incubador orbital NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC mod. Innova 2000.

En las observaciones microscópicas se usó un microscopio de contraste de fases NIKON 125-2.

Los microorganismos y reactivos se conservaron en un frigorífico ZANUSSI mod. ZF/26, en una cámara refrigerada VEREDECA mod. 230 AXEX y en un congelador vertical FORMA SCIENTIFIC mod. -86C Econofreezer.

Para el tratamiento por calor de las muestras fue empleado un baño de agua termoregulado mod. PRECISTERM S-140 y un bloque térmico mod. Tembloc de SELECTA.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una microcentrífuga refrigerada mod. 5417 C/R y en una centrífuga refrigerada de sobremesa mod. 5810-R, ambas de EPPENDORF.

Para la realización de las distintas técnicas de PCR se utilizó un termociclador de BIO-RAD mod. iCycler™.

La fusión de la agarosa para la preparación de geles se llevó a cabo en un microondas PHILCO mod. PH 909M.

En la realización de la electroforesis en gel de agarosa se emplearon las cubetas horizontales Sub-Cell GT Wide Mini y Sub-Cell GT Mini de BIO-RAD, alimentadas por una fuente Powerpac 300, también de BIO-RAD.

Los geles teñidos con bromuro de etidio se visualizaron en un transiluminador SPECTROLINE a 312 nm y se fotografiaron con una cámara digital KODAK mod. DC290.

Para la elaboración de dendrogramas se empleó el programa NTSYS-PC versión 2.0.

La emulsión y homogeneización del ácido oleico utilizado en la elaboración del medio de cultivo para el estudio de la generación de compuestos volátiles se realizó en un sonicador mod. Branson SONIFIER 250.

La extracción de los compuestos volátiles se realizó mediante una fibra de Carboxen/Polidimetilsiloxano con 100 µm de diámetro de SUPELCO.

Para la separación de los compuestos volátiles fue empleado el cromatógrafo de gases HEWLETT-PACKARD mod. HP 5890 S II dotado con una columna capilar de sílice fundido del tipo DB-5 (5% fenil metil silicona) de 50 m x 0,32 mm x 1,05 µm.

La detección de los compuestos volátiles se realizó con un detector selectivo de masas HEWLETT-PACKARD HP 5971A y su análisis mediante el programa informático MS-ChemStation.

Para la identificación de los compuestos se utilizaron las bases de datos de espectros de masas WILEY (1986) y NIST/EPA/NIH (1994) del National Institute of Standard and Technology de Estados Unidos.

En el tratamiento estadístico de los datos se empleó el paquete informático SPSS para Windows versión 15.0.

La caracterización bioquímica de los aislados seleccionados se realizó mediante el sistema Biolog MicroLog™ compuesto por un turbidímetro para la preparación del inóculo, un lector de placas multipocillo BIOLOG MicroStation, el programa informático MicroLog™ 3 y la base de datos de levaduras de Biolog (MicroLog™ Yeast DataBase).

Para medir la cantidad y la calidad del ADN extraído así como la concentración de células de levaduras de los inóculos empleados en la inoculación de los embutidos se utilizó un espectrofotómetro BioPhotometer de EPPENDORF.

El picado de las muestras de embutidos se llevó a cabo en una picadora TAURUS mod. Bapi 600.

Las mediciones de  $a_w$  de los embutidos se realizaron con un criómetro FA-st/1 de GBX (Scientific Instruments).

### **II.1.3. Material biológico**

#### **II.1.3.1. Material biológico empleado en la optimización de técnicas de ácidos nucleicos para la identificación de levaduras aisladas de productos cárnicos**

Las cepas de referencia utilizadas en la optimización de las técnicas de ácidos nucleicos para la identificación de levaduras fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Tabla 2). Se sembraron en CEM y fueron mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización, después de la adición de glicerol estéril al 20% (v/v).

#### **II.1.3.2. Aislados de levaduras de jamón curado de cerdo ibérico**

Se realizó el aislamiento de levaduras en jamones de distintas industrias pertenecientes a las diferentes D.O.P. de jamón curado de cerdo ibérico existentes actualmente en España (Jamón de Huelva, Dehesa de Extremadura, Guijuelo y Los

Pedroches) y a diferentes tiempos de procesado (postsalado, secadero y maduración en bodega).

Tabla 2. Cepas de levaduras de referencia empleadas en el presente trabajo y origen de aislamiento.

ESPECIE	DESIGNACIÓN CECT <sup>1</sup>	ORIGEN
<i>Candida zeylanoides</i>	10048	Jamón
	10051	Salchichón
	1441	Animal
	10125	Insectos
	10128	Vegetal
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	10282	Mora
	10251	Vegetal
	10099	Leche condensada
	10135	Vegetal
<i>Debaryomyces hansenii</i>	10280	Vegetal
	10352	Tomate
	10026	Bacalao
	10360	Queso
	10202	Fruta
<i>Pichia carsonii</i>	10353	Tomate
	10230	Vino
	10229	Salmón
	1129	Salmuera
	10307	Vegetal
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	10542	Vegetal
	10291	Suelo
	10359	Queso
	10044	Insectos
	10087	Vegetal
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11016	Desconocido
	1414	Desconocido
	1387	Cerveza
	1443	Vino
	1477	Vino
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1485	Desconocido
	1468	Desconocido
	1469	Desconocido
	10358	Queso
	10363	Mantequilla
	10448	Desconocido

<sup>1</sup>CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia)



La toma de muestra se llevó a cabo mediante raspado superficial de los jamones, dilución en agua de peptona al 0,1% (p/v) y siembra en Agar DG18. El medio inoculado se incubó a 25°C durante 5 días. De cada una de las tomas de muestras se seleccionaron aislados en función de diferencias morfológicas macroscópicas y de jamones de procedencia. Los aislados seleccionados se subcultivaron en AEM. A continuación fueron sembrados en CEM y conservados a -80°C en glicerol estéril al 20% (v/v).

## **II. 2. MÉTODOS**

### **II.2.1. Optimización de técnicas de ácidos nucleicos para la identificación de levaduras aisladas de productos cárnicos**

#### **II.2.1.1. Extracción de ADN total**

Para la extracción de ADN se siguió el procedimiento descrito por Querol y col. (1992b). Las células se dejan crecer en 10 mL de YPD a 25°C en agitación. Tras 48-72 h de incubación se centrifugan 5 min a 4.000 r.p.m., se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 500 µL de solución 1M sorbitol-0,1mM EDTA a pH 7,5. Después se añaden 40 µL de liticasa (20 mg/mL) y se incuba durante 45 min a 37°C. Posteriormente se centrifuga durante 1 min a 13.000 r.p.m., se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 500 µL de solución 50mM Tris-HCl pH 8 y 20mM EDTA pH 7,4, añadiendo 50 µL de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% (p/v) e incubando durante 10 min a 65°C. Se adicionan 200 µL de acetato potásico 5M, se agita e incuba en hielo durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se centrifuga 5 min a 13.000 r.p.m. y se transfiere el sobrenadante, al cual se le añade el mismo volumen de isopropanol frío, dejándose a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación se centrifuga durante 10 min a 13.000 r.p.m. y, tras la eliminación del sobrenadante, se añade 1 mL de etanol al 70% (v/v) centrifugando durante 1 min a 13.000 r.p.m. y eliminando el sobrenadante de nuevo. Una vez secado, el precipitado se resuspende e incuba a 37°C durante 30 min en 50 µL de una solución con 100 µL de tampón TE y 5 µL de ARNasa (10 mg/mL) para eliminar el ARN de las muestras.

La determinación, tanto de la cantidad como de la calidad del ADN extraído, se llevó a cabo espectrofotométricamente a 260 y 280 nm y en gel de agarosa al 1% (p/v).

### II.2.1.2. Análisis de los perfiles de restricción de la región ITS del ADN ribosómico

#### Amplificación de la región ITS del ADN ribosómico

Los cebadores empleados en la amplificación de la región ITS fueron los descritos por White y col. (1990), ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').

Se ensayaron diferentes concentraciones de ambos oligonucleótidos y de ADN. En las tablas 3 y 4 se describen las concentraciones óptimas de los componentes utilizados para el desarrollo de la PCR, en un volumen de 50  $\mu$ L, y los tiempos y temperaturas que fueron usados para llevar a cabo la amplificación del fragmento ITS, respectivamente.

Tabla 3. Concentración y volumen de los reactivos empleados para la amplificación de la región ITS del ADNr.

Reactivos	Volumen ( $\mu$ L)
Tampón 10x	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,8
Nucleótidos (10 mM)	1
ITS 1 (100 ng/ $\mu$ L)	2
ITS 4 (100 ng/ $\mu$ L)	2
ADN (100 ng/ $\mu$ L)	2
Taq polimerasa (2 U/ $\mu$ L)	0,5
Agua desionizada estéril	34,7

Tabla 4. Condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos empleados en la amplificación de la región ITS del ADNr.

Fases de la PCR	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo (min)	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización del ADN	94	1	
Hibridación de los cebadores	50	1	40
Extensión	72	2	
Extensión final	72	5	1

### Digestión de la región ITS amplificada

Los fragmentos ITS amplificados fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Sau3AI* (GATC), *TaqI* (TCGA) y *HaeIII* (GGCC). Para 15  $\mu\text{L}$  de reacción se preparó la mezcla de digestión, tal y como se describe en la tabla 5. La reacción se incubó durante toda la noche a 37°C, excepto para el enzima *TaqI* que fue incubada a 65°C.

Tabla 5. Volumen de los reactivos empleados para la digestión de la región ITS del ADNr.

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Tampón de restricción	1,5
5,8S-ITS ADNr amplificado	11,5
Enzima (1 U/ $\mu\text{L}$ )	2

### II.2.1.3. Análisis de los perfiles de restricción de la región 18S del ADN ribosómico

#### Amplificación de la región 18S del ADN ribosómico

El ADN que codifica el ARNr 18S fue amplificado empleando la pareja de oligonucleótidos P108 (5' ACCTGGTTGATCCTGCCAGT 3') y M3989 (5' CTACGGAAACCTCTACGGAAACCTTGTTACGACT 3') (James y col., 1994).

Se ensayaron diferentes concentraciones de los cebadores y de ADN. En las tablas 6 y 7 se describen las concentraciones óptimas de los reactivos utilizados para el desarrollo de la PCR, en un volumen total de 50  $\mu\text{L}$ , y los tiempos y temperaturas empleados para llevar a cabo la amplificación, respectivamente.

#### Digestión de la región 18S amplificada

El fragmento 18S amplificado mediante PCR se digirió con los enzimas de restricción *HaeIII* (GGCC), *TaqI* (TCGA) y *RsaI* (GTAC). Para 15  $\mu\text{L}$  de reacción se emplearon los reactivos que se encuentran en la tabla 8. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche, excepto para el enzima *TaqI* que fue incubada a 65°C.

Tabla 6. Concentración y volumen de los reactivos empleados para la amplificación de la región 18S del ADNr.

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Tampón 10x	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2
Nucleótidos (10 mM)	1
P108 (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	1
M3989 (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	1
ADN (10 ng/ $\mu\text{L}$ )	5
Taq polimerasa (2 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5
Agua desionizada estéril	34,5

Tabla 7. Condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos empleados en la amplificación de la región 18S del ADNr.

Fases de la PCR	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3	1
Desnaturalización del ADN	92	1	
Hibridación de los cebadores	47	1	29
Extensión	58	5	
Extensión final	58	5	1

Tabla 8. Volumen de los reactivos empleados para la digestión de la región 18S del ADNr.

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Tampón de restricción	1,5
18S ADNr amplificado	11,5
Enzima (1 U/ $\mu\text{L}$ )	2

#### II.2.1.4. RAPD-PCR

Para el desarrollo de la técnica RAPD-PCR se utilizaron los cebadores (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub>, (GAC)<sub>5</sub> y M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3') (Huey y Hall, 1989).

Tras el ensayo de diferentes concentraciones de los componentes de la reacción de PCR así como de las condiciones de amplificación se obtuvieron las concentraciones, los tiempos y temperaturas óptimas para su desarrollo que se describen en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Concentración y volumen de los reactivos empleados para la técnica de RAPD-PCR con los cebadores M13, (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub>.

Reactivos	M13	(GACA) <sub>4</sub>	(GAC) <sub>5</sub> /(GTG) <sub>5</sub>
Tampón 10x	5	5	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2	3	4
Nucleótidos (10 mM)	1	1	1
Cebador (100 ng/μL)	1	2	2
ADN (100 ng/μL)	2	1	1
Taq polimerasa (2 U/μL)	0,5	0,5	0,5
Agua desionizada estéril	38,5	37,5	36,5

Tabla 10. Condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos empleados en la técnica RAPD-PCR con los cebadores M13, (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub>.

Fases de la PCR	M13		(GACA) <sub>4</sub> /(GAC) <sub>5</sub>		(GTG) <sub>5</sub>		Número de ciclos
	T <sup>a</sup> (°C)	T <sup>o</sup>	T <sup>a</sup> (°C)	T <sup>o</sup>	T <sup>a</sup> (°C)	T <sup>o</sup>	
Desnaturalización inicial	94	3'	-	-	94	5'	1
Desnaturalización	94	45''	94	1'	94	30''	30
Hibridación	50	1'	36	1'	45	1'	
Extensión	60	3'	55	5'	60	5'	
Extensión final	60	3'	55	5'	60	5'	1

#### II.2.1.5. Análisis de los perfiles de restricción del ADN mitocondrial

##### Digestión del ADN total

El análisis de restricción del ADN genómico se realizó con la endonucleasa *HaeIII* (GGCC). Para 15 μL de reacción se prepararon los reactivos que se encuentran en la tabla 11. La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche.

Tabla 11. Volumen de los reactivos empleados para la digestión del ADN total con el enzima de restricción *HaeIII*.

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Tampón de restricción	1,5
ADN	5
Enzima (10 U/ $\mu\text{L}$ )	2
Agua desionizada estéril	7,5

#### II.2.1.6. Electroforesis en gel de agarosa de ADN, productos de amplificación y de restricción.

La cantidad y calidad del ADN extraído, así como los productos de la PCR fueron detectados en geles horizontales de agarosa al 1% (p/v) en solución de tampón TAE 1x, preparado a partir de la solución concentrada TAE 50x. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 2x, antes de ser depositadas en los pocillos del gel. Tras la electroforesis realizada a 100 V, se procedió a la tinción del gel de agarosa mediante su inmersión en una solución de bromuro de etidio 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 20 minutos. Los geles se visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

Los fragmentos de restricción de las regiones ITS y 18S del ADNr fueron detectados en geles de agarosa al 2,5% (p/v) aplicando un voltaje de 70 V. En el caso del análisis de restricción del ADN mitocondrial se emplearon geles al 0,8% (p/v) y se aplicó un voltaje de 90 V.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron uno de 10 a 0,5 Kb y otro de 2,176 a 0,15 Kb.

#### II.2.1.7. Análisis de patrones de bandas y elaboración de dendrogramas

Para el análisis de los patrones de bandas se comparó la movilidad de los fragmentos de ADN amplificados o de restricción para cada aislado con la movilidad de los fragmentos del patrón de peso molecular y se determinó el número aproximado de pares de bases de cada una de las bandas de los aislados de levaduras analizados.

Se elaboró una recta patrón mediante la representación de la movilidad de las bandas frente al logaritmo del tamaño de los marcadores de ADN. Posteriormente se realizó la extrapolación a la recta de los valores de movilidad de las bandas problemas,

obteniéndose el peso en pares de bases de cada una de ellas, mediante la ecuación de la recta correspondiente (Figura 7).

Una vez conocido el número de bases de las bandas se obtuvo el perfil de cada una de los aislados ensayados.

Con la información de los diferentes perfiles de bandas obtenidos con cada técnica molecular y mediante el programa NTSYS-PC se elaboraron los correspondientes dendrogramas, empleando el coeficiente de similitud de Dice y el método UPGMA (agrupamiento por pares no ponderadas usando la media aritmética).

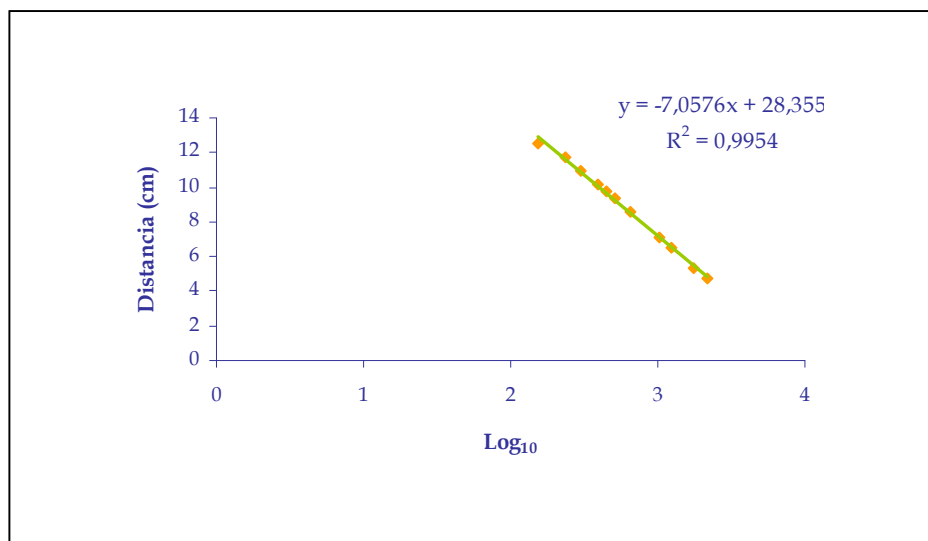


Figura 7. Recta patrón obtenida mediante la representación de la movilidad expresada en centímetros frente al  $\log_{10}$  de los pares de bases de los marcadores de ADN con la fotografía de los patrones.

## **II.2.2. Caracterización genotípica de los aislados de levaduras obtenidos de jamón curado de cerdo ibérico**

Los aislados de levaduras de jamón curado de cerdo ibérico se caracterizaron molecularmente a nivel de especie y de cepa mediante las técnicas de análisis de restricción del ADN mitocondrial y RAPD-PCR optimizadas previamente con las cepas de referencia.

### **II.2.2.1. Extracción del ADN total**

Para la extracción del ADN total de los aislados de levaduras obtenidos de jamones curados de cerdo ibérico se siguió el método descrito en el apartado II.2.1.1.

#### **II.2.2.2. RAPD-PCR con (GACA)<sub>4</sub> y (GAC)<sub>5</sub>**

Para la técnica RAPD-PCR se emplearon los cebadores (GACA)<sub>4</sub> y (GAC)<sub>5</sub>, tal y como se describe en el apartado II.2.1.4.

#### **II.2.2.3. Análisis de restricción del ADN mitocondrial con la endonucleasa de restricción *HaeIII*.**

La digestión del ADN total se realizó con el enzima de restricción *HaeIII* según el procedimiento descrito en el apartado II.2.1.5.

#### **II.2.2.4. Electroforesis en gel de agarosa de ADN, productos de amplificación y de restricción.**

La detección de los productos de PCR y de los productos de digestión del ADN mitocondrial se llevó a cabo como se describe en el apartado II.2.1.6.

#### **II.2.2.5. Análisis de los patrones de bandas y elaboración de dendrogramas**

Para la obtención de los perfiles de bandas de los diferentes aislamientos y la elaboración de los dendrogramas a partir de estos se empleó el método descrito en el apartado II.2.1.7.

#### **II.2.2.6. Secuenciación de los genes de la región 18S del ADN ribosómico**

Aislados de levaduras representantes de cada uno de los patrones moleculares obtenidos mediante análisis de restricción del ADN mitocondrial y RAPD-PCR fueron seleccionados para ser identificados mediante secuenciación del 18S ADNr.

El primer paso para la secuenciación de los genes de una determinada región de ADN consiste en la amplificación de la misma mediante PCR. Así la amplificación de los genes del 18S del ADNr se llevó a cabo mediante PCR utilizando los oligonucleótidos P108 y M3989, según las condiciones descritas previamente (apartado II.2.1.3.). La confirmación de la amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (apartado II.2.1.6.).

El fragmento amplificado de cada uno de los aislados se purificó y posteriormente fue remitido al Instituto de Biomedicina (CSIC, Valencia) para su



secuenciación. Como cebadores para la reacción de secuenciación se emplearon los mismos que para la amplificación.

Las secuencias obtenidas de la región 18S del ADNr se compararon con secuencias de la base de datos GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) empleando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### **II.2.3. Identificación bioquímica de aislados de levaduras obtenidos de jamón curado de cerdo ibérico**

Los aislados de levaduras representantes de los diferentes patrones moleculares fueron también identificados bioquímicamente mediante el sistema Biolog MicroLog™.

Inicialmente se sembraron, a partir de un cultivo puro, los aislados de levaduras a identificar en agar BUY™. Tras su incubación durante 24-48 horas a 25°C, se realizó una suspensión de cada aislado empleando un hisopo humedecido en agua estéril, ajustándola a  $47 \pm 2\%$  de transmitancia en el turbidímetro Biolog y se inocularon 100  $\mu\text{L}$  de esta suspensión en cada uno de los 96 pocillos de la placa apropiada para la identificación de levaduras (YT MicroPlate™). A continuación se incubó la placa de cada uno de los aislados seleccionados a 25°C durante 24-72 horas. La lectura de los resultados bioquímicos se efectuó en el lector automático de placas multipocillo a las 24, 48 y 72 horas. La identificación final se realizó automáticamente mediante el software de análisis MicroLog™ 3 y la base de datos MicroLog™ Yeast DataBase.

La placa multipocillo YT MicroPlate™ está constituida tanto por tests de oxidación como de asimilación de fuentes de carbono. La oxidación positiva de una fuente de carbono es indicada por una reacción colorimétrica debido a que las alteraciones en el potencial redox originadas producen un cambio de color a rojo-naranja en los pocillos de la placa por la reducción de un indicador colorimétrico, el violeta de tetrazolio. Dicha reacción colorimétrica es detectada a 750 nm. La turbidez generada en la asimilación de las fuentes de carbono se detecta a 490 nm.

### **II.2.4. Evaluación de la formación de compuestos volátiles de aislados de levaduras obtenidos de jamón curado de cerdo ibérico**

Aislados de levaduras representantes de cada uno de los patrones moleculares fueron seleccionados e inoculados, por triplicado, en un medio de cultivo mínimo con

un pH similar al encontrado en el jamón curado durante su proceso de maduración, junto con aminoácidos y ácidos grasos libres en las concentraciones también observadas, con la finalidad de analizar la producción de compuestos volátiles (tabla 12). Se realizaron controles por triplicado sin inocular del medio de cultivo empleado, que fueron incubados junto con los medios inoculados en agitación a 150 r.p.m. durante 30 días a 25°C.

Tabla 12. Composición del medio de cultivo empleado para el estudio de la producción de compuestos volátiles.

Compuestos	Cantidad
Tampón Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1M pH 6,0
Ácido láctico	0,1M
NaCl	5 g/L
Acido oleico	4 g/L
Ribosa	0,5 g/L
Creatina	3 g/L
Aminoácidos (Ala, Trp, Lys, Glu, Gly, Val, Leu, Met, Iso, Phe)	4 g/L
α-cetoglutárico	2,25 g/L

Finalizado el periodo de incubación, los compuestos volátiles se extrajeron mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) utilizando una fibra de Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) (Ruiz y col., 1998). Antes del análisis, ésta fue acondicionada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. Posteriormente, se introdujo en un vial sellado con un septum que contenía 1 mL de la muestra a analizar, la cual se mantuvo en agitación en el interior del vial en un baño termostatzado a 42°C durante 45 minutos para obtener una óptima extracción de los compuestos volátiles generados.

Los compuestos adsorbidos por la fibra se desorbieron en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas para la separación, identificación y cuantificación de dichos compuestos.

La separación de los compuestos volátiles se realizó en las siguientes condiciones cromatográficas:

- Temperatura inicial del horno: 35°C durante 15 min
- Rampa de temperatura: hasta 150°C a 4°C/min y hasta 250°C a 20°C/min

- Temperatura de la interfase: 280°C

Los espectros de masas de los distintos compuestos volátiles se obtuvieron por impacto electrónico a 70eV, con un multiplicador electrón voltio de 1650 V y recogiendo datos con una frecuencia de 1 scan/s en un rango de masas de 40 a 300 m/z. El tiempo total del análisis fue de 45 minutos.

La identificación de los compuestos volátiles se realizó mediante su espectro de masas; para ello se empleó el programa informático MS-ChemStation y los espectros obtenidos se compararon con los de la librería de espectros de masas Wiley (1986) y Nist/Epa/Nih (1994). Además, para la identificación, se calculó el índice de Kovats de cada compuesto a partir del tiempo de retención del patrón de alcanos, analizadas en las mismas condiciones que las muestras. Los resultados se expresaron como media de las tres repeticiones de la inoculación de cada patrón molecular.

## **II.2.5. Evaluación de la capacidad de formación de compuestos volátiles por levaduras inoculadas en productos cárnicos madurados (salchichones)**

### **II.2.5.1. Preparación de los inóculos de levaduras e inoculación en salchichones**

Tres de los aislados de levaduras previamente inoculados en el medio de cultivo diseñado fueron seleccionados para ser inoculados en la matriz cárnica elegida (salchichón), en base a que presentaron diferencias en sus patrones de restricción del ADN mitocondrial y en sus perfiles de producción de compuestos volátiles (apartado II.2.4.). Estos tres aislados, identificados genotípicamente como *D. hansenii*, fueron inoculados tanto de forma individual como de forma conjunta. Así, se elaboraron 5 lotes diferentes de salchichones: un lote control (sin inoculación), un lote inoculado con un aislado con patrón de restricción de ADN mitocondrial B, un lote inoculado con un aislado con patrón de restricción de ADN mitocondrial C2, un lote inoculado con un aislado con patrón de restricción de ADN mitocondrial E y un lote inoculado conjuntamente con los 3 aislados de levaduras seleccionados.

La recuperación de los aislados a partir de suspensiones almacenadas en congelación se realizó en CEM. Los cultivos fueron sucesivamente subcultivados hasta alcanzar una concentración de  $10^7$  ufc/mL en un volumen final de 1 L. Esta concentración fue comprobada mediante espectrofotometría a 600 nm. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 4.500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y los sedimentos obtenidos se resuspendieron en agua destilada estéril. La suspensión resultante se

centrifugó y los sedimentos fueron resuspendidos en 100 mL de agua destilada estéril, quedando constituido el inóculo para ser añadido directamente a la mezcla para embutir. En el lote control se incorporaron 100 mL de agua destilada estéril.

El proceso de elaboración, inoculación y curación de los embutidos se realizó en la industria de Resti Sánchez S.A. situada en la localidad de Alcuéscar (Cáceres).

En la elaboración de la masa cárnica se empleó carne magra (75%) y grasa de cerdo ibérico (25%). A esta masa se le adicionaron los aditivos (Tabla 13) así como los inóculos de los aislados seleccionados. Toda la mezcla se amasó y se embutió en tripas artificiales de colágeno (diámetro 60 mm), dando lugar a piezas de embutido de 1 kg de peso aproximadamente.

Tabla 13. Aditivos empleados en la elaboración de salchichones

<b>Aditivos</b>	<b>g/kg</b>
Pimentón	1
Pimienta negra	1,5
Sal	30
Mezcla de dextrina, dextrosa, lactosa, nitrato sódico, nitrito sódico, ascorbato sódico y rojo Ponceau 4R	30

Los embutidos inoculados y los controles sin inocular fueron ubicados en las cámaras de fermentación y de maduración de acuerdo a los protocolos de elaboración de la industria. De este modo, las condiciones ambientales del procesado fueron las siguientes:

- 15°C y 85% de Humedad Relativa durante 3 días
- 5°C y 80% de Humedad Relativa durante 21 días
- 8°C y 70% de Humedad Relativa durante 30 días

Al inicio y al final del proceso de maduración (54 días) se tomaron muestras de cada uno de los 5 lotes elaborados, y se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

#### **II.2.5.2. Análisis microbiológico de salchichones**

El análisis microbiológico consistió en el recuento de bacterias ácido-lácticas, micrococáceas y levaduras tanto en la masa lista para embutir como en el embutido

madurado. El análisis microbiológico al inicio del procesado se efectuó para conocer la población inicial de los principales grupos microbianos implicados en la maduración de este tipo de productos cárnicos.

Para el análisis microbiológico, se tomaron muestras de 5 salchichones de cada uno de los lotes elaborados, de aproximadamente 10 g en condiciones asépticas. Inmediatamente, se realizaron las diluciones decimales oportunas y la siembra posterior en los medios selectivos para el recuento de los diferentes grupos microbianos. Así se empleó el agar MRS para el recuento de bacterias ácido-lácticas, el agar MSA para el recuento de micrococáceas y el agar DG18 para el de levaduras. Las placas de agar MRS y MSA fueron incubadas a 30°C durante 48 horas y las de DG18 a 25°C durante 5 días.

### **II.2.5.3. Análisis físico-químico de salchichones**

En las muestras tomadas antes de comenzar el proceso de maduración se midió el pH y la  $a_w$ . Dichas determinaciones junto al análisis de los compuestos volátiles generados fueron realizados en las muestras que se tomaron al finalizar el proceso de maduración.

La medición del valor de pH se realizó mediante un pHmetro de sobremesa empleando 10 g de muestra aproximadamente.

Para la medición de la  $a_w$  se emplearon muestras de aproximadamente 1 g que se depositaron en las cápsulas de acero inoxidable del criómetro.

Ambas medidas fueron realizadas inmediatamente después de las tomas de muestras. Las muestras restantes se almacenaron a -80°C hasta la determinación de los compuestos volátiles.

### **II.2.5.4. Análisis de restricción del ADN mitocondrial de levaduras aisladas de salchichones**

Se realizó el aislamiento de las levaduras detectadas en agar DG18 de cada uno de los lotes de salchichones, obteniéndose un total de 36 aislados que fueron subcultivados en AEM y posteriormente sometidos a análisis de restricción del ADN mitocondrial con la endonucleasa *HaeIII*, según se ha descrito previamente (apartados II.2.1.1., II.2.1.5 y II.2.1.6.).

#### **II.2.5.5. Análisis de compuestos volátiles generados en salchichones inoculados con aislados de levaduras**

La extracción, separación, identificación y cuantificación de los compuestos volátiles generados en los 5 lotes de salchichones elaborados se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.2.4. La cantidad de muestra empleada para el análisis fue de 1 g aproximadamente.

#### **II. 2. 6. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos de generación de compuestos volátiles (apartados II.2.4. y II.2.5.5.) se efectuó mediante el programa SPSS.

El efecto de los patrones moleculares inoculados en los diferentes ensayos se determinó por análisis de la varianza (ANOVA). Posteriormente, en los casos en que dicho efecto fue significativo, las medias se compararon utilizando test de la diferencia mínima significativa (DMS) o el test de Tukey ( $p < 0,05$ ), dependiendo del ensayo.

### **III. RESULTADOS**

---





### **III.1. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products**





## DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products

M.J. Andrade, M. Rodríguez, B. Sánchez, E. Aranda, J.J. Córdoba\*

*Higiene de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad s/n. 10071-Cáceres, Spain*

Received 10 January 2005; received in revised form 3 August 2005; accepted 7 August 2005

### Abstract

RFLP analysis of the ITS and 18S rDNA, RAPD-PCR using mini- and microsatellite primers and RFLP analysis of mitochondrial DNA were examined to discriminate yeasts related to dry-cured meat products at species and strain level. Seven species and 35 strains of yeasts usually found in dry-cured meat products were tested. RFLP analysis of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 and 18S rDNA did not allow the separation at species level of all of the species tested. RAPD with a M13 primer was found to be useful for differentiation of *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae*. However, no differences were observed between *Debaryomyces polymorphus* and *Pichia carsonii*. RAPD analysis with microsatellite primers (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> and (GAC)<sub>5</sub> enabled discrimination at species and strain level. However, the degree of discrimination by means of RAPD-PCR depends highly on the primers used. Thus, the PCR fingerprinting with primer (GACA)<sub>4</sub> enabled a higher level of discrimination than primers (GAC)<sub>5</sub> and (GTG)<sub>5</sub>. The RFLP analysis of mtDNA allowed the discrimination at the species and strain level except for *R. mucilaginosa*, where no polymorphisms were observed in the strains tested. RAPD analysis with primer (GACA)<sub>4</sub> and the restriction analysis of mtDNA used in the present work are useful for the differentiation at species and strain level of yeasts related to dry-cured meat products.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Yeast; RAPD-PCR; mtDNA RFLP; ITS; Dry-cured meat products

### 1. Introduction

Yeasts are predominant microorganisms during ripening period of different products of intermediate moisture such as dry-cured meat products (Núñez et al., 1996). *Debaryomyces hansenii* is the most common species in the above products (Fleet, 1990; Núñez et al., 1996). Unlike other yeasts species such as *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica* and *Rhodotorula* spp. it can be isolated in these products. Some of these species yield a beneficial effect to dry-cured meat products, since they provide proteolytic and lipolytic effects and could be involved in the generation of volatile compounds. However, some of the above species such as *Y. lipolytica* and *C. zeylanoides* and even some strains of *D. hansenii* have been reported to be involved in spoilage of meat products (Diriye et al., 1993; Ismail et al., 2000; Martínez et al., 2004). To avoid

the presence of spoilage species or strains of yeasts, technologically tested yeasts as starter cultures could be used in dry-cured meat products. To differentiate starter cultures from spoilage yeasts rapid and simple methods should be applied to quality control systems.

Traditionally, yeasts have been characterized by morphological and physiological traits (Barnett et al., 1990; Núñez et al., 1996). These methods are laborious and time-consuming, and are, therefore, not suitable for routine analysis in quality control systems. Moreover, these characteristics are influenced by culture conditions and can provide uncertain results (Yamamoto et al., 1991). The introduction of molecular methods provided new approaches to industrial yeasts differentiation (Querol and Ramón, 1996; Loureiro and Querol, 1999).

Several DNA based methods such as RFLP analysis of the 5.8S and 18S rDNA, RAPD-PCR and RFLP analysis of mitochondrial DNA have been used to discriminate wine yeasts at strain level (Capece et al., 2003; Schuller et al., 2004). In ripened cheese the above and related methods have been

\* Corresponding author. Tel.: +34 927 257125; fax: +34 927 257110.

E-mail address: [jcordoba@unex.es](mailto:jcordoba@unex.es) (J.J. Córdoba).

URL: <http://higiene.unex.es/> (J.J. Córdoba).

Table 1  
Yeasts strains used in this study

Species designation	Strain reference
<i>Candida zeylanoides</i>	CECT 10048
<i>Candida zeylanoides</i>	CECT 10051
<i>Candida zeylanoides</i>	CECT 1441
<i>Candida zeylanoides</i>	CECT 10125
<i>Candida zeylanoides</i>	CECT 10128
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	CECT 10282
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	CECT 10251
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	CECT 10099
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	CECT 10135
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	CECT 10280
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CECT 10352
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CECT 10026
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CECT 10360
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CECT 10202
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CECT 10353
<i>Pichia carsonii</i>	CECT 10230
<i>Pichia carsonii</i>	CECT 10229
<i>Pichia carsonii</i>	CECT 1129
<i>Pichia carsonii</i>	CECT 10307
<i>Pichia carsonii</i>	CECT 10542
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CECT 10291
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CECT 10359
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CECT 10044
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CECT 10087
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CECT 11016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1414
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1387
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1443
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1477
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1485
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CECT 1468
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CECT 1469
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CECT 10358
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CECT 10363
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CECT 10448

CECT: Spanish type culture collection.

assayed to discriminate *D. hansenii* and *C. zeylanoides* at strain level (Romano et al., 1996; Petersen et al., 2001, 2002). However, there are few DNA-based methods to differentiate spoilage yeasts species such as *Y. lipolytica* and *C. zeylanoides* from normal yeasts of dry-cured meat products. Chromosome length polymorphism by pulsed-field gel electrophoresis has been proven to be useful for strains typing of *Y. lipolytica* and *C. zeylanoides* (Deák et al., 2000). However, this DNA technique is laborious and time-consuming. Thus, it is not adequate for rapid routine differentiation of yeasts of dry-cured meat products.

In the present work the RFLP analysis of the ITS and 18S rDNA, RAPD-PCR using mini- and microsatellite primers and

RFLP analysis of mitochondrial DNA were examined to discriminate yeasts species usually found in dry-cured meat products. In addition, the ability of the above methods to discriminate yeasts at strain level was also tested.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strains

Representative spoilage and normal yeasts species usually found in ripened products were used in this study (Table 1). All the strains tested were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT) (López-Coronado, 2002). All the yeasts used were purified on repeated cultivation on malt extract agar (2% malt extract, 2% glucose, 0.1% peptone, 2% agar) before analysis. Characterization of these strains was confirmed by API ID 20 C kit (Biomerieux, Lyon, France) and the tests proposed by Deák and Beuchat (1987): cellular morphology in Yeast Morphology Agar and assimilation of D-lactose, D-maltose, D-raffinose, D-ellulose, D-sucrose and D-xylose in Yeast Nitrogen Base (BD Difco, New Jersey, USA).

### 2.2. DNA isolation

Pure cultures of each yeast strain were grown in 10 ml of YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 25 °C for 48 h at 250 rpm on an orbital shaker. DNA was isolated according to the method of Querol et al. (1992). The DNA concentration was spectrophotometrically quantified and brought to a final value of 100 ng/μl.

### 2.3. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers (ITS) and the 5.8S rDNA region

The amplification of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region was carried out under the following conditions: each 50 μl reaction mixture containing 200 ng template DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 2.8 mM MgCl<sub>2</sub> 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 200 ng of each primer; and 1 U Taq DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). The primers were ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') as described by White et al. (1990). Amplification was performed in a Thermal cycler of Bio Rad (mod. iCycler 170-8731) using an initial denaturation during 5 min at 94 °C followed by 40 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C and 2 min at 72 °C. A final step of 5 min at 72 °C was carried out.

Table 2  
RAPD-PCR conditions with the M13 minisatellite primer and the microsatellite primers (GACA)<sub>4</sub>, (GAC)<sub>5</sub> and (GTG)<sub>5</sub>

Primer	Initial denaturation	Cycles	Cycles conditions		
			Denaturation	Primer annealing	Extension
M13	94 °C, 3 min	30	94 °C, 45 s	50 °C, 1 min	60 °C, 3 min
(GACA) <sub>4</sub>	–	30	94 °C, 1 min	36 °C, 1 min	55 °C, 5 min
(GAC) <sub>5</sub>	–	30	94 °C, 1 min	36 °C, 1 min	55 °C, 5 min
(GTG) <sub>5</sub>	94 °C, 5 min	30	94 °C, 30 s	45 °C, 1 min	60 °C, 5 min

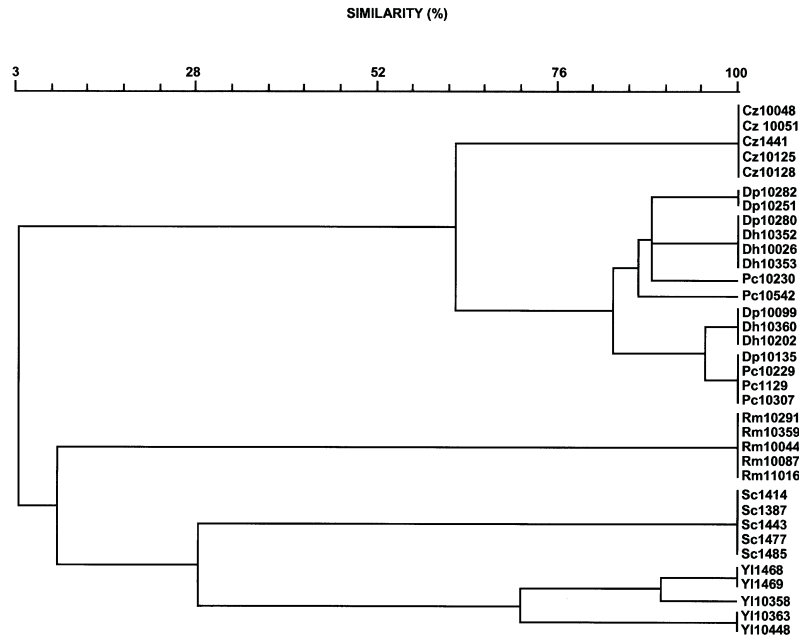


Fig. 1. Dendrogram based on the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 restriction profiles obtained by digestion with *Taq*I, *Sau*3AI and *Hae*III of different strains of the yeasts *C. zeylanoides* (Cz), *D. polymorphus* (Dp), *D. hansenii* (Dh), *P. carsonii* (Pc), *S. cerevisiae* (Sc), *Y. lipolytica* (Yl) and *R. mucilaginosa* (Rm). Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0–100%).

Amplification products were separated by electrophoresis in 1% agarose gels and detected by staining with ethidium bromide (0.5 µg/ml).

For RFLP analysis, 11.5 µl PCR products were digested with 2 U of restriction enzymes *Taq*I, *Sau*3AI and *Hae*III (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) in 15 µl reaction volume, using

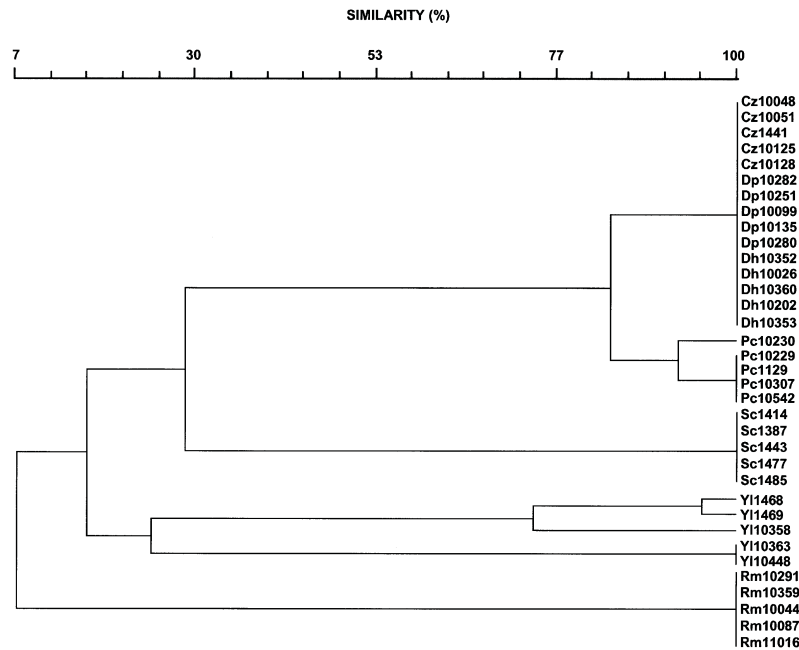


Fig. 2. Dendrogram based on the 18S rDNA restriction profiles obtained by digestion with *Hae*III, *Rsa*I and *Taq*I of different strains of the yeasts *C. zeylanoides* (Cz), *D. polymorphus* (Dp), *D. hansenii* (Dh), *P. carsonii* (Pc), *S. cerevisiae* (Sc), *Y. lipolytica* (Yl) and *R. mucilaginosa* (Rm). Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0–100%).

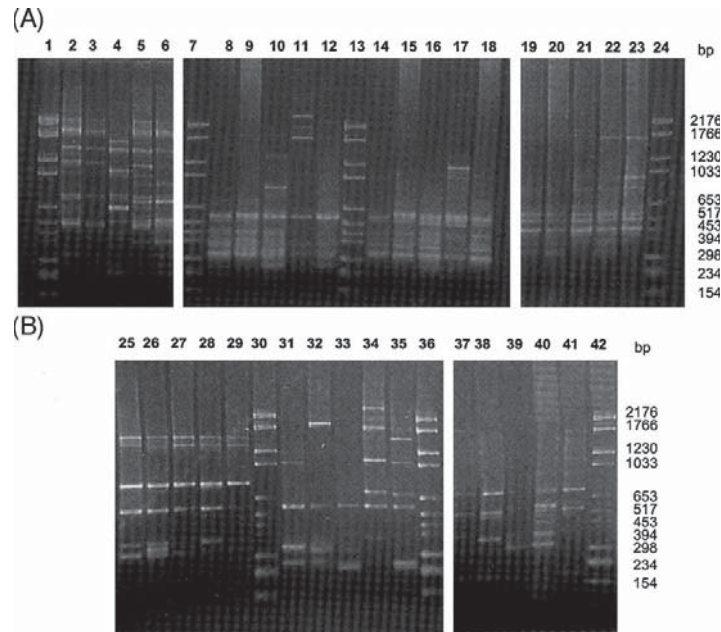


Fig. 3. PCR-fingerprinting patterns obtained with primer M13 from *Y. lipolytica*, *D. polymorphus*, *P. carsonii* and *R. mucilaginosa* (A) and *C. zeylanoides*, *D. hansenii* and *S. cerevisiae* (B). Lanes 1, 7, 13, 24, 30, 36 and 42: DNA molecular size marker of 2.1–0.15 kbp; lane 2: CECT 1468; lane 3: CECT 1469; lane 4: CECT 10358; lane 5: CECT 10363; lane 6: CECT 10448; lane 8: CECT 10282; lane 9: CECT 10251; lane 10: CECT 10099; lane 11: CECT 10135; lane 12: CECT 10280; lane 14: CECT 10230; lane 15: CECT 10229; lane 16: CECT 1129; lane 17: CECT 10307; lane 18: CECT 10542; lane 19: CECT 10291; lane 20: CECT 10359; lane 21: CECT 10044; lane 22: CECT 10087; lane 23: CECT 11016; lane 25: CECT 10048; lane 26: CECT 10051; lane 27: CECT 1441; lane 28: CECT 10125; lane 29: CECT 10128; lane 31: CECT 10352; lane 32: CECT 10026; lane 33: CECT 10360; lane 34: CECT 10202; lane 35: CECT 10353; lane 37: CECT 1414; lane 38: CECT 1387; lane 39: CECT 1443; lane 40: CECT 1477; lane 41: CECT 1485.

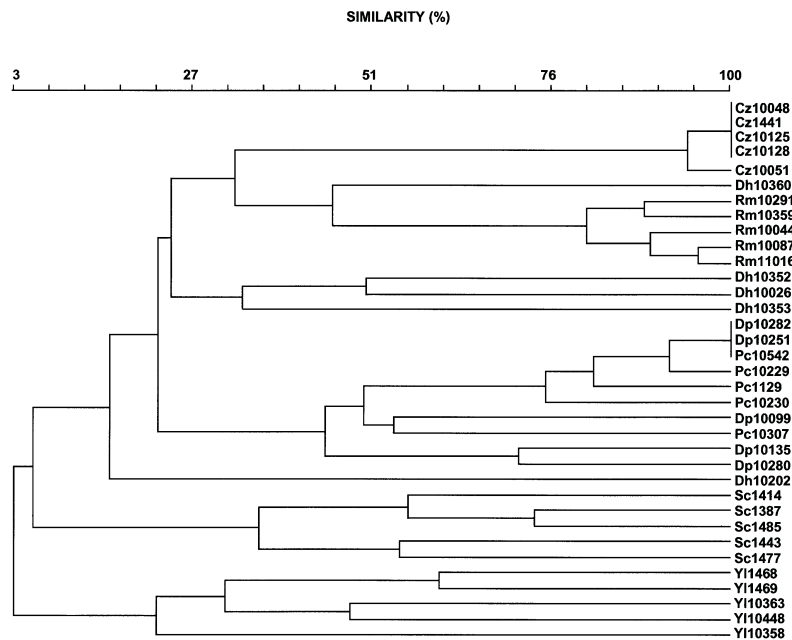


Fig. 4. Dendrogram based on the PCR-fingerprinting patterns obtained with primer M13 of different strains of the yeasts *C. zeylanoides* (Cz), *D. polymorphus* (Dp), *D. hansenii* (Dh), *P. carsonii* (Pc), *S. cerevisiae* (Sc), *Y. lipolytica* (Yl) and *R. mucilaginosa* (Rm). Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0–100%).

the manufacturer's instructions and conditions. The resulting fragments were separated on 2.5% agarose gels in 1XTAE buffer at 70 V for 1.5 h. The gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), the products were visualized by U.V. transillumination and photographed. A DNA molecular size marker of 2.1–0.15 kbp from Roche (Roche Farma, IN, USA) was used to determine the size of the PCR products. Electrophoretic patterns were compared using ID Image Analysis Software (Kodak Digital Science, Rochester, NY, USA).

Similarities among isolates were estimated using the DICE coefficient and clustering was based on the UPGMA method (NTSYS-Pc version 2.0).

#### 2.4. RFLP analysis of the 18S rDNA

The 18S rDNA was amplified using the primers P108 (5'ACCTGGTTGATCCTGCCAGT3') and M3989 (5'CTACGGAAACCTCTACGGAAACCTTGTTACGACT3') described by James et al. (1994).

The reaction was performed in a total volume of 50 µl, containing 50 ng of DNA, 10 mM Tris–HCl, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U of Taq polymerase (Finnzymes) and 100 ng of the above primers. The reactions were incubated in a Thermal Cycler of Bio Rad (mod. iCycler 170-8731), using an initial denaturation during 3 min at

94 °C followed by 29 cycles consisting of 1 min at 92 °C, 1 min at 47 °C and 5 min at 58 °C. A final step of 5 min at 58 °C was carried out. Amplification products were separated by electrophoresis in 1% agarose gels and detected by staining with ethidium bromide (0.5 µg/ml).

The PCR products were digested with the restriction enzymes *Hae*III, *Rsa*I and *Taq*I following the supplier's instructions. The resulting fragments were separated on 2.5% agarose gels in 1XTAE buffer at 70 V for 1.5 h. Gel analysis was done as described above.

#### 2.5. RAPD-PCR

For RAPD-PCR the M13 minisatellite primer (5'GAGGG-TGGCGTTCT3') (Huey and Hall, 1989) and the microsatellite primers (GACA)<sub>4</sub>, (GAC)<sub>5</sub> and (GTG)<sub>5</sub> were used. Amplification reaction was performed in a total volume of 50 µl, containing 200 ng of DNA, 10 mM Tris–HCl, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U of Taq polymerase (Finnzymes) and 100 ng of primer. The thermal cycler was programmed for the above primers as it is indicated in Table 2. PCR products were separated on 1% agarose gels using 1XTAE buffer at 70 V for 1.5 h. The gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml) and analyzed as described above. The size of the amplification products were determined

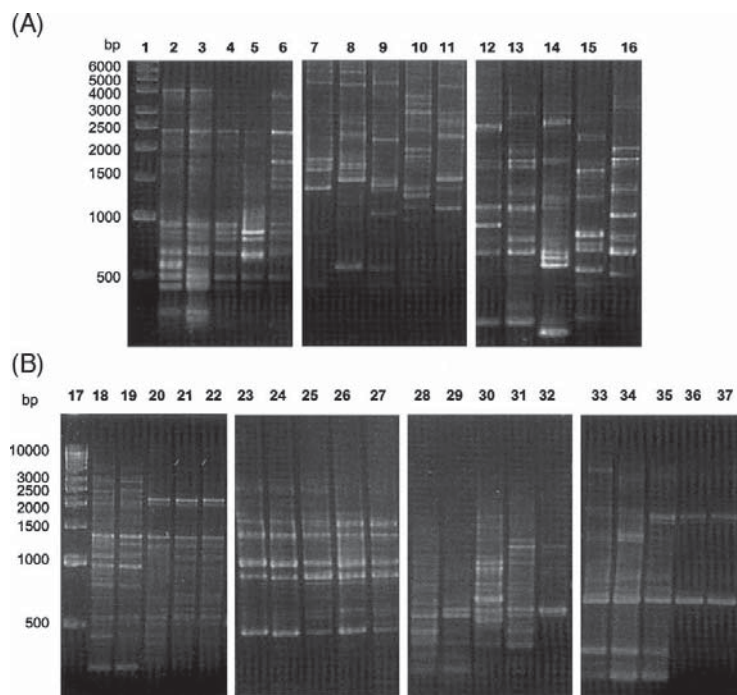


Fig. 5. PCR-fingerprinting patterns obtained with primer (GACA)<sub>4</sub> from *C. zeilanooides*, *D. polymorphus* and *D. hansenii* (A) and *R. mucilaginoso*, *P. carsonii*, *Y. lipolytica* and *S. cerevisiae* (B). Lanes 1 and 17: DNA molecular size marker of 10–0.5 kbp; lane 2: CECT 10048; lane 3: CECT 10051; lane 4: CECT 1441; lane 5: CECT 10125; lane 6: CECT 10128; lane 7: CECT 10282; lane 8: CECT 10251; lane 9: CECT 10099; lane 10: CECT 10135; lane 11: CECT 10280; lane 12: CECT 10352; lane 13: CECT 10026; lane 14: CECT 10360; lane 15: CECT 10202; lane 16: CECT 10353; lane 18: CECT 10291; lane 19: CECT 10359; lane 20: CECT 10044; lane 21: CECT 10087; lane 22: CECT 11016; lane 23: CECT 10230; lane 24: CECT 10229; lane 25: CECT 11129; lane 26: CECT 10307; lane 27: CECT 10542; lane 28: CECT 10363; lane 29: CECT 1469; lane 30: CECT 10358; lane 31: CECT 10363; lane 32: CECT 10448; lane 33: CECT 1414; lane 34: CECT 1387; lane 35: CECT 1443; lane 36: CECT 1477; lane 37: CECT 1485.

with a DNA molecular size marker of 10.0–0.5 kbp from Amersham Biosciences.

### 2.6. Mitochondrial DNA restriction patterns

The reactions were performed overnight at 37 °C and prepared for a final volume of 15 µl as follows: 5 µl of DNA obtained according to Querol et al. (1992), 20 U of the restriction enzyme *Hae*III and 1.5 µl of 10× buffer. The restriction fragments were separated on a 0.7% agarose gel in 1XTAE buffer at 45 V for 3 h. Gel analysis was done as described above.

## 3. Results

### 3.1. Identification by RFLP of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2

Amplification of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region resulted for all strains tested in a single fragment with a molecular size of approximately 650 bp, except for *S. cerevisiae* that the only amplified fragment was of approximately 850 bp (results not included). After digestion with the restriction enzymes the strains tested showed different fragment sizes, ranging from approximately 415 to 100 bp with enzyme *Hae*III, 445 to 166 bp with *Sau*3AI and 315 to 90 bp with *Taq*I. Fig. 1 shows the dendrogram constructed for the 35 yeast strains tested based on their RFLP analysis of the restriction profiles obtained from the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 with the above enzymes. A similarity higher than 80% was observed for species *D. hansenii*, *D.*

*polymorphus* and *P. carsonii*. *C. zeylanoides* showed a similarity of about 60% with the former species. Only *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* and *Y. lipolytica* showed very low similarity with any other species (always lower than 30%) (Fig. 1). No differences were observed among strains of the same species in *C. zeylanoides*, *R. mucilaginosa* and *S. cerevisiae*. Minimal differences at strain level were found in the species *P. carsonii*, *Y. lipolytica*, *D. polymorphus* and *D. hansenii*.

### 3.2. Identification by RFLP of the 18S rDNA

Amplification of the 18S rDNA resulted for all strains tested in a single fragment with a molecular size of approximately 1800 bp. The RFLP analysis yielded fragments ranging from 465 to 125 bp with enzyme *Hae*III, 1000 to 95 bp with enzyme *Rsa*I and 1260 to 170 bp with enzyme *Taq*I. Fig. 2 depicts the dendrogram derived from the combined RFLP analysis with the above three restriction enzymes. *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* and *Y. lipolytica* showed low values of similarity (always lower than 30%). However, the remaining species showed a similarity higher than 80% and *D. polymorphus*, *D. hansenii* and *C. zeylanoides* cannot be distinguished (Fig. 2). At strain level, only differences among strains of *Y. lipolytica* and *P. carsonii* were found.

### 3.3. RAPD-PCR with minisatellite M13

The RAPD with M13 primer yield band profiles of 4 to 20 bands for the strains assayed ranging from approximately 2100

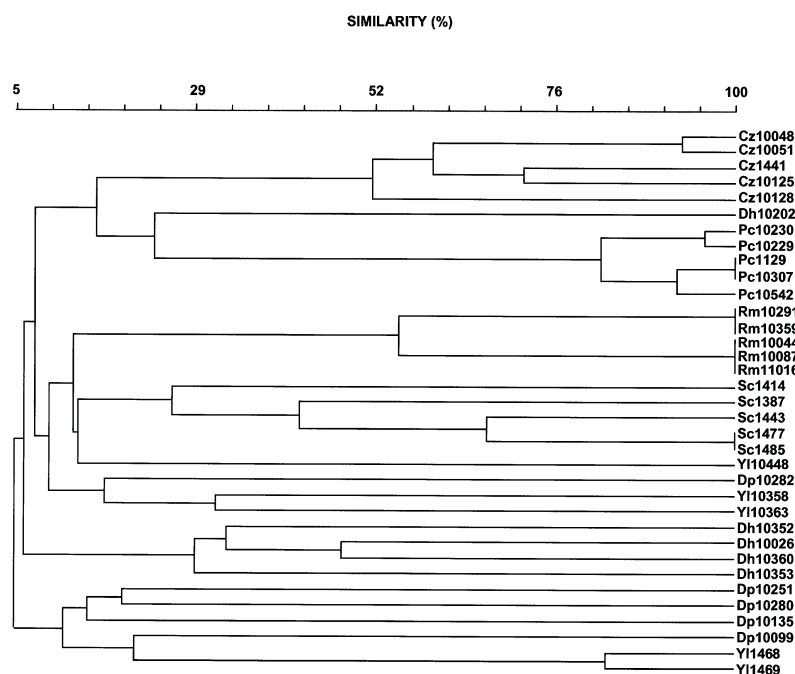


Fig. 6. Dendrogram based on the PCR-fingerprinting patterns obtained with primer (GACA)<sub>4</sub> of different strains of the yeasts *C. zeylanoides* (Cz), *D. polymorphus* (Dp), *D. hansenii* (Dh), *P. carsonii* (Pc), *S. cerevisiae* (Sc), *Y. lipolytica* (Yl) and *R. mucilaginosa* (Rm). Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0–100%).



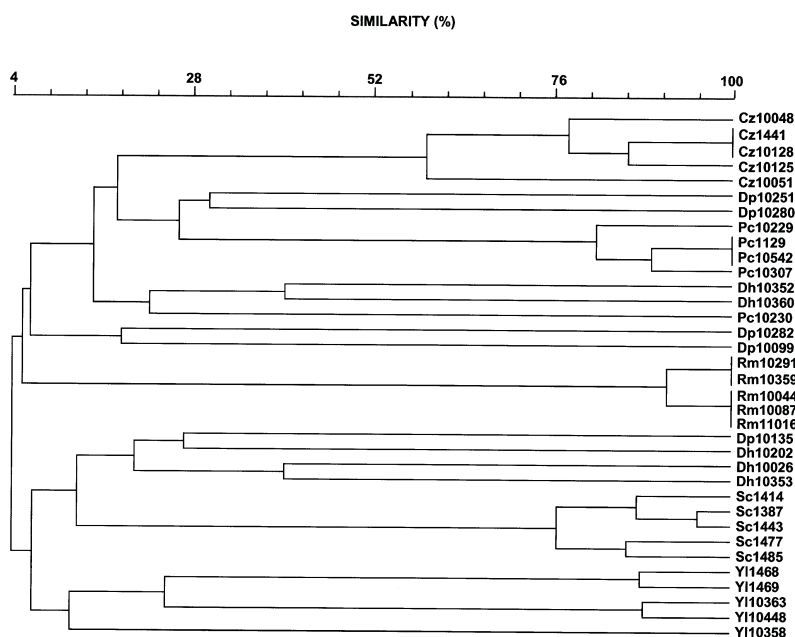


Fig. 7. Dendrogram based on the PCR-fingerprinting patterns obtained with primer (GTG)<sub>5</sub> of different strains of the yeasts *C. zeylanoides* (Cz), *D. polymorphus* (Dp), *D. hansenii* (Dh), *P. carsonii* (Pc), *S. cerevisiae* (Sc), *Y. lipolytica* (Yl) and *R. mucilaginosa* (Rm). Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0–100%).

to 160 bp. (Fig. 3). Different patterns were generated for each of the 7 species tested, except for *D. polymorphus* and *P. carsonii*, which showed similar band profiles for some of their

strains. Most of the strains tested for these two species showed a similarity higher than 75% (Fig. 4). At the strain level, different polymorphisms were observed in the different species

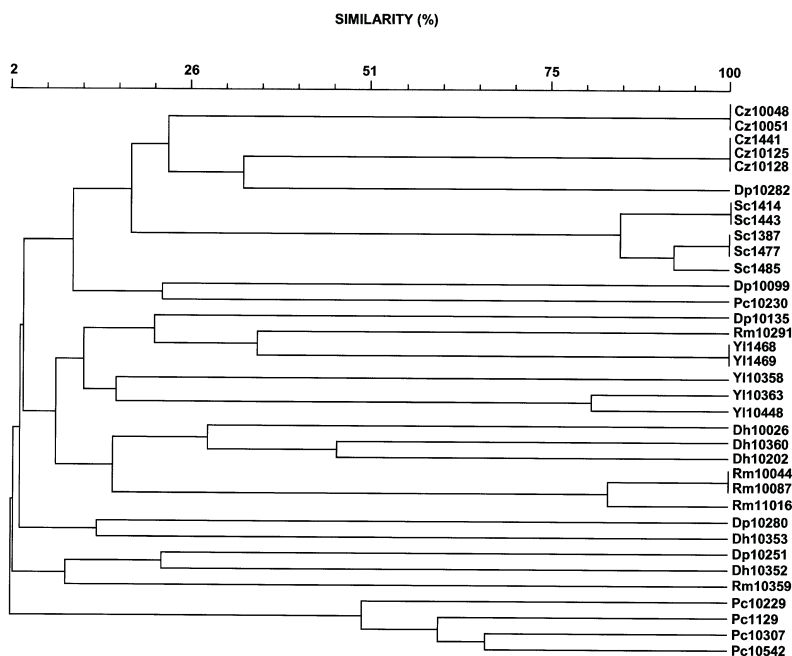


Fig. 8. Dendrogram based on the PCR-fingerprinting patterns obtained with primer (GAC)<sub>5</sub> of different strains of the yeasts *C. zeylanoides* (Cz), *D. polymorphus* (Dp), *D. hansenii* (Dh), *P. carsonii* (Pc), *S. cerevisiae* (Sc), *Y. lipolytica* (Yl) and *R. mucilaginosa* (Rm). Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0–100%).

tested. However, these differences are very low for strains of *C. zeylanoides* and *R. mucilaginosa*, which showed a similarity higher than 80% (Fig. 4).

### 3.4. RAPD-PCR with microsatellites

The RAPD-PCR patterns of the 7 species tested using primer (GACA)<sub>4</sub> are shown in Fig. 5. Patterns obtained, ranging from 5900 to 150 bp, showed great differences at species level, with similarities always lower than 25% for all the species tested (Fig. 6). At strain level, a similarity lower than 50% was observed for strains tested of *D. hansenii* and *D. polymorphus*. The remaining species showed similarities higher than 50% for most of the strains tested. Very low polymorphisms were found in the strains tested for *R. mucilaginosa* and *P. carsonii*. In the last species all the strains showed a similarity higher than 80% (Fig. 6).

The RAPD analyses with primers (GTG)<sub>5</sub> and (GAC)<sub>5</sub> showed differences at species level for all species tested. As exhibited in the dendrograms obtained from the band patterns (Figs. 7 and 8), the similarity among strains of the different species was always lower than 50%. However, at strain level no relevant differences were observed within all species tested with primer (GTG)<sub>5</sub>. Thus, a similarity higher than 75% was

observed for most of the strains of *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, *P. carsonii* and *C. zeylanoides* (Fig. 7). With primer (GAC)<sub>5</sub> a high similarity was observed for all of the strains of *S. cerevisiae* and for most of the strains of *R. mucilaginosa* and *C. zeylanoides* (Fig. 8).

### 3.5. Mitochondrial DNA RFLP

Fig. 9 shows the mtDNA restriction profiles obtained for the 35 strains tested by using the restriction enzyme *Hae*III. The band patterns obtained showed great differences at species level, with similarities always lower than 25% (Fig. 10). At strain level, similarities lower than 30% were found for the strains tested within the species *D. polymorphus*, *D. hansenii* and *S. cerevisiae* (Fig. 10). In every one of the species *P. carsonii*, *C. zeylanoides* and *Y. lipolytica* were found with two band profiles clearly differentiated, since the similarity between them was always lower than 30%. However, no differences were found among the strains of *R. mucilaginosa*.

## 4. Discussion

This study presents a contribution to the characterization of inter- and intraspecific variation of yeasts species belonging to

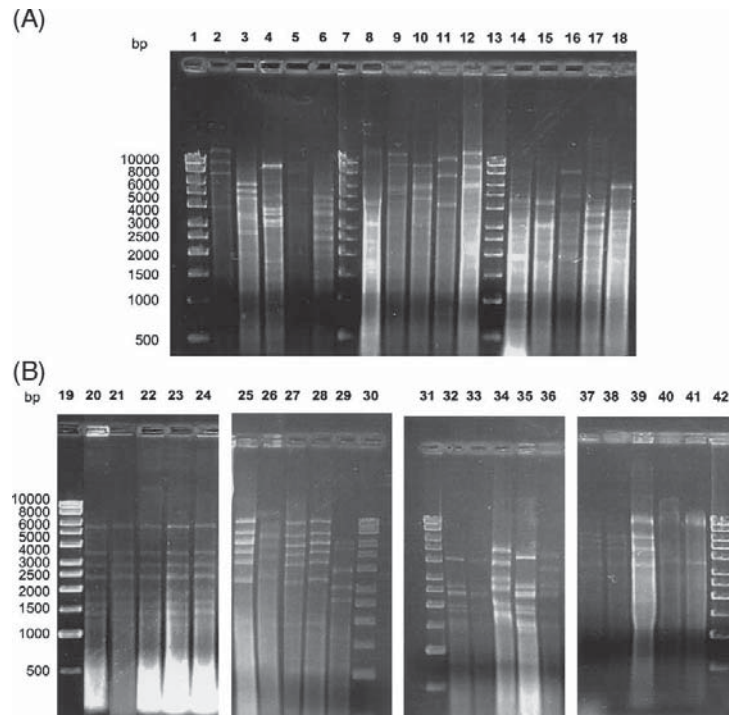


Fig. 9. Mitochondrial DNA restriction profiles with enzyme *Hae*III of *D. polymorphus*, *D. hansenii* and *S. cerevisiae* (A) and *R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica*, *C. zeylanoides* and *P. carsonii* (B). Lanes 1, 7, 13, 19, 30, 31 and 42: DNA molecular size marker of 10–0.5 kbp; lane 2: CECT 10282; lane 3: CECT 10251; lane 4: CECT 10099; lane 5: CECT 10135; lane 6: CECT 10280; lane 8: CECT 10352; lane 9: CECT 10026; lane 10: CECT 10360; lane 11: CECT 10202; lane 12: CECT 10353; lane 13: DNA molecular size marker of 10–0.5 kbp; lane 14: CECT 1414; lane 15: CECT 1387; lane 16: CECT1443; lane 17: CECT 1477; lane 18: CECT 1485; lane 20: CECT 10291; lane 21: CECT 10359; lane 22: CECT 10044; lane 23: CECT 10087; lane 24: CECT 11016; lane 25: CECT 10363; lane 26: CECT 1469; lane 27: CECT 10358; lane 28: CECT 10363; lane 29: CECT 10448; lane 32: CECT 10048; lane 33: CECT 10051; lane 34: CECT 1441; lane 35: CECT 10125; lane 36: CECT 10128; lane 37: CECT 10230; lane 38: CECT 10229; lane 39: CECT 1129; lane 40: CECT 10307; lane 41: CECT 10542.

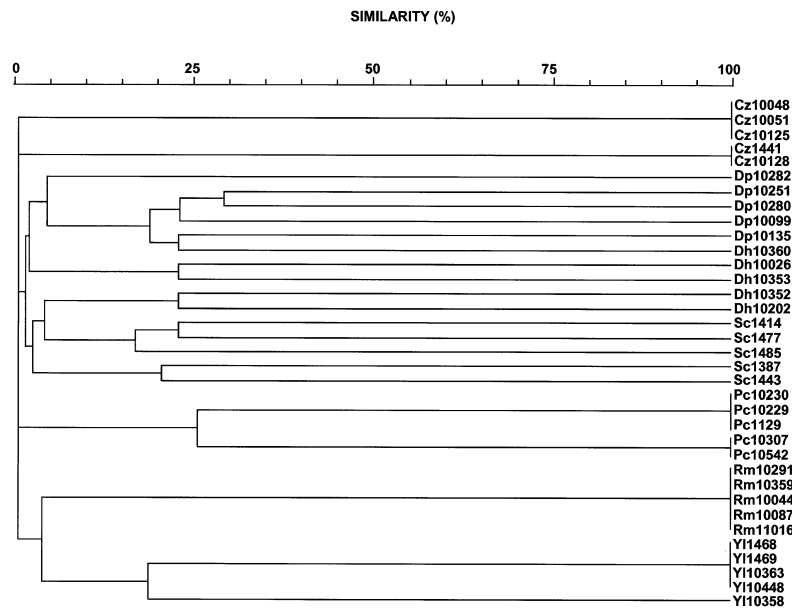


Fig. 10. Dendrogram based mitochondrial DNA restriction profiles obtained by digestion with *Hae*III of different strains of the yeasts *C. zeylanoides* (Cz), *D. polymorphus* (Dp), *D. hansenii* (Dh), *P. carsonii* (Pc), *S. cerevisiae* (Sc), *Y. lipolytica* (Yl) and *R. mucilaginosa* (Rm). Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0–100%).

dry-cured meat products. RFLP analysis of the ITS-5.8S rDNA-ITS2 region did not allow the separation of *D. hansenii*, *D. polymorphus* and *P. carsonii*. Only *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* and *Y. lipolytica* could be clearly differentiated from each other. In addition, this technique did not allow differentiation of strains within each species. RFLP of the ITS-5.8S rDNA-ITS2 has been reported as a rapid and easy method for the differentiation of several yeasts species, most of them related to *Saccharomyces* species (Guillamón et al., 1997; Dlačny et al., 1999; Jespersen et al., 2000). However, Naumova et al. (2003) observed that this method could discriminate some yeasts species only when many restriction enzymes are used. In the present work, this method allowed differentiation of only some yeasts species. Thus, this method has not enough sensitivity to be used as a routine analysis to discriminate yeasts species related to dry-cured meat products. Probably it is necessary to combine this method with sequence analysis of the ITS-5.8S rDNA-ITS2 region as the best means of reliable identification of yeasts as has been proposed by Las Heras-Vazquez et al. (2003).

The RFLP of the 18S rDNA region allowed discrimination of the same species differentiated by RFLP of the ITS-5.8S rDNA-ITS2: *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* and *Y. lipolytica*. However, no differences were found among *D. hansenii*, *D. polymorphus* and *C. zeylanoides*. In addition, minimal differences at the strain level were found for all of the species tested. Results found in the literature about suitability of RFLP of the 18S rDNA are contradictory. Thus, this method has been also reported as nonsuitable for the differentiation of yeasts from the genus *Saccharomyces* (Tornai-Lehoczki and Dlačny, 2000) while it has been proven as useful technique for

discriminating several yeasts species such as *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Kloeckera apiculata* and *Schizosaccharomyces pombe* (Capece et al., 2003). From our results, this method is not adequate as routine method analysis to discriminate yeasts species related to dry-cured meat products.

RAPD-PCR with M13 primer was found to be useful for the differentiation of *R. mucilaginosa*, *C. zeylanoides*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii* and *S. cerevisiae*. However, no differences were observed between *D. polymorphus* and *P. carsonii*. Contrary to previous report (Prillinger et al., 1999; Andrighetto et al., 2000), we did not find RAPD analysis suitable for discrimination of all of the species tested. However, our results agree with the data found by Vasdinyei and Deák (2003) in that RAPD using a M13 primer did not discriminate the most frequently yeasts species found in dairy products.

RAPD analysis with microsatellite primers (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> and (GAC)<sub>5</sub> enabled discrimination at species and strain level. However, the degree of discrimination by means of RAPD-PCR depends highly on the primers used. Thus, the PCR fingerprinting with primer (GACA)<sub>4</sub> enabled a higher level of discrimination than primers (GAC)<sub>5</sub> and (GTG)<sub>5</sub>. Although primer (GACA)<sub>4</sub> is not usual in RAPD analysis of yeasts, a high discrimination level at species and strain level was reported for several yeasts species (Lieckfeldt et al., 1993; Casali et al., 2003). The only problem for primer (GACA)<sub>4</sub> was the high similarity for strains of *P. carsonii* tested that do not allow a reliable differentiation at strain level within this species.

The RFLP analysis of mtDNA allowed the discrimination at the species and strain level except for *R. mucilaginosa*, where no polymorphisms were observed in the strains tested. This

technique has been reported as a very good tool for the differentiation of yeasts species related to wine making (Esteve-Zarzoso et al., 2000; Fernández-Espinar et al., 2001) and spoilage yeasts of the genus *Zygosaccharomyces* (Guillamón et al., 1997). Since this method yielded polymorphisms in all species tested except *R. mucilaginosa* and RAPD analysis with primer (GACA)<sub>4</sub> gives different band patterns in all species except *P. carsonii*, both methods could be used as complementary techniques to differentiate yeasts related to dry-cured meat products. The results presented here highlighted how the molecular methods tested give different levels of discrimination, but this should be validated with a higher number of strains.

In conclusion RAPD analysis with primer (GACA)<sub>4</sub> and the restriction analysis of mtDNA used in the present work are useful for the differentiation at species and strain level of yeasts related to dry-cured meat products. For maximum discriminatory power of these types of yeast, both methods should be used. These techniques should be used to discriminate yeasts species usually found in dry-cured meat products. Furthermore, since differences at strain level were found, both methods are useful to differentiate yeasts used as starter cultures in dry-cured meat products.

#### Acknowledgements

This work is part of the project AGL01-0804 funded by the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. M. J. Andrade was the recipient of a Grant of the Regional Government of Junta de Extremadura (Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología).

#### References

- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., Lombardi, A., 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology* 30, 5–9.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 1990. *Yeasts: Characteristics and Identification* (2nd edn.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Capece, A., Salzano, G., Romano, P., 2003. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *International Journal of Food Microbiology* 84, 33–39.
- Casali, A.K., Goulart, L., Kmetzsh, L., Ribeiro, A.M., Amaral, A.A., Alves, S.H., Schrank, A., Meyer, W., Vainstein, M.H., 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research* 3, 405–415.
- Deák, T., Beuchat, L.R., 1987. Identification of foodborne yeasts. *Journal of Food Protection* 50, 243–264.
- Deák, T., Chen, J., Beuchat, L.R., 2000. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4340–4344.
- Diriye, F.U., Scorzetti, G., Martini, A., 1993. Methods for the separation of yeast cells from the surfaces of processed frozen foods. *International Journal of Food Microbiology* 19, 27–37.
- Dlauchy, D., Tornai-Lehoczki, J., Peter, G., 1999. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 445–453.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., 2000. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the “El Penedés” area (Spain). *Food Microbiology* 17, 553–562.
- Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* 70, 1–10.
- Fleet, G.H., 1990. Yeast in dairy products — a review. *Journal of Applied Microbiology* 69, 199–211.
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A., 1997. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions. *Archives of Microbiology* 169, 387–392.
- Huey, B., Hall, J., 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. *Journal of Bacteriology* 171, 2528–2532.
- Ismail, S.A.S., Deák, T., Abd-Rahman, H.A., Yassien, M.A.M., Beuchat, L.R., 2000. Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology* 62, 113–121.
- James, S.A., Collins, M.D., Roberts, I.N., 1994. Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Yeast* 10, 871–881.
- Jespersen, L., Kühle, A., Petersen, K.M., 2000. Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 60, 43–53.
- Las Heras-Vazquez, F.J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jiménez, J.M., Rodríguez-Vico, F., 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research* 3, 3–9.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W., Borner, T., 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology* 33, 413–426.
- López-Coronado, J.M., 2002. Catalogue of Spanish Type Culture Collection. Available at: <http://www.uv.es/ccct/>.
- Loureiro, V., Querol, A., 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science and Technology* 10, 356–365.
- Martínez, J., Wrent, P., Quirós, M., Sotoca, R., Silóniz, M.I., Valderrama, M.J., 2004. Spoilage of sausages by gas producing yeasts. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 193, 72–78.
- Naumova, E.S., Korshunova, I.V., Jespersen, L., Naumov, G.I., 2003. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Research* 3, 177–184.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E., Asensio, M.A., 1996. Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology* 29, 271–280.
- Petersen, K.M., Moller, P.L., Jespersen, L., 2001. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69, 11–24.
- Petersen, K.M., Westall, S., Jespersen, L., 2002. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses. *Journal of Dairy Science* 85, 478–486.
- Prillinger, H., Molnar, O., Eliskases-Lechner, F., Lopandic, K., 1999. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 267–283.
- Querol, A., Ramón, D., 1996. The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends in Food Science and Technology* 7, 73–78.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1992. A comparative study of different methods of yeast strains characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 439–446.
- Romano, A., Casaregola, S., Torre, P., Gaillardin, C., 1996. Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 255–264.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., Casal, M., 2004. Survey of molecular methods for typing wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters* 231, 19–26.
- Tornai-Lehoczki, J., Dlauchy, D., 2000. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* 62, 37–45.

- Vasdinyei, R., Deák, T., 2003. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology* 86, 123–130.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 317.
- Yamamoto, N., Anemiyama, H., Yokomori, Y., Shimizu, K., Totusuka, A., 1991. Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 358–363.



**III.2. Efficiency of mitochondrial DNA restriction analysis and RAPD-PCR to characterize yeasts growing on dry-cured Iberian ham at the different geographic areas of ripening**





**Efficiency of mitochondrial DNA restriction analysis and RAPD-PCR to characterize yeasts growing on dry-cured Iberian ham at the different geographic areas of ripening**

María J. Andrade, Mar Rodríguez, Eva Casado, Juan J. Córdoba\*

Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n. 10071-Cáceres, Spain.

\*Corresponding author: Telephone: (+34) 927 257 125; fax: (+34) 927 257 110

E-mail: [jcordoba@unex.es](mailto:jcordoba@unex.es)

URL: <http://higiene.unex.es/>

**Abstract**

The efficiency of mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis and random amplification of polymorphic DNA (RAPD)-PCR to characterize yeasts growing on dry-cured Iberian ham was evaluated. Besides, the distribution of the main species and biotypes of yeasts in the different ripening areas of this product was investigated. MtDNA restriction analysis allowed yeast characterization at species and strain level. RAPD-PCR with the primers (GACA)<sub>4</sub> and (GAC)<sub>5</sub> was inappropriate for characterization at species level. Most of the mtDNA restriction patterns detected in dry-cured Iberian ham were consistent with *Debaryomyces hansenii*. Several yeasts biotypes were associated to specific geographic areas of dry-cured Iberian ham ripening.

**Keywords:** yeasts; dry-cured Iberian ham; molecular characterization

## 1. Introduction

Dry-cured Iberian ham is highly appreciated for its organoleptic characteristics. During its long ripening period (18-24 months), different microbial groups grow on the hams. Yeasts are predominant among these microorganisms throughout most of the ripening process (Núñez, Rodríguez, Córdoba, Bermúdez & Asensio, 1996). *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides* have been reported to be the most abundant yeast species in this product (Núñez et al., 1996). A wide variety of biotypes of the above species is found in dry-cured Iberian ham, which is associated primarily with the geographic location of ripening (Núñez et al., 1996).

Some studies carried out with different yeast strains have shown that they contribute to the development of the characteristic flavor of dry-cured meat products (Jessen, 1995; Durá, Flores & Toldrá, 2004; Martín, Córdoba, Aranda, Córdoba & Asensio, 2006). Furthermore, differences in flavor development related to particular yeast species and strains growing on hams have recently been reported (Andrade Córdoba, Sánchez, Casado & Rodríguez, 2009). Appropriate methods are needed to differentiate at species and strain level autochthonous yeasts that contribute in the generation of volatile compounds responsible for the flavor of dry-cured Iberian ham. These methods may allow to know the distribution of particular strains associated with processing areas and could be very useful to differentiate yeast strains selected as starter cultures.

Yeast characterization has been based traditionally on morphologic, physiologic, and biochemical criteria (Kreger-van Rij, 1984; Kurtzman & Fell, 1998). These techniques are laborious and can produce dubious results. These difficulties have encouraged the use of molecular techniques as powerful tools for characterizing yeasts. Molecular techniques based on sequencing the DNA regions that encode ribosomal RNA genes, such as 18S and 26S ribosomal DNA (rDNA), have proved to be reliable methods for identifying yeasts detected in food products (Kurtzman & Robnett, 1998; Cappa & Cocconcelli, 2001; Lopandic, Zelger, Bánszky, Eliskases-Lechner & Prillinger, 2006; Oguntoyinbo, 2008). However, they are not appropriate as routine analytical methods for yeast differentiation. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)-PCR and mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis have been used to characterize yeasts of industrial importance, mainly strains of the genus *Saccharomyces* isolated from wine (Querol, Barrio & Ramón, 1992; Lieckfeldt, Meyer & Börner, 1993; Baleiras Couto,

Eijsma, Hofstra, Huis in't Veld & van der Vossen, 1996a; Torriani, Zapparoli & Suzzi, 1999; Nikolaou, Andrighetto, Lombardi, Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2007). These techniques may be used for the routine analysis of yeast strains that grow in dry-cured meat products. However, the efficiency of both methods to differentiate yeast strains usually found in these products has not been tested.

The aim of this work was to evaluate the efficiency of mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR to characterize yeasts that usually grow on dry-cured Iberian ham at species and strain level. In addition, the distribution of the main species and strains of yeasts in the Spanish Protected Designation of Origin (PDO) of dry-cured Iberian ham processing was investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strains

For this study, a total of 371 yeast isolates were obtained from the surface of dry-cured Iberian hams at different stages of ripening. These strains were aseptically taken from hams belonging to 5 industries each of the 4 PDO of dry-cured Iberian ham ("Guijuelo" PDO, "Jamón de Huelva" PDO, "Dehesa de Extremadura" PDO and "Los Pedroches" PDO). Each superficial sample was homogenized in a stomacher using 0.1% w/v peptone water as diluent. Further decimal dilutions were made with the same diluent and 0.1 mL portions were spread onto the surface of Dichloran 18% Glycerol (DG18, Oxoid, Cambridge, UK) agar plates. They were incubated at 25°C for 5 days.

In addition, 35 yeast reference strains provided by the Spanish Type Culture Collection (CECT), belonging to *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Pichia carsonii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* and *Saccharomyces cerevisiae* (Table 1), were used for comparative characterization. All of these strains were purified on repeated cultivation on malt extract agar (2% malt extract, 2% glucose, 0.1% peptone, 2% agar) at 25°C and maintained at -80°C in malt extract broth (2% malt extract, 2% glucose, 0.1% peptone) containing 20% v/v glycerol, until analysis.

### 2.2. DNA isolation and mtDNA restriction analysis

DNA extraction from the yeast isolates was based on the method described by Querol et al. (1992) with minor modifications. MtDNA restriction analysis was carried out

according to Andrade, Rodríguez, Sánchez, Aranda & Córdoba (2006). Yeast DNA was digested using the restriction endonuclease *Hae*III (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's instructions and conditions. Restriction fragments were separated on 0.8% w/v agarose gels by electrophoresis, using 1 x TAE buffer. The gels were stained with an ethidium bromide solution (0.5 µg/mL), visualized under UV light and photographed (Kodak Digital Science, Rochester, NY, USA). The size of the fragments was determined with a DNA molecular size marker of 10.0-0.5 kbp from Amersham Biosciences.

### 2.3. RAPD-PCR

RAPD-PCR profiles were generated using the microsatellite primers (GACA)<sub>4</sub> and (GAC)<sub>5</sub>, as previously described by Andrade et al. (2006). PCR was performed in a Thermal cycler of Bio Rad (mod. iCycler 170-8731). Reaction products were analyzed by electrophoresis in 1% w/v agarose gels and stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL). A DNA molecular size marker of 2.1-0.15 kbp from Roche (Roche Farma, IN, USA) and other of 10.0-0.5 kbp from Amersham Biosciences were used to determine the size of the PCR products.

### 2.4. Sequencing of 18S rDNA gene

Representative members of the mtDNA restriction and RAPD-PCR profiles of yeasts were identified by 18S rDNA sequencing.

The oligonucleotide primers P108 (5'ACCTGGTTGATCCTGCCAGT3') and M3989 (5'CTACGGAAACCTCTACGGAAACCTTGTTACGACT3') described by James, Collins & Roberts (1994) were used to amplify the 18S rDNA region in accordance with the conditions previously reported by Andrade et al. (2006). PCR amplification was confirmed in 1% w/v agarose gels. The PCR products were purified using the MinElute® PCR Purification Kit, following the manufacturer's instructions (QIAGEN, Hilden, Germany) and submitted for sequencing at Instituto de Biomedicina (CSIC, Valencia, Spain), with the same primers used in the amplification steps. The sequences of 18S rDNA gene were used in a similarity search by means of the BLAST program from the GenBank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Yeast isolates were ascribed to species showing the highest sequence identity (higher than 99%).

### 2.5. Data analysis

The similarity dendrograms were built using the Dice coefficient and clustering analysis was based on the unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA method) (NTSYS-Pc version 2.0) for mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR.

## 3. Results

### 3.1. Characterization by mtDNA restriction analysis

The analysis of restriction fragments, which ranged from 10.0 to 1.0 kbp approximately, disclosed 15 different mtDNA restriction patterns that were designated as the A, B, C1, C2, D, E, F, G, H, I, K, M, N, O and S patterns (Table 2). The D and E patterns were matched *D. hansenii* CECT 10026 and *D. hansenii* CECT 10360, respectively (Fig. 1). The H restriction pattern showed the same profile as the reference strains of *C. zeylanoides* CECT 1441 and CECT 10128. The I pattern presented 100% similarity to the type strains of *C. zeylanoides* CECT 10048, CECT 10051, and CECT 10125. In addition, the F and B restriction patterns were quite similar (about 75% and 68%, respectively) to *D. hansenii* CECT 10360. Overall, the similarity between the remaining mtDNA restriction profiles and reference strains was less than 60% (Fig. 1), which indicates marked polymorphism in the mtDNA of the assayed isolates. Consequently, the G, A, C1, C2, M and K patterns evidenced a similarity of approximately 55 to 20% to some of the reference strains of *D. hansenii* CECT 10026, CECT 10353 and CECT 10360. The O, N and S patterns had a similarity of about 35 to 15% with some of the type strains of *C. zeylanoides* CECT 1441, CECT 10128, CECT 10048, CECT 10051 and CECT 10125.

### 3.2. Characterization by RAPD-PCR

All the yeast isolates tested by mtDNA restriction analysis also were characterized by RAPD-PCR. The primers used in this technique generated several different profiles. The size of the amplification products ranged from 2.7 to 0.1 kbp approximately with the primer (GAC)<sub>5</sub> and from about 6.0 to 0.1 kbp with the primer (GACA)<sub>4</sub>. The level of discrimination with the primer (GAC)<sub>5</sub> was better than with (GACA)<sub>4</sub> (Fig. 2 and 3). Therefore, 22 different patterns, designated from 1 to 22, were obtained with primer (GAC)<sub>5</sub>, and only 16 patterns, designated from 1 to 16, with (GACA)<sub>4</sub> (Table 2).

The RAPD pattern 4 obtained with the primer (GAC)<sub>5</sub> matched the patterns of the reference strains of *C. zeylanoides* CECT 1441, CECT 10125 and CECT 10128, while the pattern 7 coincided with *D. hansenii* CECT 10353. The remaining isolates showed patterns with low similarity (less than 30%) to some of the reference strains (Fig. 2).

When the PCR profiles obtained using the primer (GACA)<sub>4</sub> were analyzed, only the pattern 7 showed a similarity of approximately 65% with the reference strain CECT 10353 of the species *D. hansenii* (Fig. 3). The remaining isolates showed low similarity (less than 35%) to the reference strains.

The comparison of the mtDNA restriction and RAPD-PCR patterns showed that some yeast isolates tentatively characterized by mtDNA restriction analysis as different species had the same RAPD-PCR profiles (Table 2). Thus, yeast isolates with the D, E, H and I mtDNA patterns of different species (D and E of *D. hansenii*, and H and I of *C. zeylanoides*) exhibited the same RAPD-PCR pattern (3) with the primer (GAC)<sub>5</sub>. Similar results were obtained when mtDNA restriction patterns were contrasted with RAPD-PCR analysis with the primer (GACA)<sub>4</sub> (Table 2).

Representative strains of the obtained mtDNA restriction and RAPD-PCR profiles were identified by 18S rDNA gene sequencing to determine which of the above methods yielded a reliable characterization of yeast isolates at species level.

### 3.3. Identification by 18S rDNA sequencing

The 18S rDNA gene sequences obtained from representative strains of the different mtDNA restriction and RAPD-PCR patterns were compared with those of the GenBank DNA database. The probable identity and corresponding percentages of the yeast isolates obtained from blast analysis are listed in Table 2. All the sequenced isolates showed high sequence identity (99-100%) to the 18S rDNA gene deposited in GenBank. The H, I, N, O and S mtDNA restriction patterns were tentatively identified as *C. zeylanoides* and the remaining profiles, as *D. hansenii*, in accordance with the results obtained by mtDNA restriction analysis (Table 2). However, these results did not match those of RAPD analysis. Isolates with the same RAPD-PCR profile were identified as different species by sequencing of 18S rDNA. Thus, the RAPD pattern 7 obtained with the primer (GACA)<sub>4</sub> was identified as *D. hansenii* or *C. zeylanoides* by 18S rDNA sequencing (Table 2). Similar results were found in the RAPD pattern 14 obtained with (GACA)<sub>4</sub> and in (GAC)<sub>5</sub> patterns 1, 2, 3 and 18.

### 3.4. Distribution of yeast mtDNA restriction patterns according to PDO

MtDNA restriction analysis using the endonuclease *Hae*III was used to investigate the distribution of yeast population according to the 4 Spanish PDOs of dry-cured Iberian ham (Fig. 4). The B, C1, C2, D, E, F and K mtDNA patterns of *D. hansenii* were found in all of the PDOs (Fig. 4). However, the O and S patterns of the species *C. zeylanoides* were found only in the “Guijuelo” PDO, and the N pattern in the “Jamón de Huelva” PDO. The remaining patterns of *C. zeylanoides* (H and I) were detected in the last two PDOs. Therefore, in the “Jamón de Huelva” PDO, all the mtDNA restriction patterns, except O and S, were detected and the C1 pattern was the most abundant (about 34% of the total). In the “Guijuelo” PDO, all the restriction patterns, except A and N, were found, and the main pattern detected was D (about 29% of the total). Eight and nine restriction profiles were detected in the “Dehesa de Extremadura” and “Los Pedroches” PDOs, respectively. The B, C1, C2, D, E, F, K and M patterns were found in the “Dehesa de Extremadura” PDO, where the E pattern was predominant (about 23% of the total). The A, B, C1, C2, D, E, F, K and G patterns were detected in the “Los Pedroches” PDO, B being detected most frequently (about 28% of the total).

## 4. Discussion

MtDNA restriction analysis yielded DNA reproducible patterns, some of them identical to the patterns of reference strains, which allowed their direct characterization at species level. The remaining mtDNA restriction patterns showed similarities with reference strains ranging from 75 to 15% approximately. Subsequent identification by 18S rDNA gene sequencing, successfully used to identify yeast species (Oguntoyinbo, 2008), confirmed the tentative characterization at species level obtained by mtDNA restriction analysis. This molecular technique thus proved to be a reliable method for characterizing yeasts isolated from dry-cured Iberian ham at species level. In addition, the variability of mtDNA restriction profiles found between isolates of the same species could be very useful for strain differentiation. Therefore, the isolates identified as *D. hansenii* by 18S rDNA sequencing showed similarities in their mtDNA restriction profiles that ranged from 100 to 20% and those of isolates identified as *C. zeylanoides* from 100 to 15% approximately. Several studies have confirmed the efficiency of mtDNA restriction analysis for characterizing yeasts at strain level in other food products (Torriani et al., 1999; Fernández-Espinar, López, Ramón, Bartra & Querol,



2001; Martorell, Fernández-Espinar & Querol, 2005; Nikolaou et al., 2007; Jeyaram, Mohendro Singh, Capece & Romano, 2008).

RAPD analysis yielded more DNA polymorphisms than mtDNA restriction analysis. However, yeast characterization at species level obtained with RAPD-PCR did not agree with identification by 18S rDNA sequencing, since isolates with the same RAPD-PCR profile were identified as different species by 18S rDNA sequencing. This PCR technique has been reported as suitable for characterizing yeasts isolated from food at species level (Lieckfeldt et al., 1993; Baleiras Couto, Hartog, Huis in't Veld, Hofstra & van der Vossen, 1996b; Succi, Reale, Andrighetto, Lombardi, Sorrentino & Coppola, 2003; Foschino, Gallina, Andrighetto, Rossetti & Galli, 2004; Nikolaou et al., 2007; Walczak, Czaplinska, Barszczewski, Wilgosz, Wojtatowicz & Robak, 2007). However, from our results, RAPD-PCR using the primers (GAC)<sub>5</sub> and (GACA)<sub>4</sub> is not appropriated for characterizing yeasts from dry-cured Iberian ham at species level. Thus, this technique with the above primers must not be used as single method to differentiate yeast isolates from dry-cured Iberian ham. Its utility should be limited to differentiation of strains belonging to the same species as have been reported in the differentiation of yeast isolates from other food origin (Baleiras Couto et al., 1996a; Vasdinyei & Deák, 2003; Fadda, Mossa, Pisano, Deplano & Consentino, 2004; Martorell et al., 2005).

When mtDNA restriction analysis was applied to analyze the distribution of yeast species in the 4 PDOs of dry-cured Iberian ham, only *D. hansenii* and *C. zeylanoides* were found. *D. hansenii* was the predominant species, with nearly 95% of total isolates. This species of the genus *Debaryomyces* is commonly present in many meat products (Comi & Cantoni, 1983; Huerta, Querol & Hernández-Haba, 1988; Deak, 1991; Núñez et al., 1996; Encinas, López-Díaz, García-López, Otero & Moreno, 2000; Gardini et al., 2001). *D. hansenii* has been reported among the most frequent yeast species in dry-cured ham (Comi et al., 1983; Núñez et al., 1996; Simoncini, Rotelli, Virgili & Quintavalla, 2007).

Regarding the distribution of the different mtDNA restriction patterns, most of them were found in all the Spanish PDOs of dry-cured Iberian ham. However, some mtDNA restriction profiles were detected in only one PDO, such as the O and S patterns that were found only in the "Guijuelo" PDO and the N mtDNA pattern that was detected only in the "Jamón de Huelva" PDO. Moreover, the main restriction pattern found was different in each of the four PDOs; the B, C1, D and E mtDNA patterns were

predominant in the “Los Pedroches”, “Jamón de Huelva”, “Guijuelo”, and “Dehesa de Extremadura” PDOs, respectively. These results suggest that specific mtDNA restriction profiles could be linked to the different geographic areas of dry-cured Iberian ham ripening. This does not coincide with the data reported in the literature, since several researchers (Versavaud, Courcoux, Roulland, Dulau & Hallet, 1995; Romano, Casaregola, Torre & Gaillardin, 1996; Corredor, Davila, Casarégola & Gaillardin, 2003) have found only a slight relation or an unclear relation between geographic site and genetic profiles when mtDNA restriction analysis and other molecular techniques were used. Only Núñez et al. (1996) reported an association between some yeast biotypes identified by phenotypic methods and the geographic location of dry-cured Iberian ham ripening. The relation between mtDNA restriction patterns and geographic distribution acquires special relevance, since these patterns may have different implications in the flavor development of dry-cured meat products (Andrade et al., 2009). This could justify the use of a reliable method to differentiate yeasts growing on hams, for instance, mtDNA restriction analysis to characterize species, and mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR with the primers (GACA)<sub>4</sub> and (GAC)<sub>5</sub> to differentiate strains.

In conclusion, our study demonstrated that mtDNA restriction analysis was a reliable method for yeast characterization at species level, whereas RAPD-PCR with the primers (GACA)<sub>4</sub> and (GAC)<sub>5</sub> was inappropriate for this purpose, although it could be useful as a complement to mtDNA restriction analysis for characterizing yeasts at strain level. Most of the mtDNA restriction patterns found in dry-cured Iberian ham were consistent with *D. hansenii*, although some patterns belonging to *C. zeylanoides* also were detected. Several mtDNA restriction patterns were associated to specific geographic areas of dry-cured Iberian ham, which could be interesting because these patterns may have different implications in the flavor development of dry-cured Iberian ham. Consequently, mtDNA restriction analysis could be a useful method to differentiate yeasts from distinct dry-cured Iberian ham processing areas.

### **Acknowledgements**

This work is part of projects AGL2001-0804 and AGL2004-3291 funded by the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. M. J. Andrade was the recipient of a

Grant of the Regional Government of Junta de Extremadura (Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología).

## References

- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Sánchez, B., Casado, E.M., & Rodríguez, M. (2009). Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production. *Food Chemistry*, 113, 457-463.
- Andrade, M.J., Rodríguez, M., Sánchez, B., Aranda, E., & Córdoba, J.J. (2006). DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 48-58.
- Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J., & van der Vossen, J.M.B.M. (1996a). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 41-46.
- Baleiras Couto, M.M., Hartog, B.J., Huis in't Veld, J.H.J., Hofstra, H., & van der Vossen, J.M.B.M. (1996b). Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiology*, 13, 59-67.
- Cappa, F., & Cocconcelli, P.S. (2001). Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 157-160.
- Comi, G., & Cantoni, C. (1983). Yeasts in dry Parma hams. *Industria Alimentari*, 22, 102-104.
- Corredor, M., Davila, A.-M., Casarégola, S., & Gaillardin, C. (2003). Chromosomal polymorphism in the yeast species *Debaryomyces hansenii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84, 81-88.
- Deak, T. (1991). Foodborne yeasts. In *Advances in Applied Microbiology*, (vol. 36), (pp. 179-2789). New York: Academic Press James.
- Durá, M.A., Flores, M., & Toldrá, F. (2004). Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on *Debaryomyces* spp. generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. *Food Chemistry*, 86, 391-399.
- Encinas, J.P., López-Díaz, T.M., García-López, M.L., Otero, A., & Moreno, B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 54, 203-208.

- Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M., & Consentino, S. (2004). Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 51-59.
- Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., & Querol, A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 1-10.
- Foschino, R., Gallina, S., Andrighetto, C., Rossetti, L., & Galli, A. (2004). Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Research*, 4, 609-618.
- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M.A., Andrighetto, C., Schirone, M., & Tofalo, R. (2001). A survey of yeasts in traditional sausages of Southern Italy. *FEMS Yeast Research*, 1, 161-167.
- Huerta, T., Querol, A., & Hernández-Haba, J. (1988). Yeasts of dry-cured hams: quantitative and qualitative aspects. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 6, 227-231.
- James, S.A., Collins, M.D., & Roberts, I.N. (1994). Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Yeast*, 10, 871-881.
- Jessen, B. (1995). Starter cultures for meat fermentation. In G. Campbell-Platt, & P. E. Cook, *Fermented meats*, (pp. 130-159). Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Jeyaram, K., Mohendro Singh, W., Capece, A., & Romano, P. (2008). Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' - A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 115-125.
- Kreger-van Rij, N.J.W. (1984). *The yeast. A taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Kurtzman, C.P., & Fell, J.W. (1998). *The yeasts - A taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Kurtzman, C.P., & Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W., & Börner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, 33, 413-425.

- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., & Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23, 341-350.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G., & Asensio, M.A. (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 8-18.
- Martorell, P., Fernández-Espinar, M.T., & Querol, A. (2005). Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 293-302.
- Nikolaou, E., Andrighetto, C., Lombardi, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2007). Heterogeneity in genetic and phenotypic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from red and white wine fermentations. *Food Control*, 18, 1458-1465.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E., & Asensio, M.A. (1996). Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 271-280.
- Oguntoyinbo, F.A. (2008). Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale *gari* production in Nigeria. *Food Control*, 19, 465-469.
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 439-446.
- Romano, A., Casaregola, S., Torre, P., & Gaillardin, C. (1996). Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 255-264.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R., & Quintavalla, S. (2007). Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiology*, 24, 577-584.
- Succi, M., Reale, A., Andrighetto, C., Lombardi, A., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2003). Presence of yeasts in southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour. *FEMS Microbiology Letters*, 225, 143-148.
- Torriani, S., Zapparoli, G., & Suzzi, G. (1999). Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75, 207-215.

- Vasdinyei, R., & Deák, T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 123-130.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., & Hallet, J.-N. (1995). Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3521-3529.
- Walczak, E., Czaplinska, A., Barszczewski, W., Wilgosz, M., Wojtatowicz, M., & Robak, M. (2007). RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing. *Food Microbiology*, 24, 305-312.

**Figure captions**

Figure 1. Dendrogram based on the mitochondrial DNA restriction patterns of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham and yeast reference strains.

Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0-100%).

Cz: *Candida zeylanoides*; Dh: *Debaryomyces hansenii*; Dp: *Debaryomyces polymorphus*; Pc: *Pichia carsonii*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Yl: *Yarrowia lipolytica*; Rm: *Rhodotorula mucilaginosa*.

Figure 2. Dendrogram based on the RAPD-PCR patterns using the primer (GAC)<sub>5</sub> of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham and yeast reference strains.

Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0-100%).

Cz: *Candida zeylanoides*; Dh: *Debaryomyces hansenii*; Dp: *Debaryomyces polymorphus*; Pc: *Pichia carsonii*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Yl: *Yarrowia lipolytica*; Rm: *Rhodotorula mucilaginosa*.

Figure 3. Dendrogram based on the RAPD-PCR patterns using the primer (GACA)<sub>4</sub> of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham and yeast reference strains.

Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0-100%).

Cz: *Candida zeylanoides*; Dh: *Debaryomyces hansenii*; Dp: *Debaryomyces polymorphus*; Pc: *Pichia carsonii*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Yl: *Yarrowia lipolytica*; Rm: *Rhodotorula mucilaginosa*.

Figure 4. Distribution of the mitochondrial DNA (mtDNA) restriction patterns of yeast isolates according to the four Spanish Protected Designations of Origin (PDO) of dry-cured Iberian ham.

Table 1. Yeast reference strains, provided by the Spanish Type Culture Collection (CECT), used in this research.

<b>Yeast species</b>	<b>Reference strains</b>
<i>Candida zeylanoides</i>	CECT 1441, CECT 10048, CECT 10051, CECT 10125, CECT 10128
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	CECT 10099, CECT 10135, CECT 10251, CECT 10280, CECT 10282
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CECT 10026, CECT 10202, CECT 10352, CECT 10353, CECT 10360
<i>Pichia carsonii</i>	CECT 1129, CECT 10229, CECT 10230, CECT 10307, CECT 10542
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CECT 10044, CECT 10087, CECT 10291, CECT 10359, CECT 11016
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CECT 1468, CECT 1469, CECT 10358, CECT 10363, CECT 10448
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1387, CECT 1414, CECT 1443, CECT 1477, CECT 1485



Table 2. Yeast identification of representative mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis and RAPD-PCR patterns by 18S rDNA sequencing.

mtDNA restriction patterns	RAPD-PCR patterns		18S rDNA sequencing	
	<i>Hae</i> III	(GAC) <sub>5</sub>		(GACA) <sub>4</sub>
A		7	7,14	<i>D. hansenii</i> (100%) <sup>a</sup>
B		1,2,3,6,7,10,11,12,16,22	2,7,11,12,13	<i>D. hansenii</i> (100%)
C1		1,3,5,6,7,8,9,10,11	1,2,3,5,6,7,11	<i>D. hansenii</i> (100%)
C2		2,7,9	2,5,7	<i>D. hansenii</i> (100%)
D		3,7,11,17,18,20	2,7	<i>D. hansenii</i> (99%)
E		1,3,7,10,12,14,15,16	11,12	<i>D. hansenii</i> (100%)
F		1,3,6,8	1,4,12	<i>D. hansenii</i> (100%)
G		7	7	<i>D. hansenii</i> (100%)
H		1,2,3,4,21	7,9,10,16	<i>C. zeylanoides</i> (100%)
I		3,13,19	7,8,9	<i>C. zeylanoides</i> (99%)
K		3,7,16	1,2,11,12	<i>D. hansenii</i> (100%)
M		3	5,12,15	<i>D. hansenii</i> (100%)
N		18	14	<i>C. zeylanoides</i> (100%)
O		4	7	<i>C. zeylanoides</i> (99%)
S		4	7	<i>C. zeylanoides</i> (100%)

<sup>a</sup> % Identity with the nucleotides sequences in the GenBank DNA database

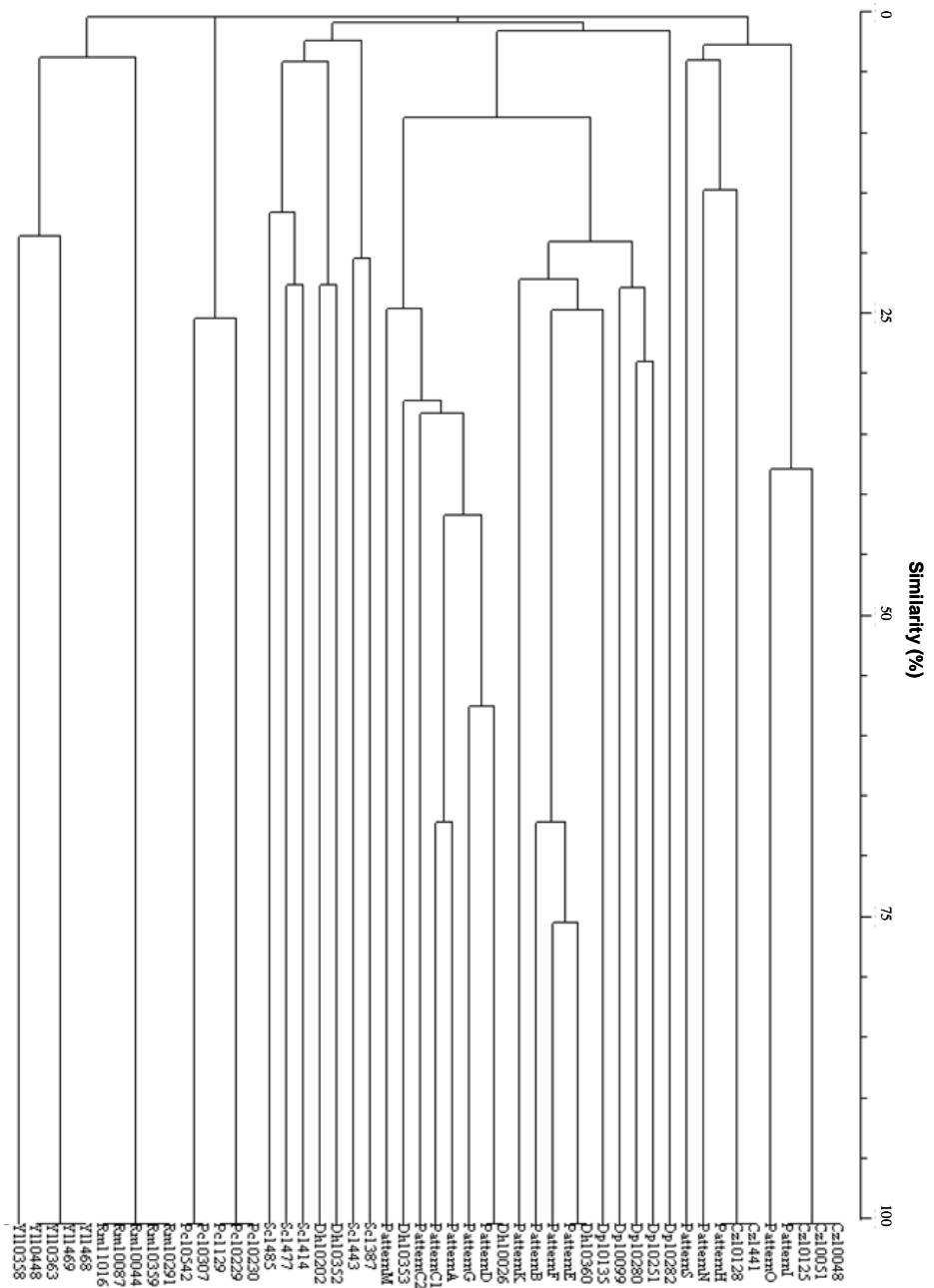


Figure 1. Andrade, Rodríguez, Casado and Córdoba

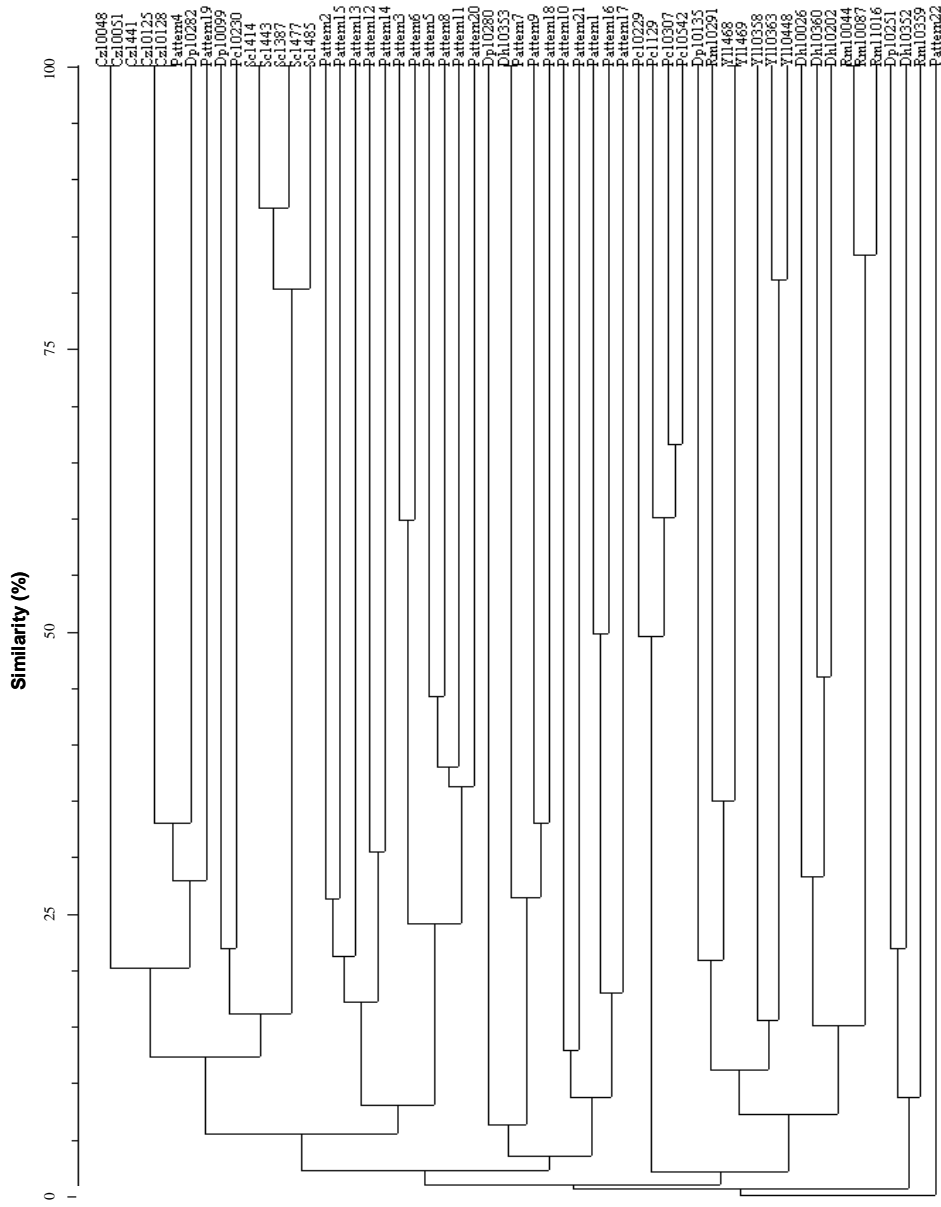


Figure 2. Andrade, Rodríguez, Casado and Córdoba

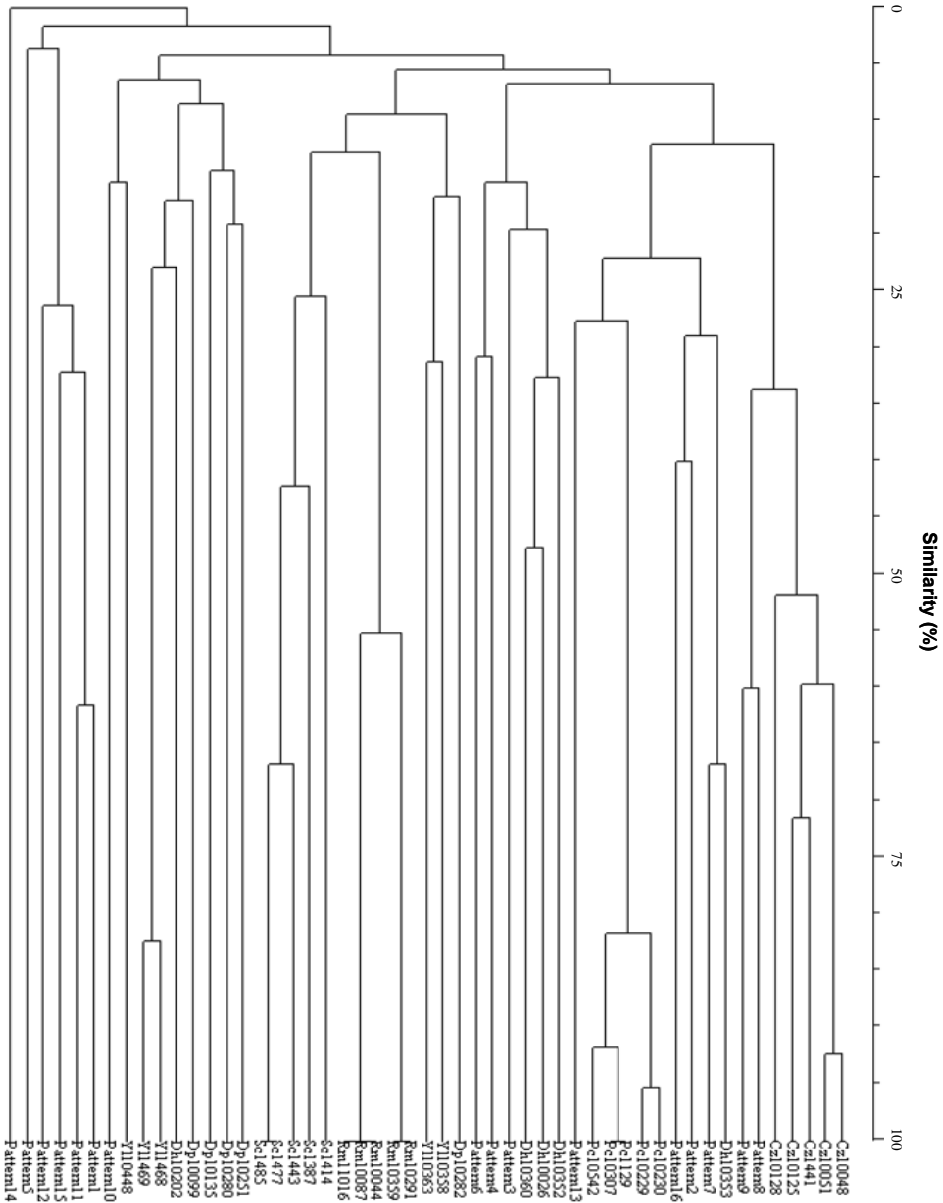


Figure 3. Andrade, Rodríguez, Casado and Córdoba

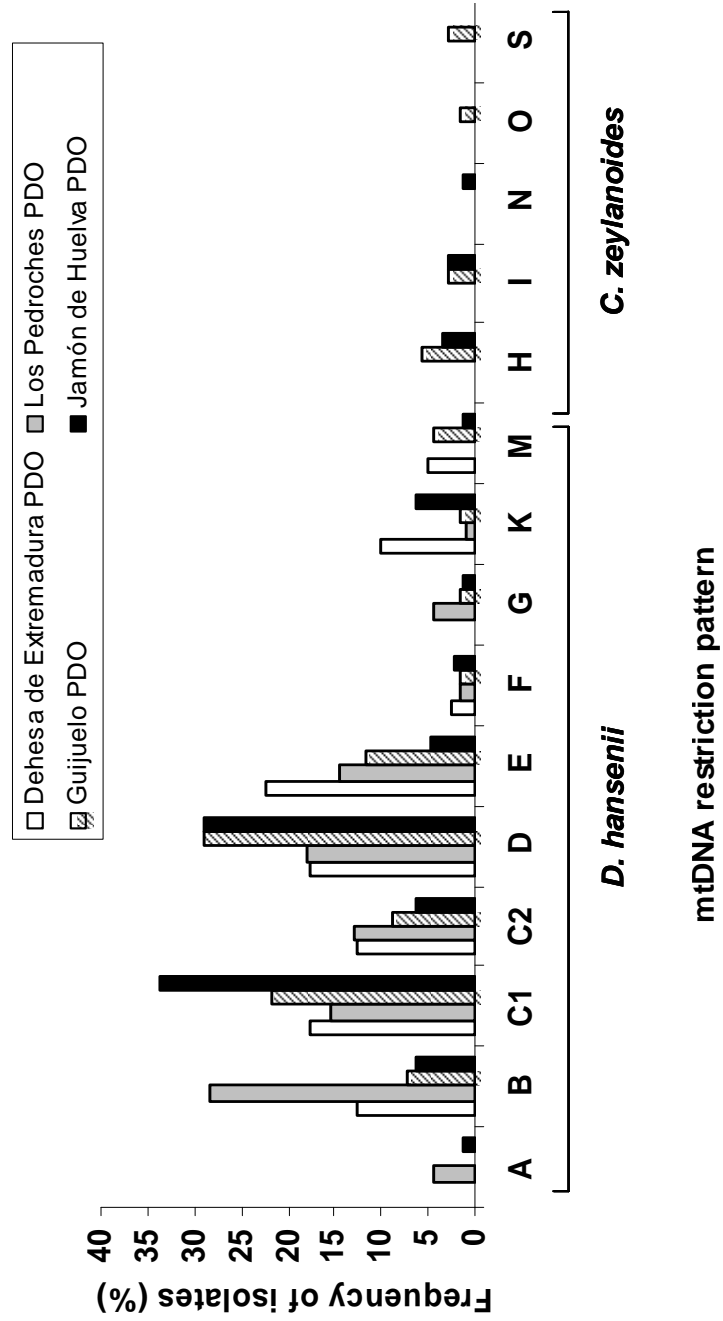


Figure 4. Andrade, Rodríguez, Casado and Córdoba



**III.3. Evaluation and selection of yeasts isolated from  
dry-cured Iberian ham by their volatile compound  
production**







## Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production

M<sup>a</sup> Jesús Andrade, Juan José Córdoba, Beatriz Sánchez, Eva M<sup>a</sup> Casado, Mar Rodríguez \*

Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n, 10071-Cáceres, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 February 2008  
Received in revised form 5 June 2008  
Accepted 24 July 2008

#### Keywords:

Yeasts  
Volatile compounds  
Dry-cured ham

### ABSTRACT

One hundred and seventeen yeast strains isolated from dry-cured Iberian ham from the four different protected designations of origin of Spain were investigated for their volatile compound production. The yeast strains were grouped into the two main yeast species usually found in this product (*Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides*) and 10 different biotypes by restriction mitochondrial DNA analysis. Yeast strains were grown in a designed model culture medium under conditions representative of dry-cured ham processing. Volatile compounds were extracted from this medium using solid-phase micro-extraction and were analysed by gas chromatography/mass spectrometry. Marked differences in volatile compound production were found between *D. hansenii* and *C. zeylanoides* and between the mitochondrial DNA patterns of these species. Two of the mitochondrial DNA patterns of *D. hansenii* exhibited the highest production of the volatile compounds involved in the dry-cured flavour. Consequently, these patterns of *D. hansenii* should be proposed as starter cultures for dry-cured ham.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Dry-cured ham is a traditional meat product obtained by a process that involves several months of ripening. During the ripening period, an uncontrolled microbial population proliferates on the surface of the product. Moulds, yeasts, and Gram-positive and catalase-positive cocci have been cited as the dominant organisms in different types of dry-cured ham during most of the ripening period (Huerta, Hernández, Guamis, & Hernández, 1988; Núñez, Rodríguez, Córdoba, Bermúdez, & Asensio, 1996a, 1996b; Rodríguez et al., 1994).

Yeasts are often abundant ( $10^6$  cfu g<sup>-1</sup>) in dry-cured Iberian ham (Núñez et al., 1996a), even if they are not added as a starter culture. The presence of yeasts seems to depend on the nature of the product, processing time and ripening conditions.

The predominant yeasts in dry-cured Iberian ham are strains of *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides* (Núñez et al., 1996a). Strains of *D. hansenii* isolated from dry-cured ham show intense proteolytic activity against myofibrillar proteins when inoculated on raw pork (Rodríguez, Núñez, Córdoba, Bermúdez, & Asensio, 1998; Martín, Córdoba, Rodríguez, Núñez, & Asensio, 2001). The inoculation of selected strains of *D. hansenii* has been recognised as involved in flavour development throughout the ripening process of pork loins (Martín, Córdoba, Benito, Aranda, &

Asensio, 2003) and dry-cured ham (Martín, Córdoba, Aranda, Córdoba, & Asensio, 2006) and it has a positive impact on volatile compound production.

The formation of volatile compounds depends on the particular yeast species and strain (Arrizon, Fiore, Acosta, Romano, & Gschae-dler, 2005; Regodón Mateos, Pérez Nevado, & Ramírez Fernández, 2006).

The wide variability of the yeast strains reported in dry-cured Iberian ham is associated mainly with place of production (Núñez et al., 1996a). This variability leads to differences in the volatile compound profiles of hams ripened in different geographical areas and even between hams processed in the same site. These differences could be avoided by selecting, as starter cultures, yeast strains that are known to be good producers of the volatile compounds involved in the flavour of dry-cured meat products. Before this can be done, the production of volatile compounds by the main strains or biotypes of the yeast species usually found in these products (*D. hansenii* and *C. zeylanoides*), in different areas of production (the four protected designations of origin [PDO] of Spain) must be characterised. As volatile compound production may be associated with specific yeast strains or biotypes, they must be clearly differentiated using an appropriate method, such as restriction mitochondrial DNA analysis, which has been reported to effectively differentiate yeast strains from dry-cured meat products (Andrade, Rodríguez, Sánchez, Aranda, & Córdoba, 2006).

The evaluation of the production of volatile compounds of multiple yeast strains in dry-cured Iberian ham is not feasible because a great number of products would have to be kept as sterile samples

\* Corresponding author. Tel.: +34 927 257 125; fax: +34 927 257 110.  
E-mail address: [marrodr@unex.es](mailto:marrodr@unex.es) (M. Rodríguez).  
URL: <http://higiene.unex.es/> (M. Rodríguez).

to be inoculated. A more practical method would be to use a culture medium that emulates the composition of dry-cured ham throughout the ripening process. This medium should include the main components of dry-cured ham (oleic acid, ribose, creatine and free amino acids) at their usual concentrations in this product throughout the ripening process (Córdoba et al., 1994a; Martín, Antequera, Ventanas, Benítez-Donoso, & Córdoba, 2001; Petrón, Muriel, Timón, Martín, & Antequera, 2004). Furthermore, the addition of NaCl and lactic acid results in similar conditions of water activity and pH to that of dry-cured ham (Córdoba et al., 1994b; Rodríguez et al., 1994). This model medium can be assayed as a routine method to test yeast strains for use as starter cultures in dry-cured ham.

The aim of this study was to evaluate the production of volatile compounds related to the flavour of dry-cured ham in order to select the most appropriate strains for use as starter cultures in this product. The yeast strains were isolated from dry-cured Iberian ham at the four different PDO of Spain. Furthermore, the relationship between the production of volatile compounds and specific yeast strains differentiated by restriction mitochondrial DNA analysis was examined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of model culture medium

A model culture medium with 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 6.0), containing NaCl, 5 g l<sup>-1</sup>; oleic acid, 4 g l<sup>-1</sup>; ribose 0.5 g l<sup>-1</sup>; creatine, 3 g l<sup>-1</sup> and 4 g l<sup>-1</sup> each of amino acids (Ala, Trp, Lys, Gly, Glu, Val, Leu, Met, Iso and Phe) was prepared. In addition,  $\alpha$ -ketoglutarate at 2.25 g l<sup>-1</sup> of medium was added to favour the conversion of amino acids into flavour compounds (Yvon, Berthelot, & Gripon, 1998). The medium pH was adjusted to pH 6.0 with 0.1 M lactic acid before autoclaving. The amino acids were sterilized by filtration and added to the autoclaved medium.

### 2.2. Yeast strains

One hundred and seventeen yeasts isolated from different industries of elaboration of the four PDO of dry-cured Iberian ham were used in this study.

Yeast strains were purified by repeated cultivation on malt extract agar (MEA) (2% malt extract, 2% glucose, 0.1% peptone, 2% agar) before analysis.

Yeasts were grouped by restriction mitochondrial DNA analysis according to Andrade et al. (2006) in 2 species and 10 patterns (Table 1). These 2 species are the predominant yeasts found in dry-cured ham (Núñez et al., 1996a).

Identification of these strains was confirmed by sequencing of 18S rDNA as described previously by Andrade et al. (2006).

Triplicate samples of each yeast strain were grown for 30 days at 25 °C, with shaking in the model culture medium. Yeasts were inoculated at 10<sup>6</sup> cfu ml<sup>-1</sup>. Six replicates of sterile culture medium were incubated and used as control samples.

Microbial counts in the control samples were detected on plate count agar (PCA). No growth was detected in any of the incubated controls. Yeast counts in the inoculated samples were determined on MEA at the end of the incubation period and levels higher than 10<sup>7</sup> cfu ml<sup>-1</sup> were found.

### 2.3. Extraction of volatile compounds

After 30 days of incubation, the cryotubes with the model culture medium were stored at -80 °C until analysis. Aliquots of one millilitre of culture medium were placed in a 5 ml headspace vial (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) and sealed with a PTFE butyl septum (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) in an aluminium cap. Volatile compounds were extracted by Solid-phase micro-extraction technique (SPME) (Ruiz, Cava, Ventanas, & Jensen, 1998) with a 10 mm long, 100  $\mu$ m thick fibre coated with carboxen/polydimethylsiloxane (Supelco Co., Bellefonte, PA, USA). Prior to collection of volatiles, the fibre was preconditioned at 220 °C for 50 min in the GC injection port. The SPME fibre was inserted into the headspace vial through the septum and exposed to headspace for 45 min at 42 °C in a water bath.

### 2.4. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analyses

GC/MS analyses were performed using a Hewlett-Packard 5890 S II gas chromatograph coupled with a Hewlett-Packard 5971A ion-trap mass spectrometer. A 5% phenyl-95% dimethyl polysiloxane column (50 m  $\times$  0.32 mm ID, 1.05  $\mu$ m film thickness; Hewlett-Packard) was used for the separation of volatile compounds. The carrier gas was helium. The injection port was in a splitless mode. The SPME fibre was kept in the injection port at 220 °C during the whole chromatographic run. The temperature programme was isothermal for 15 min at 35 °C, next increased to 150 °C at 4 °C min<sup>-1</sup>, and then to 250 °C at 20 °C min<sup>-1</sup>. To calculate the Kovats index of the compounds, *n*-alkanes (Sigma R-8769) were run under the same conditions. The GC/MS transfer line temperature was 280 °C. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode, with electron energy of 70 eV, a multiplier voltage of 1650 V and a rate of 1 scan s<sup>-1</sup> over a range of *m/z* 40–300 for data collection. The NIST/EPA/NIH mass spectral library and Kovats indexes were used to identify the volatile compounds.

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out by one-way analysis of variance, and means were separated by a LSD (least-

**Table 1**  
Origins of the yeasts isolated from dry-cured ham and their mitochondrial DNA pattern and genetic identification

Mitochondrial DNA pattern	Protected designations of origin of dry-cured Iberian ham				Genetic identification	Total strains
	Guijuelo	Pedroches	Dehesa de Extremadura	Huelva		
B	4	8	5	10	<i>D. hansenii</i>	27
C1	6	6	2	3	<i>D. hansenii</i>	17
C2	5	3	2	4	<i>D. hansenii</i>	14
D	6	4	5	3	<i>D. hansenii</i>	18
E	5	4	6	1	<i>D. hansenii</i>	16
F	1	2		1	<i>D. hansenii</i>	4
H	4			3	<i>C. zeylanoides</i>	7
I	2			1	<i>C. zeylanoides</i>	3
K			4	4	<i>D. hansenii</i>	8
S	3				<i>C. zeylanoides</i>	3
Total strains	36	27	24	30		117

significant difference) test using SPSS software package (version 15.0) for Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

### 3. Results and discussion

In Fig. 1, chromatograms of the extracted volatile compounds from an uninoculated control and a yeast inoculated sample are shown. A total of 61 volatile compounds were identified in the model culture medium (Table 2), most of them in the inoculated batches (Fig. 1). The volatile compounds included alcohols (16), hydrocarbons (10), ketones (10), aldehydes (8), esters (8), sulphur compounds (4) and carboxylic acids (2). The remaining volatile compounds were grouped as “other compounds”. Most of the compounds identified have been reported in dry-cured ham (Flores, Spanier, & Toldrá, 1998; Martín et al., 2006; Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés, & García, 1999; Ruiz et al., 1998).

Several peaks detected in the chromatograms (Fig. 1), tentatively identified as siloxanes or silanes, were not included in Table 2. Most of these peaks are probably derived from the SPME fibre or the chromatographic column.

Only 21 volatile compounds were detected in the control batch, most at very low concentrations, except for ethanol and ethylbenzaldehyde, which were detected in the highest concentration (Table 2). In the control batch, ethanol may have been produced from the catabolism of lipids or amino acids which are present in the model culture medium. In the yeast inoculated batches, it seems likely that yeasts were using ethanol as a carbon and energy source (Flo-

res, Rodríguez, Petit, & Gancedo, 2000). Ethylbenzaldehyde derives from the catabolism of amino acids. Both compounds have not been reported as essential in the flavour development of dry-cured meat products.

In inoculated samples, the most abundant compounds were branched aldehydes, alcohols and hydrocarbons (Fig. 2B), which were present in significantly higher amounts than in the control samples. These compounds have been described as involved in the development of the flavour of dry-cured Iberian ham (Carrapiso, Ventanas, & García, 2002), which confirms the importance of yeasts in the overall flavour of this product.

Aliphatic hydrocarbons were detected in control and inoculated batches (Table 2). However, aromatic and branched hydrocarbons were detected only in the inoculated batches and there were significant differences ( $P < 0.05$ ) from the control batch in some compounds (2-methylpentane, 3-methylpentane, 1,4-bis(1,1-dimethylethyl)benzene and methylcyclohexane) (Table 2). These compounds are responsible for the smoky, phenolic-like odours in dry-cured ham (Flores, Grimm, Toldrá, & Spanier, 1997).

In most cases, the aliphatic aldehyde and alcohol content was higher in the control batch than in the inoculated batches (Fig. 2A). These volatile compounds generally result from lipid oxidation (Ruiz et al., 1999). The catalase activity of the yeasts isolated from dry-cured Iberian ham may contribute to the decrease in aliphatic aldehydes in inoculated samples (Martín et al., 2003).

The highest concentrations of branched aldehydes and alcohols were detected in the inoculated batches; these were mainly

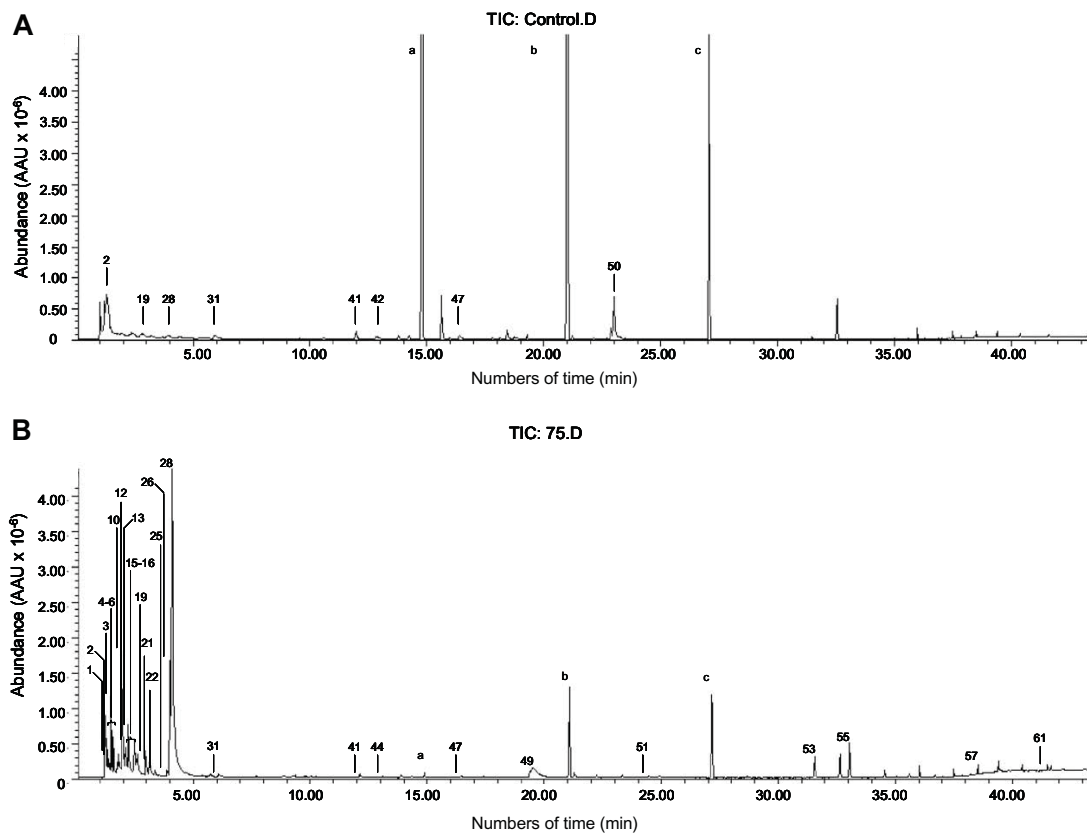


Fig. 1. Representative chromatograms of volatile compounds extracted by SPME GC/MS from uninoculated (A) and inoculated (B) samples. For peak numbers see Table 2. (a): peak tentatively identified as octamethyl cyclotetrasiloxane; (b): peak tentatively identified as decamethyl, cyclopentasiloxane; (c): peak tentatively identified as Acetic acid, [bis(trimethylsilyloxy)phosphinyl]-, trimethylsilyl ester.

**Table 2**  
Volatile compounds identified in the model culture medium by 117 yeast strains isolated from dry-cured ham<sup>a</sup>

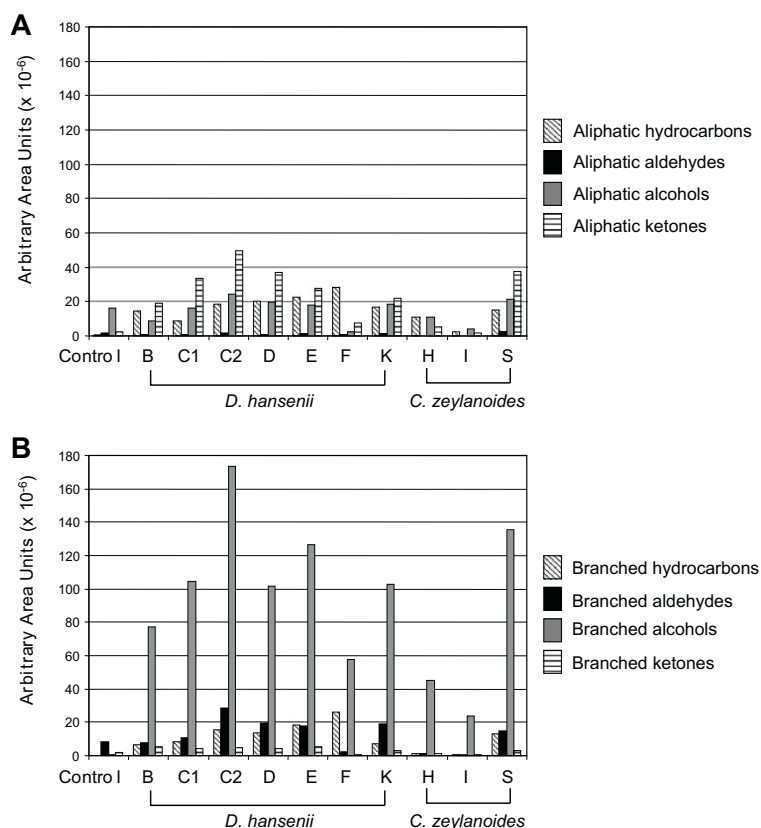
Peak number	Compounds	Control													
		Mitochondrial DNA pattern													
		B	C1	C2	D	E	F	H	I	K	S				
		27	17	14	18	16	4	7	3	8	3				
	<i>Aliphatic hydrocarbons</i>														
11	Hexane	4.62	9.02	17.62	18.52	20.51	27.18	7.43	2.48	6.70	5.17				
20	Heptane	n.d.	0.05	0.17	0.40	0.65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.				
	<i>Branched hydrocarbons</i>														
5	2-Methylpentane	n.d.	2.13 a	1.04 a	3.34 ab	4.89 ab	10.58 b	0.41 a	0.43 a	0.73 a	0.99 a				
6	3-Methylpentane	n.d.	1.87 a	1.11 a	2.67 ab	7.78 bc	15.35 c	0.38 a	0.04 a	1.53 a	2.69 ab				
17	3-Methylhexane	n.d.	0.23	0.95	0.95	1.02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11				
23	Methylcyclohexane	n.d.	0.79 a	1.38 ab	3.27 b	1.40 ab	n.d.	n.d.	n.d.	0.69 a	1.99 ab				
18	3-Ethylpentane	n.d.	0.04	0.26	0.29	1.10	n.d.	n.d.	0.23	n.d.	n.d.				
32	4,4-Dimethyl-2-pentene	n.d.	0.07	n.d.	0.07	0.10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.				
52	1-1'-Biphenyl	n.d.	0.28	0.98	0.65	0.61	0.18	0.11	n.d.	0.43	0.12				
51	1,4-Bis(1,1-dimethylethyl)benzene	n.d.	1.17 a	2.67 ab	2.42 ab	1.37 a	0.13 a	0.38 a	0.04 a	3.59 ab	7.05 b				
	<i>Aliphatic aldehydes</i>														
9	Butanal	n.d.	0.11 a	0.09 a	0.02 a	0.01 a	0.22 a	n.d.	0.11 a	0.16 a	1.72 b				
47	Benzeneacetaldehyde	0.80	0.29	0.75	0.77	0.47	0.21	0.09	n.d.	0.40	0.62				
42	Benzaldehyde	0.82	0.26	0.01	n.d.	0.69	n.d.	n.d.	n.d.	0.45	n.d.				
	<i>Branched aldehydes</i>														
8	2-Methylpropanal	n.d.	0.85 a	1.05 ab	2.22 ac	2.62 ac	0.07 a	0.04 a	0.15 a	4.05 bc	5.95 c				
16	2-Methylbutanal	0.06 a	2.77 ab	3.03 ab	7.26 bc	5.80 ab	0.47 ab	0.10 a	0.08 a	7.79 bc	1.31 ab				
15	3-Methylbutanal	0.28 a	3.92 ab	6.78 abc	10.23 cd	9.09 bd	1.20 ab	1.17 ab	0.43 a	7.25 ad	7.63 ad				
40	3-Methylthio-propanal	0.08	0.03	0.06	0.12	0.40	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	n.d.				
50	Ethylbenzaldehyde	7.78	0.07	0.05	0.02	0.08	0.43	n.d.	n.d.	0.08	n.d.				
	<i>Carboxylic acids</i>														
35	2-Methylbutanoic acid	n.d.	0.14	0.24	0.18	0.18	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	n.d.				
36	2-Methylhexanoic acid	n.d.	n.d.	0.01	0.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.				
	<i>Aliphatic alcohols</i>														
2	Ethanol	16.30 a	4.10 b	3.03 b	2.64 b	4.20 b	0.59 b	7.28 ab	4.06 b	6.34 ab	3.42 b				
49	Benzeneethanol	n.d.	4.77	13.35	16.75	13.71	1.48	3.56	0.16	12.16	18.09				
	<i>Branched alcohols</i>														
13	2-Methyl-1-propanol	n.d.	8.40 a	13.19 ab	15.35 ab	14.56 ab	3.53 a	6.14 a	1.17 a	10.03 ab	13.81 ab				
4	2-Methyl-2-propanol	n.d.	3.97 ab	3.19 a	6.83 b	4.90 ab	1.53 ab	0.24 a	0.07 a	4.09 ab	5.32 ab				
45	3-Methylthio-1-propanol	n.d.	0.21 a	1.00 b	0.15 a	0.32 ab	n.d.	n.d.	n.d.	0.50 ab	0.95 ab				
27	2-Methylbutanol	n.d.	24.41 a	26.59 a	25.30 a	31.75 ab	0.06 a	13.08 a	n.d.	22.90 a	48.09 ab				
26	3-Methylbutanol	n.d.	36.27 ab	51.17 bc	46.52 bc	67.82 bc	51.64 bc	23.46 ab	22.31 ab	62.02 bc	58.74 bc				
14	2-Methyl-2-butanol	n.d.	0.17	0.02	n.d.	0.04	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	n.d.				
33	2-Methyl-1-pentanol	n.d.	n.d.	0.20	0.01	0.20	n.d.	n.d.	n.d.	0.24	n.d.				

25	2-Methyl-2-pentanol	n.d.	0.13	0.51	0.52	0.52	0.34	n.d.	n.d.	n.d.	0.06	n.d.
34	3-Methyl-3-hexanol	n.d.	0.01	0.04	n.d.	n.d.	0.17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
37	Cyclohexanol	n.d.	0.33	0.74	0.79	0.36	0.39	n.d.	n.d.	n.d.	0.10	0.84
43	4-Methyl-2-heptanol	n.d.	n.d.	0.07	n.d.	0.01	0.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
46	8-Methyl-1,8-nonanediol	n.d.	0.20	0.34	0.09	0.08	0.49	n.d.	0.09	0.08	0.09	n.d.
48	4-Ethyl-1,3-benzenediol	0.33	0.54	0.51	0.28	0.25	2.04	0.76	0.64	0.32	0.50	n.d.
55	2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol	n.d.	2.32 ab	6.82 c	6.15 bc	5.84 bc	3.64 ac	0.14 a	1.74 ab	n.d.	2.49 ab	7.74 c
<i>Aliphatic ketones</i>												
3	2-Propanone	0.99 a	8.66 ab	9.40 bc	14.59 b	10.78 bc	11.12 bc	3.88 ab	2.48 ac	0.57 ac	7.62 ab	8.77 ab
10	2-Butanone	0.28 a	4.07 a	14.51 bc	19.04 c	13.27 bc	6.65 b	1.14 a	0.22 a	0.15 a	5.46 ab	16.65 bc
19	2-Pentanone	1.21 a	5.79 ab	8.80 bc	14.83 c	11.68 c	8.80 bc	2.20 ab	2.22 ab	0.79 a	8.99 bc	11.80 bc
30	2-Hexanone	n.d.	0.01	0.04	0.05	0.21	0.13	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	n.d.
39	Cyclohexanone	n.d.	0.47	0.83	1.05	0.97	0.85	n.d.	n.d.	0.12	0.03	n.d.
<i>Branched ketones</i>												
22	3,3-Dimethyl-2-butanone	n.d.	0.06	0.19	0.03	0.14	0.15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.07
24	3-Hydroxy-2-butanone	n.d.	0.02	0.16	0.35	0.12	0.41	n.d.	n.d.	0.04	n.d.	0.56
29	3-Methyl-2-pentanone	n.d.	3.12	0.21	0.49	0.42	1.27	n.d.	0.40	n.d.	n.d.	n.d.
31	4-Methyl-3-penten-2-one	1.00	1.11	1.28	1.26	1.41	1.78	0.50	0.41	0.33	0.82	0.30
41	4-Methyl-2-heptanone	1.06 ab	1.05 a	2.06 ab	2.71 b	2.18 ab	1.50 ab	0.30 a	0.59 a	0.10 a	2.02 ab	1.85 ab
<i>Esters</i>												
21	Ethanoic acid, methyl ester	n.d.	3.20 ab	2.96 ab	6.01 b	4.59 ab	6.81 b	0.04 a	1.72 ab	0.29 a	0.84 a	5.28 ab
56	Propanoic acid, 2-methyl-1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	n.d.	0.02	0.02	0.04	0.07	0.02	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	n.d.
57	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester	0.05	0.06	0.06	0.05	0.03	0.01	0.08	0.04	n.d.	0.03	0.03
58	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	0.05	0.02	0.04	0.15	n.d.	0.03	n.d.	0.10	n.d.	0.06	n.d.
59	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	0.05	0.02	0.04	0.15	n.d.	0.03	n.d.	0.10	n.d.	0.06	n.d.
60	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methoxyethyl) ester	n.d.	0.13	0.16	0.03	0.03	0.11	n.d.	0.02	n.d.	0.02	n.d.
54	1,4-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester	n.d.	0.02	n.d.	0.31	0.04	0.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
61	Hexanedioic acid, dioctyl ester	n.d.	0.31	0.52	1.60	0.93	0.48	n.d.	n.d.	n.d.	0.73	0.95
<i>Sulphur compounds</i>												
1	Methanethiol	n.d.	1.52 ab	2.04 ab	6.35 c	3.91 bc	3.07 ab	n.d.	0.65 a	0.15 a	1.69 ab	3.79 abc
28	Dimethyl disulphide	1.21 a	12.72 a	37.29 ab	62.96 b	59.46 b	24.38 a	0.03 a	10.19 a	0.07 a	26.48 ab	132.23 c
44	Dimethyl trisulphide	n.d.	0.05	0.26	0.24	0.41	0.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	Carbon disulphide	0.18	1.14	0.07	0.08	0.06	1.01	0.33	0.17	n.d.	1.02	n.d.
<i>Other compounds</i>												
38	Styrene	n.d.	15.27 a	n.d.	0.43 a	n.d.	0.23 a	n.d.	n.d.	n.d.	101.48 b	n.d.
53	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	0.08 a	3.58 a	10.57 b	12.36 b	10.78 b	6.76 ab	1.04 a	3.92 a	1.07 a	6.00 ab	17.96 b
12	Chloroform	2.56	8.62	8.06	13.24	10.87	16.91	9.98	4.87	7.92	9.80	11.41

Means in the same row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Peak Number: order of appearance of the peak within the identified peaks in the chromatograms.

n.d.: not detected.

<sup>a</sup> Results are expressed in Arbitrary Area Units ( $\times 10^{-6}$ ) as means of 3 replicates of each strain.



**Fig. 2.** Accumulated area of hydrocarbons, aldehydes, alcohols and ketones aliphatic (A) and branched (B) in uninoculated batch (control) and batches inoculated with different mitochondrial DNA patterns of yeasts.

2-methylpropanal, 2-methylbutanal and 3-methylbutanal and their corresponding alcohols (2-methyl-1-propanol, 2-methylbutanol and 3-methylbutanol) (Table 2). It has been suggested that branched aldehydes and alcohols contribute significantly to the overall flavour of dry-cured hams (Carrapiso et al., 2002; Martín et al., 2006; Ruiz et al., 1999). These compounds are derived from amino acids, particularly valine, isoleucine and leucine, by either Strecker degradation (Ventanas et al., 1992) or microbial metabolism (Durá, Flores, & Toldrá, 2004; Martín et al., 2006).

The higher production of branched alcohols (23% of total volatile compound area) than their aldehyde precursors (8.2% of total volatile compound area) in the inoculated batches can be attributed to the conversion of branched-chain amino acids into fusel alcohols (2- and 3-methylbutanol and 2-methylpropanol) by the "Ehrlich pathway" (Ehrlich, 1907). Yeast strains have been reported to proceed by the following three-enzymatic-step pathway: transamination of the amino group from amino acids to 2-oxoglutarate, decarboxylation to convert branched-chain oxoacids to branched aldehydes, and finally reduction of branched-chain aldehydes to branched-chain alcohols, or the so-called fusel alcohols (Schoondermark-Stolk et al., 2006).

Acidic compounds were detected only at very low concentrations in some batches inoculated with *D. hansenii* (Table 2). However, up to eight ester compounds were detected, mainly in the inoculated samples. Although esters did not reach high concentrations, they were found in higher amounts in the inoculated than the control samples (Table 2). Strains with the C2 and E mitochondrial DNA patterns of *D. hansenii* produced significantly higher

amounts of ethanethioic acid, methyl ester than the control batch. It seems likely that yeasts were using acid and ester compounds as carbon sources (Durá et al., 2004), which could explain why both compounds were not present at higher levels.

Sulphur compounds were detected in all batches, although methanethiol and dimethyl trisulphide were not found in the control batch. Inoculated C2 and D batches of *D. hansenii* and S of *C. zeylanoides* showed significantly ( $P < 0.05$ ) higher amounts of dimethyl disulphide and methanethiol than control samples. The origin of many sulphur compounds is associated with methionine catabolism, which contributes actively to both the flavours and off-flavours of foodstuffs (Boelens & van Gemert, 1993; López del Castillo-Lozano, Delile, Spinnler, Bonnarme, & Landaud, 2007). Evidence for the contribution of yeasts to generating volatile sulphur compounds has been reported in the literature (Arfi, Spinnler, Tache, & Bonnarme, 2002; López del Castillo-Lozano et al., 2007). The first step of methionine catabolism by yeasts is transamination of methionine in the presence of an amino acceptor with aminotransferase. L-methionine aminotransferase activity was detected in some yeasts and is significantly higher in *D. hansenii* (Arfi et al., 2002).

Comparison of the volatile compound production by the mtDNA patterns of yeast strains tested disclosed important differences. The production of branched volatile compounds clearly differed between the inoculated batches because more compounds, present in higher amounts, were detected in all the patterns of *D. hansenii* than in the H and I patterns of *C. zeylanoides* (Fig. 2B). Synthesis of volatile compounds from branched-chain amino acids seems to be

negatively affected by the presence of salt (Durá et al., 2004). However, most strains of *D. hansenii* are not affected because this yeast species is moderately halophilic (Breuer & Harms, 2006). This could account for the greater effectiveness of *D. hansenii* patterns in the production of branched-chain volatile compounds.

The C2 and D mtDNA patterns of *D. hansenii* showed the highest number of compounds with significantly greater volatile production (Fig. 2A and B). Thus, these patterns produced significantly higher amounts of branched aldehydes and alcohols, and aliphatic ketones, such as 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-2-propanol, 2-methylbutanol, 3-methylbutanol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol, 2-propanone, 2-butanone, 2-pentanone, than most of the other patterns analysed (Table 2).

There were not many differences in the production of sulphur compounds between yeast strains. Only the S mtDNA pattern of *C. zeylanoides* produced significantly more dimethyl disulphide than the other patterns tested. Since this compound may contribute an unpleasant flavour in dry-cured meat products, the S pattern should be avoided in starter cultures.

Considering the production of all volatile compounds, the C2 and D mtDNA patterns of *D. hansenii* were the biotypes that produced more volatile compounds related to the flavour of dry-cured meat products and, in most cases, in higher amounts than the other mtDNA patterns of *D. hansenii* and *C. zeylanoides* tested. Batches inoculated with the mtDNA patterns B, C1, E, F and K of *D. hansenii* showed very similar volatile compound profiles, with high levels of 3-methylbutanal, 2-methyl-1-propanol and 3-methylbutanol (Fig. 2B), but in lower amounts than the C2 and D patterns of *D. hansenii* (Table 2). The batch inoculated with the S mtDNA pattern of *C. zeylanoides* showed a similar volatile compound production than batches inoculated with the B, C1 and E mtDNA patterns of *D. hansenii*, although the S pattern showed a significantly higher level of sulphur compounds than the C2 and D patterns of *D. hansenii* (Table 2). The H and I patterns of *C. zeylanoides* produced less volatile compounds than the other patterns tested.

In conclusion, the development of the model medium has made it possible to detect relevant differences in volatile compound production by different yeast biotypes usually found in dry-cured meat products. This could be extended to the selection of yeast strains by volatile compound production. The examination of 117 autochthonous *D. hansenii* and *C. zeylanoides* strains isolated from the 4 PDO of dry-cured Iberian ham, revealed marked differences in volatile compound production between *D. hansenii* and *C. zeylanoides* and between different mtDNA patterns of these species. The C2 and D mtDNA patterns of *D. hansenii* had the highest production of the volatile compounds involved in dry-cured flavour. These mtDNA patterns of *D. hansenii* should be targeted for use as starter cultures in dry-cured ham.

## Acknowledgements

This work is part of projects AGL2001-0804 and AGL2004-3291 funded by the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. M. J. Andrade was the recipient of a Grant of the Regional Government of Junta de Extremadura (Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología).

## References

- Andrade, M. J., Rodríguez, M., Sánchez, B., Aranda, E., & Córdoba, J. J. (2006). DNA typing methods for differentiation of yeast related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, *107*, 48–58.
- Arfi, K., Spinnler, H. E., Tache, R., & Bonnarme, P. (2002). Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: Requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *58*, 503–510.
- Arrizon, J., Fiore, C., Acosta, G., Romano, P., & Gschaedler, A. (2005). Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, *89*, 181–189.
- Boelens, M. H., & van Gemert, L. J. (1993). Volatile character-impact sulphur compounds and their sensory properties. *Perfumer and Flavorist*, *18*, 29–39.
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, *23*, 415–437.
- Carrapiso, A. I., Ventanas, J., & García, C. (2002). Characterization of the most odor-active compound of Iberian ham headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *27*, 1996–2000.
- Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., Ventanas, J., López, C., & Asensio, M. A. (1994a). Evolution of free amino acids and amines during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*, 2296–2301.
- Córdoba, J. J., Antequera, T., Ventanas, J., López, C., García, C., & Asensio, M. A. (1994b). Hydrolysis and loss of extractability of proteins during ripening of Iberian ham. *Meat Science*, *37*, 217–227.
- Durá, M. A., Flores, M., & Toldrá, F. (2004). Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on *Debaryomyces* spp. generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. *Food Chemistry*, *86*, 391–399.
- Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, *40*, 1027–1047.
- Flores, C.-L., Rodríguez, C., Petit, T., & Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*, 507–529.
- Flores, M., Grimm, C. C., Toldrá, F., & Spanier, A. M. (1997). Correlation of sensory and volatile compounds of Spanish "Serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2178–2186.
- Flores, M., Spanier, A. M., & Toldrá, F. (1998). Flavour analysis of dry-cured ham. In F. Shahidi (Ed.), *Flavour of meat, meat products and seafoods* (pp. 320–341). Blackie Academic & Professional: Glasgow.
- Huerta, T., Hernández, J., Guamis, B., & Hernández, E. (1988). Microbiological and physico-chemical aspects in dry-salted Spanish ham. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene*, *143*, 475–482.
- López del Castillo-Lozano, M., Delile, A., Spinnler, H. E., Bonnarme, P., & Landaud, S. (2007). Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *75*, 1447–1454.
- Martín, A., Córdoba, J. J., Rodríguez, M. M., Núñez, F., & Asensio, M. A. (2001). Evaluation of microbial proteolysis in meat products by capillary electrophoresis. *Journal of Applied Microbiology*, *90*, 163–171.
- Martín, A., Córdoba, J. J., Benito, M. J., Aranda, E., & Asensio, M. A. (2003). Effect of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* on the volatile compounds during controlled ripening of pork loins. *International Journal of Food Microbiology*, *84*, 327–338.
- Martín, A., Córdoba, J. J., Aranda, E., Córdoba, M. G., & Asensio, M. A. (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, *110*, 8–18.
- Martín, L., Antequera, T., Ventanas, J., Benítez-Donoso, R., & Córdoba, J. J. (2001). Free amino acid and other non-volatile compounds analysis during processing of Iberian ham. *Meat Science*, *59*, 363–368.
- Núñez, F., Rodríguez, M. M., Córdoba, J. J., Bermúdez, M. E., & Asensio, M. A. (1996a). Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*, *29*, 271–280.
- Núñez, F., Rodríguez, M. M., Córdoba, J. J., Bermúdez, M. E., & Asensio, M. A. (1996b). Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*, *32*, 185–197.
- Petrón, M. J., Muriel, E., Timón, M. L., Martín, L., & Antequera, T. (2004). Fatty acids and triacylglycerols profiles from different types of Iberian dry-cured hams. *Meat Science*, *68*, 71–77.
- Regodón Mateos, J. A., Pérez Nevado, F., & Ramírez Fernández, M. (2006). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*, 151–157.
- Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J. J., Sanabria, C., Bermúdez, E., & Asensio, M. A. (1994). Characterization of *Staphylococcus* spp. and *Micrococcus* spp. isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, *24*, 329–335.
- Rodríguez, M. M., Núñez, F., Córdoba, J. J., Bermúdez, M. E., & Asensio, M. A. (1998). Evaluation of proteolytic activity of microorganisms isolated from dry-cured ham. *Journal of Applied Microbiology*, *85*, 905–912.
- Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J., & Jensen, M. T. (1998). Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in meat product: Dry-cured Iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4688–4694.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, *52*, 19–27.
- Schoondermark-Stolk, S. A., Jansen, M., Verkleij, A. J., Verrips, C. T., Euvierink, G. J. W., Dijkhuizen, L., et al. (2006). Genome-wide transcription survey on flavour production in *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*, 1347–1356.
- Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., & Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science*, *57*, 813–815.
- Yvon, M., Berthelot, S., & Gripon, J. C. (1998). Adding  $\alpha$ -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *International Dairy Journal*, *8*, 889–898.





**III.4. Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compound production**



**Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compound production**

M.J. Andrade, M. Rodríguez, E.M. Casado, E. Bermúdez, J.J. Córdoba\*

Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n. 10071-Cáceres, Spain.

\*Corresponding author: Tel.: +34 927 257 125; fax: +34 927 257 110.

*E-mail address:* jcordoba@unex.es

*URL:* <http://higiene.unex.es/>

**Keywords:** yeast, mtDNA restriction analysis, RAPD-PCR, volatile compounds, dry-cured ham

**Running title:** Yeast differentiation by mtDNA, RAPD and volatiles

### **Abstract**

The efficiency of mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis, RAPD-PCR and volatile compound analysis to differentiate yeast biotypes involved in flavor development of dry-cured Iberian ham throughout the ripening process is evaluated. For this purpose, eighty six yeasts isolated from Iberian hams in the main ripening stages at different industries of the four Protected Designations of Origin of this product, were used. The combination of mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR using the primer (GACA)<sub>4</sub> showed a higher variability in the yeast species detected than obtained using only mtDNA restriction analysis. Only two species, Debaryomyces hansenii and Candida zeylanoides, were identified throughout the whole ripening process and a wide diversity of biotypes was found in these two species, predominating those of D. hansenii. Clear differences between biotypes were detected in the volatile compound generation, showing the biotype C2-2 of D. hansenii the highest concentrations of volatiles. The combined use of mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR allows to distinguish yeast biotypes with different production of volatile compounds. In addition, analysis of the volatile compound production profile is needed to differentiate yeast strains of the same biotype. Thus, the combination of these three methods could be very useful to select or monitoring yeasts as starter cultures in dry-cured meat products.

## 1. Introduction

Dry-cured Iberian ham is a traditional meat product obtained by a process that involves 18-24 months of ripening. During this long period, an uncontrolled microbial population proliferates on the product. Yeasts are one of the predominant groups among this microbial population throughout most of the maturation process (Núñez et al. 1996). Debaryomyces hansenii and Candida zeylanoides have been reported to be the most abundant yeast species in this product (Núñez et al. 1996). Some studies carried out with different yeast strains have shown their influence on the development of the characteristic flavor of dry-cured meat products (Jessen, 1995; Durá et al. 2004; Flores et al. 2004; Martín et al. 2006). Furthermore, differences in flavor development associated to particular yeast species and biotypes growing on hams have been recently reported (Andrade et al. 2009). Thus, flavor of dry-cured Iberian ham can be related to particular biotype of yeasts that participate in its maturation. Consequently, it should be of great interest to differentiate the main yeast biotypes growing on Iberian hams throughout the ripening process in relation to the production of volatile compounds involved in flavor development.

Mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis and random amplification of polymorphic DNA (RAPD)-PCR have been extensively used as individual techniques to discriminate yeasts from different food products at strain level (Fernández-Espinar et al. 2001; Petersen et al. 2001; Vasdinyei and Deák 2003; Martorell et al. 2005; Cocolin et al. 2006; Nikolau et al. 2007; Walczak et al. 2007). The combination of both methods could be very useful for routine differentiation of yeast biotypes that usually grow on dry-cured meat products with a long time of ripening, such as dry-cured Iberian ham. Furthermore, the volatile compound generation may also be used to differentiate yeast biotypes that grow on hams during the ripening process.

The analysis of the volatile compound production by multiple yeast strains in dry-cured Iberian ham is not feasible as a routine method because a great number of pieces of products would have to be kept as sterile samples to be inoculated. A more practical method would be to use a culture medium that emulates the composition of dry-cured ham throughout the ripening process. A medium composed by oleic acid, ribose, creatine and free amino acids has been reported as appropriated to evaluate the generation of volatile compound by yeast isolates from dry-cured ham (Andrade et al. 2009).

The aim of this work is to investigate the efficiency of mtDNA restriction analysis, RAPD-PCR and volatile compound analysis to differentiate yeast biotypes involved in flavor development of dry-cured Iberian ham throughout the ripening process. In addition the distribution of yeast biotypes in the main ripening stages of this meat product will be determined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Molecular differentiation of yeast isolates

Eighty six yeast isolates collected from the surface of dry-cured Iberian hams in the main ripening stages (post-salting and drying-cellar) were used in this study. These strains were taken from hams belonging to different industries each of the four Spanish Protected Designations of Origin (PDO) of dry-cured Iberian ham (“Guijuelo” PDO, “Jamón de Huelva” PDO, “Dehesa de Extremadura” PDO and “Los Pedroches” PDO). They were purified by repeated cultivation on malt extract agar (MEA) (2% malt extract, 2% glucose, 0.1% peptone, 2% agar) and differentiated by mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR using the microsatellite primer (GACA)<sub>4</sub> at strain level (Andrade et al. 2006).

Thirty five yeast reference strains from the Spanish Type Culture Collection (CECT), belonging to *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Pichia carsonii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*, were used for comparison with dry-cured Iberian ham isolates. Identification of representative strains of the mtDNA restriction patterns obtained were assured by 18S rDNA sequencing.

### 2.2. Differentiation of yeast isolates by their volatile compound production

#### 2.2.1. Inoculation of culture medium

All yeast isolates were inoculated at  $10^6$  cfu mL<sup>-1</sup> in a culture medium prepared as described previously Andrade et al. (2009). Then, the cryotubes containing the inoculated medium were incubated for 30 days at 25°C with shaking. Three replicates for each yeast isolate were used. Uninoculated culture medium was used as control and it was grown in the same conditions as the inoculated samples.

After 30 days of incubation, microbial counts in the control samples were detected on Plate Count Agar (PCA) and no growth was found in any of them. Regarding the

inoculated samples, yeast counts were determined on MEA and levels higher than  $10^7$  cfu mL<sup>-1</sup> were detected.

### 2.2.2. Extraction and analysis of volatile compounds

At the end of the incubation period, the cryotubes with the culture medium were maintained at -80°C until analysis. Aliquots of 1 mL of culture medium were placed in a 5 mL headspace vial (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) and sealed with a PTFE butyl septum (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) in an aluminium cap. The extraction of volatile compounds was performed by Solid-phase micro-extraction technique (SPME) (Ruiz et al. 1998), using a 100 µm carboxen/polydimethylsiloxane fibre (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The SPME fibre was inserted into the headspace vial through the septum and exposed to headspace for 45 min at 42°C in a water bath with stirring. Prior to collection of volatiles, the fibre was preconditioned at 220°C for 50 min in the GC injection port.

GC/MS analyses were performed using a Hewlett-Packard 5890 S II gas chromatograph coupled with a Hewlett-Packard 5971A ion-trap mass spectrometer. A 5% phenyl-95% dimethyl polysiloxane column (50m x 0.32 mm ID, 1.05 µm film thickness; Hewlett-Packard) was used for the separation of volatile compounds. Helium was used as carrier gas. The injection port was in a splitless mode. The SPME fibre was kept in the injection port at 220°C during the whole chromatographic run. The temperature program was isothermal for 15 min at 35°C, next increased to 150°C at 4°C min<sup>-1</sup>, and then to 250°C at 20°C min<sup>-1</sup>. The GC/MS transfer line temperature was 280°C. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode, with electron energy of 70 eV, a multiplier voltage of 1650 V and a rate of 1 scan s<sup>-1</sup> over a range of m z<sup>-1</sup> 40-300 for data collection.

### 2.3. Data analysis

Dendrograms were built using the program NTSYS-Pc (version 2.0). The similarities between molecular profiles were determined by the Dice coefficient. Clustering analysis was based on the unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA method).

The volatile compound identification was achieved by comparing their mass spectra with the NIST/EPA/NIH library. Besides, the Kovats indexes, calculated for each peak with reference to n-alkanes (Sigma R-8769) run under the same above conditions, were

used to the identification. Then, statistical analysis was performed using the software SPSS for Windows (version 15.0). ANOVA and a subsequent Tukey test were used to determine significant differences ( $P < 0.05$ ) among the different molecular biotypes for every volatile compounds.

### 3. Results

#### 3.1. Differentiation of yeast isolates from dry-cured Iberian ham by mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR

The analysis of mtDNA restriction fragments of the 86 yeast isolates, which ranged from 10.0 to 1.0 kbp approximately (data not shown), revealed 10 different patterns that were designated as B, C1, C2, D, E, F, H, K, O and S (Fig. 1). These mtDNA restriction patterns were compared with those of the yeast reference strains from the CECT. The D and E patterns showed the same profile as the type strains of *D. hansenii* CECT 10026 and CECT 10360, respectively. Similarly, the H restriction pattern presented the same profile as the reference strains of *C. zeylanoides* CECT 1441 and CECT 10128. Besides, the F and B restriction patterns showed a high similarity with *D. hansenii* CECT 10360. The remaining mtDNA restriction profiles presented a low similarity with reference yeast strains being tentatively characterized as those species (Fig. 1).

When the 18S rDNA sequencing was used to confirm the characterization at species level obtained by mtDNA restriction analysis, the H, O and S profiles were identified as *C. zeylanoides* and the remaining as *D. hansenii*. These results were in total accordance with the tentative characterization done with mtDNA restriction analysis (Table 1).

To discriminate among the yeast strains that showed the same mtDNA restriction pattern, RAPD-PCR with the primer (GACA)<sub>4</sub> was applied. Thus, all the yeast isolates tested by mtDNA restriction analysis also were differentiated by means of RAPD-PCR. The size of the amplification products obtained ranged from 3.5 to 0.2 kbp approximately (data not shown). Different RAPD-PCR profiles were obtained in each mtDNA restriction pattern. Thus, 3 different profiles were detected in the C1 and 2 in the B, C2, E and H mtDNA restriction patterns (Fig. 2). However, no different patterns were detected in the D, F, K, O and S mtDNA restriction profiles (Table 1).



Consequently, a total of 16 different yeast biotypes were established after combining mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR (Fig. 2).

### *3.2. Distribution of yeast biotypes obtained by mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR throughout the dry-cured Iberian ham ripening*

The distribution of yeast biotypes obtained by mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR was analyzed to know the evolution of the yeast population throughout the ripening of dry-cured Iberian ham (Table 1). Only 8 of the 16 biotypes detected were found in the post-salting stage, whereas 13 biotypes were presented in the drying-cellar stage.

The H1, H2 and S1 biotypes of *C. zeylanoides* were present only in the post-salting. The *D. hansenii* B2, C1-1, C1-2, C1-3, C2-2, E1 and F1, and *C. zeylanoides* O1 biotypes were detected only in the drying-cellar stage (Table 1). From the remaining biotypes isolated throughout the whole ripening process, only the D1 biotype of *D. hansenii* was detected in the same proportion in the two stages of the process. A decrease in the number of isolates from K1 of *D. hansenii* was observed during the ripening. On the contrary, more isolates of B1, C2-1 and E2 of *D. hansenii* were detected in drying-cellar than in post-salting stage. The *D. hansenii* D1 was the predominant biotype in the post-salting and the *D. hansenii* B1 in the drying-cellar (Table 1).

### *3.3. Differentiation of yeast isolates from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production*

All of the 86 yeast isolates were tested in triplicate by the production of volatile compounds. Means of volatile compounds were calculated for each yeast biotype differentiated by mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR in both ripening stages, post-salting (P) and drying-cellar (DC) (Table 2).

A total of 47 volatile compounds were identified and quantified in the culture medium, some of which were found in trace amounts. They were grouped according to their probable origins as amino acid catabolism (22), lipid oxidation (10), microbial esterification (5) and carbohydrate fermentation products (1). The remaining volatile compounds were grouped as "unknown origin or contaminants" (9) (Table 2).

Branched aldehydes and alcohols derived from amino acid catabolism, such as 3- and 2-methylbutanal, 3- and 2-methylbutanol, 2-methyl-2-pentanol and 2-methyl-1-propanol, were detected in significant higher amount in some of the inoculated batches

than in the control batch (Table 2). However, the branched ethylbenzaldehyde was found in the greatest significant level in the uninoculated batch. These compounds were detected in the highest quantities in the batch inoculated with the D. hansenii C2-2 biotype from the drying-cellar stage. 2-methylbutanoic acid was found only at very low concentrations in some inoculated batches.

Sulphur volatile compounds were identified in all batches, though not all of them were always detected (Table 2). Thus, 3-methylthio-1-propanol, methanethiol and dimethyltrisulphide were not detected in the control batch, showing significant differences with some of the inoculated batches. The C. zeylanoides S1-P biotype presented the highest overall amount of sulphur compounds, mainly of dimethyldisulphide which was the most abundant in almost all remaining batches including the control batch. On the contrary, the D. hansenii C1-2-DC, C1-3-DC and F1-DC, and C. zeylanoides H1-P and H2-P biotypes showed very low production of sulphur compounds (Table 2).

Inside the volatile compounds from lipid oxidation, only the three methylketones identified and hexane were detected in the uninoculated batch (Table 2). The compounds 2- and 3-methylpentane, 2-propanone, 2-butanone, 2-pentanone, butanal and methylbenzene were detected in significant higher amount in some of the inoculated batches than in the control batch. The D. hansenii E1-DC biotype showed the greatest production for most of the hydrocarbons despite the branched 3-methylhexane and methylcyclohexane were absence in it.

Several esters were found in all batches, excepting the batch inoculated with the D. hansenii F1-DC biotype (Table 2). Ethanethioic acid, S-methyl ester was the most abundant in the majority of the inoculated batches.

When the volatile compound generation by the different yeast biotypes detected in both post-salting and drying-cellar stages was compared, generally those isolated from the drying-cellar showed higher levels of volatile compounds than those from the post-salting (Fig. 3). However, the B1 biotype generated lower amounts of amino acid catabolism, lipid oxidation and microbial esterification products when it was isolated from the drying-cellar than from the post-salting. The D. hansenii C2-2 biotype from the drying-cellar stage showed the highest quantities of volatile compounds with origin in catabolism of amino acids and microbial esterification (Fig. 3). This biotype and the D. hansenii E1 from the drying-cellar showed the greatest levels of compounds derived from lipid oxidation.

#### 4. Discussion

Mitochondrial DNA restriction analysis proved to be a reliable method to differentiate yeasts isolated from dry-cured Iberian ham at species level, since tentative characterization obtained with this method was confirmed by 18S rDNA sequencing. The combination of mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR using the primer (GACA)<sub>4</sub> showed a higher variability in the tested species than obtained using only the mtDNA restriction analysis. This allowed a better differentiation of yeasts at strain level. Several studies have reported the efficiency of mtDNA restriction analysis for typing yeasts (Torriani et al. 1999; Fernández-Espinar et al. 2001; Martorell et al. 2005; Andrade et al. 2006; Nikolaou et al. 2007; Jeyaram et al. 2008). From the results of this work, it could be added that the combination of this method with RAPD-PCR is useful in the analysis of the diversity of yeast biotypes that usually grow on dry-cured meat products with long ripening period, such as the dry-cured Iberian ham.

Only two species of yeasts were identified in dry-cured Iberian ham in the present study. These species were D. hansenii and C. zeylanoides, predominating D. hansenii during the whole maturation process. This species is found among the most frequent yeasts in several types of meat products, including dry-cured ham (Comi and Cantoni 1983; Núñez et al. 1996; Simoncini et al. 2007). Debaryomyces maramus, Rhodotorula rubra, P. carsonii or Candida famata, reported occasionally in dry-cured meat products (Núñez et al. 1996; Simoncini et al. 2007), were not detected in the present work. Thus, there was a low diversity of species in the yeast population growing on dry-cured Iberian ham throughout the ripening. However, a wide variety was found at strain level.

Many biotypes of D. hansenii were found during the whole ripening process. On the contrary, most of the biotypes of C. zeylanoides were isolated in the post-salting stage and only the biotype O1 was found in the drying-cellar stage. These results agree with that previously reported that indicate a higher adaptation of D. hansenii than C. zeylanoides to maturation conditions of dry-cured meat products (Núñez et al. 1996; Encinas et al. 2000; Cocolin et al. 2006). Higher number of yeast biotypes was detected in the drying-cellar than in the post-salting, probably due to longer duration of the former stage than the post-salting. Some biotypes were detected in only one ripening stage. This happened in the post-salting with most of the biotypes of C. zeylanoides, while in the drying-cellar stage most of the biotypes exclusively detected were belonging to D. hansenii. This confirms the higher adaptation of D. hansenii than C.

zeylanoides to maturation conditions of dry-cured Iberian ham. Thus, the biotypes of D. hansenii seem to be more appropriated to be selected as starter cultures.

Regarding to the differentiation of yeast biotypes according to their volatile compound production, it can be observed that most of the tested biotypes generated branched aldehydes and alcohols, such as 3- and 2-methylbutanal and 3- and 2-methylbutanol, showing the biotype C2-2 of D. hansenii the highest concentrations. These compounds derive from the branched amino acids valine, isoleucine and leucine, as result of Strecker degradation (Ventanas et al. 1992) or microbial metabolism (Durá et al. 2004; Martín et al. 2006) and they have been reported to contribute significantly to the overall flavor of dry-cured hams (Ruiz et al. 1999; Carrapiso et al. 2002; Martín et al. 2006). Thus, these volatile compounds could be used to differentiate yeast biotypes of interest in dry-cured Iberian ham flavor development.

Some of the detected biotypes produced sulphur volatile compounds, especially 3-methylthio-1-propanol, methanethiol and dimethyldisulphide, being showed the highest production by the C. zeylanoides S1 biotype. These compounds, derived from sulphur amino acids such as methionine, contribute actively to both the flavors and off-flavors of foodstuffs (Boelens and van Gemert 1993; López del Castillo-Lozano et al. 2007). Evidence of the yeast contribution to generating sulphur volatile compounds has been previously reported (Spinnler et al. 2001; Arfi et al. 2002; López del Castillo-Lozano et al. 2007).

Most of the detected yeast biotypes produced volatile compounds derived from lipid oxidation, although in lower amounts than those from amino acid catabolism. The compounds 2- and 3-methylpentane, 2-propanone, 2-butanone, 2-pentanone, butanal and methylbenzene, produced in higher amounts by some yeast biotypes, have been reported to add pleasant flavor to dry-cured meat products (Carrapiso et al. 2002). Thus, these volatile compounds could also be used to differentiate yeast biotypes of interest in dry-cured Iberian ham flavor development.

Esters were produced by the majority of the assayed yeast biotypes, being detected in the highest amount in the D. hansenii C2-2 biotype. Several authors have found that yeasts promote the ester generation from the esterification of carboxylic acids and alcohols (Shahidi et al. 1986; Olesen and Stahnke 2000; Flores et al. 2004). Esters, mainly ethyl esters, have been reported as essential volatile compounds for the typical aroma of dry-cured meat products (Meynier et al. 1999) because of their characteristic fruity

notes, their low odour threshold values (Stahnke, 1994) and their contribution to mask rancid odours (Stahnke, 1994; Careri et al. 1993). Their presence, together with 3-methylbutanal, has been associated with a “ripened flavor” (Barbieri et al. 1992; Careri et al. 1993) and could be appropriated to differentiate yeast biotypes of interest in flavor development of dry-cured Iberian ham.

Clear differences between yeast biotypes were detected in the volatile compound generation, being showed the greatest concentrations by the biotypes C2-2 of D. hansenii and S1 of C. zeynaloides. Andrade et al. (2009) found the highest production of volatile compounds in the C2 and E mtDNA restriction biotypes of D. hansenii and S of C. zeynaloides. Therefore, the combined use of mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR allows to distinguish yeast biotypes with different production of volatile compounds that could not be using only of mtDNA restriction analysis. Both methods could be very useful as routine techniques for the selection of yeasts of interest in flavor development.

When the volatile compound production of detected yeast biotypes was compared by stage of ripening, in general the biotypes isolated from the drying-cellar stage produced higher amounts than those recovered in the post-salting. Biotypes from the drying-cellar stage produced the highest levels of branched alcohols and aldehydes, hydrocarbons, esters and ketones. These differences were found even within the same biotype and obviously could not be detected by mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR. Thus, additional analysis of the volatile compound production profile is needed to differentiate yeast strains of the same biotype. The combination of these three methods may allow to select yeast biotypes with high production of volatile compounds involved in flavor development of dry-cured Iberian ham, such as the biotype C2-2 from the drying-cellar stage detected in the present study.

In conclusion, the importance of the combination of RAPD-PCR with mtDNA restriction analysis as routine method to differentiate yeast biotypes of interest throughout the ripening process of dry-cured Iberian ham, was demonstrated in the present work. Clear differences between molecular biotypes were found in the production of volatile compounds, being detected the highest levels in the biotype C2-2 of D. hansenii. Analysis of the volatile compound generation should be added to mtDNA restriction analysis and RAPD-PCR to differentiate strains of the same yeast biotype. The combination of these three methods could be very useful to select or monitoring yeasts as starter cultures in dry-cured meat products.

## Acknowledgements

This work is part of projects AGL2001-0804 and AGL2004-3291 funded by the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. M. J. Andrade was the recipient of a fellowship of the Regional Government of Junta de Extremadura (Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología).

## References

- Andrade, M.J., Rodríguez, M., Sánchez, B., Aranda, E. and Córdoba, J.J., 2006. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 48-58
- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Sánchez, B., Casado, E.M. and Rodríguez, M., 2009. Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production. *Food Chem.* 113, 457-463.
- Arfi, K., Spinnler, H.E., Tache, R. and Bonnarme, P., 2002. Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 503-510.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Careri, M. and Mangia, A., 1992. Flavour compounds of dry-cured hams. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2389-2394.
- Boelens, M.H. and van Gemert, L.J., 1993. Volatile character-impact sulphur compounds and their sensory properties. *Perfumer Flavorist.* 18, 29-39.
- Careri, M., Mangia, A., Barbieri, G., Bolzoni, L., Virgili, R. and Parolari, G., 1993. Sensory property relationship to chemical data of Italian type dry-cured ham. *J. Food Sci.* 58, 968-972.
- Carrapiso, A.I., Ventanas, J. and García, C., 2002. Characterization of the most odor-active compound of Iberian ham headspace. *J. Agric. Food Chem.* 27, 1996-2000.
- Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C. and Comi, G., 2006. Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Res.* 6, 692-701.
- Comi, G. and Cantoni, C., 1983. Yeasts in dry Parma hams. *Industrie Alimentari* 22, 102-104.

- Durá, M.A., Flores, M. and Toldrá, F., 2004. Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on Debaryomyces spp. generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. *Food Chem.* 86, 391-399.
- Encinas, J.P., Lopez-Díaz, T.M., García-Lopez, M.L., Otero, A. and Moreno, B., 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* 54, 203-208.
- Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E. and Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 1-10.
- Flores, M., Durá, M.A., Marco, A. and Toldrá, F., 2004. Effect of Debaryomyces spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Sci.* 68, 439-446.
- Jessen, B., 1995. Starter cultures for meat fermentation. In: Campbell-Platt, G., Cook, P. E. (Eds.), *Fermented meats*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp. 130-159.
- Jeyaram, K., Mohendro Singh, W., Capece, A. and Romano, P., 2008. Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' - A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 115-125.
- López del Castillo-Lozano, M., Delile, A., Spinnler, H.E., Bonnarme and P., Landaud, S., 2007. Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures. *Appl. Microbiol. Biotech.* 75, 1447-1454.
- Meynier, A., Novelli, E., Chizzolini, R., Zanardi, E. and Gandemer, G., 1999. Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Sci.* 51, 175-183.
- Nikolaou, E., Andrighetto, C., Lombardi, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N., 2007. Heterogeneity in genetic and phenotypic characteristics of Saccharomyces cerevisiae strains isolated from red and white wine fermentations. *Food Control* 18, 1458-1465.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G. and Asensio, M.A., 2006. Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 8-18.
- Martorell, P., Fernández-Espinar, M.T. and Querol, A., 2005. Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 293- 302.

- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E. and Asensio, M.A., 1996. Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 271-280.
- Olesen, P.T. and 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.
- Petersen, K.M., Moller, P.L. and Jespersen, L., 2001. DNA typing methods for differentiation of Debaryomyces hansenii strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 11-24.
- Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J. and Jensen, M.T., 1998. Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in meat product: dry-cured Iberian ham. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4688-4694.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. and García, C., 1999. Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Sci.* 52, 19-27.
- Shahidi, F., Rubin, L.J. and D'Souza L.A., 1986. Meat flavor volatiles: a review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 24, 141-243.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R. and Quintavalla. S., 2007. Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiol.* 24, 577-584.
- Spinnler, H.E., Berger, C., Lapadatescu, C. and Bonnarme, P., 2001. Production of sulphur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11, 245-252.
- Stahnke, L. H., 1994. Aroma components from dried sausages fermented with Staphylococcus xylosus. *Meat Sci.* 38, 39-53.
- Torriani, S., Zapparoli, G. and Suzzi, G., 1999. Genetic and phenotypic diversity of Saccharomyces sensu stricto strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 207-215.
- Vasdinyei R. and Deák T., 2003. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 123-130.



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

Walczak, E., Czaplinska, A., Barszczewski, W., Wilgosz, M., Wojtatowicz, M. and Robak, M., 2007. RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of Candida genus yeasts isolated in brewing. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 305-312.

Table 1. Distribution of yeast biotypes, obtained by mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis and RAPD-PCR with primer (GACA)<sub>4</sub>, throughout ripening process of dry-cured Iberian ham. Yeast identification by 18S rDNA sequencing also is reported.

Ripening stages	mtDNA restriction patterns	RAPD patterns	Yeast biotypes	Identification by 18S rDNA sequencing	Frequency of isolates (%)
Post-salting	B	1	B1	<u>D. hansenii</u>	4.7
	C2	6	C2-1	<u>D. hansenii</u>	3.5
	D	7	D1	<u>D. hansenii</u>	9.3
	E	2	E2	<u>D. hansenii</u>	3.5
	H	9	H1	<u>C. zeylanoides</u>	5.8
	H	10	H2	<u>C. zeylanoides</u>	2.3
	K	2	K1	<u>D. hansenii</u>	2.3
	S	6	S1	<u>C. zeylanoides</u>	2.3
Drying-cellar	B	1	B1	<u>D. hansenii</u>	11.6
	B	2	B2	<u>D. hansenii</u>	2.3
	C1	3	C1-1	<u>D. hansenii</u>	8.1
	C1	4	C1-2	<u>D. hansenii</u>	3.5
	C1	5	C1-3	<u>D. hansenii</u>	3.5
	C2	6	C2-1	<u>D. hansenii</u>	7.0
	C2	1	C2-2	<u>D. hansenii</u>	2.3
	D	7	D1	<u>D. hansenii</u>	9.3
	E	8	E1	<u>D. hansenii</u>	3.5
	E	2	E2	<u>D. hansenii</u>	5.8
	F	3	F1	<u>D. hansenii</u>	2.3
	K	2	K1	<u>D. hansenii</u>	2.3
	O	6	O1	<u>C. zeylanoides</u>	4.7

Table 2. Volatile compounds generated in the culture medium by different yeast biotypes, detected by mitochondrial DNA restriction analysis and RAPD-PCR, throughout the ripening process of dry-cured Iberian ham. Means of volatile compounds were calculated from the strains analyzed for each yeast biotype in both ripening stages, the post-salting (P) and the drying-cellar (DC)<sup>a</sup>.

Compound/origin	Yeast biotypes											
	Control <sup>b</sup>	BI-P	BI-DC	B2-DC	CI-1-DC	CI-2-DC	CI-3-DC	C2-1-P	C2-1-DC	C2-2-DC	DI-P	DI-DC
<i>Amino acid catabolism</i>												
2-Methyl-1-propanol	n.d.	21.34 <sup>ab</sup>	5.09 <sup>a</sup>	12.01 <sup>ab</sup>	18.56 <sup>ab</sup>	2.09 <sup>ab</sup>	0.74 <sup>ab</sup>	13.62 <sup>ab</sup>	25.25 <sup>ab</sup>	45.95 <sup>b</sup>	10.88 <sup>ab</sup>	
2-Methyl-2-propanol	n.d.	9.70	3.87	2.66	3.95	0.10	0.96	4.19	7.11	19.64	3.50	
2-Methyl-1-pentanol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	n.d.	n.d.	n.d.	1.19	n.d.	n.d.	
2-Methyl-2-pentanol	n.d.	n.d.	0.20 <sup>ab</sup>	0.29 <sup>ab</sup>	0.55 <sup>ab</sup>	n.d.	0.12 <sup>ab</sup>	0.34 <sup>ab</sup>	0.29 <sup>ab</sup>	2.02 <sup>b</sup>	0.14 <sup>ab</sup>	
2-Methylbutanol	n.d.	53.29 <sup>abc</sup>	11.18 <sup>ac</sup>	13.38 <sup>abc</sup>	31.33 <sup>abc</sup>	6.03 <sup>ac</sup>	1.27 <sup>ac</sup>	28.54 <sup>abc</sup>	67.58 <sup>bc</sup>	117.82 <sup>b</sup>	8.14 <sup>ac</sup>	
3-Methylbutanol	n.d.	59.65 <sup>ab</sup>	33.79 <sup>ab</sup>	14.51 <sup>ab</sup>	62.62 <sup>ab</sup>	17.31 <sup>ab</sup>	8.60 <sup>ab</sup>	86.47 <sup>ab</sup>	73.09 <sup>ab</sup>	144.11 <sup>b</sup>	22.55 <sup>ab</sup>	
3-Methylthio-1-propanol	n.d.	0.05 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>	n.d.	1.65 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0.09 <sup>a</sup>	4.01 <sup>b</sup>	n.d.	
2-Methylpropanal	n.d.	0.35	0.96	2.21	0.84	0.78	n.d.	2.29	1.59	7.05	1.10	
3-Methylthio-1-propanal	0.08 <sup>a</sup>	n.d.	0.05 <sup>a</sup>	0.18 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0.12a	0.04 <sup>a</sup>	0.81 <sup>b</sup>	n.d.	
2-Methylbutanal	0.06 <sup>a</sup>	4.77 <sup>ab</sup>	1.16 <sup>ab</sup>	5.81 <sup>ab</sup>	3.42 <sup>ab</sup>	1.32 <sup>ab</sup>	n.d.	8.59 <sup>ab</sup>	14.04 <sup>ab</sup>	22.03 <sup>b</sup>	3.14 <sup>ab</sup>	
3-Methylbutanal	0.28 <sup>a</sup>	7.16 <sup>ab</sup>	3.54 <sup>a</sup>	7.43 <sup>ab</sup>	5.24 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a</sup>	0.47 <sup>a</sup>	9.79 <sup>ab</sup>	12.94 <sup>ab</sup>	31.41 <sup>b</sup>	7.15 <sup>a</sup>	
2-Methylbutanoic acid	n.d.	0.68	0.03	0.37	0.02	n.d.	n.d.	n.d.	0.14	0.19	n.d.	
Methanethiol	n.d.	3.97 <sup>ab</sup>	1.70 <sup>a</sup>	2.12 <sup>ab</sup>	2.16 <sup>ab</sup>	0.35 <sup>ab</sup>	0.25 <sup>ab</sup>	5.48 <sup>ab</sup>	5.78 <sup>ab</sup>	14.24 <sup>b</sup>	2.76 <sup>ab</sup>	
Dimethyldisulphide	1.21 <sup>a</sup>	13.77 <sup>a</sup>	19.83 <sup>a</sup>	32.11 <sup>ab</sup>	51.19 <sup>ab</sup>	n.d.	0.03 <sup>a</sup>	37.77 <sup>abc</sup>	56.81 <sup>abc</sup>	167.34 <sup>b</sup>	36.80 <sup>a</sup>	
Dimethyltrisulphide	n.d.	0.16	0.07	n.d.	0.43	n.d.	n.d.	0.34	0.05	0.66	0.28	
Carbondisulphide	0.18 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>	n.d.	0.82 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	0.27 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0.11 <sup>a</sup>	
Benzeneethanol	n.d.	1.61 <sup>ac</sup>	3.92 <sup>ac</sup>	6.52 <sup>ac</sup>	14.31 <sup>ac</sup>	2.44 <sup>ac</sup>	1.15 <sup>ac</sup>	9.18 <sup>ac</sup>	20.88 <sup>bc</sup>	46.35 <sup>b</sup>	6.25 <sup>ac</sup>	
Benzeneacetaldehyde	0.80 <sup>a</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.29 <sup>a</sup>	0.77 <sup>ab</sup>	0.55 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	n.d.	0.58 <sup>a</sup>	0.57 <sup>a</sup>	3.80 <sup>b</sup>	0.54 <sup>a</sup>	
Ethylbenzaldehyde	7.78 <sup>a</sup>	n.d.	0.04 <sup>b</sup>	n.d.	0.11 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	0.50 <sup>ab</sup>	n.d.	0.17 <sup>ab</sup>	0.05 <sup>b</sup>	
Benzaldehyde	0.82 <sup>ab</sup>	1.79 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol	n.d.	0.06 <sup>a</sup>	4.18 <sup>a</sup>	6.76 <sup>abc</sup>	6.23 <sup>ab</sup>	0.21 <sup>a</sup>	n.d.	2.78 <sup>ab</sup>	5.63 <sup>ab</sup>	19.09 <sup>bc</sup>	2.09 <sup>a</sup>	
1,4-Bis(1,1-dimethylethyl)benzene	n.d.	0.34 <sup>a</sup>	2.19 <sup>a</sup>	1.15 <sup>ab</sup>	3.29 <sup>ab</sup>	0.38 <sup>ab</sup>	0.07 <sup>a</sup>	0.7 <sup>ab</sup>	5.96 <sup>ab</sup>	10.73 <sup>ab</sup>	0.86 <sup>a</sup>	

Table 2 (Cont.)

Compound/origin	Yeast biotypes										
	D1-DC	E1-DC	E2-P	E2-DC	F1-DC	H1-P	H2-P	K1-P	K1-DC	O1-DC	S1-P
<i>Amino acid catabolism</i>											
2-Methyl-1-propanol	19.45 <sup>ab</sup>	n.d.	13.21 <sup>ab</sup>	23.83 <sup>ab</sup>	6.20 <sup>ab</sup>	2.83 <sup>ab</sup>	3.25 <sup>ab</sup>	8.37 <sup>ab</sup>	6.40 <sup>ab</sup>	12.12 <sup>ab</sup>	13.63 <sup>ab</sup>
2-Methyl-2-propanol	8.84	n.d.	4.91	8.89	2.81	0.46	0.36	3.72	1.08	6.12	6.24
2-Methyl-1-pentanol	0.03	n.d.	0.12	0.54	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	n.d.	n.d.	n.d.
2-Methyl-2-pentanol	0.64 <sup>ab</sup>	n.d.	0.32 <sup>ab</sup>	0.44 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0.04 <sup>ab</sup>	0.13 <sup>ab</sup>	0.27 <sup>ab</sup>	n.d.
2-Methylbutanol	40.70 <sup>abc</sup>	n.d.	27.50 <sup>abc</sup>	66.61 <sup>abc</sup>	0.12 <sup>abc</sup>	n.d.	n.d.	9.46 <sup>abc</sup>	22.11 <sup>abc</sup>	41.75 <sup>abc</sup>	34.61 <sup>abc</sup>
3-Methylbutanol	68.29 <sup>ab</sup>	2.36 <sup>ab</sup>	47.52 <sup>ab</sup>	96.20 <sup>b</sup>	54.91 <sup>ab</sup>	41.39 <sup>ab</sup>	20.52 <sup>ab</sup>	33.38 <sup>ab</sup>	19.74 <sup>ab</sup>	54.33 <sup>ab</sup>	65.85 <sup>ab</sup>
3-Methylthio-1-propanol	0.34 <sup>a</sup>	n.d.	0.39 <sup>a</sup>	0.90 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.94 <sup>ab</sup>	n.d.	1.42 <sup>ab</sup>
2-Methylpropanal	3.64	0.44	1.51	4.27	0.13	0.14	n.d.	n.d.	n.d.	1.09	5.44
3-Methylthio-1-propanal	0.17 <sup>a</sup>	n.d.	0.08 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.18 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.
2-Methylbutanal	9.88 <sup>ab</sup>	n.d.	5.33 <sup>ab</sup>	9.68 <sup>ab</sup>	0.82 <sup>ab</sup>	n.d.	0.22 <sup>ab</sup>	5.70 <sup>ab</sup>	4.84 <sup>ab</sup>	n.d.	1.97 <sup>ab</sup>
3-Methylbutanal	12.42 <sup>ab</sup>	0.18 <sup>a</sup>	7.36 <sup>ab</sup>	14.69 <sup>ab</sup>	2.06 <sup>ab</sup>	3.12 <sup>ab</sup>	0.40 <sup>a</sup>	4.95 <sup>a</sup>	5.89 <sup>ab</sup>	7.06 <sup>ab</sup>	8.90 <sup>ab</sup>
2-Methylbutanoic acid	0.21	n.d.	0.11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.12	n.d.	n.d.
Methanethiol	4.78 <sup>ab</sup>	0.15 <sup>ab</sup>	3.14 <sup>ab</sup>	3.17 <sup>ab</sup>	n.d.	0.71 <sup>ab</sup>	0.59	1.06	0.51	3.76	4.41
Dimethylsulphide	59.98 <sup>abc</sup>	0.18 <sup>a</sup>	35.84 <sup>ab</sup>	3.43 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	28.53 <sup>a</sup>	13.71 <sup>ab</sup>	24.99 <sup>ab</sup>	183.96 <sup>bc</sup>
Dimethyltrisulphide	0.55	0.05	0.22	0.07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	n.d.
Carbondisulphide	0.02 <sup>a</sup>	3.74 <sup>b</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.98 <sup>ab</sup>	0.33 <sup>ab</sup>	0.03 <sup>a</sup>	n.d.	1.49 <sup>ab</sup>	0.35 <sup>ab</sup>	0.07 <sup>a</sup>	n.d.
Benzeneethanol	23.08 <sup>bc</sup>	3.07 <sup>ac</sup>	10.57 <sup>ac</sup>	19.60 <sup>abc</sup>	2.84 <sup>ac</sup>	2.65 <sup>ac</sup>	n.d.	8.65 <sup>ac</sup>	9.18 <sup>ac</sup>	20.20 <sup>abc</sup>	21.81 <sup>abc</sup>
Benzeneacetaldehyde	0.79 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	0.64 <sup>a</sup>	0.52 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0.06 <sup>a</sup>	0.64 <sup>ab</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.60 <sup>ab</sup>
Ethylbenzaldehyde	n.d.	n.d.	0.66 <sup>ab</sup>	n.d.	0.86 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0.33 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.
Benzaldehyde	n.d.	n.d.	0.18 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol	6.77 <sup>ab</sup>	0.25 <sup>a</sup>	4.03 <sup>ab</sup>	3.86 <sup>ab</sup>	0.28 <sup>ab</sup>	0.18 <sup>ab</sup>	n.d.	0.96 <sup>a</sup>	6.19 <sup>abc</sup>	18.90 <sup>c</sup>	8.91 <sup>abc</sup>
1,4-Bis(1,1-dimethylethyl)benzene	3.83 <sup>ab</sup>	0.39 <sup>ab</sup>	2.36 <sup>ab</sup>	2.17 <sup>ab</sup>	0.26 <sup>ab</sup>	0.25 <sup>ab</sup>	0.07 <sup>ab</sup>	0.53 <sup>a</sup>	2.86 <sup>ab</sup>	13.90 <sup>b</sup>	10.29 <sup>ab</sup>

Table 2 (Cont.)

Compound/origin	Yeast biotypes										
	Control <sup>b</sup>	B1-P	B1-DC	B2-DC	C1-1-DC	C1-2-DC	C1-3-DC	C2-1-P	C2-1-DC	C2-2-DC	D1-P
<i>Lipid oxidation</i>											
2-Methylpentane	n.d.	10.34 <sup>ab</sup>	0.92 <sup>a</sup>	n.d.	1.10 <sup>a</sup>	1.00 <sup>ab</sup>	0.97 <sup>ab</sup>	1.67 <sup>ab</sup>	3.29 <sup>ab</sup>	5.01 <sup>ab</sup>	4.17 <sup>ab</sup>
3-Methylpentane	n.d.	8.56 <sup>a</sup>	1.04 <sup>a</sup>	n.d.	0.56 <sup>a</sup>	0.68 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	1.66 <sup>a</sup>	2.62 <sup>a</sup>	7.22 <sup>a</sup>	2.96 <sup>a</sup>
Hexane	0.83 <sup>a</sup>	35.05 <sup>ab</sup>	11.34 <sup>a</sup>	32.54 <sup>ab</sup>	6.26 <sup>a</sup>	8.39 <sup>ab</sup>	15.00 <sup>ab</sup>	12.35 <sup>ab</sup>	12.44 <sup>ab</sup>	63.19 <sup>ab</sup>	9.85 <sup>a</sup>
3-Methylhexane	n.d.	0.84	0.13	n.d.	0.74	n.d.	n.d.	n.d.	1.17	4.06	0.33
Methylcyclohexane	n.d.	1.99	0.38	0.20	1.82	n.d.	n.d.	0.34	3.21	4.63	3.27
2-Propanone	0.99 <sup>a</sup>	16.00 <sup>ab</sup>	9.80 <sup>ab</sup>	10.07 <sup>ab</sup>	11.49 <sup>ab</sup>	2.71 <sup>ab</sup>	2.71 <sup>ab</sup>	8.89 <sup>ab</sup>	11.65 <sup>ab</sup>	35.67 <sup>b</sup>	4.26 <sup>a</sup>
2-Butanone	0.28 <sup>a</sup>	1.58 <sup>ab</sup>	6.95 <sup>ab</sup>	3.72 <sup>ab</sup>	18.94 <sup>ab</sup>	0.23 <sup>ab</sup>	0.07 <sup>ab</sup>	7.28 <sup>ab</sup>	29.90 <sup>b</sup>	9.83 <sup>ab</sup>	8.94 <sup>ab</sup>
2-Pentanone	1.21 <sup>a</sup>	8.73 <sup>ab</sup>	5.69 <sup>ab</sup>	6.02 <sup>ab</sup>	9.34 <sup>ab</sup>	2.69 <sup>ab</sup>	1.69 <sup>ab</sup>	8.78 <sup>ab</sup>	18.97 <sup>b</sup>	21.89 <sup>ab</sup>	6.90 <sup>ab</sup>
Butanal	n.d.	n.d.	0.14 <sup>abc</sup>	0.77 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0.24 <sup>ab</sup>	n.d.	0.16a	1.87 <sup>abc</sup>	0.04 <sup>a</sup>
Methylbenzene	n.d.	n.d.	6.23 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0.02 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	2.87 <sup>a</sup>
<i>Microbial esterification</i>											
Ethanoic acid, S-methyl ester	n.d.	10.21	1.07	1.36	4.41	0.06	0.04	0.85	8.71	9.67	4.60
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	0.15 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	1.43 <sup>b</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.38a	0.27 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>	n.d.	0.18 <sup>a</sup>
1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester	0.12 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.37 <sup>ab</sup>	0.39 <sup>a</sup>	0.28 <sup>ab</sup>	0.39 <sup>ab</sup>	2.64 <sup>b</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.90 <sup>ab</sup>	0.28 <sup>a</sup>
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methoxyethyl) ester	n.d.	0.03 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0.04 <sup>a</sup>	0.72 <sup>b</sup>	n.d.	0.13 <sup>ab</sup>	0.01 <sup>a</sup>	n.d.	0.02 <sup>a</sup>
Hexanedioic acid, dioctyl ester	n.d.	0.14 <sup>a</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.44 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0.69 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	8.26 <sup>b</sup>	0.55 <sup>a</sup>
<i>Carbohydrate fermentation</i>											
Ethanol	16.30	2.23	3.54	n.d.	5.75	0.10	0.77	1.03	4.44	4.88	0.33
<i>Unknown origin + contaminants</i>											
Chloroform	2.56 <sup>a</sup>	16.67 <sup>ab</sup>	7.02 <sup>ab</sup>	11.73 <sup>ab</sup>	8.97 <sup>a</sup>	2.05 <sup>a</sup>	4.21 <sup>a</sup>	12.55 <sup>ab</sup>	14.11 <sup>ab</sup>	20.08 <sup>ab</sup>	7.33 <sup>a</sup>
1-1'-Biphenyl	n.d.	0.07	0.32	0.58	1.35	0.25	n.d.	0.28	0.76	1.95	0.36
4-Methyl-3-penten-2-one	1.00	1.44	0.78	3.10	1.84	0.76	0.32	1.38	0.85	2.29	1.78
Cyclohexanol	n.d.	0.69	0.10	n.d.	1.21	0.04	n.d.	0.46	0.81	1.92	0.17
Cyclohexanone	n.d.	0.66	0.16	n.d.	1.36	n.d.	n.d.	0.52	1.41	0.75	0.22
4-Methyl-2-heptanone	1.06	0.22	0.99	1.11	3.09	0.41	0.17	2.06	2.40	6.12	1.21
4-Ethyl-1,3-benzenediol	0.33 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.70 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>	1.06a	0.34 <sup>a</sup>	0.35 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>
4-Methoxy-1,3-benzenediamine	n.d.	0.12 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a</sup>	n.d.	0.08 <sup>a</sup>	n.d.	0.43 <sup>ab</sup>	0.40 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	0.12 <sup>a</sup>
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	0.08 <sup>a</sup>	0.49 <sup>ab</sup>	5.50 <sup>ab</sup>	8.41 <sup>abc</sup>	10.31 <sup>ab</sup>	0.86 <sup>ab</sup>	1.06 <sup>ab</sup>	2.76 <sup>ab</sup>	14.06 <sup>abc</sup>	30.12 <sup>bc</sup>	8.55 <sup>ab</sup>

Table 2 (Cont.)

Compound/origin	Yeast biotypes										
	D1-DC	E1-DC	E2-P	E2-DC	F1-DC	H1-P	H2-P	K1-P	K1-DC	O1-DC	S1-P
<i>Lipid oxidation</i>											
2-Methylpentane	2.21 <sup>a</sup>	23.57 <sup>b</sup>	3.62 <sup>ab</sup>	0.88 <sup>a</sup>	n.d.	0.28 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	2.92 <sup>ab</sup>	0.31a	n.d.
3-Methylpentane	1.81 <sup>a</sup>	39.10 <sup>b</sup>	4.12 <sup>a</sup>	0.33 <sup>a</sup>	n.d.	0.20 <sup>a</sup>	n.d.	0.08 <sup>a</sup>	1.48 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.
Hexane	26.79 <sup>ab</sup>	67.49 <sup>b</sup>	19.41 <sup>ab</sup>	13.81 <sup>ab</sup>	0.84 <sup>ab</sup>	1.25 <sup>ab</sup>	0.09 <sup>ab</sup>	6.54 <sup>a</sup>	24.03 <sup>ab</sup>	3.47 <sup>a</sup>	13.67 <sup>ab</sup>
3-Methylhexane	1.81	n.d.	0.67	3.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Methylcyclohexane	3.71	n.d.	1.71	3.49	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	1.40	1.69	2.32
2-Propanone	15.70 <sup>ab</sup>	4.51 <sup>ab</sup>	10.18 <sup>ab</sup>	14.97 <sup>ab</sup>	5.26 <sup>ab</sup>	0.61 <sup>ab</sup>	1.56 <sup>ab</sup>	4.13 <sup>a</sup>	8.16 <sup>ab</sup>	10.60 <sup>ab</sup>	9.79 <sup>ab</sup>
2-Butanone	17.28 <sup>ab</sup>	n.d.	9.97 <sup>ab</sup>	9.40 <sup>ab</sup>	1.95 <sup>ab</sup>	0.03 <sup>ab</sup>	0.48 <sup>ab</sup>	3.64 <sup>ab</sup>	2.01 <sup>ab</sup>	11.60 <sup>ab</sup>	19.81 <sup>ab</sup>
2-Pentanone	15.38 <sup>ab</sup>	2.05 <sup>ab</sup>	8.99 <sup>ab</sup>	11.82 <sup>ab</sup>	3.26 <sup>ab</sup>	2.18 <sup>ab</sup>	1.32 <sup>ab</sup>	5.35 <sup>ab</sup>	5.36 <sup>ab</sup>	19.13 <sup>ab</sup>	11.40 <sup>ab</sup>
Butanal	n.d.	n.d.	0.16 <sup>a</sup>	n.d.	0.44 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0.63 <sup>a</sup>	n.d.	2.58 <sup>c</sup>
Methylbenzene	0.01 <sup>a</sup>	39.79 <sup>b</sup>	3.34 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	5.69 <sup>ab</sup>	4.61 <sup>ab</sup>	n.d.	2.29 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Microbial esterification</i>											
Ethanoic acid, S-methyl ester	3.97	0.42	3.62	12.99	n.d.	0.05	n.d.	0.01	3.33	3.03	3.04
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	0.33 <sup>a</sup>	0.74 <sup>ab</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>	n.d.	0.03 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.07 <sup>a</sup>	0.83 <sup>ab</sup>	0.02 <sup>a</sup>	n.d.
1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester	0.24 <sup>a</sup>	0.48 <sup>ab</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0.28 <sup>ab</sup>	0.09 <sup>a</sup>	1.01 <sup>ab</sup>	0.30 <sup>a</sup>	n.d.
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methoxyethyl) ester	0.04 <sup>a</sup>	n.d.	0.06 <sup>a</sup>	0.07 <sup>a</sup>	n.d.	0.06 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.01 <sup>ab</sup>
Hexanedioic acid, dioctyl ester	1.19 <sup>a</sup>	n.d.	0.74 <sup>a</sup>	0.78 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0.43 <sup>a</sup>	0.55 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>
<i>Carbohydrate fermentation</i>											
Ethanol	5.48	0.66	4.45	6.17	1.17	n.d.	n.d.	6.62	5.57	4.37	5.13
<i>Unkown origin + contaminants</i>											
Chloroform	13.51 <sup>a</sup>	54.65 <sup>b</sup>	12.16 <sup>a</sup>	11.83 <sup>a</sup>	14.79 <sup>ab</sup>	2.47 <sup>ab</sup>	3.63 <sup>ab</sup>	8.33 <sup>a</sup>	8.36 <sup>ab</sup>	10.24 <sup>ab</sup>	12.59 <sup>ab</sup>
1-1'-Biphenyl	0.93	0.11	0.55	0.60	0.36	n.d.	n.d.	n.d.	0.49	0.98	0.19
4-Methyl-3-penten-2-one	1.19	0.90	1.36	1.30	0.82	0.69	n.d.	0.58	0.95	0.23	0.24
Cyclohexanol	0.44	n.d.	0.44	0.75	n.d.	n.d.	n.d.	0.17	n.d.	n.d.	1.26
Cyclohexanone	1.79	n.d.	0.64	2.31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.13	n.d.	n.d.
4-Methyl-2-heptanone	3.09	0.65	1.80	2.79	0.37	0.97	0.36	0.84	1.66	1.93	1.45
4-Ethyl-1,3-benzenediol	0.31 <sup>a</sup>	1.61 <sup>ab</sup>	0.45 <sup>a</sup>	0.47 <sup>a</sup>	0.95 <sup>ab</sup>	n.d.	1.08 <sup>ab</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.23 <sup>a</sup>	n.d.
4-Methoxy-1,3-benzenediamine	n.d.	n.d.	0.13 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.07 <sup>a</sup>	1.88 <sup>b</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.51 <sup>ab</sup>	0.08 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	12.47 <sup>ab</sup>	1.95 <sup>ab</sup>	7.62 <sup>ab</sup>	9.69 <sup>ab</sup>	1.16 <sup>ab</sup>	2.55 <sup>ab</sup>	1.80 <sup>ab</sup>	3.90 <sup>ab</sup>	4.03 <sup>abc</sup>	35.36 <sup>c</sup>	23.09 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup> Results are expressed in Arbitrary Area Units ( $\times 10^4$ ) as means of 3 replicates of each strain belonging a biotype. Means in the same row with different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). n.d.: not detected. <sup>b</sup> Control: uninoculated batch.

Figure 1. Dendrogram based on the mitochondrial DNA restriction analysis of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham throughout ripening process and yeast reference strains from the Spanish Type Culture Collection.

Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0-100%).

Cz: C. zeylanoides; Dh: D. hansenii; Dp: D. polymorphus; Pc: P. carsonii; Sc: S. cerevisiae; Yl: Y. lipolytica; Rm: R. mucilaginosa.

Mitochondrial DNA restriction patterns of yeasts: B, C1, C2, D, E, F, H, K, O and S.

Y: yeast strain

Figure 2. Dendrogram based on the RAPD-PCR technique using the primer (GACA)<sub>4</sub> of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham throughout ripening process and yeast reference strains from the Spanish Type Culture Collection.

Distance values between branches in the dendrogram are reported as percentage of similarity (0-100%).

Cz: C. zeylanoides; Dh: D. hansenii; Dp: D. polymorphus; Pc: P. carsonii; Sc: S. cerevisiae; Yl: Y. lipolytica; Rm: R. mucilaginosa.

Y: yeast strain

Figure 3. Accumulated area of volatile compounds according to their origins from uninoculated batch (control) and batches inoculated with the different yeast biotypes detected in the post-salting (P) and drying-cellar (DC) stages of dry-cured Iberian ham.

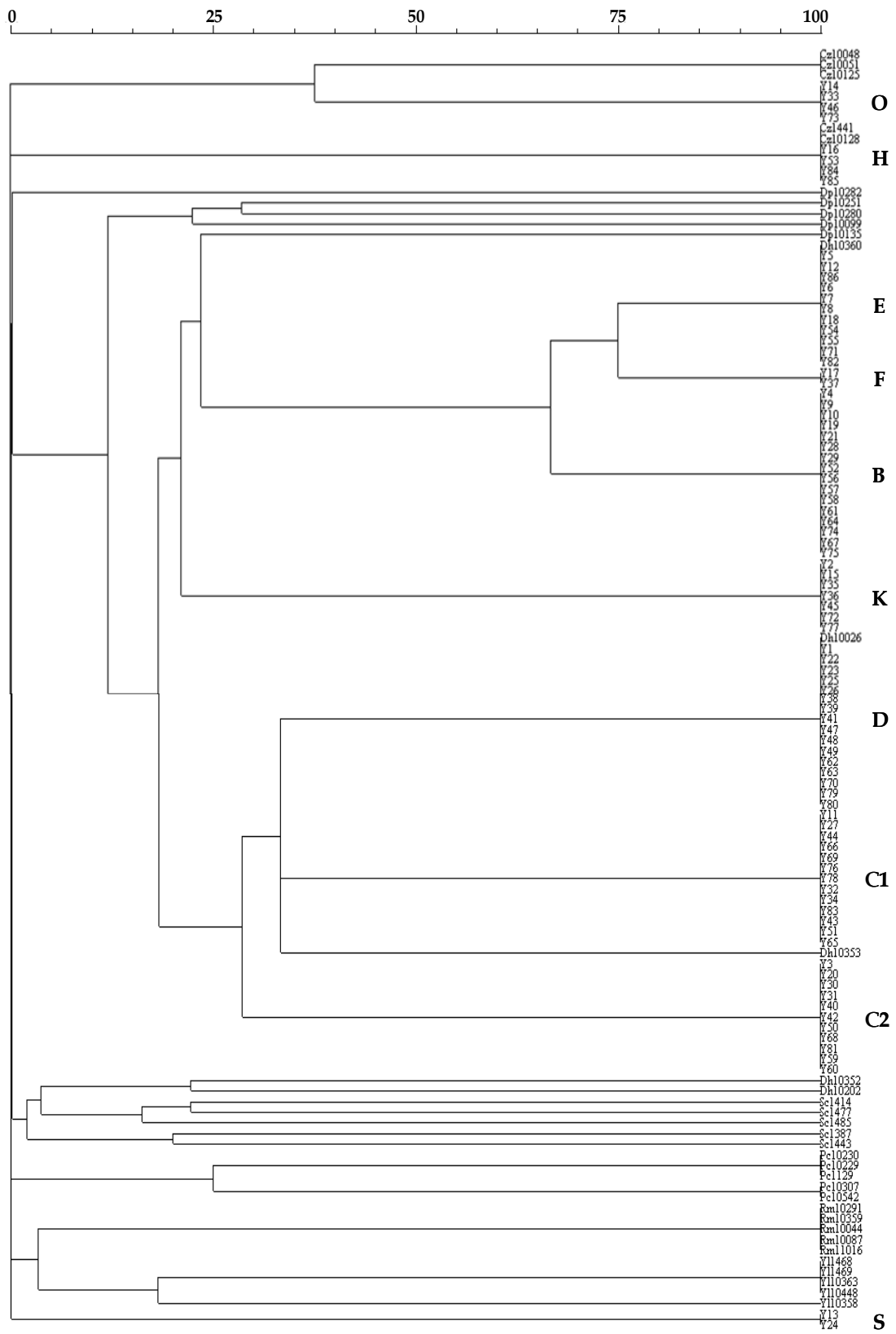


Figure 1. Andrade, Rodríguez, Casado, Bermúdez and Córdoba



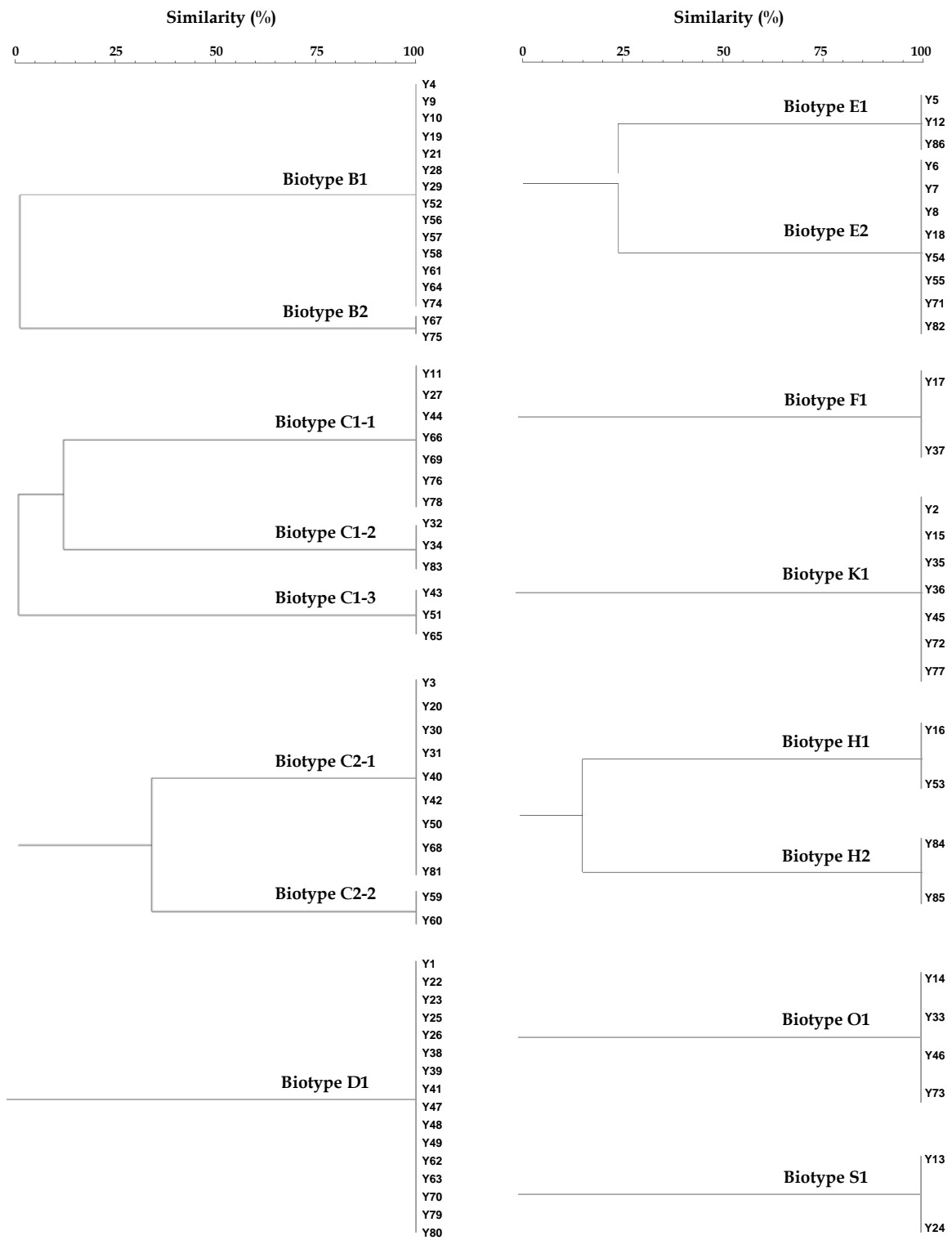


Figure 2. Andrade, Rodríguez, Casado, Bermúdez and Córdoba

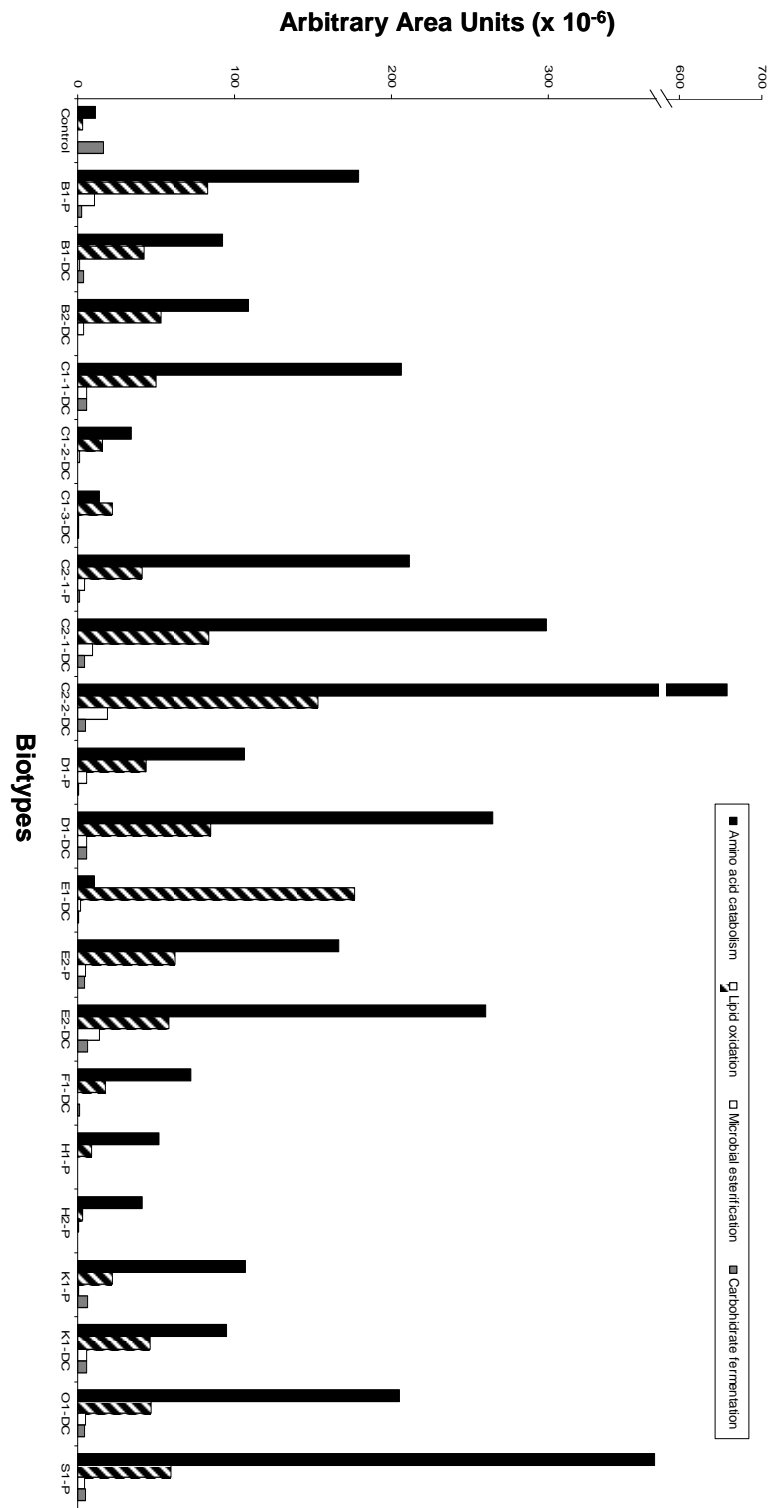


Figure 3. Andrade, Rodríguez, Casado, Bermúdez and Córdoba

**III.5. Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii*  
on the volatile compound production of dry fermented  
sausage "salchichón"**

Enviado para su publicación a *Meat Science*



**Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage “salchichón”**

M<sup>a</sup> Jesús Andrade, Juan José Córdoba, Eva M<sup>a</sup> Casado, María G. Córdoba and Mar Rodríguez\*

Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad s/n. 10071-Cáceres, Spain.

\*Corresponding author: Tel.: +34-927 257125; fax: +34-927 257110.

E-mail address: [marrodri@unex.es](mailto:marrodri@unex.es) (M. Rodríguez)

<http://higiene.unex.es/>

### **Abstract**

Different biotypes of *Debaryomyces hansenii*, characterized by mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis, were inoculated in dry fermented sausages to evaluate their influence as single starter culture on volatile compound generation throughout the ripening process. Similar evolution of physicochemical parameters and microbial population was observed in both uninoculated and inoculated sausages. The tested biotypes modified the volatile compound profile of sausages specially in esters, branched alcohols and aldehydes. The biotype of *D. hansenii* with the E mtDNA restriction pattern is the most suitable to be used as starter culture since it produced volatile compounds involved in flavour development of dry-cured meat products such as 3-methylbutanol, 3-methylbutanal and 2-propanone. Moreover, the use of *D. hansenii* strains with the B, C and E mtDNA restriction patterns, as a mixed starter culture, should be also considered to generate low amount of sulphur compounds in dry-cured meat products.

**Keywords:** *Debaryomyces hansenii*; Volatile compounds; Dry fermented sausage

## 1. Introduction

Yeasts are usually found in high numbers in dry-cured meat products, such as fermented sausages (Encinas, López-Díaz, García-López, Otero & Moreno, 2000; Cocolin, Urso, Rantsiou, Cantoni & Comi, 2006) even they are not added as starter cultures in traditional methods of spontaneous fermentation. These high levels could suggest that this microbial group may play an important role in the maturation process.

The predominant yeast species isolated in dry-cured meat products is *Debaryomyces hansenii* (Encinas, et al., 2000; Cocolin et al., 2006; Aquilanti, Santarelli, Silvestri, Osimani, Petruzzelli & Clementi, 2007). Various peptidases and proteases of this species have been described suggesting its likely participation in the ripening of dry-cured meat products (Bolumar, Sanz, Aristoy & Toldrá, 2003, 2008). Strains of *D. hansenii* isolated from dry-cured meat products have shown high proteolytic activity when inoculated on dry fermented sausages (Durá, Flores & Toldrá, 2004a; Patrignani, Iucci, Vallicelli, Guerzoni, Gardini & Lanciotti, 2007). In addition, *Debaryomyces* spp. have been reported to have a positive impact on the volatile compounds involved in flavour development of dry-cured meat products inoculated with other microorganisms as mixed starter cultures (Flores, Durá, Marco & Toldrá, 2004; Martín, Córdoba, Aranda, Córdoba & Asensio, 2006). However, it is not well known the influence of *D. hansenii* on the volatile compound generation in dry-cured meat products inoculated with this yeast species as a single starter culture in presence of usual contaminant microbial population. On the other hand, great differences in the volatile compound generation between *D. hansenii* biotypes usually found in dry-cured meat products have been recently reported in a meat model system (Andrade, Córdoba, Sánchez, Casado & Rodríguez, 2009). Differences in the production of volatile compounds between *D. hansenii* biotypes should be tested in dry-cured meat products, such as dry fermented sausage “salchichón”. This information may be of great interest to know the influence on flavour development of particular biotypes of *D. hansenii* growing on dry-cured meat products.

The aim of this work was to investigate the influence of *D. hansenii* used as single starter culture on the volatile compound generation of dry fermented sausage

“salchichón”. Furthermore, effect of the main biotypes of this yeast species on volatile compounds of dry fermented sausage “salchichón” will be evaluated.

## 2. Material and methods

### 2.1. Yeast strains

Yeast strains previously isolated from dry-cured meat products have been used for the inoculation of dry fermented sausages. They had stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in malt extract broth (MEB) (2% malt extract, 2% glucose, 0.1% peptone) containing 20% v v<sup>-1</sup> glycerol. Yeasts had been grouped by mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis in different patterns and selected by their volatile compound production in a model culture medium (Andrade et al., 2009). Three isolates tentatively identified as *D. hansenii* by means of that molecular technique were used in inoculation trials. Therefore, 2 isolates ascribed to C2 and E mtDNA restriction patterns were picked because they showed the highest production of volatile compounds related to the flavour of dry-cured meat products. Besides one strain ascribed to B mtDNA restriction pattern was chosen for its fewer production of the above compounds (Andrade et al., 2009).

### 2.2. Preparation of yeast inocula

Yeast isolates used were purified on repeated cultivation on malt extract agar (MEA) (2% malt extract, 2% glucose, 0.1% peptone, 2% agar). The cultures were successively subcultured on MEB to a final volume of 1 L with a concentration of at least  $10^7$  cfu mL<sup>-1</sup>. The cell concentration was calculated by comparison with the absorbance at 600 nm in a spectrophotometer BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

The cells were obtained by centrifugation (4500 rpm for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ), washed with sterile distilled water and centrifuged again. The pelleted cells were concentrated in 100 mL of sterile distilled water and added to the different batches.

### 2.3. Preparation of dry fermented sausages “salchichón”

The mixture for dry fermented sausages “salchichón” was prepared using the following formula: 75% iberian pork meat, 25% iberian pork fat, 1 g kg<sup>-1</sup> red pepper, 1.5 g kg<sup>-1</sup> black pepper, 30 g kg<sup>-1</sup> NaCl and a mixture of dextrin, dextrose, lactose, NaNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub>, sodium ascorbate and Ponceau 4R at standard concentrations used in this kind



of products. It is according to the composition of ingredients utilized in the meat factory for commercial production. Starter cultures were not added.

Five different batches of 10 kg each of dry fermented sausages were manufactured: the control batch, which was the uninoculated batch, the Dh B batch inoculated with the B mtDNA restriction pattern of *D. hansenii*, the Dh C batch inoculated with the C2 restriction pattern of *D. hansenii*, the Dh E batch inoculated with the E restriction pattern of *D. hansenii* and the Dh B+Dh C+Dh E batch inoculated with the three above mtDNA restriction profiles.

One hundred mL of the different *D. hansenii* suspensions and sterile distilled water without yeasts were incorporated into the inoculated batches and the control batch, respectively.

The mixture of each batch was stuffed into regenerated collagen casings (60 mm in diameter). Each sausage gave approximately 1 Kg as the final weight.

The sausages obtained were fermented and dried in a RESTI SANCHEZ S.A. industry (Cáceres, Spain) at 15°C and 85% relative humidity (RH) for 3 days. Then, the temperature and RH were lowered to 5°C and 80%, respectively, for 21 days. Finally, the sausages were kept at 8°C and 70% RH to reach 54 days of ripening.

Initially, one representative sausage of each batch was taken at 0 days of ripening for microbiological and pH analyses. Five sausages of each batch were taken at the end of the processing (54 days of ripening) for microbiological, water activity, pH and volatile compound analyses.

#### 2.4. Microbial analyses

The total viable microorganism count was determined in Plate Count Agar (PCA; Oxoid, Unipath, Basingstoke, UK), the micrococcaceae in Mannitol Salt Agar (MSA; Oxoid) and lactic acid bacteria were grown in Man Rogosa Sharpe Agar (MRS; Oxoid) at pH 5.6. All of them were incubated at 30°C for 2 days. Yeasts were grown in Dichloran Glycerin selective agar (DG18; Oxoid) at 25°C for 5 days.

#### 2.5. Water activity and pH measurements

Water activity ( $a_w$ ) of dry fermented sausages was determined using a FA-st/1 apparatus from GBX (France Scientific Instrument). The measurements of pH were carried out using a Crison mod. 2002 pHmeter (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

### 2.6. Mitochondrial DNA restriction analysis

The yeast isolates obtained from each batch were subjected to molecular identification by means of mtDNA restriction analysis. Thus a total of 36 representative yeast isolates were purified by repeated cultivation on MEA before analysis. The DNA used for mtDNA restriction analysis and the restriction fragments were obtained as described previously Andrade, Rodríguez, Sánchez, Aranda & Córdoba (2006). The size of the restriction fragments was determined with a DNA molecular size marker of 10.0-0.5 Kbp from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). MtDNA restriction patterns were compared with those of the yeast strains from dry-cured Iberian ham and those of the reference yeast strains provided by the Spanish Type Culture Collection previously obtained (Andrade et al., 2006).

### 2.7. Extraction and analysis of volatile compounds

After 54 days of ripening process, portions of dry fermented sausage “salchichón” were vacuum-packaged and stored at -80°C until volatile compound analysis. Frozen samples were minced and 1 g was weighed into a 5 mL headspace vial (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) and sealed with a PTFE butyl septum (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) in an aluminium cap. Volatile compounds were extracted by Solid Phase Micro-Extraction technique (SPME) (Ruiz, Cava, Ventanas & Jensen, 1998) with a 10 mm long, 100 µm thick fibre coated with carboxen/polydimethylsiloxane (Supelco Co., Bellefonte, PA, USA). The SPME fibre was inserted into the headspace vial through the septum and exposed to headspace for 45 min at 42°C in a water bath with stirring. Prior to collection of volatiles, the fibre was preconditioned at 220°C for 50 min in the GC injection port.

GC/MS analyses of volatile compounds were performed using a Hewlett-Packard 5890 S II gas chromatograph coupled with a Hewlett-Packard 5971A ion-trap mass spectrometer. A 5% phenyl-95% dimethyl polysiloxane column (50m x 0.32 mm ID, 1.05 µm film thickness; Hewlett-Packard) was used for the separation of volatile compounds. Helium was used as carrier gas. The injection port was in a splitless mode. The SPME fibre was kept in the injection port at 220°C during the whole chromatographic run. The temperature program was isothermal for 15 min at 35°C, next ramped to 150°C at 4°C min<sup>-1</sup>, and then to 250°C at 20°C min<sup>-1</sup>. To calculate the Kovats indexes of the different compounds, n-alkanes (Sigma R-8769) were run under the same conditions. The GC/MS transfer line temperature was 280°C. The mass

spectrometer was operated in the electron impact mode, with electron energy of 70 eV, a multiplier voltage of 1650 V and a rate of 1 scan s<sup>-1</sup> over a range of m z<sup>-1</sup> 40-300 for data collection.

The individual volatile compounds were identified through their mass spectra by comparison with NIST/EPA/NIH library and Kovats indexes.

### 2.8. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using one-way analysis of variance. Means were compared by least significant difference (LSD) test using the SPSS software package (version 15.0) for Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

## 3. Results

### 3.1. Enumeration of microorganisms, and pH and *a<sub>w</sub>* measurements

The results obtained from the enumeration of microorganisms and the pH and *a<sub>w</sub>* measurements of the five manufactured batches of dry fermented sausage “salchichón” are shown in Table 1. The pH always was lower at the end of processing than in the initial sausage mixture. Thus the pH ranged from values of 5.91 to 6.06 at 0 days of ripening and from 5.58 to 5.86 at the end of ripening. The *a<sub>w</sub>* showed a similar evolution with lower values at the end (0.772-0.809) than at the beginning of process (0.973-0.978). There were not differences in the pH and *a<sub>w</sub>* values between batches.

The lactic acid bacteria levels presented an important increase from the initial sausage mixture, reaching counts over 10<sup>7</sup> cfu g<sup>-1</sup> at the end of the maturation process in all batches, including the control batch. However the micrococccaceae levels were around 10<sup>3</sup> cfu g<sup>-1</sup> at the beginning of the process and were maintained or even decreased in the final product (Table 1). Yeast counts in the inoculated batches ranged from values of about 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> cfu g<sup>-1</sup> at 0 days of process. Through the ripening, a reduction of yeast levels about 1 log cycle was observed in all of the inoculated batches, although there were not differences between batches. The control batch, with yeast counts under 3 x10<sup>3</sup> cfu g<sup>-1</sup>, showed lower levels of yeasts than the inoculated batches at both the beginning and end of the ripening time.

### 3.2. Molecular identification of yeasts isolated from dry fermented sausage "salchichón"

A total of 36 representative yeast strains were isolated from the five batches of dry fermented sausages at 54 days of ripening. Figure 1 shows the mtDNA restriction profiles of some of these yeast isolates using the restriction enzyme *Hae*III. The distribution of the mtDNA restriction patterns from the 36 yeast strains is shown in Table 2.

Approximately 62.5%, 90% and 80% of the isolated yeasts were ascribed to the same mtDNA restriction pattern inoculated into the Dh B, Dh C and Dh E batches, respectively. In the batch inoculated with the three strains of *D. hansenii*, only the E and C2 restriction patterns were detected with about 66.7% and 33.3%, respectively (Table 2).

Several different mtDNA restriction profiles were found in the control batch, such as the B and C2 restriction patterns, whereas one isolate showed the same mtDNA restriction profile as reference strains of *Candida zeylanoides* CECT 1441 and CECT 10128 (Andrade et al., 2006). Furthermore, three yeast strains obtained from the control, Dh B and Dh C batches could not be identified because they showed unknown mtDNA restriction profiles (Table 2).

### 3.3. Analysis of volatile compounds

A total of 61 volatile compounds were identified and quantified after 54 days of ripening in the five different batches of dry fermented sausage "salchichón" (Table 3). They were grouped according to their probable origins as from lipid oxidation (20), amino acid catabolism (19), microbial esterification (7), spices (5) and carbohydrate fermentation (3). The remaining volatile compounds were grouped as "other or unknown origin".

The lowest number of volatile compounds was detected in the control batch, which presented 41 compounds. On the contrary, the batch with the greatest number of volatile compounds was the Dh C with 58 compounds.

On the other hand, the Dh C and Dh B batches showed the highest levels of compounds derived from microbial esterification and carbohydrate fermentation, respectively (Fig. 2). The Dh B batch showed also the greatest amounts of volatile compounds originated from the lipid oxidation and spices. The uninoculated batch presented the lowest quantities of microbial esterification, lipid oxidation and carbohydrate fermentation products. Although this batch showed the highest amount

of compounds with origin in amino acid catabolism because of the great quantity of benzene derivatives (Table 3). The Dh C and Dh B+Dh E+Dh C batches presented the lowest content of compounds derived from amino acid catabolism and, spices and lipid oxidation, respectively.

Branched volatile compounds proceeded from the catabolism of amino acids, such as 3-methylbutanol, 3-methylbutanal, 2-methylpropanoic acid and 3-methylbutanoic acid, were detected only in the batches inoculated with the different *D. hansenii* strains (Fig. 3). Besides, 2-methyl-1-propanol was found only in the Dh E batch. The highest levels of 3-methylbutanal and 3-methylbutanol were detected in the Dh E and Dh B+Dh E+Dh C batches.

Regarding the volatile compounds from lipid oxidation, five aliphatic aldehydes were detected in the inoculated batches. Only three of them were found in the uninoculated batch. Hexanal and heptanal presented the highest significant values in the batch inoculated with the three strains of *D. hansenii* (Table 3). The methylketone 2-propanone presented higher significant concentrations in the inoculated batches than in the control (Table 3). The Dh B batch showed significant higher amounts of butanoic, pentanoic and tetradecanoic acids than the remaining batches (Table 3).

Acetic acid, ethyl ester was the most abundant ester in all batches (Table 3). Besides its concentration and the remaining esters were higher in inoculated than in uninoculated sausages (Table 3 and Fig. 2).

In spite of the total concentration of volatile compounds originated from carbohydrate catabolism was the highest (Fig. 2), it was the group with the low number of compounds (Table 3). The three volatile sugar fermentation products identified were found in lower amounts in the control batch than in the inoculated batches. Ethanol was the most abundant compound in all batches (Table 3).

Five volatile compounds from added spices were detected in all batches, reaching the lowest concentration in the control batch. All of them were terpenes, being limonene the most abundant compound in all batches (Table 3).

Regarding the sulphur compounds, only carbon disulphide and thiobis-methane were found. Carbon disulphide was detected in the highest amount in the Dh C batch (Table 3). However it was not found in the batch inoculated with the three strains of *D. hansenii*.

#### 4. Discussion

Physicochemical parameter values were unaffected by the levels of the selected yeast strains in the five batches of dry fermented sausage “salchichón”, since no differences in the pH and  $a_w$  values between uninoculated and inoculated batches were found. The final  $a_w$  values obtained were quite similar to those described for dry fermented sausages inoculated with yeasts (Selgas, Ros & García, 2003; Patrignani et al., 2007).

The evolution of the microbial population was as expected for dry fermented sausages (Benito, Martín, Aranda, Pérez-Nevado, Ruiz-Moyano & Córdoba, 2007; Martín, Colín, Aranda, Benito & Córdoba; 2007; Patrignani et al., 2007), being the lactic acid bacteria the predominant microbial group and maintaining or decreasing the levels of micrococaceae throughout the ripening time (Ordóñez, Hierro, Bruna & De La Hoz, 1999). No differences in the lactic acid bacteria counts were found between batches, which may explain the similar pH values observed in all of them.

Yeasts reached high levels only in the inoculated batches. A small reduction of yeasts during the ripening process was observed as it has been previously reported in this kind of products (Encinas et al., 2000; Olesen & Stahnke, 2000; Durá et al., 2004a).

A high correspondence between the mtDNA restriction profiles of the inoculated yeasts and those of the yeasts isolated from the manufactured sausages at 54 days of ripening was obtained. Therefore, the selected strains of *D. hansenii* were recovered in all inoculated batches at the end of the ripening, apart from the strain with the B mtDNA restriction pattern which was not detected in the batch inoculated with the three strains. On the contrary, the greatest resistance to the ripening conditions as well as the meat mixture composition was shown by yeast strains with the E mtDNA restriction pattern. Thus, 15 of the 36 representative yeast isolates obtained were ascribed to E mtDNA restriction pattern.

When the mtDNA restriction patterns of yeasts from the uninoculated batch were analyzed, *D. hansenii* was the main yeast species detected, although *C. zeylanoides* were also found. The absence of this species in the inoculated batches could be explained by the interaction with the high *D. hansenii* levels added to the inoculated sausages. Besides *D. hansenii* seems to adapt easier than *C. zeylanoides* to the ripening on account of *D. hansenii* has been reported reaching higher level than *C. zeylanoides* at the final stages of dry fermented sausages maturation (Encinas et al., 2000; Cocolin et al., 2006).

Most of the 61 volatile compounds identified after 54 days of sausages ripening have been previously described in different types of dry fermented sausages (Schmidt &

Berger, 1998; Flores et al., 2004; Bianchi, Cantoni, Careri, Chiesa, Musci & Pinna, 2007). Volatile compounds were classified according to their most likely origin, in order to understand how generation pathways were affected by the inoculation of different strains of *D. hansenii*, a species commonly used as starter culture in dry fermented sausages. However, some of the compounds listed could have more than one source or are the result of secondary reactions between substances derived from different catabolic routes (Berdagué, Montel, Montel & Talon, 1993).

The branched aldehyde 3-methylbutanal, only found in the inoculated sausages, has been reported to contribute considerably to the overall flavour of dry fermented sausages (Montel, Masson & Talon, 1998) and other meat products such as dry-cured ham (Careri, Mangia, Barbieri, Bolzoni, Virgili & Parolari, 1993; Carrapiso, Ventanas & García, 2002; Martín et al., 2006). This compound derives from amino acids by Strecker degradation (Barbieri, Bolzoni, Parolari & Virgili, 1992; Ventanas, Córdoba, Antequera, García, López-Bote & Asensio, 1992) but it can also be generated by microbial metabolism (Durá, Flores & Toldrá, 2004b; Martín et al., 2006). According to previous studies in dry-cured ham (Ventanas et al., 1992), the latter pathway is the most probable origin in fermented sausages since the Strecker degradation normally requires heat or long ripening periods and is favoured by relatively low  $a_w$ .

The branched alcohols 2-methyl-1-propanol and 3-methylbutanol, only detected in the inoculated sausages, are formed by reduction of the corresponding aldehydes, 2-methyl-1-propanal and 3-methylbutanal, respectively (Stahnke, 1994). The higher production of 3-methylbutanol than their aldehyde precursor 3-methylbutanal in the inoculated batches can be attributed to the conversion of branched-chain amino acids into the branched alcohol through the so-called Ehrlich pathway (Ehrlich, 1907).

Furthermore, other volatile amino acid catabolism products, such as 2-methylpropanoic and 3-methylbutanoic acids, were detected only in the inoculated sausages. Consequently, yeasts may contribute to their production as described Olesen et al. (2000). Both compounds are characterized by their cheesy odour and play an important role in the dry fermented sausage flavour (Meynier, Novelli, Chizzolini, Zanardi & Gandemer, 1999; Berdagué et al., 1993). Besides these two acids have a positive impact on sausages aroma due to their conversion into esters (Stahnke, 1994).

The control batch presented high amounts of aromatic hydrocarbons from amino acid catabolism such as ethylbenzene, 1,3-dimethylethylbenzene and 1,4-

dimethylethylbenzene, which poorly contribute to sausages flavour due to their high threshold value (Bianchi et al., 2007).

Regarding the lipid oxidation products, some differences between uninoculated and inoculated batches were found. Thus hexanal, which imparts a green odour (Stahnke, 1994), showed significant higher amount in the batch inoculated with the three *D. hansenii* strains than in the remaining batches. Another aldehydes from lipid oxidation, only detected or detected in higher amount in the inoculated sausages than in the control, were heptanal, octanal and nonanal, which add pleasant flavour to dry-cured meat products (Carrapiso et al., 2002).

Despite the fact that hexane was present in higher amount in the control batch than in the inoculated batches, it is not relevant owed to linear hydrocarbons are not important contributors to the meat product flavour because of their high odour thresholds (Shahidi, Rubin & D'Souza, 1986; Bianchi et al., 2007).

Carboxylic acids with origin in lipid oxidation, such as propanoic, butanoic and pentanoic acids, were detected in higher amounts in some of the inoculated batches than in the control batch. These compounds have been reported in fermented sausages inoculated with yeasts (Olesen et al., 2000). Inside these compounds, butanoic acid imparts a sour and cheesy note to the sausage flavour (Stahnke, 1994).

Esters may arise from the action of yeasts on account of higher contents of these compounds were detected in the inoculated than in the control batches. Several authors have found that yeasts promoted the ester generation from the esterification of carboxylic acids and alcohols (Shahidi et al., 1986; Olesen et al., 2000; Flores et al., 2004).

Esters, mainly ethyl esters, have been identified in dry fermented sausages and reported as essential volatile compounds for the typical aroma of this kind of meat product (Mateo & Zumalacárregui, 1996; Meynier et al., 1999) because of their characteristic fruity notes, their low odour threshold values (Stahnke, 1994) and their contribution to mask rancid odours (Careri et al., 1993; Stahnke, 1994). Their presence, together with 3-methylbutanal, has been associated with a "ripened flavour" (Barbieri et al., 1992; Careri et al., 1993).

The higher amount of ethanol in the inoculated than in the uninoculated sausages could be due to presence in yeast of some pyruvate decarboxylases and alcohol dehydrogenases (Durá et al., 2004b). This aliphatic alcohol has not been described as



essential in the aroma development of dry-cured meat products but it is the precursor of several esters (Molimard & Spinnler, 1996).

Acetic acid could come from the fermentation of sugars by microorganisms or the Maillard reaction. Since its content is higher in the inoculated sausages than in the sausages without inoculation, the contribution of yeast isolates inoculated to its production could be considered.

The ketone 3-hydroxy-2-butanone, detected in higher amount in the Dh B batch than in the remaining batches has been also observed in different kinds of fermented sausages, some of them inoculated with selected yeasts (Olesen et al., 2000; Flores et al., 2004). It is thought that it adds buttery notes (Montel et al., 1998) and contributes to the typical final flavour of meat products (Schmidt et al., 1998).

Several volatile compounds from the added spices were detected in all batches of dry fermented sausages produced. Despite the fact that no significant differences were detected between batches, a higher amount of this type of compounds, excepting limonene, was present in the inoculated than in the control sausages. Some of the terpenic compounds identified have been described to add menthol, fresh, herbal and lemon notes (Schmidt et al., 1998; Meynier et al., 1999).

The ability of selected strains of *D. hansenii* to produce volatile sulphur compounds has been previously reported (Olesen et al., 2000; Arfi, Spinnler, Tache & Bonnarme, 2002). In the present work, only carbon disulphide was detected in the inoculated sausages when the B, E and C mtDNA restriction patterns of *D. hansenii* were added separately. However, no sulphur compounds were detected when the former three yeast strains were inoculated together. Sulphur compounds own intense odours described as onion, butyric, meaty, unpleasant or gas (Meynier et al., 1999). Because of their very low odour thresholds, these types of compounds could determine the flavour of the products, over-riding the aromatic notes of other volatile compounds and giving the meat product its characteristic aroma (Edwards, Ordóñez, Dainty, Hierro & De La Hoz, 1999). Thus, Stahnke (1998) identified some sulphur compounds as having characteristic salami aroma. However, high amounts of sulphur compounds could contribute to an undesirable flavour.

From the comparison of the inoculated batches, important differences were observed. Thus, the batch inoculated with the strain of *D. hansenii* ascribed to C2 mtDNA restriction pattern presented the highest number of volatiles compounds, with the highest contents of esters and sulphur compounds. The batch inoculated with the

strain of *D. hansenii* with E mtDNA restriction pattern presented higher amounts of volatile compounds related to the dry fermented sausage “salchichón” aroma such as 3-methylbutanol, 3-methylbutanal and 2-propanone as well as lower amounts of sulphur compounds than the Dh C batch. Inside the inoculated batches, the Dh B presented the lowest contents of 3-methylbutanol, 3-methylbutanal, hexanal, heptanal and octanal, and 3-methylbutanoic acid was not detected.

Finally, the Dh B+Dh E+Dh C batch showed the highest amounts of hexanal, heptanal, 3-methylbutanol and 3-methylbutanoic acid, whereas its 3-methylbutanal generation was similar to the highest amount in the Dh E batch. Besides the sausages inoculated with the three strains of *D. hansenii* did not show sulphur compound production, despite the fact the yeast isolates identified generated these compounds when they were inoculated individually. Thus the interaction between the three selected strains of *D. hansenii* proved their positive effect on the volatile compound production in dry fermented sausage “salchichón”.

## **Conclusion**

This research conducted on dry fermented sausage “salchichón” indicated that the inoculation of selected *D. hansenii* strains may have a positive contribution to flavour development of this meat product. The tested yeast strains produced specially esters, branched alcohols and aldehydes, and some compounds derived from lipid oxidation. Considering the overall volatile compound production, the strain of *D. hansenii* with the E mtDNA restriction pattern is the most suitable to be used as starter culture. Moreover, the use of *D. hansenii* strains with the B, C and E mtDNA restriction patterns, as a mixed starter culture, should also be considered to generate low amount of sulphur compounds in dry-cured meat products.

## **Acknowledgements**

This work is part of projects AGL2001-0804 and AGL2004-3291 funded by the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. M. J. Andrade was the recipient of a Grant of the Regional Government of Junta de Extremadura (Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología).

---

**References**

- Andrade, M.J., Rodríguez, M., Sánchez, B., Aranda, E., & Córdoba, J.J. (2006). DNA typing methods for differentiation of yeast related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 48-58
- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Sánchez, B., Casado, E.M., & Rodríguez, M. (2009). Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production. *Food Chemistry*, 113, 457-463.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A., & Clementi, F. (2007). The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 136-145.
- Arfi, K., Spinnler, H.E., Tache, R., & Bonnarme, P. (2002). Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 503-510.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., & Virgili, R. (1992). Flavor compounds of dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2389-2394.
- Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., & Córdoba, M.G. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented Salchichón and Chorizo sausages. *Journal of Food Science*, 72, 193-201.
- Berdagué, J. L., Monteil, P., Montel, M. C., & Talon, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science*, 35, 275-287.
- Bianchi, F., Cantoni, C., Careri, M., Chiesa, L., Musci, M., & Pinna, A. (2007). Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta*, 72, 1552-1563
- Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M.-C., & Toldrá, F. (2003). Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 141-151.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M.-C., & Toldrá, F. (2008). Purification and characterisation of Proteases A and D from *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 135-141.

- Careri, M., Mangia, A., Barbieri, G., Bolzoni, L., Virgini, R., & Parolari, G. (1993). Sensory property relationship to chemical data of Italian type dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 58, 968-972.
- Carrapiso, A.I., Ventanas, J., & García, C. (2002). Characterization of the most odor-active compounds of Iberian ham headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1996-2000.
- Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., & Comi, G. (2006). Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research*, 6, 692-701.
- Durá, M. A., Flores, M., & Toldrá, F. (2004a). Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Science*, 68, 319-328.
- Durá, M. A., Flores, M., & Toldrá, F. (2004b). Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on *Debaryomyces* spp. generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. *Food Chemistry*, 86, 391-399.
- Edwards, R.A., Ordóñez, J.A., Dainty, R.H., Hierro E.M., & De La Hoz, L. (1999). Characterization of the headspace volatile compounds of selected Spanish dry fermented sausages. *Food Chemistry*, 64, 461-465.
- Encinas, J.P., López-Díaz, T.M., García-López, M.L., Otero, A., & Moreno, B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 54, 203-208.
- Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 40, 1027-1047.
- Flores, M., Durá, M.A., Marco, A., & Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, 68, 439-446.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G., & Asensio, M.A. (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 8-18.
- Martín, A., Colín, B., Aranda, E., Benito, M.J., & Córdoba, M.G. (2007). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Science*, 75, 696-708.
- Mateo, J., & Zumalacárregui, J.M. (1996). Volatile compounds in chorizo in their changes during ripening. *Meat Science*, 44, 255-273.

- Meynier, A., Novelli, E., Chizzolini, R., Zanardi, E., & Gandemer, G. (1999). Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Science*, 51, 175-183.
- Molimard, R., & Spinnler, H.E. (1996). Compounds involved in flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184.
- Montel, M.C., Masson, R., & Talon, R. (1998). Bacterial role in flavor development. *Meat Science*, 49, S111-S124.
- Olesen, P.T., & 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 Science*, 56, 357-368.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M., & De La Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329-367.
- Patrignani, F., Iucci, L., Vallicelli, M., Guerzoni, M.E., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2007). Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. Part 1: Evaluation of their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns. *Meat Science*, 75, 676-686.
- Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J., & Jensen, M.T. (1998). Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in meat product: dry-cured Iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4688-4694.
- Schmidt, S., & Berger, R.G. (1998). Aroma compounds in fermented sausages of different origins. *LWT - Food Science and Technology*, 31, 559-567.
- Selgas, M.D., Ros, J., & García, M.L. (2003). The effect of selected yeast strains on the sensory properties of dry fermented sausages. *European Food Research and Technology*, 217, 475-480.
- Shahidi, F., Rubin, L.J., & D'Souza L.A. (1986). Meat flavor volatiles: a review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24, 141-243.
- Stahnke, L. H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum*. *Meat Science*, 38, 39-53.
- Stahnke, L. H. (1998). Character impact aroma compounds in fermented sausage. In *Proceedings of the 44th International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 786-787). Barcelona, Spain.

Ventanas, J., Córdoba, J.J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., & Asensio, M.A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science*, 57, 813-815.

Figure 1. Mitochondrial DNA restriction profiles of yeast strains collected from the control and inoculated batches of dry fermented sausage “salchichón” at 54 days of drying process.

Lanes 1 and 17: DNA molecular size marker of 10-0.5 kbp; lane 2: *C. zeylanoides* mtDNA restriction pattern; lanes 3, 5 and 6: *D. hansenii* B mtDNA restriction pattern; lanes 7, 10, 11, 12 and 14: *D. hansenii* C2 mtDNA restriction pattern; lanes 8, 9, 15 and 16: *D. hansenii* E mtDNA restriction pattern; lane 13: unknown mtDNA restriction pattern.

Control: uninoculated batch; Dh B: batch inoculated with *D. hansenii* B mtDNA restriction pattern; Dh E: batch inoculated with *D. hansenii* E mtDNA restriction pattern; Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* C2 mtDNA restriction pattern; Dh B+Dh E+Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* B, *D. hansenii* E and *D. hansenii* C2 mtDNA restriction patterns.

Figure 2. Accumulated area of volatile compounds according to their origin of dry fermented sausages “salchichón” inoculated with different strains of *Debaryomyces hansenii* at the end of ripening.

Control: uninoculated batch; Dh B: batch inoculated with *D. hansenii* B mtDNA restriction pattern; Dh E: batch inoculated with *D. hansenii* E mtDNA restriction pattern; Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* C2 mtDNA restriction pattern; Dh B+Dh E+Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* B, *D. hansenii* E and *D. hansenii* C2 mtDNA restriction patterns.

Figure 3. Methyl branched volatile compounds in dry fermented sausages “salchichón” inoculated with different strains of *Debaryomyces hansenii* at the end of ripening.

Control: uninoculated batch; Dh B: batch inoculated with *D. hansenii* B mtDNA restriction pattern; Dh E: batch inoculated with *D. hansenii* E mtDNA restriction pattern; Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* C2 mtDNA restriction pattern; Dh B+Dh E+Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* B, *D. hansenii* E and *D. hansenii* C2 mtDNA restriction patterns.

Table 1. Water activity ( $a_w$ ), pH and microbial counts of the control and inoculated batches of dry fermented sausage “salchichón” at 0 and 54 days of ripening.

	Batches <sup>a</sup>				
	Control	Dh B	Dh E	Dh C	Dh B+Dh E+Dh C
<b>0 days of ripening</b>					
$a_w$	0.973	0.976	0.973	0.978	0.976
pH	5.95	5.99	6.06	5.91	6.05
Yeasts (cfu g <sup>-1</sup> )	2.9x10 <sup>3</sup>	2.6x10 <sup>5</sup>	4.05x10 <sup>6</sup>	1.4x10 <sup>5</sup>	1.8x10 <sup>6</sup>
Lactic acid bacteria (cfu g <sup>-1</sup> )	5.1x10 <sup>4</sup>	6.2x10 <sup>4</sup>	1.7x10 <sup>4</sup>	7.9x10 <sup>4</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>
Micrococcaceae (cfu g <sup>-1</sup> )	2.8x10 <sup>3</sup>	4.6x10 <sup>3</sup>	5.5x10 <sup>3</sup>	5.2x10 <sup>3</sup>	3.6x10 <sup>3</sup>
<b>54 days of ripening</b>					
$a_w$	0.781	0.809	0.772	0.803	0.792
pH	5.86	5.86	5.63	5.58	5.82
Yeasts (cfu g <sup>-1</sup> )	<10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>4</sup>	1.1x10 <sup>5</sup>	3.5x10 <sup>4</sup>	1.9x10 <sup>5</sup>
Lactic acid bacteria (cfu g <sup>-1</sup> )	4.6x10 <sup>7</sup>	8.1x10 <sup>7</sup>	8.3x10 <sup>7</sup>	7.1x10 <sup>7</sup>	6.1x10 <sup>7</sup>
Micrococcaceae (cfu g <sup>-1</sup> )	9.8x10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>	9.2x10 <sup>3</sup>	9.6x10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> Control: uninoculated batch; Dh B: batch inoculated with *D. hansenii* B mtDNA restriction pattern; Dh E: batch inoculated with *D. hansenii* E mtDNA restriction pattern; Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* C2 mtDNA restriction pattern; Dh B+Dh E+Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* B, *D. hansenii* E and *D. hansenii* C2 mtDNA restriction patterns.



Table 2. Distribution of the mitochondrial DNA (mtDNA) restriction patterns of yeasts isolated from the control and inoculated batches of dry fermented sausage “salchichón” at the end of the ripening process.

Identification of yeasts by mtDNA restriction analysis	Batches <sup>a</sup>				
	Control	Dh B	Dh E	Dh C	Dh B+Dh E+Dh C
<i>Debaryomyces hansenii</i> B	1	5			
<i>Debaryomyces hansenii</i> E			9		6
<i>Debaryomyces hansenii</i> C2	1	2	1	4	3
<i>Candida zeylanoides</i>	1				
Unknown restriction pattern	1	1		1	

<sup>a</sup> Control: uninoculated batch; Dh B: batch inoculated with *D. hansenii* B mtDNA restriction pattern; Dh E: batch inoculated with *D. hansenii* E mtDNA restriction pattern; Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* C2 mtDNA restriction pattern; Dh B+Dh E+Dh C: batch inoculated with *D. hansenii* B, *D. hansenii* E and *D. hansenii* C2 mtDNA restriction patterns.

Table 3. Volatile compounds identified and quantified in the control and inoculated batches of dry fermented sausage "salchichón" at 54 days of ripening<sup>a</sup>.

Compound/origin	Control	Batches <sup>b</sup>				Compound/origin	Control	Batches <sup>b</sup>			
		Dh B	Dh E	Dh C	Dh B+Dh E+Dh C			Dh B	Dh E	Dh C	Dh B+Dh E+Dh C
<b>Lipid oxidation</b>											
Hexane	370.87	347.47	85.15	63.31	191.64	3-Methylpentane	27.49a	0.80b	n.d.	n.d.	3.14b
Decane	n.d. <sup>c</sup>	7.06	3.57	8.38	4.51	2-Methylpentane	100.88	n.d.	n.d.	27.02	n.d.
Pentadecane	3.31a	17.77b	6.65ab	9.80ab	n.d.	3-Methylbutanol	n.d.	12.45	20.45	12.81	23.45
Hexadecane	8.95	31.31	4.47	7.87	n.d.	2-Methyl-1-propanol	n.d.	n.d.	12.15	n.d.	n.d.
1-Propanol	n.d.	16.04ab	26.54a	13.13b	10.03b	4-Dimethyl-3-cyclohexen-1-ol	20.67a	63.17b	38.07ab	21.07a	23.74a
1-Butanol	n.d.	1.93	1.94	2.20	n.d.	3-Methylbutanal	n.d.	5.30	14.16	5.79	13.91
2-Propanone	24.03a	105.82ab	150.02b	83.73ab	115.85ab	2-Methylpropanoic acid	n.d.	5.04	9.82	4.20	4.88
2-Pentanone	n.d.	n.d.	0.73	0.88	0.16	3-Methylbutanoic acid	n.d.	n.d.	1.36	1.45	2.12
2-Heptanone	1.74	1.27	0.44	0.48	0.20	Benzaldehyde	21.51a	15.40ab	17.02ab	4.51b	14.68ab
Pentanal	6.97	11.55	17.75	32.64	34.49	Benzeneacetaldehyde	13.18	98.61	64.47	14.32	4.23
Hexanal	49.44a	6.54a	18.22a	130.56a	300.63b	Ethylbenzene	43.51	n.d.	n.d.	0.79	1.61
Heptanal	3.82a	7.82ab	8.57ab	10.57ab	12.23b	Methylbenzene	9.87ab	2.74a	8.90a	14.56ab	23.19b
Octanal	n.d.	2.86	9.12	6.71	6.64	1,3-Dimethylbenzene	64.50	0.67	0.52	0.93	2.09
Nonanal	n.d.	4.34	3.71	2.72	4.17	1,2-Dimethylethylbenzene	391.45	43.57a	321.64	209.42	8.96
Propanoic acid	n.d.	12.07	13.40	1.21	12.20	1,4-Dimethylethylbenzene	76.55a	55.19a	102.09a	20.73a	27.533b
Butanoic acid	129.39a	278.75b	199.91ab	167.28ab	80.09a	1-Methyl-2-(2-propenyl)-benzene	n.d.	25.98	35.94	25.81	11.05
Pentanoic acid	6.35a	15.81b	7.15a	1.87a	1.21a	Methyl(1-methylethenyl)-benzene	21.15	5.60	8.99	42.63	9.43
Hexanoic acid	21.56	37.22	15.17	28.00	14.56	1,2-Dimethoxy-4-(2-propenyl)-benzene	1.97a	12.60b	7.74ab	2.25a	n.d.
Tetradecanoic acid	30.60a	150.35b	44.59ab	76.38ab	n.d.	1,2-Dimethoxy-4-(1-propenyl)-benzene	2.24	19.62	5.83	7.26	n.d.
Hexadecanoic acid	134.59	343.31	250.07	254.73	n.d.	<b>Spices</b>					
<b>Microbial esterification</b>											
Acetic acid, ethyl ester	50.68a	411.98ab	117.00a	649.24b	149.69a	Thujene	5.37	7.47	14.06	9.93	22.46
Propanoic acid, ethyl ester	n.d.	5.09ab	1.52a	9.12b	5.19ab	<i>c</i> -Pinene	7.40	11.54	43.34	27.25	64.60
Propanoic acid, 2-hydroxyethyl ester	n.d.	12.38ab	2.89ab	18.66a	2.67b	$\beta$ -Pinene	18.44	153.41	55.90	46.59	97.31
Butanoic acid, ethyl ester	18.83ac	99.23b	61.71bc	85.27b	11.29a	$\beta$ -Myrcene	32.92	252.94	37.24	45.89	40.86
Pentanoic acid, ethyl ester	n.d.	6.03	4.21	8.38	6.03	Limonene	610.92ab	829.90ac	1016.74a	497.85bc	321.11b
Hexanoic acid, ethyl ester	5.63a	29.51b	18.90ab	25.93b	7.36a	<b>Other or unknown origin</b>					
2-Propanoic acid, 2-dimethyl ester	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.11	Carbon disulphide	4.85a	105.46b	92.84b	132.19b	n.d.
<b>Carbohydrate fermentation</b>											
Ethanol	321.48a	1652.24b	1761.34b	1567.93b	769.80ab	Chloroform	36.33ab	1.18a	31.30ab	75.50ab	252.56b
3-Hydroxy-2-butanone	5.26a	18.04b	11.39ab	14.84ab	5.61a	1,3-Pentadiene	n.d.	24.94	9.88	384.95	n.d.
Acetic acid	267.08ab	1499.04b	1193.96ab	1243.38ab	312.88a	Styrene	16.66	n.d.	n.d.	1.73a	49.42b
						4,4'-(1-Methylethylidene) phenol	198.48ab	282.93b	81.61a	146.05a	19.98
						Thiobis-methane	n.d.	14.11	16.93	5.10	n.d.

<sup>a</sup> Results are expressed in Arbitrary Area Units ( $\times 10^9$ ) as means of 3 replicates of each sausage (5 sausages in each batch). Means with different lowercase letters in the same row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between batches.

<sup>b</sup> Control: uninoculated batch; Dh B: batch inoculated with D. hansenii B mtDNA restriction pattern; Dh E: batch inoculated with D. hansenii E mtDNA restriction pattern; Dh C: batch inoculated with D. hansenii C mtDNA restriction pattern; Dh B+Dh E+Dh C: batch inoculated with D. hansenii B, D, hansenii E and D. hansenii C mtDNA restriction patterns. "n.d.": not detected.

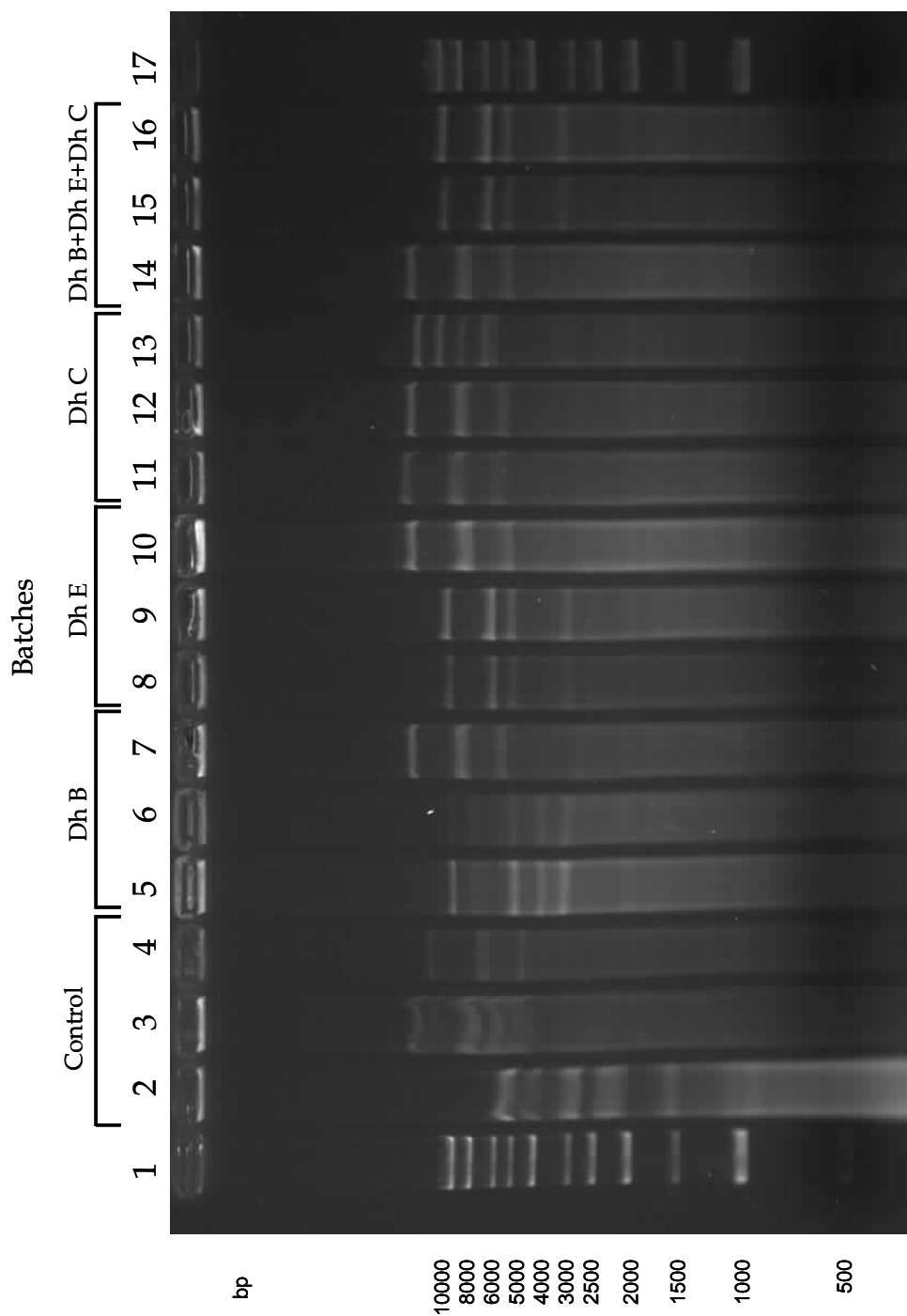


Figure 1. Andrade, Córdoba, Casado, Córdoba and Rodríguez

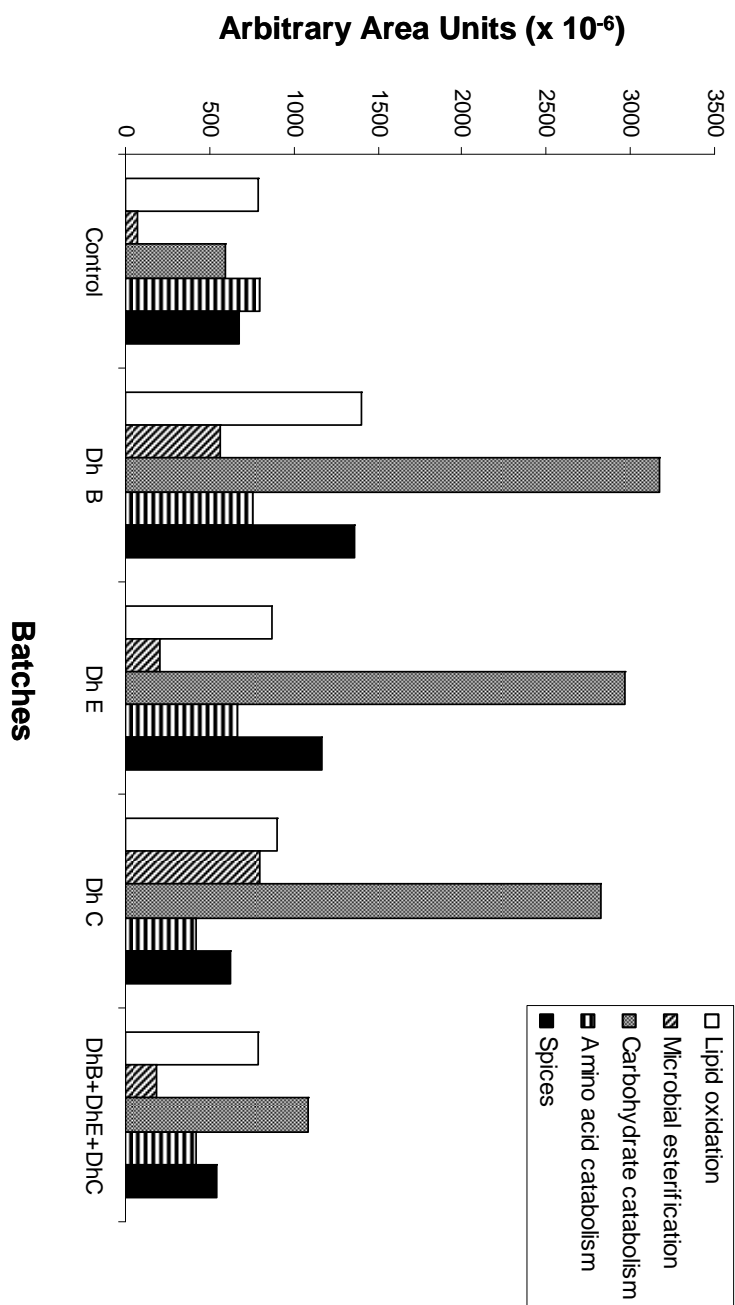


Figure 2. Andrade, Córdoba, Casado, Córdoba and Rodríguez

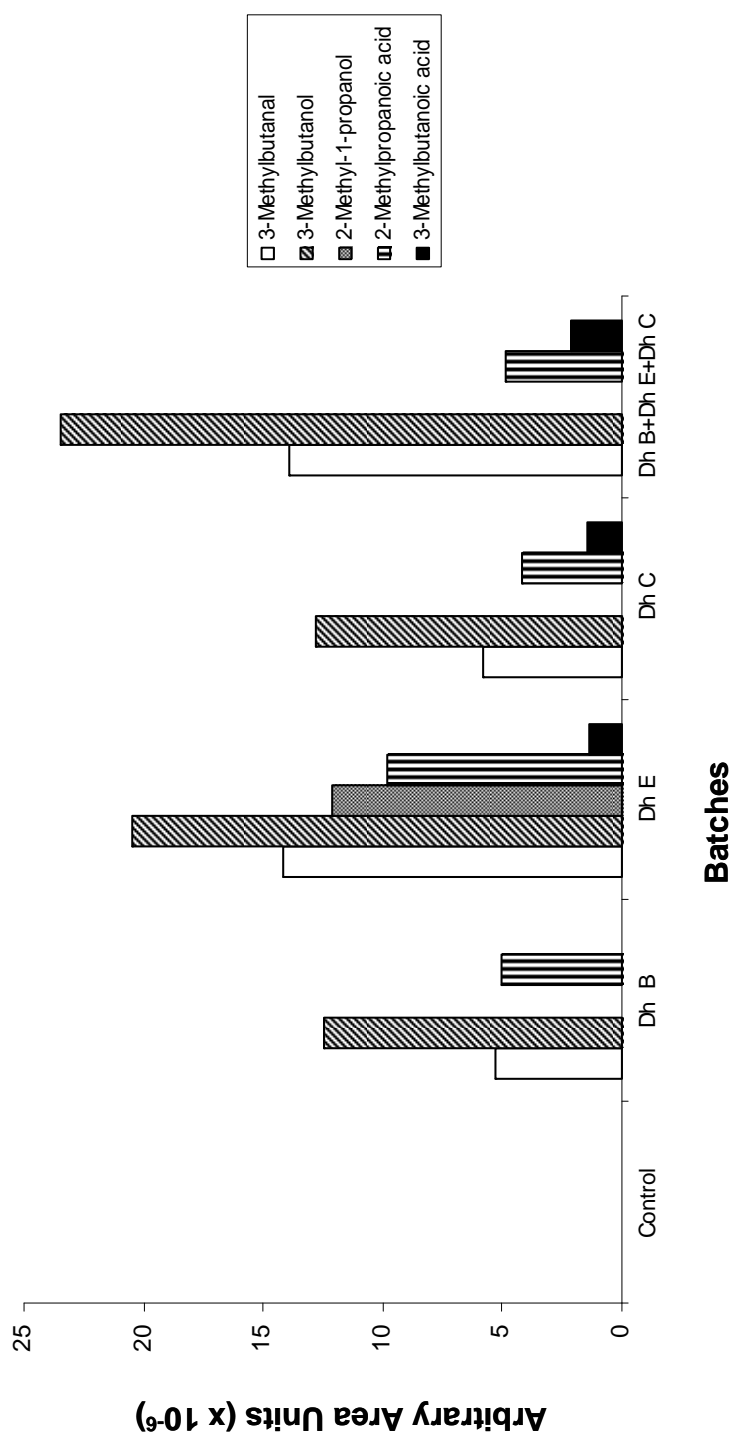


Figure 3. Andrade, Córdoba, Casado, Córdoba and Rodríguez



## IV. DISCUSIÓN

---





#### IV.1. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS AISLADAS DE JAMÓN IBÉRICO

En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la efectividad de diferentes métodos de ácidos nucleicos (análisis de restricción de las regiones ribosómicas ITS y 18S, y del ADN mitocondrial, así como la técnica RAPD-PCR), en la caracterización de levaduras aisladas de jamón ibérico. Estos métodos han sido utilizados con éxito en la caracterización de determinadas especies de levaduras como *S. cerevisiae*, pero han sido poco usados en la tipificación de las levaduras que habitualmente se desarrollan en productos cárnicos de larga maduración como el jamón ibérico donde, como puede comprobarse en los resultados, predomina *D. hansenii*. Para el desarrollo de este objetivo se han utilizado cepas de referencia de diferentes especies de levaduras pertenecientes a la CECT.

El análisis de restricción de la región ITS, con las endonucleasas de restricción *HaeIII*, *SauA3I* y *TaqI*, muestra un alto porcentaje de similitud entre las cepas de las especies *P. carsonii*, *D. hansenii* y *D. polymorphus* (Figura 8). Las cepas de las especies restantes sólo pudieron ser identificadas a nivel de especie. Bujdosó y col. (2001), empleando 11 enzimas de restricción diferentes, entre ellos los utilizados en el presente estudio, sólo consiguieron diferenciar a nivel de especie aislados de *Hanseniospora*.

No obstante, el análisis de restricción de la región ribosómica ITS ha sido empleado para la identificación rápida de especies de levaduras tanto de origen vínico (Baleiras Couto y col., 1995; Guillamón y col., 1998; Fernández y col., 1999; Fernández-Espinar y col., 2000), como de productos lácteos (Wyder y Puhán, 1996; Caggia y col., 2001; Petersen y col., 2001; Álvarez-Martín y col., 2007) y de otros alimentos (Deak y col., 2000; Cadez y col., 2002; Las Heras-Vázquez y col., 2003; Arroyo-López y col., 2006; Aquilanti y col., 2007).

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, el análisis de restricción de la región ITS parece tener poca capacidad para la identificación y caracterización de levaduras de interés en productos cárnicos, en los que predomina la especie *D. hansenii*. Resultados similares a los anteriormente descritos obtuvo Martorell (2006) al utilizar el análisis de restricción de la región ITS para la diferenciación de 15 especies del género *Debaryomyces*, sin obtener un perfil de restricción distintivo para cada una de ellas, a pesar de haber empleado 13 endonucleasas. Guillamón y col. (1998) emplearon el análisis de restricción de la región ribosómica ITS con 7 enzimas para la diferenciación

de las especies *D. hansenii*, *D. polymorphus* y *D. pseudopolymorphus*, y en la mayor parte de los casos estas 3 especies del género *Debaryomyces* presentaron el mismo perfil de restricción. Sin embargo, la diferenciación de estas 3 especies sí ha sido posible mediante el análisis de restricción de la región IGS del ADNr (Romero y col., 2005).

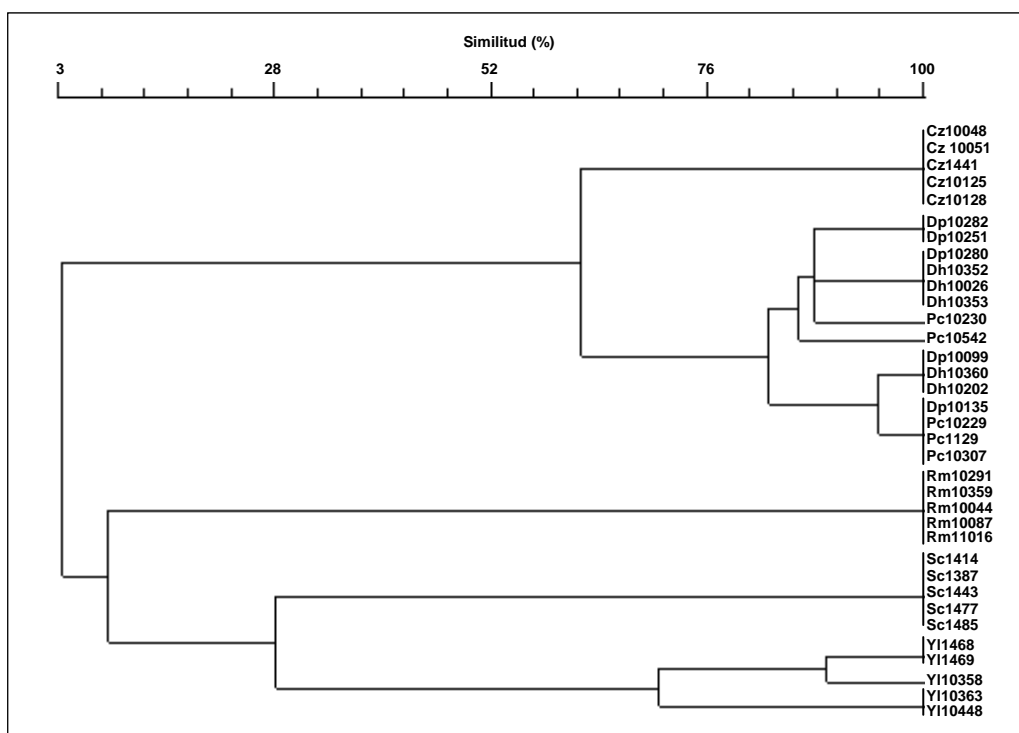


Figura 8. Dendrograma resultante del análisis de restricción de la región ITS del ADN ribosómico con los enzimas *HaeIII*, *SauA3I* y *TaqI*.

En la amplificación de la región 18S del ADNr el tamaño fue muy similar en todas las cepas analizadas, lo cual no permitió la diferenciación a nivel de especie. El análisis de restricción de esta región, con los enzimas *HaeIII*, *RsaI* y *TaqI*, no diferencia las especies *C. zeylanoides*, *D. polymorphus* y *D. hansenii* (Figura 9). Además sólo fue posible diferenciar a nivel de cepa las especies *P. carsonii* y *Y. lipolytica*. Por consiguiente, esta técnica no es útil en la caracterización de las levaduras aisladas con mayor frecuencia de productos cárnicos madurados. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Capece y col. (2003) que con el análisis de restricción del 18S encuentran diferencias a nivel de especie y cepa en las 4 especies de levaduras ensayadas, *Kloeckera apiculata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Candida stellata*.

En definitiva, el análisis de restricción de las regiones ITS y 18S del ADNr no es un método adecuado para la diferenciación a nivel de especie de levaduras de interés en la industria cárnica.

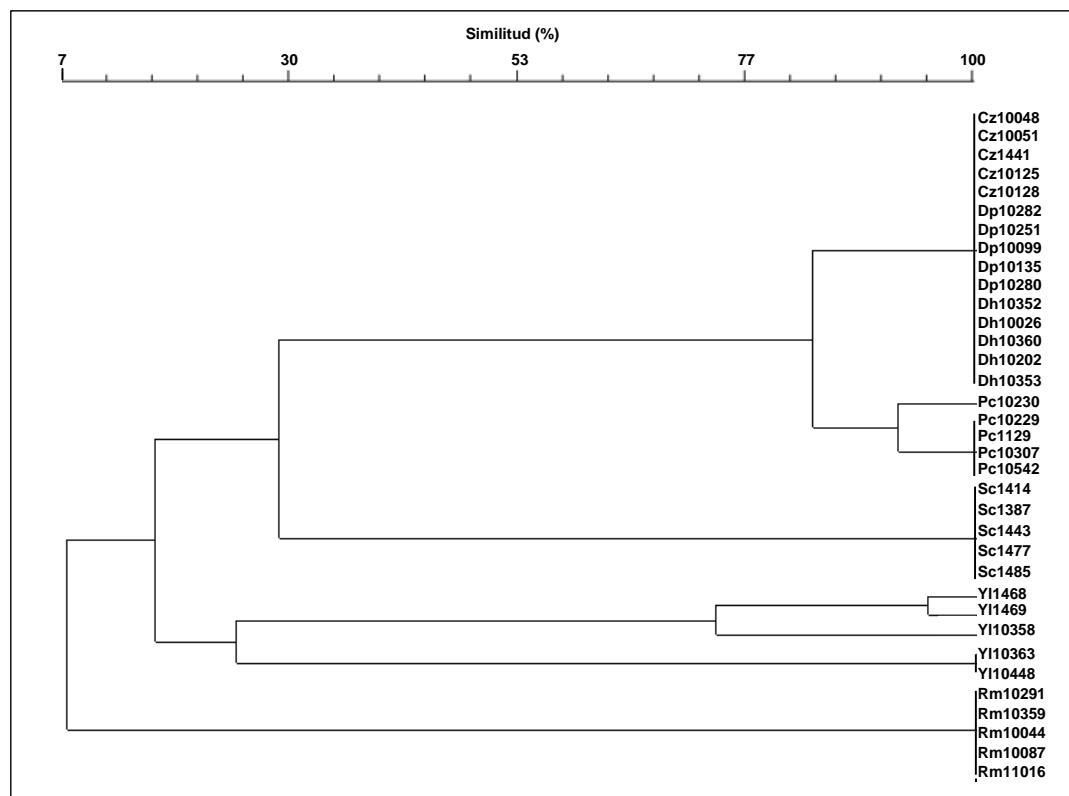


Figura 9. Dendrograma resultante del análisis de restricción de la región 18S del ADN ribosómico con los enzimas *HaeIII*, *RsaI* y *TaqI*.

La técnica RAPD-PCR con el cebador M13 da lugar a polimorfismos genéticos que permiten diferenciar las distintas levaduras ensayadas a nivel de especie, exceptuando varias cepas de *D. polymorphus* y *P. carsonii*. Con este cebador sólo es posible diferenciar a nivel de cepa las especies *D. hansenii*, *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica*. Es por tanto también un método poco útil para la caracterización de las especies de levaduras más frecuentemente aisladas en productos cárnicos madurados. Sin embargo, el cebador M13 ha sido utilizado mayoritariamente para la diferenciación a nivel de especie de levaduras con origen alimentario (Baleiras Couto y col., 1996a; Andrighetto y col., 2000; Bujdosó y col., 2001; Foschino y col., 2004; Nikolaou y col., 2007), llegando además a proporcionar información para discriminar a nivel de cepa (Lieckfeldt y col., 1993; Vasdinyei y Deák, 2003). Cocolin y col. (2006) demostraron que

este cebador es útil para establecer diferencias entre aislados de la especie *D. hansenii* de embutidos crudos madurados al igual que ha sido obtenido en el presente estudio.

Los polimorfismos obtenidos tras las amplificaciones arbitrarias del ADN mediante RAPD-PCR, con los cebadores  $(GACA)_4$ ,  $(GAC)_5$  y  $(GTG)_5$ , permitieron diferenciar a nivel de especie e incluso, dependiendo del cebador, establecer diferencias a nivel de cepa. La mayor capacidad de diferenciación se obtuvo con el cebador  $(GACA)_4$ , con el que se encuentran diferencias entre perfiles genéticos de cepas de la misma especie en casi todas las levaduras analizadas, con excepción de la especie *P. carsonii* en la que las cepas ensayadas mostraron perfiles genéticos muy similares (Figura 10). Este cebador ha sido escasamente empleado, pero con éxito en la caracterización mediante RAPD-PCR de levaduras de origen alimentario (Lieckfeldt y col., 1993).

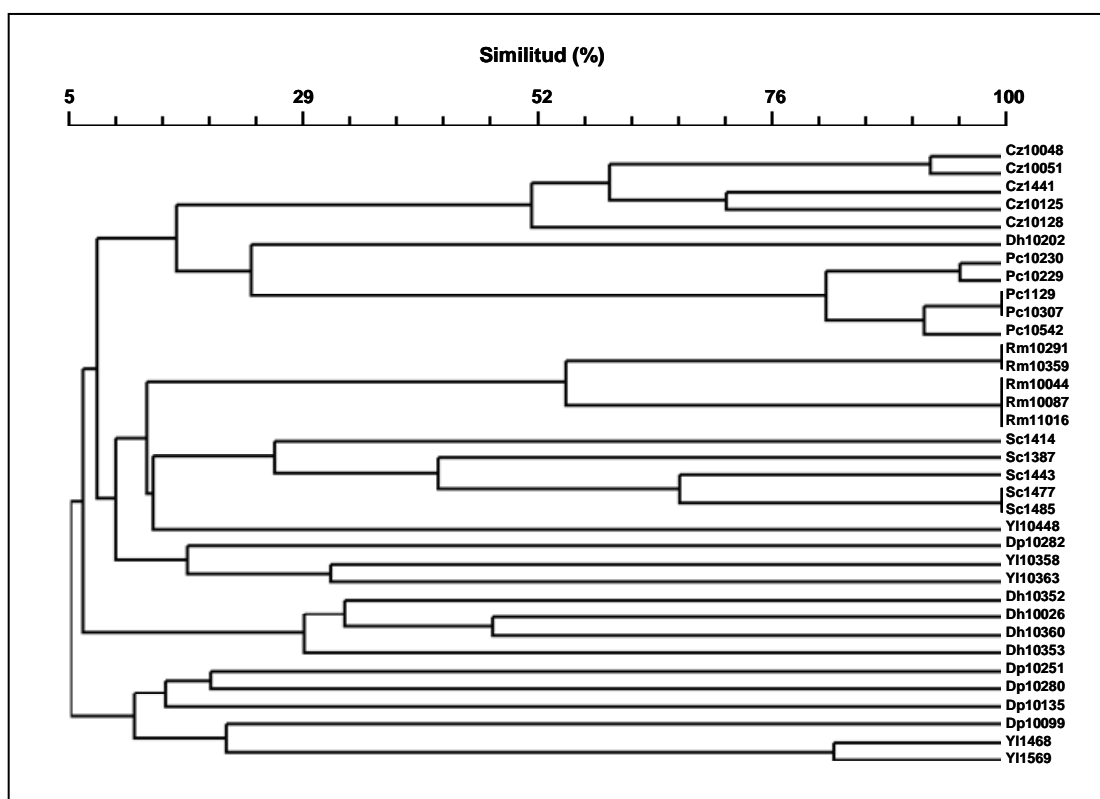


Figura 10. Dendrograma resultante de la técnica RAPD-PCR con el cebador  $(GACA)_4$ .

Con los cebadores  $(GAC)_5$  y  $(GTG)_5$  se encontraron diferencias entre las cepas de levaduras ensayadas suficientes como para discriminar a nivel de especie. En la mayoría de las especies no fue posible la caracterización a nivel de cepa con el cebador

(GTG)<sub>5</sub>, sin embargo una mayor diferenciación fue posible con el cebador (GAC)<sub>5</sub> a pesar de que algunas cepas de *R. mucilaginosa*, *C. zeylanoides* y *Y. lipolytica* y todas las de *S. cerevisiae* presentaron una alta similitud en sus perfiles de amplificación. Estos dos cebadores han sido utilizados con distintos resultados. Así, Lieckfeldt y col. (1993) los emplearon y consiguieron discriminar sólo a nivel de especie aislados del género *Saccharomyces*. Naumova y col. (2003) usaron el cebador (GAC)<sub>5</sub> para diferenciar aislados del género *Saccharomyces* procedentes de cerveza y tampoco encontraron diferencias relevantes en los perfiles de amplificación. Resultados similares obtuvieron Capece y col. (2003) que no consiguieron discriminar a nivel de cepa aislados de las especies *C. stellata*, *K. apiculata*, *M. pulcherrima* y *S. pombe* utilizando los cebadores (GAC)<sub>5</sub> y (GTG)<sub>5</sub>. Sin embargo, Baleiras Couto y col. (1996a,b) emplearon ambos cebadores para la caracterización de aislados de los géneros *Cryptococcus*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* y *Candida* observando diferencias a nivel de especie y cepa. El nivel de discriminación encontrado por estos autores con el cebador (GTG)<sub>5</sub> fue mayor que el observado con el cebador (GAC)<sub>5</sub> al contrario de lo obtenido en el presente estudio. Caruso y col. (2002) obtuvieron discriminación a nivel de cepa con el cebador (GAC)<sub>5</sub> en *S. cerevisiae* pero no en *K. apiculata*. Así, el grado de discriminación de la técnica RAPD-PCR parece depender de los cebadores empleados y las especies de levaduras analizadas.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, los 3 cebadores ensayados pueden ser utilizados para la caracterización de levaduras aisladas de productos cárnicos a nivel de especie. El cebador (GACA)<sub>4</sub> es el que proporciona mayor información para la diferenciación adecuada de aislados de levaduras con interés en la industria cárnica a nivel de cepa.

Los patrones de restricción del ADN mitocondrial generados por el enzima *Hae*III mostraron diferencias a nivel de especie e incluso a nivel de cepa en todas las levaduras ensayadas, con la excepción de *R. mucilaginosa* al presentar todas sus cepas el mismo perfil de bandas (Figura 11).

Este método de ácidos nucleicos ha sido ampliamente utilizado en la diferenciación de cepas de levaduras del género *Saccharomyces*, la mayor parte de ellas de origen vínico (Querol y col., 1992b; Comi y col., 2000; Esteve-Zarzoso y col., 2000; Fernández-Espinar y col., 2001; Schuller y col., 2003; Nikolaou y col., 2007; Jeyaram y col., 2008; Suárez y col., 2008). También ha sido descrito como útil para discriminar a nivel de cepa otras especies de levaduras (Romano y col., 1996; Suzzi y col., 2000;

Petersen y col., 2001, 2002; Martorell y col., 2005c, 2006). Sin embargo, no ha sido empleada en la diferenciación de la población de levaduras presente en los productos cárnicos madurados.

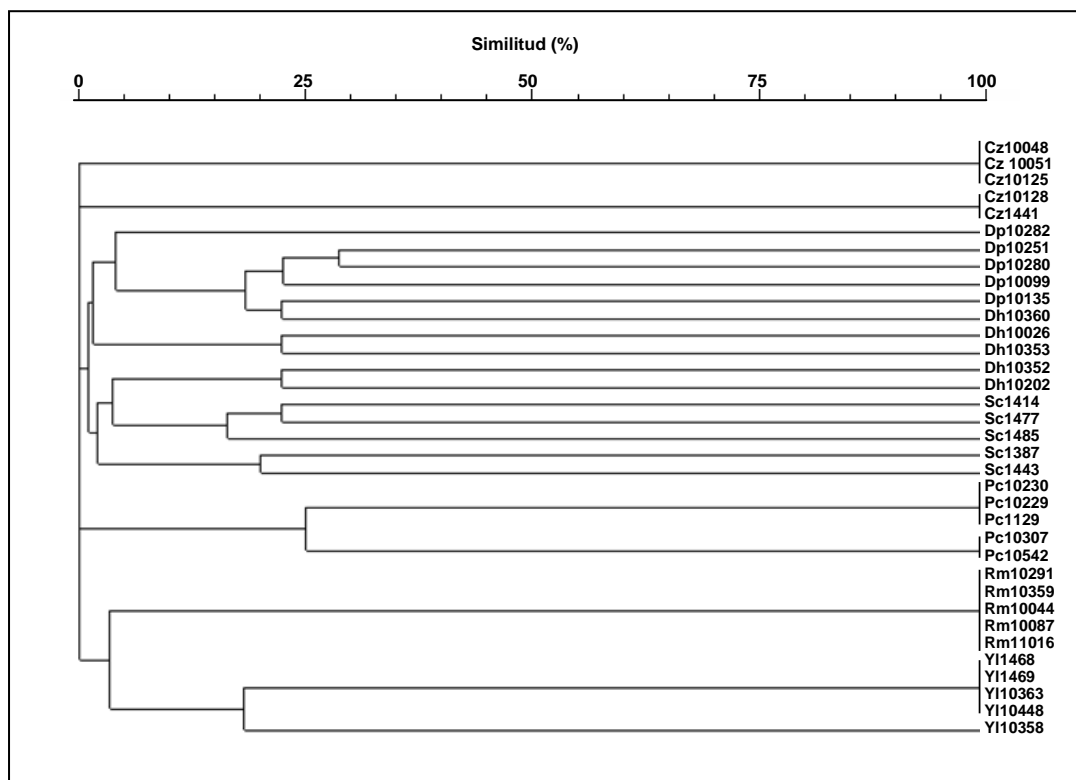


Figura 11. Dendrograma resultante del análisis de restricción del ADN mitocondrial con la endonucleasa *HaeIII*.

De acuerdo con lo indicado por varios autores, el grado de diferenciación del análisis de restricción del ADN mitocondrial se incrementa al combinar patrones obtenidos con diferentes endonucleasas (Pramateftaki y col., 2000; Petersen y col., 2001), pues no todos los enzimas generan el mismo grado de polimorfismo. Además unos enzimas son más apropiados que otros para diferenciar a nivel de cepa una determinada especie. Así, las endonucleasas *RsaI* y *HinfI*, sugeridas para el análisis de restricción del ADN mitocondrial por Querol y col. (1992b), muestran un buen nivel de discriminación en el estudio de cepas de *S. cerevisiae* y de otras especies pertenecientes al género *Saccharomyces* (Sabaté y col., 1998; Esteve-Zarzoso y col., 2000). En el caso de la especie *D. hansenii* se ha observado que la endonucleasa *HaeIII* muestra un mayor nivel de variabilidad genética que otros enzimas (Romano y col., 1996; Petersen y col., 2001; Casado, 2006). Probablemente el empleo conjunto de varios enzimas sería de

interés. No obstante, en el presente trabajo el uso de una única endonucleasa de restricción ha aportado información que puede ser suficiente para la caracterización a nivel de cepa de aislados de levaduras de interés en la industria cárnica, simplificando de esta forma el análisis rutinario.

Como puede deducirse de lo expuesto se dispone de una gama bastante amplia de métodos de ácidos nucleicos para la identificación y caracterización de levaduras, pero no todos presentan la suficiente resolución como para ser empleados en la diferenciación de las distintas cepas de la población de levaduras característica de los productos cárnicos madurados. La decisión de la técnica o técnicas a emplear estará condicionada por el nivel de discriminación que sea requerido.

De todos los métodos ensayados en este trabajo, el más sensible ha resultado ser el análisis de restricción del ADN mitocondrial, además de ser rápido, reproducible y sencillo. Esta técnica es la más adecuada para la diferenciación a nivel de especie y los polimorfismos que genera son muy útiles para la tipificación a nivel de cepa. La técnica RAPD-PCR muestra igualmente un elevado poder discriminatorio y puede ser de utilidad en la caracterización de levaduras que habitualmente se desarrollan en productos cárnicos madurados. En este sentido, la utilización de forma combinada del RAPD-PCR con el cebador (GACA)<sub>4</sub> y el análisis de restricción del ADN mitocondrial podría permitir una caracterización más adecuada de las levaduras de interés en la industria cárnica a nivel de cepa. Así su uso debería ser considerado, frente a la caracterización fenotípica, en la selección y control de la implantación de levaduras como cultivos iniciadores en la industria cárnica. Además estos métodos podrían ser de utilidad en la diferenciación de cepas de levaduras de interés tecnológico de las causantes de alteración en los productos cárnicos.

#### **IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS AISLADAS DE JAMÓN IBÉRICO**

La efectividad del análisis de restricción del ADN mitocondrial y de la técnica RAPD-PCR en la diferenciación de levaduras de productos cárnicos fue evaluada con 371 aislados de levaduras obtenidos de jamones procedentes de las 4 D.O.P. españolas de jamón curado de cerdo ibérico.

Inicialmente, los aislados fueron caracterizados mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial con el enzima *HaeIII*. Los 15 patrones de restricción resultantes se compararon con los obtenidos previamente para las cepas de referencia de la CECT.

Esta comparación permitió la caracterización a nivel de especie de algunos de los aislados de jamón ibérico, al presentar un perfil de bandas similar e incluso idéntico en algunos casos a las cepas de referencia. De esta manera, los patrones de restricción B, D, E y F fueron adscritos a la especie *D. hansenii* y los patrones H e I a *C. zeylanoides*.

Todos los aislados fueron asimismo caracterizados mediante RAPD-PCR usando los cebadores (GACA)<sub>4</sub> y (GAC)<sub>5</sub>, al ser los que presentaron previamente un mayor grado de discriminación con las cepas de referencia de la CECT. El nivel de discriminación obtenido con ambos cebadores fue diferente, siendo mayor el del (GAC)<sub>5</sub> que el del (GACA)<sub>4</sub>. De los 22 patrones de amplificación obtenidos con el cebador (GAC)<sub>5</sub> sólo los patrones 4 y 7 fueron idénticos a los de las cepas de referencia, pertenecientes a las especies *C. zeylanoides* y *D. hansenii*, respectivamente. De los 16 patrones de amplificación obtenidos con el cebador (GACA)<sub>4</sub> sólo el patrón 7 mostró un perfil idéntico a una de las cepas de referencia de *D. hansenii*.

Cuando se compararon los resultados obtenidos mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial y la técnica RAPD-PCR, determinados patrones de restricción adscritos a diferentes especies presentaron el mismo perfil de amplificación por RAPD-PCR lo cual resulta incongruente. Para dilucidar cuál de las dos técnicas está identificando de forma correcta a nivel de especie, se secuenció la región 18S del ADNr de aislados representantes de los patrones obtenidos mediante análisis de restricción del ADN mitocondrial y RAPD-PCR.

La secuenciación de la región 18S del ADNr confirmó la identificación a nivel de especie encontrada con el análisis de restricción del ADN mitocondrial y permitió la identificación de los aislados con perfiles de restricción que presentaron una menor similitud con los de las cepas de referencia de la CECT. Así, los patrones de restricción H, I, N, O y S fueron identificados como *C. zeylanoides* y los restantes como *D. hansenii*. La secuenciación de la región ribosómica 18S ha sido empleada con éxito para la identificación de levaduras de origen alimentario a nivel de especie (Cappa y Cocconcelli, 2001; Oguntoyinbo, 2008), pero se trata de una técnica compleja que no resulta adecuada para el análisis rutinario en la industria alimentaria.

Los resultados anteriores confirman al análisis de restricción del ADN mitocondrial como método adecuado para la caracterización de los aislados de levaduras de jamón ibérico a nivel de especie y cepa. Varios estudios han confirmado la eficiencia de esta técnica para la caracterización de levaduras de origen alimentario a



nivel de cepa (Torriani y col., 1999; Fernández-Espinar y col., 2001; Petersen y col., 2001; Martorell y col., 2005c; Nikolaou y col., 2007; Jeyaram y col., 2008).

Al aplicar el análisis de restricción del ADN mitocondrial en la caracterización a nivel de especie de los aislados de jamón curado de cerdo ibérico sólo se detectaron las especies *D. hansenii* y *C. zeylanoides*, siendo la primera la dominante con cerca del 95% del total de aislados. Igualmente, *D. hansenii* ha sido descrita como la especie más frecuentemente aislada en productos cárnicos, entre los que se encuentra el jamón curado (Comi y Cantoni, 1983; Huerta y col., 1988; Deak, 1991; Núñez y col., 1996; Encinas y col., 2000; Gardini y col., 2001; Cocolin y col., 2006; Aquilanti y col., 2007; Simoncini y col., 2007). Levaduras pertenecientes a otras especies, como *D. maramba*, *Rhodotorula rubra*, *P. carsonii* y *Candida famata*, no han sido encontradas en este estudio a pesar de que se han detectado esporádicamente en jamón curado (Núñez y col., 1996; Simoncini y col., 2007). De este modo, la población de levaduras de jamón curado de cerdo ibérico no se caracterizó por estar compuesta por una amplia variedad de especies, pero sí por presentar una importante variabilidad de biotipos de la misma especie, especialmente en la especie *D. hansenii*.

La caracterización de los aislados de levaduras de jamón curado mediante RAPD-PCR no coincidió con los resultados obtenidos mediante la secuenciación de la región 18S del ADNr. Así, aislados identificados como especies diferentes mediante la secuenciación presentaron el mismo patrón de amplificación. Por lo tanto, la técnica RAPD-PCR con los cebadores (GACA)<sub>4</sub> y (GAC)<sub>5</sub> no debería ser empleada individualmente para la caracterización de levaduras aisladas de jamón curado de cerdo ibérico. Sin embargo, esta técnica ha sido utilizada para la caracterización, tanto a nivel de especie como de cepa, de determinadas especies de levaduras de origen alimentario (Lieckfeldt y col., 1993; Baleiras Couto y col., 1996b; Prillinger y col., 1999; Andriquetto y col., 2000; Succi y col., 2003; Vasdinyei y Deák, 2003; Fadda y col., 2004; Foschino y col., 2004; Nikolaou y col., 2007; Walczak y col., 2007). Por los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral la utilidad de esta técnica para la tipificación de levaduras procedentes de productos cárnicos madurados debe limitarse a la diferenciación de los biotipos de levaduras previamente establecidos mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial.

Los aislados de levaduras de jamón curado de cerdo ibérico identificados genótipicamente mediante secuenciación de la región 18S del ADNr fueron también identificados fenotípicamente empleando el sistema Biolog MicroLog™, con la finalidad

de evaluar su eficacia como método de identificación de levaduras. Esta técnica, basada en pruebas bioquímicas, no proporcionó una identificación correcta de todos los patrones de restricción, afectando principalmente a los patrones identificados como *C. zeylanoides* con la secuenciación de la región 18S. Así, un porcentaje del 20% de los aislados no pudo ser identificado con suficiente fiabilidad (Tabla 14).

Tabla 14. Identificación de levaduras de jamón ibérico representantes de los patrones de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt) y de RAPD-PCR mediante secuenciación de la región 18S del ADN ribosómico (ADNr) y el sistema Biolog MicroLog™.

Patrones de restricción del ADNmt	Patrones RAPD-PCR		Secuenciación del ADNr 18S	Identificación con Biolog MicroLog™
	<i>Hae</i> III	(GAC) <sub>5</sub>		
A		7	7,14	<i>D. hansenii</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (78%)
B		1,2,3,6,7,10,11,12,16,22	2,7,11,12,13	<i>D. hansenii</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (94%)
C1		1,3,5,6,7,8,9,10,11	1,2,3,5,6,7,11	<i>D. hansenii</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (90%)
C2		2,7,9	2,5,7	<i>D. hansenii</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (75%)
D		3,7,11,17,18,20	2,7	<i>D. hansenii</i> (99%) <i>D. hansenii</i> (96%)
E		1,3,7,10,12,14,15,16	11,12	<i>D. hansenii</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (82%)
F		1,3,6,8	1,4,12	<i>D. hansenii</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (96%)
G		7	7	<i>D. hansenii</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (96%)
H		1,2,3,4,21	7,9,10,16	<i>C. zeylanoides</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (96%)- <i>C. zeylanoides</i> (99%)
I		3,13,19	7,8,9	<i>C. zeylanoides</i> (99%) <i>C. zeylanoides</i> (99%)
K		3,7,16	1,2,11,12	<i>D. hansenii</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (78%)
M		3	5,12,15	<i>D. hansenii</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (99%)
N		18	14	<i>C. zeylanoides</i> (100%) <i>C. zeylanoides</i> (99%)
O		4	7	<i>C. zeylanoides</i> (99%) <i>C. zeylanoides</i> (99%)- <i>D. hansenii</i> (91%)
S		4	7	<i>C. zeylanoides</i> (100%) <i>D. hansenii</i> (78%)

Simoncini y col. (2007) consiguieron identificar correctamente un mayor porcentaje (cerca del 93%) de aislados de levaduras de jamón curado de Parma mediante este método fenotípico, pero tampoco llegaron a identificarlos en su totalidad. Análogamente, otros autores no han descrito el sistema Biolog MicroLog™ como una técnica fiable para la identificación de especies e incluso de géneros de levaduras de origen alimentario (Praphailong y col., 1997; Foschino y col., 2004). Por

consiguiente, la importancia de la caracterización basada en los métodos de ácidos nucleicos frente a las técnicas fenotípicas queda así confirmada.

### **IV.3. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS AISLADAS DE JAMÓN IBÉRICO EN FUNCIÓN DEL ÁREA GEOGRÁFICA DE PROCESADO**

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es conocer la distribución de las especies y biotipos de levaduras más frecuentemente encontrados por áreas de procesado de jamón ibérico. Estos resultados podrían permitir conocer cuáles son los biotipos predominantes y si hay algunos de ellos asociados a una determinada zona de producción. Toda esta información puede ser de extraordinario interés para la selección de cultivos iniciadores adaptados a los nichos ecológicos de elaboración.

Con este propósito se ha analizado la distribución de los aislados de levaduras en función de los patrones de restricción del ADN mitocondrial en las diferentes áreas geográficas de producción (las 4 D.O.P. existentes en España) del jamón curado de cerdo ibérico.

En todas las D.O.P. se encontraron la mayoría de los 15 patrones de levaduras obtenidos con el análisis de restricción del ADN mitocondrial con la endonucleasa *HaeIII* (Figura 12). Sin embargo, el patrón de restricción más abundante en cada una de ellas difirió siendo los patrones B, C1, D y E de *D. hansenii* los predominantes en las D.O.P. Los Pedroches, Jamón de Huelva, Guijuelo y Dehesa de Extremadura, respectivamente. Además, hay patrones que se detectaron de forma exclusiva en una D.O.P., como los patrones O y S, y N de *C. zeylanoides* que solamente fueron encontrados en la D.O.P. Guijuelo y en la D.O.P. Jamón de Huelva, respectivamente. A la vista de estos resultados cabría pensar que los perfiles de restricción del ADN mitocondrial podrían estar relacionados con las diferentes áreas geográficas de producción de jamón ibérico. Incluso determinados biotipos de levaduras podrían utilizarse como indicadores de la procedencia geográfica de los jamones, lo cual podría ser especialmente interesante para las D.O.P.

Anteriormente, Núñez y col. (1996) describieron la existencia de diferentes patrones fenotípicos en la población de levaduras del jamón ibérico y encontraron cierta asociación entre estos y el lugar de producción. Otros autores han investigado la relación entre los perfiles genéticos de levaduras de diferentes alimentos y lugares de producción pero no en todos los casos se ha encontrado una correlación definida

(Versavaud y col., 1995; Romano y col., 1996; Corredor y col., 2003). En el caso de la industria vínica, utilizando diferentes técnicas de ácidos nucleicos, entre ellas el análisis de restricción del ADN mitocondrial, se ha demostrado la existencia de cepas autóctonas de *S. cerevisiae* representativas de una determinada región (Venzinhet y col., 1992; Guillamón y col., 1996) totalmente adaptadas a determinadas características climáticas y sustratos.

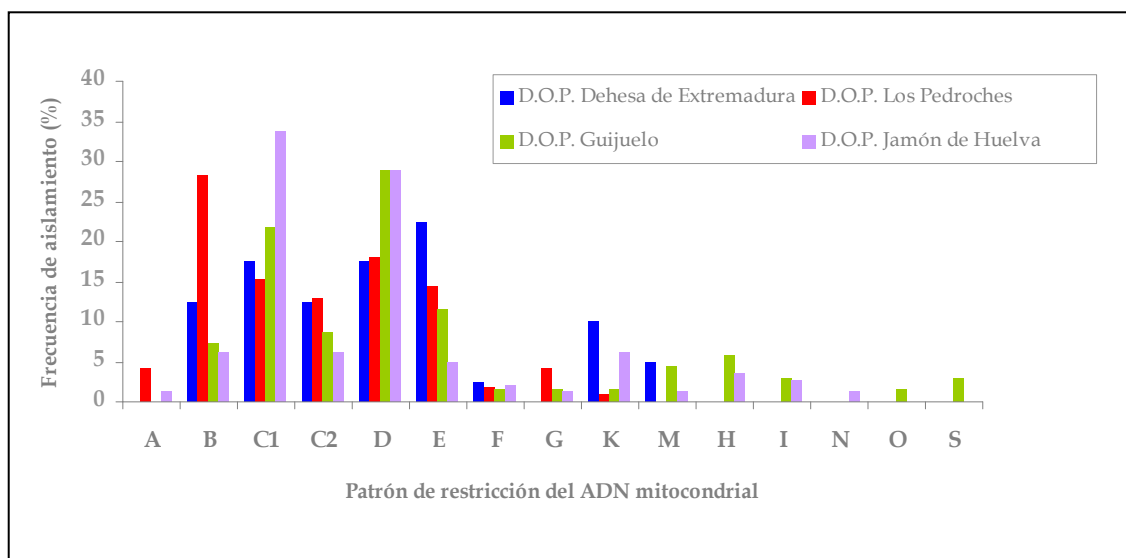


Figura 12. Distribución por Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.) de los diferentes patrones de levaduras aislados de jamón ibérico obtenidos mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial.

La existencia de biotipos de levaduras específicos en cada zona de producción de jamón ibérico puede estar justificada por las diferencias climáticas existentes entre las áreas de producción y la adaptación de estos biotipos a dichas peculiares condiciones. De hecho en la D.O.P. Guijuelo las temperaturas alcanzadas durante el procesado, sobre todo en las etapas de secadero y bodega, son más bajas que en el resto de las zonas de producción (Ventanas y col., 2001). El hecho de existir diferencias en la distribución de biotipos entre zonas de producción adquiere especial relevancia si tenemos en cuenta que, como se observa en el apartado de resultados y se discute a continuación, hay diferencias considerables entre los biotipos en la producción de compuestos volátiles. Esto podría traducirse en diferencias en el aroma de los jamones en función de su lugar de procesado. Por ello, la caracterización de las levaduras predominantes en los secaderos de las distintas D.O.P. y su asociación a un perfil de

generación de compuestos volátiles podría ser de gran interés para la industria cárnica pues permitiría conocer y seleccionar el biotipo o los biotipos de levaduras más adecuados para ser usadas como cultivos iniciadores. De esta forma se podría conseguir lotes de producción homogéneos dentro de una industria elaboradora de jamón ibérico, evitando variaciones dependientes de la población de levaduras que se desarrollan en cada caso.

#### **IV.4. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE LEVADURAS AISLADAS DE JAMÓN IBÉRICO**

Con el objetivo de evaluar la influencia en la formación de compuestos volátiles de los principales biotipos de levaduras de jamón ibérico, se analizó la producción de compuestos volátiles de interés en el aroma a curado de 116 aislados representantes de los 10 patrones de restricción del ADN mitocondrial más frecuentemente aislados. Con dicha finalidad los aislados se inocularon en un medio de cultivo modelo que contiene los principales componentes del jamón curado (ácido oleico, ribosa, creatina y aminoácidos libres) en las concentraciones habituales de estos componentes durante el proceso de maduración (Córdoba y col., 1994a; Martín y col., 2001; Petrón y col., 2004). Además se añadió  $\alpha$ -cetoglutarato con la finalidad de favorecer la conversión de los aminoácidos en compuestos volátiles, debido a que el primer paso en el catabolismo de aminoácidos consiste en una transaminación que requiere la presencia de un  $\alpha$ -cetoácido que actúa como aceptor del grupo amino, siendo éste comúnmente el  $\alpha$ -cetoglutarato (Yvon y col., 1998). Para obtener unas condiciones de  $a_w$  y pH similares a las descritas en jamón ibérico durante el proceso de maduración (Córdoba y col., 1994b; Rodríguez y col., 1994) se añadió también cloruro sódico y ácido láctico.

El sistema modelo diseñado permite simplificar la metodología de selección de las levaduras utilizadas como cultivos iniciadores, pues resultaría inviable inocular en productos cárnicos todos los aislados a los que inicialmente se desean evaluar sus aptitudes. Con este método se pretendía además analizar exclusivamente los compuestos volátiles producidos por los aislados de levaduras, sin la influencia de otros microorganismos.

Transcurrido los 30 días de incubación en el medio de cultivo, un total de 61 compuestos volátiles fueron identificados. Según el grupo químico, los compuestos volátiles se agruparon en 16 alcoholes, 10 hidrocarburos, 10 cetonas, 8 aldehídos, 8

ésteres, 4 compuestos azufrados y 2 ácidos carboxílicos. La mayor parte de los compuestos identificados han sido previamente descritos en jamón curado (Flores y col., 1998; Ruiz y col., 1998, 1999; Martín y col., 2006) y en embutidos crudos curados (Schmidt y Berger, 1998; Ansorena y col., 2001; Flores y col., 2004; Marco y col., 2006; Bianchi y col., 2007).

En el lote control no inoculado sólo se detectaron 21 compuestos volátiles y la mayor parte de ellos en bajas concentraciones, excepto el etanol y el etilbenzaldehído que fueron detectados en las mayores cantidades en este lote. Ambos compuestos han sido descritos como relativamente poco aromáticos en los productos cárnicos madurados. La menor cantidad de etanol en las muestras inoculadas podría deberse a que las levaduras utilizan este alcohol como fuente de carbono y energía (Flores y col., 2000). El etanol podría generarse a partir de los compuestos derivados de la degradación lipídica y el etilbenzaldehído podría derivar del catabolismo de aminoácidos.

En el medio de cultivo inoculado con los aislados de levaduras se generaron compuestos volátiles diferentes, en variedad y en cantidad, a los del medio de cultivo sin inoculación. En las muestras inoculadas, los compuestos más abundantes fueron los aldehídos, alcoholes e hidrocarburos ramificados (Figura 13), los cuales se detectaron en cantidades significativamente inferiores en el lote sin inoculación. Todos estos compuestos han sido relacionados con el desarrollo del aroma del jamón curado (Ruiz y col., 1999; Carrapiso y col., 2002), lo que puede confirmar la contribución de las levaduras inoculadas al mismo.

Los hidrocarburos alifáticos fueron detectados en todos los lotes (Figura 13); sin embargo, los ramificados sólo fueron identificados en los lotes inoculados, presentando algunos de ellos diferencias significativas (2-metilpentano, 3-metilpentano, 1,4-bis(1,1-dimetiletil)benceno y metilciclohexano). En general, los alcanos no contribuyen significativamente al aroma debido a su escaso poder aromático (Shahidi y col., 1986).

Los aldehídos y alcoholes alifáticos presentaron un contenido mayor en el lote control que en los lotes inoculados aunque hubo escasas excepciones (Figura 13). En el caso de los alcoholes fue debido principalmente a la alta concentración de etanol detectada en el lote no inoculado. Estos compuestos volátiles proceden sobre todo de la oxidación lipídica (Ruiz y col., 1999). La actividad catalasa descrita en algunas levaduras podrían contribuir a la disminución de las concentraciones de aldehídos alifáticos en las muestras inoculadas (Martín y col., 2003). Esta actividad antioxidante

de las levaduras podría tener un efecto beneficioso protegiendo la grasa de los jamones del enranciamiento (Flores y col., 2004).

Los aldehídos y alcoholes ramificados se detectaron en mayor número y contenido en las muestras inoculadas que en el control, a excepción del etilbenzaldehído (Figura 13). De estos resultados se deduce que la presencia de las levaduras resulta decisiva para la formación de estos compuestos en el medio de cultivo. Principalmente fueron cuantificados los aldehídos 2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal y sus correspondientes alcoholes derivados (2-metilpropanol, 2-metilbutanol y 3-metilbutanol). Estos compuestos volátiles ramificados presentan notas aromáticas que contribuyen de manera importante al aroma del jamón curado (Careri y col., 1993; Ruiz y col., 1999; Carrapiso y col., 2002; Martín y col., 2006). En concreto, el 2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal se relacionan con el aroma a madurado típico de los productos cárnicos (Stahnke, 1995a, b; Ruiz y col., 1998, 1999). Su alto contenido en el jamón ibérico parece ser una de las principales razones de la gran aceptabilidad de este tipo de productos (Ruiz y col., 1999). Estos compuestos proceden de aminoácidos, principalmente de la valina, isoleucina y leucina, por la degradación de Strecker (García y col., 1991; Barbieri y col., 1992; Ventanas y col., 1992) o por el metabolismo microbiano (Hinrichsen y Pedersen, 1995; Durá y col., 2004; Martín y col., 2006).

Dickinson y col. (2000) consideraron que el producto final generado por las levaduras a partir de los aminoácidos son preferentemente alcoholes ramificados, lo cual explicaría la mayor producción de alcoholes ramificados que de aldehídos precursores en los lotes del medio de cultivo inoculado del presente estudio. Schoondermark-Stolk y col. (2006) han descrito la utilización de la ruta de Ehrlich (Ehrlich, 1907) por las levaduras, a través de la cual generan derivados con grupo aldehído, a partir de aminoácidos, que posteriormente son reducidos a los correspondientes alcoholes ramificados.

En general, el lote control no inoculado mostró menos concentración de cetonas, tanto lineales como ramificadas (Figura 13), incluso algunas de ellas no se detectaron. Los lotes inoculados presentaron las mayores concentraciones de 2-propanona, 2-butanona y 2-pentanona, metilcetonas que son consideradas importantes en el aroma de embutidos crudos curados (Berdagué y col., 1993) y de jamón curado (García y col., 1991; Ruiz y col., 1998, 1999; Pérez-Juan y col., 2006) al impartir matices afrutados y florales (Grosch, 1982). Alonso (2004) y Sosa (2005) también detectaron la formación de

estas cetonas por levaduras aisladas de jamón curado tanto en medio de cultivo como en carne madurada.

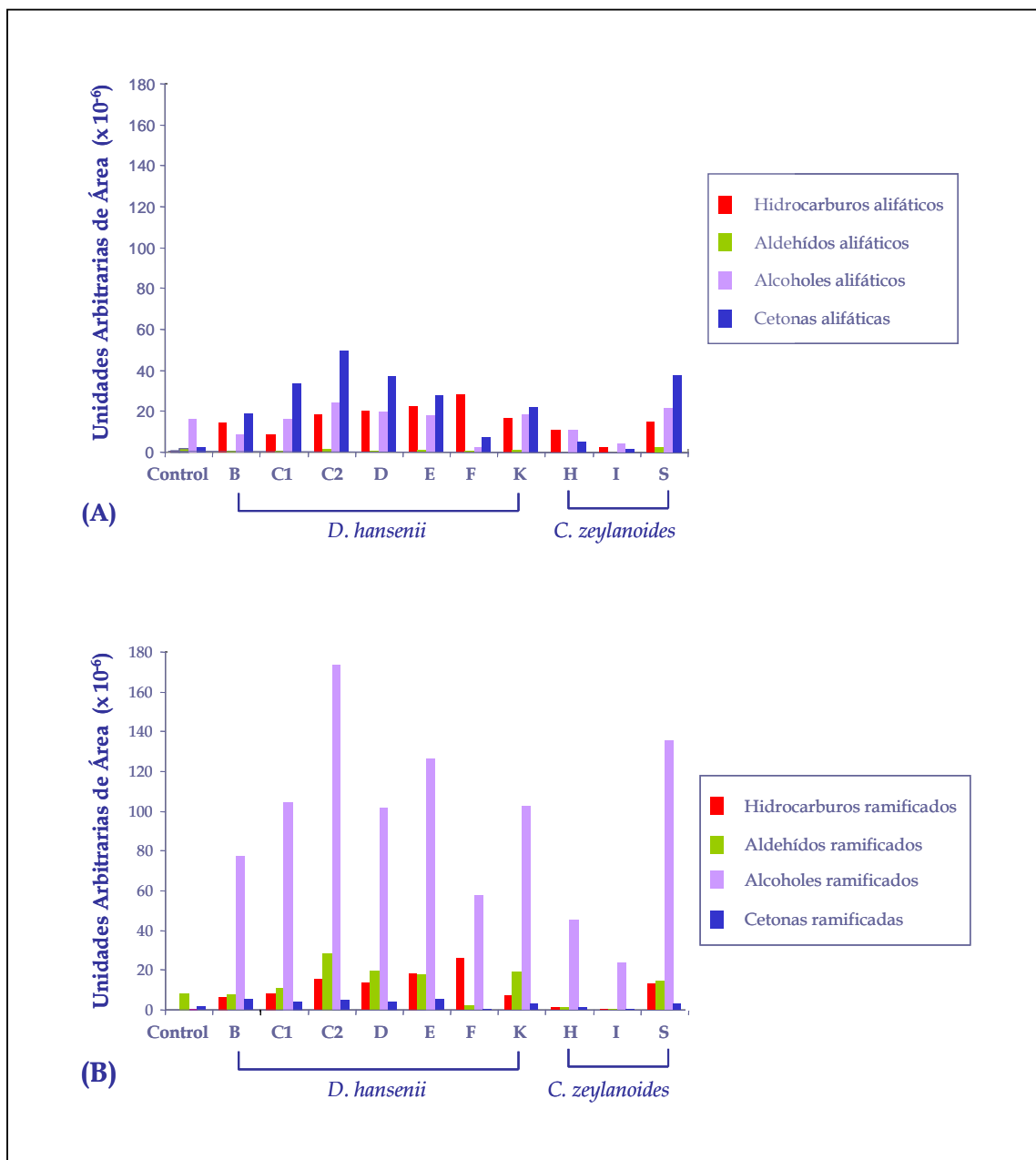


Figura 13. Compuestos volátiles alifáticos (A) y ramificados (B) producidos en medio de cultivo por los patrones de restricción del ADN mitocondrial de los aislados de levaduras más frecuentemente aislados en jamón curado de cerdo ibérico.

De los 8 ésteres identificados, sólo se detectaron 3 en el lote no inoculado y además en cantidades bajas; en las muestras inoculadas tampoco alcanzaron concentraciones elevadas, exceptuando al éster metílico del ácido etanetioico. Se ha



descrito que la inoculación de diferentes especies de levaduras, entre las que se encuentra *D. hansenii*, promueve la generación de ésteres (Olesen y Stanhke, 2000; Flores y col., 2004), detectados habitualmente en los productos cárnicos madurados como jamón curado (García y col., 1991; Barbieri y col., 1992; Ruiz y col., 1998), embutidos (Mateo y Zumalacárregui, 1996; Edwards y col., 1999; Meynier y col., 1999) o lomo madurado (Muriel y col., 2004).

Igualmente, los dos únicos ácidos encontrados se detectaron en pequeña concentración, sin llegar a ser cuantificados en los lotes inoculados con biotipos de *C. zeylanoides*. De esta manera, parece ser que las levaduras podrían usar tanto los ácidos como los ésteres como fuentes de carbono (Durá y col., 2004).

Los compuestos azufrados se detectaron en todos los lotes, excepto el metanotiol y el dimetildisulfuro que no fueron identificados en el lote control sin inocular. Ambos compuestos presentaron cantidades significativamente mayores en los lotes inoculados con los patrones de restricción C2 y D de *D. hansenii* y S de *C. zeylanoides*. La contribución de las levaduras a la producción de este tipo de compuestos volátiles ha sido descrita, principalmente, en embutidos y quesos (Olesen y Stahnke, 2000; Spinnler y col., 2001; Arfi y col., 2002; Flores y col., 2004; López del Castillo-Lozano y col., 2007). Estos compuestos también han sido detectados en diferentes tipos de productos cárnicos en los que no se han inoculado levaduras (Muriel y col., 2004; Marco y col., 2006; Pérez-Juan y col., 2006; Bianchi y col., 2007). La presencia de estos compuestos en productos cárnicos no es deseable en niveles elevados debido a que originan normalmente olores desagradables (Flores y col., 1998).

Al evaluar en conjunto la generación de compuestos volátiles por los diferentes biotipos de levaduras inoculados se observaron relevantes diferencias tanto en el número como en la concentración de los compuestos generados. De este modo, la producción de compuestos volátiles ramificados fue claramente mayor, tanto en variedad como en cantidad, en los lotes inoculados con biotipos de *D. hansenii* que en los lotes inoculados con los patrones H e I de *C. zeylanoides* (Figura 13). La mayor producción de compuestos volátiles ramificados por los aislados adscritos a *D. hansenii* podría deberse a su carácter moderadamente halófilo (Breuer y Harms, 2006), puesto que la generación de compuestos volátiles por las levaduras a partir de aminoácidos ramificados parece estar afectada negativamente por la presencia de sal (Durá y col., 2004).

Los lotes inoculados con los aislados encuadrados dentro de los patrones de restricción C2 y D de *D. hansenii* fueron los que mostraron una mayor cantidad de compuestos volátiles relacionados con el aroma a curado y casi siempre en concentraciones mayores que en el resto de patrones analizados. Así estos patrones produjeron significativamente mayores cantidades de aldehídos y alcoholes ramificados y cetonas que el resto de los patrones ensayados tanto de *D. hansenii* como de *C. zeylanoides* (Figura 13).

Las muestras inoculadas con aislados con los patrones de restricción B, C1, E, F y K de *D. hansenii* mostraron perfiles de generación de compuestos volátiles similares, con altos niveles de 3-metilbutanal, 2-metilpropanol y 3-metilbutanol, pero menores que los encontrados en los lotes inoculados con los patrones C2 y D.

Dentro de los biotipos de *C. zeylanoides*, el H y el I, presentaron menor número y concentración de compuestos volátiles que el resto de patrones. El patrón S de la misma especie mostró un perfil de compuestos volátiles bastante similar al de los patrones B, C1 y E de *D. hansenii*, pero con una mayor concentración de compuestos azufrados, presentando diferencias significativas en la producción de dimetildisulfuro, que fue mayor a la del resto de los patrones inoculados. Debido a que este tipo de compuestos aporta aromas pocos deseados en jamón curado (Flores y col., 1998), los aislados con el patrón de restricción S deberían ser evitados para su utilización como cultivos iniciadores en productos cárnicos madurados. Por consiguiente, se evidenciaron claras diferencias en la producción de compuestos volátiles entre las dos especies encontradas en jamón ibérico, *D. hansenii* y *C. zeylanoides*.

Según los resultados obtenidos, la aplicación del análisis de restricción del ADN mitocondrial como técnica de caracterización de levaduras permite diferenciar biotipos de levaduras con diferente producción de compuestos volátiles. Esto también ha sido puesto de manifiesto en levaduras aisladas de vino y de queso (Romano, 1997; Patel y Shibamoto, 2003; Romano y col., 2003; Arrizon y col., 2005; Regodón Mateos y col., 2006). Por consiguiente, tanto el medio de cultivo diseñado como el método de ácidos nucleicos propuesto permiten la selección de aislados de levaduras para ser empleados como cultivos iniciadores. Por los resultados del presente estudio, los patrones de restricción C2 y D de *D. hansenii* son los más adecuados, en cuanto a producción de compuestos volátiles, para ser seleccionados como cultivos iniciadores.

#### IV.5. EVALUACIÓN DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS DE JAMÓN IBÉRICO EN FUNCIÓN DE LA FASE DE MADURACIÓN

Analizadas las especies y biotipos de levaduras que con mayor frecuencia se desarrollan en jamón ibérico y su influencia en la producción de compuestos volátiles de interés, es necesario evaluar la posible sucesión de biotipos durante su proceso de maduración. Núñez y col. (1996) advirtieron la existencia de una sucesión de biotipos de levaduras diferenciados por métodos morfológicos y fisiológicos durante el proceso de maduración del jamón ibérico. Con el objetivo de detectar mínimas desviaciones en los biotipos que facilite la evaluación de posibles sucesiones de estos durante el procesado se ha utilizado además del análisis de restricción del ADN mitocondrial el RAPD-PCR con el cebador (GACA)<sub>4</sub>. Al mismo tiempo se ha evaluado la influencia de los biotipos que se suceden durante el procesado en la generación de compuestos volátiles. Para facilitar el estudio se han diferenciado dos grandes fases de maduración, postsalado y secadero-bodega, en las que se ha estudiado la distribución de los 10 patrones de restricción del ADN mitocondrial más frecuentemente aislados en jamón ibérico.

Mediante el análisis de RAPD-PCR se encontraron diferencias sólo dentro de los patrones de restricción B, C1, C2, E y H. Así, en total se detectaron 16 biotipos moleculares diferentes en los dos períodos de maduración considerados.

Según los resultados derivados de la combinación del análisis de restricción del ADN mitocondrial y la técnica RAPD-PCR, el perfil de la población de levaduras de jamón ibérico varió con la etapa de procesado a nivel de cepa. Así, una amplia diversidad de biotipos de *D. hansenii* fueron encontrados durante todo el proceso de maduración del jamón. Sin embargo, los biotipos de *C. zeylanoides* fueron detectados fundamentalmente en la etapa de postsalado. *D. hansenii* muestra pues una mayor adaptación que *C. zeylanoides* a las condiciones de maduración del jamón ibérico. *D. hansenii* ha sido citada como la levadura predominante al final del proceso de maduración de diferentes tipos de jamones curados (Comi y Cantoni, 1983; Huerta y col., 1988; Núñez y col., 1996). En otros productos cárnicos madurados se ha observado igualmente una mayor supervivencia de *D. hansenii* (Encinas y col., 2000; Cocolin y col., 2006). Por consiguiente, la elección de los aislados de la especie *D. hansenii* como cultivos iniciadores parece ser lo más apropiado.

A lo largo del proceso de maduración del jamón ibérico se observó una sucesión de biotipos pues, del total de los 16 detectados, sólo 8 de ellos fueron aislados en la fase

de postsalado mientras que 13 lo fueron en la fase de secadero-bodega. La mayor diversidad de biotipos de levaduras detectada en la última fase puede ser debido a su mayor duración y al aumento de la población de levaduras que tiene lugar en la misma (Núñez, 1995), ya que en postsalado las bacterias son el grupo microbiano dominante y las levaduras compiten desfavorablemente con ellas.

Se ha comprobado que determinados biotipos parecen estar asociados a fases del proceso de elaboración. En este sentido, los biotipos H1, H2 y S1 de *C. zeylanoides* sólo se detectaron en postsalado, mientras que los biotipos B2, C1-1, C1-2, C1-3, C2-2, E1 y F1 de *D. hansenii* y O1 de *C. zeylanoides* sólo se aislaron en la fase de secadero-bodega (Figura 14). Entre los biotipos aislados en ambas fases, se encontraron diferencias de recuperación. Así, el biotipo D1 de *D. hansenii* se aisló en la misma proporción en ambas fases, el biotipo K1 disminuyó a lo largo de la maduración y otros, como los biotipos B1, C2-1 y E2 de *D. hansenii*, se encontraron en mayor proporción al final del procesado (Figura 14). Además se encontraron diferencias en el biotipo predominante en cada una de las etapas, siendo el biotipo D1 en postsalado y el biotipo B1 en secadero-bodega. De esta forma la proporción de los biotipos de levaduras podría ser empleada como un indicador del tiempo de maduración de los jamones.

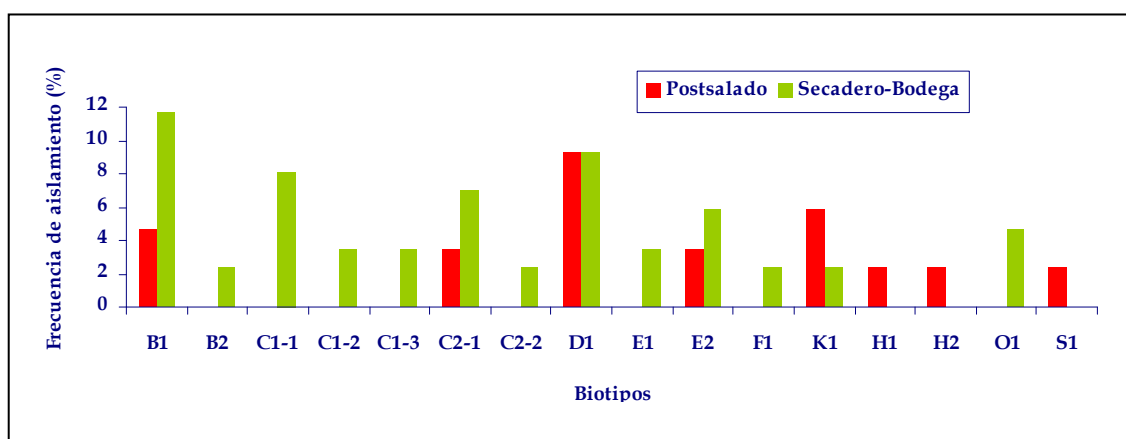


Figura 14. Distribución por etapa de procesado de los biotipos de levaduras aislados de jamón ibérico obtenidos mediante análisis de restricción del ADN mitocondrial y RAPD-PCR.

Las técnicas de ácidos nucleicos han sido empleadas por varios autores para estudiar la sucesión de levaduras a nivel de cepa durante el procesado de diferentes alimentos. En este sentido, una sucesión de aislados de las especies *S. cerevisiae* y *C. krusei* ha sido detectada durante la fermentación espontánea de pasta de maíz (Hayford

y Jakobsen, 1999; Hayford y Jespersen, 1999), de *S. cerevisiae* durante la fermentación del vino (Querol y col., 1994; Sabaté y col. 1998) y de *D. hansenii* durante la maduración de quesos (Petersen y col., 2002). Cocolin y col. (2006) observaron una distribución de biotipos de *D. hansenii* obtenidos mediante RAPD-PCR en las diferentes fases del proceso de maduración de embutidos.

El análisis de la producción de compuestos volátiles en medio de cultivo de los diferentes biotipos detectados en las fases de maduración del jamón ibérico consideradas reveló que la mayoría de ellos producen compuestos derivados del catabolismo de aminoácidos ramificados como valina, leucina e isoleucina. Entre estos compuestos se encontraron los aldehídos ramificados 2-metilbutanal y 3-metilbutanal, y sus correspondientes alcoholes, 2-metilbutanol y 3-metilbutanol. Todos ellos contribuyen de manera importante al aroma del jamón curado (Careri y col., 1993; Hinrichsen y Pedersen, 1995, Ruiz y col., 1999; Carrapiso y col., 2002). El biotipo C2-2, aislado únicamente en la fase de secadero-bodega y adscrito a la especie *D. hansenii*, presentó la mayor producción de estos compuestos. Respecto a la producción total de alcoholes y aldehídos ramificados, predominó la de los alcoholes lo que indica que prevaleció la ruta metabólica que conduce a la formación del alcohol sobre el aldehído (Durá y col., 2004).

El único ácido detectado fue el ácido 2-metilbutanoico aunque en muy pequeña cantidad en algunos biotipos de *D. hansenii*. Este ácido derivado del metabolismo de la leucina también ha sido generado por cepas de *Debaryomyces*, autóctonas de productos de cárnicos curados, inoculadas en un sistema modelo (Durá y col., 2004).

Otros compuestos volátiles producidos por los biotipos de levaduras inoculados fueron los compuestos azufrados, derivados principalmente de la metionina. Las levaduras pueden degradar la metionina hasta metanotiol y posteriormente éste puede ser metabolizado hasta la obtención de otros compuestos azufrados, lo cual ha sido descrito en quesos (Molimard y Spinnler, 1996; Spinnler y col., 2001). Algunos de los biotipos inoculados en este ensayo generaron 1-metiltiopropanol, dimetiltrisulfuro y metanotiol en cantidades significativamente superiores al lote control sin inoculación. El biotipo S1 adscrito a *C. zeylanoides* presentó la producción más elevada de este tipo de compuestos, fundamentalmente de dimetildisulfuro.

En los compuestos volátiles resultantes de la degradación lipídica, se observó una menor producción en comparación con la de los derivados del catabolismo aminoacídico. Esta actividad antioxidante de las levaduras posee un efecto positivo

sobre el aroma y la calidad sensorial del producto final al inhibir el desarrollo de rancidez, atributo negativo en productos cárnicos (Konopka y col., 1995; Shu-Mei y col., 1995).

Al comparar la producción de los diferentes biotipos de levaduras se observaron diferencias en las concentraciones detectadas de varios compuestos entre los que se encontraron el 2-metilpentano, 3-metilpentano, 2-propanona, 2-butanona, 3-pentanona, butanol y metilbenceno. En un estudio preliminar en carne inoculada con diferentes cepas de levaduras aisladas de jamón curado, los niveles de cetonas más destacables fueron los de las metilcetonas detectadas en el presente trabajo (Sosa, 2005).

Los ésteres fueron generados por casi todos los biotipos ensayados, siendo cuantificados mayoritariamente en el biotipo C2-2. La contribución de las levaduras a la generación de estos compuestos ha sido descrita previamente en productos cárnicos madurados inoculados con este grupo microbiano (Olesen y Stahnke, 2000; Flores y col., 2004). Su presencia es muy importante para el aroma característico de los productos cárnicos curados (Barbieri y col., 1992; Careri y col., 1993; Flores y col., 2004).

De los resultados obtenidos se deduce que los biotipos de levaduras con mayor generación de compuestos volátiles fueron el C2-2 y el S1 (Figura 15) adscritos a *D. hansenii* y a *C. zeylanoides*, respectivamente. Sin embargo, la mayor concentración de compuestos presentada por el biotipo S1 es un reflejo de la mayor cantidad de compuestos azufrados producida, los cuales no son deseables en elevadas proporciones en los productos cárnicos madurados por su participación en olores desagradables (Flores y col. 1998). Por consiguiente este biotipo no debería estar entre los seleccionados como cultivo iniciador para ser empleado en la industria cárnica. Estos resultados están en total concordancia con los obtenidos previamente al inocular diferentes patrones de restricción del ADN mitocondrial de levaduras en el mismo medio de cultivo, pues los patrones con mayor generación de compuestos volátiles fueron el C2, el E y el S. Sin embargo, el uso combinado de la técnica RAPD-PCR con el análisis de restricción del ADN mitocondrial permitió establecer diferencias entre biotipos que no habían sido detectadas con el uso único del análisis de restricción del ADN mitocondrial.

Cuando se realiza la comparación del perfil de compuestos volátiles generados por los diferentes biotipos moleculares detectados en función de la etapa de procesado se observan diferencias relevantes. Así, los de la fase de secadero-bodega produjeron los mayores niveles de alcoholes y aldehídos ramificados, así como de hidrocarburos,

ésteres y cetonas que los biotipos de postsalado (Figura 15). Estas diferencias, aunque mínimas, pueden observarse incluso dentro del mismo biotipo, dependiendo de si se aísla en postsalado o en secadero-bodega. Esta discriminación no es detectada mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial y el RAPD-PCR, siendo necesario para detectar esas mínimas diferencias analizar la producción de compuestos volátiles.

Por todo ello, la combinación de las técnicas de ácidos nucleicos de análisis de restricción del ADN mitocondrial y de RAPD-PCR junto con el análisis del perfil de generación de compuestos volátiles permite la diferenciación de levaduras aisladas de jamón curado de cerdo ibérico, por lo que podría ser empleada en la selección de éstas como cultivo iniciador en la industria cárnica.

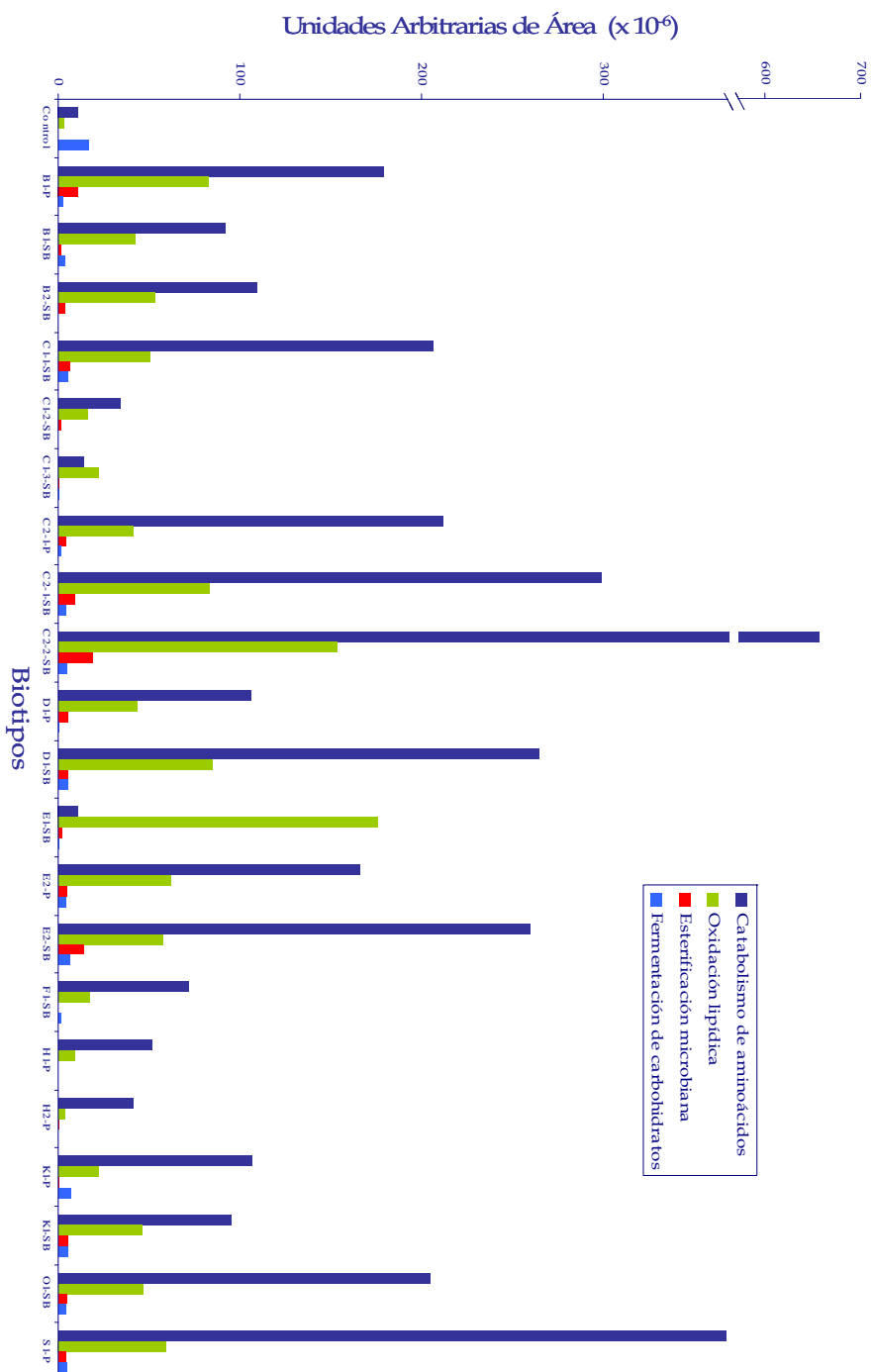


Figura 15. Compuestos volátiles producidos en medio de cultivo por los biotipos de levaduras obtenidos mediante análisis de restricción del ADN mitocondrial y RAPD-PCR en función de la etapa de aislamiento. P: postsalado; SB: secadero-bodega.



#### IV.6. EVALUACIÓN DE LAS MODIFICACIONES EN EL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS INOCULADOS CON LEVADURAS

Una vez caracterizada la población de levaduras autóctonas del jamón curado de cerdo ibérico, evaluada su influencia en la generación de compuestos volátiles y realizada la primera selección de los aislados para su utilización como cultivos iniciadores, es necesario una segunda fase de selección que permita evaluar la producción de compuestos volátiles en una matriz cárnica, tal como un producto cárnico madurado. Esta selección que debe ser la definitiva debe hacerse sólo con aislados seleccionados mayoritariamente pertenecientes a los biotipos que mostraron mayor producción de volátiles en el medio de cultivo. Así, en base a los perfiles de compuestos volátiles que presentaron los diferentes patrones de restricción del ADN mitocondrial en el medio de cultivo diseñado, se seleccionaron 3 biotipos de levaduras para ser inoculados en salchichones de forma individual y conjunta. La matriz cárnica elegida fue el salchichón por ser un producto cárnico de maduración más corta que jamón curado de cerdo ibérico, lo que simplifica el proceso de evaluación. Además los resultados que puedan derivarse deben ser tanto de aplicación al sector de los embutidos crudos curados como al del jamón curado. Los biotipos elegidos pertenecieron a la especie *D. hansenii* que es la especie que se aisló en mayor porcentaje y que presentó en el medio de cultivo un perfil de compuestos volátiles más adecuado para los productos cárnicos madurados y, además, es la utilizada comúnmente como cultivo iniciador en la industria cárnica. Dos de los patrones, el C2 y el E, fueron elegidos al mostrar en medio de cultivo una mayor producción de compuestos volátiles relacionados con el aroma de los productos cárnicos madurados. Se inoculó también un aislado con baja producción de compuestos volátiles para evaluar la eficacia del medio del cultivo diseñado en la selección de biotipos productores de compuestos volátiles de interés.

Al finalizar el proceso de maduración, como es esperado en este tipo de productos cárnicos, se observó una reducción tanto de los valores de  $a_w$  como de pH, no existiendo diferencias entre lotes. Los valores finales de  $a_w$  fueron bastante similares a los descritos en otros embutidos crudos madurados inoculados con levaduras (Selgas y col., 2003; Patrignani y col., 2007). Sin embargo, no ocurrió lo mismo con los valores finales de pH, que fueron ligeramente más elevados que los descritos por los autores

anteriores. Hay que tener en cuenta que se elaboró un embutido crudo curado de tipo tradicional no adicionado de bacterias ácido-lácticas. Al mismo tiempo, las condiciones de procesado (tiempo y temperatura) fueron diferentes a las indicadas en los anteriores trabajos.

En general, la evolución de la población microbiana se encontró dentro del rango esperado en embutidos crudos curados (Benito y col., 2007; Martín y col., 2007; Patrignani y col., 2007), siendo las bacterias ácido-lácticas el grupo microbiano predominante, mientras que los recuentos de micrococáceas se mantuvieron e incluso decrecieron durante el proceso de maduración de acuerdo con lo indicado previamente por Ordóñez y col. (1999). Además, no se detectaron grandes diferencias en la población de bacterias ácido-lácticas entre los diferentes lotes, causa de que todos ellos alcanzasen valores de pH similares.

Los recuentos de levaduras descendieron ligeramente tanto en los salchichones inoculados como en los no inoculados. Una disminución similar en el recuento de levaduras durante el proceso de elaboración de embutidos crudos curados ha sido observada por Encinas y col. (2000) y Olesen y Stahnke (2000), probablemente motivada por el efecto dominante que ejercen las bacterias ácido-lácticas en la población microbiana, así como por el efecto provocado por el descenso de la  $a_w$ .

En la presente Tesis Doctoral no pudo establecerse, durante el procesado de los salchichones, correlación alguna entre los recuentos de los 3 grupos microbianos mayoritarios. Encinas y col. (2000) encontraron que los niveles de bacterias ácido-lácticas eran más elevados en los embutidos con los recuentos de levaduras más bajos. En nuestro caso es evidente que esto no ocurrió porque las bacterias ácido-lácticas contaminantes alcanzaron los niveles más elevados, incluso en los lotes inoculados con levaduras.

Para evaluar la capacidad colonizadora y competitiva de los aislados de levaduras inoculados frente a otros procedentes de contaminación se evaluó la recuperación de estos en los salchichones madurados mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial de las levaduras aisladas de ellos. Los porcentajes de recuperación de los patrones de restricción inoculados variaron pero, en general, hubo una buena correspondencia entre los patrones inoculados y los recuperados. De esta manera fueron detectados los biotipos inoculados en todos los lotes de salchichones inoculados, exceptuando el aislado con patrón de restricción B que no fue recuperado en el lote conjunto de inoculación de los 3 aislados de *D. hansenii*. Además este biotipo

fue el que presentó el porcentaje de recuperación más bajo de los 3 lotes con inoculación individual. Los aislados con el patrón de restricción E fueron los que mostraron la mayor resistencia a las condiciones de maduración así como a la composición de la mezcla, pues 15 de los 36 aislados recuperados fueron adscritos a este biotipo. En general, podría afirmarse que las cepas de *D. hansenii* inoculadas se imponen a la posible población de levaduras contaminante de la mezcla cárnica inicial, debido probablemente a que la inoculación se realiza a niveles elevados.

En las muestras de salchichones no inoculados, los aislados recuperados también presentaron patrones de restricción de la especie *D. hansenii*. Además se detectó un aislado adscrito a la especie *C. zeylanoides*, la cual no fue detectada en los lotes inoculados. Este hecho podría justificarse en la interacción de los escasos aislados de esta especie con los altos niveles de aislados de *D. hansenii* añadidos a los salchichones inoculados. Además, *D. hansenii* ha sido descrita en niveles más altos que *C. zeylanoides* al finalizar el periodo de maduración de los embutidos crudos madurados (Encinas y col., 2000; Cocolin y col., 2006).

Una vez transcurridos los 54 días de procesado, un total de 61 compuestos volátiles fueron identificados y cuantificados en los 5 lotes de salchichones elaborados. La mayor parte de estos compuestos han sido descritos con anterioridad en este tipo de productos cárnicos (Schmidt y Berger, 1998; Flores y col., 2004; Bianchi y col., 2007). Los compuestos volátiles fueron agrupados de acuerdo con su origen mayoritario, con la finalidad de investigar el efecto de la inoculación de las diferentes cepas de *D. hansenii* en las rutas de generación. Hay que tener en cuenta que algunos de los compuestos identificados podrían tener más de un origen o ser el resultado de reacciones secundarias entre sustancias derivadas de rutas metabólicas diferentes (Berdagué y col., 1993).

Los salchichones no inoculados mostraron menor variedad de compuestos volátiles y cantidades más bajas de compuestos derivados de la oxidación lipídica, de la fermentación de carbohidratos y de ésteres que los salchichones inoculados. Por el contrario, este lote presentó la concentración mayor de compuestos derivados del catabolismo de aminoácidos debido a los valores elevados de los compuestos derivados del benceno, los cuales contribuyen escasamente al perfil aromático característico de los embutidos debido a su alto umbral de detección (Bianchi y col., 2007).

Olsen y Stanke (2000) inocularon *D. hansenii* en embutidos crudos madurados observando un bajo efecto de esta especie sobre el aroma del producto acabado. Sin embargo, esto podría haberse debido al efecto inhibitor que el ajo empleado en la fabricación de estos productos podría tener sobre la población de levaduras (Asehrou y col., 1997). Por el contrario, Flores y col. (2004) encontraron un efecto positivo de *D. hansenii* sobre la generación de compuestos volátiles en embutidos madurados.

Al analizar los compuestos volátiles encontrados, se observó que dentro de los procedentes del catabolismo de aminoácidos, el aldehído ramificado 3-metilbutanal, que contribuye al aroma de los embutidos crudos madurados (Montel y col., 1998) y otros productos cárnicos como el jamón curado (Careri y col., 1993; Carrapiso y col., 2002; Martín y col., 2006), solamente fue detectado en los salchichones inoculados. La formación de este compuesto, a partir de aminoácidos, ha sido atribuida a las reacciones de degradación de Strecker o al metabolismo microbiano, tal y como ha sido explicado con anterioridad. En salchichones, la ruta más probable parece ser la segunda pues las condiciones de maduración de estos productos no son las más favorables para la otra puesto que normalmente dichas reacciones requieren temperaturas moderadamente altas, un tiempo de madurado muy largo y valores de  $a_w$  relativamente bajos (Bruna y col., 2001).

Los alcoholes ramificados 2-metilpropanol y 3-metilbutanol se detectaron exclusivamente en los lotes inoculados. La mayor detección de estos alcoholes que la de sus aldehídos precursores puede ser debida a la utilización de la ruta de Ehrlich por las levaduras, tal y como se expuso anteriormente para los resultados similares obtenidos en el medio de cultivo diseñado.

En vista de los resultados obtenidos parece clara la intervención de los biotipos de levaduras de la especie *D. hansenii* inoculados en la formación de aldehídos y alcoholes ramificados a partir de aminoácidos. Estos resultados coinciden con los observados por Durá y col. (2004) que describieron la capacidad de aislados de *Debaryomyces* para metabolizar aminoácidos ramificados generando compuestos volátiles de interés en el desarrollo del aroma típico de los embutidos crudos curados (Montel y col., 1998).

Otros compuestos volátiles derivados del catabolismo de aminoácidos, como los ácidos 2-metilpropanoico y 3-metilbutanoico, fueron solamente detectados en los lotes inoculados. Olsen y Stahnke (2000) también describieron la contribución de las levaduras a la producción de estos ácidos carboxílicos. Ambos compuestos contribuyen

al aroma de los embutidos crudos curados por sí mismos (Berdaqué y col., 1993; Montel y col., 1996; Meynier y col., 1999) y por transformarse en los correspondientes ésteres (Stahnke, 1994), con un papel también esencial en el aroma de estos productos.

En el grupo de los compuestos derivados de oxidación lipídica se detectaron algunas diferencias entre los lotes inoculados y sin inocular. Dentro de este grupo, tal vez los aldehídos son los más importantes en el aroma debido a sus bajos umbrales de percepción (Shahidi y col., 1986). El hexanal, aldehído lineal que imparte un aroma a "hojas verdes", "hierba" o "afrutado", fue detectado en una concentración significativamente mayor en los salchichones inoculados con los 3 biotipos de levaduras seleccionados que en el resto. Otros aldehídos, relacionados con el catabolismo lipídico, detectados sólo o en mayor cantidad en las muestras inoculadas fueron el heptanal, el octanal y el nonanal, que contribuyen al aroma deseable en los productos cárnicos madurados (Carrapiso y col., 2002).

El hexano fue detectado en la cantidad más elevada en los salchichones no inoculados, lo cual no es relevante pues los hidrocarburos lineales, debido a sus umbrales altos de olfacción, tienen una repercusión escasa o nula sobre el aroma de los productos cárnicos (Shahidi y col., 1986; Bianchi y col., 2007).

Los ácidos propanoico, butanoico y pentanoico se detectaron en menor concentración en los salchichones no inoculados que en los inoculados. Estos compuestos han sido también identificados en embutidos inoculados con levaduras (Olesen y Stahnke, 2000; Flores y col., 2004). El ácido butanoico aporta notas a "queso" o a "agrio" al aroma de los embutidos (Stahnke, 1994).

Los ésteres alcanzaron concentraciones más elevadas en los salchichones inoculados, quedando reflejada así la acción de las levaduras en su generación. En este sentido, varios autores han considerado la contribución de las levaduras a la producción de ésteres mediante esterificación de alcoholes y ácidos carboxílicos (Shahidi y col., 1986; Olesen y Stahnke, 2000; Alonso, 2004; Flores y col., 2004). Las enzimas que intervienen en dicha reacción han sido descritos en levaduras (Gatfield, 1988; Jelén y Wasowicz, 1998)

La repercusión aromática de los ésteres de etilo, los ésteres más abundantes en este estudio, es importante en los embutidos crudos curados debido a sus bajos umbrales de detección sensorial, a las notas frutales que aportan al aroma del embutido y a su contribución a enmascarar el aroma a "rancio" (Careri y col., 1993; Stahnke, 1994; Mateo y Zumalacárregi, 1996; Meynier y col., 1999). Su presencia, junto

con la del 3-metilbutanal, se ha asociado con el aroma a "madurado" típico de los embutidos (Barbieri y col., 1992; Careri y col., 1993).

Dentro del grupo de los derivados de la fermentación de carbohidratos, sólo se identificaron 3 compuestos. El etanol y el ácido acético fueron detectados en mayor cantidad en los lotes de salchichones inoculados que en los sin inoculación. En el caso del alcohol lineal podría ser debido a la presencia en los aislados de levaduras ensayados de enzimas alcohol deshidrogenasas y piruvato descarboxilasas (Durá y col., 2004). Dicho compuesto no se asocia a un papel esencial en el desarrollo del aroma de los productos cárnicos madurados pero es el precursor de varios ésteres (Molimard y Spinnler, 1996). El ácido acético podría participar en el aroma a "especias" (Ramírez y Cava, 2007) característico de algunos productos cárnicos e imparte aromas que se describen como "vinagre" (Demeyer y col., 2000; Marco y col., 2007). La abundancia de este compuesto ha sido descrita en embutidos (Mateo y Zumalacárregui, 1996), llegando a ser considerado incluso como uno de los compuestos aromáticos más potentes en este tipo de productos (Schmidt y Berger, 1998). Sin embargo, otros autores no lo han llegado a detectar debido probablemente a las condiciones de procesado y al método empleado en la extracción y análisis de los compuestos volátiles.

El otro compuesto detectado procedente de la fermentación de carbohidratos fue la 3-hidroxi-2-butanona, presente en la concentración más elevada en el lote inoculado con el biotipo B de *D. hansenii*. Esta cetona ha sido identificada en diferentes productos cárnicos, algunos de ellos inoculados con levaduras (Olesen y Stahnke, 2000; Flores y col., 2004), contribuyendo a su aroma final (Schmidt y Berger, 1998).

Debido a la utilización de especias en la fabricación de los salchichones, se detectaron diversos compuestos volátiles derivados de éstas en todos los lotes, encontrándose en mayor cantidad en los lotes inoculados, a excepción del limoneno. Los terpenos identificados han sido aislados previamente en las diferentes especias frecuentemente empleadas en la fabricación de embutidos (Berger y col., 1990; Johansson y col., 1994). Las especias poseen un elevado impacto aromático en el aroma final de los embutidos al aportar notas características (Stahnke, 1995a; Meynier y col., 1999).

Respecto a los compuestos azufrados, sólo se detectaron dos compuestos, siempre en mayor concentración en los salchichones inoculados que en el lote control. No obstante, ninguno de estos compuestos fue identificado en el lote de salchichones inoculados con los 3 biotipos de levaduras seleccionadas. El carbondisulfuro, detectado

en mayor cantidad que el tiobis-metano, ha sido descrito previamente en diferentes concentraciones en este tipo de productos (Marco y col., 2006; Bianchi y col., 2007), algunos de ellos inoculados con *Debaryomyces* spp. (Olesen y Stahnke, 2000; Flores y col., 2004). Los compuestos azufrados poseen aromas intensos a "sulfúrico", "coliflor" o "cebolla" (Acree y Arn, 1997; Meynier y col., 1999), originando olores desagradables a niveles elevados en productos cárnicos. Stahnke (1998) describió a algunos compuestos azufrados como participantes en el aroma característico del salami.

De los resultados obtenidos se deduce que la inoculación de salchichones con los diferentes biotipos de levaduras seleccionados influyó en el perfil y la concentración de los compuestos volátiles que se generan durante la maduración de un producto cárnico, incluso en presencia de la población microbiana contaminante habitual de estos productos y con una compleja formulación de aditivos y especias. Además no todos los biotipos presentaron la misma influencia, sino que se observaron diferencias importantes. Así, el lote inoculado con el biotipo C2 de *D. hansenii* presentó el mayor número de compuestos volátiles, con los contenidos más elevados de ésteres y compuestos azufrados. El lote inoculado con el biotipo E de *D. hansenii* presentó la mayor cantidad de compuestos volátiles relacionados con el aroma característico del salchichón, como el 3-metilbutanol, el 3-metilbutanal (Figura 16) y la 2-propanona. La cantidad de compuestos azufrados producidos por este biotipo fue menor que la del biotipo C2. Por su parte, el lote inoculado con el biotipo B mostró las concentraciones más bajas de 3-metilbutanol, 3-metilbutanal (Figura 16), hexanal, heptanal y octanal; además el ácido 3-metilbutanoico no fue detectado. Por último, la interacción entre los 3 aislados de *D. hansenii* ensayados en el presente estudio resultó tener un efecto positivo en el perfil de compuestos volátiles con importancia en el aroma de los embutidos crudos madurados, puesto que presentó las concentraciones mayores de 3-metilbutanol, hexanal, heptanal y ácido 3-metilbutanoico (Figura 16). Por otra parte, este lote no presentó producción de compuestos azufrados, a pesar de que al ser inoculados individualmente los aislados sí la presentaron, y la cantidad de 3-metilbutanal fue muy similar a la detectada en el lote inoculado con el aislado con patrón de restricción E. Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de las interacciones entre microorganismos y de las reacciones que dan lugar a la formación de los compuestos volátiles en los productos cárnicos madurados.

En definitiva, los biotipos E y C2 de *D. hansenii* son los más adecuados para ser utilizados como cultivo iniciadores en la industria cárnica. El biotipo E puede

seleccionarse como más adecuado por la menor producción de compuestos azufrados. Incluso la utilización de un cultivo mixto que incluya los 3 biotipos ensayados debería ser considerada por la menor generación de estos compuestos azufrados.

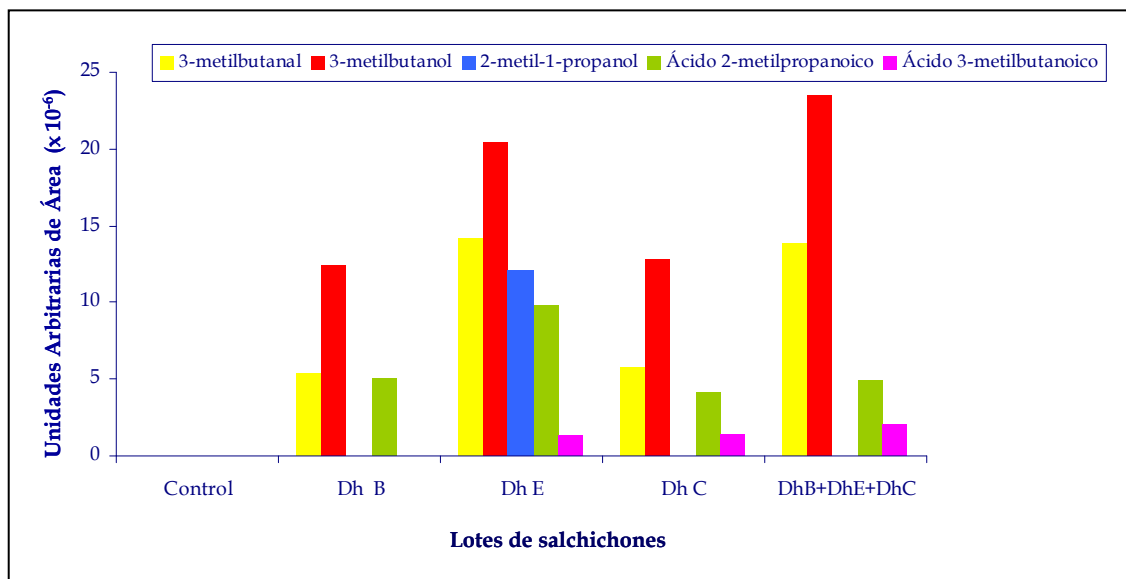


Figura 16. Compuestos volátiles ramificados, de interés en productos cárnicos madurados, producidos en los salchichones inoculados con levaduras.

Control: lote de salchichones sin inoculación; Dh B: lote inoculado con el biotipo B de *Debaryomyces hansenii*; Dh E: lote inoculado con el biotipo E de *D. hansenii*; Dh C: lote inoculado con el biotipo C de *D. hansenii*; Dh B+DhE+DhC: lote inoculado con los biotipos B, E y C de *D. hansenii*.

Al comparar estos resultados con los obtenidos con el medio de cultivo diseñado con la finalidad de seleccionar las cepas de levaduras que se inocularían en salchichones, se observa que los biotipos con mayor producción de compuestos volátiles de interés en el medio de cultivo siguen siendo los más productores en los salchichones. No obstante hay algunas diferencias entre los compuestos volátiles encontrados en los salchichones y en el medio de cultivo. De esta forma, determinados compuestos detectados en los embutidos crudos curados inoculados con los biotipos de *D. hansenii* no fueron detectados en el medio de cultivo. Las diferencias podrían deberse a que el medio de cultivo diseñado es un sistema modelo que no reproduce con total exactitud la composición y el proceso de maduración de los productos cárnicos. Además, en dicho medio de cultivo no existe interacción microbiana, al contrario de lo que ocurre en los salchichones inoculados en los cuales los biotipos de levaduras seleccionados compiten con la población microbiana contaminante natural de la mezcla cárnica inicial. En definitiva el medio de cultivo se muestra como un



método válido para realizar una primera selección de biotipos de levaduras de interés en la industria cárnica y la inoculación en la matriz cárnica debe ser sólo utilizada para una evaluación final de los biotipos previamente seleccionados.



## V. CONCLUSIONES

---



❶ La metodología basada en el análisis de restricción de las regiones ITS y 18S del ADN ribosómico es poco eficaz para la caracterización de levaduras de interés en productos cárnicos madurados.

❷ El análisis de restricción del ADN mitocondrial es un método adecuado para la caracterización a nivel de especie y cepa de las levaduras que se desarrollan habitualmente en los productos cárnicos durante su proceso de elaboración.

❸ La utilización de la técnica RAPD-PCR no es adecuada como método único para la correcta caracterización de levaduras aisladas de productos cárnicos. Sin embargo, su aplicación es útil para la diferenciación de los biotipos de levaduras previamente establecidos mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial.

❹ El uso conjunto del análisis de restricción del ADN mitocondrial y de la técnica RAPD-PCR con el cebador (GACA)<sub>4</sub> permiten la caracterización de levaduras aisladas de jamón ibérico pertenecientes a la misma especie con diferente perfil de generación de compuestos volátiles.

❺ Durante el proceso de elaboración del jamón ibérico sólo se detectan las especies de levaduras *Debaryomyces hansenii* y *Candida zeylanoides*. Sin embargo, se encuentran una gran cantidad de biotipos dentro de estas dos especies, especialmente en *D. hansenii*.

❻ Existe una asociación entre biotipos de levaduras y área geográfica de producción o fase de elaboración del jamón ibérico, dado que determinados biotipos se aíslan exclusivamente en una Denominación Origen Protegida o en una fase concreta del procesado.

❼ La evaluación de los compuestos volátiles producidos por las levaduras en un medio de cultivo, con composición y características similares a las encontradas en jamón curado durante su maduración, es un método adecuado para la selección de levaduras como cultivos iniciadores.

❽ Las levaduras aisladas de jamón ibérico producen compuestos volátiles ramificados relacionados con el aroma de los productos cárnicos curados como alcoholes, aldehídos y ésteres, destacando especialmente en su producción los biotipos de *D. hansenii*.

❾ Los biotipos de levaduras que se desarrollan en la fase de secadero-bodega del proceso de elaboración de jamón ibérico producen, en general, mayor cantidad de compuestos volátiles ramificados relacionados con el aroma de los productos cárnicos curados que los procedentes de la fase de postsalado.

⑩ La inoculación individual en productos cárnicos del biotipo E o C2 de *D. hansenii* o conjunta de los biotipos E, B y C2 de la misma especie, provoca un efecto positivo en el perfil de compuestos volátiles asociados al aroma a curado. Estos biotipos deben ser considerados para su utilización como cultivos iniciadores potenciadores de aroma en productos cárnicos madurados.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

---





- Abel, K., Schmertzing, H. y Peterson, J.I. (1963). Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. *Journal of Bacteriology* 85, 1039-1044.
- Acree, T. y Arn, H. (1997). Flavornet. Gas chromatographyolfactometry (GCO) of natural products. Cornell University. <http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet>.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 69, 25-36.
- Agnolucci, M., Scarano, S., Rea, F., Toffanin, A. y Nuti, M. (2007). Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed Sangiovese grapes by real time PCR. *Italian Journal of Food Science* 19, 153-164.
- Aigle, M., Erbs, D. y Moll, M. (1984). Some molecular structures in the genome of larger brewing yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 42, 1-7.
- Alonso, M. (2004). Efecto de la utilización de cultivos iniciadores de *Penicillium chrysogenum* Pg222, *Debaryomyces hansenii* Dh345 y *Staphylococcus xylosus* Sx5EA en productos cárnicos. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Alonso, M., Bermúdez, E., Acosta, R., Rodríguez, M., Asensio, M.A. y Núñez, F. (2001). Diseño de un sistema modelo para evaluar el papel de los microorganismos en la formación de compuestos volátiles en productos cárnicos. I Congreso Mundial del Jamón. Córdoba, España.
- Álvarez-Martín, P., Flórez, A.B., López-Díaz, T.M. y Mayo, B. (2007). Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal* 17, 961-967.
- Andersen, H.J. (1994). How does protein influence flavour in cured meat?. *Meat Focus International* 3, 365-367.
- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G. y Lombardi, A. (2000). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology* 30, 5-9.
- Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I. y Bello J. (2001). Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. *Food Research International* 34, 67-75.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A. y Clementi, F. (2007). The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 120, 136-145.

- Arfi, K., Spinnler, H.E., Tache, R. y Bonnarme, P. (2002). Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 503-510.
- Arias, C.R., Burns, J.K., Friedrich, L.M., Goodrich, R.M. y Parish, M.E. (2002). Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1955-1961
- Arrizon, J., Fiore, C., Acosta, G., Romano, P. y Gschaedler, A. (2005). Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek* 89, 181-189.
- Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A. y Garrido-Fernández, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* 23, 791-796.
- Asehrou, A., Mohieddine, S., Faid, M. y Serhrouchni, M. (1997). Use of antifungal principles from garlic for the inhibition of yeasts and moulds in fermenting green olives. *Grasas y aceites* 48, 68-73.
- Baleiras Couto, M.M., Vogels, J.T.W.E., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. y van der Vossen, J.M.B.M. (1995). Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis techniques for foodborne yeasts. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 525-535.
- Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. y van der Vossen, J.M.B.M. (1996a). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 41-46.
- Baleiras Couto, M.M., Hartog, B.J., Huis in't Veld, J.H.J., Hofstra, H. y van der Vossen, J.M.B.M. (1996b). Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiology* 13, 59-67.
- Baleiras Couto, M.M., Reizinho, R.G. y Duarte, F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 102, 49-56.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G. y Virgili, R. (1992). Flavor compounds of dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 2389-2394.

- Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (1990). *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Belloch, C., Fernández-Espinar, T., Querol, A., García, M.D. y Barrio, E. (2002). An analysis of inter- and intraespecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon. *Yeast* 19, 257-268.
- Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S. y Córdoba, M.G. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented Salchichón and Chorizo sausages. *Journal of Food Science* 72, 193-201.
- Berdagué, J.L., Montel, P., Montel, M.C. y Talon, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausages. *Meat Science* 35, 275-287.
- Berger, R.G., Macku, C., German, J.B. y Shibamoto, T. (1990). Isolation and identification of dry salami volatiles. *Journal of Food Science* 55, 1239-1242.
- Bianchi, F., Cantoni, C., Careri, M., Chiesa, L., Musci, M. y Pinna, A. (2007). Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta* 72, 1552-1563
- Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F. y Torriani, S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yoghurts and pasteurized food products. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4116-4122.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M.-C. y Toldrá, F. (2003a). Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 227-232.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M.-C. y Toldrá, F. (2003b). Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 86, 141-151.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M.-C. y Toldrá, F. (2005). Protease B from *Debaryomyces hansenii*: purification and biochemical properties. *International Journal of Food Microbiology* 98, 167-177.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M.-C. y Toldrá, F. (2008). Purification and characterisation of Proteases A and D from *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 124, 135-141.

- Botha, A. y Kock, J.L.F. (1993). Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 19, 39-51.
- Breuer, U. y Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23, 415-437.
- Bruna, J.M., Hierro, E.M., de la Hoz, L., Mottram, D.S., Fernández, M. y Ordóñez, J.A. (2001). The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science* 59, 97-107.
- Bujdosó, G., Egli, C.M. y Henick-Kling, T. (2001). Inter- and intra-specific differentiation of natural wine strains of *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) by physiological and molecular methods. *Food Technology and Biotechnology* 39, 19-28.
- Cadez, N., Raspor, A.W., de Cock, A.M., Boekhout, T. y Smith M.T. (2002). Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniospora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Research* 1, 279-289.
- Caggia, C., Restuccia, C., Pulvirenti, A. y Giudici, P. (2001). Identification of *Pichia anomala* isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. *International Journal of Food Microbiology* 71, 71-73.
- Capece, A., Salzano, G. y Romano, P. (2003). Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *International Journal of Food Microbiology* 84, 33-39.
- Cappa, F. y Cocconcelli, P.S. (2001). Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *International Journal of Food Microbiology* 69, 157-160.
- Careri, M., Mangia, A., Barbieri, G., Bolzoni, L., Virgini, R. y Parolari, G. (1993). Sensory property relationship to chemical data of Italian type dry-cured ham. *Journal of Food Science* 58, 968-972.
- Carrapiso, A.I., Ventanas, J. y García, C. (2002). Characterization of the most odor-active compounds of Iberian ham headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1996-2000.
- Carrascosa, A.V. (2001). Cultivos iniciadores para la industria cárnica. En "Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos". Volumen II. Coordinador: Martín Bejarano, S. Ediciones Martín y Macías, Plasencia.
- Carreira, A. y Loureiro, V. (1998). A differential medium to detect *Yarrowia lipolytica* in 24 hours. *Journal of Food Mycology* 1, 3-12.

- Caruso, M., Capece, A., Salzano, G. y Romano, P. (2002). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Letters in Applied Microbiology* 34, 323-328.
- Casado, E. (2006). Caracterización de levaduras de interés tecnológico en jamón Ibérico mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial y la formación de compuestos volátiles. Trabajo de Grado. Universidad de Extremadura.
- Casey, G.D. y Dobson, A.D.W. (2004). Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice - a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* 91, 327-335.
- CE/510/06 (2006). Reglamento 510/2006 sobre la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* de 31/03/2006. L93, 12-25.
- Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C. y Comi, G. (2006). Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research* 6, 692-701.
- Comi, G. y Cantoni, C. (1980). I lieviti in insaccati crudi stagionati. *Industrie Alimentari* 19, 857-862.
- Comi, G. y Cantoni, C. (1983). Presenza di lieviti nei prosciutti crudi stagionati. *Industrie Alimentari* 22, 102-104.
- Comi, G., Maifrenia, M., Manzano, M., Lagazio, C. y Cocolin, L. (2000). Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). *International Journal of Food Microbiology* 58, 117-121.
- Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida Jamón de Huelva (2008). <http://www.jamondehuelva.com/>.
- Cook, P.E. (1995). Fungal ripened meats and meat products. En: *Fermented Meats*. Ed.: Campbell-Plott, G. y Cook, P.E. Chapman & Hall, Glasgow.
- 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 Science* 56, 321-329.
- Córdoba, J.J., Antequera, T., García, C., Ventanas, J., López, C. y Asensio, M.A. (1994a). Evolution of free amino acids and amines during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 2296-2301.

- Córdoba, J.J., Antequera, T., Ventanas, J., López, C., García, C. y Asensio, M.A. (1994b). Hydrolysis and loss of extractability of proteins during ripening of Iberian ham. *Meat Science* 37, 217-227.
- Corredor M., Davila, A.M., Casarégola, S. y Gaillardin, C. (2003). Chromosomal polymorphism in the yeast species *Debaryomyces hansenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 83, 215-222.
- Coton E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S. y Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 130-135.
- Cunin, R., Glandsdorff, N., Pierard, A. y Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological Review* 50, 314-330.
- Dalton, H., Board, R. y Davenport, R. (1984). The yeasts of British fresh sausage and minced beef. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 227-248.
- de Llanos, R., Fernández-Espinar, M.T. y Querol, A. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 175-185.
- de Silóniz, M.I., Valderrama, M.J. y Peinado, J.M. (2000). A chromogenic medium for the detection of yeasts with  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -glucosidase activities from intermediate moisture foods. *Journal of Food Protection* 63, 651-654.
- Deak, T., (1991). Foodborne yeasts. En: *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 36. Academic Press James, Nueva York.
- Deak, T. y Beuchat, L.R. (1987). Identification of foodborne yeasts. *Journal of Food Protection* 50, 243-264.
- Deak, T. y Beuchat, L.R. (1996). *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. Boca Ratón, FL. CRC Press, Nueva York.
- Deak, T., Chen, J. y Beuchat, L.R. (2000). Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4340-4344.
- Demeyer, D.I., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., Ten Brink, B., Hagen, B., Montel, C., Zanardi, E., Murbrekk, E., Leroy, F., Vandendriessche, E., Lorentsen, K., Venema, K., Sunesen, K., Stahnke, L.H., De Vuyst, L., Talon, R., Chizzolini, R. y Eerola, S. (2000). Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first report of a European project. *Food Research International* 33, 171-180.

- Dickinson, J.R., Harrison, S.J., Dickinson, J.A. y Hewlins, M.J.E. (2000). An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 10937-10942.
- Dillon, V.M. y Board, R.G. (1991). Yeasts associated with red meats. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 93-108.
- Diriye, F.U., Scorzetti, G. y Martini, A. (1993). Methods for the separation of yeast cells from the surfaces of processed frozen foods. *International Journal of Food Microbiology* 19, 27-37.
- Dlauchy, D., Tornai-Lehoczki, J. y Péter, G. (1999). Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Systematic Applied Microbiology* 22, 445-453.
- Duarte, F.L., Pais, C., Spencer-Martins, I. y Leão, C. (1999). Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces sensu stricto*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1907-1913.
- Durá, M.A., Flores, M. y Toldrá, F. (2004). Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on *Debaryomyces* spp. generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. *Food Chemistry* 86, 391-399.
- Edwards, R.A., Ordóñez, J.A., Dainty, R.H., Hierro, E.M. y Hoz, L. (1999). Characterization of the headspace volatile compounds of selected Spanish dry fermented sausages. *Food Chemistry* 64, 461-465.
- Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 40, 1027-1047.
- Encinas, J.P., López-Díaz, T.M, García-López, M.L., Otero, A. y Moreno, B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science* 54, 203-208.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329-337.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostínar, A., Bobet, R., Uruburu, F. y Querol, A. (2000). Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the *El Penedès* area (Spain). *Food Microbiology* 17, 553-562.
- Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M. y Consentino, S. (2004). Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology* 95, 51-59.

- Faticenti, F., Bergere, J.L., Deiana, P. y Farris, G.A. (1983). Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Clostridium butyricum*. *The Journal of Dairy Research* 50, 449-457.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonesca, A., Scorzetti, G. y Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1351-1371.
- Fernández, M.T., Úbeda, J.F. y Briones, A.I. (1999). Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of must in fermentation, by physiological and molecular methods. *FEMS Microbiology Letters* 173, 223-229.
- Fernández-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. y Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of "flor" yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 87-97.
- Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón D., Bartra, E. y Querol, A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* 70, 1-10.
- Fleet, G.H. (1990). Yeast in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 199-211.
- Flores, C.-L., Rodríguez, C., Petit, T. y Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 507-529.
- Flores, M., Grimm, C.C., Toldrá, F. y Spanier, A.M. (1997). Correlation of sensory and volatile compounds of Spanish "Serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2178-2186.
- Flores, M., Spanier, A.M. y Toldrá, F. (1998). Flavour analysis of dry-cured ham. En: *Flavour of meat, meat products and seafoods*. Ed.: Shahidi, F. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Flores, M., Durá, M.A., Marco, A. y Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science* 68, 439-446.
- Foschino, R., Gallina, S., Andrighetto, C., Rossetti, L. y Galli A. (2004). Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Research* 4, 609-618.



- Fujikawa, H., Maruyama, B.-I., Wauke, T., Morozumi, S. e Itoh, T. (1998). Analysis of yeast growth in salad dressing during storage with chromogenic agar CHROMagar Candida®. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 39, 120-126.
- García, C., Berdagué, J.L., Antequera, T., López-Bote, C., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (1991). Volatile compounds of dry cured Iberian ham. *Food Chemistry* 41, 23-32.
- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M.A., Andrigueto, C., Schirone, M. y Tofalo, R. (2001). A survey of yeasts in traditional sausages of Southern Italy. *FEMS Yeast Research* 1, 161-167.
- Gatfield, I. L. (1988). Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. *Food Technology* 42, 110-169.
- Gehlen, K.H., Meisel, C., Fischer, A. y Hammes, W.P. (1991). Influence of the yeast *Debaryomyces hansenii* on dry sausage fermentation. 37<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, Kulmbach, Alemania.
- Golden, D.A., Beuchat, L.R. y Hitchcock, H.L. (1994). Changes in fatty acid composition of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. *International Journal of Food Microbiology* 21, 293-303.
- Grosch, W. (1982). Lipid degradation products and flavour. En: *Developments in Food Science and Food Flavours. Part A. Introduction*. Ed.: Morton, I.D. y MacLeod, A.J. Elsevier, Amsterdam.
- Guillamón, J.M., Querol, A., Jiménez, M. y Huerta, T. (1993). Phylogenetic relationships among wine yeast strains based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *International Journal of Food Microbiology* 18, 115-125.
- Guillamón, J.M., Barrio, E., Huerta, T. y Querol, A. (1994). Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Internacional Journal of Systematic Bacteriology* 44, 708-714.
- Guillamón, J.M., Barrio, E. y Querol, A. (1996). Characterization of wine yeasts strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographical or ecological origin. *Systematic Applied Microbiology* 19, 122-132.
- Guillamón, J.M., Sánchez, I. y Huerta, T. (1997). Rapid characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. *FEMS Microbiology Letters* 147, 267-272.

- Guillamón, J.M., Sabaté, J. y Barrio, E. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* 169, 387-392.
- Hayford, A.E. y Jakobsen, M. (1999). Characterization of *Candida krusei* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome profile, polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Journal of Applied Microbiology* 87, 29-40.
- Hayford, A.E. y Jespersen, L. (1999). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome polymorphism, PCR and MAL genotyping. *Journal of Applied Microbiology* 86, 284-294.
- Heard, G.M., Fleet, G.H., Praphailong, W. y Addis, E. (2000). Evaluation of the Biolog System for the identification of yeasts from cheese. *International Dairy Federation* 117-124.
- Hierro, N., González, A., Mas, A. y Guillamón, J.M. (2004). New PCR based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology* 97, 792-801.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, A., Mas, A. y Guillamón, J.M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7148-7155.
- Hinrichsen, L.L. y Andersen, H.J. (1994). Volatile compounds and chemical changes in cured pork: role of three halotolerant bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2932-2940.
- Hinrichsen, L.L. y Pedersen, S.B. (1995). Relationship among flavour, volatile compounds, chemical changes and microflora in Italian-type dry-cured ham during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2932-2940.
- Hinrichsen, L.L., Tran, N. y Berdagué, J.L. (1994). Identification of volatile compounds in slow and fast cured bacon. 40<sup>th</sup> ICoMST. La Haya, Holanda.
- Hsieh, D. y Jay, J.M. (1984). Characterization and identification of yeasts from fresh and spoiled ground beef. *International Journal of Food Microbiology* 4, 141-147.
- Huerta, T., Querol, A. y Hernández-Haba, J. (1988). Yeast of dry cured hams: quantitative and qualitative aspects. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 6, 227-231.

- Huey, B. y Hall, J. (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. *Journal of Bacteriology* 171, 2528-2532.
- Hughes, M.C., Kerry, J.P., Arendt, E.K., Kenneally, P.M., McSweeney, P.L.H. y O'Neill, E.E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science* 62, 205-216.
- Ismail, S.A.S., Deak, T., Abd-Rahman, H.A., Yassien, M.A.M. y Beuchat, L.R. (2000). Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology* 62, 113-121.
- James, S.A., Collins, M.D. y Roberts, I.N. (1994). Genetic interrelation ship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Yeast* 10, 871-881.
- James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N. y Collins, M.D. (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 453-460.
- Janssens, L., De Pooter, H.L., Schamp, N.M. y Vandamme, E.J. (1992). Production of flavours by microorganism. *Process Biochemistry* 27, 195-215.
- Jelén, H. y Wasowicz, E. (1998). Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. *Food Reviews International* 14, 391-426.
- Jessen, B. (1995). Starter cultures for meat fermentation. En: *Fermented meats*. Ed.: Campbell-Platt, G. y Cook, P. E. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Jeyaram, K., Mohendro Singh, W., Capece, A. y Romano, P. (2008). Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' - A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology* 124, 115-125.
- Johansson, G., Berdagué, J.L., Larson, M., Tran, N. y Borch, E. (1994). Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science* 38, 203-218.
- Khachatourians, G.G. (1999). Biochemical and modern identification techniques. *Food Spoilage Flora (Yeasts and Moulds)*. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Ed.: Robinson, R.K., Batt, C.A. y Patel, P. Vol. B. Academic Press, San Diego.

- Konopka, U.C., Guth, H. y Grosch, W. (1995). Potent odorants formed by lipid peroxidation as indicators of the warmed-over flavour (WOF) of cooked meat. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 193, 123-125.
- Kreger-Van Rij, N.J.W. (1984). *The yeast, a taxonomic study*. 3ª edición. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Kurita, O. y Yamazaki, E. (2002). Growth under alkaline conditions of the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939. *Current Microbiology* 45, 277-280.
- Kurtzman, C.P. (1992). rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeast. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 1-6.
- Kurtzman, C.P. y Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.
- Larpin, S., Mondoloni, C., Goergers, S., Vernoux, J.P., Guéguen, M. y Desmasures, N. (2006). *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Research* 6, 1243-1253.
- Las Heras-Vázquez, F.J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jiménez, J.M. y Rodríguez-Vico, F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research* 3, 3-9.
- Lavallee, F., Salavas, Y., Lamy, S., Thomas, D.Y., Degre, R. y Dulau, L. (1994). PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production wine yeast strain. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 86-91.
- Leistner, L. (1986). Mould-ripened foods. *Fleischwirtschaft* 66, 1385-1388.
- Leistner, L. y Echardt, C. (1979). Vorkommen toxischer Penicillien bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtsch* 59, 1892-1896.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W. y Borner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal Basic Microbiology* 33, 413-426.
- Lopandic, K., Zelgen, S., Bánszky, L.K., Eliskases-Lechner, F. y Priliinguer, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology* 23, 341-350.
- López, V., Querol, A., Ramón, D. y Fernández-Espinar, M.T. (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 68, 75-81.

- López del Castillo-Lozano, M., Delile, H.E., Spinnler, A., Bonnarme, P. y Landaud, S. (2007). Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 1447-1454.
- Loureiro, V. (2000). Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International* 33, 247-256.
- Lücke, F.K. (1985). Fermented sausages. En: *Microbiology of fermented foods*. Vol. 2. Ed.: Wood. B.J.B. Elsevier, Amsterdam.
- Lücke, F.K. y Hechelmann, H. (1987). Starter cultures for dry sausages and raw ham. Composition and effect. *Fleischwirtschaft* 67, 307-314.
- Marco, A., Navarro, J.L. y Flores, M. (2004). Volatile compounds of dry-fermented sausages as affected by solid-phase microextraction (SPME). *Food Chemistry* 84, 633-641.
- Marco, A., Navarro, J.L. y Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science* 73, 660-673.
- Marco, A., Navarro, J.L. y Flores, M. (2007). Quantitation of selected odor-active constituents in dry fermented sausages prepared with different curing salts. *Journal Agricultural of Food Chemistry* 55, 3058-3065.
- Martín, A., Asensio, M.A., Bermúdez, E., Córdoba, M.G., Aranda, E. y Córdoba, J.J. (2002). Proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* during controlled ripening of pork loins. *Meat Science* 84, 327-338.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 84, 327-338.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Núñez, F., Benito, M.J. y Asensio, M.A. (2004). Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology* 94, 55-66.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G. y Asensio, M.A. (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology* 110, 8-18.

- Martín, A., Colín, B., Aranda, E., Benito, M.J. y Córdoba, M.G. (2007). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Science* 75, 696-708.
- Martín, L., Antequera, T., Ventanas, J., Benítez-Donoso, R. y Córdoba, J.J. (2001). Free amino acid and other non-volatile compounds analysis during processing of Iberian ham. *Meat Science* 59, 363-368.
- Martínez, J., Wrent, P., Quirós, M., Sotoca, R., Silóniz, M.I. y Valderrama, M.J. (2004). Alteración de embutidos por levaduras productoras de gas. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 193, 72-78.
- Martorell, P. (2006). Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Martorell, P., Querol, A. y Fernández-Espinar, M. T. (2005a). Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6823-6830.
- Martorell, P., Fernández-Espinar, M.T. y Querol, A. (2005b). Sequence-based of species belonging to the genus *Debaryomyces*. *FEMS Yeast Research* 5, 1157-1165.
- Martorell, P., Fernández-Espinar, M.T. y Querol, A. (2005c). Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *International Journal of Food Microbiology* 101, 293- 302.
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M.T., Loureiro, V. y Querol, A. (2006). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology* 106, 79-84.
- Mateo, J. y Zumalacárregui, J.M. (1996). Volatile compounds in chorizo in their changes during ripening. *Meat Science* 44, 255-273.
- Mateo, J., Domínguez, M.C., Aguirrezábal, M.M. y Zumalacarregui, J.M. (1996). Taste compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Science* 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 Biotechnology* 3, 145-168.
- Metaxopoulos, J., Stravropoulos, S., Kakouri, A. y Samelis, J. (1996). Yeasts isolated from traditional Greek salami. *Italian Journal of Food Science* 1, 25-32.

- Meyer, S.A. y Phaff, H.J. (1970). Taxonomic significance of the DNA base composition in yeasts. En: Recent trends in yeast research. Vol. 1. Ed.: Ahearn, D.G. Spectrum, Georgia State University, Atlanta.
- Meynier, A., Novella, E., Chizzolini, R., Zanardi, E. y Gandemer, G. (1999). Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Science* 51, 175-183.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2008). <http://www.marm.es/>.
- Mitrakul, C., Henick-Kling, T. y Egli, C. (1999). Discrimination of *Dekkera/Brettanomyces* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiology* 16, 3-14.
- Molimard, P. y Spinnler, H.E. (1996). Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science* 79, 169-184.
- Molina, I., Silla, H., Flores, J. y Monzo, J.L. (1990). Study of the microbial flora of dry cured ham. 4. Yeasts. *Fleischwirtschaft* 2, 47-54.
- 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 Chemistry* 59, 539-545.
- Molnár, O., Prillinger, H., Lopandic, K., Weigang, F. y Staudacher, E. (1996). Analysis of coenzyme Q systems, monosaccharide patterns of purified cell walls, and RAPD-PCR patterns in the genus *Kluyveromyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 67-78.
- Monte, E., Villanueva, J. R. y Domínguez, A. (1986). Fungal profiles of Spanish country-cured hams. *International Journal of Food Microbiology* 3, 355-359.
- 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 Science* 35, 229-240.
- Montel, M.C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, 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 Microbiology* 13, 489-499.
- Montel, M.C., Masson, F. y Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science* 49, 111-123.

- Moreira da Silva, M., Malfeito-Ferreira, M., Aubyn, S. y Loureiro, V. (1994) Long-chain fatty acid composition as criterion for yeast distinction in the brewing industry. *Journal of the Institute of Brewing* 100, 17-22.
- Mottram, D.S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry* 62, 415-424.
- Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F. y Cogan, T.M. (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6489-6500.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986). Especific enzymatic amplification or DNA In vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273.
- Muriel, E., Antequera, T., Petrón, M.J., Andrés, A.I. y Ruiz, J. (2004). Volatile compounds in Iberian dry-cured loin. *Meat Science* 68, 391-400.
- Naumova, E.S., Korshunova, I.V., Jespersen, L. y Naumov, G.I. (2003). Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Research* 1531, 1-8.
- Nikolaou, E., Andrighetto, C., Lombardi, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N. (2007). Heterogeneity in genetic and phenotypic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from red and white wine fermentations. *Food Control* 18, 1458-1465.
- Núñez, F. (1995). Flora fúngica en jamón ibérico y su importancia tecnológica y sanitaria. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A. (1996). Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology* 29, 271-280.
- Nychas, G.J. (1984). Microbial growth in minced meat. Tesis Doctoral. Universidad de Bath. Reino Unido.
- Oguntoyinbo, F.A. (2008). Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale *gari* production in Nigeria. *Food Control* 19, 465-469.
- Olesen, 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 Science* 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. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39, 329-367.
- Parson, G. (1988). Development of DNA probe-based commercial assays. *Journal of Clinical Immunoassay* 11, 38-152.
- Patel, S. y Shibamoto, T. (2003). Effect of 20 different yeast strains on the production of volatile components in Symphony wine. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 469-476.
- Patrignani, F., Iucci, L., Vallicelli, M., Guerzoni, M.E., Gardini, F. y Lanciotti, R. (2007). Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. Part 1: Evaluation of their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns. *Meat Science* 75, 676-686.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 60, 55-63.
- Pérez, M.A., Gallego, F.J. e Hidalgo, P. (2001). Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters* 205, 375-378.
- Pérez-Juan, M., Flores, M. y Toldrá, F. (2006). Generation of volatile flavour compounds as affected by the chemical composition of different dry-cured ham sections. *European Food Research and Technology* 222, 658-666
- Petersen K.M. y Jespersen L. (2004). Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface ripened cheeses. *Journal of Applied Microbiology* 97, 205-213.
- Petersen, K.M., Moller, P.L. y Jespersen, L. (2001). DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69, 11-24.
- Petersen, K.M., Westall, S. y Jespersen, L. (2002). Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during production of Danish surfaced-ripened cheeses. *Journal of Dairy Science* 85, 478-486.
- Petrón, M.J., Muriel, E., Timón, M.L., Martín, L. y Antequera, T. (2004). Fatty acids and triacylglycerols profiles from different types of Iberian dry-cured hams. *Meat Science* 68, 71-77.

- Phister, T.G. y Mills, D.A. (2003). Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7430-7434.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Gualla, A. y Piva, G. (2006). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy. *Italian Journal of Food Science* 18, 99-106.
- Pramateftaki, P.V., Lanaridis, P. y Typas, M.A. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology* 89, 136-248.
- Praphailong, W., Van Gestel, M., Fleet, G.H. y Heard, G.M. (1997). Evaluation of the Biolog system for the identification of food and beverage yeasts. *Letters in Applied Microbiology* 24, 455-459.
- Prillinger, H., Molnár, O., Eliskases-Lechner, F. y Lopandic, K. (1999). Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 267-283.
- Pulvirenti, A., Nguyen, H., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S. y Zambonelli, C. (2000). *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters* 192, 191-196.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D. (1992a). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2948-2953.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1992b). A comparative study of different methods of yeast strains characterization. *Systematic Applied Microbiology* 15, 439-446.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1994). Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 21, 315-323.
- Quesada, M. y Cenis, J.L. (1995). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterisation of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 204-208.
- Quirós, M., Wrent, P., Valderrama, M.J., de Silóniz, M.I. y Peinado, J.M. (2005) A betaglucuronidase-based agar medium for the differential detection of the yeast *Debaryomyces hansenii* from foods. *Journal of Food Protection* 68, 808-814.
- Quirós, M., Martorell, P., Valderrama, M.J., Querol, A., Peinado, J.M. y de Silóniz, M.I. (2006). PCR-RFLP analysis of the IGS region of rDNA: a useful tool for the

- practical discrimination between species of the genus *Debaryomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 90, 211-219.
- Quirós, M., Martorell, P., Querol, A., Barrio, E. Peinado, J.M. y de Silóniz, M.I. (2008). Four new *Candida cretensis* strains isolated from Spanish fermented sausages (chorizo): taxonomic and phylogenetic implications. *FEMS Yeast Research* 8, 485-491.
- Ramírez, R. y Cava, R. (2007). Volatile profiles of dry-cured meat products from three different Iberian X Duroc genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1923-1931
- Raspor, P., Cus, F., Jemec, K.P., Zagorc, T. Cadez, N. y Nemanic, J. (2002). Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of Zametovka must. *Food Technology and Biotechnology* 40, 95-102.
- Rawsthorne, H. y Phister, T.G. (2006). A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology* 112, 1-7.
- Redzepovic, S., Orlic, S., Sikora, S., Majdak, A. y Pretorius, I.S. (2002). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Letters in Applied Microbiology* 35, 305-310.
- Regodón Mateos, J.A., Pérez Nevado, F. y Ramírez Fernández, M. (2006). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 151-157.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology* 90, 588-599.
- Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Sanabria, C., Bermúdez, E. y Asensio, M.A. (1994). Characterization of *Staphylococcus* spp. and *Micrococcus* spp. isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *International Journal of Food Microbiology* 24, 329-335.
- Rodríguez, M.M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A. (1998). Evaluation of proteolytic activity of *Micrococcaceae*, moulds and yeasts isolated from dry cured ham. *Journal of Applied Microbiology* 85, 905-912.

- Rohm, H., Lechmer, F. y Lehner, M. (1990). Evaluation of the API ATB 32C system for the rapid identification of foodborne yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 11, 215-224.
- Romano, A., Casaregola, S., Torre, P. y Gaillardin, C. (1996). Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 255-264.
- Romano, P. (1997). Metabolic characteristics of wine strains during spontaneous and inoculated fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 35, 255-260.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. y Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 169-180.
- Romero, P., Patiño, B., Quirós, M., González-Jaén, M.T., Valderrama, M.J, de Silóniz, M.I. y Peinado, J.M. (2005). Differential detection of *Debaryomyces hansenii* isolated from intermediate-moisture foods by PCR-RFLP of the IGS region of rDNA. *FEMS Yeast Research* 5, 455-461.
- Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J. y Jensen, M.T. (1998). Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in meat product: dry-cured Iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4688-4694.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. y García, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science* 52, 19-27.
- Sabaté, J., Cano, J., Querol, A. y Guillamón, J.M. (1998). Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: Analysis for two consecutive years. *Letters in Applied Microbiology* 26, 452-455.
- Saiki, R.K., Sharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saldanha-da-Gama, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (1997). Characterization of yeasts associated with Portuguese pork based products. *International Journal of Food Microbiology* 37, 201-207.
- Samelis, J. y Sofos, J.N. (2003). Yeasts in meat and meat products. En: *Yeasts in food. Beneficial and detrimental aspects*. Ed.: Boekhout, T. y Robert, V. Behr's Verlag GmbH, Hamburgo.

- Samelis, J., Stavropoulos, S., Kakouri, A. y Metaxopoulos, J. (1994). Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiology* 11, 447-460.
- Santos, N., Santos-Mendoza, R.-C., Sanz, Y., Bolumar, T., Aristoy, M.-C. y Toldrá, F. (2001). Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 68, 199-206.
- Schmidt, S. y Berger, R.G. (1998). Aroma compounds in fermented sausages of different origins. *LWT - Food Science and Technology* 31, 559-567.
- Schoondermark-Stolk, S.A., Jansen, M., Verkleij, A.J., Verrips, C.T., Euverink, G.J.W., Dijkhuizen, L. y Boonstra, J. (2006). Genome-wide transcription survey on flavour production in *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 1347-1356.
- Schüller, D. y Casal, M. (2007). The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 91, 137-150.
- Schuller, D., Côte-Real, M. y Leão, C. (2000). A differential medium for the enumeration of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in wine. *Journal of Food Protection* 63, 1570-1575.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. y Casal, M. (2003). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters* 231, 19-26.
- Schütz, M. y Gafner, J. (1993). Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 551-558.
- Selgas, M.D., Ros, J. y García, M.L. (2003). The effect of selected yeast strains on the sensory properties of dry fermented sausages. *European Food Research and Technology* 217, 475-480.
- Senses-Ergul, S., Ágoston, R., Belák, A. y Deák, T. (2006). Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology* 108, 120-124.
- Shahidi, F., Rubin, L.J. y D'Souza L.A. (1986). Meat flavor volatiles: a review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 24, 141-243.
- Shu-Mei, L., Gray, J.I., Booren, A.M., Crackel, R.L. y Gill, J.L. (1995). Assessment of off-flavor development in restructured chicken nuggets using hexanal and TBARS

- measurements and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67, 447-452.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R. y Quintavalla, S. (2007). Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiology* 24, 577-584.
- Sorensen, B.B. (1997). Lipolysis of pork fat by the meat starter culture *Debaryomyces hansenii* at various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 34, 187-193.
- Sorensen, B.B. y Samuelsen, H. (1996). The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat by lipases of the meat starter culture organisms *Staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 32, 59-71.
- Sosa, M.J. (2005). Actividades enzimáticas y generación de compuestos volátiles por microorganismos aislados del interior del jamón curado. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Spinnler, H.E., Berger, C., Lapadatescu, C. y Bonnarne, P. (2001). Production of sulphur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. *International Dairy Journal* 11, 245-252.
- Stahnke, L. H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Science* 38, 39-53.
- Stahnke, L. H. (1995a). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredients levels - Part III. Sensory evaluation. *Meat Science* 41, 211-223.
- Stahnke, L. H. (1995b). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredients levels - Part II. Volatile compounds. *Meat Science* 41, 193-209.
- Stahnke, L. H. (1998). Character impact aroma compounds in fermented sausage. 44<sup>th</sup> International Congress of Food Science and Technology. Barcelona, España.
- Suárez, B., Pando, R., Lastra, A. y Mangas, J.J. (2008). Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). *Food Microbiology* 25, 690-697.
- Succi, M., Reale, A., Andrighetto, C., Lombardi, A., Sorrentino, E. y Coppola, R. (2003) Presence of yeasts in southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour. *FEMS Microbiology Letters* 225, 143-148.

- Suzzi, G., Lombardi, A., Lanorte, M.T., Caruso, M., Andrighetto, C. y Gardini, F. (2000). Phenotypic and genotypic diversity of yeasts isolated from water-buffalo Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* 88, 117-123.
- Taylor, J.W., Geiser, D.M., Burt, A. y Koufopanou, V. (1999). The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 126-146.
- Toldrá, F. (1998) Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry cured meat products. *Meat Science* 49, S1101-1110.
- Toldrá, F. y Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry cured ham. *CRC Critical Reviews in Food Science* 38, 331-352.
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. y Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 345-352.
- Tornai-Lehoczki, J. y Dlačny, D. (2000). Determination of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* 62, 37-45.
- Tornai-Lehoczki, J., Péter, G. y Dlačny, D. (2003). CHROMagar Candida medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. *International Journal of Food Microbiology* 86, 189-200.
- Török, T., Rockhold, D. y King, A.D. (1993). Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. *International Journal of Food Microbiology* 19, 63-80.
- Torriani, S., Zapparoli, G. y Suzzi, G. (1999). Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 207-215.
- Vacanneyt, B.P., Hennebert, G. y Kersters, K. (1991). Differentiation of yeast species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Systematic Applied Microbiology* 14, 23-32.
- Valderrama, M.J., de Silóniz, M.I., Gonzalo, P. y Peinado, J.M. (1999). A differential medium for the isolation of *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis* from dairy products. *Journal of Food Protection* 62, 189-193.

- Van den Tempel, T. y Jacobsen, M. (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal* 10, 263-270.
- van Keulen, H., Lindmark, D.G., Zeman, K.E. y Gerlosky, W. (2003). Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie van Leeuwenhoek* 83, 149-154.
- Van Vuuren, H.J.J. y Van der Meer, L.J. (1988). Characterization of brewing yeast strains by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *Journal of the Institute of Brewing* 94, 245.
- Vasdinyei, R. y Deák T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology* 86, 123- 130.
- Vaughan-Martini, A. y Martini, A. (1987). Taxonomic revision of the yeast genus *Kluyveromyces* by nuclear deoxyribonucleic acid reassociation. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 380-385.
- Ventanas, J. (2006). Características del jamón producido en montanera. *Cárnica* 2000 275, 50-54.
- Ventanas, J., Córdoba, J.J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C. y Asensio, M.A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science* 57, 813-815.
- Ventanas, J., Ruiz, J. y Córdoba, J.J. (2001). El jamón curado de cerdo Ibérico: descripción del proceso tradicional de elaboración. En: *Tecnología del Jamón Ibérico*. Coordinador: Ventanas, J. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Venzinhet, F., Blondin, B. y Hallet, J.N. (1990). Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of eonological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32, 568
- Venzinhet, F., Hallet, J., Valade, M. y Poulard, A. (1992). Ecological survey of wine yeast strains by methods of identification. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 83-86.
- Verplaetse, A., Demeyer, D., Gerard, S. y Buys, E. (1992). Endogenous and bacterial proteolysis in dry sausage fermentation. 38<sup>th</sup> ICoMST. Clermont-Ferrand, Francia.
- Versavaud, A., Corcoux, P., Poulland, C., Dulau, L. y Hallet, J.N. (1995). Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains



- from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3521-3529.
- Virgili, R., Pastori, P., Simoncini, N. y Quintavalla, S. (2004). Proteolytic activity, vs. synthetic substrates and ochratoxin A, of *Candida guilliermondii* isolated from dry-cured ham. *Industria Conserve* 79, 13-35.
- Walczak, E., Czaplinska, A., Barszczewski, W., Wilgosz, M., Wojtatowicz, M. y Robak, M. (2007). RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing. *International Journal of Food Microbiology* 24, 305-312.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes form phylogenetics. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Ed.: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. Academic Press, San Diego.
- Wigley, R.C. (1999). Starter cultures. Uses in the Food Industry. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, San Diego.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.
- Wyder, M.T. y Puhan, Z. (1996). Rapid identification of yeasts from kefir at species level by amplifying the ITS region and subsequent restriction analysis. *Symposium Yeasts in the dairy industry: positive and negative aspects*, Copenhagen, Dinamarca.
- Yamada, Y. y Kondo, K. (1972). Taxonomic significance of the coenzyme Q system in yeasts and yeast-like fungi. 4<sup>th</sup> International Fermentation Symposium, Kioto, Japón.
- Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K., y Totsuka, A. (1991). Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 358-363.
- Yvon, M., Berthelot, S. y Gripon, J.C. (1998). Adding  $\alpha$ -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *International Dairy Journal* 8, 889-898.
- Zamarocky, M. y Bernardi, G. (1986). The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*- a review. *Gene* 47, 155-177.



## **VII. RESUMEN**

---



El jamón ibérico es un producto cárnico elaborado mediante salazonado y posterior secado-maduración de perniles de cerdos ibéricos. La evolución de las condiciones ambientales de humedad relativa y temperatura alcanzadas durante su maduración va limitando el desarrollo de los distintos grupos microbianos, entre ellos el de las levaduras. A final de postsalado y durante la etapa de secadero aumenta la población de levaduras, que se mantiene en la fase de bodega.

Las levaduras parecen tener un papel destacado en la génesis de compuestos volátiles que contribuyen al aroma característico de los productos cárnicos madurados, aprovechando los productos resultantes de la proteólisis y lipólisis que tienen lugar durante la maduración. Concretamente, dentro de la población de levaduras que se desarrolla en el jamón ibérico se han identificado distintos biotipos de *Debaryomyces hansenii* que han generado diferentes perfiles y concentraciones de compuestos volátiles. Estas diferencias podrían estar vinculadas a las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.) y a las fases de procesado en las que se realizó el aislamiento.

Por todo ello, la caracterización de la población de levaduras predominante en las diferentes etapas de maduración en una determinada industria elaboradora de jamones curados de cerdo ibérico y su asociación a un perfil de generación de compuestos volátiles sería de gran utilidad, pues permitiría conocer el tipo de levadura deseada en sus secaderos, e incluso emplearla como cultivo iniciador.

Tradicionalmente, la caracterización de las levaduras aisladas de los productos cárnicos se ha realizado mediante métodos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Debido a la laboriosidad, lentitud y baja fiabilidad de estas técnicas se han empleado como alternativa los métodos basados de ácidos nucleicos. Estos han sido escasamente empleados para la caracterización de aislados de levaduras de origen cárnico.

Se dispone de una gama bastante amplia de técnicas de ácidos nucleicos para la identificación y caracterización de levaduras, pero no todos presentan la suficiente resolución como para ser empleados en la diferenciación de la población de levaduras característica de los productos cárnicos madurados.

En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la efectividad de los diferentes técnicas de ácidos nucleicos para la caracterización de las levaduras que habitualmente se desarrollan en un producto cárnico de larga maduración como el jamón curado. El método más adecuado se ha utilizado para diferenciar las especies y cepas de levaduras con el objetivo de poder diferenciar los biotipos que producen mayor cantidad y variedad de compuestos volátiles asociados al aroma a curado, para poder

seleccionarlos como cultivos iniciadores y controlar posteriormente su implantación. Ha sido igualmente objetivo de este trabajo analizar la distribución de los biotipos de levaduras en función del área de procesado y de la fase de maduración.

De todos los métodos ensayados en este trabajo, el análisis de restricción, tanto de la región ITS como de la región 18S, del ADN ribosómico resulta inadecuado para la diferenciación a nivel de especie de levaduras de interés en la industria cárnica.

El análisis de restricción del ADN mitocondrial, además de ser una técnica rápida, reproducible y sencilla, permitió la caracterización a nivel de especie y cepa de las levaduras aisladas de jamón ibérico. La técnica RAPD-PCR no permite una correcta caracterización de las levaduras aisladas de jamón ibérico a nivel de especie, por lo que su utilidad debe limitarse a la tipificación dentro de los biotipos previamente determinados mediante análisis de restricción del ADN mitocondrial. El cebador (GACA)<sub>4</sub> fue el que proporcionó mayor información para la caracterización de aislados de levaduras con interés en la industria cárnica a nivel de cepa. Por todo ello, el uso de forma conjunta del análisis de restricción del ADN mitocondrial y del RAPD-PCR debería ser considerado, frente a la caracterización fisiológica, para la selección de levaduras para ser empleadas como cultivos iniciadores en la industria cárnica y el posterior control de su implantación.

Al aplicar el análisis de restricción del ADN mitocondrial en la caracterización de las levaduras de jamón curado de cerdo ibérico se encontraron un total de 15 biotipos diferentes, la mayoría de ellos detectados en todas las D.O.P. Sin embargo, se obtuvieron patrones exclusivos de algunas de ellas y el biotipo más abundante en cada una de las D.O.P. nunca fue el mismo. A la vista de estos resultados cabría pensar que los perfiles de restricción de ADN mitocondrial podrían estar relacionados con las diferentes áreas geográficas de producción de jamón ibérico, por lo que los biotipos de levaduras así obtenidos podrían ser empleados como indicadores de la procedencia geográfica de los jamones. Además, las cepas de levaduras seleccionadas, al haber sido aisladas de localizaciones geográficas diferentes, deben de encontrarse bien adaptadas a los correspondientes nichos ecológicos, por lo que podrían ser propuestas como cultivos iniciadores en las respectivas áreas geográficas.

Mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial los aislados obtenidos se adscribieron a dos especies diferentes, *D. hansenii* y *Candida zeylanoides*, siendo la primera la predominante. Así, la población de levaduras de jamón ibérico no se caracterizó por estar compuesta por una amplia variedad de especies, pero sí por

presentar una importante variabilidad de cepas de la misma especie, fundamentalmente dentro de la especie *D. hansenii*.

La aplicación del análisis de restricción del ADN mitocondrial como técnica de caracterización de levaduras ha permitido establecer diferentes perfiles de producción de compuestos volátiles en un medio de cultivo diseñado con una composición similar a la del jamón curado. Se han obtenido diferencias en la cantidad y en la variedad de compuestos volátiles producidos tanto en función del patrón de restricción como en función de la especie. Así los aislados de *D. hansenii*, principalmente los encuadrados dentro de los patrones de restricción C2 y D, mostraron una mayor cantidad de compuestos volátiles relacionados con el aroma a curado que los de *C. zeylanoides*.

La evaluación de los compuestos volátiles producidos por las levaduras en un medio de cultivo, con composición y características similares a las encontradas en jamón curado durante su maduración, es un método adecuado para la selección de levaduras como cultivos iniciadores.

Por otra parte, el perfil de la población de levaduras de jamón ibérico varió con la etapa de procesado a nivel de cepa. Así se observó una evolución a lo largo del procesado de los biotipos obtenidos mediante la combinación de la técnica RAPD-PCR y el análisis de restricción del ADN mitocondrial. Al evaluar la producción de compuestos volátiles por los diferentes biotipos en función de la etapa de procesado en la que fueron aislados, se observaron diferencias relevantes. Por consiguiente, ambas técnicas moleculares deberían aplicarse junto con la generación de compuestos volátiles en el medio de cultivo diseñado para llevar a cabo una diferenciación adecuada para la selección de levaduras para ser usadas como cultivos iniciadores en la industria cárnica.

Una vez caracterizada la población de levaduras autóctonas del jamón curado de cerdo ibérico, evaluada su influencia en la generación de compuestos volátiles y realizada la primera selección de los aislados para su utilización como cultivos iniciadores, se evaluó la producción de compuestos volátiles en una matriz cárnica como el salchichón. De los 3 biotipos inoculados, los aislados de *D. hansenii* con patrón de restricción del ADN mitocondrial E y C2 resultaron ser los más adecuados para ser empleados como cultivo iniciador en la industria cárnica. Sin embargo, la utilización de un cultivo mixto que incluya las 3 cepas ensayadas de *D. hansenii* debería ser considerada por la menor cantidad de compuestos azufrados generados.





**ANEXO**

---



## Capítulo 40. *Debaryomyces*

**Molecular detection of foodborne pathogens**

Ed.: Dongyou Liu, Taylor & Francis, Londres

En proceso de impresión para su publicación.



# 40 *Debaryomyces*

J.J. Córdoba, M.J. Andrade, E. Bermúdez, F. Núñez,  
M.A. Asensio, and M. Rodríguez  
Universidad de Extremadura

## CONTENTS

40.1	Introduction .....	557
40.1.1	Classification and Morphology of <i>Debaryomyces</i> .....	557
40.1.2	Biology, Pathogenesis, and Medical Importance.....	558
40.1.3	Diagnosis of <i>Debaryomyces</i> .....	559
	40.1.3.1 Physiological and Morphological Analysis.....	559
	40.1.3.2 Molecular Analysis.....	560
40.2	Methods .....	561
40.2.1	Reagents and Equipment.....	561
	40.2.1.1 Sample Preparation.....	561
40.2.3	Detection Procedures.....	562
	40.2.2.1 RFLP Analysis of Mitochondrial DNA.....	562
	40.2.2.2 RAPD-PCR.....	563
40.3	Conclusions.....	563
	Acknowledgments.....	565
	References.....	565

## 40.1 INTRODUCTION

Species of the ascomycetous genus *Debaryomyces* are among the most common yeasts isolated from many natural habitats such as air, soil, pollen, tree exudates, plants, fruits, insects, feces, gut of vertebrates, and sea water.<sup>1</sup> Some of their species, especially *Debaryomyces hansenii*, have been found in a wide variety of foods, mainly those with low water activity ( $a_w$ ) as well as in high-sugar products such as fruit juices, soft drinks, wine, beer, sugary products, bakery products, dairy products and meat or processed meats.<sup>1-12</sup> Also *Candida famata*, anamorph of *D. hansenii*, formerly known as *Torulopsis candida*, can be found in many foods, in particular cheese and other dairy products and sausages.<sup>2,13,14</sup>

The genus *Debaryomyces* is normally considered a non-pathogenic yeast<sup>15</sup> and has rarely been isolated from humans. Some species have been reported to exert positive effects in the ripening of fermented foods such as dairy and meat products. However, some diseases have been related to *D. hansenii* and its anamorph *C. famata*, mainly in immunocompromised patients, such as a case of bone infection,<sup>16</sup> an allergic alveolitis,<sup>17</sup> or septicemia.<sup>18</sup> The positive effects of *Debaryomyces* in foods and its pathogenic relevance will be discussed in this chapter.

For the diagnosis of *Debaryomyces*, different physiological and morphological methods have been traditionally used. However, these methods are laborious, lack discriminatory power and misidentification occurs frequently.

Progress in the molecular nucleic acid methods may allow the possibility to characterize yeasts at species and strain level. We here will analyze the main physiological and morphological methods, as well as the molecular techniques for the diagnosis of *Debaryomyces*.

### 40.1.1 CLASSIFICATION AND MORPHOLOGY OF *DEBARYOMYCES*

Genus *Debaryomyces* was established by Klocker<sup>19</sup> with the single species of *D. globosus*, and currently 18 species have been included: *D. carsonii*, *D. castellii*, *D. coudertii*, *D. etchellsii*, *D. hansenii*, *D. maramus*, *D. melissophilus*, *D. nepalensis*, *D. occidentalis*, *D. polymorphus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. robertsiae*, *D. udenii*, *D. vanrijiae*, *D. yamadae*,<sup>20</sup> *D. prosopidis*,<sup>21</sup> *D. mycophilus*,<sup>22</sup> and *D. singareniensis*.<sup>23</sup>

The members of this genus show spherical cells, and pseudomycelium is absent, primitive or occasionally well developed. All species are perfect, haploid, and have a vegetative reproduction by multilateral budding.<sup>24</sup> The sexual reproduction proceeds via heterogamous conjugation of two cells of different form or size, generally mother and bud, although the isogamous conjugation also occurs.<sup>24</sup> The conjugation commonly leads to a diplophase followed by meiosis and ascospore formation.<sup>25</sup> One to two spherical, globular, ovoidal or lenticular smoothy or warty spores are usually formed per ascus, but in some species up to four spores could be present.<sup>24</sup> *Debaryomyces* species are distinguished from

other ascomycetous yeast genera by the special internal ultrastructure of their ascospores.<sup>24</sup>

The nuclear base composition of the *Debaryomyces* species is 37 mol% G + C or higher.<sup>26</sup> The karyotype analysis revealed a high degree of polymorphism.<sup>27</sup> Thus, in the most frequent species of the genus, *D. hansenii*, two varieties are differentiated, according to the current taxonomy: *D. hansenii* var. *fabryi* and *D. hansenii* var. *hansenii*. They can be discriminated by their maximum growth temperatures, the sequence divergences of their 26S rRNA genes, and differences in the electrophoretic mobility of their glucose-6-phosphate dehydrogenase.<sup>28,29</sup>

The anamorph of *D. hansenii* is *C. famata*. Phylogenetically, *D. hansenii* is related to *Candida albicans*<sup>30</sup> and belongs to a monophyletic clade containing organisms that translate CTG as serine instead of leucine. For this, Fitzpatrick et al.<sup>31</sup> suggested that *D. hansenii* and *Candida guilliermondii* are sister taxa.

#### 40.1.2 BIOLOGY, PATHOGENESIS, AND MEDICAL IMPORTANCE

*Debaryomyces* species are osmotolerant and can grow in media containing up to 4 M NaCl.<sup>32</sup> Species of this genus are characterized physiologically by their inability to assimilate nitrate, as well as their weak or nonexistent fermentation capacities,<sup>24</sup> and chemotaxonomically by their expression of coenzyme Q-9.<sup>33</sup> These and others characteristics, which are used for testing species of genus *Debaryomyces* are summarized in Table 40.1.

The main species of this genus, *D. hansenii* is able to grow at 10% NaCl or 5% glucose, and these characteristics are used to discriminate *D. hansenii* from other ascomycetous yeasts. On the other hand, *D. hansenii* is one of the

lipid-accumulating, “oleaginous” yeasts, and can accumulate lipids to concentrations up to 70% of its dry biomass<sup>34</sup> and its metabolism is clearly dominated by pathways that contribute to lipid metabolism. *D. hansenii* is a heterogeneous species, with remarkable phenotypic differences between strains, such as variations in their ability to metabolize various carbon sources, the expression of different lipase and protease activities, and their diverse optimal growth conditions.<sup>4,35</sup> The biological characteristics of *D. hansenii* have been reviewed recently by Breuer and Harms.<sup>36</sup> *D. hansenii* can be cultivated in media with up to 25% NaCl or 18% glycerol. It is isolated from environments with high salt concentrations, such as sea water or several types of food. In fact, moderate NaCl concentrations improve growth of *D. hansenii* cells. The positive effect of NaCl on *D. hansenii* growth is even more evident in the presence of several stress conditions, such as high temperature and low or high pH levels in the media. All these characteristics make that *D. hansenii* is regarded as a halophilic yeast.<sup>37</sup>

*D. hansenii* is reported to grow optimally at 20–25°C, which might be a consequence of its natural occurrence in habitats such as sea water. *D. hansenii* can grow at 5°C and even below 0°C. At 10°C this yeast is able to grow at pH 4.0–6.0 when  $a_w$  is up to 0.99. *D. hansenii* can grow at  $a_w$  values as low as 0.65.<sup>36,38</sup>

The growth of *Debaryomyces* in foods is not considered usually as harmful, and some species have positive effects in the ripening of fermented foods like dairy and meat products.<sup>39–41</sup> Due to their ability to grow at low pH, high salt concentration and low temperature, yeasts are the first microorganisms that develop on the cheese surface. They contribute in cheese ripening by assimilation of lactic acid causing an increase in pH, which will enhance the growth of other microorganisms. In addition, *D. hansenii* metabolizes lactose,

**TABLE 40.1**  
**Characteristics of Genus *Debaryomyces***

Characteristics	Possible Results for <i>Debaryomyces</i> spp.
Fermentation of: galactose, glucose, lactose, maltose, melibiose, raffinose, sucrose	+, –, s, v, w
Assimilation of carbon compounds: L-arabinose, cellobiose, citric acid, erythritol, galactose, inositol, lactose, maltose, D-mannitol, raffinose, L-rhamnose, ribitol, D-ribose, soluble starch, succinic acid, sucrose, trehalose, D-xylose	+, –, v
Splitting of arbutin	+, –, v
Assimilation of nitrite	+, –, v
Growth in vitamin-free medium	+, –
Growth on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar	+, –, w
Growth at 37°C	+, –, v
G + C (mol%)	37–40%
Shape of the ascospores	spherical, oval
Wall of the spores	warty, smooth
Number of spores per ascus	1, 2, 3, 4
Formation of pseudomycelium	+, –

Source: Kreger-van Rij, N.J.W., *The Yeast, A taxonomic Study*, 3rd ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.

Notes: +, positive reaction; w, weak reaction; s, slow reaction; –, negative reaction; v, variable reaction.

as well as multiple organic carbon and nitrogen sources, to generate volatile sulphur compounds, esters, alcohols, aldehydes, and ketones that contribute to alcoholic, acidic, and cheesy flavour.<sup>42</sup> In addition, *D. hansenii* isolated from meat products showed proteolytic and lipolytic activities,<sup>43–49</sup> and it has been suggested that *D. hansenii* enhances the sensory characteristics and may contribute to the flavour in dry-cured fermented sausages,<sup>41,50</sup> ripened loins<sup>51</sup> or dry-cured hams.<sup>12,52</sup> *Debaryomyces* species also contribute to the ripening of pickles, where they oxidize the acids produced by lactic acid bacteria during fermentation.<sup>3,53</sup>

It is also possible to find *Debaryomyces* spp. in other kinds of foods. They were found in ready-to-eat fufu and lafun-fermented cassava products.<sup>54</sup> *Debaryomyces polymorphus* was one of the most frequently reported yeasts in fruit salads.<sup>55</sup> However, *D. hansenii* has been the most reported species in fermented tea plant (*Camellia sinensis*) leaves, seasoned green table olives, and processed fresh edible sea urchins.<sup>56–58</sup>

An excessive growth of *Debaryomyces* may cause undesirable sensory changes in the formation of bad aromas and flavors, gas production, discoloration, and changes in texture.<sup>3,59</sup>

Proteolytic *D. hansenii* was isolated from decayed and damaged, uncooked, ripe tomatoes. Growth of a proteolytic, alkalizing yeast such as *D. hansenii* in raw tomatoes enhances conditions for growth of *Salmonella*, because of increased pH. Thus, the risk of human diseases caused by pathogenic bacteria favoured by increased pH of decayed pulp tissue is enhanced by this yeast.<sup>60</sup>

*Debaryomyces* spp. have rarely been isolated from humans, but they are considered opportunistic pathogens. Wong et al.<sup>16</sup> reported some infections caused by *Debaryomyces* species. *Torulopsis candida* (*C. famata*) was isolated from a patient with chronic skin lesions on the hands and feet. *D. hansenii* was also found in one case of bone infection that a 23-year-old woman suffered over 4 years. Several clinical samples were identified as *D. hansenii* (and its anamorph *C. famata*) in superficial infections.<sup>61</sup> *D. hansenii* was also responsible for a persistent candidemia observed in a patient heavily treated with various fungicides.<sup>18</sup> A 65-year-old female was diagnosed of extrinsic allergic alveolitis resulting from exposure to inhaled organic dusts, being *D. hansenii* the dominant species in indoor air samplings.<sup>17</sup>

Different species of *Candida* are part of the natural microbiota and, thus, are regarded as commensal organisms in humans. *C. famata* was thought to be nonpathogenic for humans. However, this yeast was isolated in combination with other *Candida* spp. from a relevant number of clinical cases, including ocular endophthalmitis, retinopathy, and central nervous system infection. In addition, *C. famata* is rarely implicated in human fungemia.<sup>62–64</sup> New treatments of hospitalized patients seem to have favored the emergence of *C. famata* as a pathogen, but they may be under-reported.<sup>65</sup> In this sense, *C. famata* has been associated with catheter-related bloodstream infection<sup>66</sup> and rarely with other infections,<sup>16,67–71</sup> generally in immunocompromised patients. Thus, medical

importance of *D. hansenii* and its anamorph *C. famata* may rely on susceptibility of immunocompromised patients and on its resistance to the treatments applied to different pathologies.

### 40.1.3 DIAGNOSIS OF DEBARYOMYCES

Different physiological and morphological methods have been traditionally used in taxonomic differentiation of *Debaryomyces*.<sup>1,33,72–74</sup> However, several studies have shown that traditional identification methods, based on phenotypic properties of yeasts (morphological, biochemical, and physiological tests) are laborious, lack discriminatory power and misidentification occurs frequently.<sup>75</sup> In addition, identification on the basis of morphological properties generates the so-called double binomial nomenclature, with one name for the vegetative state (anamorph) and another for the sexual state (teleomorph). This is the case of *C. famata/D. hansenii*. Furthermore, these methods generally produce ambiguities and inaccuracies in the results, because the morphological and physiological characteristics are strongly influenced by growing conditions.

Progress in molecular biology in the last decade has opened up possibilities of characterizing yeasts at the genomic level. The sequencing of the genes coding for 18S and 26S ribosomal RNA (rRNA), as well as internal transcribed spacer (ITS), has brought about many changes in the identification and classification of yeasts.<sup>76</sup> In addition, techniques based on random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP), have already been recognized as reliable tools for the rapid identification of yeasts.<sup>9</sup> We here review the main physiological and morphological methods, as well as the molecular techniques.

#### 40.1.3.1 Physiological and Morphological Analysis

The physiological and morphological identification of *Debaryomyces* is done on the basis of several characteristics of this genus which are listed below:

**Characteristics of vegetative reproduction.** (i) Modes of vegetative reproduction: by budding, by fission or a combination of both processes; (ii) characteristic of vegetative cells: morphology grown in liquid and solid media; (iii) formation of pseudomycelium and true mycelium; (iv) formation of asexual endospores; (v) formation of chlamydo-spores; and (vi) formation of germ tubes.

**Sexual characteristics.** Characteristics of ascospore or basidiospore formation.

**Physiological and biochemical characteristics.** The physiological tests used for identifying purposes are those associated with the utilization of carbon and nitrogen sources, growth factor requirements, growth at elevated temperatures and on media of high sugar or sodium chloride content, formation of typical characteristic metabolites, and susceptibility to antibiotics. The utilization of these tests for *Debaryomyces* characterization requires considerable experience and skill for evaluating specified

tests. Furthermore, great difficulties for the differentiation at species level in this genus could be found, since many biochemical and physiological tests show the same result for different species. Among the physiological biochemical tests of characterization, in addition to those in Table 40.1, the following have been used:

- Formation of extracellular, amyloid compounds
- Production of ammonia from urea
- Splitting of fat
- Ester production
- Cycloheximide resistance
- Tolerance of 1% acetic acid
- Gelatin liquefaction
- Diazonium Blue B (DBB) color test
- Coenzyme Q structure
- Tetrazolium indicator medium (TTC medium)

The main biochemical tests are electrophoresis of proteins, coenzyme Q analysis, allozyme analysis, and ultrastructure and chemical composition (polysaccharides, fatty acids) of the cell wall.<sup>24</sup> Missoni et al.<sup>77</sup> found the evaluation of cell fatty acids by gas chromatography very useful in the routine diagnosis and epidemiological monitoring of the infection due to *Candida* spp. (including *C. famata*). These techniques are not always stable or reproducible because they depend on the physiological status of the strains. For example, fermentation of sugars is not very accurate because the slow release of CO<sub>2</sub> is not so immediate to be trapped in a tube Durham.

Many commercial methods based on the above morphological and physiological characteristics have been developed for the identification of yeasts, although most of them focus on clinical isolates related to different diseases that do not include species of genus *Debaryomyces*. Some examples of this are the Yeast Identification System API 20C (BioMérieux), the Uni-Yeast-Yek system (Remel), the Minitek system (BBL),<sup>72,78–80</sup> or enzyme-based system such as Yeast Identification Panel (Baxter-MicroScan) and MicroScan Rapid Yeast Identification (Innovative Diagnostic Systems).<sup>73,81</sup> The basic principle of these systems is carbohydrate assimilation, which requires a minimum incubation period of 24 h for growth. The enzymatic activity systems use chromogenic substrates and can identify yeasts within 4 h after inoculation.

Due to the increasing importance of yeasts in the production and spoilage of foods, the database of the above methods has been completed with foodborne yeasts. Thus, the API ID32C system allows the identification of three species of the genus *Debaryomyces*: *D. hansenii*, *D. marama*, and *D. polymorphus*.<sup>82</sup> Similarly, the Vitek Yeast Biochemical card (BioMérieux) allows identification of *D. hansenii*.<sup>83,84</sup>

Furthermore, several methods have been developed for automatic identification of yeasts on the basis of biochemical tests, such as the highlighting system Vitek 2® (BioMérieux) with colorimetric and fluorimetric VITEK 2 yeast cards<sup>85,86</sup> and Biolog YT Microplate® (AES Laboratories).

In addition, selective, and differential chromogenic solid media have been developed for the detection of *Debaryomyces* spp. For food samples, *Debaryomyces* differential medium (DDM) has been reported to be very satisfactory.<sup>87,88</sup>

#### 40.1.3.2 Molecular Analysis

The molecular methods for identifying genus *Debaryomyces* and yeasts in general, are based on the study of DNA and RNA. The yeast nucleic acid sequences contain the primary information which determines all the physiological, biotechnological, and pathogenic characteristics and potential of a particular organism. The use of genotypic rather than phenotypic characteristics for identification is potentially more accurate, reproducible, and rapid.<sup>83</sup> Nucleic acid-based methods have the advantage over phenotypic identification methods by not being influenced by environmental conditions of the cells, because the nucleotide sequence of the DNA does not change during growth.

##### (i) Methods based on nucleic acid hybridization

Nucleic acid hybridization is typically between a DNA or RNA molecule present in the target organism and a DNA probe which has a sequence complementary to the target sequence.

18S rRNA-targeted oligonucleotide probes were designed for rapid and reliable identification of yeasts like the genus *Debaryomyces* and the species *D. hansenii*.<sup>89–91</sup>

##### (ii) Methods based on nucleic acid amplification

The most popular method of amplification is the polymerase chain reaction (PCR) technique. The PCR can detect one copy of the target sequence by using two oligonucleotide primers.

Conventional PCR has been used for identification of *D. hansenii* only in some cases.<sup>92</sup> However, different variations of this technique (PCR-RFLP, RAPD, Q-PCR, NASBA, etc.) are frequently used to differentiate the genus *Debaryomyces*.

One of the problems when using PCR with clinical samples or isolates related to pathogenesis is the possibility of detecting naked DNA derived from dead and degrading yeast cells instead of live yeasts, which results in false-positives. An alternative to PCR consists in using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) system that selectively amplifies RNA. This method has been used with yeasts of genus *Candida*.<sup>93</sup>

The RAPD-PCR is a variation of PCR used for the identification of yeasts. This method is based on PCR amplification of the genomic DNA in the presence of a single short primer. Due to low-temperature hybridization primer joins unspecific sites throughout the genome, allowing the amplification of DNA fragment of different length. The use of RAPD-PCR permits to obtain fingerprints which are specific for species and even strains. The RAPD-PCR technology with different primers, mainly from micro- and minisatellites, has been used for the correct identification of several species of *Debaryomyces*.<sup>75,83,94–96</sup>



One of the most promising PCR techniques in the detection of microorganisms is real-time PCR or quantitative PCR (Q-PCR). Q-PCR assays have been developed for detecting and enumerating yeasts, specially for yeasts in wine<sup>97,98</sup> and foods,<sup>99</sup> as well as in fungal infections by *C. famata*.<sup>64</sup>

### (iii) Methods based on RFLP

The determination of the RFLP is the differentiation of organisms by analyzing patterns of rupture that are generated in a specific site of the genome when it is cut by restriction enzymes. Then, gel electrophoresis displays a pattern of polymorphic bands corresponding to the fragments of different sizes, which are generated on the cut of each endonuclease. This fragment length polymorphism appears because the organisms of different species and even strains differ in the distance of cleavage sites for each restriction enzyme. The similarity of the patterns generated allows for correlations between species and strains.

The PCR-RFLP is a useful method for identification of some yeast genus, using the restriction analysis of different regions of ribosomal RNA/DNA genes (ITS, 5.8S rDNA, 18S rDNA, etc.). This technique has two steps: first, the rDNA region is amplified and then the PCR product is digested. Therefore, this technique is slower than some current PCR methods, which achieve identification and typing with just the PCR products. The results of this technique depend on the region of genome amplified and the enzymes used. For example, PCR-RFLP of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 and 18S rDNA regions has been reported as a good method for the differentiation of *Saccharomyces* species,<sup>100,101</sup> but it does not allow for separation of *Debaryomyces* spp.<sup>94</sup> However, the PCR-RFLP of the intragenic spacer (IGS) of rDNA is proposed as a clear technique for the practical discrimination species of the genus *Debaryomyces*.<sup>102</sup>

In the technique of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), restriction enzymes digest the complete genome and large DNA molecules are resolved by continuous reorientation of the electric field during gel electrophoresis, determining chromosome length polymorphism (CLP). This pattern is specific for yeast species, due to genetic and evolutionary phenomena that have taken place in the chromosomes (insertions, deletions, and translocations). This method has been reported as a useful tool in the differentiation of species and strains of *Debaryomyces*.<sup>27,35</sup>

Another technique based on restriction fragment length polymorphism is the mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis. Among all the molecular techniques described in literature, mtDNA restriction analysis appears as one of the most suitable methods to differentiate between yeast strains. Querol et al.<sup>103</sup> developed a new mitochondrial restriction analysis method based on the extraction of total yeast DNA and the use of GC-rich restriction endonucleases that recognise a high number of sites in the yeast nuclear DNA, but few sites in the mtDNA. This technique has successfully been used to characterize strains of genus *Debaryomyces*.<sup>94,104–106</sup>

The most reliable, simple, and fast methods to differentiate *Debaryomyces* spp. at strain level rely first on RFLP analysis of mtDNA and then on RAPD-PCR using micro- or minisatellite primers.<sup>94</sup>

## 40.2 METHODS

In this chapter, a differentiation method for *Debaryomyces* spp. that includes first mtDNA restriction analysis and then RAPD-PCR using micro- and minisatellite primers is described. For this, total yeast DNA is first isolated and then either digested with *Hae*III for RFLP of mtDNA or amplified by RAPD-PCR using microsatellite primers (GACA)<sub>4</sub>, (GAC)<sub>5</sub> and (GTG)<sub>5</sub> and the minisatellite primer M13.

### 40.2.1 REAGENTS AND EQUIPMENT (TABLE 40.2)

#### 40.2.1.1 Sample Preparation

Samples must be taken aseptically and homogenized in a Stomacher lab-blender with sterile peptone water (0.1%, w/v). Decimal dilutions are obtained with the same diluent and 0.1 ml is spread onto the surface of different selective media for yeasts, such as Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC, Oxoid, Cambridge, UK), Malt Extract Agar (2% w/v malt extract, 2% w/v glucose, 0.1% w/v peptone, 2% w/v agar) and Dichloran-Glycerol Agar (DG18, Oxoid). They are incubated at 25°C for 5 days.

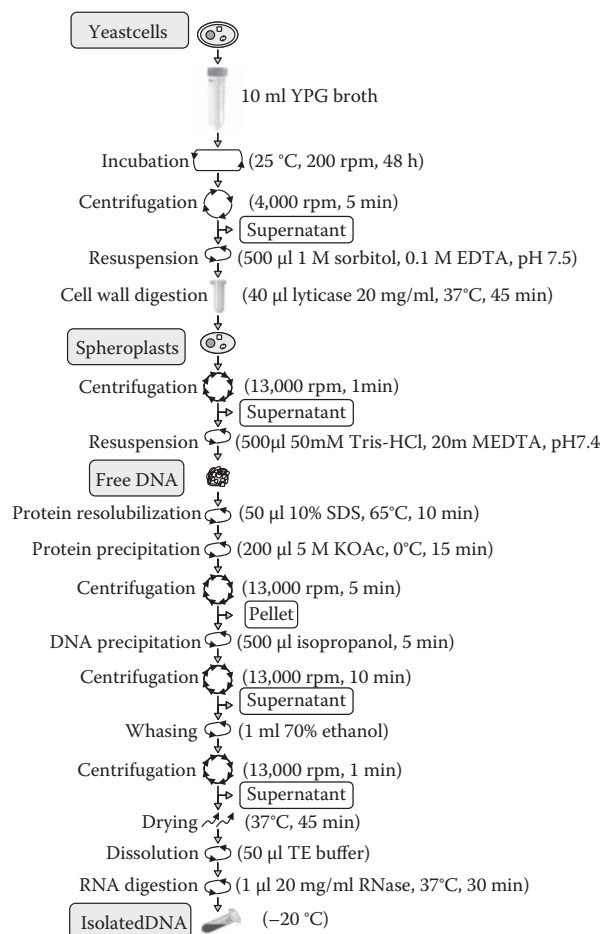
The isolates obtained can be placed in cryotubes containing Malt Extract Broth (2% w/v malt extract, 2% w/v glucose, 0.1% w/v peptone) and stored at –80°C in 20% (v/v) glycerol.

Total DNA is isolated from broth cultures. Yeast cells are grown in 10 ml of Yeast Peptone Glucose broth (1% w/v yeast extract; 2% w/v peptone; 2% w/v glucose) in a 50 ml conical tube at 25°C in an orbital shaker at 200 rpm (Figure 40.1). In addition, for mitochondrial DNA isolation, conical tubes should be placed inclined in the orbital shaker. To reach an adequate cell density, incubation for 48 h is recommended. Cells are pelleted by centrifugation for 5 min at 4,000 rpm, resuspended in 500 µl of 1 M sorbitol, 0.1 M EDTA, pH 7.5, and transferred to a 2 ml sterile microtube. Subsequently, 40 µl of lyticase (20 mg/ml) are added to digest cell walls of yeasts and obtain spheroplasts. After 45 min of incubation at 37°C in a water bath with occasional shaking, the suspension is centrifuged at 13,000 rpm for 1 min and the supernatant is discarded. The pellet is resuspended in 500 µl of 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA pH 7.4 to release cellular DNA from spheroplasts. After that, 50 µl of 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) are added and the mixture is heated at 65°C for 10 min in a water bath. To remove proteins, 200 µl of 5 M potassium acetate are added, the solution is shaken and stored on ice for 15 min. Next, it is centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. A volume of 500 µl of the resulting supernatant is transferred to a new sterile microtube together with an equal volume of ice-cold isopropanol and it is left at room

**TABLE 40.2**  
**Reagents and Equipment Required for RFLP Analysis of Mitochondrial DNA and RAPD-PCR**

Reagents and Culture Media	Equipment
Glycerol	Laminar flow cabinet
Lyticase	Stomacher lab-blender
Sodium dodecyl sulfate (SDS), molecular biology grade	Incubator
Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt, dihydrate	Orbital shaker
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	Vortex
D-Sorbitol extrapure	Freezer
Hydrochloric Acid (HCl) 35%	Water bath
Potassium acetate, extra pure	Centrifuge for 50 ml conical tubes
Isopropanol	Centrifuge for 2 ml and 0.5 ml microtubes
Ethanol absolute	1 ml, 200 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 1 $\mu$ l and 0.5 $\mu$ l pipettes
RNase	5 ml cryotubes
Ultrapure water	Spectrophotometer
<i>Hae</i> III and 10 $\times$ buffer	Microwave oven
Agarose D-1	UV transilluminator
DNA molecular markers	Thermal cycler and PCR tubes
Bromophenol blue, indicator	Horizontal electrophoresis unit with the appropriate gel casting tray and combs
Ethidium bromide	
PCR reagents (see Table 40.3).	
Dichloran 18% Glycerol (DG18) Agar	
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar	
Bacteriological agar	
Malt extract	
Yeast extract	
D-Glucose anhydrous, extra pure	
Bacteriological peptone	

temperature for 5 min. DNA is pelleted by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min, washed with 1 ml of ice-cold 70% (v/v) ethanol and centrifuged at 13,000 rpm for 1 min. Ethanol is aspirated with a pipette and the pellet is dried at 37°C for 45 min. Dried DNA is dissolved in 50  $\mu$ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0). For RNA digestion, 1  $\mu$ l of RNase (20 mg/ml) is added and the solution is incubated at 37°C for 30 min in a water bath and immediately placed at -20°C. The DNA obtained can be used for RFLP analysis and RAPD-PCR. To be used for PCR the DNA has to be spectrophotometrically quantified and brought to a final concentration of 100 ng/ $\mu$ l.



**FIGURE 40.1** Diagram of DNA isolation from *Debaryomyces* yeasts.

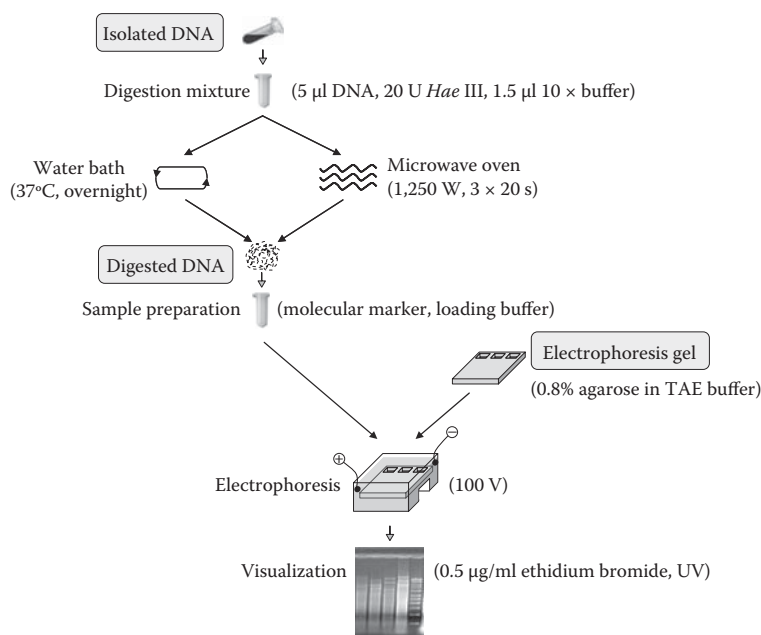
## 40.2.2 DETECTION PROCEDURES

### 40.2.2.1 RFLP Analysis of Mitochondrial DNA

Mitochondrial DNA restriction analysis consists in the digestion of total DNA with restriction endonucleases with recognition sites rich in GC, such as *Hae*III, that results in an overdigestion of the nuclear DNA to render specific bands from mtDNA.

The digestion mixture is prepared on ice for a final volume of 15  $\mu$ l as follows: 5  $\mu$ l of DNA isolated according to the above method, 20 U of the restriction enzyme *Hae*III and 1.5  $\mu$ l of the appropriate 10  $\times$  buffer.<sup>94</sup> Then, the reaction is performed overnight at 37°C in a water bath (Figure 40.2).

An alternative method using a microwave oven for DNA digestion has been described.<sup>107,108</sup> The digestion mixture is placed inside a water bath and incubated in three heating times at maximum level of the microwave oven (1,250 W) for 20 s each, giving a spin between each time.



**FIGURE 40.2** Diagram of RFLP analysis of mitochondrial DNA from *Debaryomyces* yeasts.

Restriction fragments are electrophoretically separated in a horizontal 0.8% (w/v) agarose gel in  $1 \times$  TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0) at 100 V. Each digested DNA sample, as well as an appropriate DNA molecular marker, are mixed with loading buffer (50% glycerol, 0.25% bromophenol blue and 25 mM EDTA) and loaded into the gel wells. Restriction fragments are visualized in an UV transilluminator after ethidium bromide (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) staining. Sizes of restriction fragments can be estimated by comparison to the DNA molecular marker.

#### 40.2.2.2 RAPD-PCR

For RAPD-PCR a single primer with an arbitrary sequence of oligonucleotides is used. Thus, knowledge of DNA template sequence from the tested yeasts is not required. Core sequence of phage M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3')<sup>109</sup> and the microsatellite primers (GACA)<sub>4</sub>, (GAC)<sub>5</sub> and (GTG)<sub>5</sub> have proved useful to characterize *Debaryomyces* spp. using RAPD-PCR.<sup>94</sup>

The PCR mixture must be prepared on ice with the reagents and concentrations summarized in Table 40.3 to reach a final volume of 50  $\mu\text{l}$ . The reaction is performed in a thermal cycler following the amplification programs shown in Table 40.3. After the program ends, RAPD-PCR products are kept in the thermal cycler at 4°C. The reaction mixture adding water instead of DNA sample can be used as negative control.

RAPD-PCR products are examined by electrophoresis in horizontal 1% (w/v) agarose gels at 100 V (Figure 40.3).

A DNA molecular marker can be incorporated into the gel to estimate the size of the amplification products. Gels are stained with an ethidium bromide (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) solution and visualized under UV light.

## 40.3 CONCLUSIONS

Yeasts of genus *Debaryomyces* have been usually found as microbial population of food, specially ripened foods. These yeasts are considered normally as nonpathogenic. However, some species of this genus have been occasionally isolated from human diseases such as bone infection, allergic alveolitis or septicaemia in immunocompromised patients.

Eighteen different species have been included in the genus *Debaryomyces*. All of them are osmotolerant and can grow in media containing up to 4 M NaCl. Species of this genus are characterized physiologically by their inability to assimilate nitrate, as well as their weak or nonexistent fermentation capacities.

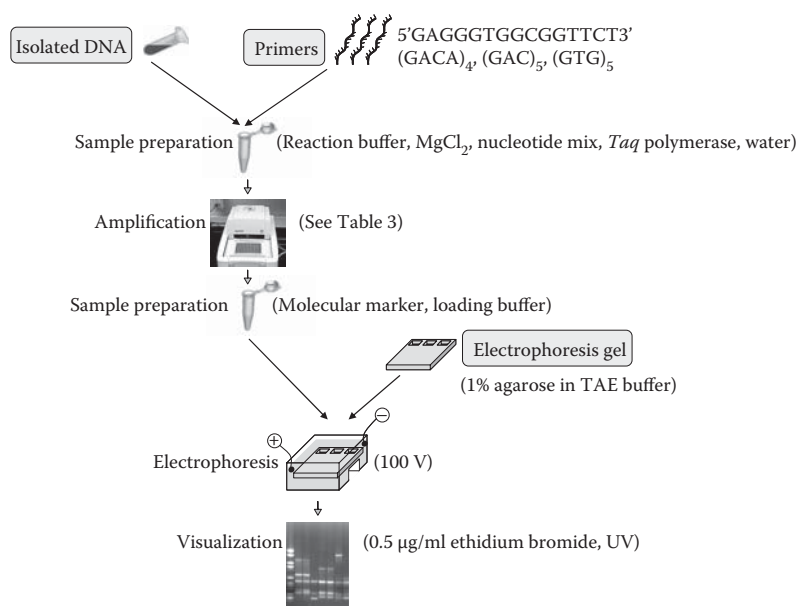
Among the physiological, morphological, and molecular methods used for characterizing *Debaryomyces* species, the most reliable, simple, and fast way to characterize *Debaryomyces* spp. relies on RFLP analysis of mtDNA and RAPD-PCR using micro- or minisatellite primers. In the present work, a combined procedure that includes characterization by both above methods to differentiate *Debaryomyces* spp. at strain level has been described.

**TABLE 40.3**  
**RAPD-PCR Reagents and Programs for Different Primers**

Reagents	Stock Concentration	M13	(GACA) <sub>4</sub>	(GAC) <sub>5</sub>	(GTG) <sub>5</sub>
		Volume (μl)			
Mg <sup>2+</sup> -free reaction buffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2	3	4	4
PCR nucleotide mix	10 mM	1	1	1	1
Primer	100 ng/μl	1	2	2	2
DNA	100 ng/μl	2	1	1	1
<i>Taq</i> DNA polymerase	2 U/μl	0.5	0.5	0.5	0.5
Sterile deionized water		38.5	37.5	36.5	36.5

PCR stages	Number of Cycles	PCR Program		
Initial denaturation	1	94°C, 3 min		94°C, 5 min
Denaturation		94°C, 45 s	94°C, 1 min	94°C, 30 s
Annealing	30	50°C, 1 min	36°C, 1 min	45°C, 1 min
Extension		60°C, 3 min	55°C, 5 min	60°C, 5 min
Final extension	1	60°C, 3 min	55°C, 5 min	60°C, 5 min



**FIGURE 40.3** Diagram of RAPD-PCR from *Debaryomyces* yeasts.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by part of the projects AGL2004-03291 and AGL2007-64639 funded by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

## REFERENCES

1. Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.

2. Besançon, X. et al. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 17, 9, 1992.
3. Deák, T. and Beuchat, L.R. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1996.
4. Núñez, F. et al. Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.*, 29, 271, 1996.
5. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London, 1997.
6. Córdoba, J.J., Núñez, F. and Asensio, M.A. Contribution of the fungal population to the quality of dry-cured ham. In: *Research Advances in the Quality of Meat and Meat Products*, Toldrá, F., Ed. Research Singpost, Trivandrum, India, 2002.
7. Petersen, K.M., Westall, S. and Jespersen, L. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses. *J. Dairy Sci.*, 85, 478, 2002.
8. Bintsis, T. et al. Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 68, 2003.
9. Vasdinyei, R. and Deák, T. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 123, 2003.
10. Cocolin, L. et al. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1883, 2004.
11. Fadda, M.E. et al. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 95, 51, 2004.
12. Simoncini, N. et al. Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiol.*, 24, 577, 2007.
13. Van den Tempel T. and Jacobsen, M. Yeasts associated with Danablu. *Int. Dairy J.*, 8, 25, 1998.
14. Gardini F. et al. A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Res.*, 1, 161, 2001.
15. Warren, N.G. and Hazen, K.C. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., Murray P.R., Ed. ASM Press, Washington, DC, 1998.
16. Wong, B. et al. Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. *J. Clin. Microbiol.*, 16, 545, 1982.
17. Yamamoto, Y. et al. Extrinsic allergic alveolitis induced by the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Eur. Respir. J.*, 20, 1351, 2002.
18. Wagner, D. et al. Breakthrough invasive infection due to *Debaryomyces hansenii* (teleomorph *Candida famata*) and *Scopulariopsis brevicaulis* in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin B and caspofungin for suspected Aspergillosis. *Infection*, 33, 397, 2005.
19. Klocker, A. Deux nouveaux genres de la famille des Saccharomycetes. *CR. Trav. Lab. Carlsberg*, 7, 273, 1909.
20. Nakase, T. et al. *Debaryomyces* Lodder and Kreger-van Rij nom. cons. In: *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th ed., Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., Eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.
21. Phaff, H.J., Vaughan-Martini A. and Starmer W.T. *Debaryomyces prosopidis* sp. nov., a yeast from exudates of mesquite trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 1419, 1998.
22. Thanh, V.N., VanDyk, M.S. and Wingfield, M.J. *Debaryomyces mycophilus* sp. nov., a siderophore-dependent yeast isolated from woodlice. *FEMS Yeast Res.*, 2, 415, 2002.
23. Saluja, P. and Prasad, G.S. *Debaryomyces singareniensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from a coal mine soil in India. *FEMS Yeast Res.*, 7, 482, 2007.
24. Kreger-van Rij, N.J.W. *The Yeast, A Taxonomic Study*, 3rd ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.
25. Forrest, S.I., Robinow, C.F. and Lachance, M.A. Nuclear behaviour accompanying ascus formation in *Debaryomyces polymorphus*. *Can. J. Microbiol.*, 33, 967, 1987.
26. Price, C.W., Fuson, G.B. and Phaff, H.J. Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the Genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. *Microbiol. Rev.*, 42, 161, 1978.
27. Corredor M. et al. Chromosomal polymorphism in the yeast species *Debaryomyces hansenii*. *Ant. Leeuwenhoek*, 83, 215, 2003.
28. Nakase, T. and Suzuki, M. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-Van Rij and related species. II. Practical discrimination and nomenclature. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 31, 71, 1985.
29. Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Ant. Leeuwenhoek*, 73, 331, 1998.
30. Fabre, E. et al. Comparative genomics in hemiascomycete yeasts: evolution of sex, silencing, and subtelomeres. *Mol. Biol. Evol.*, 22, 856, 2005.
31. Fitzpatrick, D.A. et al. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.*, 6, 99, 2006.
32. Onishi, H. Osmophilic yeasts. *Adv. Food Res.*, 12, 53, 1963.
33. Yamada, Y. Identification of coenzyme Q (ubiquinone) homologs. In: *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th ed. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., Eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.
34. Ratledge C. and Tan K.-H. Oils and fat: production, degradation and utilization by yeasts. In: *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, Verachtert H.J. and De Mot R., Eds. Marcel Dekker, New York, 1990.
35. Petersen, K.M. and Jespersen, L. Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface-ripened cheeses. *J. Appl. Microbiol.* 97, 205, 2004.
36. Breuer, U. and Harms, H. *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23, 415, 2006.
37. Prista, C., et al. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4005, 1997.
38. Van den Tempel, T. and Jacobsen, M. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int. Dairy J.*, 10, 263, 2000.
39. Fleet, G.H. Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 199, 1990.
40. Cook, P.E. Fungal ripened meats and meat products. In: *Fermented Meats*, Campbell-Platt G. and Cook, P.E., Eds. Chapman & Hall, London, 1995.
41. Encinas, J.P. et al. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.*, 54, 203, 2000.
42. Masoud, W. and Jakobsen, M. The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *Int. Dairy J.*, 15, 69, 2005.
43. Rodríguez, M. et al. Evaluation of proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry-cured ham. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 905, 1998.
44. Martín, A. et al. Proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* during controlled ripening of pork loins. *Meat Sci.* 62, 129, 2002.

45. Martín, A. et al. Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 55, 2004.
46. Bolumar T. et al. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 227, 2003.
47. Bolumar T. et al. Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 141, 2003.
48. Bolumar, T. et al. Protease B from *Debaryomyces hansenii*: purification and biochemical properties. *Int. J. Food Microbiol.*, 98, 167, 2005.
49. Durá, M.A., Flores, M. and Toldrá, F. Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Sci.*, 68, 319, 2004.
50. Flores, M., et al. Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Sci.*, 68, 439, 2004.
51. Martín, A. et al. Effect of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* on the volatile compounds during controlled ripening of pork loins. *Int. J. Food Microbiol.*, 84, 327, 2003.
52. Martín, A. et al. Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.*, 110, 8, 2006.
53. Boekhout, T. and Phaff, J. Yeast biodiversity. In: *Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects*, Boekhout, T. and Robert, V., Eds. Behr's Verlag, Hamburg, 2003.
54. Omafuvbe, B.O. et al. Microbial diversity in ready-to-eat fufu and lafun-fermented cassava products sold in Ile-Ife, Nigeria. *Res. J. Microbiol.*, 2, 831, 2007.
55. Tournas, V.H., Heeres, J. and Burgess, L. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiol.*, 23, 684, 2006.
56. Kajikazawa, T. et al. Detection of pathogenic yeasts from processed fresh edible sea urchins sold in a fish market. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 48, 169, 2007.
57. Sansone, C. et al. Isolation of a psychrotolerant *Debaryomyces hansenii* strain from fermented tea plant (*Camellia sinensis*) leaves. *J. Plant Interactions*, 2, 169, 2007.
58. Hernández, A. et al. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 178, 2008.
59. Jakobsen, M. and Narvhus, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy J.*, 6, 755, 1996.
60. Wade, W.N. et al. Proteolytic yeasts isolated from raw, ripe tomatoes and metabiotic association of *Geotrichum candidum* with *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 101, 2003.
61. Nishikawa, A. et al. Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 34, 411, 1996.
62. Krcmery, V. and Barnes, A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J. Hospital Infect.*, 50, 243, 2002.
63. Carrasco, L. et al. Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer retinopathy. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 635, 2005.
64. Pisa, D. et al. Evolution of antibody response and fungal antigens in the serum of a patient infected with *Candida famata*. *J. Med. Microbiol.*, 56, 571, 2007.
65. Hazen, K.C. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 462, 1995.
66. Ng, K.P. et al. *Scopulariopsis brevicaulis* infection in a patient with acute myeloid leukemia. *Med. J. Malaysia*, 58, 608, 2003.
67. St.-Germain, G. and Laverdiere, M. *Torulopsis candida*, a new opportunistic pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, 24, 884, 1986.
68. Carrega G. et al. *Candida famata* fungemia in a surgical patient successfully treated with fluconazole. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16, 698, 1997.
69. Quindos, G. et al. Fatal *Candida famata* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis who was treated with fluconazole. *Clin. Infect. Dis.*, 18, 658, 1994.
70. Rao, N.A., Nerenberg, A.V. and Forster, D.J. *Torulopsis candida* (*Candida famata*) endophthalmitis simulating *Propionibacterium acnes* syndrome. *Arch. Ophthalmol.*, 109, 1718, 1991.
71. Migliorati, C.A., Birman, E.G. and Cury, A.E. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 98, 301, 2004.
72. El-Zaatar, M. et al. Evaluation of the updated Vitek yeast identification database. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 1938, 1990.
73. St.-Germain, G. and Beauchesne, D. Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification Panel. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2296, 1991.
74. Török, T. and King, A.D. Comparative study on the identification of food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1207, 1991.
75. Lopandic, K. et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.*, 23, 341, 2006.
76. Fell, J.W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 1351, 2000.
77. Missoni, E.M. et al. Differentiation between *Candida* species isolated from diabetic foot by fatty acid methyl ester analysis using gas chromatography. *J. Chromatogr. B*, 822, 118, 2005.
78. Buesching, W.J., Kurek, K. and Roberts G.D. Evaluation of the modified API 20C system for identification of clinically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.*, 9, 565, 1979.
79. Pfaller, M.A. et al. Comparison of the Quantum II, API Yeast Ident, and AutoMicrobic systems for identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 2054, 1988.
80. Salkin, I.F. et al. Evaluation of YeastIdent and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 624, 1987.
81. Land, G.A. et al. Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme based yeast identification system. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 718, 1991.
82. Rohm, H., Lechner, F. and Lehner, M. Evaluation of the API ATB 32C system for the rapid identification of foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, 11, 215, 1990.
83. Latouche, G.N. et al. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 3171, 1997.
84. Álvarez-Martín, P. et al. Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *Int. Dairy J.*, 17, 961, 2007.
85. Hata, D.J. et al., Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card, *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1087, 2007.
86. Loïez, C. et al. Evaluation of VITEK 2 colorimetric card for identification of yeast. *Diag. Microbiol. Inf. Dis.*, 56, 455, 2006.

87. De Silóniz, M.I., Valderrama, M.J. and Peinado, J.M. A chromogenic medium for the detection of yeasts with beta galactosidase and beta-glucuronidase activities from intermediate moisture foods. *J. Food Prot.*, 68, 808, 2000.
88. Quirós, M. et al. A beta-glucuronidase-based agar medium for the differential detection of the yeast *Debaryomyces hansenii* from foods *J. Food Prot.*, 68, 808, 2006.
89. Kosse, D. et al. Identification of yoghurt-spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Syst. Appl. Microbiol.*, 20, 468, 1997.
90. Corredor, M. et al. DNA probes specific for the species *Debaryomyces hansenii*: useful tools for rapid identification. *FEMS Microbiol. Lett.*, 193, 171, 2000.
91. Davila, A.M. et al. Use of specific DNA probes for the rapid characterization of yeasts isolated from complex biotypes. *Gen. Sel. Evol.*, 33, 353, 2001.
92. Nishikawa, A., Sugita, T. and Shinoda, T. Rapid identification of *Debaryomyces hansenii*/*Candida famata* by polymerase chain reaction. *Med. Mycology*, 37, 101, 1999.
93. Borst, A. et al. Detection of *Candida* sp in blood cultures using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Diag. Microbiol. Inf. Dis.*, 39, 155, 2001.
94. Andrade, M.J. et al. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 107, 48, 2006.
95. Baruzzi, F. et al. Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. *Meat Sci.*, 72, 261, 2006.
96. Senses-Ergul, S. et al. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *Int. J. Food Microbiol.*, 108, 120, 2006.
97. Hierro, N. et al. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 7148, 2006.
98. Phister, T.G. and Mills, D.A. Real-time PCR assays for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 7430, 2003.
99. Larpin, S. et al. *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Res.*, 6, 1243, 2006.
100. Guillamón, J.M. et al. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.*, 169, 387, 1997.
101. Jespersen, L., Kühle, A. and Petersen, K.M. Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, 60, 43, 2000.
102. Quirós, M. et al. PCR-RFLP analysis of the IGS region of rDNA: a useful tool for the practical discrimination between species of the genus *Debaryomyces*. *Ant. Leeuwenhoek*, 90, 211, 2006.
103. Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15, 439, 1992.
104. Romano, A. et al. Use a RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. *Syst. Appl. Microbiol.*, 19, 255, 1996.
105. Petersen, K.M., Moller, P.L. and Jespersen, L. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripening cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 11, 2001.
106. Martorell, P., Fernández-Espinar, M.T. and Querol, A. Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determined food contamination sources. *Int. J. Food Microbiol.*, 101, 293, 2005.
107. López, V. et al. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, 68, 75, 2001.
108. Casado, E.M. et al. Caracterización rápida de levaduras aisladas de jamón ibérico mediante análisis de restricción del ADN mitocondrial. *XX Congreso Nacional de Microbiología*, Cáceres, 2005.
109. Huey, B. and Hall, J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.*, 171, 2528, 1989.

