



TESIS DOCTORAL

**“ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE UN
NUEVO PRODUCTO CÁRNICO FERMENTADO DE
CERDO IBÉRICO CON COMPUESTOS NITROGENADOS
BIOACTIVOS MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE
MICROORGANISMOS SELECCIONADOS
Y LA ENZIMA EPg222”**

Margarita Fernández García

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Conformidad de los directores:

Fdo. M^ª Guía Córdoba Ramos, M^ª José Benito Bernáldez y Alberto Martín González

Escuela de Ingenierías Agrarias

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Ctra Cáceres s/n
06071- BADAJOZ
Teléfono: 924286200
Fax: 924286201

María de Guía Córdoba Ramos, Profesora Titular 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 titulado “ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE UN NUEVO PRODUCTO CÁRNICO FERMENTADO DE CERDO IBÉRICO CON COMPUESTOS NITROGENADOS BIOACTIVOS MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS Y LA ENZIMA EPg222” presentada por la Lda. Dña. Margarita Fernández García ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctor.

Lo que firma en Badajoz a martes, 3 de Noviembre de 2015.

Fdo: María de Guía Córdoba Ramos



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

Escuela de Ingenierías Agrarias

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Ctra Cáceres s/n
06071- BADAJOZ
Teléfono: 924286200
Fax: 924286201

María José Benito Bernáldez, Profesora Titular 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 titulado “ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE UN NUEVO PRODUCTO CÁRNICO FERMENTADO DE CERDO IBÉRICO CON COMPUESTOS NITROGENADOS BIOACTIVOS MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS Y LA ENZIMA EPg222” presentada por la Lda. Dña. Margarita Fernández García ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctor.

Lo que firma en Badajoz a martes, 3 de Noviembre de 2015.

Fdo: María José Benito Bernáldez

Escuela de Ingenierías Agrarias

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Ctra Cáceres s/n
06071- BADAJOZ
Teléfono: 924286200
Fax: 924286201

Alberto Martín González, Profesor Titular 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 titulado “ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE UN NUEVO PRODUCTO CÁRNICO FERMENTADO DE CERDO IBÉRICO CON COMPUESTOS NITROGENADOS BIOACTIVOS MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS Y LA ENZIMA EPg222” presentada por la Lda. Dña. Margarita Fernández García ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctor.

Lo que firma en Badajoz a martes, 3 de Noviembre de 2015.

Fdo: Alberto Martín González

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis Doctoral realizado en la Universidad de Extremadura es un esfuerzo en el cuál, directa o indirectamente, han participado distintas personas opinando, corrigiendo, dando ánimo, teniendo paciencia y acompañándome en los momentos de crisis y de felicidad. Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas a las que deseo agradecer en este apartado.

Para empezar, quiero agradecer a la Fundación Fernando Valhondo Calaff de Cáceres, la concesión de la beca para la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Universidad de Extremadura, Escuela de Ingenierías Agrarias, en especial al Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, por todos los medios e infraestructuras que me han permitido desarrollar este trabajo.

Mi especial agradecimiento a mis directores de Tesis, la Dra. María de Guía Córdoba Ramos, la Dra. María José Benito Bernáldez y el Dr. Alberto Martín González por su comprensión y dedicación. A Guía, por su ayuda y esfuerzo, y por sacar siempre un ratito para mí. A Pepa, por su interés, esfuerzo y apoyo, y por todo lo que ha aportado a este trabajo. A Alberto, por toda su ayuda, por todo lo que me ha enseñado y por sacarme siempre una sonrisa. Porque sin vosotros, este trabajo no hubiera sido posible.

A los miembros del grupo de investigación CAMIALI: al Prof. Dr. Emilio Aranda Medina por su simpatía y alegría; al Prof. Dr. Francisco Pérez Nevado por su amabilidad e interés y al Dr. Alejandro Hernández León por su apoyo y por los buenos momentos compartidos.

Al resto de compañeros con los que he pasado tantos momentos a lo largo de estos años: al Dr. Santiago Ruíz-Moyano Seco de Herrera por su enorme ayuda en este trabajo, por todas sus enseñanzas y por estar siempre dispuesto a ayudar a los demás; a la Dra. Rocío Casquete Palencia, por tantas horas de trabajo y conversación compartidas

en el laboratorio, a la Dra. María del Carmen Villalobos Rivera por su interés y compañía; y al Dr. Julio Broncano, al Dr. Alejandro Matamoros, a Vita, Nieves, Elena, M^a José, Pedro Pablo, Guti y el resto de compañeros que han pasado por el laboratorio a lo largo de todos estos años, por haber compartido conmigo la labor investigadora, por sus inestimables y desinteresadas ayudas y por tantos buenos momentos pasados.

Al PAS de la escuela, y en especial a Mariano Cabrero por estar siempre dispuesto a ayudar, por su interés y alegría contagiosa; a Juan Barneto por ayudarme siempre que lo necesitaba y por los buenos momentos de conversación; y a Cándido Cebrián, allí donde esté, por toda la ayuda que me prestó y los buenos momentos compartidos.

A todos los compañeros del Área de Tecnología de los Alimentos y Producción Animal, con quienes he compartido tantos agradables desayunos, en especial a la Prof. Dra. Lourdes Martín, a la Prof. Dra. María Luisa Timón, a la Prof. Dra. María Jesús Petró, a la Prof. Dra. Ana Isabel Andrés, a la Prof. Dra. Ana Carrapiso, a la Prof. Dra. Elena González y al Prof. Dr. Juan Florencio Tejada.

Agradecer a la Dra. Isidra Recio Sánchez, por permitirme realizar mi estancia en el Departamento de Bioactividad y Análisis de los Alimentos en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) en Madrid, así como a todos los compañeros y amigos por hacerme sentir como en casa y hacer que mi estancia fuese tan agradable y fructífera, en especial a la Dra. Francisca Bravo, por ser una de mis mejores amigas y estar siempre a mi lado; y a la Dra. María del Mar Contreras, por enseñarme tanto sobre los péptidos bioactivos.

A mis amigas, por estar siempre a mi lado, por vuestro interés, comprensión y ayuda, por escucharme cuando necesitaba desahogarme, por compartir los malos momentos y disfrutar de los buenos conmigo.

A mi familia política, en especial a Toni y Jose, por aceptarme en su familia y tratarme como a una hija, por preocuparse y estar siempre ahí, dispuestos a echar una mano.

A toda mi familia, en especial a mi padre, por no rendirse nunca con nosotros, por escucharme, guiarme, aconsejarme y apoyarme en todas mis decisiones, porque sin él no habría llegado hasta aquí. También a mis tías Tere y Lourdes, por su cariño y dedicación, por preocuparse, apoyarme y llamarme todos los días, porque a pesar de estar lejos, siempre están cerca. A mis hermanos, primos y tíos, por estar en los buenos y malos momentos, por todos los ratos que compartimos y por todos los momentos que nos quedan por compartir.

Muy especialmente quiero agradecerle a Sergio, mi marido, por estar a mi lado incondicionalmente, por hacerme mejor persona, entenderme, apoyarme, ayudarme y por ser tan paciente conmigo y con esta Tesis.

Y a Pablo, mi hijo, por ser la razón de mi vida, por llenar mis días de sonrisas, cariño e ilusión, porque desde que nació, todo es por y para él.

A todos, muchísimas gracias.

*Si no conozco una cosa,
la investigaré*
Louis Pasteur

**A los tres hombres de mi vida:
Jesús, Sergio y Pablo.**

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	15
I.1.- COMPUESTOS NITROGENADOS FUNCIONALES O BIOACTIVOS	17
I.1.1.- Producción de compuestos nitrogenados bioactivos mediante hidrólisis por enzimas digestivas	20
I.1.2.- Producción mediante la acción de enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos.....	22
I.1.3.- Actividades biológicas de los compuestos nitrogenados	25
<i>I.1.3.1.- Actividad antihipertensora</i>	26
<i>I.1.3.2.- Actividad antioxidante</i>	31
<i>I.1.3.3.- Actividad antiproliferativa o anticancerígena</i>	35
<i>I.1.3.4.- Actividad antimicrobiana</i>	39
<i>I.1.3.5.- Actividad opiácea</i>	44
<i>I.1.3.6.- Actividad antitrombótica o anticoagulante</i>	47
<i>I.1.3.7.- Actividad inmunomodulante</i>	49
<i>I.1.3.8.- Actividad quelante de metales</i>	51
<i>I.1.3.9.- Actividad hipocolesterolémica</i>	53
<i>I.1.3.10.- Otras actividades biológicas</i>	54
I.2.- ALIMENTOS CON COMPUESTOS NITROGENADOS BIOACTIVOS	55
I.2.1.-Compuestos nitrogenados de origen animal	55
<i>I.2.1.1.- Productos lácteos</i>	55
<i>I.2.1.2.- Huevos</i>	57
<i>I.2.1.3.- Pescados y mariscos</i>	58
<i>I.2.1.4.- Carne y productos cárnicos</i>	59
I.2.2.- Compuestos nitrogenados de origen vegetal.....	60
I.3.- PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS	62
I.3.1.- Definición y características de los productos cárnicos fermentados	62
I.3.2.- Proceso de elaboración de los productos cárnicos fermentados .	65
I.3.3.- Composición proteica de la carne como materia prima.....	70

I.3.4.- Cambios bioquímicos en los compuestos nitrogenados durante el procesado.....	73
I.3.4.1.- Cambios en las proteínas	74
I.3.4.2.- Cambios en los compuestos nitrogenados no proteicos	75
I.3.5.- Papel de la adición de cultivos iniciadores seleccionados durante el procesado de los productos cárnicos fermentados.....	81
I.3.5.1.- Importancia del empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos fermentados.....	82
I.3.5.2.- Microorganismos que componen los cultivos iniciadores.....	83
I.3.5.2.1.- Bacterias ácido lácticas	85
I.3.5.2.2.- Micrococaceae y Staphylococaceae	87
I.3.5.2.3.- Mohos	88
I.3.5.2.4.- Levaduras	89
I.3.6.- Papel de las enzimas en procesado de los productos cárnicos fermentados	89
I.3.6.1.- Ablandamiento	90
I.3.6.2.- Aceleradores de la maduración y potenciadores del sabor y aroma	91
 II. OBJETIVOS	 94
 III. MATERIAL Y MÉTODOS	 98
III.1.- MATERIAL GENERAL	100
III.1.1.- Reactivos químicos y medios de cultivo	100
III.1.2.- Instrumental.....	100
III.2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	103
III.2.1.- Material biológico	103
III.2.2.- Métodos	105
III.2.2.1.- Elaboración de embutidos y toma de muestras	105
III.2.2.1.1.- Industria 1: chorizos y salchichones	105
III.2.2.1.2.- Industria 2: ensayo con la proteasa EPg222 en salchichones	107

<i>III.2.2.2.- Análisis físico-químicos</i>	109
<i>III.2.2.2.1.- Humedad</i>	109
<i>III.2.2.2.2.- Actividad de agua</i>	110
<i>III.2.2.2.1.- Determinación del pH</i>	110
<i>III.2.2.3.- Determinaciones microbiológicas</i>	110
<i>III.2.2.3.1.- Preparación de las muestras para el análisis microbiológico</i>	110
<i>III.2.2.3.2.- Recuentos microbiológicos</i>	110
<i>III.2.2.4.- Determinación del nitrógeno no proteico y aminoacídico</i>	112
<i>III.2.2.4.1.- Preparación del extracto</i>	112
<i>III.2.2.4.2.- Cuantificación del nitrógeno no proteico (NNP)</i>	112
<i>III.2.2.4.2.- Cuantificación del nitrógeno aminoacídico (NA)</i>	113
<i>III.2.2.5.- Preparación de los extractos peptídicos</i>	114
<i>III.2.2.5.1.- Extracción con ácido perclórico</i>	114
<i>III.2.2.5.2.- Ultrafiltración</i>	114
<i>III.2.2.5.3.- Liofilización</i>	114
<i>III.2.2.6.- Determinación de la concentración en los extractos peptídicos</i>	115
III.3.- ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS EXTRACTOS	116
III.3.1.- Actividad antihipertensora. Inhibición de la enzima convertora de la angiotensina I (IECA)	116
III.3.2.- Actividad antioxidante. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)	118
III.3.3.- Actividad antiproliferativa	119
III.3.4.- Actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas	121
III.4.- SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL ..	122
III.5.- CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTOMETRÍA DE MASAS (HPLC-ESI-MS)	123

III.6.- ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	124
IV. RESULTADOS	126
IV.1.- Influence of starter cultures on the generation of antioxidant nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausages	128
IV.2.- Influence of starter culture and protease on the generation of ACE-inhibitory and antioxidant bioactive nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausages	140
IV.3.- Influence of starter cultures on the generation of healthy nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausages	179
IV.4.- Potential antimicrobial and antiproliferative activities of autochthonous starter cultures in dry-fermented sausages	222
V. DISCUSIÓN	260
V.1.- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LOS EMBUTIDOS ELABORADOS	262
V.1.1.- Humedad	262
V.1.2.- Actividad de agua	262
V.1.3.- pH	262
V.2.- DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS	264
V.2.1.- Recuento de bacterias ácido lácticas	264
V.2.2.- Recuento de cocos gram + catalasa +.....	265
V.3.- DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO NO PROTEICO (NNP) Y AMINOACÍDICO (NA)	267
V.3.1.- Cuantificación del nitrógeno no proteico (NNP).....	267
V.3.2.- Cuantificación del nitrógeno aminoacídico (NA)	268
V.4.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS	269
V.5.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERSORA DE LA ANGIOTENSINA I (IECA)	277
V.6.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES DE OXÍGENO (ORAC)	284

V.7.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA	290
V.8.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS	294
V.9.- IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS MEDIANTE HPLC-ESI-MS	302
VI. CONCLUSIONES	314
VII. BIBLIOGRAFÍA	320
VIII. RESUMEN	382
IX. ANEXOS	388

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- COMPUESTOS NITROGENADOS FUNCIONALES O BIOACTIVOS

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen numerosas e importantes funciones dentro del organismo que van desde su papel catalítico (enzimas) hasta su función en la motilidad corporal (actina, miosina), pasando por su papel mecánico (elastina, colágeno), de transporte y almacén (hemoglobina, mioglobina, citocromos), protección (anticuerpos), reguladora (hormonas), etc. (Gil, 2005).

Desde el punto de vista nutricional la proteína es un macronutriente presente en los alimentos. La importancia de la proteína presente en la dieta se debe a su capacidad de aportar aminoácidos para atender al mantenimiento de la proteína corporal y al incremento de esta durante el crecimiento. La calidad nutricional de una proteína (o una fuente proteica) se define como la capacidad de esa fuente proteica para cubrir los requerimientos de nitrógeno y aminoácidos de un determinado individuo. Existen numerosos factores que afectan a la calidad proteica. Factores íntrosos como la propia fuente proteica, el tipo de procesado al que ha sido sometida, la forma de almacenamiento y la presencia de factores antinutricionales que forman parte del alimento que la contiene como inhibidores de la tripsina, taninos, filatos y glucosinolatos (Gilani y col., 2005; Meade y col., 2005). Y factores extrínsecos que hacen referencia al procesado de alimentos ya que estos tratamientos afectan a la funcionalidad de la proteína modificando su estado físico, hidrolizándola en pequeños péptidos o modificando los aminoácidos que la componen.

Además de su valor nutricional por ser fuente de aminoácidos, las proteínas y péptidos pueden ejercer efectos biológicos específicos y en este caso se denominan proteína funcionales y péptidos bioactivos (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Korhonen y Pihlanto, 2003). Estos péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (Meisel, 1998). Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 2 a 20 aminoácidos, cuya bioactividad intrínseca permanece latente hasta que son liberadas de

las proteínas intactas. La mayoría de los péptidos bioactivos son generados espontáneamente durante la digestión gastrointestinal *in vivo* a partir de las proteínas que los contienen. Aunque también pueden ser liberados durante el procesado industrial de los alimentos (Shahidi y Zhong, 2008; Pihlanto-Leppälä, 2000). En los últimos años, debido a la gran relevancia que estos péptidos han obtenido en el mercado, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos compuestos nitrogenados bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante hidrólisis *in vitro* empleando enzimas digestivas, predominantemente pepsina, tripsina y quimiotripsina (Wijesekara y col., 2011; Contreras y col., 2009); utilizando microorganismos proteolíticos (Papadimitriou y col., 2007); o a través de la acción de enzimas proteolíticas de origen vegetal o microbiano (Meisel, 2004).

En la actualidad, las proteínas alimentarias se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de compuestos nitrogenados con el fin de mejorar una función biológica o de tratar de prevenir o reducir el riesgo de enfermedad (Korhonen, 2002), ya que toda fuente de proteínas alimentarias es susceptible de aportar compuestos funcionales. De esta manera, proteínas de distinta procedencia (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de compuestos nitrogenados a partir de hidrolizados enzimáticos (Dziuba y col., 2005; Korhonen y Pihlanto, 2003; Pihlanto y Korhonen, 2003), siendo interesante destacar que dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usado y de las condiciones de procesado, la actividad biológica de los compuestos obtenidos es distinta (Wang y González, 2005). Mullally y col., (1997b) han descrito como determinante en la formación de compuestos bioactivos, la especificidad de las enzimas en mayor medida que el grado de hidrólisis.

Así pues, las características nutricionales de una proteína determinada no se limitarían solo al aporte de nitrógeno y energía que representan, así como a los contenidos de aminoácidos esenciales, sino también habría que considerar la actividad de los compuestos nitrogenados bioactivos que pueden ser liberados de estas proteínas durante la elaboración o procesado del alimento, o la digestión gastrointestinal, ejerciendo diversas funciones metabólicas beneficiosas para el organismo.

La literatura científica evidencia que los compuestos bioactivos pueden ejercer su acción tanto a nivel local (tracto gastrointestinal) como sistémico, principalmente los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Meisel, 2004; Vermeirssen y col., 2004; Korhonen y Pihlanto, 2003; FitzGerald y Meisel, 2000; Teschemacher y col., 1997), ya que pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea (Vermeirssen y col., 2004; Teschemacher y col., 1997). Así, varios péptidos y proteínas han sido propuestos para el tratamiento de enfermedades dentales, de la malabsorción de minerales, de la diarrea, de la hipertensión, de la trombosis, o de inmunodeficiencias (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Meisel, 2004; Vermeirssen y col., 2004; Korhonen y Pihlanto, 2003; Teschemacher y col., 1997).

Algunos de los efectos beneficiosos de estos compuestos se resumen en la Tabla I.1.

Tabla I.1. Compuestos bioactivos y sus efectos saludables (Vioque y Millán, 2005)

Péptidos	Efecto beneficioso
Opioides	Regulan el tránsito intestinal Mejoran la digestión y la absorción
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Quelantes de metales	Mejoran la absorción de minerales y metales
Antitrombóticos	Reducen los riesgos de padecer trombos
Antihipertensores	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antiproliferativa	Reducen el crecimiento de células cancerígenas

Los compuestos bioactivos han sido encontrados principalmente en las proteínas de la leche y en derivados de esta como el queso o el yogurt, así como en la ovoalbúmina de huevo (Korhonen y Pihlanto, 2003) y la soja, siendo estas tres las fuentes de proteínas funcionales y péptidos bioactivos más estudiadas hasta la fecha. Pero también se ha observado su existencia en otras proteínas vegetales y animales.

Entre las proteínas de origen vegetal de las que se han aislado compuestos nitrogenados bioactivos encontramos las proteínas de trigo, de maíz, de arroz, de cebada y de girasol (Wang y González, 2005). En cuanto a las proteínas de origen animal, se han identificado estos compuestos en la carne (Korhonen y Pihlanto, 2003), en el músculo de pescado (sardina, atún, bonito) (Yamamoto y col., 2003) y en la jalea real (Matsui y col., 2002), entre otros.

I.1.1.- PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS BIOACTIVOS MEDIANTE HIDRÓLISIS POR ENZIMAS DIGESTIVAS

La manera más común de producirse compuestos nitrogenados bioactivos es a través de la hidrólisis enzimática de las moléculas de proteínas enteras. Para ello, se han empleado las enzimas responsables de la digestión gastrointestinal, como la pepsina del estómago y la tripsina y quimotripsina pancreáticas, simulando las condiciones fisiológicas del organismo en la liberación de compuestos con actividad biológica.

La enzima gástrica pepsina, rompe los enlaces peptídicos X-Y, en los que X es un aminoácido hidrofóbico (Phe o Leu) y ambos aminoácidos no pueden ser Val, Ala o Gly. La mayoría de los estudios que se han realizado sobre la producción de compuestos nitrogenados bioactivos con enzimas digestivas se han llevado a cabo en proteínas lácteas. Así se observó que la β -lactoglobulina bovina contiene muchos enlaces teóricamente susceptibles a la pepsina. Sin embargo, es resistente a la acción de dicha enzima (Reddy y col., 1988) debido a la estructura compacta de la proteína que oculta los aminoácidos hidrofóbicos susceptibles a la hidrólisis (Papiz y col., 1986; Brownlow y col., 1997). Por ello, se ha detectado mediante estudios *in vivo* la presencia de esta proteína intacta en el estómago (Yvon y col., 1984). Por el contrario, la α -lactoglobulina es sensible a la acción de la pepsina (Schmidt y Van Marwijk, 1993) pero se requieren tiempos superiores a las tres horas para que se produzca la liberación de péptidos inhibidores de la ECA (Pihlanto-Leppälä, 2000). La pepsina también ha sido utilizada para la obtención de compuestos nitrogenados bioactivos en proteínas animales. Nalinanon y col., (2011) hidrolizaron proteína del pescado dorada Threadfin

(*Nemipterus hexodon*) con pepsina, obteniendo hidrolizados de proteínas con actividad antioxidante.

La tripsina es una enzima pancreática liberada al intestino donde hidroliza los enlaces peptídicos en los cuales el grupo carbonilo es cedido por la Lys o la Arg (Lehninger, 1991). Los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina-I y los fosfopéptidos quelantes de calcio (CPPs), son los que se producen más comúnmente por acción de la tripsina (FitzGerald y col., 2004; Meisel y FitzGerald, 2003; Vermeirssen y col., 2004; Yamamoto y col., 2003). Además, es la enzima más empleada para la hidrólisis de las caseínas, encaminada a la formación de péptidos inhibidores de la ECA (Maruyama y col., 1985, 1987a y b). Las casoquininas engloban un conjunto de péptidos liberados tras la acción de la tripsina sobre la α_{s1} -caseína y la β -caseína (Ariyoshi, 1993).

La quimotripsina es otra enzima pancreática que, a nivel del intestino delgado, hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas alimentarias en los que el grupo carbonilo es aportado por un aminoácido aromático.

La combinación de las tres enzimas digestivas, pepsina, tripsina y quimotripsina ha permitido la liberación de péptidos de pequeño tamaño y con actividad inhibitoria de la ECA (Pihlanto-Leppälä, 2000).

Otras enzimas digestivas y diferentes combinaciones de proteasas, incluyendo pepsina, quimiotripsina, pancreatina, alcalasas y termolisina, así como enzimas bacterianas y fúngicas, han sido también utilizadas para generar compuestos nitrogenados bioactivos a partir de diversos tipos de proteínas (Kilara y Panyam, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2003). Actualmente, Ko y col. (2013) han descubierto dos nuevos péptidos con potencial antioxidante a partir de preparados de músculo del pez platija (*Paralichthys olivaceus*) hidrolizados con proteasas digestivas como pepsina, tripsina, quimiotripsina y papaína, entre otras.

I.1.2.- PRODUCCIÓN MEDIANTE LA ACCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DERIVADAS DE MICROORGANISMOS

Las enzimas microbianas han sido incorporadas de manera satisfactoria en la obtención de compuestos nitrogenados bioactivos. Así, el empleo de las enzimas procedentes de bacterias lácticas, como *Lactobacillus helveticus*, ha permitido la obtención de péptidos inhibidores de la ACE derivados de las caseínas. Yamamoto y col. (1994) relataron que caseínas hidrolizadas con proteinasas asociadas a las membranas celulares de *Lb. helveticus* CP790 mostraban actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Maeno y col. (1996) hidrolizaron caseínas utilizando la misma proteinasa e identificaron el péptido antihipertensivo Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln derivado de la β -caseína. En un estudio más reciente, Mizuno y col. (2004) midieron la actividad inhibidora de la ECA en hidrolizados de caseína tras el tratamiento con nueve enzimas proteolíticas comerciales diferentes. Entre estas enzimas, una proteasa aislada de *Aspergillus oryzae* mostró la mayor actividad inhibidora de la ECA *in vitro*. El péptido de *A. oryzae* tuvo un efecto antihipertensor dosis-dependiente en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

En el caso de las proteínas de suero, la hidrolisis se ha llevado a cabo con enzimas microbianas de distinto origen, fundamentalmente la proteinasa K y la termolisina. Los hidrolizados obtenidos tras la acción de estas enzimas sobre concentrados de proteínas de suero presentan porcentajes de inhibición de la ACE superiores al 95% (Saito y col., 1997).

La proteinasa K, procedente del *Tritirachium album*, rompe los enlaces XY, en los que Y es un aminoácido aromático o hidrofóbico. Hidroliza rápidamente la α -La y la β -Lg (Schmidt y Poll, 1991). Abubakar y col., (1998) han aislado, a partir del hidrolizado de un suero de quesería con proteinasa K el péptido IPA, correspondiente al fragmento f(78-80) de la β -Lg, que presentó un valor de IC₅₀ de 141 μ M.

La termolisina, que procede de la bacteria *Bacillus thermoproteolyticus*, rompe los enlaces X-Y, en los que X es Leu, Phe, Ile, Val, Met o Ala e Y no debe ser Pro. Hidroliza lentamente las dos proteínas de suero mayoritarias. Sin embargo, se ha

descrito la liberación de péptidos de pequeño tamaño en los primeros veinte minutos de incubación de estas seroproteínas con dicha enzima (Schmidt y Poll., 1991).

La tabla I.2 muestra una lista de estudios experimentales en la liberación de compuestos nitrogenados bioactivos sobre la fermentación de la leche usando enzimas diferentes microorganismos vivos proteolíticos y enzimas proteolíticas derivadas de tales microorganismos.

Tabla I.2. Ejemplos de péptidos bioactivos liberados de proteínas de la leche por la acción hidrolítica de microorganismos y enzimas bacterianas (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Microorganismos usados	Proteína precursora ¹	Secuencia peptídica	Bioactividad	Referencia
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	β -CN, κ -CN	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	Inhibidores ECA Antihipertensores	Nakamura y col. (1995a) Nakamura y col. (1995b)
Enzimas de <i>Lactobacillus</i> GG con pepsina y tripsina	β -CN, α_{s1} -CN	Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	Opioides, Inhibidores ECA Inmunomoduladores	Rokka y col. (1997)
Proteinasa de <i>Lb. helveticus</i> CP90	β -CN	Lys-Val-leu-Pro-val-Pro-(Glu)	Inhibidores ECA	Maeno y col. (1996)
<i>Lb. helveticus</i> CPN4	Proteínas del suero	Tyr-Pro	Inhibidores ECA	Yamamoto y col. (1999)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> SS1 – <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i> FT4	β -CN, κ -CN	Varias secuencias	Inhibidores ECA	Gobetti y col. (2000)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> IFO13953	κ -CN	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met	Antioxidante	Kudoh y col. (2001)
<i>Lb. rhamnosus</i> + digestion con pepsin y Corolasa PP	β -CN	Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe, Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu, Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys	Inhibidores ECA	Hernández-Ledesma y col. (2004)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	β -CN	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile	Antioxidante Inhibidores ECA	Ashar y Chand (2004)
<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	β -CN	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	Inhibidores ECA	Ashar y Chand (2004)
Extracto libre de células de <i>Lb. helveticus</i> ICM 1004	Hidrolizado de leche desnatada	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	Inhibidores ECA	Pan y col (2004)

¹ Abreviaturas: CN = caseína; ACE = Enzima convertora de la angiotensina I

Numerosos cultivos iniciadores utilizados industrialmente son altamente proteolíticos. Los compuestos nitrogenados bioactivos pueden, de este modo, ser

generados por las bacterias usadas en la fabricación y fermentación de los alimentos. El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas (BAL), por ejemplo *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, está bien caracterizado. Este sistema consiste en una proteinasa de membrana y en un número de peptidasas intracelulares distintas, incluyendo endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas y dipeptidasas (Christensen y col., 1999). El hecho de que la actividad de estas peptidasas se vea afectada por las condiciones de crecimiento hace posible manipular la formación de péptidos hasta una extensión conocida (Williams y col., 2002).

Numerosos artículos y capítulos de libros han revisado la liberación de péptidos antihipertensores e inhibidores de la ECA, inmunomoduladores, antioxidantes y antimicrobianos a partir de las proteínas de la leche a través de la proteólisis microbiana (Gobetti y col., 2002; Gobetti y col., 2004; Korhonen y Pihlanto-Lepälä, 2001, 2004; Matar y col., 2003).

Lactobacillus helveticus es ampliamente usado como cultivo iniciador lácteo en la fabricación tradicional de productos lácteos. Los péptidos inhibidores de la ECA mejor conocidos derivados de proteínas lácteas, Val-Pro-Pro (VPP) y Ile-Pro-Pro (IPP), han sido identificados en leche fermentada con cepas de *Lb. helveticus* (Nakamura y col., 1995a; Sipola y col., 2002). Pihlanto-Leppälä y col., (1998) estudiaron la formación potencial de péptidos inhibidores de la ECA en suero de leche y caseínas durante la fermentación del queso con varios cultivos iniciadores utilizados en la fabricación del yogurt, leche coagulada y leche cortada. No se observó actividad inhibidora de la ECA en estos hidrolizados. Tras la digestión de esas muestras con pepsina y tripsina se produjo la liberación de varios péptidos altamente inhibidores de la ECA. Gobetti y col., (2000) demostraron la formación de péptidos inhibidores de la ECA con dos cepas de quesería, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, tras la fermentación de leche con cada una de las cepas por separado durante 72 horas. Yamamoto y col. (1999) identificaron un dipéptidos inhibidor de la ECA (Tyr-Pro) de un yogurt fermentado con la cepa de *Lb. helveticus* CPN4. Esta secuencia de péptido está presente en gran fracción de las caseínas, y se encontró que su concentración aumentaba durante la fermentación. Más recientemente, Ashar y Chand

(2004) identificaron un péptido inhibidor de la ECA de leche fermentada con *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. El péptido mostraba la secuencia Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile de la β -caseína. En combinación con *Streptococcus thermophilus* y *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, se obtuvo una estructura peptídica con la secuencia Ser-Lys-Val-Tyr-Pro. Ambos péptidos eran estables a la digestión por enzimas, a los pH ácidos y alcalinos, así como al almacenamiento a 5°C y 10°C durante 4 días.

Matar y col. (2001) alimentaron con leche fermentada con una cepa de *Lb. helveticus* a ratones durante 3 días y detectaron un aumento significativo de las células secretoras de IGA en la mucosa intestinal, comparados con ratones controles alimentados con una leche similar incubada con una variedad no proteolítica de la misma cepa. El efecto inmunomodulador de la leche fermentada fue atribuido a los péptidos liberados de la fracción de las caseínas. Estos resultados sugieren que las BAL pueden modular las propiedades inmunológicas de las proteínas de la leche antes o después de la ingestión oral del producto. Dicha modulación puede ser beneficiosa, por ejemplo, en la bajada de las reacciones de hipersensibilidad a la ingesta de proteínas en pacientes con alergias a las proteínas de los alimentos.

I.1.3.- ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS

Durante ésta última década, ha crecido mucho el interés científico y comercial en la identificación de secuencias de péptidos derivadas de los alimentos (Korhonen, 2009; Pritchard y col., 2010). Entre los péptidos bioactivos más estudiados se encuentran: péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), péptidos opiáceos, péptidos antimicrobianos, péptidos antioxidantes, péptidos inmunomoduladores, y péptidos anticoagulantes (FitzGerald y col., 2004; Gómez-Ruiz y col., 2002, 2004; Lignitto y col., 2010; López-Expósito y col., 2008; López-Fandiño y col., 2006; Pihlanto-Lepäla, 2006; Yamamoto y col., 2003). Además, en los últimos años se han descrito péptidos bioactivos con actividad anticancerígena (Hsu y col., 2011; Picot y col., 2006) e hipocolesterolemica (Zhong y col., 2007a, b).

I.1.3.1.- Actividad Antihipertensora

La hipertensión es la principal causa de enfermedad en los países industrializados. El 35% de la mortalidad en estos países se debe a esta enfermedad o a alguna de sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales. Debido a esto, se ha producido un creciente interés en los péptidos antihipertensivos y en su capacidad bajando la presión de la sangre ya que se ha demostrado que estos péptidos son muy efectivos en la prevención y tratamiento de la hipertensión.

La hipertensión arterial es un proceso multifactorial, por lo que los péptidos con actividad antihipertensiva pueden actuar de formas muy diversas, siendo la principal la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), la cual juega un importante papel en la regulación de la presión sanguínea y en la homeostasis de los electrolitos. La ECA es una dipeptidil carboxipeptidasa no específica que convierte el decapeptido angiotensina I en el octapéptido angiotensina II, el cual es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora. Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por tanto, el incremento de la presión arterial, ya que estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la excreción de potasio y la retención de sodio y agua y provoca el incremento del volumen extracelular, y la neutralización de la producción de renina. La renina libera el decapeptido angiotensina I del sistema renina-angiotensina. Este sistema es, quizás, el más importante de los diferentes mecanismos vasoconstrictores y vasodilatadores implicados en la regulación de la presión sanguínea (Ondetti y Cushman, 1982) (Figura I.1.).

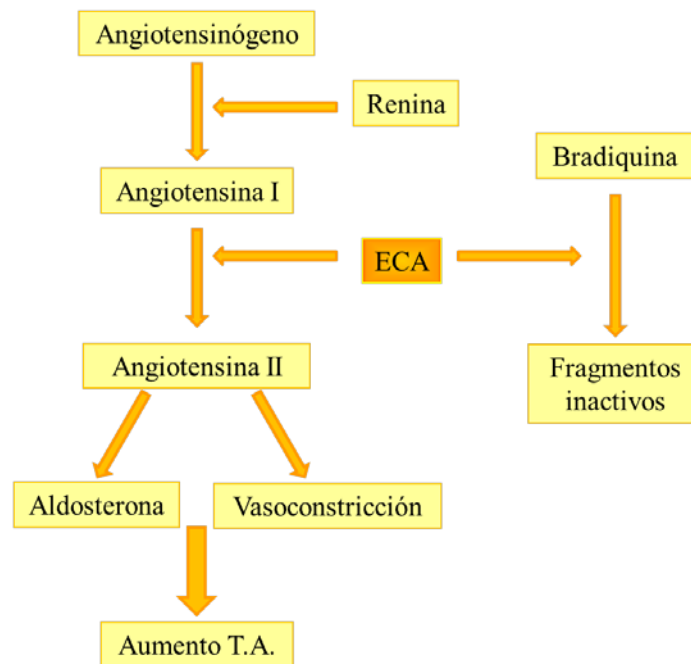


Figura I.1. Sistema renina-angiotensina-bradiquina

Por otro lado, la ECA también degrada al péptido bradiquinina que es un potente vasodilatador, lo cual conduce a un incremento de la presión arterial.

Los inhibidores de la ECA pueden disminuir la actividad de la ECA e indirectamente reducir los niveles de angiotensina II, ejerciendo de esta manera un efecto vasodilatador en los vasos sanguíneos. Estudios clínicos han revelado que los inhibidores de la ECA reducen significativamente la mortalidad de pacientes con infarto de miocardio o insuficiencia cardiaca (Daemon y col., 1991; Geisterfer y col., 1988).

Se han buscado inhibidores competitivos exógenos de esta enzima a partir de distintas fuentes que engloban tanto al reino vegetal como al reino animal (pescado, maíz, gelatina, veneno de serpiente, vino, etc.). Dependiendo del tipo de inhibidor, se puede producir inhibición competitiva o no competitiva (Hernández-Ledesma y col., 2005). Los inhibidores competitivos compiten con el sustrato por el centro activo de la enzima. En este caso, el aumento en la concentración del sustrato da lugar a una disminución de la capacidad del inhibidor para competir con éste. Por otra parte, los inhibidores no competitivos se unen a la enzima en una zona diferente al centro activo,

deformándolo, de manera que impide el enlace con el sustrato, siendo este tipo de inhibición independiente de la concentración de sustrato.

Compuestos nitrogenados con actividad inhibidora de la ECA han sido identificados de un gran rango de proteínas de alimentos diferentes fuentes vegetales y animales.

Dentro del reino animal, las proteínas más estudiadas como fuente de péptidos inhibidores de la ECA son las proteínas lácteas, principalmente caseínas, tanto bovinas (Maruyama y Suzuki, 1982; Maruyama y col., 1987a) como humanas (Kohmura y col., 1989). Maruyama y Suzuki (1982) fueron los primeros en aislar un péptido inhibidor de la ECA a partir de un hidrolizado de caseína. Posteriormente, otros péptidos inhibidores de la ECA se han aislado de diferentes productos lácteos, sobre todo de productos lácteos fermentados. Yamamoto y col. (1994) han demostrado que las leches fermentadas con *L. helveticus* son las que más actividad inhibitoria de la ECA presentan, debido a la alta actividad proteolítica extracelular de esta cepa. Otros péptidos con actividades inhibitoras se han identificado en leches fermentadas por *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* o *Lactobacillus lactis* sp. *cremoris* (Gobetti y col., 2000) y en el kéfir, una leche fermentada preparada a partir de un caldo de cultivo que incluye bacterias acidolácticas, una cepa de *Saccharomyces kefir* y algunas especies bacterias acéticas (Kuwabara y col., 1995). Actualmente, Li y col., (2015) han identificado nuevos péptidos con efecto inhibidor de la ECA a partir de leche fermentada con la levadura *Kluyveromyces marxianus*.

Se ha encontrado que péptidos derivados de la β -caseína, la segunda proteína más abundante de la leche, tiene actividad inhibidora de la ECA (Abubakar y col., 1998; Gobetti y col., 2002; Maeno y col., 1996). Los tripéptidos Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro, conjuntamente denominados lactotripéptidos, son efectivos inhibidores de la ECA que redujeron la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Nakamura y col., 1995b). Otros tripéptidos y algunos péptidos de secuencias más largas, incluidos Tyr-Gln-Glu-Pro, Val-Pro-Lys-Val-Lys, Pro-Leu-Pro-Leu-Leu, His-Leu-Pro-Leu-Pro, y Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro obtenidos de la β -caseína, Arg-Pro-Lys y Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His de la α_{s1} -caseína, así como Pro-Pro-Glu-Ile-Asp de la κ -

caseína han sido citados por mostrar actividad inhibidora de la ECA (Hernández-Ledesma y col., 2007a; Mao y col., 2007; Silva y col., 2006).

Péptidos inhibidores de la ECA se han encontrado también en proteínas del suero, en particular de la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina, demostrando una gran potencial de inhibición de la ECA (Chatterton y col., 2006; Hernández-Ledesma y col., 2007b).

Los estudios llevados a cabo en quesos han demostrado una fuerte actividad inhibitoria de la ECA observada después de un proceso de digestión proteásica (Saito y col., 2000). La proteólisis que tiene lugar durante la maduración de los quesos podría aumentar la tasa de actividad inhibitoria de la ECA a un cierto nivel, más allá del cual esta actividad inhibitoria disminuye (Smacchi y Gobeti, 2000) debido a que los péptidos bioactivos se transforman en moléculas inactivas y aminoácidos (Ryhänen y col., 2001). El momento óptimo de maduración para la producción de péptidos bioactivos es distinto para cada tipo de queso. Como ejemplo, podríamos hablar de 8 meses para un queso tipo manchego (FitzGerald y col., 2004). De este modo, se han identificado distintos péptidos inhibidores de la ECA en distintos tipos de queso (Ong y Shah, 2008; Ong y col., 2008) y en hidrolizados de los mismos (Corrêa y col., 2014).

Péptidos con actividad inhibidora de la ECA también han sido aislados de otros productos lácteos como el yogurt (Donkor y col., 2007; Papaimitriou y col., 2007).

Además de las proteínas de la leche, otras fuentes de péptidos antihipertensivos han sido estudiadas. Dentro del reino animal, la actividad inhibitoria de la ECA se ha determinado en las proteínas del huevo, principalmente la ovoalbúmina (Miguel y Aleixandre, 2006; Quirós y col., 2007), aunque también la ovotransferrina (Majumder y col., 2015); proteínas de la carne (Arihara, 2006), hemoglobina bovina (Qi y col., 2007), gelatina bovina (Kim y col., 2001a) y jamón curado (Escudero y col., 2012a, b, 2013b); y músculo de sardina (Matsufuji y col., 1994), de bonito (Fujita y col., 1995), de atún (Astawan y col., 1995) o de sepia (Balti y col., 2015).

También se han encontrado péptidos inhibidores de la ECA en muchas fuentes vegetales, como la semilla de soja (Chen y col., 2003, 2004; Korhonen y Pihlanto, 2003), proteínas de trigo sarracero (Ma y col., 2006), sésamo (Nakano y col., 2006), brócoli (Bachiega y col., 2016; Lee y col., 2006), huesos de ciruela (González-García y col., 2015), proteínas de arroz transgénico (Yang y col., 2006), garbanzo (Yustm y col., 2003), e incluso algas marinas (Suetsuna y Chen, 2001).

Aunque se originen de diferentes fuentes, estos péptidos inhibidores de la ECA parecen tener en común una propiedad estructural, la presencia de residuos aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o con el extremo de la cadena ramificado) como los tres aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Muchos de los compuestos nitrogenados inhibidores de la ECA documentados son normalmente péptidos cortos con un residuo de prolina en el extremo carboxilo terminal. Además se sabe que la prolina es resistente a la degradación por las enzimas digestivas y puede pasar desde el intestino hasta la circulación sanguínea (Yamamoto y col., 2003). La ECA parece preferir los enlaces de los sustratos o los inhibidores competitivos que contienen aminoácidos hidrofóbicos en el tripéptido carboxiloterminale (Vermeirssen y col., 2004). Sin embargo, la lisina o arginina en el extremo carboxilo con carga positiva también parece contribuir a la actividad inhibidora de los péptidos, lo cual sugiere una posible interacción entre el inhibidor y el sitio de enlace aniónico de la ECA.

El potencial efecto hipotensivo de los péptidos inhibidores de la ECA depende de su capacidad para alcanzar intactos los órganos donde van a realizar su función. Como ya se ha comentado, son muchos los estudios realizados en los que se evalúa la actividad IECA de estos péptidos, pero es difícil establecer una relación directa entre la capacidad de inhibir la ECA *in vitro* y la actividad antihipertensiva *in vivo*. El estudio de la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos es fundamental a la hora de diseñar alimentos funcionales con propiedades fisiológicas (Shimizu, 2004). Se sabe que dipéptidos y tripéptidos pueden transportarse a través de la mucosa intestinal, aunque también hay evidencias de que péptidos de mayor tamaño pueden absorberse en el intestino delgado (Chabance y col., 1998). Se ha demostrado, por tanto, que algunos péptidos con actividad IECA y antihipertensiva son capaces de absorberse en el tracto gastrointestinal acumulándose en diversos órganos, por lo que podrían ejercer su

mecanismo de acción sistémicamente (Matsui y col., 2002). Sin embargo, se postula que determinados péptidos antihipertensivos podrían no absorberse en el tracto intestinal, ejerciendo una función directa en el lumen intestinal, o bien podrían ejercer su función mediante la interacción con receptores que se encuentran en la pared del intestino. Una vez absorbidos, el elevado número de peptidasas que se encuentran en la sangre hace que el tiempo durante el que ciertos péptidos permanecen estables en el plasma sea muy corto. Sin embargo, existen algunas evidencias de que péptidos con actividad IECA pueden absorberse en el tracto digestivo y ser transportados por el torrente circulatorio sin ser hidrolizados por las proteasas sanguíneas (Vermeirssen y col., 2004).

Otra de las enzimas involucradas en la regulación de la presión arterial es la enzima convertidora de endotelina (ECE). Esta enzima cataliza la formación de endotelina-I a partir de su precursor (Ynagisawa y col., 1988). La endotelina-I es un potente vasoconstrictor, lo que favorece el incremento de la presión arterial; por lo tanto, la inhibición de la ECE produce un efecto antihipertensivo. Se han descrito péptidos inhibidores de esta enzima a partir de un hidrolizado digestivo del bonito (Okitsu y col., 1995), y más actualmente Fernández-Musoles y col. (2010, 2013) han identificado péptidos derivados de la lactoferricina B y de hidrolizados de lactoferrina con dicha actividad.

Algunos autores han encontrado que, en productos fermentados, péptidos con actividad inhibitoria de la ECA podrían, también, presentar actividad antioxidante, sugiriendo la presencia de actividad multifuncional en estos compuestos (Bachiega y col., 2016; González-García y col., 2015; Mirzaeis y col., 2015; Silva y col., 2006).

I.1.3.2.- Actividad Antioxidante

Los radicales libres (compuestos oxidantes) son moléculas que están en continua formación en las células pudiendo generar daños en proteínas, lípidos o ADN, y que son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo. Sin embargo, existen factores que producen un desequilibrio en el número de radicales libres, y un exceso de éstos puede dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo

de enfermedades (Bray, 2000). Además, en los alimentos, el daño oxidativo también tiene una gran importancia pudiendo afectar a su calidad nutricional y funcional. Los compuestos antioxidantes pueden limitar este daño oxidativo, tanto en alimentos (usándolos como antioxidantes naturales), como proteger frente a la oxidación a las células del organismo cuando sean ingeridos en la dieta. Estos compuestos actúan impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente de membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venéreo, 2002).

Las proteínas digeridas tienen varias actividades antioxidantes dependiendo de la estructura del péptido, su tamaño y su secuencia de aminoácidos, lo cual viene determinado por la fuente de proteína y las condiciones del proceso de hidrólisis involucrado. Los péptidos de soja, por ejemplo, obtenidos por la acción de diferentes enzimas, como pepsina, papaína, quimotripsina, alcalasa, entre otras, dan lugar a diferentes grados de hidrólisis, que van desde el 1,7 al 20,6% con una actividad antioxidante que va desde el 28 al 65% medida como la inhibición contra la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Peña-Ramos y Xiong, 2002). Chen y col. (1995) identificaron 6 péptidos antioxidantes de la digestión proteolítica de proteínas de la semilla de soja, y encontraron que los péptidos estaban compuestos por 6-15 residuos de aminoácidos, con aminoácidos hidrofóbicos, valina o leucina, en la posición amino terminal y prolina, histidina o tirosina dentro de la secuencia. En cuanto a la comparación de la capacidad antioxidante de 28 péptidos pequeños procedentes de hidrolizados de proteínas de soja, estructuralmente relacionados con la secuencia Leu-Leu-Pro-His-His, se encontró que el tripéptido Pro-His-His era el centro activo responsable de la actividad antioxidante (Chen y col., 1996). Posteriormente, se creyó que los péptidos que contienen histidina pueden actuar como secuestradores del radical hidroxilo, contribuyendo a la actividad antioxidante del hidrolizado proteico (Chen y col., 1996).

Proteínas de muchas fuentes naturales y subproductos industriales han sido investigados en la producción de hidrolizados de proteínas con potencial antioxidante (Tabla 3).

Tabla I.3. Péptidos bioactivos derivados de alimentos y sus actividades antioxidantes (Shahidi y Zhong, 2008)

Péptidos	Actividad antioxidante	Referencia
Péptidos de soja	Inhibición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) Inhibición de la oxidación de liposomas	Peña-Ramos y Xiong, (2002)
Hidrolizado de proteínas de suero de leche	Actividad atrapadora de radicales	Cheison y col., (2007)
Péptidos derivados de la β-lactoglobulina	Actividad atrapadora de radicales Inhibición contra la oxidación de lípidos en emulsiones de aceite en agua	Hernández-Ledesma y col., (2007a) Elias y col., (2006)
Hidrolizados de caseínas	Actividad atrapadora de radicales	Suetsuna y col., (2000)
Caseinofosfopéptidos	Actividad atrapadora de radicales Inhibición de la oxidación de liposomas	Kim y col., (2007) Kansci y col., (2004)
Hidrolizado de proteínas de yema de huevo	Actividad atrapadora de radicales Inhibición de TBARS	Sakanaka y Tachibana, (2006)
Hidrolizados de colágeno de piel de cerdo	Actividad atrapadora de radicales	Li y col., (2007)
Hidrolizado de proteínas de capelán	Inhibición de la oxidación de caroteno-linoleato Efectos sinérgicos con BHA, BHT y TBHQ	Amarowicz y Shahidi, (1997) Amarowicz y col., (1999)
Hidrolizado de proteínas de foca	Inhibición de la oxidación de caroteno- linoleato	Shahidi y Amarowicz, (1996)
Hidrolizado de proteínas de colza	Actividad atrapadora de radicales	Cumby y col., (2008)

Los hidrolizados de las proteínas del suero de leche han recibido mucha atención por su captación de radicales y sus actividades de inhibición en la oxidación de lípidos (Peña-Ramos y Xiong, 2001, 2003). Hernández-Ledesma y col., (2007b) evaluaron la actividad captadora de radicales de varios péptidos derivados de la β -lactoglobulina y sugirieron que la presencia y la posición de aminoácidos triptófano, tirosina y metionina en los péptidos era la responsable de su actividad antioxidante. Sus resultados respaldan la hipótesis de que los enlaces peptídicos o la conformación estructural de los péptidos mejora la capacidad donante de los residuos de aminoácidos, realizando su actividad antioxidante.

También se deduce de las proteínas de la leche, que los hidrolizados de caseína producidos con pepsina y pancreatina muestran dos secuencias de péptidos con actividad antioxidante, His-Leu-Pro-Leu-Pro y Trp-Ser-Val-Pro-Gln-Pro-Lys, siendo estas identificadas como responsables de dicha actividad (Hernández-Ledesma y col.,

2007a). Otro péptido, Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu, derivado de la digestión de la caseína con actividad captadora de radicales fue identificado por Suetsuna y col. (2000) y su actividad antioxidante fue atribuida a la secuencia Glu-Leu. También se ha descrito que los caseinofosfopéptidos tienen actividad capturando radicales (Kim y col., 2007) y un efecto inhibitorio contra la oxidación de los liposomas (Kansci y col., 2004). Otro estudio sobre hidrolizados de proteínas de suero de leche reveló una relación entre las propiedades antioxidantes de los péptidos del suero y la presencia de aminoácidos aromáticos o de iminoácidos (Peña-Ramos y col., 2004).

Hidrolizados preparados por hidrólisis enzimática de proteína de yema de huevo mostraron actividades captadoras de radicales superóxido, hidroxilo y DPPH (Tanzadehpanha y col., 2012; You y Wu, 2011), e inhibieron la formación de TBARS en alimentos como carne picada y homogeneizado de atún (Sakanaka y Tachibana, 2006).

Subproductos de la producción de carne también proporcionan una fuente de péptidos antioxidantes. Los hidrolizados de colágeno de piel de cerdo por una mezcla de proteasas mostraron una sustancial actividad capturadora del radical DPPH (Li y col., 2007). Estudios más actuales han identificado péptidos antioxidantes a partir de productos cárnicos curados como el jamón (Escudero y col., 2013b) y productos cárnicos fermentados como chorizo (Broncano y col., 2012; Petró y col., 2013).

Además de todos estos estudios, las especies animales acuáticas y los subproductos de la industria acuícola son probablemente las más investigadas como fuente importante de péptidos antioxidantes. Amarowicz y Shahidi (1997) separaron 4 fracciones de péptidos de hidrolizados proteicos de capelán (*Mallotus villosus*) con una fracción que tenía una notable capacidad antioxidante, otras 2 con eficacia antioxidante débil, y la cuarta con efecto pro-oxidante. También se han encontrado efectos sinérgicos con BHA, BHT, ascorbato de sodio, y α -tocoferol de hidrolizados de proteínas de sardinas *in vitro* e *in vivo* (Matsumoto y col., 2004; Hatate y col., 1990). Li y col. (2006) demostraron la actividad de hidrolizados de músculo de carpa y sus condiciones óptimas de hidrólisis para la producción de péptidos con fuerte actividad antioxidante. En hidrolizados de proteínas de mejillones, Wang y col., (2013) identificaron el péptido

Tyr-Pro-Pro-Ala-Lys con potente actividad captadora de radicales DPPH, hidroxilo y superóxido. Hidrolizados de proteínas de salsa fermentada de mejillones también han mostrado actividad antioxidante (Rajapakse y col., 2005). Una variedad de restos de pescado procesados han sido recientemente considerados como una fuente potencial de péptidos con potencial antioxidante. Estos incluyen hidrolizados de proteínas como espinas dorsales de atún (Je y col., 2007), piel y armazón de abadejo de Alaska (Je y col., 2005; Kim y col., 2001b), armazón de merluza azul (Kim y col., 2007) y otros desperdicios marinos (Guerard y col., 2005).

En adición a las proteínas animales, proteínas de fuentes vegetales son también de gran interés por producir potenciales péptidos antioxidantes. Gluten de trigo y hidrolizados de proteínas de germen han mostrado buenas actividades antioxidantes comparables con la del α -tocoferol (Wang y col., 2007; Zhu y col., 2006). Otros hidrolizados de proteínas derivadas de las plantas conocidos con propiedades antioxidantes incluyen la colza (Cumby y col., 2008), maíz (Kong y Xiong, 2006) patata (Wang y Xiong, 2005), patata dulce (Zhang y col., 2014), cacahuete (Chen y col., 2007a), girasol (Megias y col., 2007) y *B. carinata* (Pedroche y col., 2007).

I.1.3.3.- Actividad Antiproliferativa o anticancerígena

Numerosos compuestos nitrogenados de diferentes tamaños y fuentes de procedencia han sido descritos por tener un efecto anticancerígeno en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Tabla I.4).

Tabla I.4. Péptidos con actividades anticancerígenas (Shahidi y Zhong, 2008)

Péptidos	Actividad anticancerígena	Referencia
Lunasina de semilla de soja	Inhibición de carcinógenos en células de mamíferos	De Lumen, (2008) Galvez y col., (2001) Jeong y col., (2002)) Lam y col., (2003)
Hidrolizados de proteínas de soja	Supresión de la tumorigénesis en hígado y colon	Azuma y col., (2000) Kanamoto y col., (2001)
Glicoproteína de soja	Citotoxicidad en células de linfoma	Kim y col., (2000)
Proteínas de trigo sarraceno	Antiproliferación de hepatomas, leucemia, y células de cáncer de pecho	Leung y col., (2007)
Péptidos de ginseng	Actividad antitumoral en células de linfoma	Kim y col., (2003)
Hidrolizados de proteínas de huevo	Antiproliferación de células de linfoma	Yi y col., (2003)
Hidrolizados de proteínas de pescado	Inhibición de células de cáncer de mama	Picot y col., (2006)

Se ha demostrado en modelos animales *in vitro* que el conjunto de las proteínas del suero lácteo posee actividad anticancerígena. El mecanismo de acción parece estar relacionado con el incremento en la síntesis de glutatión, con la consiguiente estimulación de la inmunidad y la actividad antioxidante (Marshal, 2004; Xiao y col., 2005). Además, el glutatión es sustrato de dos clases de enzimas: la glutatión peroxidasa dependiente de selenio y la familia de las glutatión transferasas. Ambas favorecen la eliminación de compuestos, incluidos mutágenos y carcinógenos (Marshal, 2004). También se ha especulado con que sea la capacidad del suero lácteo de unirse al hierro, la responsable de su potencial anticancerígeno, al menos en parte, ya que el hierro puede actuar como agente mutagénico causando daño oxidativo en los tejidos. La inducción de la producción de somatostatina, un conocido agente antiproliferativo en cáncer de colon, se ha relacionado también con la actividad anticancerosa de las proteínas del lactosuero (Kennedy y col., 1995).

La actividad anticancerosa de la lactoferrina humana ha sido ampliamente estudiada. En modelos animales *in vitro* se ha comprobado que la lactoferrina bovina posee actividad anticancerosa, inhibiendo tanto el crecimiento de tumores como la formación de metástasis. Así, se ha demostrado que inhibe la carcinogénesis en colon,

esófago, pulmón y vejiga cuando se administra a ratas por vía oral en el estado post-inicial (Iigo y col., 2004; Ward y col., 2005). Se ha descrito que la lactoferrina puede inducir la apoptosis selectiva de las células cancerosas mediante su unión a estos receptores específicos.

La lactoferricina, al igual que la lactoferrina, posee actividad antitumoral, siendo capaz de inhibir la formación de metástasis y de inducir la apoptosis selectiva de células cancerosas (Gifford y col., 2005). Así, la lactoferricina activa vía mitocondrial de apoptosis mediante mecanismos relacionados al menos en parte con la generación de especies reactivas del oxígeno (Mader y col., 2005; Yoo y col., 1997).

Los productos lácteos y los péptidos derivados de estos también juegan un papel importante en la prevención del cáncer (Chatterton y col., 2006; Parodi, 1998). Kim y col. (1995) han estudiado la anticarcinogénesis de fracciones de péptidos hidrofóbicos aislados de suspensiones de queso y encontraron que dichas fracciones de péptidos mostraban una gran actividad citotóxica contra las líneas celulares tumorales SNU-C2A, SNU-1, y P388D1.

La lisozima, presente tanto en la leche como en el huevo, ha sido ampliamente estudiada como agente anticancerígeno y se ha demostrado que inhibe la formación y el crecimiento de tumores tanto *in vitro* como *in vivo* cuando se administra por vía oral (Kovacs-Nolan y col., 2005). Además, se ha descrito que potencia la eficacia de tratamientos de quimioterapia y que posee un efecto preventivo cuando se administra a ratones (Kovacs-Nolan y col., 2005).

También se ha encontrado que otros hidrolizados proteicos de huevo ejercen efectos antiproliferativos en células de linfoma de ratón (Yi y col., 2003).

Además de los encontrados en la leche y el huevo, otros compuestos bioactivos derivados de plantas han sido estudiados. El inhibidor de proteasas de Bowman-Brik es una proteína soluble que se ha aislado de legumbres, principalmente de la soja. Se ha demostrado que el inhibidor de Bowman-Brik es un potente anticancerígeno y como consecuencia, ya se han llevado a cabo varios estudios con el inhibidor purificado y con

concentrados (Armstrong y col., 2000, 2003; Friedman y Brandon, 2001; Kennedy, 1998; Malkowicz y col., 2001). Además de sus efectos anticancerígenos, el inhibidor de Bowman-Brik ha demostrado ser útil en la prevención de ciertos tipos de cánceres y en la protección frente a radiaciones durante la radioterapia utilizada en el tratamiento del cáncer (Dittmann y col., 2003; Friedman y Brandon, 2001).

Otros péptidos bioactivos extraídos de la soja con efectos preventivos contra el cáncer han sido investigados. Azuma y col. (2000) y Kamamoto y col. (2001) encontraron una fracción de alto peso molecular de proteínas de soja tratadas con proteasas que suprimían la carcinogénesis de tumores de hígado y colon en animales experimentales. Estos autores sugirieron que esta fracción proteica inhibía la reabsorción intestinal de los ácidos biliares a través de enlaces hidrofóbicos, y por tanto disminuían la actividad promotora del tumor que tienen los ácidos biliares sobre el hígado y el colon.

Un glicopéptido aislado de hidrolizados de soja que contiene mayoritariamente aspartato, glutamato, prolina, glicina y leucina, han mostrado presentar citotoxicidad contra las células P388D1 de linfoma de ratón (Kim y col., 1999). Kim y col. (2000) purificaron un péptido anticancerígeno de la fracción de péptidos hidrofóbica de un hidrolizado de soja tratada con termoasa. El péptido fue identificado como un nanopéptido con un peso molecular de 1157 Da y la secuencia X-Met-Leu-Pro-Ser-Tyr-Ser-Pro-Tyr.

Además de la soja, los péptidos bioactivos con actividad anticancerígena han sido encontrados en otras plantas leguminosas como en garbanzos (Xue y col., 2015), granos de café (Wong y Ng, 2003) y alubias pintas (Ye y Ng, 2001).

Otras fuentes vegetales de péptidos anticancerígenos incluyen el trigo sarraceno y el ginseng. Un péptido aislado de las semillas del trigo sarraceno con un peso molecular de 4 kDa mostró actividad antiproliferativa contra el hepatoma, la leucemia, y células de cáncer de mama (Leung y Ng, 2007).

Además, los péptidos anticancerígenos también están presentes en animales marinos y microorganismos. Los péptidos derivados del cartílago de tiburón mostraron actividad antiangiogénica cuando fueron evaluados en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Bukowski, 2003). Picot y col. (2006) evaluaron la actividad antiproliferativa de 18 hidrolizados de proteínas de pescado *in vitro* e identificaron 3 hidrolizados de bacaladilla, 3 de bacalao, 3 de platija y 1 de salmón con una gran actividad inhibidora contra el crecimiento de dos líneas celulares de cáncer de mama. Más recientemente, Alemán y col. (2011) evaluaron la actividad antiproliferativa frente a células MCF-7 de hidrolizados de gelatina de calamar realizados con distintas proteasas, siendo los más activos los hidrolizados realizados con esperasa y alcalasa.

I.1.3.4.- Actividad Antimicrobiana

Compuestos nitrogenados con propiedades antimicrobianas han sido identificados en una amplia variedad de fuentes naturales que van desde los propios microorganismos hasta animales y plantas.

Estos compuestos antimicrobianos exhiben efectos inhibidores contra los microorganismos que producen el deterioro de los alimentos y una amplia gama de patógenos, incluyendo bacterias, mohos, virus e incluso parásitos eucariotas. Su forma de acción y su efectividad varían dependiendo de sus características estructurales, así como del tamaño del péptido, su composición de aminoácidos, carga, hidrofobicidad y estructura secundaria (Dathe y Wieprecht, 1999). Además, también muestran distinta sensibilidad y selectividad.

En general, los compuestos antimicrobianos derivados de los animales muestran actividad inhibitoria contra un espectro mucho más amplio que los producidos por bacterias (Rydlo y col., 2006), aunque estos últimos muestran una eficiencia más alta en concentraciones muy bajas (Nagao y col., 2006).

Sin embargo, todos estos compuestos nitrogenados poseen ciertos rasgos comunes. Muchos de ellos están compuestos por, al menos, 50 aminoácidos siendo aproximadamente el 50% de estos aminoácidos hidrofóbicos y a menudo plegados en

estructuras anfipáticas (Rydlo y col., 2006). Por tener un exceso de aminoácidos básicos (lisina y arginina), los compuestos antimicrobianos normalmente poseen carga positiva. El efecto antimicrobiano parece estar relacionado con esta carga neta positiva, de modo que los aminoácidos se organizan estructuralmente formando un bucle en forma de α -hélice en el extremo carboxilo terminal (Kang y col., 1996) que provoca la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos (Agawa y col., 1991), alterando su permeabilidad y provocando la muerte celular (Bellamy y col., 1992). Además de producir alteraciones en las membranas bacterianas, la actividad antimicrobiana puede tener lugar porque los compuestos nitrogenados antimicrobianos secuestran el hierro impidiendo su utilización por las bacterias o mediante la estimulación de la fagocitosis por macrófagos y monocitos (Farnaud y Evans, 2003; Kovacs-Nolan y col., 2005; Orsi, 2004).

También ejercen un efecto inhibitor sobre los microorganismos de destino mediante la interacción con los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe la síntesis de proteínas y la división celular de los microorganismos. Por otra parte, algunos péptidos están involucrados en la activación autolítica en los microorganismos diana (Cudic y Otvos, 2002).

Por su potencial aplicación en la preservación de alimentos y en tratamientos terapéuticos para el cuidado de la salud, estos compuestos antimicrobianos son de gran interés.

De este modo, los compuestos nitrogenados bioactivos con propiedades antimicrobianas, tales como aquellos producidos por bacterias ácido lácticas (BAL) en alimentos fermentados y muchos componentes peptídicos de los alimentos, son buenos candidatos a ser utilizados como aditivos. Las ventajas frente a los conservantes químicos incluyen menos efectos adversos, una menor intensidad en el tratamiento con calor requerido y mantienen las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos (Galvez y col., 2007).

En aplicaciones terapéuticas, los compuestos antimicrobianos son mejores que los antibióticos convencionales porque matan las bacterias más rápido y no se ven

afectados por los mecanismos de resistencia que afectan a los antibióticos (Rydlo y col., 2006).

Un gran grupo de estos compuestos nitrogenados antimicrobianos pertenecen a las bacteriocinas, que son péptidos producidos por diferentes grupos de bacterias contra otras bacterias de la misma familia (Nes y col., 2007). Muchas de las bacteriocinas producidas por las BAL, son activas inhibiendo el crecimiento de bacterias gram positivo como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. Estos péptidos son considerados de las bacteriocinas más interesantes debido a su gran número, importante bioactividad, y aplicación potencial en alimentos y en la industria farmacéutica como antibióticos y agentes antivirales (Drider y col., 2006; Ennahar y col., 1999).

De modo similar a las bacteriocinas, los compuestos derivados de organismos eucariotas (hongos, animales y plantas) inhiben el crecimiento de microorganismos por mecanismos no específicos que involucran la interacción con la membrana y los componentes intracelulares de los microorganismos diana, lo cual resulta en una perturbación de la membrana, translocación del citoplasma e interacción con los elementos intracelulares (Rydlo y col., 2006).

Finalmente, los compuestos nitrogenados con actividad antimicrobiana de fuentes alimentarias son de especial interés debido a la preferencia de los consumidores por los componentes derivados de los alimentos sobre otros aditivos químicos.

Entre ellos, los péptidos resultantes de la hidrólisis de proteínas de la leche han mostrado actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas, gram-negativas, levaduras e incluso hongos.

Péptidos derivados de las caseínas de la leche muestran actividad antimicrobiana *in vitro* frente a un amplio rango de microorganismos, entre los que se incluyen *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus pyogenes*. El fragmento f(1-23) de la α_{s1} -CN o isracidina, obtenido tras la hidrólisis por la quimosina, ejerce *in vivo* actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, a concentraciones

comparables con la de antibióticos conocidos en ratones (Lahov y Regelson, 1996) y frente a mastitis en vacas y ovejas (Clare y Swaisgood, 2000; Marshal, 2004). Además, se han descrito con actividad antimicrobiana distintos fragmentos derivados de la α_{s2} -CN, como la casocidina-I o fragmento f(165-203), que inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* (Zucht y col., 1995). Las secuencias peptídicas f(164-179) y f(183-207), aisladas a partir de un hidrolizado de la α_{s2} -CN con pepsina, provocan efectos antibacterianos frente a *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Recio y Visser, 1999a). Los fragmentos derivados de la β -CN humana ejercen efectos protectores frente a *Klebsiella pneumoniae* en ratón (Migliore-Samour y col., 1989).

Entre los péptidos derivados de las proteínas del lactosuero cabría destacar el caseinomacropéptido o glicomacropéptido (GMP), un péptido muy glicosilado derivado de la digestión de la κ -caseína. Se ha demostrado que previene la adhesión de bacterias a las células intestinales y que presenta actividad antiinflamatoria. En la actualidad el GMP se añade a pastas dentríficas junto a otros péptidos derivados de las caseínas, denominados caseínfosfopéptidos (CPP), por su demostrada capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias cariogénicas. Además, el GMP y los CPP inhiben la desmineralización y favorecen la remineralización del esmalte dental al formar en la superficie del diente nanoagregados con fosfato cálcico amorfo que constituyen un reservorio útil en el mantenimiento del estado de supersaturación de iones del esmalte dental. Además del caseinomacropéptido, la hidrólisis de suero de cabra por acción de la alcalasa produce péptidos actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *Bacillus cereus*, entre otros (Osman y col., 2016).

La actividad antibacteriana de la lactoferrina bovina ha sido estudiada en varios estudios realizados con individuos infectados por *Helicobacter pylori*. En general estos estudios han demostrado que la administración de antibióticos en conjunción con lactoferrina es más efectiva que la administración únicamente de antibióticos (Okuda y col., 2005). El fragmento f(17-41) de la lactoferrina, aislado de un hidrolizado con pepsina de la lactoferrina, presenta propiedades bacterianas *in vitro* frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, incluidos *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* y levaduras como *Candida* (Bellamy y col., 1992; Recio y Visser, 1999b). El menor tamaño de este

péptido con respecto al de la lactoferrina favorece el acceso a zonas de acción de la superficie microbiana. En cuanto a su actividad antiviral, se ha descrito que la lactoferrina es capaz de inhibir la replicación de virus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la leucemia de células T tipo I, el citomegalovirus, el virus de la hepatitis C o el herpes simplex tipo I (Martínez Augustín y Martínez de Victoria, 2006). De hecho, varios estudios clínicos en enfermos de hepatitis C han demostrado que la administración de lactoferrina disminuye el RNA sérico del virus y los niveles de alanin-transaminasa (Ishii y col., 2003; Okada y col., 2002).

La lactoferricina (LFCina) es un péptido resultante de la digestión de la lactoferrina y corresponde al extremo amino terminal de la lactoferrina, cuya actividad bactericida es más potente que la de la propia lactoferrina (Gifford y col., 2005; Orsi, 2004). Se ha demostrado que este péptido posee también actividad antiviral e inmunomoduladora. Además, posee capacidad de unirse al ADN y puede entrar en la célula, atravesar la membrana nuclear y actuar como un factor de transcripción. Por último, la lactoferricina posee la capacidad de potenciar el efecto de antivirales y antibacterianos (Gifford y col., 2005).

Además, la leche contiene inmunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgA e IgM) que resisten a la digestión gástrica y ejercen un papel protector en el intestino (Diehl-Jone y Askin, 2004). De hecho son capaces de prevenir la adherencia de bacterias patógenas a células epiteliales, de aglutinar bacterias, de neutralizar toxinas y de inactivar virus. Entre estas inmunoglobulinas la IgA, presente en la leche y el calostro, es especialmente importante en neonatos, ya que proporciona una inmunidad pasiva hasta que su barrera intestinal llega a ser funcionalmente madura. Por otra parte, se ha demostrado que la IgM es más eficiente que otras inmunoglobulinas en la neutralización de virus o la aglutinación de bacterias, y que defiende frente a patógenos Gram-negativos como *Escherichia coli* y *Salmonella*.

También péptidos de proteínas hidrolizadas de huevo han mostrado actividad antibactericida. La ovotransferrina, al igual que la lactoferrina, es una proteína de la familia de las transferrinas que se encuentran presentes en el huevo. Este tipo de proteínas se encuentra en varios fluidos biológicos y posee la capacidad de unirse a

hierro de forma reversible. La ovotransferrina también posee actividad antiviral que ha sido demostrada frente al virus de la enfermedad de Marek (Giansanti y col., 2002)

Tanto el huevo como la leche contienen lisozima aunque la fuente principal de la lisozima comercial es el huevo (Kovacs-Nolan y col., 2005). La lisozima (N-acetilmuramida glucanohidrolasa) es una proteína que inactiva gran cantidad de microorganismos al unirse a la pared bacteriana y romper el enlace β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina. Estudios recientes han demostrado que la lisozima posee actividad antibacteriana independiente de sus funciones catalíticas y que puede estimular la función fagocítica de los macrófagos (Kovacs-Nolan y col., 2005). Se ha demostrado que la administración de EDTA-tris-lisozima es efectiva en el tratamiento de infecciones de vejiga en humanos producidas por coliformes. Además, por sus propiedades antibacterianas la lisozima se ha utilizado en la elaboración de pastas de dientes, chicles y colutorios destinados a prevenir la periodontitis y las infecciones de la mucosa bucal.

La hidrólisis enzimática de la lisozima de huevo incrementa su actividad antibacteriana. Los péptidos responsables de este incremento han sido aislados y corresponden a los fragmentos que comprenden los aminoácidos 98 a 108 y 15 a 21 (Kovacs-Nolan y col., 2005).

Además de la leche y el huevo, hidrolizados de proteínas de otros alimentos han sido investigados por su actividad antimicrobiana, incluyendo hidrolizados de músculo de pescado (Sila y col., 2014), proteínas de crustáceos marinos (Liu y col., 2008; Mercado y col., 2005), semillas de trigo sarraceno (Leung y Ng, 2007) y semillas de chile (Diz y col., 2006).

I.1.3.5.- Actividad Opiácea

El aislamiento por primera vez, en 1975, de péptidos opioides endógenos denominados encefalinas, condujo a la detección en 1979 de la actividad opiácea de péptidos derivados de hidrolizados proteicos de las proteínas de la leche. Posteriormente, el estudio de la actividad opiácea en un hidrolizado de proteínas lácteas

dio lugar al nacimiento del concepto de “exorfina”, o péptido opioide de origen dietético, en contraposición al de “endorfina” o péptido endógeno (Fazel, 1998).

Los péptidos con actividad opiácea se definen como compuestos que presentan afinidad por receptores opiáceos lo que los relaciona con un gran número de funciones fisiológicas y fisiopatológicas, incluyendo funciones inmunológicas, control de las funciones gastrointestinales, control de los mecanismos reproductivos, y regulación de muchas funciones del sistema nervioso central como tratamiento del stress, depresión y otros comportamientos emocionales (Guesdon y col., 2006).

Los péptidos opioides endógenos tienen como característica estructural la presencia de un residuo de Tyr en el extremo amino terminal (excepto los derivados de la α -caseína). La carga negativa localizada en el grupo fenólico de la Tyr se ha descrito como esencial para la actividad opiácea, y la eliminación de este aminoácido da lugar a una ausencia total de bioactividad (Chang y col., 1981). La presencia de otro aminoácido aromático, Phe o Tyr, en la tercera o cuarta posición, favorece la fijación del péptido al receptor opiáceo (Meisel, 1998). Además, una Pro en la segunda posición es crucial para la actividad biológica ya que mantiene la orientación de las cadenas de los aminoácidos Tyr y Phe (Mierke y col., 1990).

Los péptidos opioides exógenos se diferencian en péptidos opioides típicos, que tiene la misma secuencia en el extremo amino terminal, Tyr-Gly-Gly-Phe, y opioides atípicos, que sólo tienen como una Tyr en el extremo amino terminal y varios aminoácidos de la secuencia de la proteína original (Teschemacher y col., 1997).

Estos péptidos han sido aislados de cereales, leches y tejidos animales (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005). Aunque los péptidos opioides más estudiados son los derivados de proteínas lácteas, en concreto de las caseínas (Martínez Agustín y Martínez de Victoria, 2006; Rutherford-Markwick y Moughan, 2005).

Se ha observado que las casomorfina afectan la función gastrointestinal inhibiendo la tasa de vaciado gástrico y la motilidad intestinal y por lo tanto ralentizando el paso del alimento a través del tracto intestinal. Otras funciones

propuestas para estos péptidos es la de ejercer una acción antidiarreica o modular el transporte intestinal de aminoácidos y estimulando la secreción de insulina y somastostatina produciendo analgesia y modulando el comportamiento social (Meisel, 1998).

Estos son péptidos pequeños, de entre 5 y 10 aminoácidos de longitud. Los más abundantes son las β -casomorfina denominadas así por derivar de la hidrólisis de la β -caseína y por su parecido efecto fisiológico al de la morfina. Otros péptidos aislados, aunque con menor actividad opioide, son las α - y β -lactorfina derivadas de la α -lactoalbumina y la β -lactoglobulina (Chiba y col., 1986), exorfina generadas de la hidrólisis de la α_{s1} -caseína (Loukas y col., 1983), y serorfina obtenidas a partir de las proteínas del suero (Tani y col., 1994). Tras ser ingeridos en el alimento o tras liberarse durante la digestión gastrointestinal, las β -casomorfina pueden ejercer los efectos a nivel local, que sólo se han descrito en animales adultos. Así, se ha estudiado el efecto antisecretorio en el íleon del conejo (Tomé y col., 1987) y la reducción del grado de vaciamiento gástrico y de la motilidad intestinal en ratas (Daniel y col., 1993). Además, esta reducción de la motilidad intestinal permitiría la máxima producción de otros péptidos bioactivos (Schanbacher y col., 1998). Los péptidos lácteos pueden participar en la regulación del apetito, modificando la actividad endocrina del páncreas para aumentar la producción de insulina (Kitts y col., 1992). Estudios en ratas indican que las β -casomorfina pueden modular la ingesta, estimulando la ingesta de grasa y reduciendo la ingesta de dietas ricas en hidratos de carbono (Lin y col., 1998), además de regular el transporte intestinal de aminoácidos (Brandsch y col., 1994). En humanos adultos se han detectado fragmentos opiáceos en el contenido intestinal tras la ingestión de leche de vaca (Svedberg y col., 1985), no detectándose en el suero sanguíneo. Por ello, los efectos de estos péptidos suelen limitarse al tracto gastrointestinal de los seres humanos adultos, ya que, o bien no son absorbidos, o escapan a la degradación enzimática en la pared intestinal (Teschmacher y col., 1997). Sin embargo, existen estudios que sugieren que algunos de ellos (β -casomorfina) pueden ser transportados de la sangre al tronco cerebral (Pasi y col., 1993).

Por el contrario y debido a la inmadurez y consecuente mayor permeabilidad de la barrera intestinal de los neonatos a los péptidos y proteínas, los fragmentos opiáceos

se absorben y alcanzan la circulación sistémica, actuando sobre los receptores del sistema nervioso central. De este modo, las β -casomorfina pueden ser transportadas a través de la mucosa intestinal de los neonatos y producen un efecto analgésico en el sistema nervioso, lo cual resulta en tranquilidad y el sueño de los niños (Teschmacher, 1997).

En contraste con las casomorfina, algunos péptidos pueden actuar como antagonistas de los opioides, es decir, que pueden inhibir el efecto de sustancias como la morfina (Haque y Chand, 2006). Los péptidos antagonistas opiáceos suprimen la actividad agonista de las encefalinas, produciendo el mismo efecto que la naloxona (Fiat y col., 1993). Este grupo de péptidos incluye las casoxinas, procedentes de la κ -CN y de la α_{s1} -CN (Chiba y col., 1989; Yoshikawa y Chiba, 1990) y las lactoferrinas, derivadas de la lactoferina (Yoshikawa y col., 1988). En general, los péptidos opioides antagonistas tienen la estructura X_a -Aromático- X_b -Tyr-OCH₃. La naturaleza del aminoácido X_a puede determinar la especificidad por uno u otro receptor opioide.

I.1.3.6.- Actividad Antitrombótica o Anticoagulante

La agregación plaquetaria es un paso crítico en la formación de trombos y está mediada por el enlace del fibrinógeno y su receptor, la glucoproteína GPIIb/IIIa de la membrana de las plaquetas, la cual involucra el reconocimiento de la secuencia Arg-Gly-Asp del fibrinógeno. Es concebible, por lo tanto, que los compuestos nitrogenados que contienen esta secuencia puedan ser capaces de antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa, resultando en la inhibición de la agregación de plaquetas. Por lo anterior, los compuestos que son antagonistas del fibrinógeno y se fijan a GPIIb/IIIa son útiles en la prevención de la trombosis y en los regímenes de tratamiento post-angioplastia o post-trombolíticos (Mulero y col., 2011).

Los principales compuestos nitrogenados aislados con actividad antitrombótica se encuentran presentes en la leche. A nivel molecular, la coagulación de la sangre y de la leche muestra gran similitud. En la leche, el mecanismo de coagulación es definido por la interacción de la κ -caseína con quimosina, y el proceso de coagulación de la sangre es definido por la interacción del fibrinógeno con la trombina.

El efecto antitrombótico de péptidos procedentes, entre otras proteínas, de la κ -caseína y concretamente del caseinomacropéptido, parece venir dado por su similitud estructural con la cadena γ del fibrinógeno, de forma que entran en competencia con los receptores de los trombocitos, inhibiendo la agregación plaquetaria (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Meisel, 1997, 2004).

Determinadas secuencias peptídicas de la κ -CN, denominadas casoplatelinas, son similares a la cadena γ del fibrinógeno (Darragh, 2002). Se ha comprobado *in vitro* que los péptidos derivados del extremo carboxilo terminal de la κ -CN bovina son inhibidores de la agregación plaquetaria y de la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano al receptor específico de la membrana de las plaquetas (Jollés y col., 1996). Estos péptidos son capaces de fijarse sobre receptores específicos situados en la superficie de las plaquetas, impidiendo así la formación del trombo. Los principales péptidos antitrombóticos de la κ -caseína son los correspondientes a la secuencia aminoacídica Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Glu-Asp-Lys, correspondiente a los aminoácidos 106 a 116. La característica estructural similar entre la cadena γ del fibrinógeno y las casoplatelinas, responsable de la competencia en el proceso de agregación de las plaquetas, es la homología en la secuencia de los aminoácidos Ile, Lys y Asp en las posiciones 108, 112 y 115, respectivamente (Fiat y col., 1989).

Péptidos derivados de la lactoferrina, concretamente la secuencia Lys-Arg-Asp-Ser, presentan también actividad antitrombótica a través de otro mecanismo distinto al de la caseína, inhibiendo, de manera dosis-dependiente, la agregación plaquetaria inducida por ADP, debido a la homología con el fragmento F(572-575) de la cadena α del fibrinógeno (Mazoyer y col., 1990). Se ha comprobado *in vivo* que este fragmento inhibe la formación de trombos en la arteria coronaria de perros (Shebuski y col., 1989) y prolonga el tiempo de sangrado en la arteria mesentérica del hámster (Cook y col., 1988). Además, se ha descrito el efecto antitrombótico de este péptido sobre la trombosis inducida por láser en rata y cerdo (Drouet y col., 1990).

Se han encontrado secuencias peptídicas en el plasma de recién nacidos alimentados con leche materna o con fórmulas infantiles elaboradas con leche de vaca,

en concentración suficiente para ejercer el efecto antitrombótico *in vivo*, lo que demuestra su liberación a partir de las proteínas lácteas durante el proceso de digestión gastrointestinal (Chabance y col., 1995). Estudios más recientes han demostrado la presencia de péptidos antitrombóticos en el estómago, duodeno y posteriormente en la sangre de adultos que habían digerido leche o yogur (Chanbance y col., 1998), lo que demuestra la capacidad de las bacterias lácticas en hidrolizar las proteínas lácteas y formar péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación, así como la capacidad del tracto gastrointestinal de absorber cadenas peptídicas.

En estudios más recientes, se ha utilizado caseína bovina fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota para producir péptidos con propiedades antitrombóticas y entre los compuestos producidos se identificó un péptido con una potente actividad antitrombótica que anteriormente había sido descrito también como antihipertensor (Rojas-Ronquillo y col., 2012).

Además de las proteínas lácteas, también se han utilizado proteínas vegetales para obtener péptidos con actividad anticoagulante (Sabbione y col., 2015).

I.1.3.7.- Actividad Inmunomodulante

El mecanismo de acción de estos compuestos nitrogenados no es conocido, aunque la hipótesis más aceptada describe la unión a los receptores opiáceos situados en la membrana de los linfocitos, lo que influye en su capacidad inmunoreactiva. Se ha identificado el aminoácido Arg de los extremos amino o carboxilo terminal como la zona reconocida por los receptores específicos de la membrana de los linfocitos y los macrófagos (Pagelow y Werner, 1996).

Los efectos de estos compuestos se han comprobado tras la administración intravenosa de los mismos, pero no existen en la actualidad estudios concluyentes sobre los efectos inmunomodulantes ejercidos tras su digestión.

Numerosos estudios han demostrado que la hidrólisis de proteínas de la leche por enzimas digestivas o microbianas puede producir péptidos con actividad

inmunomoduladora (Gill y col., 2000). Los péptidos responsables de esta actividad son fragmentos derivados de la α_{s1} -caseína (Meisel y col., 1989), de la β -caseína (Parker y col., 1984), de la κ -caseína y de la α -lactoalbúmina (Kayser y Meisel, 1996).

Sütas y col. (1996) demostraron que la digestión de la fracción de caseínas con pepsinas y tripsinas producía péptidos que provocaban efectos inmunomoduladores *in vitro* en linfocitos de sangre humana. Péptidos derivados del total de las caseínas y principalmente de la α_{s1} -caseína suprimen la proliferación de linfocitos, mientras que los derivados de la β - y κ -caseína estimulaban el índice de proliferación. Además, se ha observado que los péptidos derivados de la hidrólisis de la α_{s1} -caseína y de la β -caseína son capaces de estimular la fagocitosis de eritrocitos por macrófagos del peritoneo así como ejercer un efecto protector frente a infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae*.

Recientemente, también se ha descrito que la inmunoreactividad de linfocitos humanos era estimulada por varios péptidos bioactivos de proteínas de la leche. Así, los péptidos Tyr-Gly y Tyr-Gly-Gly, correspondientes a fragmentos de la α -lactoalbúmina y la κ -caseína de vaca, respectivamente, incrementaban significativamente la proliferación de linfocitos (Kayser y Meisel, 1996).

La isracidina, fragmento f(1-23) de la α_{s1} -CN, permite el desarrollo de la inmunidad a largo plazo frente a la reinfección por *Staphylococcus aureus* (Fazel, 1998). Además, las β -casomorfina y las exorfinas pueden actuar como inmunomodulantes debido a su afinidad por los receptores opiáceos presentes en las células T y en los leucocitos fagocíticos humanos (Migliore-Samour y col., 1989).

Estudios en modelos animales y celulares sugieren que la lactoferrina también posee actividad inmunomoduladora (Legrand y col., 2004). Estos estudios indican que podría actuar mediante dos mecanismos de acción, el primero de los cuales implicaría la inhibición de la producción de varias citoquinas como el TNF- α o la interleucina (IL) 1 β . La existencia de receptores de lactoferrina en monocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales sugiere que la lactoferrina podría tener un efecto directo en la regulación de la producción de citoquinas mediante la regulación de vías de señalización mediadas por estos receptores. El segundo mecanismo de acción podría

estar relacionado con la inhibición de la estimulación de la inmunidad mediante la unión al lípido A del lipopolisacárido bacteriano. En concordancia con su actividad inmunomoduladora, se ha descrito que la lactoferrina es capaz de inhibir las respuestas inflamatorias locales en la inflamación cutánea en humanos (Griffiths y col., 2001), así como en modelos animales de inflamación cutánea mediada por alérgenos y de inflamación intestinal.

La lisozima, presente en la leche y el huevo, posee actividad inmunoreguladora pudiendo mejorar la sinusitis crónica y normalizar la respuesta humoral y celular en pacientes con bronquitis crónica cuando se combina con inmunoterapia. Además, mejora la respuesta inmune en pacientes cancerosos inmunodeprimidos. Se ha sugerido que la inmunomodulación producida por la lisozima puede ser resultado de la estimulación de la función fagocítica y de la hidrólisis de productos de peptidoglucano que pueden actuar como adyuvantes o inmunomoduladores (Kovacs-Nolan y col., 2005; Sava, 1996; Asakura y col., 1990; Li-Chan y nakai, 1989).

Otros alimentos, aunque no tan estudiados como los lácteos, también contienen péptidos con actividad inmunomodulante, como es el caso de la jalea real de la que se han aislado péptidos que estimulan la proliferación de monocitos humanos (Schmitzová y col., 1998), péptidos de trigo sarraceno y pimiento (Leung y Ng, 2007; Diz y col., 2006), y péptidos derivados de las proteínas de arroz y soja, que estimulan los sistemas de inmunidad no específica (Kitts y Weiler, 2003). Entre las proteínas de la soja se encuentran inhibidores de proteasas, siendo el más estudiado el inhibidor Bowman-Birk que produce la regresión de la enfermedad en pacientes que padecen colitis ulcerosa (Lichtenstein y col., 2002).

I.1.3.8.- Actividad Quelante de Metales

Los compuestos nitrogenados más importantes que tienen actividad quelante de metales son los caseinofosfopéptidos, que son fragmentos derivados de la hidrólisis de la α_{s1} -caseína, la α_{s2} -caseína y la β -caseína. La mayoría de estos compuestos contienen una secuencia con tres grupos de fosfoserina seguida de dos residuos de ácido glutámico. Las cadenas laterales negativas, en particular las de los grupos fosfato, son

las responsables de la unión de los minerales, especialmente del calcio (Meisel, 1998). De este modo, los caseinofosfopéptidos previenen la precipitación del fosfato cálcico en la luz intestinal durante la digestión, compitiendo con el calcio por los iones fosfato (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Meisel, 2004; Lonnerdal, 2003), e incrementando la biodisponibilidad de este. Esto conduce a una mejora en la absorción de calcio a través de los enterocitos del intestino (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005). Además, las secuencias próximas a los grupos fosforilados determinan las diferencias en la actividad quelante del calcio de los distintos caseinofosfopéptidos (Schlimme y Meisel, 1995).

Aunque los caseinofosfopéptidos son más conocidos por su capacidad de unir Ca, también se ha observado que pueden acomplejarse con macroelementos como Mg o Fe o oligoelementos como Zn, Ba, Cr, Ni, Co y Se, sin alterar su solubilidad.

Estos compuestos podrían emplearse como suplementos dietéticos y preparaciones farmacéuticas en el tratamiento de alteraciones dentales o para mejorar la mala absorción mineral (Brule y col., 1982). De hecho, el uso de los caseinofosfopéptidos se ha propuesto en la prevención de la caries dental debido a su papel en la recalcificación del esmalte dental (Reynolds, 1987).

Además, los compuestos nitrogenados bioactivos quelantes de metales son capaces de quelar metales pro-oxidantes, como el hierro y el cobre, y por tanto, pueden proteger de la oxidación lipídica que produce el deterioro de los alimentos y el daño celular mediado por estrés oxidativo. Péptidos quelantes de cobre han sido purificados de hidrolizados de proteínas de girasol, y su actividad quelante depende del contenido de histidina y del tamaño del péptido (Megias y col., 2007). Esta propiedad fue atribuida al anillo imidazol presente en la histidina, el cual está directamente implicado en la captura del cobre por parte del péptido.

I.1.3.9.- Actividad Hipocolesterolémica

La hiperlipidemia, en especial la hipercolesterolemia, es uno de los factores de riesgo más importantes que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En este sentido, aquellos mecanismos o sustancias que reducen la incorporación de colesterol a la sangre son considerados beneficiosos para la salud. Se ha observado que hidrolizados proteicos de soja reducen la absorción de colesterol. Y se ha demostrado que estos hidrolizados disminuyen los niveles de colesterol en sangre de personas hipercolesterolémicas, y que decrecen la absorción *in vivo* del colesterol en ratas e *in vitro* en cultivos celulares. Esto es debido a que los compuestos bioactivos inhiben la absorción del colesterol, posiblemente debido a que disminuyen la solubilidad micelar del mismo. Para su absorción el colesterol es solubilizado en micelas y estos compuestos hipocolesterolémicos compiten con el colesterol por dichas micelas disminuyendo la solubilidad final de este y por tanto su absorción por las células del epitelio digestivo (Nagaoka y col., 2001).

Además, algunos compuestos pueden regular al alza los receptores LDL, que están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración del colesterol de la dieta (Sirtori y col., 1995).

Las proteínas de origen vegetal muestran frecuentemente efectos hipocolesterolemiantes en comparación con las proteínas animales. La soja es una de las fuentes proteicas vegetales con un efecto más claro en este sentido. Es más, su efecto se produce sólo sobre el colesterol LDL y no sobre el HDL, por lo que se produce un incremento relativo del colesterol HDL (“colesterol bueno”). Además, la soja disminuye la oxidación de las LDL, mejora la reactividad vascular y disminuye los niveles triglicéridos (Costa y Summa, 2000). El consumo de 25 g/día de proteína de soja como parte de una dieta baja en grasas saturadas puede producir una disminución de hasta un 8% del colesterol LDL en pacientes que tienen altos niveles de colesterol, mientras que no tiene efectos adversos en personas con niveles normales de colesterol. Gran cantidad de estudios demuestran que las isoflavonas presentes en los preparados de proteínas de soja (genisteína, daizeína y gliciteína) son las principales responsables del efecto de los

preparados de soja sobre el colesterol (Dewell y col., 2006). Además, Zhong y col, (2007) identificaron el péptido Trp-Gly-Ala-Pro-Ser-Leu que producía una inhibición de la solubilidad micelar del colesterol del 94,3% a partir de hidrolizados de proteína de soja con alcalasa.

Aparte de los péptidos derivados de la soja, otros compuestos bioactivos con efecto hipocolesterolemico han sido obtenidos a partir de β -lactoglobulina, hidrolizados de proteína de carne de cerdo (Morimatsu y Kimura, 1992; Morimatsu y col., 1996) y proteínas vegetales (*Brassica carinata*) (Pedroche y col., 2007).

I.1.3.10.- Otras actividades biológicas

Steijns (1996) ha descrito la acción estabilizadora del sistema inmunitario y moduladora del intercambio de proteínas y de glucógeno ejercida por el aminoácido Gln, así como las funciones inhibitoria de los depósitos de grasa y alterante del metabolismo ejercidas por el dipéptido Phe-Met.

La atriopeptina es un péptido presente de forma natural en la leche que actúa como un fuerte diurético, natriurético y vasorelajante, además de jugar un papel importante en la adaptación del neonato a la vida extrauterina (Jezova y col., 1996).

También se han identificado fragmentos trípticos de la β -caseína humana con actividad estimulante de la síntesis del ADN (Azuma y col., 1989).

La lactoferrina tiene efectos reguladores del crecimiento celular gracias a su capacidad de unión a gran variedad de células a través de su receptor específico (Field, 2005; Lonnerdal, 2003). De hecho, se ha demostrado que puede estimular el crecimiento celular en el intestino, además de mejorar la función digestiva e inducir el crecimiento de la microbiota patógena (Field, 2005; Lonnerdal, 2003). Por otra parte, se ha observado que actúa como factor de crecimiento esencial para líneas celulares de linfocitos (Lonnerdal, 2003).

Otras actividades biológicas de interés en la aplicación dietética y farmacéutica incluyen la inhibición de la secreción ácida de gastrina y de la motilidad gastrointestinal (Fiat y col., 1993), así como la inducción de la producción de colecistoquinina en ratas, hormona reguladora de la secreción pancreática y del vaciado gástrico, y relacionada con la saciedad, ejercida por el caseinomacropéptido (Beucher y col., 1994).

I.2.- ALIMENTOS CON COMPUESTOS NITROGENADOS BIOACTIVOS

En los últimos años el interés por el estudio y el desarrollo de alimentos funcionales y nutracéuticos ha experimentado un gran incremento, tanto por su evidente valor terapéutico como por su gran interés para la industria alimentaria, dada la gran repercusión económica que supone la comercialización de este tipo de alimentos y de los productos que los contengan (Bagchi, 2006; Burdock y col., 2006). Los alimentos funcionales se definen como los alimentos y componentes alimentarios que, tomados como parte de la dieta, proporcionan beneficios más allá de sus valores nutricionales tradicionales, bien sea mejorando una función del organismo o reduciendo el riesgo de enfermedad, en tanto que los nutracéuticos serían los componentes de los alimentos que aportan un beneficio añadido para la salud de carácter médico, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Sin duda, el campo de los compuestos nitrogenados bioactivos es altamente prometedor en el área de los alimentos funcionales ya que los consumidores ven la posibilidad de mejorar la salud o prevenir enfermedades mediante una alimentación más saludable.

I.2.1.- COMPUESTOS NITROGENADOS DE ORIGEN ANIMAL

I.2.1.1.- Productos lácteos

La leche es una fuente particularmente rica en péptidos bioactivos. Estos péptidos están encriptados en las caseínas (α_s , β , κ y γ -caseína) y en las proteínas del

suero (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, lactoferrina e inmunoglobulinas) (Belem y col., 1999; Gobbetti y col., 2002).

El aislamiento y la caracterización de péptidos bioactivos se han realizado fundamentalmente a partir de digeridos *in vitro* de proteínas lácteas (Brantl y col., 1979; Fiat y Jollès, 1989; Loukas y col., 1983; Maruyama y col., 1985; Meisel y col., 1991). La estructura abierta y flexible de las caseínas les hace muy susceptibles a la hidrólisis, lo que permite la liberación de un gran número y variedad de péptidos (Yamamoto y Takano, 1999).

Estos péptidos pueden liberarse por hidrólisis enzimática o microbiana. La hidrólisis enzimática, se ha llevado a cabo tanto utilizando una enzima sola como una combinación de proteinasas, como tripsina, alcalasa, quimiotripsina, carboxipeptidasa, pancreatina, pepsina, y enzimas de origen bacteriano o fúngico (como la proteinasa K obtenida de *Tritirachium album*). La hidrólisis microbiana ha permitido identificar péptidos bioactivos a partir de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, la cepa *Lactobacillus* GG, *Lactobacillus delbruskii* subsp. *bulgaricus* (Gobbetti y col., 2002; Korhonen y Pihlanto 2003; LeBlanc y col., 2002).

Las condiciones de procesado de la leche también afectan a la formación de compuestos nitrogenados bioactivos. En productos lácteos fermentados, las actividades de los compuestos dependen del tipo de bacteria utilizado en el cultivo iniciador y del grado de proteólisis. Una adecuada proteólisis puede facilitar la liberación de péptidos bioactivos, pero en un nivel excesivo puede hacer que disminuya la bioactividad. En productos con un bajo grado de proteólisis, como el yogurt y el queso fresco, la actividad inhibidora de la ECA es baja, mientras que quesos con un largo tiempo de maduración presentaron mayor acción inhibidora de la ECA (Korhonen y Pihlanto 2003). Péptidos hipocolesterolémicos también han sido identificados; como Ile-Ile-Ala-Glu-Lys, un péptido derivado de hidrolizados de β -lactoglobulina, que disminuyó el nivel de colesterol en el suero y el hígado (Nagaoka y col., 2001).

Los péptidos bioactivos derivados de la leche muestran diversas actividades fisiológicas. Por ejemplo, las β -casoquininas (derivadas de las α y β -caseínas) muestran actividades antihipertensivas e inmunomodulantes; la lactoferricina (f(17-41) de la lactoferrina) tiene actividad antimicrobiana; las casomorfina (derivadas de las α y β -caseínas) y las exorfina (f(90-96) de la α_{s1} -caseína) tienen actividad opioide; los caseinofosfopéptidos (derivados de la fosforilación post-translacional de las α_s - y la β -caseína) son quelantes de metales y el péptido Lys-Arg-Asp-Ser (f(17-41) de la lactoferrina) tiene actividad antitrombótica (Gobbetti y col., 2002; Korhonen y col., 1998; Meisel y FitzGerald 2003).

Hoy en día ya se comercializan diversos productos alimentarios, todos derivados de la leche, enriquecidos en péptidos bioactivos.

I.2.1.2.- Huevos

Varios péptidos bioactivos con acción inhibidora de la ECA y vasodilatadora han sido encontrados en la ovoalbúmina de huevo tratada con quimiotripsina y pepsina (Korhonen y Pihlanto, 2003). Entre ellos, dos péptidos vasodilatadores con las secuencias Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe perteneciente al f(359-364) de la ovoalbúmina y la ovoquinina (con la secuencia Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu perteneciente al f(358-365) de la ovoalbúmina), fueron aislados de los hidrolizados con quimiotripsina y pepsina, respectivamente (Fujita y col., 1995; Matoba, 1999).

Más recientemente, Tanzadehpanah y col. (2012) hidrolizaron clara de huevo de avestruz con varias proteasas (quimiotripsina, pepsina, tripsina y papaína) observando que el hidrolizado tratado con tripsina poseía una gran actividad antioxidante. De este hidrolizado, aislaron el péptido Leu-Thr-Glu-gln-GluSer-Gly-Val-Pro-Val-Met-Lys que era el que presentaba dicha actividad.

I.2.1.3.- Pescados y mariscos

Los compuestos nitrogenados bioactivos también pueden encontrarse en productos pesqueros, como en músculos de sardina, de atún o bonito (Yamamoto y col., 2003), y en la piel del abadejo de Alaska (Korhonen y Pihlanto, 2003).

Diferentes enzimas han sido utilizadas para generar estos compuestos bioactivos (Fujita y Yoshikawa, 1999). Por ejemplo, el péptido Leu-Lys-Pro-Asp-Met aislado de un digerido con termolisina de bonito desecado, presentó actividad inhibidora de la ECA y mostró un prolongado efecto tras su administración en animales (Yoshikawa y col., 2000). Tras la hidrólisis de proteínas de sardina con una proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*, la fracción separada con etanol presentó una fuerte acción inhibidora de la ECA. Se confirmó que esta fracción tenía un importante efecto in vivo tras su administración durante 4 semanas a voluntarios hipertensos (Matsui y col., 1993).

En ratas Zucker genéticamente obesas, hidrolizados de proteínas de pescado redujeron el nivel de colesterol en el plasma. Además, el ratio colesterol HDL:colesterol total fue mayor en estas ratas que en ratas Wistar alimentadas con los mismos hidrolizados (Wergedahl y col., 2004).

En hidrolizados de proteínas de ostra tratados con pepsina se ha encontrado el péptido His-Leu-Arg-Gln-Glu-Glu-Lys-Glu-Glu-Val-Thr-Val-Gly-Ser-Leu-Lys que posee actividad quelante de zinc (Chen y col., 2013).

Además, Wang y col. (2013) hidrolizaron proteínas de mejillón atlántico con pepsina, papaína, neutrasa y alcalasa obteniendo un péptido antioxidante con la secuencia Tyr-Pro-Pro-Ala-Lys.

I.2.1.4.- Carne y productos cárnicos

Aunque en menor grado que otras fuentes proteicas, las proteínas de la carne también están siendo investigadas en la obtención de compuestos nitrogenados con actividades biológicas.

Entre los compuestos bioactivos derivados de las proteínas de la carne, los péptidos con actividad inhibidora de la ECA han sido ampliamente estudiados (Arihara, 2006; Vercruyssen y col., 2005). La carne de pollo ha ido utilizada como fuente de péptidos antihipertensivos, detectándose varios péptidos antihipertensivos, Leu-Lys-Ala, Leu-Lys-Pro, Leu-Ala-Pro, Phe-Gln-Lys-Pro-Lys-Arg, Ile-Val-Gly-Arg-Arg-Arg-His-Gln-Gly, Phe-Lys-Gly-Arg-Tyr-Tyr-Pro, Ile-Lys-Trp, por acción de la termolisina (Fujita y col., 2000; Korhonen y Pihlanto, 2003). Arihara y col. (2001) hidrolizaron músculo esquelético porcino con 8 tipos de proteasas encontrando péptidos inhibidores de la ECA. Los hidrolizados con termolisina fueron los que presentaron mayor potencial inhibidor, siendo identificadas las secuencias Met-Asn-Pro-Pro-Lys y Ile-Thr-Thr-Asn-Pro, que procedían de la cadena pesada de la miosina. Estos péptidos mostraron actividad antihipertensora cuando fueron administrados por vía oral a ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Nakashima y col., 2002). También se han encontrado péptidos con actividad antihipertensiva e inhibidores de la ECA en proteínas del músculo esquelético de cerdo generados por la acción de bacterias ácido lácticas (Arihara y col., 2004). Katayama y col. (2003a, 2003b, 2004) también utilizaron proteínas de músculos esqueléticos de cerdo para sus estudios proteolíticos, aislando el péptido Arg-Met-Leu-Gly-Gln-Thr-Pro-Thr-Lys, correspondiente a la troponina C hidrolizada con pepsina. Saiga y col. (2003a) encontraron actividad de hidrolizados de músculo de pollo tratados con una proteasa de *Aspergillus* en ratas SHR. Además, aislaron cuatro péptidos inhibidores de la ECA de estos hidrolizados. Estos cuatro péptidos tienen en común la secuencia Gly-X-X-Gly-X-X-Gly-XX, que es homóloga con la del colágeno. Posteriormente, Jang y Lee (2005) evaluaron la actividad inhibidora de la ECA de varios hidrolizados enzimáticos de extractos de proteínas sarcoplásmicas de cuartos traseros de ternera. El péptido Val-Leu-Ala-Gln-Tyr-Lys fue purificado del hidrolizado con mayor actividad que fue el obtenido por acción de la termolisina junto a la proteinasa A.

Varios compuestos nitrogenados antioxidantes también han sido encontrados en hidrolizados de proteínas de la carne mediante digestión enzimática. Saiga y col. (2003b) encontraron que hidrolizados obtenidos de proteínas miofibrilares tratados con papaína y actinasa E mostraban altos niveles de actividad antioxidantes en los sistemas de peroxidación del ácido linoleico. Cinco péptidos antioxidantes fueron purificados de los hidrolizados con papaína, destacando el péptido con la secuencia Asp-Ala-Gln-Glu-Lys-Leu-Glu, que corresponde a una parte de la secuencia de la actina porcina. Posteriormente, Arihara y col. (2005) han investigado la actividad antioxidante de hidrolizados de actomiosina de músculo esquelético de cerdo usando el sistema hipoxantina-xantina oxidasa como fuente de aniones superóxidos. Se aislaron tres péptidos antioxidantes de los hidrolizados tratados con papaína, Asp-Leu-Tyr-Ala, Ser-Leu-Tyr-Ala, y Val-Trp. Además de su actividad *in vitro*, estos péptidos mostraron actividad *in vivo*.

Todos estos estudios realizados en fuentes de proteínas cárnicas se han llevado a cabo en carne fresca. Sin embargo, poco se sabe de los péptidos bioactivos generados durante la fermentación de los productos cárnicos crudos madurados o fermentados

Actualmente, se está comenzando a estudiar este tipo de productos para la obtención de nuevos péptidos con actividades biológicas. Hasta el momento, en productos crudos madurados, han sido aislados de jamón curado péptidos con actividad antioxidante, destacando los péptidos Ser-Ala-Gly-Asp-Pro-Asp y Gly-Leu-Ala-Gly-Ala, (Escudero y col., 2013a) y péptidos con actividad inhibidora de la ECA, destacando el péptido Ala-Ala-Ala-Thr-Pro (Escudero y col., 2013b).

I.2.2.- COMPUESTOS NITROGENADOS DE ORIGEN VEGETAL

La soja, trigo, maíz, arroz, cebada, trigo sarraceno y girasol, entre otras plantas, han sido utilizadas como fuentes de compuestos nitrogenados bioactivos. La mayoría de ellos se han utilizado para obtener péptidos por hidrólisis enzimática. Es interesante observar que dependiendo de la fuente de proteína inicial, la enzima usada, y las condiciones del proceso, las actividades biológicas de los péptidos son diferentes.

Cuando diferentes enzimas hidrolizan las proteínas de soja, se producen péptidos antioxidantes (Peña-Ramos y Xiong, 2002), péptidos con propiedades anticancerígenas (Kim y col., 2000), o péptidos con actividad antihipertensora (Wu y Ding, 2001).

Basándose en un péptido bioactivo secuenciado por análisis en bases de datos, se cree que la prolamina de arroz es uno de los mejores precursores de péptidos antihipertensivos (Dziuba y col., 2003). De forma similar, péptidos inhibidores de la ECA, como Leu-Gln-Pro, Leu-Ser-Pro, Leu-Ala-Ala y Phe-Tyr han sido identificados en hidrolizados con termolisina de α -zeína (Yamamoto y col., 2003). Varios di- y tri-péptidos (Tyr-Gln-Tyr y Pro-Ser-Tyr) del trigo sarraceno digerido fueron identificados considerando la magnitud de su acción inhibidora de la ECA (Li y col., 2002). Matsui y col. (1999) aislaron 16 péptidos inhibidores de la ECA compuestos por 2 a 7 residuos de aminoácidos de hidrolizados de germen de trigo. Ile-Val- Tyr fue identificado como el principal responsable de la actividad inhibidora de la ECA del hidrolizado.

Un péptido opioide con estructura Gly-Tyr-Pro-Thr también fue aislado de la digestión enzimática del gluten de trigo (Yoshikawa y col., 2003). Otros péptidos con actividad opioide fueron encontrados derivados de un constituyente de la espinaca, el Rubisco (D-ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) (Teschemacher, 2003).

Péptidos inmunomoduladores derivados de hidrolizados con tripsina de proteínas de arroz y soja actúan estimulando los aniones superóxidos los cuales desencadenan sistemas inmunes de defensa no específica (Kitts y Weiler, 2003). Un péptido de 9 aminoácidos (Gly-Tyr-Pro-Met-Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg) con actividades contractoras del íleon e inmunomoduladoras se encontró en hidrolizados de albúmina de arroz con tripsina.

En alimentos de origen vegetal también se han encontrado péptidos con actividad quelante de metales. Torres-fuentes y col. (2011) han encontrado actividad quelante en hidrolizados de proteínas de garbanzo con pepsina y pancreatina. Dentro de estos hidrolizados, observaron que los péptidos de pequeño tamaño y con alto contenido en His (alrededor del 20-30%) eran los que mejores actividades quelante tenían.

Además de todo lo detallado, la jalea real es un producto resultado de la unión entre el mundo animal y el vegetal, elaborado por las abejas a partir del polen, rico en proteínas y que ha sido utilizado como una buena fuente de compuestos inhibidores de la ECA. Matsui y col. (2002) encontraron que la jalea real intacta y sus fracciones no mostraban actividad inhibidora de la ECA. Sin embargo, tras una hidrólisis con pepsina, tripsina y quimiotripsina, se desarrolló dicha actividad. Además, la administración oral de este hidrolizado disminuyó significativamente la presión sanguínea en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

I.3.- PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS

I.3.1.- DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS

La desecación de los productos cárnicos representa la forma de conservación de la carne más antigua que se conoce. Entre los métodos de desecación de alimentos se encuentra el curado, que es una técnica de conservación derivada de la salazón. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada desde la antigüedad para prolongar la vida útil de los alimentos ya que permite conservarlos durante prolongados periodos de tiempo dando lugar a productos de elevada calidad (Molly y col., 1997).

Actualmente, el curado de los alimentos no se utiliza como método de conservación sino que se ha convertido en un proceso industrial de elaboración de productos de alta calidad, con características muy distintas a las de las materias primas y que se caracterizan porque se consumen crudos, se conservan sin necesidad de refrigeración, tienen un tiempo de vida útil prolongado y tienen escaso riesgo sanitario.

Los embutidos crudos curados están sujetos a un tratamiento de salazón-desecación-maduración sobre la materia prima. Estos productos tienen como ingrediente principal la carne que es mezclada con grasas, sales, especias y agentes de curado; los cuales son mezclados y embutidos en tripas naturales o artificiales y sometidos a un proceso de desecación durante el cual tiene lugar una fermentación microbiana que origina la acidificación del producto. Para favorecer esta fermentación, en muchos de

ellos se incorporan azúcares. Los microorganismos fermentadores no solo actúan en la estabilización microbiológica del alimento fermentado, sino que también contribuyen a las características organolépticas del mismo. Entre las características organolépticas cabe destacar su color, aroma, consistencia y sabor típicos, responsables de la identidad de los embutidos y muy apreciadas por el consumidor.

La conservación de estos productos se debe a la combinación del proceso de fermentación con otro de deshidratación. Tradicionalmente, se confiaba en una “fermentación natural”, sin embargo la producción a gran escala obligó a estandarizar los procesos para evitar posibles defectos. La inoculación de microorganismos para dirigir las fermentaciones había sido una práctica habitual en otros sectores de la industria alimentaria, como el lácteo, pero en la industria cárnica no se inició hasta la década de los 40. Las ventajas que reportó esta técnica fueron: períodos de maduración más cortos, uniformidad de la producción reduciendo la presencia de piezas defectuosas y mejora de las características sensoriales de los productos.

Otro aspecto de gran importancia en la utilización tecnológica de cultivos iniciadores es su contribución a la seguridad e higiene de los alimentos. Es bien conocido que las bacterias ácido lácticas producen una serie de sustancias antagonistas de otros grupos microbianos, que incluye productos finales del metabolismo como son ácidos orgánicos (láctico, acético y propiónico), peróxido de hidrógeno y diacetilo; así como otras sustancias de naturaleza antibiótica denominadas bacteriocinas. Algunos autores apuntaron la posibilidad de conservar los alimentos mediante la adición de cultivos iniciadores o por la incorporación de los metabolitos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas (Speck, 1972).

Así, los productos cárnicos curados fermentados son carnes inoculadas deliberadamente durante su elaboración para asegurar una actividad microbiana controlada y suficiente como para modificar las características del producto.

No obstante, la elaboración de embutidos fermentados presenta gran variabilidad debida básicamente a variaciones en la composición de los embutidos y a la tecnología de elaboración. Según Leistner (1986), la producción de embutidos fermentados crudos

curados involucra una tecnología imprecisa que permite grandes variaciones siempre que se mantenga el concepto básico de proporcionar una adecuada reducción del pH y/o de la actividad de agua (a_w).

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

Independientemente de las distintas tecnologías de elaboración, en España existe una extensa gama de embutidos curados. Según la Orden de 7 de febrero de 1980; BOE 21/3/80 podemos diferenciar en función del origen de las carnes y del grado de maduración-secado:

Chorizo

Se entiende por chorizo la mezcla de carnes picadas o troceadas de cerdo, o de cerdo y vacuno, con tocino y/o grasa de cerdo, adicionada de sal, pimentón y otras especias, condimentos y aditivos autorizados. Esta mezcla es amasada y embutida en tripas naturales o artificiales, y sufren un proceso de maduración-deseccación, con o sin ahumado. Se caracterizan por su coloración roja (con excepción de los denominados chorizos blancos) y por su olor y sabor característico. En el caso de chorizo de cerdo Ibérico la mezcla de carnes y tocino y/o grasa procede exclusivamente de cerdo Ibérico. En el mercado existen numerosos productos que responden a la definición anterior. Flores, (1999) los clasifica en función de:

- La forma: chorizo vela, rosario, herradura, etc.
- El calibre y tipo de tripa: chorizo y chistorra.
- Las características sensoriales: chorizo ahumado, blanco, casero o picante.
- El tamaño y tipo de materia prima: chorizo de lomo, de Pamplona o de Soria.

Salchichón

Se denomina salchichón a la mezcla de carnes picadas de cerdo, vacuno, o de cerdo y vacuno, con tocino y/o grasa de cerdo, adicionada de sal, especias y aditivos. Esta mezcla es amasada y embutida en tripas naturales o artificiales, sufriendo un proceso de maduración-deseccación que le asegura una buena estabilidad, así como un olor y sabor característicos. En el caso de salchichón de cerdo Ibérico la mezcla de carnes y tocino y/o grasa, procede exclusivamente de cerdo Ibérico. En el mercado existe una gran variedad de salchichón que tienen diferentes denominaciones según la forma, tripa, calibre, origen geográfico, características geográficas, etc.: salchichón de Vic, salchichón imperial, salchichón de Aragón, fuet, etc.

I.3.2.- PROCESO DE ELABORACIÓN DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS

La producción de un producto cárnico fermentado de calidad requiere un proceso fermentativo en el que se producen modificaciones físico-químicas provocando una reducción del contenido acuoso y una disminución de la a_w mediante la adición de sal. De este modo, se consigue una adecuada estabilización del producto sin peligros de alteraciones ni proliferación de microorganismos patógenos. Además se produce deshidratación, fermentación de carbohidratos y acidificación, desarrollo del color y diversas reacciones lipolíticas y proteolíticas (Casaburi y col., 2007; Ordóñez y col., 1999). Todos estos cambios son responsables de las características organolépticas del producto final.

La operación de fermentación o estufaje suele durar entre 5-10 días y se realiza a 18-22 °C y con una humedad relativa entre el 80-90% (Toldrá y col., 2001). La operación posterior de secado se realiza a una temperatura entre 10-15 °C y una humedad relativa del 65-80%. La duración del secado es variable, de 20 a 90 días (Flores, 1997), en función del diámetro del embutido y de si se pretende elaborar un producto de curado rápido o lento (tradicional).

En general, el proceso de elaboración de estos productos se puede resumir en tres etapas básicas que abarcan las distintas fases del proceso, y que incluiría la selección y preparación de materia prima, elaboración del producto, y por último, un secado-maduración (Figura I.2).

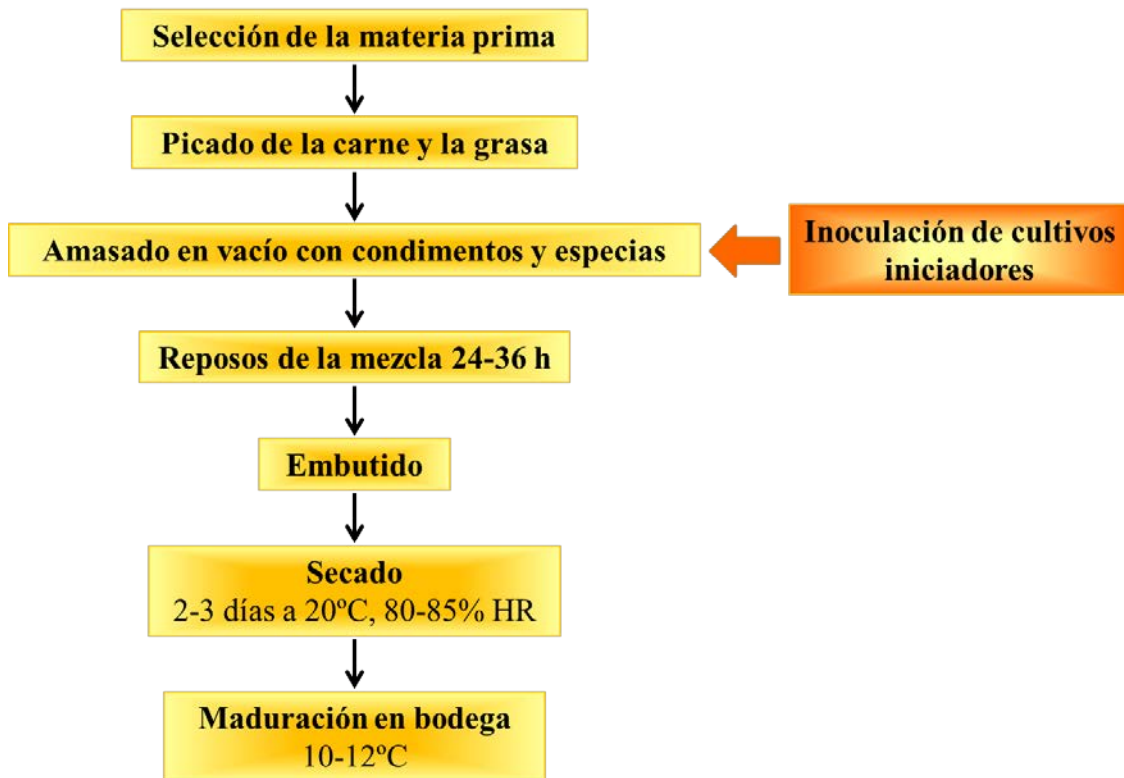


Figura I.2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de embutidos curados.

La calidad de las materias primas y la higiene del proceso son de vital importancia, por esto en todos los embutidos hay una selección previa de la materia prima.

La carne que se utiliza para la elaboración de estos productos debe reunir unos requisitos básicos para su empleo en la elaboración de embutidos. Debe ser carne sana libre de coágulos de sangre y con un valor de pH entre 5,6-6,0 y no superior a 6,2. No se aconseja utilizar carnes DFD (dry, firm, dark) ni PSE (pale, soft, exudative). La carne que se utiliza normalmente en Extremadura es de cerdo Ibérico de alta calidad.

La grasa es otro ingrediente fundamental ya que influye sobre determinadas características que afectan de forma decisiva a la calidad sensorial del producto cárnico fermentado: facilidad al corte, jugosidad y untuosidad. Además aporta ligazón, puesto que favorece la formación de la emulsión de los componentes de la masa, y participa en el aroma y sabor del embutido, por lo que cuanto mayor sea la cantidad de grasa, mayor será el sabor y el aroma. Por todo esto, para elegir la grasa se evalúan su consistencia, color, sabor y aroma.

Los aditivos, aunque son sustancias que no son necesarias para la elaboración de los embutidos, regulan la maduración, aumentan la calidad microbiológica, modifican las características organolépticas e incrementan el período de conservación de los productos. Los productos crudos curados requieren unos condimentos específicos del curado que incluyen la sal, los nitratos y nitritos, y los azúcares. En cuanto a las especias, su función es básicamente aromática y su empleo varía según el tipo de producto pero, en general, las más utilizadas son: pimentón, ajo, clavo, nuez moscada, cilantro, cebolla, orégano, pimienta y tomillo.

La sal común se ha utilizado tradicionalmente como saborizante y por su acción conservadora, ya que su adición provoca una disminución de la actividad de agua del producto, lo cual inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes. Además es imprescindible para lograr la ligazón de estos embutidos ya que favorece la solubilización de las proteínas miofibrilares de la carne y esto permite la formación de un gel estable y consistente.

Los nitratos y nitritos juegan un papel fundamental en el desarrollo del color típico de los embutidos crudos. En el proceso de enrojecimiento de las carnes curadas participan activamente microorganismos, principalmente pertenecientes a la familia *Micrococcaceae*, que reducen el nitrato a nitrito. Este nitrito se reduce posteriormente a óxido nítrico que se combina con la mioglobina para formar nitrosomioglobina (pigmento rojo del curado). Además de este beneficio tecnológico, el nitrito posee una marcada acción bactericida sobre el crecimiento de determinados microorganismos sensibles como *Salmonella* spp., aunque el nitrato no posee ningún efecto inhibitorio sobre los microorganismos. No obstante, algunos investigadores sugieren que la

cantidad de nitrito utilizada en los embutidos crudos curados (120-150 ppm) por sí sola, no inhibe el crecimiento de *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum* ni *Staphylococcus aureus*, aunque si es efectiva cuando se combina con otros factores como valores reducidos de aw y pH (Lücke y Hechelmann, 1985).

Los azúcares constituyen otro ingrediente básico en la elaboración de embutidos crudos curados ya que son el principal sustrato energético de los microorganismos que intervienen en el proceso de acidificación. Las bacterias ácido lácticas homofermentativas desdoblan los azúcares produciendo ácido láctico que reduce el pH de la masa cárnica a valores inferiores a 5,5. Este descenso del pH tiene varios efectos beneficiosos: reduce la capacidad de retención de agua favoreciendo la deshidratación del producto, inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y proteolíticos que pueden entorpecer el proceso de maduración del embutido, interviene en el proceso de enrojecimiento favoreciendo la reducción del nitrito a óxido nítrico, facilita la gelificación de las proteínas cárnicas garantizando la correcta ligazón y consistencia del embutido, y por último, la presencia de ácidos orgánicos contribuye al aroma del producto final. La cantidad y el tipo de azúcar añadido dependen del tipo de producto crudo a elaborar. Está comprobado que la adición de un 0,1 % de azúcar a la masa cárnica provoca un descenso en torno a 0,1 unidades de pH (Prändl y col., 1994). Los azúcares más utilizados en la elaboración de productos crudos curados son: glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa, aunque también se utilizan hidrolizados de almidón desecado.

Finalmente, 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 los alimentos con objeto de mejorar su aspecto, aroma y sabor, así como la conservación de los mismos, según la definición de Leistner y Echardt (1979). Los microorganismos añadidos se instauran como flora predominante dirigiendo la fermentación y excluyendo a la flora indeseable, así se reducen los riesgos higiénicos y de fabricación por deficiencias de origen microbiano. Actualmente su empleo es generalizado en la industria cárnica permitiendo homogeneizar la producción y evitar posibles defectos.

Una vez elegida la materia prima, se lleva a cabo la preparación de la mezcla de los ingredientes, la cual comienza con un picado de la carne y la grasa, más o menos fino dependiendo del tipo de producto que se vaya a elaborar. Tras esta operación se añaden el resto de ingredientes, entre los que debe encontrarse la sal, y se procede al amasado de la mezcla que, generalmente, se lleva a cabo en una amasadora a vacío.

La masa cárnica ya elaborada se mantiene en refrigeración durante 24-36 horas, a temperatura y humedad relativa controladas. Esto se hace para favorecer el “arranque” del cultivo iniciadora ya que puede verse afectado por las condiciones del producto tras el embutido. Transcurrido este periodo, se procede al embutido en tripas naturales con cuidado de excluir la mayor cantidad posible de oxígeno, ya que podría interferir en el desarrollo del color y sabor deseables en el producto final.

Una vez embutidas, las piezas son conducidas a secaderos donde se lleva a cabo una maduración natural, o bien, pueden madurarse en cámaras climáticas que permiten controlar las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente, así como la velocidad del aire. La duración de este periodo es variable en función de la clase de producto y su diámetro, pero suele oscilar entre unos 20 días (maduración rápida) y 90 días (maduración lenta) (Flores, 1997a). Para los embutidos elaborados mediante un proceso de maduración lenta, como los de cerdo Ibérico, las temperaturas óptimas deben oscilar entre 12 y 14 °C y la humedad relativa debe ser de un 80%.

La maduración de los embutidos crudos curados en cámaras climáticas, generalmente, consta de dos fases: estufaje y desecación o maduración propiamente dicha.

Durante el estufaje las piezas recién embutidas se someten a temperaturas que oscilan entre 22-26 °C y a una humedad relativa de 90%, aproximadamente. Esta fase es crucial para el buen desarrollo de la maduración ya que se producen importantes cambios físico-químicos y microbiológicos como consecuencia del proceso fermentativo iniciado por las bacterias lácticas, que provocan la acidificación del producto convirtiendo la glucosa en ácido láctico (Benito y col., 2007). Además, las

Micrococcaceas, inician el fenómeno de enrojecimiento llevando a cabo la reducción de los nitratos a nitritos durante las primeras 24 horas.

En la desecación o maduración se modifican las condiciones de temperatura y humedad relativa. El proceso puede realizarse a temperatura baja (inferior a 15 °C), intermedia ó alta (superior a 20 °C y hasta 28-30 °C) y con una humedad relativa entre 75-85%. Es muy importante que se controle adecuadamente la velocidad y distribución del aire en los secaderos, ya que durante esta fase se va a producir la mayor parte de la deshidratación del producto y es conveniente que este proceso se desarrolle de forma gradual en equilibrio con el resto de modificaciones que se producen en el embutido. De este modo, durante la maduración se produce una reducción del peso de los embutidos, entre un 20-40% del peso inicial, lo que está asociado a una disminución de los niveles iniciales de la a_w a valores en torno a 0,90 (Benito y col., 2007; Ordóñez y De La Hoz, 2001). Al mismo tiempo, la concentración de cloruro sódico (NaCl) aumenta durante el procesado debido a la difusión de la sal y a la pérdida de agua. Estas condiciones tan estrictas van seleccionando una flora autóctona de bacterias ácido lácticas y cocos Gram + catalasa + que juegan un papel importante en los aspectos de seguridad, y son capaces de multiplicarse y sobrevivir hasta el final del procesado, influyendo en las características sensoriales de estos productos (Benito y col., 2007; Bover-Cid y col., 2001a, b; Leroy y col., 2006; Montel y col., 1998).

I.3.3.- COMPOSICIÓN PROTEICA DE LA CARNE COMO MATERIA PRIMA

El tejido muscular contiene un del 19% de proteínas, que se pueden englobar en tres tipos: miofibrilares, sarcoplásmicas y del tejido conectivo.

Las proteínas miofibrilares (solubles en soluciones salinas de alta fuerza iónica) son la fracción mayoritaria y constituyen aproximadamente el 55% de la proteína total del tejido muscular. Esta fracción engloba distintos tipos de proteínas pero las más abundantes son la miosina y la actina.

Las proteínas sarcoplásmicas (solubles en agua y en soluciones salinas diluidas) constituyen el 25-30% de la proteína total del tejido muscular y engloba a enzimas y mioglobina.

Finalmente las proteínas del tejido conectivo constituyen una fracción insoluble en soluciones salinas y su representante mayoritario es el colágeno.

Los tejidos musculares de los vertebrados se pueden dividir, en base a su morfología y funcionalidad, en dos grandes grupos: músculos lisos o estriados. Estos últimos se dividen en músculo esqueléticos (conectado a los huesos) y músculos cardíacos (asociados al corazón), mientras que los músculos lisos rodean los órganos internos así como los intestinos y los vasos sanguíneos.

Las proteínas responsables de la contracción de los músculos son la actina y la miosina. La miosina es el componente estructural primario de los filamentos gruesos, mientras que los delgados están compuestos por actina, troponina y tropomiosina. Los filamentos gruesos y delgados están unidos en sarcómeros, que son la unidad funcional del músculo. Estos sarcómeros están longitudinalmente repartidos para formar miofibrillas. De una en una, las miofibrillas están unidas en paralelo para formar miofibras, y numerosas miofibras organizadas en paralelo forman las fibras del músculo. Como las proteínas están ancladas en bandas paralelas, le dan a los músculos esqueléticos y cardíacos una apariencia rayada o estriada (Randall y col., 1997) (Fig I.3).

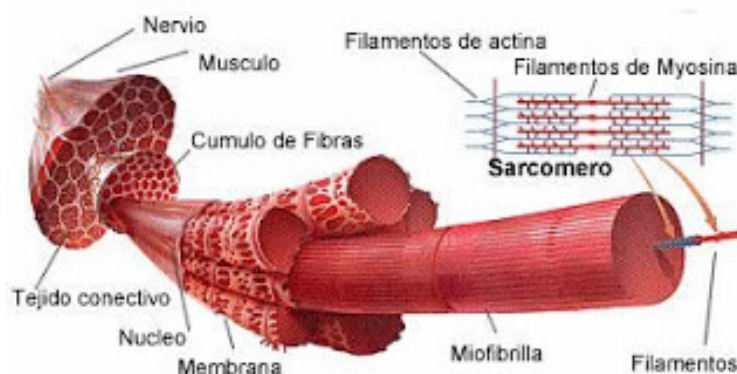


Fig I.3. Organización general de los tejidos del músculo esquelético

Los músculos lisos también están compuestos por filamentos gruesos y delgados, los cuales contienen las mismas proteínas que los músculos estriados, pero al no estar organizados en sarcómeros, no tienen apariencia estriada.

Durante la contracción de los músculos, los filamentos delgados se deslizan a lo largo, entre los filamentos gruesos, haciendo que los sarcómeros se acorten (Teoría de los Filamentos deslizantes) (Randall y col., 1997).

Mientras el músculo genera fuerza, el papel de la transmisión de la fuerza se atribuye al tejido conectivo extracelular que conectan los músculos. De este modo, cada final de un músculo está anclado a un hueso o a una estructura resistente de tejido conectivo, denominada tendón. El endomisio (que rodea por completo a los músculos) y el epimisio (que rodea cada fibra) se extienden más allá de los músculos para formar los tendones (Fig I.4).

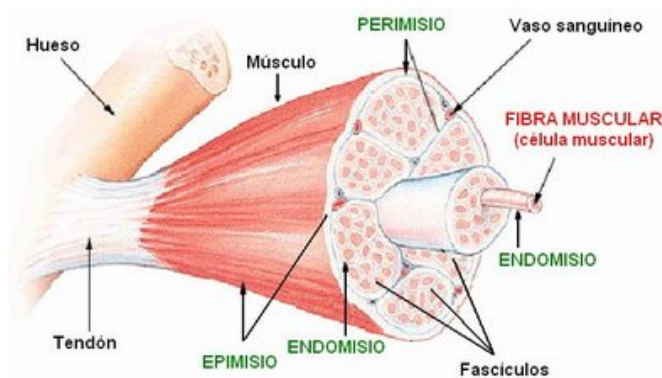


Fig I.4. Anclaje del tejido muscular con los huesos

El tejido conectivo consiste predominantemente en fibras de colágeno. El colágeno contiene grandes cantidades de hidroxiprolina, En la estructura primaria del colágeno se ha encontrado que se repite la secuencia glicina-prolina-hidroxiprolina-glicina-AA. Al menos, se han identificado 12 formas, cada una de las cuales tiene una secuencia única de aminoácidos. En la estructura secundaria, las cadenas moleculares están ancladas en hélices hacia la izquierda y tres de estas se combinan para formar una súper hélice a la derecha denominada tropocolágeno. Las moléculas de tropocolágeno se ensamblan para formar fibrillas y estas se agregan en fibras (Lawrie, 1991) (Fig. I.5.).

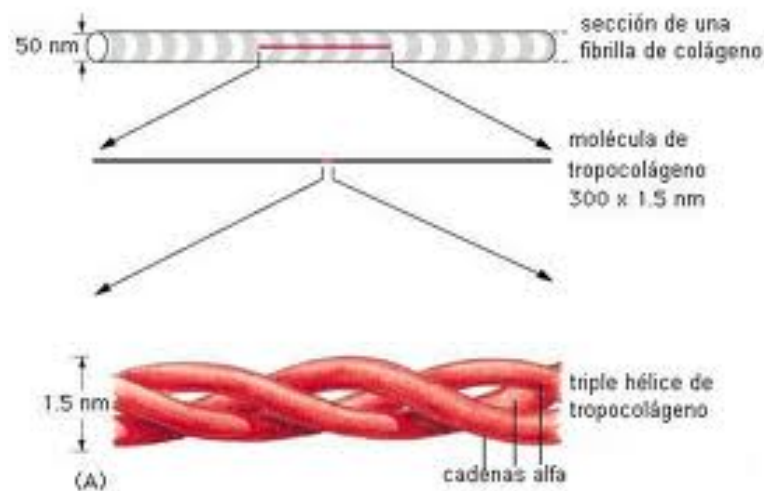


Fig 1.5. Estructura de las fibras de colágeno

I.3.4.- CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN LOS COMPUESTOS NITROGENADOS DURANTE EL PROCESADO

Los principales fenómenos bioquímicos que afectan a los componentes de los productos cárnicos fermentados durante la maduración son reacciones metabólicas (proteólisis) y químicas (oxidación lipídica, reacciones de Maillard y degradación de Strecker de ciertos aminoácidos). Como resultado de la actividad enzimática se liberan compuestos de bajo peso molecular, los cuales podrán ser utilizados por los microorganismos para su metabolismo e intervenir en posteriores reacciones bioquímicas de síntesis y lisis. Estas enzimas son las responsables de la apariencia, sabor y aroma característicos de estos productos así como de su conservabilidad y seguridad (Ordóñez y col., 1999; Ruíz y col., 2002)

En la figura I.6, pueden observarse los principales mecanismos de generación de sabor y aroma que se producen a lo largo de la maduración de los embutidos curados fermentados.

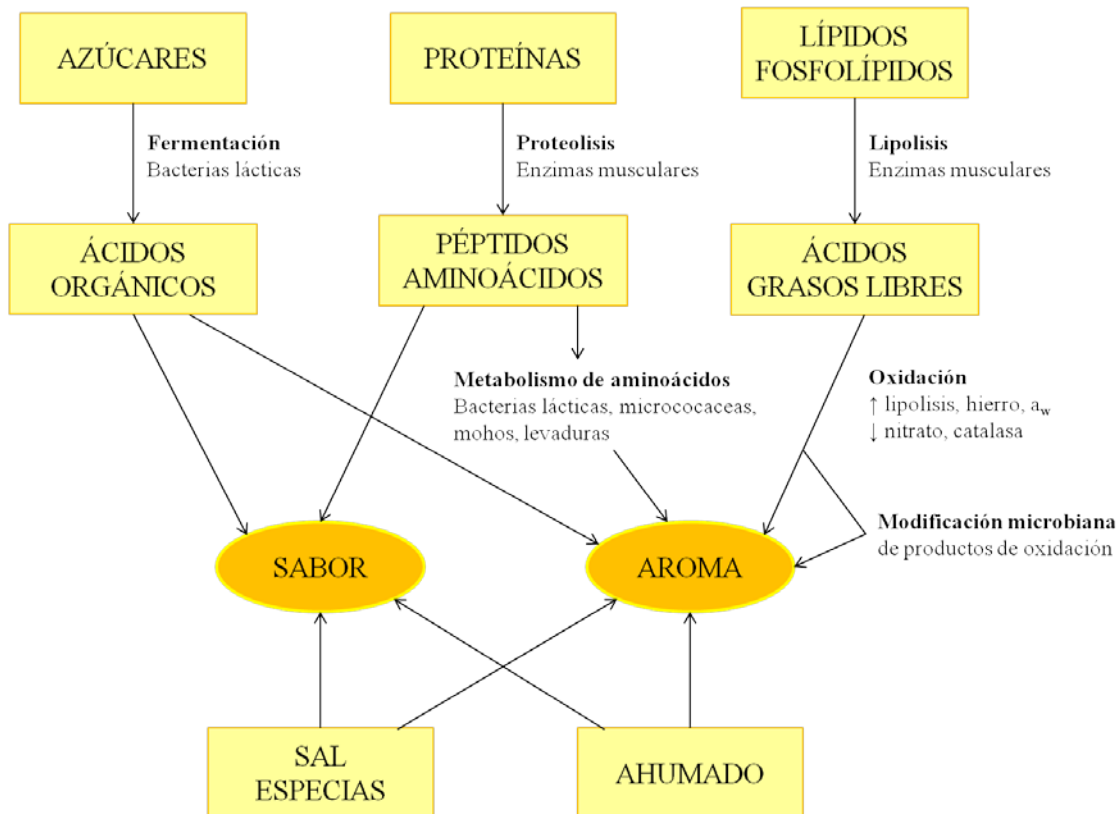


Figura I.6. Principales mecanismos de generación de sabor y aroma a lo largo de la maduración de embutidos fermentados (adaptado de Hammes y col., 2003).

Las proteínas son, junto a las grasas, los componentes mayoritarios de la materia seca de los productos cárnicos y constituyen el sustrato de una serie de reacciones bioquímicas que dan lugar a grandes modificaciones de la calidad sensorial de los embutidos, fundamentalmente relacionadas con la textura, el aroma y el sabor.

I.3.4.1.- Cambios en las proteínas

Los cambios que se producen en las proteínas de los embutidos durante la maduración están relacionados fundamentalmente con dos fenómenos: la solubilización y la proteólisis.

El fenómeno de la solubilización de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas se produce en los primeros estadios de la maduración como consecuencia del aumento de la fuerza iónica por la adición de sal y es el principal responsable del desarrollo de la textura y consistencia de los productos curados.

Los fenómenos de proteólisis en los productos cárnicos madurados se ven influenciados por varias variables como la formulación del producto, las condiciones del procesado y los cultivos iniciadores utilizados (Hughes y col., 2002). Estos procesos se deben principalmente a la acción de distintas proteasas de origen tisular o microbiano.

Entre las proteasas de origen muscular se encuentran las catepsinas, que son proteasas cuya actividad se ve favorecida por el pH ácido, lo que hace que los embutidos constituyan un medio óptimo para la actividad de estas enzimas. Cabe destacar, la catepsina D que es la responsable de la degradación de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares (Casaburi y col., 2008). La acción de las proteasas tisulares va disminuyendo durante las sucesivas etapas del curado, por la acción de la sal y por efecto del secado que se produce durante la maduración (Benito y col., 2005a), lo cual provoca la rápida inhibición de los enzimas endógenos.

Sin embargo, los enzimas microbianos son más importantes durante las últimas etapas de maduración (Hugas y Monfort, 1997; Hughes y col., 2002; Lizaso y col., 1999; Molly y col., 1997; Sanz y col., 1999). Esta actividad sobre proteínas cárnicas ha sido descrita en cepas de bacterias ácido lácticas y *Staphylococcus* (Benito y col., 2007; Casaburi y col., 2005; Drosinos y col., 2007; Fadda y col., 1999a, b; Martín y col., 2007; Mauriello y col., 2002, 2004; Rodríguez y col., 1998). También algunas cepas pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Mucor* poseen una actividad proteolítica importante en embutidos (Martín y col., 2002; Trigueros y col., 1995). Además, diferentes cepas de levaduras son activas frente a proteínas cárnicas tanto en medios de cultivo como en sistemas cárnicos (Durá y col., 2004; Martín y col., 2000 y 2004; Rodríguez y col., 1998).

I.3.4.2.- Cambios en los compuestos nitrogenados no proteicos

Los compuestos nitrogenados incluyen péptidos, aminoácidos y aminas, y suponen el 1,5% del peso fresco del músculo esquelético. Estos compuestos se incrementan según aumenta el grado de proteólisis de la carne. Por ello, los aumentos más marcados se han observado en los productos sometidos a fermentación. En embutidos crudos curados se ha observado un aumento de la fracción nitrogenada no

proteica que oscila entre el 10 y el 40% del nitrógeno total, dependiendo del tipo de embutido, siendo más acusado su incremento en los 20 primeros días de la maduración (García de Fernando y Fox, 1991). Benito y col., (2005a) observaron en embutidos de cerdo Ibérico un aumento de la fracción nitrogenada no proteica desde niveles iniciales de 2 mg N/materia seca hasta 5,2 mg N/materia seca a los 75 días de maduración.

El sabor de la carne viene determinado por compuestos hidrosolubles, entre los que se encuentran los aminoácidos, péptidos, nucleótidos, azúcares y ácidos orgánicos. Otros compuestos que están presentes en la carne, como son los dipéptidos entre los que destacan la carnosina (β -alanil-histidina), la anserina (β -alanil-1metilhistidina) y la balenina (β -alanil-3metilhistidina) (Belitz y Grosch, 1997; Buscailhon y col., 1994a, b) contribuyen al sabor amargo. Durante las primeras etapas de la maduración de los productos cárnicos se produce un incremento tanto de péptidos de diverso tamaño, como de aminoácidos libres, debido a la hidrólisis de las proteínas (Bolumar y col., 2001; DeMasi, y col., 1990; Díaz y col., 1993, 1996; Mateo y col., 1996; Zapelena y col., 1997). Al principio de la maduración predomina la formación de fragmentos de alto peso molecular, pero con el tiempo se van incrementando los de menor peso, algunos de ellos asociados a sabores amargo, ácido y salado (Henriksen y Stahnke, 1997).

En productos cárnicos fermentados, los aminoácidos son la fracción más abundante del nitrógeno no proteico al final de la maduración, siendo habitualmente la tasa de éstos de 2 a 10 veces superior a los valores existentes en carne fresca. Los que más aumentan son la alanina, leucina, valina, serina, glicina y prolina (Díaz y col., 1995). Aunque otros como el ácido glutámico, histamina y tirosina se muestran variables (Mateo y col., 1996). Los aminoácidos libres sufren diversas transformaciones químicas dando lugar a diferentes compuestos como aminas, cetoácidos, ácidos orgánicos y amoníaco, entre otros (Figura I.7). Todos estos compuestos afectan a las características sensoriales de los alimentos, y algunos de ellos de manera no deseable (Ventanas y col., 1992).

Las rutas de formación de estos compuestos en los productos cárnicos son la descarboxilación, la desaminación oxidativa, la transaminación y las reacciones de Maillard (Ordóñez y col., 1999; Talon y col., 2002).

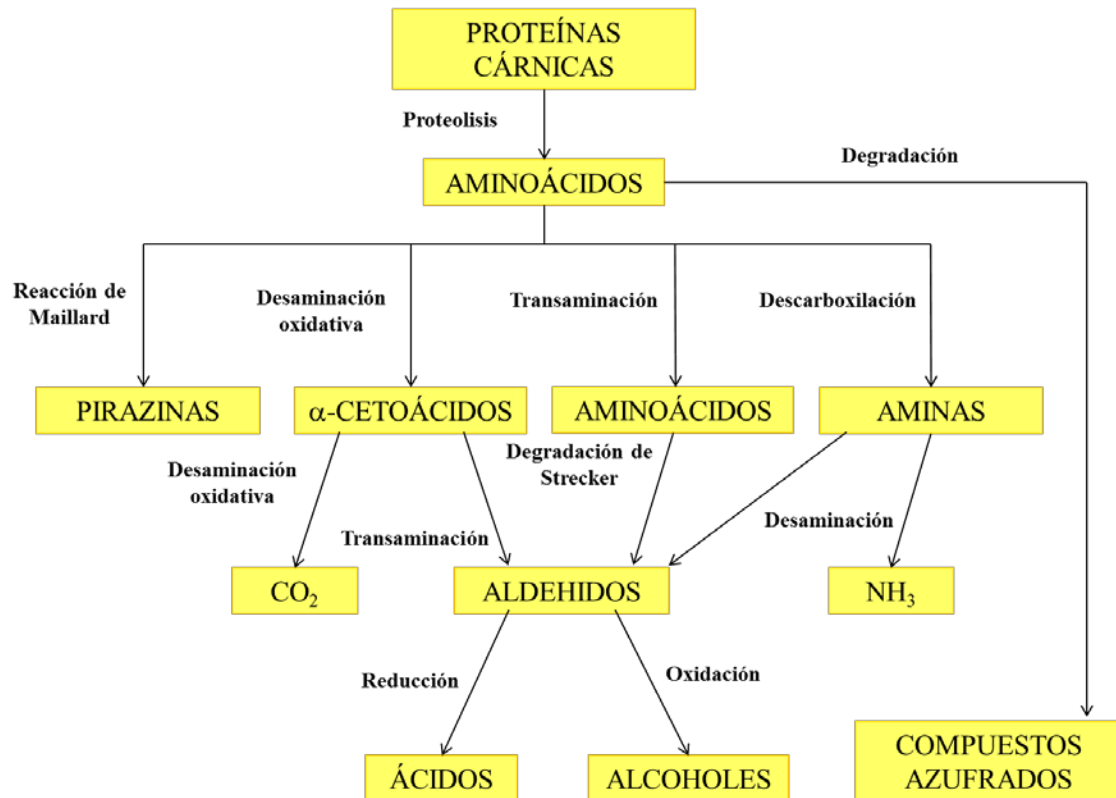


Figura I.7. Reacciones de transformación de los aminoácidos (Adaptada de Benito, 2002a).

La descarboxilación de los aminoácidos origina aminas, que son bases orgánicas de baja masa molecular con actividad biológica, poseen estructura alifática, aromática o heterocíclica. En general, las aminas biógenas más importantes en los alimentos son histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, espermina, espermidina y 2-feniletilamina (Shalaby, 1996). Los productos cárnicos fermentados pueden contener altas cantidades de aminas debido que contienen una alta cantidad de proteínas, unido a la actividad proteolítica que tiene lugar durante la maduración. Especies de BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* poseen actividad aminoácido descarboxilasa (Bover-Cid y Holzapfel, 1999; De Llano y col., 1998; Lonvaud-Funel, 2001; Maijala y col., 1993). Principalmente enterococos y lactobacilos se han relacionado con la producción de aminas biógenas en carne y productos cárnicos (Bover-Cid y col., 2001a; Halász y col., 1994). La presencia de concentraciones elevadas de aminas puede afectar al sabor del producto, pero también puede constituir un riesgo para la salud del consumidor. Un consumo excesivo de estas aminas tiene efectos toxicológicos, pudiendo causar problemas nerviosos, gástricos, intestinales y de presión sanguínea

(Suzzi y Gardini, 2003). Dado que son tóxicas, debe evitarse su formación a través de la selección y utilización de cultivos iniciadores que no las produzcan o que las metabolicen.

Por otro lado, la desaminación oxidativa de los aminoácidos produce amoniaco y α -cetoácidos. Estos últimos pueden participar en la formación de compuestos responsables del aroma del producto ya que el α -cetoácido puede sufrir una posterior decarboxilación dando lugar a un aldehído. En la fracción volátil de gran cantidad de productos cárnicos se han encontrado aldehídos ramificados que pueden formarse por esta vía a partir de aminoácidos (Andersen y Hinrichsen, 1995i; Hinrichsen y Pedersen, 1995; Martín y col., 2000; Ruíz y col., 1996).

Los aminoácidos también pueden sufrir reacciones de transaminación, en las que el grupo α -amino es transferido a un α -cetoácido, que en la mayor parte de los casos el acetoglutarato, de manera que queda el correspondiente α -cetoácido análogo del aminoácido y el aminoácido análogo al α -cetoácido (Lehninger, 1993). Estas reacciones están catalizadas por enzimas conocidas como aminotransferasas o transaminasas.

Algunos aminoácidos también están implicados en la degradación de Strecker, que consiste en la desaminación oxidativa y posterior decarboxilación de un aminoácido en presencia de un compuesto dicarbonilo. De este modo se generan aldehídos ramificados que, por oxidación, pueden formar sus correspondientes alcoholes, como el 2- y 3-metilbutanol y el 2-metilpropanol, o a partir de su reducción pueden formar ácidos, como el ácido 2-metilpropanoico y el 2- y 3-metilbutírico (García y col., 1991; Ruíz y col., 1998) que influyen en el sabor y aroma del producto final (Figura I.8 y Tabla I.5). Los aminoácidos azufrados, como la metionina y la cisteína, por degradación de Strecker generan tioderivados, metional y 2-mercaptoacetaldehído respectivamente, además de sulfuro de hidrógeno y dimetil sulfuro. Este tipo de compuestos azufrados se encuentran en todos los alimentos que contienen proteínas cuando se almacenan durante un período de tiempo prolongado (Barbieri y col., 1992). Aunque gran parte de estos compuestos parecen contribuir negativamente al flavor, algunos de ellos imparten aromas deseables, y al tener un bajo umbral de percepción pueden ser muy importantes en la formación del flavor en productos cárnicos (Edwards y col., 1999).

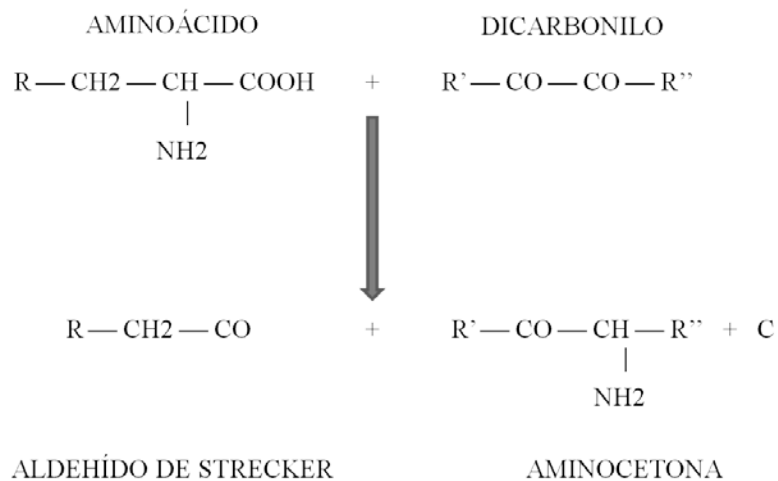


Figura I.8. Esquema de la degradación de Strecker de un aminoácido (Ruíz y col., 1998).

Tabla I.5. Aminoácidos implicados en la degradación de Strecker.

Aminoácidos	Aldehídos	Aroma
Glicina	Formaldehído	Étereo
Alanina	Acetaldehído	Picante/fruta
Cisteína	Acetaldehído	Picante/fruta
Valina	2-metil-propanal	Hierba/picante
Leucina	3-metil-butanal	Hierba/almendra
Isoleucina	2-metil-butanal	Hierba/almendra
Fenilalanina	Feniletanal	Miel/floral/jacinto
Ácido glutámico	Ácido 3-oxobutírico	
Metionina	Metional	Carne

Fuente: (Belitz y Grosch, 1997).

Además de la degradación de Strecker, otra fuente importante de compuestos volátiles en productos cárnicos son las reacciones de Maillard. Estas reacciones se producen entre aminoácidos y grupos reductores de azúcares y otros compuestos carbonílicos, particularmente productos de la peroxidación lipídica, e incluye condensación, deshidratación y polimerización. Como resultado de esta compleja reacción se generan una gran variedad de compuestos (Ordóñez y col., 1999; Toldrá, 1998).

La naturaleza de los aminoácidos presentes tiene un efecto determinante en el tipo y la cantidad de compuestos que se forman (Hwang y col., 1995). Los aminoácidos básicos y los que tienen grupos hidroxilos reaccionan fácilmente con los dicarbonilos, mientras que los aminoácidos ácidos y los no polares tienen una menor reactividad. La prolina y los aminoácidos con cadenas hidrofóbicas laterales reaccionan más lentamente que otros aminoácidos, mientras que el triptófano y otros con cadenas alifáticas que contienen alcohol, reaccionan más rápidamente. La lisina es el aminoácido más reactivo en las reacciones de Maillard, ya que su grupo amino no ionizado es un potente nucleófilo que puede catalizar la fragmentación de azúcares que participan en la degradación de Strecker.

La reacción de Maillard o de pardeamiento no enzimático ocurre bajo tratamiento térmico de los alimentos o durante almacenamientos prolongados a temperatura ambiente, contribuyendo a la formación de compuestos con aroma (Mottram y Whitfield, 1995). Estudios realizados revelan que la velocidad de reacción y la naturaleza de los compuestos volátiles formados dependen de factores como pH, contenido en agua y temperatura (Lendl, 1990).

Se ha descrito también la posibilidad de que reaccionen los productos de degradación de Strecker con los que se forman en la reacción de Maillard (furfurales, furanonas, dicarbonilos) formándose compuestos heterocíclicos como pirazinas, oxazoles, tiofenos (Whitfield, 1992). Las pirazinas también se han descrito como productos de degradación de Strecker, por la participación sobre todo de las cadenas laterales de aminoácidos como glutamina, asparragina y lisina (Hwang y col., 1994). Otro producto de la degradación de aminoácidos es el amoníaco que se produce en cantidades pequeñas durante la maduración (Córdoba y col., 1994).

I.3.5.- PAPEL DE LA ADICIÓN DE CULTIVOS INICIADORES SELECCIONADOS DURANTE EL PROCESADO DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS

Como se ha definido previamente, los cultivos iniciadores son microorganismos que se añaden a la carne con el fin de controlar adecuadamente el proceso de fermentación y maduración de los embutidos crudos curados de forma que se consiga estandarizar el proceso y la calidad de los productos elaborados. Los microorganismos añadidos se instauran como flora predominante dirigiendo la fermentación y excluyendo a la flora indeseable, así se reducen los riesgos higiénicos y de fabricación por deficiencias de origen microbiano.

Tradicionalmente, la maduración de los embutidos dependía de la microbiota que aportaban los ingredientes utilizados, y de la incorporada en las operaciones previas al embutido de la masa. De este modo se confiaba en una “fermentación natural” en la cual las condiciones predominantes en el embutido favorecían el crecimiento selectivo de la flora microbiana adaptada que generalmente estaba compuesta por bacterias ácido lácticas y micrococos. Una forma de asegurar que esta flora beneficiosa estuviera presente consistía en inocular una porción de carne fermentada previamente a la masa fresca, con lo cual se conseguían productos de mayor consistencia y estabilidad. Esta práctica fue utilizada durante muchos años con éxito hasta que en 1940, Jensen y Padock investigaron la posibilidad de utilizar una cepa de *Lactobacillus* en la elaboración de embutidos crudos curados, la cual generaba una importante reducción del tiempo de maduración, mejoraba las características sensoriales e inhibía el desarrollo de microorganismos peligrosos para la salud.

Esta experiencia despertó el interés de otros investigadores que iniciaron un estudio más profundo sobre los cultivos iniciadores y su aplicación a la industria cárnica. Se establecieron dos líneas de investigación: de un lado científicos norteamericanos (Deibel, 1956; Niven y col., 1954) recomendaron especialmente el empleo de *Pediococcus cerevisiae* para la elaboración de embutidos crudos curados. Por otro lado, científicos europeos (Niinivaara, 1955; Pohja, 1960) estudiaron la utilización de cepas de micrococos estableciendo las ventajas tecnológicas que conllevaba su uso. Posteriormente, Nurmi (1966) combinó ambos tipos de microorganismos, bacterias

ácido lácticas y micrococos, en cultivos mixtos, obteniendo resultados más satisfactorios que cuando se empleaban independientemente. Hasta la década de los 80 los cultivos iniciadores no empezaron a ser empleados de forma comercial (Hugas y col., 1992; Jessen, 1995; Smith y Palumbo, 1983), pero en la actualidad, el empleo de cultivos iniciadores en la fabricación de estos productos es una práctica habitual para mejorar la calidad y seguridad del producto final y normalizar el proceso de producción (Campbell-Platt y Cook, 1995; Hugas y Monfort, 1997; Lücke, 2000; Toldrá, 2006).

I.3.5.1.- Importancia del empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos fermentados

El sector industrial del cerdo Ibérico tiene grandes problemas de normalización y homogenización, hecho que puede hacer que aparezcan fraudes o imitaciones. Esto propicia un alto grado de desconocimiento por parte del consumidor y por consiguiente se produce una desconfianza en las distintas calidades de los productos. Dentro de este sector, la industria chacinera es la que presenta mayor variabilidad de producto terminado al no existir una estandarización en el proceso de producción ni tipificación en el producto final. La elaboración de embutidos con un procesado tradicional está poco controlada, no existiendo homogeneidad de unos lotes a otros. Durante la etapa de secadero es difícil controlar las bacterias lácticas y otros microorganismos que pueden crecer lo que supone, por un lado, un riesgo sanitario para el consumidor, y por otro, una gran variabilidad del efecto proteolítico y lipolítico ya que este depende de la flora desarrollada, con lo que es poco probable obtener lotes de productos de idénticas características (Benito y col., 2007; Martín y col., 2007).

En este sentido, el empleo de cultivos iniciadores en la industria cárnica ofrece una serie de ventajas al industrial y al consumidor, entre las que podemos destacar:

- Obtener embutidos más seguros para el consumidor, de mayor calidad y de mejores características sensoriales.
- Conseguir productos con una mayor homogeneidad entre los lotes.
- Los productores marcarían la tipicidad de sus productos y potenciarían la diferenciación frente a elaboraciones foráneas.

- La tipificación permite a la industria extremeña incrementar su radio de ventas a otras regiones de España.

Existen tres tipos de cultivos iniciadores:

Los cultivos iniciadores comerciales que proceden de productos lácteos o cárnicos centroeuropeos, por lo que no se adaptan a las condiciones de elaboración y de maduración de los embutidos.

Los cultivos iniciadores autóctonos, que se obtienen de a partir de productos cárnicos fermentados elaborados de forma artesanal y tradicional en la misma zona donde posteriormente van a ser empleados. De este modo se consigue una mayor adaptación del cultivo iniciador a las condiciones de elaboración y maduración, conservándose las características sensoriales propias del producto del que se aislaron

Finalmente, los cultivos iniciadores naturales consisten en inocular la masa que se desea fermentar con una parte de masa cárnica fermentada con anterioridad. Este sistema puede comportar ciertos riesgos porque aunque las bacterias lácticas estén incrementadas y perfectamente adaptadas al substrato cárnico, también puede ser elevado el número de otras bacterias, patógenas o alterantes no deseables.

Independientemente del tipo de cultivo, se pueden distinguir 2 grupos de cultivos iniciadores, los cultivos iniciadores propiamente dichos, con los que se intenta inducir cambios sensoriales deseables en el producto; y los cultivos protectores, utilizados para inhibir la flora microbiana no deseable en los embutidos (Geisen y col., 1992).

I.3.5.2.- Microorganismos que componen los cultivos iniciadores

Son numerosos los géneros microbianos utilizados en la composición de los cultivos iniciadores. Aunque los más empleados pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y las micrococáceas, se ha propuesto la utilización de otros géneros bacterianos como *Escherichia*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*,

Flavobacterium, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Corynebacterium* (Pätäjá, 1977). También se utilizan determinadas especies de levaduras y mohos como flora de superficie, aunque la finalidad en este caso es fundamentalmente de aromatización y mejora de la apariencia externa. Los microorganismos más utilizados como componentes de los cultivos iniciadores para la elaboración de productos cárnicos fermentados se recogen en la tabla I.6.

Tabla I.6. Microorganismos utilizados como cultivos iniciadores en embutidos crudos curados (Hammes y Bantleon, 1990).

Grupo microbiano	Especies usadas como iniciadores
Bacterias ácido lácticas	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus sake</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Micrococáceas	<i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Micrococcus varians</i>
Levaduras	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida famata</i>
Mohos	<i>Penicillium nalgiovensis</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>

Los cultivos iniciadores comerciales deben cumplir una serie de requisitos que son indispensables para que su aplicación genere los beneficios esperados. Estos requisitos se pueden agrupar en tres principios básicos: seguridad, competitividad tecnológica y viabilidad económica. En lo relativo a la seguridad, los microorganismos utilizados como iniciadores no deben poseer actividad tóxica ni patógena y las preparaciones deben elaborarse con la máxima higiene y estar libres de cualquier tipo de contaminante, biológico o químico. Con respecto a las funciones tecnológicas, los microorganismos inoculados deben predominar sobre la flora espontánea de la masa cárnica y desarrollar su actividad metabólica. Finalmente, en cuanto a los aspectos económicos, el empleo del cultivo iniciador debe ser viable económicamente y su manipulación fácil; además el almacenamiento de los preparados en congelación o liofilización no debe afectar a las propiedades de la cepa ni ocasionar pérdidas de su actividad (Buckenhüskes, 1993).

1.3.5.2.1.- Bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos muy heterogéneo que engloba cuatro géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Entre ellos, los más utilizados para la elaboración de productos curados son *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Los lactobacilos son el género que predomina de forma natural en este tipo de productos, por tanto, las cepas aisladas de estos productos que se utilizan como cultivos iniciadores están mejor adaptadas y se desarrollan más. Los pediococos no suelen encontrarse como parte de la flora natural de los embutidos curados pero su elevada resistencia al proceso de liofilización les ha convertido en uno de los géneros más utilizados en el mercado norteamericano (Hammes y Bantleon, 1990).

Las bacterias de este grupo se caracterizan porque todas son capaces de fermentar los carbohidratos produciendo principalmente ácido láctico. Esta fermentación se puede realizar por dos vías, lo que nos permite clasificar a estas bacterias en homofermentativas, que producen lactato como único producto de la fermentación de la glucosa, y heterofermentativas, que producen cantidades equimolares de lactato, etanol/acetato y dióxido de carbono a partir de la glucosa (Adams y Moss, 1997).

La principal función tecnológica de las bacterias lácticas en los embutidos curados se basa en su capacidad para producir ácido a partir de los carbohidratos añadidos a la masa. Los microorganismos utilizados como iniciadores son preferiblemente homofermentativos y descomponen los azúcares obteniendo ácido láctico como único producto final. Este ácido se acumula en el medio y como consecuencia se produce un descenso del pH que origina una serie de efectos beneficiosos, como son:

- Contribuir a la conservación del embutido, puesto que ayuda a seleccionar una flora bacteriana típica de modo que se inhibe el crecimiento de microorganismos no deseables.

- Participar en el desarrollo de la textura, ya que reduce la capacidad de retención de agua de las proteínas cárnicas y de este modo favorece el proceso de desecación. Además, acelera el mecanismo de gelificación de las proteínas miofibrilares.
- Participar en la aparición del sabor ácido.
- Inhibir a bacterias psicrótrofas contaminantes y patógenas.
- Favorecer la degradación de los nitritos y con ello la formación del color del curado (Hugas y col., 1992).

Además de todo esto, las bacterias ácido lácticas, controlan las reacciones enzimáticas, proteolíticas y lipolíticas, que contribuyen al desarrollo del sabor y aroma.

La aptitud de una cepa para ser un buen cultivo iniciador depende del tipo de producto que se desea fabricar y de las condiciones del procesado. Los preparados comerciales suelen incluir algunas de las siguientes especies: *L. plantarum*, *L. sake*, *L. curvatus*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*. Para que puedan desarrollar su aptitud tecnológica deben estar presentes en la masa cárnica en un número superior a 10^6 ufc/g.

Los principales criterios que se siguen para la selección de la cepa iniciadora más adecuada dependen en gran parte del tipo de embutido que se va a fabricar y de los atributos que se desea obtener en el producto final. Una cualidad deseable es una rápida producción de ácido al comienzo de la fermentación para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables.

La cepa seleccionada debe ser capaz de crecer a diferentes temperaturas y predominar durante todo el proceso de maduración. Es conveniente que establezca interacciones sinérgicas con otras bacterias del cultivo iniciador, en cambio, debe presentar una acción antagónica hacia los microorganismos tecnológicamente indeseables y los patógenos. En este sentido, es importante seleccionar cepas que tengan capacidad para sintetizar bacteriocinas, ya que aunque su actuación esté limitada, pueden participar como un elemento secundario de inhibición junto a otros factores como el pH, la a_w o la competencia por los nutrientes (Huisin't Veld, 1996).

La mayoría de los lactobacilos sintetizan peróxido de hidrógeno por la oxidación del lactato. Cuando es liberado a la masa cárnica, el H₂O₂ puede actuar negativamente y ocasionar fenómenos de decoloración y de oxidación de las grasas. Por tanto, las cepas seleccionadas para la industria cárnica no deben producir este metabolito, o bien, contener la enzima catalasa capaz de desdoblarlo.

Finalmente, otro aspecto tecnológico a tener en cuenta en la elección de las cepas es su posible participación en la formación del aroma. Distintos autores han defendido la importancia de la actividad lipolítica y proteolítica que pueden desarrollar ciertas bacterias lácticas en los embutidos (Curt y col. 2002).

1.3.5.2.2.- Micrococaceae y Staphylococaceae

La mayoría de los cultivos iniciadores utilizados en productos cárnicos curados son mixtos, incorporando principalmente *Micrococcus* y *Staphylococcus*, siendo las micrococáceas el segundo grupo de bacterias en importancia para la constitución de los cultivos iniciadores. *Staphylococcus* se ha constituido como el género más utilizado debido a su capacidad para crecer y metabolizar bajo condiciones anaeróbicas. A diferencia de las bacterias lácticas estos microorganismos se caracterizan por poseer la enzima catalasa, ser sensibles a los ácidos y tolerar mejor condiciones de baja a_w. En ocasiones, la diferenciación de micrococos y estafilococos es difícil ya que una única enzima puede decidir el resultado de una identificación (Weidenfeller y Fegeler, 1990).

Las especies del género *Staphylococcus* más frecuentemente utilizadas como cultivos iniciadores en los embutidos son: *Staphylococcus carnosus* (Jenssen, 1995; Leistner, 1995), *Staphylococcus xylosus* (Bersani y col., 1991; Jenssen, 1995; Leistner, 1995) y *Staphylococcus simulans* (Jenssen, 1995; Rocabayera, 1992). Tecnológicamente las diferencias entre estas especies son muy escasas (Lücke y Hechelmann, 1985). Para la selección de micrococáceas y estafilococos, debe garantizarse, en primer lugar, su seguridad toxicológica y posteriormente su aptitud tecnológica por su actividad nitratorreductasa, proteolítica y lipolítica.

En cuanto a los beneficios tecnológicos que reporta la utilización de micrococáceas y estafilococos como cultivos iniciadores figura la conservación de productos cárnicos, ya que evitan el enranciamiento, y su contribución a la formación y estabilización del color (Lücke, 1998; Montel y col., 1996). Del mismo modo, varios autores han reseñado el papel de estos microorganismos en fenómenos proteolíticos, lipolíticos, y en la formación del flavor en los salchichones (Berdagué y col., 1993; Engelvin y col., 2000; Martín y col., 2007; Tjener y col., 2004).

1.3.5.2.3.- Mohos

La inoculación superficial de los mohos antitoxigénicos como los de la especie *Penicillium* contribuyen a la calidad sensorial de los embutidos crudos curados (Bruna y col., 2000, 2001; García y col., 2001). Esta contribución se produce por la reducción de agua, la oxidación del lactato, la proteólisis y degradación de aminoácidos, la lipólisis, lipooxidación y el retraso del enranciamiento (Benito y col., 2003a, 2004, 2005b; Martín y col., 2004; Sunesen y Stahnke, 2003; Sunesen y col., 2004). Además, los mohos contribuyen al atractivo general del producto final debido a su apariencia y característico color blanco grisáceo, a la estabilización del color a través de la actividad de catalasa, y a la protección contra la luz y fácil pelado de la piel del embutido.

Se han descrito algunos mohos como los que presentan mayor actividad proteolítica en ensayos realizados sobre proteínas miofibrilares (Benito y col., 2003a; Martín y col., 2001; Rodríguez y col., 1998). Destaca especialmente una cepa de *Penicillium chrysogenum* que ha mostrado elevada actividad proteolítica sobre proteínas miofibrilares en ensayos en carne y en lomos madurados (Benito y col., 2003a, 2005b; Martín y col., 2002, 2004). En los ensayos realizados en lomos madurados esta mayor actividad proteolítica se tradujo en un incremento de compuestos volátiles derivados de aminoácidos (Benito y col., 2004, 2005b; Martín y col., 2003).

Por otra parte, *Penicillium chrysogenum* participa directamente en el perfil de los compuestos volátiles disminuyendo los productos de oxidación de ácidos grasos e incrementando otros como las pirazinas o pirroles (Martín y col., 2002). Estos cambios,

debidos en parte a la acción antioxidante del moho, contribuyen a mejorar las características sensoriales del producto.

I.3.5.3.4.- Levaduras

El papel de las levaduras en la formación del sabor en los embutidos crudos curados, está bien determinado. En varios estudios se ha demostrado que *Debaryomyces* spp. afecta a la proteólisis (Durá y col., 2004; Martín y col., 2002; Patrignani y col., 2007) y a la generación de compuestos volátiles (Andrade y col., 2010; Flores y col., 2004; Martín y col., 2000).

Por otra parte, debido al efecto fungistático del ajo o la presencia de otros cultivos iniciadores, las levaduras pueden morir antes de terminar el proceso de maduración, y no mejorar la calidad sensorial (Olesen y Stahnke, 2000). Otros autores han puesto de manifiesto como las levaduras aisladas de productos cárnicos curados, concretamente *Debaryomyces hansenii* han demostrado alta actividad proteolítica cuando se inocula en embutidos fermentados, mejorando sus características sensoriales (Bolumar y col., 2006; Durá y col., 2004; Flores y col., 2004; Martín y col., 2006, Patrignani y col., 2007).

I.3.6.- PAPEL DE LAS ENZIMAS EN EL PROCESADO DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS

El tratamiento con enzimas es uno de los métodos más utilizados para mejorar las características sensoriales de la carne y los productos cárnicos. Han sido utilizados con distintos fines como ablandadores, potenciadores del sabor y aroma, y para acelerar la maduración de los productos curados madurados (Andersen y col., 1995; Benito y col., 2003a, b, 2004, 2005a; Bolumar y col., 2003a, b; Engelvin y col., 2000; Fadda y col., 2002; Sanz y Toldrá, 2002).

I.3.6.1.- Ablandamiento

La terneza de la carne es uno de los atributos más valorados por los consumidores. Por ello, para conseguir mayor terneza se utilizan tanto métodos físicos (golpear la carne, someterla a congelación y descongelación) como químicos (utilizando enzimas proteolíticas).

Gran parte de la dureza de la carne se debe al tejido conectivo, de ahí que se hayan utilizado enzimas con actividad colagenolítica para ablandar la carne. Se han utilizado enzimas proteolíticas con actividad colagenasa de bacterias (Foeding y Larick, 1986) y también procedentes de mamíferos como la utilizada por Phillips y col. (2000), procedente de la placenta de bóvidos. Ambos fueron propuestos como ablandadores por su gran actividad hacia el tejido conectivo.

Además, diversas proteinasas microbianas y vegetales se utilizan para acelerar el proceso de maduración de la carne y aumentar su blandura. Las más utilizadas son las tiol proteinasas de origen vegetal: papaína, ficina y bromelina (Díaz y col., 1997; Lawrie, 1998). Melendo y col. (1996) utilizaron la bromelina con el fin de intentar mejorar la textura de embutidos curados tipo chorizo. Estos autores observaron que el enzima producía un importante ablandamiento de la masa cárnica, sobre todo durante las primeras 48 h, que podía llegar a ser excesivo cuando la cantidad de enzima añadido era muy elevada. Díaz y col. (1996) estudiaron el efecto de la adición de distintas concentraciones de papaína en embutidos y observaron un aumento en la proteólisis y un ablandamiento de las muestras inoculadas. Este mismo enzima junto con proteasas de *Aspergillus* sp. fueron igualmente probadas en carne por Gerelt y col. (2000) observando una importante degradación de la estructura miofibrilar y por tanto, un aumento de la terneza.

Pero también hay que tener en cuenta los efectos negativos del ablandamiento por proteasas. Algunos autores han detectado ablandamientos excesivos por acción de proteasas sobre proteínas musculares produciéndose defectos en la textura y en el sabor (Díaz y col., 1997; Zapelena y col., 1998).

I.3.6.2.- Aceleradores de la maduración y potenciadores del sabor y aroma

Como se describió anteriormente, el desarrollo del flavor y el aroma de la carne y los productos cárnicos está relacionado con una serie de reacciones químicas y bioquímicas que aún no se conocen en su totalidad aunque en los últimos años se ha conseguido profundizar más en ellas. El desarrollo de esas reacciones lleva un cierto tiempo, pero gracias al conocimiento de algunas de ellas se puede intentar acelerarlas y/o potenciarlas para obtener productos que proporcionen una mayor intensidad de ese flavor y olor y disminuir el tiempo de maduración de los productos.

La adición de proteasas con este fin ha sido muy utilizada. En este sentido, una proteasa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151 fue probada por Naes y Nissen-Meyer (1992) y Naes y col. (1991, 1995). Díaz y col. (1993, 1996, 1997) ensayaron la adición de distintas concentraciones de pronasa E de *Streptomyces griseus*, aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae* y papaína. Sandtorv y col. (1995) y Hagen y col. (1996) estudiaron el efecto de una proteasa de *Bacillus licheniformis* en embutidos fermentados. Zapelena y col. (1997) estudiaron el efecto de la adición de una metaloproteinasa de *Bacillus subtilis* (Neutrasa) junto con un cultivo iniciador mixto (*L. plantarum* y *S. carnosus*) en embutidos tipo chorizo.

En todos los experimentos se produjo una mayor degradación de las proteínas cárnicas y, debido a ello, una mayor acumulación de péptidos y de aminoácidos libres. De este modo, se produjeron cambios químicos importantes en las distintas fracciones nitrogenadas (nitrógeno no proteico, nitrógeno básico volátil, aminoácidos libres y aminas). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en las propiedades sensoriales, salvo en los casos en los que se añadían cantidades muy elevadas de enzimas, en los que se apreciaba un ablandamiento excesivo (Díaz y col., 1997; Zapelena y col., 1998).

Zapelena y col. (1999) detectaron ligeras mejoras sensoriales después de la adición a embutidos de una proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* sola y en combinación con un cultivo iniciador mixto (*L. plantarum* y *S. carnosus*). Por otro lado, Bruna (2000) afirman que el uso de la pronasa E sobre la carne también produce una

serie de cambios químicos como el aumento de aminoácidos libres, aminas biógenas y amoníaco, además de cambios en la textura del producto, pero cuando se añade junto con un extracto intracelular de *Penicillium aurantiogriseum* se generan una gran cantidad de compuestos volátiles responsables de aroma de estos productos.

Finalmente, la utilización de una proteasa extraída del moho *Penicillium chrysogenum* aislado de jamón curado, denominada EPg222 (actualmente patentada por la Universidad de Extremadura), ha mostrado elevada actividad proteolítica sobre proteínas miofibrilares “*in-vitro*” y en ensayos sobre carne y embutidos crudos-madurados (Benito y col., 2002b, 2003a, b, 2004, 2005a; Casquete, 2011b), generando pequeños péptidos y aminoácidos a partir de las proteínas cárnicas. Este enzima ha sido expresado en *Pichia pastoris*, permitiendo obtener EPg222 a gran escala (Benito y col., 2006) para ser utilizado como aditivo en los productos cárnicos.

II.- OBJETIVOS

1. Evaluar la capacidad de cepas preseleccionadas de bacterias ácido lácticas y cocos gram + catalasa + para la producción de compuestos nitrogenados bioactivos durante el procesado de productos cárnicos fermentados inoculados con cultivos iniciadores autóctonos y con la enzima EPg222, de forma combinada o por separado.
2. Estudiar las actividades funcionales *in vitro* presentes en los compuestos nitrogenados generados durante el procesado de los embutidos fermentados de cerdo ibérico.
3. Analizar el efecto de la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre los compuestos nitrogenados presentes en los extractos peptídicos y sus actividades funcionales.
4. Correlacionar el perfil de los compuestos nitrogenados bioactivos mayoritarios obtenidos tras el procesado de los embutidos fermentados con las actividades funcionales presentes en los extractos.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- MATERIAL GENERAL

III.1.1.- Reactivos químicos y medios de cultivo

Los reactivos utilizados para el desarrollo de la parte experimental de este estudio han sido suministrados por las casas comerciales OXOID, PRONADISA, ACROS, SIGMA-ALDRICH, MERCK, SCHARLAB Y PANREAC.

Los gases utilizados fueron suministrados por AIR LIQUIDE.

Los medios de cultivo, suplementos y demás productos utilizados para la realización de las pruebas microbiológicas fueron adquiridos a las casas comerciales OXOID, MERCK, CULTIMED, PRONADISA, VIOCULT, BIOMEDIX, BIOKAR Y SCHARLAB. Para las preparaciones de los medios se siguieron las indicaciones prescritas por cada fabricante.

III.1.2.- Instrumental

Para las pesadas rutinarias se utilizó una balanza Monobloc, METTLER TOLEDO, modelo B2002-S. Pesada máxima: 2.100 g, precisión $\pm 0,01$ g. Las pesadas de mayor precisión se llevaron a cabo en una balanza METTLER TOLEDO modelo AB54-S, de precisión $\pm 0,0001$ g.

Los reactivos y medios de cultivo se prepararon en agitadores magnéticos de SELECTA con calefacción, modelo AGIMATIC-E.

La esterilización de los medios de cultivo y reactivos, así como del material utilizado, se llevó a cabo en un autoclave SELECTA modelo PRESOCLOVE 75.

Las muestras, microorganismos y reactivos se conservaron en dos tipos de congeladores verticales; uno marca ZANUSSI modelo Tropic Sistem (-20 °C) y otro Forma Scientific a -80 °C; y en un frigorífico ZANUSSI Tropic Sistem.

Para la realización de las diluciones y medida de los volúmenes se utilizaron micropipetas BIOHIT Proline de volúmenes: 0,5-10 μl ; 5-50 μl ; 50-200 μl , 200-1.000 μl y de 1-5 ml; y micropipetas PLURIPET KARTELL de 0,1-2 μl , 0,5-10 μl y de 2-20 μl .

Para agitar los tubos de muestras o microorganismos se usaron agitadores de tubos HEIDOLPH, mod. Reax-top

Las incubaciones se realizaron en una estufa de hibridación HYBAID modelo Shake “n” Stack, y en estufas SELECTA mod. CONTERM 80L y CONTERM 150L, incubador de CO₂ mod. NUAIRE airjacketed GH Autoflow Automatic mod. 2004, una estufa Hotcold-M refrigerada y un incubador orbital BRAUN BIOTECH mod. IS.

Las mediciones de la actividad del agua se realizaron con un medidor LABMASTER. A_w NOVASINA.

Para la medición del pH se utilizó un pHmetro de electrodo combinado, de la marca CRISON, modelo Basic20.

En el análisis microbiológico, para el homogeneizado de las muestras se utilizó un Stomacher, mod. LAB BLENDER 400.

Las siembras se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar TELSTAR mod. AV-100.

Los recuentos de colonias se llevaron a cabo en un contador automático COMECTA mod. DIGITAL S.

Las muestras fueron trituradas utilizando una picadora MOULINEX y homogeneizadas mediante un homogeneizador de cuchillas SORVAL OMNIMIXER, mod. 17106.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en las siguientes centrífugas: centrífuga de sobremesa MICROSPIN SORVALL modelo 24S y una centrífuga de sobremesa refrigerada EPPENDORF, modelo 5810 R.

Para el filtrado de las muestras se utilizaron filtros GELMAN SCIENCES de 0,2 μm de diámetro de poro y WHATMAN N° 54.

Para la desecación de las muestras y digestión se utilizó un baño de arena RAYPA BS-3920.

La medición de la absorbancia para la determinación del nitrógeno no proteico así como la del nitrógeno aminoacídico realizó en el espectrofotómetro BIOMATE 3.

La ultrafiltración de los extractos se llevó a cabo con membranas de ultrafiltración MILLIPORE PELLICON XL FILTER PXB010A50 y PXB005A50 adaptadas a una bomba peristáltica MASTERFLEX mod. 77201-60.

Los extractos se liofilizaron con un liofilizador TELSTAR modelo 50, CRYODOS.

Para las esterilizaciones por filtración se utilizaron filtros MILLIPORE de 0,22 μm de tamaño de poro.

Para realizar la medida de la fluorescencia de las muestras se utilizaron placas negras de poliestireno y un lector de fluorescencia en microplacas FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech.

Los recuentos de esporas de moho se llevaron a cabo en cámaras de Neubauer de MARIENFELD y observadas en un microscopio BIOX 2000.

Para la medición de la actividad antimicrobiana se utilizaron placas multipocillo de polipropileno transparentes y un lector de microplacas y turbidómetro BIOSCREEN C.

La obtención de agua destilada tuvo lugar con un destilador de agua USF ELGA y un sistema de purificación de agua Mili-Q mod. ELGASTAT UHQ II (Millipore, USA) para el agua desionizada.

Además, se utilizó diverso material de uso general de laboratorio, como destilador de agua, matraces, vasos de precipitado, probetas, etc.

En el tratamiento estadístico de los datos se empleó el programa informático SPSS para Windows, 22.0.

III.2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

III.2.1.- Material biológico

Para la realización del presente trabajo se utilizaron dos cepas de *Pediococcus acidilactici* (MS198 y MS200) y una cepa de *Staphylococcus vitulus* (RS34) (*S. vitulinus*) sinónimo de *S. pulvereri* (Stepanovic y col., 2005) aisladas de embutidos crudos curados fermentados (salchichón y chorizo) procedentes de industrias cárnicas del norte y sur de Extremadura, y elaborados mediante procesado tradicional sin la adicción de cultivos iniciadores (Tabla III.1 y Tabla III.2). Estas cepas fueron preidentificadas y preseleccionadas por sus características tecnológicas y antimicrobianas “*in vitro*” por el Área de Nutrición y Bromatología de la Escuela de Ingenierías Agrarias de Badajoz (Casquete, 2011a; Benito y col., 2007; Martín y col., 2007). Posteriormente, fueron identificadas y seleccionadas en base a nuevas aptitudes tecnológicas (Casquete, 2011a). También se utilizó el enzima EPg222 (Patente con número de publicación 2 220 176; OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS DE ESPAÑA) el cual se obtuvo por sobreexpresión en *Pichia pastoris* transformada con el gen de la proteasa EPg222 (Benito y col., 2006).

Tabla III.1. Cepas de bacterias ácido lácticas preseleccionadas por sus características tecnológicas y antimicrobianas para este estudio (Benito y col., 2007).

CEPAS	PRODUCCIÓN			CRECIMIENTO				ACTIVIDAD		
	Aminas biógenas ^a	Ácido láctico (µg/mL)	Ácido acético (µg/mL)	a _w	pH	%NaCl	T ^a (°C)	Lipolítica ^b	Proteolítica ^c	Antimicrobiana
MS198	-	58,52	2,44	0,75-0,99	4,5-5,5	≤ 10	4-45	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
MS200	-	43,33	1,90	0,75-0,99	4,5-5,5	≤ 10	4-45	+	+	<i>L. monocytogenes</i>

^a -: rango < 10µl/mL

^b +: rango 1 a 4 mm

^c % de reducción en la intensidad con respecto al control, +: rango 10 a 50 %

Tabla III.2. Cocos Gram + Catalasa + preseleccionadas por sus características tecnológicas y antimicrobianas para este estudio (Martín y col., 2007).

CEPA	PRODUCCIÓN		CRECIMIENTO		ACTIVIDAD		
	Aminas biógenas ^a	Reducción de nitrato ^b	a _w	pH	Lipolisis ^c	Proteolisis ^d	Antimicrobiana
RS34	-	+++	≥ 0,75	≥ 4,5	-	+	<i>L. monocytogenes</i>

^a -: rango < 10µl/mL

^b +++: >85% de nitrato reductasa

^c -: no hidrólisis

^d % de reducción en la intensidad con respecto al control, +: rango 10 a 50 %

III.2.2.- Métodos

III.2.2.1.- Elaboración de embutidos y toma de muestras

Para la realización del presente estudio se elaboraron dos tipos de embutidos (chorizos y salchichones) en dos industrias con procesados diferentes, tal y como se detalla en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Lotes de embutidos elaborados en el presente estudio.

Producto	Industria 1		Industria 2
	Chorizo	Salchichón	Salchichón
Lotes	Control	Control	Control
	P198S34	P198S34	
	P200S34	P200S34	P200S34
			EPg222
			P200S34+EPg222

III.2.2.1.1.- Industria 1: chorizos y salchichones.

Para la elaboración de los chorizos en la industria 1 se utilizó carne de cerdo Ibérico a la que se adicionó: 2% de NaCl, y una mezcla de pimentón, dextrina, dextrosa, lactosa, nitrato sódico y ascorbato sódico en las cantidades y condiciones recomendadas por el fabricante. Se adicionó 0,1 g/Kg de carne del cultivo iniciador correspondiente compuesto por bacterias ácido lácticas (BAL) y *Staphylococcus*, en una concentración de 5×10^7 ufc/Kg de carne (Tabla III.3.). Así, se elaboraron tres lotes de chorizos de 30 Kg cada uno.

Tabla III.4. Lotes de chorizos elaborados en la industria 1.

Lotes	Cepa inoculada	Cantidad inoculada (ufc/Kg)
P198S34	<i>P.acidilactici</i> MS198 + <i>S.vitulus</i> RS34	5×10^7
P200S34	<i>P.acidilactici</i> MS200 + <i>S.vitulus</i> RS34	5×10^7
Control	-	-

Para la elaboración de los salchichones se utilizó carne de cerdo Ibérico a la que se adicionó: 1 g/Kg de pimienta blanca, 1,5 g/Kg de pimienta negra, 30 gr/Kg de NaCl y una mezcla de dextrina, dextrosa, lactosa, nitrato sódico y ascorbato sódico en las cantidades y condiciones recomendadas por el fabricante. Se añadió un cultivo iniciador compuesto de bacterias ácido lácticas y *Staphylococcus*, en una concentración de 5×10^7 ufc/Kg de carne, elaborando tres lotes de salchichones de 30 Kg cada uno como se detalla en la tabla III.5.

Tabla III.5. Lotes de salchichones elaborados en la industria 1.

Lotes	Cepa inoculada	Cantidad inoculada (ufc/Kg)
P198S34	<i>P.acidilactici</i> MS198 + <i>S.vitulus</i> RS34	5×10^7
P200S34	<i>P.acidilactici</i> MS200 + <i>S.vitulus</i> RS34	5×10^7
Control	-	-

Una vez mezclados todos los componentes en la amasadora, se colocaron las mezclas en bateas y se procedió a embutir los lotes en tripa de toscal de vacuno de aproximadamente 6 cm de diámetro, obteniéndose unos embutidos que tenían unos pesos medios de entre 0,8-1 Kg. Todos los embutidos fueron convenientemente etiquetados y sellados. Posteriormente fueron colgados en palés y llevados a la cámara de maduración donde permanecieron a 8 °C y a una humedad relativa del 75-80% durante 3 días. Finalmente, pasaron a bodega, donde permanecieron hasta los 63 días con una temperatura de 12 °C y una humedad relativa del 70%, para completar su maduración.

Las tomas de muestra de ambos embutidos se realizaron por triplicado a los 20, 35, 45 y 65 días de maduración (Figura III.1).

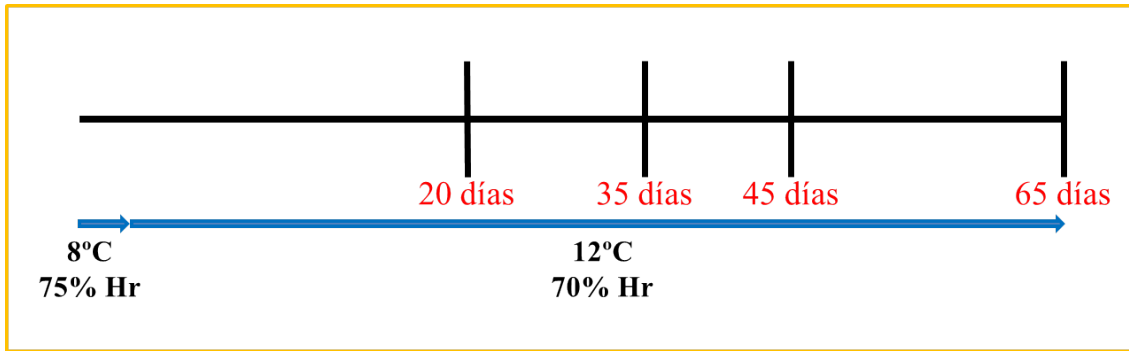


Figura III.1. Esquema del proceso de elaboración de los embutidos en la industria 1 y tomas de muestras realizadas.

Para cada toma de muestra se recogían chorizos y salchichones completos, por tanto, 3 controles y 3 inoculados por cada lote (9 chorizos y 9 salchichones). Una vez tomadas las muestras se transportaron en contenedores refrigerados hasta los laboratorios para proceder a sus análisis en menos de 24 horas.

III.2.2.1.2.- Industria 2: ensayo con la proteasa EPg222 en salchichones

Para la realización de este ensayo se eligió el procesado de la industria 2, ya que utilizaba temperaturas más bajas y un tiempo de maduración más largo (90 días).

Para la elaboración de los salchichones se utilizó carne de cerdo Ibérico a la que se adicionó: 1 g/Kg de pimienta blanca, 1,5 g/Kg de pimienta negra, 30 gr/Kg de NaCl y una mezcla de dextrina, dextrosa, lactosa, nitrato sódico y ascorbato sódico en las cantidades y condiciones recomendadas por el fabricante. Se añadió el cultivo iniciador compuesto de bacterias ácido lácticas y *Staphylococcus*, en una concentración de 5×10^7 ufc/Kg de carne y la enzima EPg222 a una concentración de 28 mg/Kg de carne. Con todo esto, se hicieron cinco lotes, cada uno de 30 Kg de carne, como se detalla en la Tabla III.6.

Tabla III.6. Lotes de salchichones elaborados.

Lotes	Cepa inoculada	Cantidad inoculada
P200S34	<i>P. acidilactici</i> MS200 + <i>S. vitulus</i> RS34	5×10^7 ufc/Kg
EPg222	Extracto de la enzima EPg222	28 mg/Kg
P200S34+EPg222	(<i>P. acidilactici</i> MS200 + <i>S. vitulus</i> RS34) + EPg222	5×10^7 ufc/Kg + 28 mg/Kg
Control	-	-

Una vez mezclados todos los ingredientes en una amasadora, las mezclas se dejaron en reposo durante 24 h, a una temperatura entre 2 y 4°C y una humedad relativa entre 65 y 70%. Transcurrido este tiempo se procedió a embutir las mezclas en tripa natural de unos 6 cm de diámetro, obteniéndose unos embutidos con unos pesos medios de 1,6 Kg que fueron etiquetados y sellados.



Figura III.2. Proceso de embutido.



Figura III.3. Etiquetado y sellado de los embutidos.

Posteriormente se colocaron en palés y fueron llevados a cámaras a 7°C de temperatura y con una humedad relativa de 65-70%, permaneciendo allí hasta que alcanzaron el grado de adecuado de maduración (en torno a 30 días). Finalmente permanecieron hasta los 90 días en bodegas a 10-12°C de temperatura y 70% de humedad relativa para completar su maduración.



Figura III.4. Salchichones colgados en palés.

Se tomaron muestras por triplicado a los 20, 40, 65 y 90 días de maduración (Figura III.5).

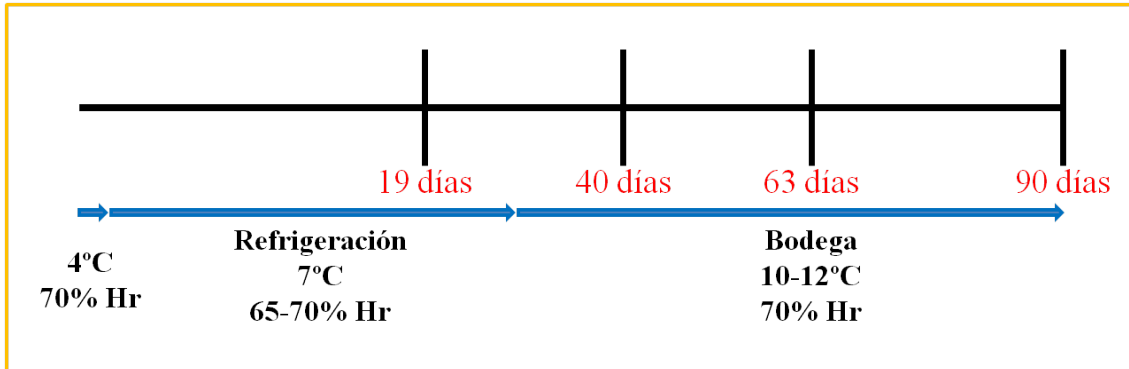


Figura III.5. Esquema del proceso de elaboración de los salchichones y tomas de muestras realizadas.

Para cada toma de muestra se recogieron salchichones completos, por tanto, 3 controles y 3 inoculados y tratados con enzima por cada lote (12 salchichones). Una vez tomadas las muestras se transportaron en contenedores refrigerados hasta los laboratorios para proceder a sus análisis en menos de 24 horas.

El estudio físico-químico y microbiológico se realizó a todas las muestras recogidas durante el proceso de maduración de los embutidos tanto de la industria 1 como de la industria 2 (Figuras III.1 y III.5).

III.2.2.2.- Análisis Físico-Químicos

III.2.2.2.1.- Humedad

La humedad se determinó según el procedimiento descrito en la técnica de la AOAC (2005). Esta técnica consiste en desecar la muestra en una estufa a 105° C hasta obtener un peso de la misma constante. Para ello se utilizaron cápsulas de porcelana que fueron previamente desecadas a 105° C. Una vez desecadas, las cápsulas se enfriaron manteniéndolas en un desecador a temperatura ambiente para evitar que volvieran a coger humedad y se pesaron, tras lo cual se añadió 10 g de cada una de las muestras. A continuación, las vasijas con las muestras se llevaron a la estufa a 105° C donde permanecieron hasta que alcanzaron un peso constante (aproximadamente 24 horas). Finalmente y antes de la pesada final, se mantuvieron en un desecador hasta alcanzar la

temperatura ambiente. La determinación de la humedad se realizó por diferencia de pesadas.

III.2.2.2.2.- Actividad de agua

La actividad de agua fue determinada mediante la utilización de un equipo Novasina con control de temperatura. Las determinaciones se hicieron sobre 3 ó 4 g de cada muestra, a una temperatura de 25 °C y con un tiempo de equilibrado de 30 min.

III.2.2.2.3.- Determinación del pH

Las medidas del pH se realizaron según se describe en la Norma ISO 2917:1999, introduciendo el electrodo del pHmetro calibrado en un homogenizado de 2 g de embutido de ensayo en agua desionizada.

III.2.2.3.- Determinaciones microbiológicas

III.2.2.3.1.- Preparación de las muestras para el análisis microbiológico

Se pesaron 10 g de cada muestra en una bolsa con filtro para Stomacher™ modelo 400, previamente tarada. Se añadió un volumen de diluyente, agua de peptona al 1%, igual a nueve veces la muestra (90 ml) para obtener la dilución 10^{-1} . Finalmente se colocó la bolsa en el Stomacher™ durante 60 segundos y, a continuación, se prepararon diluciones seriadas para la siembra en los medios de cultivos utilizados.

III.2.2.3.2.- Recuentos microbiológicos

✓ Bacterias ácido lácticas

El recuento de las bacterias ácido lácticas se realizó según las recomendaciones de la APHA (1976).

La siembra se realizó en placas petri estériles con el medio agar para recuento de lactobacilos (MRS) acidificado con una solución de ácido acético al 10%. A partir de

las diluciones decimales, se añadió 100 µl sobre la superficie bien seca del agar MRS y el inóculo se extendió con varillas de vidrio estériles hasta quedar completamente absorbido por el medio. Las placas se incubaron en posición invertida a 37 °C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis (10% CO₂).

Finalizada la incubación, se efectuó el recuento de las bacterias para lo cual se eligieron las placas que presentaban entre 30 y 300 colonias. Para ello se utilizó un contador de colonias y el recuento de bacterias obtenido se multiplicó por el factor de dilución de la placa contada, expresándolo así en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo (log ufc/g).

✓ Cocos gram + catalasa +

Para el recuento de estafilococáceas se utilizó el medio agar Baird Parker (BP) enriquecido con yema de huevo y telurito potásico mientras que para las micrococáceas se empleó el medio agar manitol con sal (MSA), según el procedimiento descrito por Pascual y Calderón (1999). La siembra se desarrolló del mismo modo que el detallado anteriormente para las bacterias ácido lácticas. Las placas sembradas se incubaron invertidas durante 48 horas a 37 °C para el agar BP y a 30 °C en el caso del agar MSA.

Para el recuento de las placas se procedió igual que en el caso de las bacterias ácido lácticas, contando las colonias encontradas en las placas y multiplicando el valor obtenido por el factor de dilución. El resultado también se expresó en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo (log ufc/g).

La presencia de *S. aureus* se evidenció en el agar BP por la aparición de colonias de color negro azabache, brillante, convexas, de 2-3 mm de diámetro y rodeadas de un halo de precipitación transparente.

III.2.2.4.- Determinación del nitrógeno no proteico y nitrógeno aminoacídico

Se determinó el nitrógeno no proteico y el nitrógeno aminoacídico de los embutidos elaborados en ambas industrias siguiendo los métodos desarrollados por Johnson (1941) para el nitrógeno no proteico y por Moore y Stein (1954) para el nitrógeno aminoacídico, ambos descrito por Córdoba (1990).

III.2.2.4.1.- Preparación del extracto

Para la determinación tanto del nitrógeno no proteico como del nitrógeno aminoacídico se preparó un extracto común (De Ketelaere y col., 1974). Para ello, se realizó un homogeneizado de 4 g de embutido con de ácido perclórico 0,6 N. Seguidamente se centrifugó durante 15 min a 4000 rpm, se filtró el sobrenadante con papel Whatman nº 54, y se lavó el residuo con 5 ml de ácido perclórico 0,6 N. El pH del filtrado obtenido se ajustó a pH 6 con hidróxido potásico al 30%, filtrándose finalmente para eliminar el perclorato potásico y enrasándose a 30 ml con agua destilada.

III.2.2.4.2.- Cuantificación del nitrógeno no proteico (NNP)

El NNP se cuantificó mediante el método de Johnson (1941), descrito por Córdoba (1990), que se fundamenta en la reacción de los compuestos nitrogenados con ioduro potásico mercuríco (Reactivo de Nessler) para dar, en solución alcalina, un complejo de color naranja que se mide en un espectrofotómetro a 490 nm.

Para su determinación se desecó en un baño de arena a 120 °C un tubo de ensayo que contenía 0,1 ml del extracto exento de proteínas preparado anteriormente. A continuación, se añadió 0,2 ml de ácido sulfúrico concentrado y se digirió a 120 °C en un baño de arena, donde se mantuvo el tiempo suficiente para que la solución fuese transparente. Sucesivamente, se añadieron 4,8 ml de agua destilada, 3 ml de NaOH 4 N y 2 ml del reactivo de Nessler. Se agitó y se dejó reaccionar durante 10 min.

Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia refiriendo los resultados de las lecturas colorimétricas a una recta patrón elaborada con una solución de sulfato amónico.

III.2.2.4.3.- Cuantificación del nitrógeno aminoacídico (NA)

En primer lugar se procedió a la precipitación de los péptidos del extracto. Para ello, se tomaron 5 ml del extracto preparado anteriormente, como se describe en el apartado III.2.2.4.1., y se añadieron 5 ml de ácido sulfosalicílico al 10%. Se dejó al menos durante 17 h en reposo a una temperatura entre 0-1 °C. Seguidamente, se ajustó a pH 6 con NaOH 4 N y se filtró. Finalmente se llevó a un volumen de 25 ml con agua destilada.

El NA se determinó según el método de Moore y Stein (1954), tal como describe Córdoba (1990). Del extracto obtenido anteriormente se cogieron 0,5 ml a los que se añadió 1,5 ml de reactivo de ninhidrina (2 g de ninhidrina y 0,3 g de hidridantina disueltos en 75 ml de etilenglicol monometiléter y 25 ml de tampón acetato sódico 4 N a pH 5,5). A continuación se agitó y se mantuvo durante 20 min en un baño de agua hirviendo, tras lo cual se enfrió y se añadieron 8 ml de 1-propanol al 50%. Finalmente se midió la absorbancia, a 570 nm, tras 10 min en oscuridad para favorecer el desarrollo del color. Para este análisis se elaboró una recta patrón con concentraciones crecientes del aminoácido leucina.

Se calcularon el índice de proteólisis (IP) y el índice de generación de aminoácidos libres (IA) con las fórmulas que se detallan a continuación:

$$IP = \frac{\text{Nitrógeno no proteico}}{\text{Nitrógeno total}} \times 100$$

$$IA = \frac{\text{Nitrógeno aminoacídico}}{\text{Nitrógeno no proteico}} \times 100$$

III.2.2.5.- Preparación de los extractos peptídicos

III.2.2.5.1.- Extracción con ácido perclórico

Para la extracción con ácido perclórico se siguió el método descrito por De Ketelaere y col. (1974) y Bauchart y col. (2006). Se pesaron 15 g de cada embutido a los que se añadieron 45 ml de ácido perclórico 0,6 N. La mezcla se homogeneizó y se centrifugó 4.000 rpm durante 15 minutos. Pasado el tiempo de centrifugado, las muestras se filtraron con papel Whatman nº 54 y se lavó el residuo con 5 ml de ácido perclórico. Se neutralizó el pH hasta alcanzar pH 6 con hidróxido potásico al 30% y finalmente se filtró para eliminar el perclorato potásico formado durante la neutralización. Finalmente, todas las muestras se enrasaron con agua destilada hasta conseguir 100 ml de extracto.

III.2.2.5.2.- Ultrafiltración

Una vez obtenidos los extractos se procedió a la ultrafiltración de los mismos para obtener los péptidos de bajo peso molecular (< de 5 kD). Para ello, se hicieron pasar a través de membranas de ultrafiltración de 10 y 5 kD, sucesivamente.

III.2.2.5.3.- Liofilización

Para asegurar una mejor conservación de las muestras hasta su análisis estas se liofilizaron siguiendo el modo descrito por Casquete (2011a). Para ello se introdujo 25 ml del extracto en un balón de cristal. Se congelaron las muestras, dentro de los balones, en finas capas, en un baño metálico con 2-isopropanol y nieve carbónica, y seguidamente se colocaron en el liofilizador. La realización de estas capas finas era importante con el fin de conseguir que la desecación de las muestras fuera homogénea a través de los manifoles del liofilizador. La liofilización se realizó con un equipo TELSTAR mod. 50 (Figura III.6). Se trabajó a una temperatura de liofilización de -50°C y el vacío fue de 0,01 mbar.



Figura III.6.- Liofilización de las muestras

III.2.2.6.- Determinación de la concentración en los extractos peptídicos

La determinación del contenido proteico de los extractos se llevó a cabo mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA). Para ello se empleó el ensayo comercial de diagnóstico de Pierce (Rockford, IL, EE. UU.). El método consiste en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} por las proteínas y péptidos en medio alcalino (reacción de Biuret). La interacción del Cu^{+1} con dos moléculas de BCA da lugar a un complejo de color púrpura que tiene un máximo de absorción a 562 nm.

El reactivo de trabajo se preparó mezclando los reactivos A y B en una proporción 50:1. El reactivo A se componía de carbonato y bicarbonato sódico, BCA y tartrato sódico en una disolución de NaOH 0,1 M. El reactivo B era una solución de sulfato cúprico al 4%. Se añadieron 200 μL de esta mezcla a 20 μL de cada una de las muestras en una placa multipocillo de polipropileno transparente. La reacción se llevó a cabo dejando incubar las muestras en un horno de hibridación a 37°C durante 60 minutos. Una vez finalizada la reacción, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas y turbidómetro BIOSCREEN.

Para calcular la recta de calibrado, se prepararon cinco concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) en un intervalo de 125 a 1500 $\mu\text{g/ml}$ y un blanco de agua, que se analizaron con la metodología anteriormente detallada.

Para realizar los estudios de las actividades biológicas, se normalizaron las concentraciones de los extractos por lo que se diluyeron los gramos necesarios para alcanzar una concentración de 600 µg/ml de cada extracto en 1 ml de agua desionizada y se agitaron hasta que se rehidrataron y solubilizaron totalmente.

III.3.- ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS EXTRACTOS

III.3.1.- Actividad antihipertensora. Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina I (IECA)

La actividad inhibidora de la ECA se determinó de acuerdo con el método desarrollado por Sentandreu y Toldrá (2006a, 2006b), con algunas modificaciones. Este método se basa en la hidrólisis del sustrato o-aminobenzoilglicil-p-nitrofenilalanilprolina (Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro) por la acción de la enzima ECA que da lugar al producto fluorescente o-aminobenzoilglicina (Abz-Gly), desarrollado por Carmel y Yaron (1978).

El sustrato Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro (Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Suiza) se preparó en un tampón de Tris 0,15 M y NaCl 1,125 M para obtener una concentración final de 0,45 mM de sustrato a pH 8,3 y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

La ECA, previamente disuelta en glicerol al 50%, se diluyó en un tampón Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 0,15 M que contenía ZnCl₂ 0,1 µM a pH 8,3 y 0,04 U/ml de enzima.

Para llevar a cabo la reacción se empleó una placa multipocillo negra de poliestireno, donde a cada pocillo se añadieron 40 µl de tampón Tris para los blancos, o de disolución de la ECA, y se ajustó a 80 µl con agua desionizada para el blanco y el control, o con muestra. Para tener en cuenta las interferencias de los compuestos, se preparó un blanco para cada extracto sustituyendo el agua por muestra (blanco de muestra).

La reacción enzimática se inició al añadir 160 µl del sustrato fluorescente que inmediatamente se mezcló e incubó a 37°C en un fluorímetro (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Alemania) (Figura III.7). La fluorescencia generada se midió a 30 minutos utilizando 350 y 420 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente.



Figura III.7. Fluorímetro FLUOstar OPTIMA BMG

Se empleó el software FLUOstar Control versión 1.32 R2 para procesar los datos.

La actividad inhibitoria de cada muestra se determinó por triplicado y para su cálculo se empleó la fórmula que se detalla a continuación.

$$\text{Actividad inhibitoria de la ECA (\%)} = \frac{(F_C - F_B) - (F_M - F_{Bm})}{F_C - F_B} \times 100$$

donde:

F_C : Fluorescencia emitida por el grupo o-aminobenzoil-glicina tras la acción de la ECA sobre el sustrato fluorescente o-aminobenzoil-glicil-p-nitrofenilalanil-prolina sin inhibidor (control).

F_M : Fluorescencia emitida por el grupo o-aminobenzoil-glicina tras la acción de la ECA sobre el sustrato fluorescente o-aminobenzoilglicil-p-nitrofenilalanil-prolina en presencia de sustancias inhibitoras.

F_B : Fluorescencia emitida por el sustrato fluorescente o-aminobenzoilglicil-p-nitrofenilalanil-prolina (blanco).

F_{Bm} : Fluorescencia emitida por el sustrato fluorescente o-aminobenzoilglicil-p-nitrofenilalanil-prolina y la muestra (blanco de muestra).

III.3.2.- Actividad antioxidante. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

La capacidad de absorción del radical de oxígeno-fluoresceína (ORAC-FL) se determinó siguiendo el método desarrollado por Ou y col. (2001) y adaptado para un lector de fluorescencia de placas multipocillo por Dávalos y col. (2004), con algunas modificaciones. Este método puede determinar *in vitro* la actividad antioxidante y se basa en la oxidación de la fluoresceína por los radicales peroxilos producidos *in situ* por descomposición térmica del 2,2'-azo-bis-(2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH). La oxidación de la fluoresceína causa un descenso de la fluorescencia, sin embargo, este proceso puede ser evitado o retrasado con la presencia de sustancias antioxidantes.

La solución de trabajo de fluoresceína se preparó diariamente a una concentración 116,7 nM a partir de una solución madre de fluoresceína 1.166,1 μ M en tampón fosfato 75 mM (pH 7,4). El AAPH se disolvió en el tampón fosfato hasta una concentración final de 46,6 mM.

Como antioxidante de referencia se utilizó el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (análogo soluble de la vitamina E), que se preparó a una concentración de 0,1 mM en tampón fosfato (solución madre). Éste se diluyó para obtener diferentes cantidades, de 0,2 a 1,6 nmol, y construir una curva de calibrado de Trolox de referencia realizando el ensayo que a continuación se detalla.

Para llevar a cabo el ensayo, se mezclaron 20 μ l de la muestra a distintas concentraciones o tampón fosfato en el caso del control y el blanco, con 120 μ l de fluoresceína en una placa multipocillo de polipropileno negra, y se dejó incubar durante 10 min a 40°C. Pasado el tiempo de incubación se inició la reacción añadiendo 60 μ l de AAPH a cada pocillo, exceptuando el control. Se determinaron 104 medidas de la fluorescencia durante 137 minutos a 40°C en un fluorímetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech), siendo la longitud de onda de excitación 485 nm y la de emisión 520 nm.

El software utilizado fue FLUOstar Control. Todos los análisis se llevaron a cabo por duplicado y el ensayo se repitió al menos 2 veces.

Las medidas de fluorescencia obtenidas por la oxidación de la fluoresceína en función del tiempo se normalizaron. Para ello, se calculó el área bajo la curva (AUC) de la muestra, del Trolox y del control (sin antioxidante) mediante la fórmula 1. El AUC neta se calculó como la diferencia entre la AUC del antioxidante (Trolox o muestra) y del control (fórmula 2).

$$\text{Fórmula 1: } AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=104} \frac{f_i}{f_0}$$

f_0 : Fluorescencia inicial medida en el ciclo 1 a tiempo 0 minutos.

f_i : Fluorescencia medida en un ciclo i .

$$\text{Fórmula 2: } AUC_{neta} = AUC_{antioxidante} - AUC_{control}$$

Se construyó una recta enfrentando AUC neta (eje Y) con la cantidad de antioxidante (eje X) y se calculó la regresión lineal. El valor final de ORAC-FL se expresó como el cociente entre la pendiente de la recta de la muestra y la del Trolox (μmol equivalentes de Trolox/mg de proteína y μmol equivalentes de Trolox/ μmol de péptido).

III.3.3.- Actividad antiproliferativa

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa dando lugar a cristales púrpuras de formazán (Vistica y col., 1991), permitiendo así determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán formada.

El ensayo se llevó a cabo según Olsen y col. (2012) y para ello se utilizaron células HT-29 de adenocarcinoma de colon humano caracterizadas por Fogh (1975).

Estas células se crecieron en botellas con medio McCoy's 5A que contenía 10% de FBS y 1% de antibiótico y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

Cuando las células estuvieron confluentes, se tripsinizaron añadiendo 1,6 ml de una solución de Tripsina-EDTA, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, y se resuspendieron en medio fresco suplementado. Las células presentes se contaron con una cámara de Neubauer. Tras esto, las células se sembraron en placas multipocillos en un volumen por pocillo de 100 µl y una cantidad de 5000 células por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir la adhesión de las células.

Se prepararon las soluciones madre de los péptidos a las máximas concentraciones posible en PBS 0,1M pH 7,4. Estas se diluyeron en el medio de cultivo de las células obteniendo una concentración final de péptidos de 5 mg/ml, intentando que la cantidad de PBS fuera inferior al 10%. También se realizó un control positivo con quercetin (200 µM), un flavonol con actividad antiproliferativa conocida sobre células de colon, un control negativo que contenía únicamente PBS 1X, y un control de lisis con 10 µl de SDS al 10% y 90 µl del medio de cultivo (medio de lisis, SDS 1%). Tanto las muestras como los controles fueron testados por triplicado.

Una vez que las células estuvieron adheridas a la placa, se eliminó el medio y se cambió por medio nuevo que incluía los diferentes tratamientos. Las placas se volvieron a incubar durante 72 h, a 37°C y 5% de CO₂, reemplazando el medio cada 24 h con los diferentes tratamientos (control negativo, control de lisis y medio conteniendo los péptidos a 5 mg/ml). El número de células vivas fue contado a las 12 h, 24 h, 48 h y 72 h, y para ello se eliminó el medio y se añadieron 200 µl de DMEM sin suplementar y 50 µl de solución MTT (5mg/ml, Sigma) libre de calcio y magnesio. Tras incubar a 37°C durante 4 h para permitir la formación de cristales de formazán, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de DMSO para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se midió la absorbancia de la placa a 570 nm.

El porcentaje de inhibición se midió con la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\text{OD péptidos} - \text{OD lisis})}{(\text{OD control negativo} - \text{OD lisis})} \times 100$$

III.3.4.- Actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas

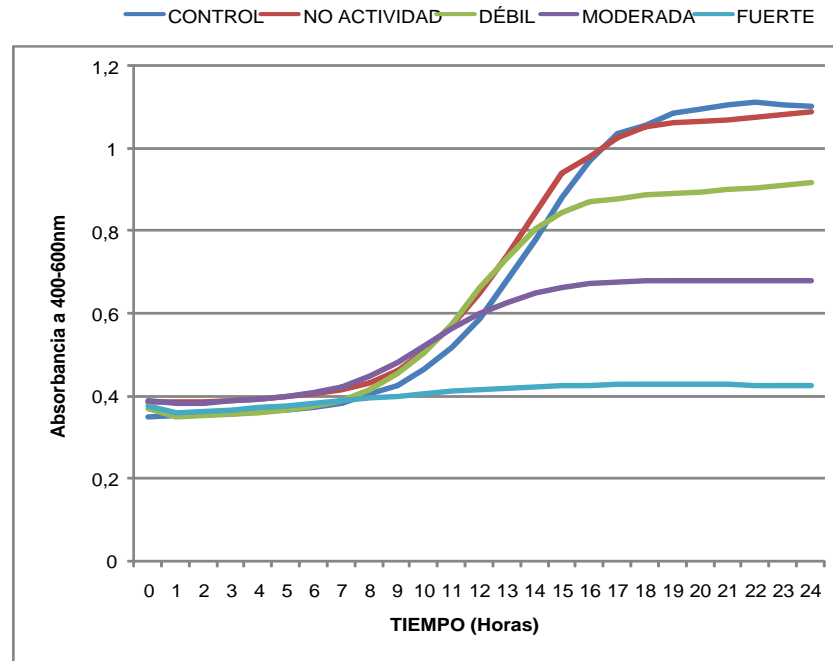
El estudio de la actividad antimicrobiana se realizó de acuerdo a Ruíz-Moyano y col. (2009). Las cepas con las que se realizó el estudio de la actividad antimicrobiana pertenecían a la Colección Española de Cultivos Tipo. Se eligieron las bacterias patógenas *Escherichia coli* CECT4267, *Salmonella cholerasuis* CECT4395, *Staphylococcus aureus* CECT976, *Listeria monocytogenes* CECT911 y la bacteria alterante *Bacillus cereus* CECT131.

Para comenzar con el estudio, las bacterias se crecieron en caldo BHI, recomendado para preparar el inóculo para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. El ensayo se realizó en placas multipocillos de poliestireno transparentes en los que se añadió 240 µl del caldo de crecimiento estéril correspondiente a cada microorganismo a pH 6,5; 10 µl del cultivo de la cepa y 50 µl de la muestra. Para la correcta medida de la actividad se hicieron 2 controles para cada muestra, uno positivo, por triplicado y otro negativo, también por triplicado.

La actividad antimicrobiana se determinó mediante un turbidómetro automático Bioscreen C. La turbidimetría fue medida con un filtro de 420-580 nm a intervalos regulares de tiempo. Las placas fueron incubadas en el Bioscreen C durante 24 horas a 30 o 37°C, dependiendo de la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. Las medidas de turbidez se realizaron cada 15 min, siendo agitada la placa previamente a cada medida.

Los análisis se hicieron por triplicado y la actividad antimicrobiana se observó comparando la cinética de crecimiento en presencia de los extractos con la cinética de crecimiento de los controles positivos. Densidades ópticas inferiores a 100 unidades arbitrarias de área (UAA) con respecto al control fueron consideradas como ausencia de actividad (-), del mismo modo diferencias de 100-200 UAA se consideraron actividad

débil
200-
UAA



(+),
400

actividad moderada (++) y diferencias superiores a 400 UAA fueron consideradas como un fuerte capacidad antimicrobiana (+++) (Figura III.8).

Figura III.8. Diferencias de absorbancias para establecer el grado de inhibición mostrado por los extractos peptídicos seleccionados. Densidades ópticas < 100 U (-), 100-200 UAA actividad débil (+), 200- 400 UAA actividad moderada (++) y diferencias > 400 UAA capacidad antimicrobiana fuerte (+++).

III.4.- SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL

La simulación de la digestión gastrointestinal in vitro usando una hidrólisis con pepsina y pancreatina fue llevada a cabo según Cinq-Mars y col. (2008) y You y col. (2010) con algunas modificaciones.

Para comenzar, las concentraciones de los extractos se ajustó a una concentración de 0,7% de proteína (p/v) y a continuación se bajó a pH 2 utilizando HCl 1M, ya que la pepsina actúa en medios ácidos. Se añadió la pepsina (4% w/w) (20 mg/gr proteína) y la mezcla se incubó a 37°C durante 90 min. Transcurrido ese tiempo, se subió el pH de las mezclas hasta pH 7,5 con NaOH 1M para inactivar la pepsina y crear un medio adecuado para el funcionamiento de la pancreatina. Tras añadir la pancreatina (4% w/w), la mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas. Para terminar la

digestión y desactivar la pancreatina, los tubos que contenían las mezclas se introdujeron un agua en ebullición durante 10 min. Finalmente, las muestras se enfriaron hasta que alcanzaron temperatura ambiente y se centrifugaron a 5000 rpm 30 min.

Para estudiar los cambios en las actividades antihipertensora, antioxidante, antiproliferativa y antimicrobiana de los extractos tras la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*, dichas actividades fueron comprobadas de nuevo en todas las muestras.

III.5.- CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTOMETRÍA DE MASAS (HPLC-ESI-MS)

La caracterización de los péptidos presentes en los hidrolizados se llevo a cabo mediante un sistema HPLC 1100 HP Agilent (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania) conectado on-line a una trampa de iones Esquire-LC (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) con las condiciones descritas por Gómez-Ruiz y col. (2008). Se inyectaron 10 µl del extracto en una columna C18 Zorbax 300SB, de dimensiones 2.1 × 150mm, 5 µm (Agilent Technologies A/S). Las fases móviles A y B empleadas fueron mezclas de agua: ácido trifluoroacético (TFA) 1000:0,37 y acetonitrilo: ácido trifluoroacético 1000:0,27, respectivamente. Los péptidos fueron diluidos utilizando un gradiente lineal del 0 al 45% del solvente B en 60 minutos, y del 45 al 70% en 5 minutos más, con un flujo de 0,8 ml/minuto.

El análisis de las masas se realizó mediante espectrometría de masas (MS) en un equipo de simple cuadrupolo. El voltaje capilar se mantuvo a 4000 V, la presión del nebulizador a 40 psi y la temperatura y flujo del gas de secado fueron de 320°C y 10 l/minuto, respectivamente. Se empleó el fragmentador de 40 V. El intervalo de adquisición (m/z) fue de 100 hasta 1500 uma. La adquisición y el análisis de los datos se realizó mediante el programa Agilent Technologies ChemStation (versión B.04.03 [16]; Hewlett Packard).

III.6.- ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Las diferencias significativas y los grupos homogéneos de medias se establecieron mediante un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo los procedimientos de una vía. Cuando el efecto de la interacción es significativo ($P < 0,05$) se procedió a la realización de un test de comparación de medias por el método TUKEY que determina la diferencia mínima entre las medias de cada grupo para que ésta sea estadísticamente significativa. Las relaciones entre las actividades funcionales encontradas en los extractos y los compuestos nitrogenados detectados al final del procesado de los embutidos elaborados fueron estimadas mediante el análisis de componentes principales (PCA).

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Influence of starter cultures on the generation of antioxidant nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausages.

Aceptado en la revista “International Journal of Food Science and Technology”

A Original article

Influence of starter cultures on the generation of antioxidant nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausages

Margarita Fernández,¹ Alberto Martín,^{1*} María José Benito,¹ Rocio Casquete,¹ Isidra Recio² & María De Guía Córdoba¹

1 Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz, Spain

2 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain

(Received 19 May 2015; Accepted in revised form 9 September 2015)

Summary The purpose of this work was to investigate the influence of a starter culture on the generation of nitrogen compounds with antioxidant activity during the ripening of Iberian dry-fermented sausages. Starters P200S34 (*P. acidilactici* M200 and *S. vitulus* RS34) and P198S34 (*P. acidilactici* MS198 and *S. vitulus* RS34) were used to make the Iberian dry-fermented sausages 'salchichón' and chorizo; then, the physico-chemical and microbial properties were determined during the ripening process. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was employed to evaluate the antioxidant potential of the nitrogen extracts obtained during ripening of the sausages. This activity was correlated with the most relevant compounds detected by HPLC-ESI-MS in the final ripened extracts. Although a relevant part of the antioxidant activity was attributed to the predominant natural nitrogen fraction, the microbial population found in fermented sausages and the fermentation conditions significantly influenced the low molecular weight nitrogen profile and antioxidant activities. Inoculation with the starter culture P200S34 increased free amino acids and amines, such as methionine and tyramine, but other nitrogen compounds also increased the antioxidant activity of the low molecular weight nitrogen extracts. Thus, these starter cultures in Iberian sausages can contribute to delaying oxidative changes during storage.

Keywords Antioxidant activity, dry-fermented sausages, low molecular weight nitrogen compounds, oxygen radical absorbance capacity, starter cultures.

Introduction

Iberian dry-cured sausages are high-value products obtained from autochthonous Iberian pigs and represent an important part of the cured meat products produced in Spain. Their manufacture is based on the growth of fermentative micro-organisms; Gram-positive catalase-positive cocci (GPCP) and lactic acid bacteria are the commonly most used starter cultures in the processing of these meat products (Benito *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2007). Several authors have reported the role of the micro-organisms in proteolysis, lipolysis and the formation of flavour in sausages (Berdagué *et al.*, 1993; Engelvin *et al.*, 2000; Stahnke *et al.*, 2002; Olesen *et al.*, 2004; Tjener *et al.*, 2004). Proteolytic activity in dry-fermented sausages has been described for strains of lactic acid bacteria (LAB) and even more strongly for staphylococci (Casaburi *et al.*,

2006) with the release of small peptides and amino acids from the degradation of protein fragments.

Apart from taste or flavour characteristics, little is known about the effect that small peptides from proteic products exert on human health and food preservation as antioxidant agents. The antioxidant capacities of many active peptides from vegetable protein hydrolysates, such as soya, walnut, rapeseed, chickpea and cereals protein, have been assessed (Chen *et al.*, 1996, 2012; Zhu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009, 2011). Şanlıdere Aloğlu & Öner (2011) obtained peptide fractions with high antioxidant activity from yogurt. Likewise, several authors observed good antioxidative activity in various assays from fish and egg white hydrolysates (Dávalos *et al.*, 2004; You *et al.*, 2010; Sampath Kumar *et al.*, 2012).

In meat products, peptide fractions from dry-cured ham exhibit *in vivo* superoxide ion extinguishing ability (Escudero *et al.*, 2012). However, the great accumulation of small peptides and free amino acids at the end

*Correspondent: Fax: +34 924 286201; e-mail: amartin@unex.es

Dispatch: 24.9.15	CE: Vijay T
No. of pages: 9	PE: Rathi
WILEY	
12978	Manuscript No.
I J F S	Journal Code
	

of dry-curing of hams is due to endogenous enzymes (Mora *et al.*, 2009). Although in dry-fermented sausages, the endogenous enzymes are primarily responsible for protein degradation, the bacterial proteases and peptidases contribute significantly to the initial breakdown of myofibrillar proteins and the release of small peptides and amino acids (Molly *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 2002). Good antioxidant activity has been observed for peptide fractions extracted from dry-fermented sausages (Sun *et al.*, 2009; Broncano *et al.*, 2012). The generation of peptides with antioxidant activity is inherent to the protease specificity and to the hydrolysis conditions (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005). In this sense, there is little information about the role of autochthonous starter cultures and manufacturing conditions on the generation of bioactive peptides during the processing of fermented meat products. As Iberian dry-cured sausages are produced to have a high percentage of fat and a long period of ripening (3 months), they are appropriate meat products to evaluate the contribution of inoculated microorganisms to the antioxidant ability of the non-protein nitrogen components.

Currently, one of the most widely used antioxidant assays for food samples and peptidic extracts is the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, as it combines both inhibition percentage and inhibition time of the reactive species by antioxidants into a single quantity (Cao *et al.*, 1995; Stockham *et al.*, 2011). This assay has been used for determining the antioxidant capacity of peptides from egg white protein ova-transferrin and peptide interactions with phytochemicals derived from different teas (Huang *et al.*, 2012).

The objective of this work was to study the effect of the starter culture on the antioxidant activity of peptic extracts obtained from two different Iberian fermented sausages.

Material and methods

Starter culture preparation

The association between two strains of *Pediococcus acidilactici* (MS198 and MS200) and one of *Staphylococcus vitulus* (RS34) was chosen to form starter cultures: starter P200S34, which contained *P. acidilactici* M200 and *S. vitulus* RS34, and starter P198S34, which contained *P. acidilactici* MS198 and *S. vitulus* RS34 (Benito *et al.*, 2007, 2008a,b; Martín *et al.*, 2007).

The *P. acidilactici* strains were cultured in Man-Rogosa-Sharpe broth (MRS) (Oxoid, Basingstoke, UK) at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions, and *S. vitulus*, in brain heart infusion broth (BHI) (Oxoid) at 37 °C for 24 h. The cultures were inoculated under the same conditions in flasks with nutrient

broth plus 5% NaCl and 10% mannitol (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) which has been shown to be protective during drying. The flasks were mixed until the cell concentration reached 10^{12} CFU mL⁻¹. Then, cells were harvested under aseptic conditions by centrifugation (6000 g for 10 min) at room temperature. The obtained cell pastes were washed once with 2.5% sucrose solution, re-centrifuged and concentrated to 10^{12} CFU mL⁻¹ in 2.5% sucrose solution. The cells were quick-frozen by immersion in a dry ice/isopropanol bath prior to lyophilisation, and then lyophilised at low temperatures (-46/-52 °C) and pressures (0.17/0.22 mbar) in a Cryodos-50 freeze drier (Telstar, Barcelona, Spain). The dried starter cultures were stored in vacuum-sealed bags at -80 °C until use. Before use, lyophilised starters were analysed for total viable cell counts (TVC), determined by the standard dilution methods on MRS and BHI agar (Oxoid) after incubation at 37 °C for 48 h. Powders with a TVC of more than 10^{11} CFU g⁻¹ were used in the dry-fermented sausages.

Preparation of dry-fermented sausages

Iberian dry-fermented sausages, that is 'salchichón' and chorizo, were produced in the same factory. The 'salchichón' mixtures were prepared using 95.5% Iberian pork; 2% NaCl; 1–1.5 g kg⁻¹ white pepper; 1.7 g kg⁻¹ black pepper; and a commercial mixture of spices and additives (SALAVI, Anvisa, Arganda del Rey, Madrid, Spain) specially prepared for this type of meat product which contains dextrin, dextrose, lactose, sodium nitrate and sodium ascorbate. The 'chorizo' mixtures were prepared using 95.5% Iberian pork; 2% NaCl; and a mixture of Spanish paprika, dextrin, dextrose, lactose, sodium nitrite and sodium ascorbate sold as CHORAVI from Anvisa at the concentrations recommended by the manufacturer. The casing used for both Iberian dry-fermented sausages was natural gut which diameter was 50 mm approximately.

The starter cultures, that is *P. acidilactici* MS198 plus *S. vitulus* RS34, denominated P198S34, and *P. acidilactici* MS200 plus *S. vitulus* RS34, denominated P200S34, were added to two different batches of 50 kg of meat mixture. Lyophilised starter (0.1 g kg⁻¹ of the mixture) was added to obtain an initial population of 5×10^7 CFU g⁻¹. In the fermentation trials, three batches (60 sausages per each batch) were prepared: (i) control without starter culture, (ii) starter culture P198S34 and (iii) starter culture P200S34. The ripening process conditions (temperature and moisture) were from 0 to 3 days 8 °C and 75% relative humidity and from 3 to 65 days 12 °C and 70% relative humidity. For sampling, three sausages of each batch were taken at different time points (15, 35 and 65 days of incubation), and each analysis was done in triplicate.

Physicochemical analysis

The pH was measured using a Crison model 2002 pH meter (Crison Instrument, Barcelona, Spain). The moisture content of the dry-fermented sausages was determined by dehydration at 100 °C to a constant weight by the ISO recommended method (ISO, 1973). Water activity (A_w) was determined using an FA-St/1 apparatus from GBX (France Scientific Instrument). Nonprotein nitrogen (NPN) was determined by the Nessler method using 4 g of sample after protein precipitation with 0.6 M perchloric acid (Benito *et al.*, 2005).

Microbial analysis

To investigate the presence of strains inoculated at high levels in the sausages, samples were taken at the time points described above. The *Staphylococcus* count was determined in mannitol salt agar (MSA) at 30 °C, and lactic acid bacteria were grown in Man–Rogosa–Sharpe agar (MRS) (Oxoid) at 37 °C and with the pH adjusted at 5.6 for 24 h under anaerobic conditions. To investigate the presence of strains inoculated at high levels in the sausages, ten colonies from the plates with the highest dilutions were isolated in 5 mL of MRS or MSA broth to collect strains. Then, the DNA was obtained, and 16S rRNA gene sequence analysis was done as described by Benito *et al.* (2008a,b). Sequences were compared with the EMBL and GenBank database using the BLAST algorithm. The identities of the isolates were determined on the basis of the highest score.

Preparation of peptide extracts

The nitrogen compounds were extracted according to De Ketelaere *et al.* (1974) and Bauchard *et al.* (2006). Fifteen grams of the sample was homogenised in 0.6 N perchloric acid with an Omni mixer homogeniser. The homogenate was centrifuged at 2000 g for 15 min. The soluble fraction located between the upper layer and the precipitate was filtered through Whatman No. 54 filter paper. The pH was neutralised to pH 6 with 30% KOH. To eliminate the potassium perchlorate that formed during neutralisation, extracts were filtered again. Finally, extracts were ultrafiltered through hydrophilic 10 kDa and 5 kDa cut-off membranes (Pellicon XL, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

The protein content of the 5 kDa permeate extracts was determined by a colorimetric method based on bicinchoninic acid (BCA) (Pierce, Rockford, IL, USA), using bovine serum albumin as the standard protein.

Assessment of antioxidant activity

The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was employed to evaluate the antioxidant potential of our peptides extracts as indicated by Ou *et al.* (2001), with some modifications (Dávalos *et al.*, 2004). The automated ORAC assay was performed in black polystyrene 96-well microplates (Porvair, Leatherhead, UK) using a FLUOstar OPTIMA plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) with fluorescence filters for an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm. The equipment was controlled by the FLUOstar Control software version (1.32 R2) for fluorescence measurement. A fluorescein stock solution (116.7 nM) in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) was stored in complete darkness at 4 °C for 4 weeks. The fluorescein working solution, as well as AAPH and the Trolox solution, was prepared daily in PBS. Peptide samples (20 µL, at different concentrations) and fluorescein working solutions (120 µL, 116.7 nM) were placed in each well of the microplate. The mixture was preincubated for 10 min at 37 °C. AAPH solution (60 µL, 46.6 mM) was added rapidly with a multichannel pipette. The microplate was immediately placed in the reader and the fluorescence recorded every minute for 104 min (104 cycles). The microplate was automatically shaken prior to each reading. A blank (FL plus AAPH), using PBS instead of the peptide extract, was also carried out in each assay, and the calibration solutions were also measured using the Trolox standard (0.2–1.6 nmol). All reaction mixtures were prepared in duplicate, and at least two independent runs were performed for each sample.

Fluorescence measurements were normalised to the curve of the blank. From the normalised curve, the area under the fluorescence decay curve (AUC) was calculated as follows:

$$\text{Formula 1 : AUC} = 1 + \sum_{i=1}^{i=104} \frac{f_i}{f_0}$$

where f_0 is the initial fluorescence read at 0 min and f_i is the fluorescence read at time i . The net AUC corresponding to a sample was calculated by subtracting the AUC corresponding to the blank. Regression between net AUC and Trolox standard were calculated, and the ORAC values of samples were expressed as µmol Trolox equivalents per mg protein, as proposed elsewhere (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005).

HLPC-ESI-MS analysis of the extracts

The nitrogen compounds in the extracts were analysed by HLPC-ESI-MS according to Gómez-Ruiz *et al.* (2008) on an Agilent series 1100 apparatus (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA, USA). A Supelcosil LC-18 column (SUPELCO, Bellafonte, USA) was used with mobile phases (A) a mixture of water–trifluoroacetic acid (1000:0.37, v/v) and (B) acetonitrile–trifluoroacetic acid (1000:0.27, v/v) in a gradient of solvent B in A increasing from 0 to 45% in 60 min, and from 45 to 70% in 5 min at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. Nitrogen compounds were identified on an Agilent 6100 Series Single Quad LC/MS (Agilent Technologies) equipped with a multimode source in electrospray ionisation mode, according to their retention time and mass spectrum. Standards of biogenic amines (histamine, putrescine, cadaverine, tyramine, tryptamine, 2-phenylethylamine, spermine and spermidine), amino acids (alanine, arginine, aspartic acid, cystine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine, valine and taurine) and carnitine (Sigma–Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) were used. The other nitrogen compounds detected were tentatively identified by their mass spectra.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using SPSS for Windows, 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Physicochemical parameters, microbial counts and antioxidant activity were studied by variance mixed ANOVA. This analysis allowed to compare the mean differences between groups that have been split on two dependent factors where the within-subjects factor was ‘processing day’ and the between-subject factor was ‘batch’. Mean values were analysed by Tukey’s honestly significant difference (HSD) test ($P \leq 0.05$). The relationships among the antioxidant activity and the nitrogen compounds detected at the end of the processing of the meat-fermented sausages studied were evaluated by principal component analysis (PCA).

Results and discussion

Physicochemical and microbial parameters

The physicochemical values of the two Iberian dry-cured sausages during the ripening processes are shown in Table 1. There were no relevant differences in the evolution of moisture between the control batches of the two sausages studied. This parameter was not clearly affected by the starter cultures, with similar mean values among inoculated batches and the control batch for ‘salchichón’ and ‘chorizo’ during ripening. Only at 15 days of ripening, the batch of ‘salchichón’ inoculated with P200S34 showed higher values than the other batches (Table 1). The evolution of a_w was associated with moisture loss with final values of less than 0.85 in all the batches (data not shown). The final pH values ranged from 5.1 to 5.8 for ‘salchichón’ and from 5.8 to 5.9 for ‘chorizo’ (Table 1). Similar pH levels have been reported for sausages with no initial fermentation period at high temperatures and with long ripening times, including Iberian dry-fermented sausages (Fista *et al.*, 2004; Mauriello *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2007; Spaziani *et al.*, 2009). The evolution of pH did not show differences among the batches of both meat products, except for samples of ‘salchichón’ inoculated with starter culture P200S34. This batch showed pH values significantly lower than the control batch throughout ripening, suggesting an optimal adaptation of strain *P. acidilactici* MS200 to the processing of ‘salchichón’.

The mean values of NPN in the initial stage were 4.33 and 5.87 mg N g⁻¹ for control batches of ‘salchichón’ and chorizo, respectively (Fig. 1). According to Benito *et al.* (2005), who observed slightly changes in these compounds in ‘salchichón’ in the last stages of ripening period, we observed few differences in control batch of ‘chorizo’ samples, which were associated with a notable increase in NPN in the samples after 35 days

Table 1 Physicochemical parameters and microbial counts during the processing of Iberian dry-fermented sausages

Meat product Stage	Physicochemical parameters*						Microbial counts (log CFU g ⁻¹)*					
	Moisture (%)			pH			LAB			GPCPC		
	Control	P198S34	P200S34	Control	P198S34	P200S34	Control	P198S34	P200S34	Control	P198S34	P200S34
Salchichón												
S1 (15 days)	36.4 ^{b,†}	36.7 ^b	44.6 ^c	5.6 ^a	5.5 ^a	5.0 ^a	8.5 ^b	8.3 ^b	9.0 ^b	5.3	5.8 ^{a,b}	5.6
S2 (35 days)	29.6 ^{a,b}	35.1 ^{a,b}	34.8 ^{a,b}	5.5 ^a	5.5 ^a	4.9 ^a	7.7 ^b	7.7 ^b	8.5 ^b	5.3	5.5 ^{a,b}	5.5
S3 (65 days)	21.2 ^a	23.8 ^a	26.4 ^a	5.8 ^{a,b}	5.7 ^{a,b}	5.1 ^a	7.2 ^b	7.3 ^{a,b}	7.2 ^{a,b}	5.0	4.1 ^a	4.7
Chorizo												
S1 (15 days)	43.0 ^{bc}	40.0 ^{bc}	42.4 ^{bc}	5.8 ^{a,b}	5.9 ^b	5.8 ^b	6.1 ^a	7.4 ^{a,b}	8.1 ^b	5.7	6.4 ^b	6.6
S2 (35 days)	27.5 ^{a,b}	23.7 ^a	23.7 ^a	5.9 ^{a,b}	6.0 ^b	5.9 ^b	6.0 ^a	7.2 ^{a,b}	7.3 ^{a,b}	5.6	5.7 ^{a,b}	6.6
S3 (65 days)	25.3 ^a	21.9 ^a	20.2 ^a	5.8 ^{a,b}	5.9 ^b	5.9 ^b	5.8 ^a	7.1 ^{a,b}	7.2 ^{a,b}	5.4	5.5 ^{a,b}	6.5

*Mean values correspond to the analysis of three sausages, and each analysis was done in triplicate.

†For a given parameter or count, values with different lowercase are significantly different ($P < 0.05$).

of ripening and a tendency to decrease at the end of the processing. On the other hand, no significant effect of the starter culture was observed on the evolution of NPN in both products. Thus, at the end of ripening, the NPN values ranged from 2.97 to 4.17 mg g⁻¹ and 3.93 to 4.70 mg g⁻¹ for 'salchichón' and 'chorizo', respectively.

The counts of LAB and GPCPC in the mass (before stuffing the sausage) were 3 log cfu g⁻¹ higher in the inoculated batches for both microbial groups (data not shown). In the control batches, the counts increased during the first 15 days of processing from the initial values (around 4 and 3 log cfu g⁻¹ for LAB and GPCPC, respectively). The microbial values during ripening showed LAB counts greater than 7 log cfu g⁻¹ at the end of ripening in all batches, except for the control batch of chorizo, which remained lower than 6 log cfu g⁻¹ (Table 1). In the stage 1 (15 days), the batches inoculated with starter P200S34 showed higher counts, confirming its excellent adaptation to the studied meat products. The 16S rRNA gene sequence analysis indicated the presence of *P. acidilactici* MS198 and *P. acidilactici* MS200 among the predominant LAB in each inoculated batches until the end of processing. These levels of LAB were similar to those found in other fermented sausages (González & Díez,

2002; Ambrosiadis *et al.*, 2004). With respect to GPCPC, the 16S rRNA gene sequence analysis showed the presence of *S. vitulus* RS34 in the inoculated batches of both studied sausages. In the stages 2, and at the final stage (3), GPCPC counts were above 5.4 log cfu g⁻¹ in all batches except for 'salchichón' (Table 1). The final numbers in both fermented meat products (4.14–6.52 log cfu g⁻¹) were similar to the ranges usually reported for other traditional Mediterranean sausages (Mauriello *et al.*, 2004 and Drosinos *et al.*, 2005).

LOW RESOLUTION FIG

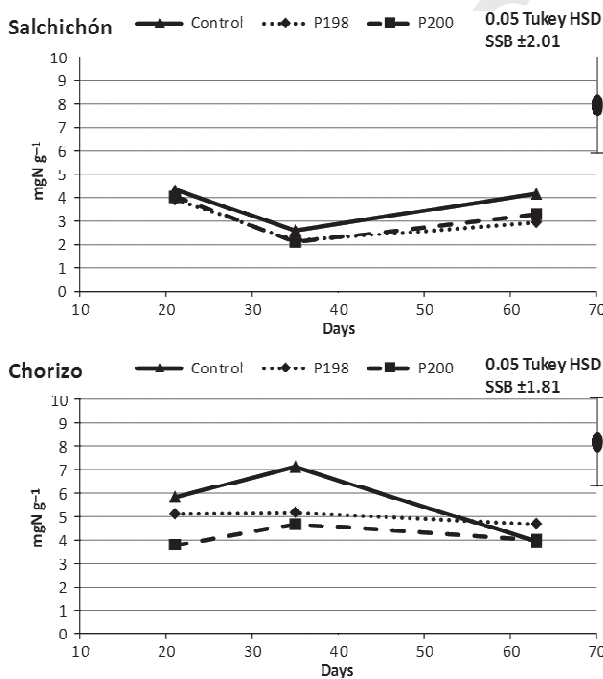


Figure 1 Differences among control and inoculated batches with starter cultures 198S34 (198) and 200S34 (200) in NPN values during the ripening period of 'salchichón' and 'chorizo'. SSB: statistical significance bar using the Tukey HSD test.

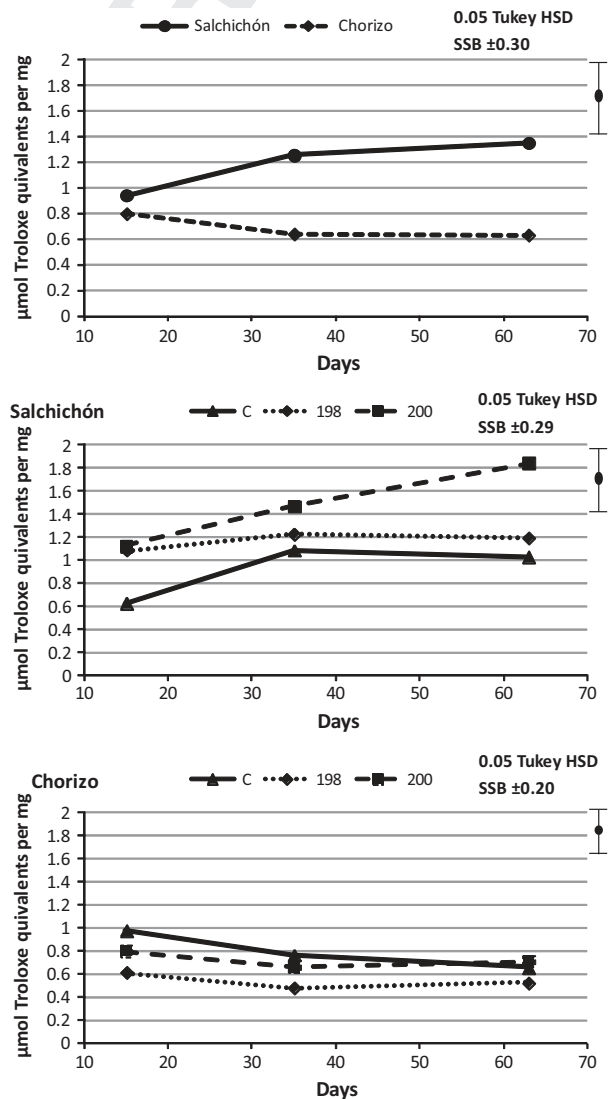


Figure 2 Antioxidant activity values of the peptic extracts of 'salchichón' and 'chorizo' obtained during the ripening period and differences among control and inoculated batches with starter cultures 198S34 (198) and 200S34 (200). SSB: statistical significance bar using the Tukey HSD test.

Antioxidant activity of extracts

In general, the antioxidant activity of extracts increased during ripening in salchichón, probably due to extensive enzymatic degradation of proteins and polypeptides, releasing free amino acids and new small peptides with antioxidant activity. At the end of processing, the mean ORAC-FL values found in the extracts of whole 'salchichón' were 1.35 μmol of Trolox equivalents mg^{-1} of peptide extract (Fig. 2). These values were higher than those found for 'chorizo' samples in the final products, which showed a mean value of 0.63 μmol of Trolox equivalent/mg of peptide extract without significant differences throughout processing (Fig. 2a).

The evolution of ORAC values in the two inoculated batches with respect to the control showed differences depending on the meat product (Fig. 2b,c). The samples inoculated with the well-adapted starter culture P200S34 in 'salchichón' showed, in general,

significantly higher ORAC values with respect to the control batch, suggesting additional antioxidant peptide generation by these strains under the studied processing conditions. At the end of ripening, the mean ORAC values for this batch were 1.84 μmol of Trolox equivalent mg^{-1} of peptide extract, 0.81 μmol higher than the control batch. In this case, the starter cultures could contribute to sausage preservation as lipid oxidation is the main cause of deterioration of 'salchichón' quality, leading to rancidity and shortening of shelf life. On the contrary, for chorizo, the mean ORAC values of inoculated samples did not show differences or were lower than the control batch (Fig. 2c). At the end of ripening, no significant differences were found between inoculated and control batches, suggesting a scarce or minor effect of the starter cultures on antioxidant peptide generation in comparison with autochthonous micro-organisms present in the control batch of this product.

Table 2 Nitrogen compounds detected by HPLC-ESI-MS in extracts of 'chorizo' and 'salchichón' batches at the end of the ripening process

Rt	Cd*	Compound	ID†	m/z‡	Mass fragments	Salchichón§				Chorizo§			
						Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD
Natural compounds						48.57				59.00			
1.9	N1	Taurine	a	126.1	109.1; 126.1			<1		0.82	1.91	1.37	0.41
2.37	N2	Carnosine	b	227.1	227.1; 210.1	5.33	12.70	7.97	2.64	4.81	14.09	9.45	3.18
2.49	N3	Anserine	b	241.1	241.1; 170.1	1.43	3.60	2.35	0.60	1.20	3.78	2.25	0.84
2.54	N4	Carnitine	a	162.1	162.1	5.21	9.14	6.51	1.08	0.57	2.23	1.38	0.47
2.8	N5	Creatine	b	132.1	132.1; 115.1	13.44	27.41	18.42	4.54	16.10	39.67	20.33	7.38
2.81	N6	Creatinine	b	114.1	114.1	9.21	20.04	13.32	3.39	16.21	37.31	24.22	6.62
Amino acids and amines						15.55				17.49			
2.17	A1	Lysine	a	147.1	130.1; 147.1	2.61	6.53	4.73	1.22	1.27	3.76	2.47	0.82
2.56	A2	Proline	a	116.1	116.1	6.11	10.39	8.13	1.57	3.83	6.46	4.57	0.82
6.29	A3	Methionine	a	150.1	133; 150.1			<1		0.59	2.21	1.35	0.55
14.1	A4	Isoleucine	a	132.1	132.1			<1		0.49	1.99	1.21	0.54
15.24	A5	Leucine	a	132.1	132.1	0.62	2.12	1.2	0.58	1.25	4.24	2.93	0.95
16.31	A6	Tyramine	a	121.1	121.1–138.1	0.54	2.07	1.50	0.49	2.42	5.76	3.97	1.26
31.09	A7	Phenylalanine	a	166.1	120.1–166.1			<1		0.00	2.04	0.99	0.83
Presumed peptides and other compounds						37.57				25.64			
2.1	P1	Compound 1	c	190.9	190.9; 380.9; 478.9; 614.9; 750.9	3.41	6.22	4.44	0.81	2.69	7.28	3.50	1.43
2.15	P2	Compound 2	c	118.1	118.1; 203.1	3.85	7.77	5.61	1.17	7.07	12.75	10.34	2.24
2.23	P3	Compound 3	c	365.1	365.1	2.19	3.65	2.77	0.51	0.89	4.09	1.51	1.02
3.16	P4	Compound 4	c	146.1	146.1	1.74	3.13	2.24	0.52				<1
3.36	P5	Compound 5	c	277.1	227.1; 407.1; 504.1	1.15	3.15	1.92	0.52				<1
4.7	P6	Compound 6	c	124.1	124.1	6.55	9.49	7.82	0.84				<1
5.63	P7	Compound 7	c	159.1	159; 1295.1	4.38	6.47	5.16	0.70	2.79	6.90	3.92	1.20
5.93	P8	Compound 8	c	137.1	137.1	2.61	7.75	4.85	1.47	4.91	9.57	6.37	1.46
7.28	P9	Compound 9	c	205.1	204.1	1.63	3.34	2.77	0.48				<1

*Code used in PCA.

†Identification levels: a: standard; b: database mass bank (<http://www.massbank.jp>); c: unidentified compound.

‡The most abundant fragment ions.

§Values expressed in percentage of the main fragment ions of the nitrogen compounds detected.

Low molecular weight nitrogen compounds and their influence on antioxidant activity

The analysis of the low molecular weight nitrogen compounds of different batches at the final ripening stage allowed detection for a total of 22 major compounds, 13 of which were potentially identified (Table 2). The extracts were mainly constituted by several endogenous compounds and their degradation products (6) but also small peptides (9), free amino acids (6) and biogenic amines (1) from meat protein degradation. Most of the identified nitrogen compounds have been reported as majority components of the NPN fraction in meat products, including fermented sausages (Broncano *et al.*, 2012).

Natural nitrogen compounds were the most abundant compounds in the extract profiles of both meat products. This group of compounds included as the major components creatine (18.42–20.33% of total area) and creatinine (13.32–24.22% of total area), the latter derived from creatine degradation. These compounds together with taurine were most abundant in ‘chorizo’ at the final stage of ripening. On the contrary, carnitine (1.38–6.51% of total area)

was most abundant in ‘salchichón’ samples. Carnosine and anserine represented around 10–11% of the total area of nitrogen compounds analysed for ‘chorizo’ and ‘salchichón’ extracts. Both are histidyl dipeptides and are the most relevant natural antioxidants in fresh meat (Wu *et al.*, 2003; Guiotto *et al.*, 2005).

Another group of nitrogen compounds included amino acids and amines, and indeed, it is known that some of these compounds are among the most important antioxidants in food (Wang & De Mejia, 2005). The free amino acids Lys, Leu, Ile, Pro, Met and Phe, detected in the studied extracts, have been described as among the most abundant compounds derived from proteolytic activity during the process of sausage fermentation (Benito *et al.*, 2005; Leggio *et al.*, 2012). The biogenic amine tyramine was also detected, which is produced mainly by microbial decarboxylation of free amino acids that are formed during the maturation process (Suzzi & Gardini, 2003).

Finally, the group of presumed peptides (a total of nine compounds) at the final stage of ripening represented 25.64 and 37.57% of the total area for ‘chorizo’ and salchichón, respectively (Table 2). These high per-

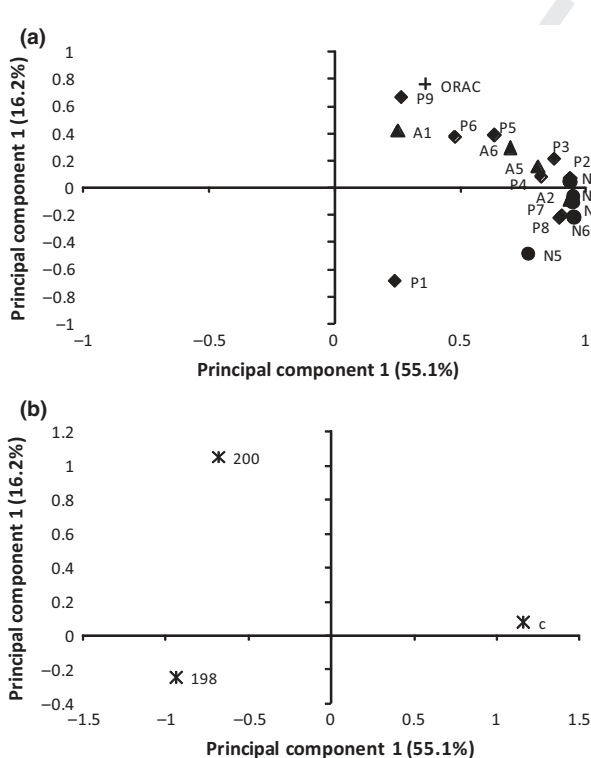


Figure 3 PC1 and PC2 (55.1% and 16.2% of the explained variance, respectively) of the PCA for the ‘salchichón’ samples at the end of processing. Score plot showing the detected nitrogen compounds in the peptidic extracts and the antioxidant activity (a). Loading plot indicating the location of the batches analysed (b).

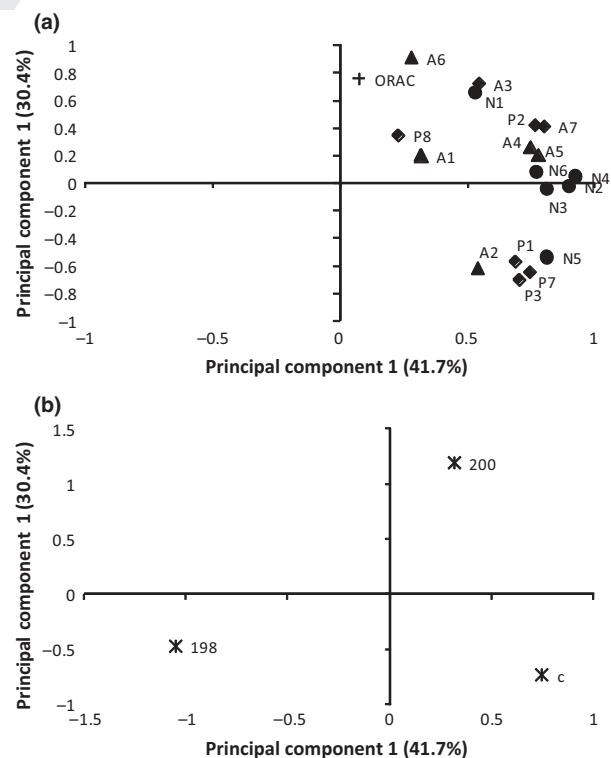


Figure 4 PC1 and PC2 (41.7% and 30.4% of the explained variance, respectively) of the PCA for the ‘chorizo’ samples at the end of processing. Score plot showing the detected nitrogen compounds in the peptidic extracts and the antioxidant activity (a). Loading plot indicating the location of the batches analysed (b).

centages suggest a noticeable influence of these compounds on the antioxidant properties of the extracts. The compounds with m/z 191, 118, 365, 159 and 137 were found in relevant amounts in both sausages, whereas the compounds with m/z 146, 277, 124 and 205 were only clearly detected in 'salchichón' samples. Some of these compounds (m/z 191, 365 and 137) have been referenced by other authors as low molecular weight antioxidant compounds in fermented 'chorizo' sausages (Broncano *et al.*, 2012).

To determine the influence of the extract components on the activities studied, a PCA was performed with the extract profiles of the samples obtained at the final stage of the ripening process and their antioxidant activity (Figs 3 and 4). For 'salchichón', the natural nitrogen compounds were mainly explained by the first axis (PC 1) of the PCA. These compounds were clearly associated with the control batch, suggesting a higher proportion of NPN derived from proteolysis products in the extracts of inoculated batches. In fact, the second axis (PC 2) of the PCA was defined by antioxidant activity, and the compounds with m/z 204, 124 and 277, and the amino acid lysine were related to samples of batch inoculated with 200S34 (Fig. 3). This amino acid is generally accepted to be antioxidant (Wang & De Mejia, 2005).

Regarding the 'chorizo' samples, only tyramine and to a lesser extent methionine and taurine (mainly explained by PC2) showed a significant correlation with antioxidant activity (Fig. 4). The high susceptibility to oxidation of sulphur-containing amino acids, including methionine and taurine, has been widely described (Stadman & Levine, 2000; He *et al.*, 2012). These amino acids play a major role in the antioxidant activity found in muscle proteins (Park & Xiong, 2007). On the other hand, the relevant amount of tyramine detected in 'chorizo' samples would suggest a more important role of the secondary proteolytic products in the processing of this product linked to the microbial activity. The antioxidant and free radical scavenging effects of this phenolic amine have been described as comparable to those of α -tocopherol (Yen & Hsieh, 1997). The same was found for salchichón; the nitrogen compounds linked to PC1 included natural compounds that were negatively related to inoculated batches, especially for P198S34. However, in contrast to salchichón, the control samples of 'chorizo' were mainly associated with presumed peptides, probably as a consequence of the higher proteolytic activity of autochthonous microorganisms in this meat product.

In conclusion, the microbial population found in fermented sausages significantly influences the profile of the low molecular weight nitrogen compounds and the antioxidant activity. The inoculation of well-adapted starter cultures with high proteolytic activity increased the antioxidant activity of these extracts, mainly due to

an increase in free amino acids and amines such as Lys, Met and tyramine, but also small peptides. Thus, the use of starter cultures in Iberian sausages can contribute to delaying oxidative changes during storage.

Acknowledgments

This work was supported by Project PRI08A093 from the Government of Extremadura (Spain) and FEDER. M. Fernández is the beneficiary of a predoctoral grant from the Valhondo Calaff Foundation (Cáceres, Spain). The authors are grateful to M. Cabrero and J. Barneto for technical assistance.

References

- Ambrosiadis, J., Soutosa, N., Abrahamia, A. & Bloukas, J.G. (2004). Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. *Meat Science*, **66**, 279–287.
- Bauchard, C., Rémond, D., Chambon, C. *et al.* (2006). Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Science*, **74**, 658–666.
- Benito, M.J., Rodríguez, M., Córdoba, M.G., Andrade, M.J. & Córdoba, J.J. (2005). Effect of the fungal protease Epg 222 on proteolysis and texture in the dry fermented sausage "Salchichón". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 273–280.
- Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevaldo, 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**, M193–M201.
- Benito, M.J., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Pérez-Nevaldo, F. & Córdoba, M.G. (2008a). Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, **80**, 656–661.
- Benito, M.J., Serradilla, M.J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A. & Córdoba, M.G. (2008b). Differentiation of Staphylococci from Iberian dry fermented sausages by protein fingerprinting. *Food Microbiology*, **25**, 676–682.
- Berdagué, J.L., Bonnaud, N., Rousset, S. & Touraille, C. (1993). Influence of pig crossbreed on the composition volatile compound content and flavour of dry cured ham. *Meat Science*, **34**, 119–129.
- Broncano, J.M., Otte, J., Petró, M.J., Parra, V. & Timón, M.L. (2012). Isolation and identification of low molecular weight antioxidant compounds from fermented "chorizo" sausages. *Meat Science*, **90**, 494–501.
- Cao, G., Verdon, C.P., Wu, A.H.B., Wang, H. & Prior, R.L. (1995). Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II. *Clinical Chemistry*, **41**, 1738–1744.
- Casaburi, A., Villani, F., Toldra, F. & Sanz, Y. (2006). Protease and esterase activity of Staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, **112**, 223–229.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F. & Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2619–2623.
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J. & Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, **38**, 344–349.
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B. & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, **67**, 1939–1944.

- De Ketelaere, A., Demeyer, D., Vandekerckhove, P. & Vervaeke, I. (1974). Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. *Journal of Food Science*, **39**, 297–300.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. & Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, **69**, 307–317.
- Engelvin, G., Feron, G., Perrin, C., Molle, D. & Talon, R. (2000). Identification of β -oxidation and thioesterase activities in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *FEMS Microbiology Letters*, **190**, 115–120.
- Escudero, E., Aristoy, M.C., Nishimura, H., Arihara, K. & Toldrá, F. (2012). Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science*, **91**, 306–311.
- Fista, G.A., Bloukas, J.G. & Siomos, A.S. (2004). Effect of leek and onion on processing and quality characteristics of Greek traditional sausages. *Meat Science*, **68**, 163–172.
- Gómez-Ruiz, J.A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M. & Recio, I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, **227**, 1061–1067.
- González, B. & Díez, V. (2002). The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of “chorizo”—a Spanish dry cured sausage. *Meat Science*, **60**, 295–298.
- Guiotto, A., Calderan, A., Ruzza, P. & Borin, G. (2005). Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Current Medicinal Chemistry*, **12**, 2293–2315.
- He, R., Ju, X., Yuan, J., Wang, L., Girgih, A.T. & Aluko, R.E. (2012). Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Research International*, **49**, 432–438.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 588–593.
- Huang, W., Shen, S., Nimalaratne, C., Lib, S., Majumder, K. & Wu, J. (2012). Effects of addition of egg ovotransferrin-derived peptides on the oxygen radical absorbance capacity of different teas. *Food Chemistry*, **135**, 1600–1607.
- Hughes, M.C., Kerry, J.P., Arendt, E.K., Kenneally, P.M., McSweeney, P.L.H. & O'Neill, E.E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science*, **62**, 205–216.
- ISO. (1973). *Meat and Meat Product-Determination of Moisture Content Method 1442*. Geneva: ISO.
- Leggio, A., Belsito, E.L., Marco, R.D. et al. (2012). Dry fermented sausages of southern Italy: a comparison of free amino acids and biogenic amines between industrial and homemade products. *Journal of Food Science*, **77**, S170–S175.
- 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.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. & Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of southern Italy. *Meat Science*, **67**, 149–158.
- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinc, M. & Geenen, I. (1997). The importance of meat enzymes in dry fermented sausages. First results of European project. *Food Chemistry*, **59**, 539–545.
- Mora, L., Sentandreu, M.A., Koistinen, K.M., Fraser, P.D., Toldrá, F. & Bramley, P.M. (2009). Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in Serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 3228–3234.
- Olesen, P.T., Meyer, A.S. & Stahnke, L.H. (2004). Generation of flavor compounds in fermented sausages the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, **66**, 675–687.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M. & Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4619–4626.
- Park, D. & Xiong, Y.L. (2007). Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Food Chemistry*, **103**, 607–616.
- Pritchard, S.R., Phillips, M. & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, **43**, 1545–1548.
- Sampath Kumar, N.S., Nazeer, R.A. & Jaiganesh, R. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Megalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids*, **42**, 1641–1649.
- Şanlıdere Aloglu, H. & Öner, Z. (2011). Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science*, **94**, 5305–5314.
- Spaziani, M., Del Torre, M. & Stecchini, L. (2009). Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *Meat Science*, **81**, 77–85.
- Stadman, E.R. & Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **899**, 191–208.
- Stahnke, L.H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A. & Zanardi, E. (2002). Maturity acceleration of Italian dried sausage by *Staphylococcus carnosus*—relationship between maturity and flavor compounds. *Journal of Food Science*, **67**, 1914–1921.
- Stockham, K., Paimin, R., Orbell, J.D., Adorno, P. & Buddhadasa, S. (2011). Modes of handling Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) data and reporting values in product labelling. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**, 686–691.
- Sun, W., Zhao, H., Zhao, Q., Zhao, M., Yang, B. & Wu, N. (2009). Structural characteristics of peptides extracted from Cantonese sausage during drying and their antioxidant activities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**, 558–563.
- Suzzi, G. & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, **88**, 41–54.
- Tjener, K., Stahnke, L.H., Andersen, L. & Martinussen, J. (2004). Growth and production of volatiles by *Staphylococcus carnosus* in dry sausages: influence of inoculation level and ripening time. *Meat Science*, **67**, 447–452.
- Wang, W.Y. & De Mejia, E.G. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **4**, 63–78.
- Wu, H.C., Shiau, C.Y., Chen, H.M. & Chiou, T.K. (2003). Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *Journal of Food and Drug Analysis*, **11**, 148–153.
- Yen, G.C. & Hsieh, C.L. (1997). Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **61**, 1646–1649.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M. & Ren, J. (2010). Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International*, **43**, 1167–1173.
- Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, X. & Yao, H. (2009). Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. *European Food Research and Technology*, **229**, 709–719.
- Zhang, T., Li, Y.H., Miao, M. & Jiang, B. (2011). Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, **128**, 28–33.
- Zhu, K.X., Zhou, H.M. & Qian, H.F. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, **41**, 1296–1302.

IV.2.- Influence of starter culture and protease on the generation of ACE-inhibitory and antioxidant bioactive nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausages.

Enviado a la revista "Food Research International"

Manuscript Number:

Title: Influence of starter culture and a protease on the generation of ACE-inhibitory and antioxidant bioactive nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausages

Article Type: Research Paper

Keywords: *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus vitulus*, starter cultures, protease, dry-fermented sausages, ACE-inhibitory compounds, antioxidant compounds.

Corresponding Author: Dr. Maria Jose Benito, Doctor

Corresponding Author's Institution: Universidad de Extremadura

First Author: Margarita Fernández

Order of Authors: Margarita Fernández; Maria Jose Benito, Doctor; Alberto Martín; Rocio Casquete; Juan J Córdoba; Maria G Córdoba

Abstract: The effect of the addition of an autochthonous starter culture and the protease EPg222 on the generation of angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antioxidant compounds by the dry-fermented sausage "salchichón" was investigated. Sausages were prepared with purified EPg222 and *Pediococcus acidilactici* MS200 and *Staphylococcus vitulus* RS34 as the starter culture (P200S34), separately and together, ripened for 90 days, and compared to a control batch. Batches inoculated with EPg222 achieved higher nitrogen compound concentrations after 63 days of ripening. ACE-inhibitory and antioxidant activities were also highest in both batches with EPg222 after 63 days of ripening, and these activities were stable after in vitro simulated gastrointestinal digestion. These activities were correlated with the most relevant compounds detected by HPLC-ESI-MS. The P200S34+EPg222 batch was mainly linked to the major compounds identified. The antioxidant activity was higher at 63 days of ripening, especially in highly proteolytic batches, such as P200S34+EPg222. The ACE-inhibitory activity was not associated with any of the major compounds. Since the use of the enzyme EPg222 in association with the starter culture P200S34 improved sensory characteristics, their use in the preparation of dry-cured meat products could be of great importance due to their demonstrated ability to produce compounds with high biological activity, such as ACE-inhibitory and antioxidant activity.



ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS

NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Carretera de Cáceres s/n
06071-Badajoz (Spain)
Teléfono: +34 924 286200 ext 6270
Fax: +34 924 286201
E-MAIL: mjbenito@unex.es

September 29, 2015

Please find enclosed the manuscript entitled “**ACE-inhibitory and antioxidant bioactive nitrogen compounds generated by an autochthonous starter culture and the protease EPg222 from a traditional Iberian dry-fermented sausage “salchichón”**” to be considered for publication in the *Food Research International*.

Mailing address: Nutrición y Bromatología. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura. 06071-Badajoz. Spain.

Phone: 0034 924 286200 ext 86270. Fax: 0034 924286201.

E-mail: mjbenito@unex.es

Authors: Margarita Fernández (University of Extremadura, Spain), Maria José Benito (University of Extremadura, Spain), Alberto Martín (University of Extremadura, Spain), Rocio Casquete (University of Extremadura, Spain), Juan José Córdoba (University of Extremadura, Spain), María de Guía Córdoba (University of Extremadura, Spain)

In this manuscript was studied the effect of the addition of an autochthonous starter culture and the protease EPg222 on the generation of angiotensin-I–converting enzyme (ACE)-inhibitory and antioxidant compounds by the dry-fermented sausage “salchichón” was investigated. Sausages were prepared with purified EPg222 and *Pediococcus acidilactici* MS200 and *Staphylococcus vitulus* RS34 as the starter culture (P200S34), separately and together, ripened for 90 days, and compared to a control batch. Batches inoculated with EPg222 achieved higher nitrogen compound concentrations after 63 days of ripening. ACE-inhibitory and antioxidant activities were also highest in both batches with EPg222 after 63 days of ripening, and these activities were stable after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. These activities were correlated with the most relevant compounds detected by HPLC-ESI-MS. The P200S34+EPg222 batch was mainly linked to the major compounds identified. The antioxidant activity was higher at 63 days of ripening, especially in highly proteolytic batches, such as P200S34+EPg222. The ACE-inhibitory activity was not associated with any of the major compounds. Since the use of the enzyme EPg222 in association with the starter culture P200S34 improved sensory characteristics, their use in the preparation of dry-cured meat products could be of great importance due to their demonstrated ability to produce compounds with high biological activity, such as ACE-inhibitory and antioxidant activity.

Highlights (for review)

Autochthonous starter culture and the protease EPg222 were added to sausages to investigate bioactive nitrogen compounds generated. >ACE-inhibitory and antioxidant activities were studied during ripening process. >Batches inoculated with EPg222 in association with the starter culture P200S34 showed highest ACE-inhibitory and antioxidant activities. >We demonstrated the ability to produce compounds with antihypertensive and antioxidant activities.

1 **Influence of starter culture and a protease on the generation of ACE-**
2 **inhibitory and antioxidant bioactive nitrogen compounds in Iberian dry-**
3 **fermented sausages**

4

5 Margarita Fernández, María J. Benito*, Alberto Martín, Rocío Casquete, Juan J
6 Córdoba² and María G. Córdoba

7

8 Nutrición y Bromatología. Escuela de Ingenierías Agrarias, e Instituto
9 Universitario de Investigación de Recursos Agrarios (INURA). Universidad de
10 Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n. 06071 Badajoz, Spain

11 ²Higiene y Seguridad de los Alimentos, Univ. de Extremadura, Avda.
12 Universidad s/n, 10071 Cáceres, Spain

13

14 *Corresponding author

15 Tel.: +34 924 286200

16 Fax: +34 924 286201

17 E-mail: mjbenito@unex.es

18 <http://eia.unex.es>

19

20 **Abstract**

21 The effect of the addition of an autochthonous starter culture and the
22 protease EPg222 on the generation of angiotensin-I–converting enzyme (ACE)-
23 inhibitory and antioxidant compounds by the dry-fermented sausage
24 “salchichón” was investigated. Sausages were prepared with purified EPg222
25 and *Pediococcus acidilactici* MS200 and *Staphylococcus vitulus* RS34 as the
26 starter culture (P200S34), separately and together, ripened for 90 days, and
27 compared to a control batch. Batches inoculated with EPg222 achieved higher
28 nitrogen compound concentrations after 63 days of ripening. ACE-inhibitory and
29 antioxidant activities were also highest in both batches with EPg222 after 63
30 days of ripening, and these activities were stable after *in vitro* simulated
31 gastrointestinal digestion. These activities were correlated with the most
32 relevant compounds detected by HPLC-ESI-MS. The P200S34+EPg222 batch
33 was mainly linked to the major compounds identified. The antioxidant activity
34 was higher at 63 days of ripening, especially in highly proteolytic batches, such
35 as P200S34+EPg222. The ACE-inhibitory activity was not associated with any
36 of the major compounds. Since the use of the enzyme EPg222 in association
37 with the starter culture P200S34 improved sensory characteristics, their use in
38 the preparation of dry-cured meat products could be of great importance due to
39 their demonstrated ability to produce compounds with high biological activity,
40 such as ACE-inhibitory and antioxidant activity.

41

42 **Keywords:** *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus vitulus*, starter cultures,
43 protease, dry-fermented sausages, ACE-inhibitory compounds, antioxidant
44 compounds.

45

46 **1. Introduction**

47 Research investigating bioactive nitrogen compounds has increased
48 significantly over the last decade, and several studies have been published
49 (Arihara, 2006; Korhonen & Pihlanto, 2006; Rutherford-Marwick & Moughan,
50 2005; Shahidi & Zong, 2008; Smacchi & Gobetti, 2000). Although they are not
51 active within the primary structure of their original proteins, some peptides and
52 other nitrogen compounds with specific amino acid sequences are known to
53 exhibit biological activity and can be released through enzyme-mediated
54 hydrolysis (Nalinanon et al., 2011; Pihlanto-Lepälä, 2000; Torres-Fuentes et al.,
55 2011).

56 Bioactive nitrogen compounds have proven useful in the prevention of diseases
57 that are major health problems worldwide, e.g. hypertension, which is one of the
58 major risk factors for the eventual development of cardiovascular disease.
59 Angiotensin-converting enzyme (ACE) has been implicated in hypertension, and
60 the ability to inhibit ACE has been found for many different peptides from food
61 proteins, such as milk (Contreras et al., 2009; FitzGerald & Meisel, 2000;
62 Pihlanto-Lepälä et al., 1998) and derivatives thereof, such as cheese (Gómez-
63 Ruiz et al., 2004; Lignitto et al., 2010) or yogurt (Papadimitriou et al., 2007), as
64 well as egg (Korhonen & Pihlanto, 2003; Miguel & Aleixandre, 2006), soy (Chen
65 et al., 2004; Korhonen & Pihlanto, 2003), buckwheat (Ma et al., 2006), sesame
66 (Nakano et al., 2006), broccoli (Lee et al., 2006), chickpea (Yustm et al., 2003),
67 fish (Wijesekara et al., 2011) and meat (Arihara, 2006; Jang & Lee, 2005;
68 Verduyck et al., 2005).

69 Oxidative metabolism is essential for cell survival, but generates free radicals
70 and other reactive oxygen species that can cause oxidative damage.

71 Antioxidant activity has been specifically found in food proteins, such as those
72 of milk and meat (Broncano et al., 2012; Escudero et al., 2013; Ko et al., 2013;
73 Li et al., 2007; Peña-Ramos & Xiong, 2003, 2001; Pihlanto-Lepälä, 2006;
74 Tanzadehpanah et al., 2012; Wang et al., 2007).

75 The easiest way to produce bioactive compounds in food is the enzymatic
76 hydrolysis of proteins from these whole foods.

77 In addition to nitrogen compound bioactivity, it is important to take into account
78 their bioavailability. This is defined as the fraction of a compound that is
79 released from the food matrix in the gastrointestinal tract and therefore
80 becomes available for absorption to carry out its bioactivity (Fernández-García
81 et al., 2009). Bioaccessibility includes the gastrointestinal processing of the food
82 matrix material to be absorbed by the cells of the intestinal epithelium. *In vitro*
83 testing of gastrointestinal digestion can show the bioavailability of nitrogen
84 compounds and the production of new bioactive compounds due to the activity
85 of digestion enzymes, such as pepsin, trypsin and chymotrypsin.

86 Iberian dry-fermented sausages are high-value products made with traditional
87 technologies. The final product quality is closely related to the maturation that
88 occurs during drying. Proteolysis is one of the most important biochemical
89 changes to occur during ripening of the dry-fermented sausages. Peptides are
90 generated by the action of endogenous enzymes and especially by the
91 proteases produced by microorganisms involved in the ripening process, given
92 that endogenous enzymes may be inhibited by salt curing agents during the
93 ripening process (Rico et al., 1991; Sárraga et al., 1989; Toldrá et al., 1993).

94 LAB and *Staphylococcus* strains were selected from indigenous populations to
95 obtain starter cultures that were better adapted to Iberian dry-fermented

96 sausages, which could help preserve the typical characteristics of these
97 products. Indeed, autochthonous LAB and staphylococci have been shown to
98 make good starter cultures (Benito et al., 2007; Martín et al., 2007). Different
99 combinations of selected autochthonous *Pediococcus acidilactici* and
100 *Staphylococcus vitulus* strains, which have been demonstrated to have
101 proteolytic activities, have been used in fermented products with different
102 ripening processes (Casquete et al., 2011a, 2011b, 2012). The use of the mixed
103 starter culture P200S34, combining *P. acidilactici* MS200 with *S. vitulus* RS34,
104 showed the best results for the production of traditional fermented sausages,
105 maintaining the typical sensory characteristics while improving its homogeneity
106 and safety.

107 Similarly, the use of proteases obtained from microorganisms isolated from dry-
108 fermented meat products could be more appropriate than other proteases, since
109 they may be more suitable and adapted to the traditional ripening process.
110 EPg222 protease purified from *Penicillium chrysogenum* Pg222, which was
111 isolated from dry-cured meat products, has high proteolytic activity against
112 myofibrillar proteins under the conditions of temperature, pH and NaCl
113 concentration used for dry-cured meat products (Benito et al., 2002, 2006). This
114 protease has been reported in sterile ripened pork and in fermented sausages
115 (Benito et al., 2003, 2004, Casquete et al., 2011c). Therefore, the combination
116 of active and specific proteases, such as a starter culture and EPg222, could be
117 of great interest for the production of bioactive compounds in fermented dry
118 sausages.

119 The aim of this study was to investigate the effect of the starter culture P200S34
120 and the protease EPg222, individually and together, in the formation of

121 compounds with ACE-inhibitory and antioxidant activity in dry-fermented
122 sausages.

123

124 **2. Materials and Methods**

125 *2.1. Starter culture and protease EPg222 preparation*

126 The association of the strains of *Pediococcus acidilactici* (MS200) and
127 *Staphylococcus vitulus* (RS34) was chosen to form the starter culture P200S34,
128 which was cultured and freeze-dried as described by Casquete et al. (2011a).
129 Powders with total viable cell counts (TVC) of more than 10^{11} CFU g⁻¹ were
130 used in the dry-fermented sausages. For this trial, EPg222 was obtained
131 according to the protocol described by Benito et al. (2006). The enzyme
132 EPg222 was ultrafiltered and lyophilized as above.

133

134 *2.2. Preparation of dry-fermented sausages*

135 Iberian dry-fermented sausages were prepared according to Casquete et al.
136 (2011c). The lyophilized starter P200S34 and enzyme EPg222 were also added
137 to obtain four different batches: (i) the control batch without the starter culture or
138 EPg222; (ii) with the enzyme EPg222 added; (iii) with the starter culture
139 P200S34 added; (iv) with the starter culture P200S34 and EPg222
140 (P200S34+EPg222 batch) added.

141 Three batches of sausages were made with each starter culture. The sausages
142 were ripened for 90 days, and for sampling, three different sausages of each
143 batch were taken randomly at various time points of ripening: 19 (Beginning), 28
144 (Middle 1), 63 (Middle 2), and 90 (Final) days for physico-chemical and

145 microbiological analyses (Casquete et al., 2011c). Each analysis was performed
146 in triplicate.

147

148 *2.3. Physicochemical and Microbial analysis*

149 The moisture content of the dry-fermented sausages was determined by
150 dehydration at 100 °C to a constant weight by the ISO recommended methods
151 (ISO, 1973). Water activity (Aw) was determined using an FA-St/1 apparatus
152 from GBX (France Scientific Instrument). The pH was measured using a Crison
153 mod. 2002 pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

154 To investigate the presence of strains inoculated at high levels in the sausages,
155 samples were taken at the time points described above. The *Staphylococcus*
156 count was determined in mannitol salt agar (MSA) at 30 °C, and lactic acid
157 bacteria were grown in Man–Rogosa–Sharpe agar (MRS) (Oxoid) at 37 °C and
158 with the pH adjusted at 5.6 for 24 h under anaerobic conditions. To investigate
159 the presence of strains inoculated at high levels in the sausages, ten colonies
160 from the plates with the highest dilutions were isolated in 5 mL of MRS or MSA
161 broth to collect strains. Then, the DNA was obtained, and 16S rRNA gene
162 sequence analysis was done as described by Benito et al. (2008a,b).
163 Sequences were compared with the EMBL and GenBank database using the
164 BLAST algorithm. The identities of the isolates were determined on the basis of
165 the highest score.

166

167 *2.4. Preparation of extracts*

168 The nitrogen compounds were extracted according to De Ketelaere et al. (1974)
169 and Bauchart et al. (2006). Fifteen grams of the sample were homogenised in

170 50 ml of 0.6 N perchloric acid with an Omni Mixer Homogenizer. The
171 homogenate was centrifuged at 2000 x g for 15 min. The soluble fraction
172 located between the upper layer and the precipitate was filtered through
173 Whatman No. 54 filter paper. The pH was neutralised to pH 6 with 30% KOH.
174 To eliminate the potassium perchlorate that formed during neutralisation, the
175 extracts were filtered again. Finally, extracts were ultrafiltered through
176 hydrophilic 10- and 5-kDa cut-off membranes (Pellicon XL, Millipore
177 Corporation, Billerica, MA, USA) and the 5-kDa permeates were freeze-dried
178 and kept at -80°C until use.

179 The protein contents of the 5-kDa permeate extracts were determined by a
180 colorimetric method based on bicinchoninic acid (BCA) (Pierce, Rockford, IL,
181 USA), using bovine serum albumin as the standard protein. To determine the
182 biological activities, the concentrations of all extracts were equalised.

183

184 *2.5. Assessment of ACE-inhibitory activity*

185 ACE-inhibitory activity was measured by fluorescence according to the method
186 developed by Sentandreu and Toldrá (2006a, 2006b), with some modifications
187 (Quirós et al., 2009). ACE, previously dissolved in 50% glycerol, was diluted in
188 0.15 M Tris buffer (pH 8.3) containing 0.1 µM ZnCl₂ with 0.04 U/mL of enzyme
189 in the final reaction solution. Black polystyrene 96-well microplates (Povair,
190 Leatherhead, UK) were used. A total of 40 µL of distilled water or the ACE
191 working solution were added to each microtitre plate well, then adjusted to
192 80 µL by adding distilled water to the blank (B), control (C) or samples (S). To
193 take into account the interference of the compounds, a sample blank (SB) was
194 prepared by replacing distilled water with the sample. The enzyme reaction was

195 started by adding 160 μ L of 0.45 mM o-Abz-Gly-p-Phe(NO₂)-Pro-OH (Bachem
196 Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland) dissolved in 150 mM Tris-base buffer
197 (pH 8.3), containing 1.125 M NaCl, and the mixture was incubated at 37°C. The
198 fluorescence generated was measured at 30 min using a multiscan microplate
199 fluorimeter (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany). The
200 excitation and emission wavelengths were 350 and 420 nm, respectively. The
201 software used to process the data was FLUOstar control (version 1.32 R2, BMG
202 Labtech). The activity of each sample was tested in triplicate. Inhibitory activity
203 is expressed as the nitrogen compounds concentration required to inhibit the
204 original ACE activity. The formula applied to calculate the percentage of ACE-
205 inhibitory activity was: $100 \times [(C - B) - (S - SB)] / (C - B)$.

206

207 *2.6. Assessment of antioxidant activity*

208 The ORAC-FL assay was based on that proposed by Ou et al. (2001) with
209 some modifications (Contreras et al., 2011; Dávalos et al., 2004). Black
210 polystyrene 96-well microplates (Porvair, Leatherhead, UK) were used. Briefly,
211 the reaction was carried out at 40°C in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) and
212 the final assay mixture (200 μ L) contained FL (116.7 nM), AAPH (46.6 mM),
213 and antioxidant [Trolox (0.2 and 1.6 nmol) or sample (at different
214 concentrations)]. AAPH and Trolox solutions were prepared daily and FL was
215 diluted from a stock solution (1.17 mM) in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4).
216 The fluorescence was recorded for 104 min (104 cycles). A FLUOstar OPTIMA
217 plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) with 485-nm excitation and
218 520-nm emission filters was used. The equipment was controlled by FLUOstar
219 Control software version (1.32 R2) for fluorescence measurement. All reaction

220 mixtures were prepared in duplicate and at least two independent runs were
221 performed for each sample. Final ORAC-FL values are expressed as mmol of
222 Trolox equivalent/mg of protein.

223

224 *2.7. In vitro pepsin–pancreatin simulated gastrointestinal digestion*

225 Simulated gastrointestinal (GI) digestion using *in vitro* pepsin–pancreatin
226 hydrolysis was carried out according to Cinq-Mars et al. (2008) and You et al.
227 (2010) with a slight modification. Extracts were adjusted to pH 2.0 with 1 M HCl.
228 Then, pepsin [4% weight as received/weight of protein in the powder (~85%
229 protein)] was added. The mixture was incubated at 37°C for 90 min. The pH
230 was then adjusted to pH 7.5 with 1 M NaOH. Pancreatin was added [4% weight
231 as received/weight of protein in the powder (~85% protein)], and the mixture
232 was further incubated at 37°C for 2 h. To terminate the digestion, the test tubes
233 were kept in boiling water for 10 min. Then, the GI digests were cooled to room
234 temperature and centrifuged at 5000 rpm for 5 min.

235 To investigate the changes in antioxidant and ACE-inhibitory activity of sample
236 digests after simulated GI digestion, samples of GI digests were recovered and
237 the assays were performed as described above.

238

239 *2.8. Identification of the extracts by HPLC-ESI-MS*

240 Nitrogen compounds of the extracts were analysed by HPLC-ESI-MS according
241 to Gómez-Ruiz et al., (2008) in an Agilent series 1100 apparatus (Agilent
242 Technologies, Palo Alto, USA). A Supelcosil LC-18 column (SUPELCO,
243 Bellafonte, USA) was used with mobile phases (A) a mixture of water and
244 trifluoroacetic acid (1000:0.37, v/v) and (B) acetonitrile and trifluoroacetic acid

245 (1000:0.27, v/v) in a gradient of solvent B in A increasing from 0% to 45% in 60
246 min, and from 45% to 70% in 5 min at a flow rate of 0.8 ml/min. Nitrogen
247 compounds were identified in an Agilent series 6100 Series Single Quad LC/MS
248 (Agilent Technologies) equipped with a multimode source in electrospray
249 ionization mode, according to their retention time and mass spectrum.
250 Standards of biogenic amines, amino acids, taurine and carnitine (Sigma–
251 Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) were used. The other nitrogen compounds
252 detected were identified by their mass spectra.

253

254 *2.9. Statistical analysis*

255 Statistical analysis of the data was carried out using variance mixed ANOVA,
256 and the means were separated by Tukey's honest significant difference (HSD)
257 test ($P \leq 0.05$), using SPSS for Windows, 15.0. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).
258 The relationships among the antioxidant activity and the nitrogen compounds
259 detected at the end of the processing of the meat-fermented sausages studied
260 were evaluated by principal component analysis (PCA).

261 **3. Results and Discussion**

262 The obtained results were not affected by physicochemical factors, because the
263 moisture content, water activity (a_w) and pH values did not differ significantly
264 between the control, EPg222 and starter culture batches. pH decreased from
265 about 6.3 to 4.9 during ripening, being 5.7 at the end of process in all batches.
266 The moisture content decreased from initial values of 65% to 30% at the end of
267 ripening. Water activity ranged from values of 0.95 to 0.82 at the end of ripening
268 in all batches. These results are similar to those reported by Benito et al., 2007.

269 On the other hand, it was check the starter culture was around 10^7 CFU g⁻¹ for
270 *P. acidilactici* and *S. vitulus* in the P200S34 and P200S34+EPg222 batches.

271

272 *Protein content of the 5-kDa permeate extracts*

273 Table 1 shows the nitrogen compound concentrations of the 5-kDa permeate
274 extracts measured by the bicinchoninic acid colorimetric method.

275 During the ripening of sausages, an increase in the nitrogen compound
276 concentration was observed, which reached its maximum value at the end of
277 ripening (90 days). Batch P200S34 inoculated with the starter culture was the
278 exception, as it reached its highest concentration after 63 days of ripening and
279 then decreased until the end of ripening. This could be because the starter
280 culture microorganisms metabolised small peptides during the last stage of
281 maturation, whereas the batch with the protease EPg222 with and without the
282 starter culture had a higher amount of formed peptides because of the
283 additional protease activity. These data are consistent with those obtained by
284 Casquete et al. (2011c). In this study, it was found that the use of these starter
285 cultures and EPg222 produced an increase in non-protein nitrogen (NPN) at the
286 end of sausage ripening. The batch inoculated with EPg222 showed the highest
287 value of NPN.

288 The batch with the highest nitrogen compound concentration was inoculated
289 with EPg222 and ripened for 63 days (Table 1). Batches with a higher initial
290 concentration of nitrogen compound may have higher bioactivity.

291

292 *ACE-inhibitory activity and antioxidant activity*

293 Table 2 shows the values of ACE inhibition from the batches during the ripening
294 of the sausages. The range of the activity values was very wide and ranged
295 from 19% to 95%.

296 All the batches showed the highest activity at day 63 of ripening. After this time
297 point, the ACE-inhibitory activity of all batches decreased, which could be due
298 to proteolysis in the sausages and hydrolysis of some of the compounds that
299 are responsible for ACE inhibition.

300 The results observed after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion with
301 pepsin and pancreatin showed that no activity was lost (Table 2). This result is
302 very interesting since the potential hypotensive effect of ACE-inhibitory
303 compounds depends on their ability to reach the organs, *i.e.* where they exert
304 their bioactivity. Testing gastrointestinal digestion is important to determine
305 whether these bioactive compounds maintain their activity after passing through
306 the human digestive system and remain intact. Furthermore, this digestion can
307 generate novel bioactive compounds from other inactive molecules present in
308 the extracts (Matsui et al., 2002; Rutherford-Markwick & Moughan, 2005;
309 Vermeirssen et al., 2004).

310 Batches with the EPg222 protease achieved the highest ACE-inhibitory activity,
311 *i.e.* between 89% and 95% after 63 days of ripening. As described above, these
312 batches had the highest concentration of nitrogen compounds according to the
313 BCA assay. These values should be highlighted because the concentration was
314 standardised to measure the biological activities, and these batches had the
315 greatest inhibition of ACE. The fact that the highest value of ACE-inhibitory
316 activity occurred at 63 days of ripening may be due to the degradation of active
317 compounds into inactive molecules. This has been found in cheese, in which

318 the proteolysis that occurs during maturation increases the ACE-inhibitory
319 activity to a peak, after which the activity decreases (Smacchi & Gobbetti, 2000)
320 because the bioactive compounds become inactive molecules (Ryhänen et al.,
321 2001).

322 In previous studies, it has been found that the addition of proteases during the
323 meat dry-curing process releases peptides and free amino acids (Díaz et al.,
324 1993, 1997; Naes et al., 1995; Ordoñez et al., 1999; Zapelena et al., 1997,
325 1999), but the potential bioactivity of these compounds has not been studied.
326 The use of EPg222 with high proteolytic activity (Benito et al., 2002, 2003,
327 2004, 2006; Casquete et al., 2011c) is important due to its activity on meat
328 proteins. Previously, it has been observed that the batches in which this
329 enzyme was added showed a higher concentration of nitrogen compounds
330 (Table 1). It should be highlighted that the compounds produced by this enzyme
331 are resistant to gastrointestinal digestion. Furthermore, the ACE inhibitory
332 activity shown by these compounds remained high.

333 Table 3 shows the absorption capacity of the oxygen radical fluorescein
334 (ORAC-FL) by different batches during the ripening of sausages, expressed as
335 $\mu\text{mol Trolox/mg protein}$ in the extract. In this table, a value of 1 indicates an
336 extract antioxidant capacity equal to that of Trolox. Before digestion, the
337 EPg222 batch at the end of ripening had an antioxidant activity of $2.57 \mu\text{mol}$
338 Trolox/mg of protein. This batch also highlighted at 63 days of ripening.

339 The results observed after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion with
340 pepsin and pancreatin are shown in Table 3. The values are higher than those
341 obtained before digestion with some values higher than $2 \mu\text{mol Trolox/mg}$ of
342 protein. It can be observed that these values are even higher than those

343 obtained in the samples before simulated gastrointestinal digestion, indicating
344 that the compounds with antioxidant activity present in these extracts are
345 resistant to the action of the enzymes active during gastrointestinal digestion.
346 Furthermore, these enzymes produce new compounds with antioxidant activity,
347 which increases the bioactivity after digestion.

348 Again, batches with the protease EPg222 were those that showed the highest
349 activity, which highlights the importance of adding the enzyme to the dry-curing
350 process. Due to its high proteolytic activity, EPg222 produces more compounds
351 that also have a high degree of biological activity. The antioxidant activity values
352 obtained in these assays were higher than those obtained by other authors for
353 hydrolysed whey protein (Tavares et al., 2011) and egg protein (You & Wu,
354 2011).

355 The use of this enzyme improves the sensory characteristics of dry-cured meat
356 products and, in association with the starter culture P200S34, reduces the
357 accumulation of biogenic amines in meats (Casquete et al., 2011c). These data
358 show that the use of EPg222 + P200S34 is important during the meat product
359 dry-curing process.

360

361 *Identification of the extracts by HPLC-ESI-MS*

362 The analysis of the extracts allowed a total of 12 major compounds to be
363 detected in the chromatogram and eight were potentially identified (Figure 1).
364 The most abundant peaks were mainly constituted by endogenous compounds,
365 but also by free amino acids (Phe, Ile, Leu and Val), biogenic amines (Tyr) and
366 four unidentified compounds. Among the major components of NPN fraction in

367 meat cured products have been reported these compounds, including in
368 fermented sausages (Broncano et al., 2012).

369 In order to determine the influence of major extract components on the activities
370 studied, a PCA was performed with the extract profiles of the samples obtained
371 during the ripening process and their activities (Figures 1 and 2). The natural
372 nitrogen compounds were mainly explained by the first axis (PC1) of the PCA.
373 These compounds were clearly associated with the 19 days of ripening of the
374 samples, suggesting a lower proportion of NPN derived from proteolysis
375 products in these extracts. The free amino acids that were identified were also
376 explained by PC1, being mainly linked to samples of the highly proteolytic batch
377 P200S34+EPg222. On the other hand, the PC2 of the PCA was defined by
378 antioxidant activity, Tyr, and the compound with m/z 146, which were related to
379 the 63 days of ripening of the samples, especially those of the batch
380 P200S34+EPg222 according to the results previously shown. The hypotensive
381 activity could be attributed to minor nitrogen compounds since this activity was
382 not associated with any of the major compounds found in the studied extracts.

383 In conclusion, batches inoculated with the protease EPg222 achieved higher
384 nitrogen compound concentrations after 63 days of ripening. The ACE-inhibitory
385 and antioxidant activities were also highest in both batches with the EPg222
386 protease after 63 days of ripening, and these activities were stable after *in vitro*
387 simulated gastrointestinal digestion. Since the use of the enzyme EPg222 in
388 association with the starter culture P200S34 improved the sensory
389 characteristics, their use in the elaboration of dry-cured meat products could be
390 of great importance due to their proven ability to produce compounds with
391 excellent biological activities, such as ACE-inhibitory and antioxidant activity.

392 **Acknowledgments**

393 This work formed part of the Projects PDT05A037 and PDT08A062 funded by
394 the Consejería de Educación y Tecnología (Junta de Extremadura co-funded
395 with FEDER funding). Margarita Fernández received a grant from the Valhondo
396 Calaff Foundation. The authors are grateful to M. Cabrero and C. Cebrián for
397 technical assistance.

398 **References**

- 399 Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products.
400 Meat Science, 74, 219-229.
- 401 Bauchard, C., Rémond, D., Chambon, C., Patureau Mirand, P., Savary-
402 Auzeloux, I., Reynès, C. & Morzel, M. (2006). Small peptides (<5 kDa)
403 found in ready-to-eat beef meat. Meat Science, 74, 658-666.
- 404 Benito, M. J., Rodríguez, M., Núñez, F., Asensio, M. A., Bermúdez, M. E., &
405 Córdoba, J. J. (2002). Purification and characterization of an extracellular
406 protease from *Penicillium chrysogenum* (Pg222) active against meat
407 proteins. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3532-3536.
- 408 Benito, M.J., Rodriguez, M., Acosta, R., & Córdoba, J.J. (2003). Effect of the
409 fungal extracellular protease EPg222 on texture of whole pieces of pork
410 loin. Meat Science, 65, 877-884.
- 411 Benito, M. J., Rodríguez, M., Martín, A., Aranda, E., & Córdoba, J. J. (2004).
412 Effect of the fungal protease EPg222 on the sensory characteristics of
413 dry fermented sausage “salchichón” ripened with commercial starter
414 cultures. Meat Science, 67, 497–505.
- 415 Benito, M.J., Connerton, I.F., & Córdoba, J.J. (2006). Genetic characterization
416 and expression of the novel fungal protease, EPg222 active in dry-cured
417 meat products. Applied Microbiology and Biotechnology, 73, 356-365.
- 418 Benito, M. J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., &
419 Córdoba, M. G. (2007). Characterization and selection of autochthonous
420 lactic acid bacteria isolated from traditional iberian dry-fermented
421 salchichón and chorizo sausages. Journal of Food Science, 72, M193-
422 M201.

423 Benito, M.J., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Pérez-Nevaldo, F. &
424 Córdoba, M.G. (2008a). Rapid differentiation of lactic acid bacteria from
425 autochthonous fermentation of Iberian dry fermented sausages. *Meat*
426 *Science*, 80, 656–661.

427 Benito, M.J., Serradilla, M.J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A. & Córdoba,
428 M.G. (2008b). Differentiation of *Staphylococci* from Iberian dry fermented
429 sausages by protein fingerprinting. *Food Microbiology*, 25, 676–682.

430 Broncano, J.M., Otte, J., Petró, M.J., Parra, V. y Timón, M.L. (2012). Isolation
431 and identification of low molecular weight antioxidant compounds from
432 fermented “chorizo” sausages. *Meat Science*, 90, 494-501.

433 Casquete, R., Martín, A., Benito, M.J., Ruiz-Moyano, S., Pérez-Nevaldo, F. &
434 Córdoba, M.G. (2011a). Impact of pre-selected autochthonous starter
435 cultures on the flavor quality of iberian dry-fermented “salchichón”
436 sausage with different ripening processes. *Journal of Food Science*,
437 76(1), S535-S544.

438 Casquete R, Benito M.J, Martín A, Ruiz Moyano S, Hernández A, Córdoba
439 M.G. (2011b). Effect of autochthonous starter cultures in the production
440 of “salchichón”, a traditional Iberian dry-fermented sausage, with different
441 ripening processes. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1562-
442 1571.

443 Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, J.J. &
444 Córdoba, M.G. (2011c). Role of autochthonous starter culture and the
445 protease EPg222 on the sensory and safety properties of a traditional
446 Iberian dry-fermented sausage “salchichón”. *Food Microbiology*, 28,
447 1432-1440.

448 Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E. & Córdoba,
449 M.G. (2012). Use of autochthonous *Pediococcus acidilactici* and
450 *Staphylococcus vitulus* starter cultures in the production of “chorizo” in 2
451 different traditional industries. *Journal of Food Science*, 71(1), M70-M79.

452 Chen, G.T., Zhao, L., Zhao, L.Y., Cong, T. & Bao, S.F. (2007). In vitro study on
453 antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. *Journal of the Science*
454 *of Food and Agriculture*, 87(2), 357-362.

455 Cinq-Mars, C.D., Hu, C., Kitts, D.D., & Li-Chan, E.C.Y. (2008). Investigations
456 into Inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell
457 transport of the angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides in
458 pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. *Journal of*
459 *Agricultural and Food Chemistry*, 56, 410–419.

460 Contreras, M.M., Carrón, R., Montero, M.J., Ramos, M. & Recio, I. (2009).
461 Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International*
462 *Dairy Journal*, 19, 566-573.

463 Contreras, M.M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P.J. &
464 Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey
465 protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface
466 methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 9-15.

467 Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. & Bartolomé, B. (2004). Extending
468 applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-
469 Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.

470 De Ketelaere, A., Demeyer, D., Vandekerckhove, P. & Vervaeke, I. (1974).
471 Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening.
472 *Journal of Food Science*, 39, 297-300.

473 Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G. D., de la Hoz, L., & Ordóñez,
474 J. A. (1993). Effect of the addition of the Pronase E on the proteolysis of
475 dry fermented sausages. *Meat Science*, 34, 205-216.

476 Díaz, O., Fernandez, M., García de Fernando, G. D., De la Hoz, L., & Ordóñez,
477 J. A. (1997). Proteolysis in dry fermented sausages: the effect of selected
478 exogenous proteases. *Meat Science*, 46, 115-128.

479 Escudero, E., Mora, L., Fraser, P.D., Aristoy, M.C. & Toldrá, F. (2013).
480 Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured
481 ham. *Food Chemistry*, 138, 1282-1288.

482 Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I. & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro
483 bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency.
484 *Nutrition Research*, 29, 751-760.

485 FitzGerald, R.J. & Meisel, H. (2000). Milk protein derived inhibitors of
486 angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84, Suppl. 1,
487 S33-S37.

488 Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M. & Recio, I. (2004). Angiotensin converting
489 enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese.
490 Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy*
491 *Journal*, 14, 1075-1080.

492 Gómez-Ruiz, J.A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M. & Recio, I.
493 (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of
494 active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and*
495 *Technology*, 227, 1061-1067.

496 ISO. (1973). *Meat and Meat Product-Determination of Moisture Content Method*
497 *1442*. Geneva: ISO.

498 Jang, A. & Lee, M. (2005). Purification and identification of angiotensin
499 converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat*
500 *Science*, 69, 653-661.

501 Ko, J.Y., Lee, J.H., Samarakoon, K., Kim, J.S. & Jeon, Y.J. (2013). Purification
502 and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish
503 (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food and Chemical*
504 *Toxicology*, 52, 113-120.

505 Korhonen, H. & Pihlanto-Lepälä, A. (2003). Food-derived bioactive peptides –
506 Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*,
507 9, 1297-1308.

508 Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and
509 functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.

510 Lee, J.E., Bae, I.Y., Lee, H.G. & Yang, C.B. (2006). Tyr-Pro-Lys, an angiotensin
511 I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica*
512 *oleracea*). *Food Chemistry*, 99, 143-148.

513 Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. & Wu, Y. (2007). Isolation and identification of
514 Antioxidant peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive
515 chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food*
516 *Chemistry*, 102(4), 1135-1143.

517 Lignitto, L., Cavatorta, V., Balzan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E.,
518 Sforza, S. & Segato S. (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibitory
519 activity of water-soluble extracts of Asiago d’allevio cheese. *International*
520 *Dairy Journal*, 20, 11-17.

521 Ma, M.S., Bae, I.Y., Lee, H.G. & Yang, C.B. (2006). Purification and
522 identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from
523 buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Food Chemistry*, 96, 36-42.

524 Martín, A., Colín, B., Aranda E., Benito, M. J., & Córdoba, M. G. (2007).
525 Characterization of Micrococcaceae isolated from Iberian dry-cured
526 sausages. *Meat Science*, 75, 696-708.

527 Matsui, T., Yukiyoishi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. & Matsumoto, K.
528 (2002). Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from
529 royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *Journal of*
530 *Nutritional Biochemistry*, 13, 80-86.

531 Miguel, M. & Aleixandre, A. (2006). Antihypertensive peptides derived from egg
532 proteins. *The Journal of Nutrition*, 136(6), 1457-1460.

533 Naes, H., Holck, A. L., Axelsson, L., Andersen, H. J., & Blom, H. (1995).
534 Accelerated ripening of dry fermented sausage by addition of a
535 *Lactobacillus* proteinases. *Journal of Food Science and Technology*, 29,
536 651–659.

537 Nakano, D., Ogura, K., Miyakoshi, M., Ishii, F., Kawanishi, H., Kurumazuka, D.,
538 Chol-Jun-Kwan, Ikemura, K., Takaoka, M., Morigushi, S., Iino, T.,
539 Kusumoto, A., Asami, S., Shibata, H., Kiso, Y. & Matsumura, Y. (2006).
540 Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory
541 peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously
542 hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(5),
543 1118-1126.

544 Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. & Shahidi, F. (2011). Functionalities
545 and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of

546 ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. Food
547 Chemistry, 124, 1354-1362.

548 Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in
549 the components of dry-fermented sausages during ripening. CRC Critical
550 Review in Food Science and Nutrition, 39, 329-367.

551 Ou, B., Hampsch-Woodill, M. y Prior, R. L. (2001). Development and validation
552 of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using
553 fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food
554 Chemistry, 49, 4619-4626

555 Papadimitriou, C.G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S.V., Gomes, A.M.,
556 Malcata, F.X. & Alichanidis, E. (2007). Identification of peptides in
557 traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting
558 enzyme (ACE)-inhibitory activity. Food chemistry, 105(2), 647-656.

559 Peña-Ramos, E.A. & Xiong, Y.L. (2003). Whey and soy protein hydrolysates
560 inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. Meat Science, 64(3), 259-263.

561 Pihlanto-Lepälä, A., Rokka, T. & Korhonen H. (1998). Angiotensin I-converting
562 enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. International
563 Dairy Journal, 8, 325-331.

564 Pihlanto-Lepälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey
565 proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. Trends in Food Science &
566 Techonology, 11, 347-356.

567 Pihlanto-Lepälä, A. (2006). Antioxidant peptides derived from milk proteins.
568 International Dairy Journal, 16, 1306-1314.

569 Quirós, A., Contreras, M.M., Ramos, M., Amigo, L. & Recio, I. (2009). Stability
570 to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -

571 casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides*. 30, 1848-
572 1853.

573 Rico, E., Toldrá, F., & Flores, J. (1991). Effect of dry-curing process parameters
574 on pork muscle cathepsin B, H and L activity. *Zeitschrift für Lebensmittel*
575 *Untersuchung und Forschung*, 193, 541-544.

576 Rutherfurd-Markwick, K.J. & Moughan, P.J. (2005). Bioactive peptides derived
577 from food. *Journal of AOAC International*, 88, 955-966.

578 Ryhänen, E-V., Pihlanto-Lepälä, A. & Pahkala, E. (2001). A new type of
579 ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy*
580 *Journal*, 11, 441-447.

581 Sárraga, C., Gil, M., Arnau, J., Monfort, J.M., & Cussó, R. (1989). Effect of
582 curing salt and phosphate on activity of porcine muscle proteases. *Meat*
583 *Science*, 25, 241-249.

584 Sentandreu, M.A. & Toldrá, F. (2006a). A fluorescence-based protocol for
585 quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nature Protocols*,
586 2423-2427.

587 Sentandreu, M.A. & Toldrá, F. (2006b). A rapid, simple and sensitive
588 fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme.
589 *Food Chemistry*. 97: 546-554.

590 Shahidi, A. & Zhong, B. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC*
591 *International*, 91, 914-931.

592 Smacchi, E. & Gobbetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products:
593 synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17,
594 129-141.

595 Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A. & Chamani, J. (2012). An antioxidant peptide
596 derived from Ostrich (*Struchio camelus*) egg white protein hydrolysates.
597 Food Research International, 49, 105-111.

598 Tavares, T.G., Contreras, M.M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P.J., Pintado,
599 M.E., Recio, I. & Malcata, F.X. (2011). Optimisation, by response surface
600 methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory
601 activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract.
602 International Dairy Journal, 21, 926-933.

603 Toldrá, F., Cerveró, C., Rico, E., & Part, C. (1993). Porcine aminopeptidase
604 activity as affected by curing agents. Journal of Food Science, 58, 724-
605 726.

606 Torres-Fuentes, C., Alaiz, M. & Vioque, J. (2011). Affinity purification and
607 characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates.
608 Food Chemistry, 129, 485-490.

609 Vercruyse, L., Van Camp, J. & Smagghe, G. (2005). ACE inhibitory peptides
610 derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review.
611 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 8106-8115.

612 Vermeirssen, V., Van Camp, J. & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of
613 angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. British Journal of
614 Nutrition, 92, 357-366.

615 Wang, J.S., Zhao, M.M., Zhao, Q.Z. & Jiang, Y.M. (2007). Antioxidant
616 properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation
617 systems. Food Chemistry, 101, 1658-1663.

618 Wijesekara, I., Qian, Z., Ryu, B., Ngo, D. & Kim, S. (2011). Purification and
619 identification of antihypertensive peptides from seaweed pipefish

620 (Syngnathus schlegeli) muscle protein hydrolysate. Food research
621 International, 44, 703-707.

622 You, L., Zhao, M., Regestein, J.M. & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant
623 activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during
624 a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry. 120: 810-816.

625 You, S.J. & Wu, J. (2011). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and
626 antioxidant activities of egg protein hydrolysates produced with
627 gastrointestinal and nongastrointestinal enzymes. Food Chemistry, 76
628 (6), C801-C807.

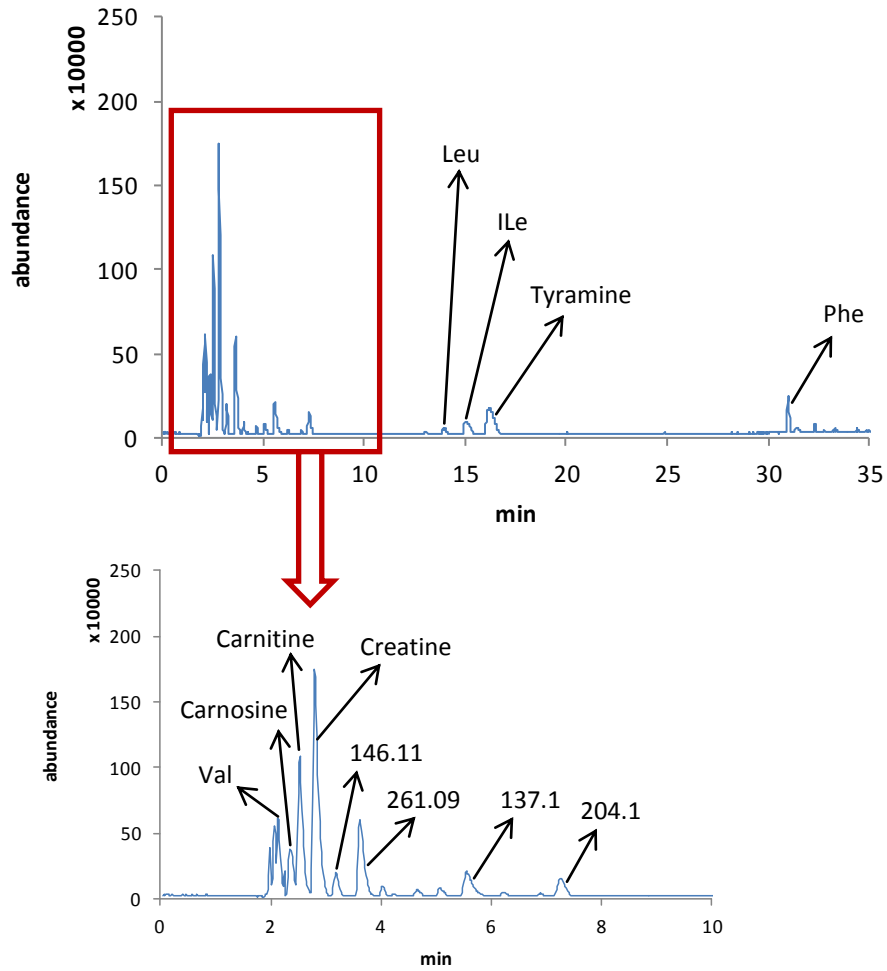
629 Yustm, M., Pedroche, J., Girón-Calle, j., Alaiz, M., Millán, F. & Vioque, J.
630 (2003). Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea
631 legumin with alcalase. Food Chemistry, 81, 363-369.

632 Zapelena, M.J., Zalacaín, I., de Peña, M., Astiasarán, I., & Bello, J. (1997).
633 Effect of the addition of a neutral proteinase from *Bacillus subtilis*
634 (Neutrase) on nitrogen fractions and texture of Spanish fermented
635 sausage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2798-2801.

636 Zapelena, M.J., Astiasarán, I., & Bello, J. (1999). Dry fermented sausages
637 made with a protease from *Aspergillus oryzae* and/or a starter culture.
638 Meat Science, 52, 403-409.

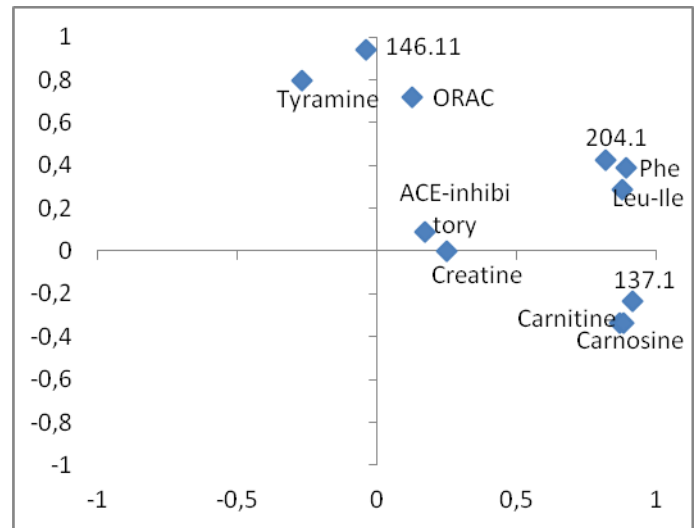
639

1 Figure 1. Chromatogram of the nitrogen extract of 'Salchichón' at the end of
2 ripening.



1 Figure 2. PC1 and PC2 (43.5% and 24.9% of explained variance, respectively)
2 of the PCA for the 'Salchichón' samples during processing. Score plot showing
3 the detected nitrogen compounds in the peptidic extracts and the antioxidant
4 (ORAC) and ACE-inhibitory activities. Loading plot indicating the location of the
5 batches analysed.

6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18



1 Table 1. Nitrogen compound concentrations ($\mu\text{g/ml}$ of extract), means and
 2 standard error of different extracts measured by the bicinchoninic acid (BCA)
 3 method.

Sampling Time	Beginning		Middle 1		Middle 2		Final	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Control	358.67 \pm 32.286 ^a ₁		592.33 \pm 40.700 ^{a,b} _{1,2}		705.67 \pm 39.375 ^a ₂		797.44 \pm 31.791 ^a ₂	
EPg222	538.22 \pm 38.662 ^{a,b} ₁		561.44 \pm 35.234 ^{a,b} ₁		1050.11 \pm 32.162 ^b ₂		1127.78 \pm 40.581 ^b ₂	
P200S34	493.83 \pm 25.296 ^{a,b} _{1,2}		587.86 \pm 21.731 ^{a,b} _{1,2}		1002.83 \pm 43.103 ^b ₃		782.17 \pm 29.403 ^a ₂	
P200S34+EPg222	710.17 \pm 21.524 ^b ₁		766.00 \pm 37.404 ^b ₁		984.00 \pm 22.856 ^{a,b} ₂		1067.56 \pm 22.798 ^b ₂	

4
 5 ^{a,b} For a given determination (column), values with different letters as the superscript are significantly different ($P < 0.05$).

6 _{1,2,3} For a given determination (row), values with different numbers as the subscript are significantly different ($P < 0.05$).

7
 8
 9
 10

1 Table 2. Antihypertensive activity, expressed as a percentage, means and
 2 standard error, before and after sample digestion.

3

		Sampling Time	Beginning		Middle 1		Middle 2		Final	
			Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Before Digestion	Control		32.40 ± 3.182 ^b _{1,2}		29.99 ± 3.506 ^{a,b} ₂		32.52 ± 3.179 ^a _{2,3}		23.96 ± 1.759 ^{a,b} ₁	
	EPg222		38.14 ± 1.905 ^b _{1,2}		68.61 ± 2.769 ^c ₂		95.41 ± 3.291 ^c ₃		57.47 ± 3.472 ^c ₂	
	P200S34 P200S34 + EPg222		21.70 ± 1.938 ^a ₁		58.57 ± 3.521 ^c ₂		74.64 ± 3.378 ^b ₃		34.92 ± 3.285 ^{a,b,c} ₁	
			61.79 ± 3.174 ^d ₂		80.27 ± 3.140 ^d ₃		95.35 ± 6.132 ^c ₃		41.41 ± 2.393 ^{b,c} ₁	
After Digestion	Control		41.26 ± 1.166 ^{b,c} ₃		24.43 ± 1.404 ^{a,b} ₁		31.06 ± 2.855 ^a _{1,2,3}		19.04 ± 1.765 ^a ₁	
	EPg222		47.08 ± 2.234 ^c _{1,2}		37.78 ± 0.790 ^{a,b,c} ₁		89.83 ± 3.763 ^{b,c} ₃		44.86 ± 3.532 ^{b,c} _{1,2}	
	P200S34 P200S34 + EPg222		41.08 ± 0.639 ^{b,c} _{2,3}		28.60 ± 2.324 ^{a,b} ₁		48.39 ± 3.126 ^a _{2,3}		32.24 ± 2.627 ^{a,b,c} _{1,2}	
			53.90 ± 1.444 ^{c,d} ₂		42.91 ± 1.690 ^{b,c} _{1,2}		93.44 ± 3.445 ^c ₃		50.72 ± 2.666 ^c _{1,2}	

4

5 ^{a,b,c,d} For a given determination (column), values with different letters as the superscript are significantly different
 6 ($P < 0.05$).

7 _{1,2,3} For a given determination (row), values with different numbers as the subscript are significantly different ($P < 0.05$).

8

9

1 Table 3. Antioxidant activity, expressed as $\mu\text{mol Trolox/mg protein}$, means and
 2 standard error, before and after sample digestion.

3

		Sampling Time		Beginning		Middle 1		Middle 2		Final	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Before Digestion	Control	0.68	0.146 ^a ₁	0.70	0.096 ^a ₁	1.14	0.169 ^a _{1,2}	1.21	0.027 ^a _{1,2}		
	EPg222	1.37	0.081 ^b ₁	1.74	0.164 ^{b,c} _{1,2}	2.49	0.217 ^c ₂	2.57	0.210 ^c ₂		
	P200S34 P200S34 + EPg222	0.94	0.063 ^{ab} ₁	1.60	0.163 ^{b,c} _{1,2}	1.50	0.097 ^{ab} _{1,2}	1.21	0.151 ^a _{1,2}		
		1.43	0.081 ^b ₁	1.76	0.218 ^{b,c} _{1,2}	1.69	0.046 ^b _{1,2}	1.65	0.094 ^{ab} _{1,2}		
After Digestion	Control	1.38	0.209 ^b ₁	1.41	0.146 ^b ₁	1.90	0.146 ^{b,c} _{1,2}	1.22	0.137 ^a ₁		
	EPg222	1.20	0.178 ^b ₁	1.94	0.107 ^c _{1,2}	2.57	0.218 ^c ₂	2.17	0.162 ^{b,c} ₂		
	P200S34 P200S34 + EPg222	1.37	0.125 ^b ₁	1.49	0.085 ^{b,c} ₁	2.14	0.093 ^{b,c} ₂	1.69	0.335 ^{ab} _{1,2}		
		1.39	0.067 ^b ₁	1.60	0.119 ^{b,c} _{1,2}	2.29	0.180 ^{b,c} ₂	2.75	0.247 ^c ₂		

4

5 ^{a,b} For a given determination (column), values with different letters as the superscript are significantly different ($P < 0.05$).

6 _{1,2} For a given determination (row), values with different numbers as the subscript are significantly different ($P < 0.05$).

7

8

IV.3.- Influence of starter cultures on the generation of healthy nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausages.

1 **Influence of starter cultures on the generation of healthy nitrogen compounds in Iberian dry-**
2 **fermented sausages.**

3 **Running Head:** Healthy effect of sausage starter cultures

4 MARGARITA FERNÁNDEZ^a, ALBERTO MARTÍN^{a*}, MARÍA JOSÉ BENITO^a, SANTIAGO RUIZ
5 MOYANO^a, ALEJANDRO HERNÁNDEZ^a, MARÍA DE GUÍA CÓRDOBA^a

6 ^aNutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Ctra.
7 de Cáceres s/n, 06071 Badajoz, Spain.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19 *Corresponding author

20 Tel.: +34 924 286200; fax: +34 924 286201

21 E-mail address: amartin@unex.es

22 <http://eia.unex.es>

23

24 **ABSTRACT**

25 The purpose of this work was to investigate the influence of a starter culture on the generation
26 of healthy nitrogen compounds with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory,
27 antiproliferative and antibacterial activities during the ripening of Iberian dry-fermented
28 sausages. Starters P200S34 (*P. acidilactici* M200 and *S. vitulus* RS34) and P198S34 (*P.*
29 *acidilactici* MS198 and *S. vitulus* RS34) were used to make the Iberian dry-fermented sausages
30 ‘salchichón’ and chorizo. The physicochemical and microbial properties were determined
31 during the ripening process. The antiproliferative activity was measured as ability to inhibit the
32 growth on Caco-2 colon adenocarcinoma cell line and antibacterial activity was tested against
33 spoilage and pathogenic bacteria such us *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*
34 *cholerasuis*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. These activities were
35 correlated with the most relevant compounds detected by HPLC-ESI-MS in the final ripened
36 extracts. The microbial population found in fermented sausages and the fermentation
37 conditions significantly influenced the low molecular weight nitrogen profile and functional
38 activities. The inoculation of well-adapted starter cultures with high proteolytic activity
39 increased the ACE-inhibitory and antiproliferative activity of these extracts, mainly due to an
40 increase in free amino acids such as Lys and Pro, but also small peptides.

41

42

43

44

45

46

47

48 **Keywords:** dry-fermented sausages, starter cultures, low molecular weight nitrogen
49 compounds, antiproliferative activity, antibacterial activity.

50

51 Introduction

52

53 Iberian dry cured sausages are high quality meat products that are traditionally manufactured
54 from Iberian pigs of South West of Iberian Peninsula. The quality of the final product is tightly
55 related to the ripening that takes place during drying. This process, which confers on the
56 product its particular colour, firmness and flavour, is defined by a complex interaction of
57 physical and chemical reactions associated with the microbiological development (Ordóñez et
58 al., 1999). Several authors have reported the role of the microorganisms on traditional
59 fermented sausages ripening and sensory traits (Berdagué, *et al.* 1993; Engelvin, *et al.* 2000;
60 Stahnke, 2002; Olesen *et al.*, 2004; Tjener *et al.*, 2004, Casaburi et al. 2008).

61 The most commonly microorganisms that have been used as starter cultures in the processing
62 of these meat products are lactic acid bacteria (LAB) and gram positive catalase positive cocci
63 (GPCP) (Leroy and De Vuyst 2004; Ammor and Mayo 2007; Benito et al., 2007; Martín et al.,
64 2007). LAB and GPCP possess extracellular and intracellular proteinases and peptidases for
65 possible application in the production of bioactive peptides (Mauriello *et al.* 2004; Flores and
66 Toldrá 2011). Many book chapters and articles have reviewed the liberation of bioactive
67 peptides from milk proteins through microbial proteolysis (Gobbetti et al., 2002, 2004;
68 Korhonen and Pihlanto-Leppälä, 2001, 2004; Matar et al., 2003; Smacchi and Gobbetti, 2000).
69 Most of these studies describe the production of antimicrobial and antihypertensive or ACE-
70 inhibitory, and antiproliferative peptides have also been identified. However, to determine the
71 possible beneficial effects of these peptides on health, it is essential to investigate how
72 gastrointestinal digestion affects to the functional activities (Rutherford-Markwick and
73 Moughan, 2005).

74 In meat products, Escudero et al. (2012, 2013) obtained bioactive peptides from dry-cured
75 ham with *in vivo* high ACE inhibitory activity. However, there are few studies about the role of
76 autochthonous starter cultures on the release of nitrogen compounds with antimicrobial or

77 antiproliferative activity during the processing or fermented meat products. The starter
78 cultures used in this study are highly proteolytic, and can produce bioactive nitrogen
79 compounds during ripening that may have a wide variety of biological functions such as
80 antimicrobial, ACE inhibitory or antiproliferative activities (Rutherford-Markwick and Moughan
81 2005; Korhonen and Pihlanto 2006; Shahidi and Zhong 2008).

82 The aim of this work was to study the effect of the starter culture on the presence of nitrogen
83 compounds with antimicrobial, angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and
84 antiproliferative activities of peptic extracts obtained from two different Iberian fermented
85 sausages.

86

87 **Material and Methods**

88

89 *Starter culture preparation*

90 Starter cultures used in the present work were formed by the union of two strains of
91 *Pedococcus acidilactici* (MS198 or MS200) and one of *Staphylococcus vitulus* (RS34): starter
92 P200S34, which included *P. acidilactici* M200 and *S. vitulus* RS34 and starter P198S34, which
93 included *P. acidilactici* MS198 and *S. vitulus* RS34 (Benito *et al.*, 2007; 2008a; 2008b; Martín *et*
94 *al* 2007).

95 The *P. acidilactici* strains were grown in Man Rogosa Sharpe broth (MRS) (Oxoid, Basingstoke,
96 U.K.) at 37°C for 24 hours under anaerobic conditions, and *S. vitulus* in Brain Heart Infusion
97 broth (BHI) (Oxoid) at 37°C for 24 hours. The starter cultures were inoculated under the same
98 conditions in flasks with nutrient broth plus 5% NaCl and 10% mannitol (Scharlau Chemie S.A.,
99 Barcelona, Spain) which has been demonstrated to be protective during drying. The flasks
100 were mixed until the cell concentration reached 10^{12} CFU ml⁻¹. Then cells were collected by
101 centrifugation (6000 x g for 10 min) under aseptic conditions at room temperature. The
102 obtained cell pastes were washed once with 2.5% sucrose solution, re-centrifuged, and

103 concentrated to 10^{12} CFU ml⁻¹ in 2.5% sucrose solution. The cells were quick-frozen by
104 immersion in a dry ice/isopropanol bath. Behind this, the cells were lyophilized at low
105 temperatures (-46/-52°C) and pressures (0.17/0.22 mbar) in a Cryodos-50 freeze drier (Telstar,
106 Barcelona, Spain). The dried starter cultures were store in vacuum-sealed bags at -80°C until
107 use. Before use, lyophilized starters were examined for total viable cell counts (TVC), verified
108 by the standard dilution methods on MRS and BHI agar (Oxoid) after incubation at 37°C for 48
109 h. Powders with a TVC of more than 10^{11} CFU g⁻¹ were used in the dry-fermented sausages.

110

111 *Preparation of dry-fermented sausages*

112 Iberian dry-fermented sausages, i.e. 'salchichón' and chorizo, were manufactured in the same
113 factory. The 'salchichón' mixtures were prepared using 95.5% Iberian pork, 2% NaCl, , 1.7 g kg⁻¹
114 black pepper, 1-1.5 g kg⁻¹ white pepper and a commercial mixture of other spices and additives
115 (SALAVI, Anvisa, Arganda del Rey, Madrid) specially prepared for this type of meat product
116 which contains dextrose, dextrin, lactose, sodium ascorbate and sodium nitrate. . The 'chorizo'
117 mixtures were prepared using 95.5% Iberian pork, 2% NaCl, and a mixture of Spanish paprika,
118 dextrose, dextrin, , lactose, sodium ascorbate and sodium nitrite sold as CHORAVI from Anvisa
119 (Madrid, Spain) at the concentrations recommended by the producer. For both Iberian dry-
120 fermented sausages the casing used was natural gut which diameter was 50mm
121 approximately.

122 The starter cultures, i.e. P198S34 containing *P. acidilactici* MS198 plus *S. vitulus* RS34, and
123 P200S34 containing *P. acidilactici* MS200 plus *S. vitulus* RS34, were added to two different
124 batches of 50 kg of meat mixture. In order to obtain an initial population of 5×10^7 CFU g⁻¹ was
125 added 0.1 g kg⁻¹ of lyophilized starter in the meat mixture Three batches (60 sausages per each
126 batch) were prepared in each fermentation trials: (i) control without starter culture, (ii) starter
127 culture P198S34, and (iii) starter culture P200S34. The ripening process conditions
128 (temperature and moisture) were from 0 to 3 days 8° C and 75% relative humidity; from 3 to

129 65 days 12°C and 70% relative humidity. Three sausages of each batch were taken at different
130 time points (15, 35, and 65 days of incubation) for sampling and each analysis was done in
131 triplicate.

132

133 *Physicochemical analysis*

134 The pH of the dry-fermented sausages was determined using a Crison model 2002 pH meter
135 (Crison Instrument, Barcelona, Spain). The moisture content was measured by dehydration at
136 100°C to a constant weight by the ISO recommended method (ISO, 1973). Water activity (A_w)
137 was measured using an FA-St/1 apparatus from GBX (France Scientific Instrument).

138

139 *Microbial analysis*

140 To investigate the presence of strains inoculated at high levels in the sausages, samples were
141 taken at 15, 35, and 65 days of incubation. Lactic acid bacteria were cultured in Man Rogosa
142 Sharpe agar (MRS) (Oxoid) at 37°C and with the pH adjusted at 5.6 for 24 hours under
143 anaerobic conditions, and the *Staphylococcus* count was measured in Mannitol Sal Agar (MSA)
144 at 30°C. To collect strains 10 colonies from the plates with the highest dilutions were isolated
145 in 5 ml of MRS or MSA broth. Then the DNA was obtained, and 16S rRNA gene sequence
146 analysis was done as described in Benito *et al.* (2008a, 2008b). Using the BLAST algorithm,
147 sequences were compared with the EMBL and GenBank database. The identities of the
148 isolates were established on the basis of the highest score.

149

150 *Preparation of peptide extracts*

151 The nitrogen compounds were extracted according to De Ketelaere *et al.* (1974) and Bauchart
152 *et al.* (2006). Using an Omni Mixer Homogenizer, fifteen grams of the sample were
153 homogenized in 0.6 N perchloric acid. The homogenate obtained was centrifuged at 2000 x g
154 for 15 min. The soluble fraction located between the upper layer and the precipitate was

155 filtered through Whatman No. 54 filter paper. The pH in the filtered recovered was neutralized
156 with 30% KOH to pH 6. To eliminate the potassium perchlorate that produced during
157 neutralization, extracts were filtered again. Finally, extracts were ultrafiltered through
158 hydrophilic 10 kDa and 5 kDa cut-off membranes (Pellicon XL, Millipore Corporation, Billerica,
159 MA, USA).

160 The nitrogen compounds content of the 5 kDa-permeate extracts was calculated by a
161 colorimetric method based on bicinchoninic acid (BCA) (Pierce, Rockford, IL, USA), using bovine
162 serum albumin as the standard protein.

163

164 *Antibacterial activity testing*

165 Inhibitory effects of nitrogen compound extracts on selected potential harmful microorganism
166 were studied by following the ability of the target microbes to grow in a medium containing
167 sterilized extracts as described Ruiz-Moyano et al. (2009). Selected pathogens bacteria were
168 obtained from Spanish Type culture collection: *Escherichia coli* CECT4267, *Salmonella*
169 *cholerasuis* CECT4395, *Staphylococcus aureus* CECT976, *Listeria monocytogenes* CECT911,
170 *Bacillus cereus* CECT131. The strains were grown at 37°C for 18h in Brain-Heart Infusion broth
171 (BHI) (Scharlab, Barcelona, Spain) at least twice previously to the experiment. The nitrogen
172 compounds extracts were reconstituted to a concentration of 600 µg/ml in Milli-Q water and
173 filtered sterilized. The test was carried out in 100-well flat-bottomed honeycomb plates in
174 which 247 µl of BHI broth was inoculated with 3 µl from a suspension of tested
175 microorganisms at 10⁸ (cfu/ml) and 50 µl of test fractions. 50 µl of Milli-Q water and BHI broth
176 inoculated with test microorganisms was used as control. The ability of each strain to grow in
177 supplemented broth was evaluated with an automated turbidometer Bioscreen C Analysing
178 System (Labsystems, Finland) by following the microbial growth at 37 °C for 24 h. The optical
179 density was determined with a wide band filter (OD 420-580 nm). Broth media without
180 supplement was used as control media. Each assay was carried out in triplicate. The

181 absorbance was measured at 15 min intervals preceded by 10 seconds shaking at medium
182 speed during the incubation period. The inhibitory effect of nitrogen compound extracts on
183 the food borne pathogens was established by comparing the turbidity readings of each strain
184 with those obtained in absence of nitrogen compounds extracts. The percent of inhibition was
185 estimated with the following formula: %inhibition = $(Abs_{control} - Abs_{assay} / Abs_{control}) \times 100$, where
186 $Abs_{control}$ is the optical density of the growth of the test strain in absence of nitrogen
187 compounds extracts and Abs_{strain} is the optical density of the growth of the test strain in
188 presence of nitrogen compounds extracts.

189

190 *Assessment of angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity*

191 ACE-inhibitory activity was determined by fluorescence according to the method developed by
192 Sentandreu and Toldrá (2006a, 2006b) with some modifications (Quirós et al., 2009). ACE was
193 previously dissolved in 50% glycerol and diluted with 0.15 M Tris buffer (pH 8.3) containing
194 0.1 μ M $ZnCl_2$ with 0.04 U/mL of enzyme in the final reaction solution. To perform the assay
195 ninety-six-well black polystyrene microplate (Porvair, Leatherhead, UK) were used. A total of
196 40 μ L of Milli-Q water or the ACE working solution were added to each microtiter-plate well,
197 then adjusted to 80 μ L by adding Milli-Q water to blank (B) and control (C) or extracts to
198 samples (S). To take into consideration the interference of the compounds, a sample blank (SB)
199 was prepared by substituting distilled water per sample. The enzyme reaction was originated
200 by adding 160 μ L of 0.45 mM o-Abz-Gly-p-Phe(NO₂)-Pro-OH (Bachem Feinchemikalien,
201 Bubendorf, Switzerland) dissolved in 150 mM Tris-base buffer (pH 8.3), containing 1.125 M
202 NaCl, and the mixture was incubated at 37 °C. The fluorescence generated was determined at
203 30 min using a multiscan microplate fluorimeter (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg,
204 Germany). Excitation and emission wavelengths were 350 and 420 nm, respectively. The
205 activity of each sample was measured in triplicate. The software used to study the data was
206 FLUOstar control (version 1.32 R2, BMG Labtech). Inhibitory activity was expressed as the

207 nitrogen compounds concentration required to inhibit the original ACE activity. The formula
208 applied to estimate percentage of ACE-inhibitory activity was: $100 \times [(C - B) - (S-SB)] / (C - B)$.

209

210 *Determination of antiproliferative activity on HT-29 colon adenocarcinoma cell line.*

211 The antiproliferative test was development using the HT-29 ATCC HTB-38 human colorectal
212 adenocarcinoma cell line. The cells were routinely grown in flask with McCoy's 5A medium
213 containing 10% FBS and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The
214 medium was renewal every 48 h. When cells got 90% confluence, were trypsinized by adding
215 1.6 ml of trypsin-EDTA solution for 5 min. Then, 6 mL of complete fresh medium was added
216 and cells were centrifuged at 120 g for 5 min. The pellet of cells was suspended in fresh media
217 and the concentration of cells determined with a hemocytometer. Cells were seeded at 5×10^3
218 cells per well in 96-well plate, and incubated in 100 µL of complete culture medium for 24 h at
219 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ prior to the addition of the samples. After
220 24 h, the medium was replaced with 95 µL of complete medium plus 5 µL of phosphate buffer
221 saline pH 7.4 (PBS) in negative control wells, 99 µL of complete medium plus 1 µL of quercetin
222 (Sigma) solution at 20 mM in methanol, and in treatment wells 95 µL of complete medium plus
223 5 µL of nitrogen compounds extracts in PBS obtained as above at 20 mg/mL. The medium of
224 each treatment and controls was replaced in 96 well plates every 24 h. The proliferation of the
225 cells was assessment using the colorimetric MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol;
226 Sigma) assay according to Olsen et al. (2012) with slight modification, at 24, 48 and 72 h. To
227 determine the living cells, the medium was removed and 200 µL of not supplemented medium
228 and 50 µL of MTT solution at 5 mg/ml were added to each well and plates were incubated for
229 4h at 37°C. After incubation, the medium was removed and the resulting blue MTT formazan
230 precipitated was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (200 µL). Finally, the absorbance at
231 570 nm was determined using a spectrophotometer (Fluostar Optima microplate reader; BMG
232 LABTECH, Offenburg, Germany). The antiproliferative effect was calculated as the percentage

233 of growth inhibition with respect to the negative control cells, according to the following
234 equation: % Antiproliferative activity= [(Absorbance *negative control*– Absorbance
235 samples)/(Absorbance *negative control*)]*100

236

237 *In vitro pepsin–pancreatin simulated GI digestion*

238 Simulated gastrointestinal digestion using an *in vitro* pepsin–pancreatin hydrolysis was
239 performed according to Cinq-Mars et al. (2008) and You et al. (2010) with a slight modification.

240 Extracts were adjusted to pH 2.0 with 1 M HCl and pepsin (4% weight as received/weight of
241 protein in the powder (~85% protein)) was added. After that, the mixture was incubated for 90
242 min at 37°C. Then the pH was raised to pH 7.5 with 1 M NaOH, pancreatin was added (4%
243 weight as received/weight of protein in the powder (~85% protein) and the mixture was
244 incubated again at 37°C for 2 h. To finish the digestion, the test tubes were maintained in
245 boiling water for 10 min. Finally the GI digests were chilled to room temperature and
246 centrifuged at 5000 rpm for 5 min.

247 To study the changes in antimicrobial, antihypertensive and antiproliferative activities of
248 samples after the simulated gastrointestinal digestion, samples of GI digests were recovered
249 and the assays were done as described above.

250

251 *HLPC-ESI-MS analysis of the extracts*

252 The nitrogen compounds presents in the extracts were analyzed by HLPC-ESI-MS as described
253 Gómez-Ruiz *et al.* (2008) on an Agilent series 1100 apparatus (Agilent Technologies, Palo Alto,
254 USA). A Supelcosil LC-18 column (SUPELCO, Bellafonte, USA) was used with mobile phases (A) a
255 medley of water-trifluoroacetic acid (1000:0,37, v/v) and (B) acetonitrile-trifluoroacetic acid
256 (1000:0,27, v/v) in a gradient of solvent B in A rising from 0 to 45% in 60 min, and from 45 to
257 70% in 5 min at a flow rate of 0.8 ml min⁻¹. Nitrogen compounds were characterized on an
258 Agilent series 6100 Series Single Quad LC/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipped

259 with a multimode source in electrospray ionization mode, according to their retention time
260 and mass spectrum. Standards of biogenic amines (histamine, tyramine, tryptamine,
261 cadaverine, putrescine, 2-phenylethylamine, spermine, and spermidine), amino acids (alanine,
262 arginine, aspartic acid, cystine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine,
263 methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine, valine, and taurine), and
264 carnitine (Sigma–Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) were used. The other nitrogen
265 compounds detected were tentatively recognized by their mass spectra.

266

267 *Statistical analysis*

268 Statistical analysis of the data was realized using SPSS for Windows, 22.0 (SPSS Inc. Chicago, IL,
269 USA). Physicochemical parameters, microbial counts and the functional activities were studied
270 by variance mixed ANOVA. Mean values were analyzed by Tukey's honestly significant
271 difference (HSD) test ($p \leq 0.05$). The relationships among the functional activities found in the
272 extracts and the nitrogen compounds detected at end of the processing of the meat
273 fermented sausages studied were estimated by principal component analysis (PCA).

274

275 **Results and Discussion**

276

277 *Physico-chemical and microbial parameters*

278 The physico-chemical values of the two Iberian dry-cured sausages during the ripening
279 processes are presented in Table 1. There were no relevant differences in the evolution of
280 moisture between the control batches of the two sausages studied. This parameter was not
281 clearly affected by the starter cultures, with similar mean values among inoculated batches
282 and the control batch for 'salchichón' and 'chorizo' during ripening. The evolution of a_w was
283 associated with moisture loss with final values of less than 0.81 in all the batches (Table 1). The
284 final pH values ranged from 5.1 to 5.8 for 'salchichón' and from 5.8 to 5.9 for 'chorizo' (Table

285 1). Similar pH levels have been reported for sausages with no initial fermentation period at
286 high temperatures and with long ripening times, including Iberian dry-fermented sausages
287 (Mauriello *et al.*, 2004; Fista *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2007; Spaziani *et al.*, 2009). The counts
288 of LAB and GPCPC in the mass (before stuffing the sausage) were 3 log cfu g⁻¹ higher in the
289 inoculated batches for both microbial groups (data not shown). The microbial values during
290 ripening showed LAB counts greater than 7 log cfu g⁻¹ at the end of ripening in all batches,
291 except for the control batch of chorizo, which remained lower than 6 log cfu g⁻¹ (Table 1). The
292 16S rRNA gene sequence analysis indicated the presence of *P. acidilactici* MS198 and *P.*
293 *acidilactici* MS200 among the predominant LAB in each inoculated batches until the end of
294 processing. These levels of LAB were similar to those found in other fermented sausages
295 (Ambrosiadis *et al.*, 2004; González and Diez, 2002). With respect to GPCPC, the 16S rRNA gene
296 sequence analysis showed the presence of *S. vitulus* RS34 in the inoculated batches of both
297 studied sausages. At the final of ripening, GPCPC counts were above 5.4 log cfu g⁻¹ in all
298 batches except for 'salchichón' (Table 1). The final numbers in both fermented meat products
299 (4.14–6.52 log cfu g⁻¹) were similar to the ranges usually reported for other traditional
300 Mediterranean sausages (Drosinos *et al.*, 2005; Mauriello *et al.*, 2004).

301

302 *Inhibition of angiotensin-I conversing enzyme activity of extracts*

303 At the end of the ripening process no significant differences were observed in the ACE
304 inhibitory activity between controls and starter culture P198S34 batches (Figure 1). However,
305 Batch P200S34 inoculated with the strain *P. acidilactici* MS200 showed inhibitions of 55.37% in
306 'salchichón' and 40.37% in 'chorizo' sausage. This strain was the best adapted during ripening
307 of sausages (Casquete *et al.* 2011b). In addition, the high percentage of activity observed is due
308 to the microbial proteases activity of the starter culture (Benito *et al.*, 2007; Casquete *et al.*,
309 2011a, b; Martin *et al.*, 2007).

310 After gastrointestinal digestion simulation extracts obtained at the end of the ripening
311 maintained the ACE inhibitory activity. This is important because the ACE inhibitor compounds
312 released during food processing must be able to survive the gastrointestinal digestion to be
313 absorbed and reach the cardiovascular system to exercise potential hypotensive effect
314 (Vermeirssen et al., 2004).

315

316 *Determination of antiproliferative activity on HT-29 colon adenocarcinoma cell line.*

317 After study antiproliferative activity in 'chorizo' sausages it was observed that the extracts
318 obtained had a low growth inhibition of tumor cells (Figure 2). The observed inhibition
319 appeared only when the samples were incubated with tumor cells for 72 hours and this
320 inhibition did not exceed 4%. After gastrointestinal digestion *in vitro*, the extract activities
321 increased significantly ($p < 0.05$), but after 24 hours of incubation continued without activity.
322 After 48 hours, activity appeared in the control batch reaching values around 10% inhibition of
323 growth of tumor cells.

324 Finally, when after 72 hours incubation, all digested extracts from 'chorizo' sausages showed a
325 significant activity increased, reaching values ranging between 20% and 37%. This activity
326 increased is due to the action of digestive enzymes that produce new compounds from
327 inactive molecules present in the extracts (Matsui et al., 2002; Rutherford-Markwick and
328 Moughan, 2005; Vermeirssen et al, 2004). In these cases, the activity by the extracts obtained
329 from inoculated with starter cultures batches was equal or lower than the control batch
330 activity, indicating that in the 'chorizo' sausages, the nitrogen compounds produced by the
331 bacterial proteases are not responsible for the antiproliferative activity found.

332 However, extracts obtained from 'salchichón' sausages showed high degree of growth
333 inhibition of tumor cells and a clear effect of the incubation time was observed too, so the
334 longer the incubation, greater inhibition was observed. Furthermore, the inhibition produced
335 by the inoculated batches was significantly higher ($p < 0.05$) than the control batch throughout

336 the assay. The proteolytic activity produced by lactic acid bacteria and staphylococci on meat
337 proteins (Casaburi et al, 2005, 2008; Drosinos et al., 2007; Fadda et al, 1999a, b, 2010;
338 Mauriello et al, 2002, 2004; Rodríguez et al, 1998) leads nitrogen compounds with
339 antiproliferative activity.

340 After *in vitro* gastrointestinal digestion, the activity remained or slightly decreased. Despite
341 this, the extract obtained from P200S34 batch highlight because of its high inhibition
342 percentage, 47.2% after 48 hours and 61.2% after 72 hours of incubation with tumor cells. Our
343 results are higher than those obtained by Picot et al., (2006) when studying the
344 antiproliferative activity of 18 hydrolyzed fish protein on the cell lines MCF-7 and MDA-MB-
345 231, finding 25% and 40% of inhibition after 72 hours of incubation.

346

347 *Antibacterial activity against pathogenic bacteria*

348 The activity against *Escherichia coli* growth of the extracts obtained at the end of maturation,
349 the control batch showed antimicrobial activity significantly higher than that the inoculated
350 batches (Figure 3). After gastrointestinal digestion, these values remained. In ‘salchichón’
351 sausages, no significant differences between the control and inoculated with starter cultures
352 batch were observed. After gastrointestinal digestion, there was a significant increase in
353 antimicrobial activity in all extract batches. Furthermore, the batch inoculated with the starter
354 culture P200S34 was significantly higher than the control and P198S34 batch, showing a
355 inhibition percent around 15%. Again P200S34 batch showed the highest activity and was the
356 best adapted to the conditions of ripening process (Benito et al., 2007; Casquete et al, 2011a,
357 b; Martin et al, 2007).

358 In the inhibition caused by the ‘chorizo’ sausages on the growth of *Salmonella choleraeuis* it
359 was observed that the P198S34 batch had activity significantly higher than the control and
360 P200S34 batch (Figure 4), although this was close to 8% growth inhibition. This difference
361 between ‘chorizo’ batches disappeared after *in vitro* gastrointestinal digestion. In “salchichon”

362 sausages, inoculated batches had a higher antibacterial activity than control batch. After
363 digestion all batches increased the activity significantly. There are numerous studies that
364 demonstrate the high resistance of *Salmonella* sp. to different types of antimicrobial
365 compounds because of resistance of these microorganisms (Foley and Lynne, 2007, McEwen
366 and Fedorka-Cray, 2002). This would explain the low sensitivity of *S. choleraesuis* strain to
367 antimicrobial compounds present in the extract.

368 Control batch showed an antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* significantly
369 higher than inoculated batches (Figure 5). After gastrointestinal digestion, no antimicrobial
370 activity was observed. In 'salchichón' sausages, the control batch showed the lowest
371 percentage of inhibition (10.32%), while the extracts obtained from starter cultures batches
372 had activity values significantly higher, ranging from 12.8 to 14 ,3 %. These values increased
373 after gastrointestinal digestion, reaching 16% compared to 12% that showed by control batch.
374 Ammor et al., 2006 examined the antimicrobial activity of 87 lactic acid bacteria, and found
375 that only three strains of *Lactococcus garvieae* showed activity against *S.aureus*.

376 The antibacterial activity of extracts against *Listeria monocytogenes* CECT 911 was null (Figure
377 6). These results indicate that nitrogen compounds of low molecular weight are not
378 responsible for the inhibition of *L. monocytogenes*. Furthermore, different authors have
379 investigated the influence of lactic acid bacteria in the inhibition of *L. monocytogenes* showing
380 that this inhibition occurs due to bacteriocin production (Callewaert et al., 2000; Hugas, 1998;
381 Hugas and Monfort, 1997; Hugas et al., 2003; Johnson et al., 1990; Jones et al, 2008;.
382 Mataragas et al., 2003; Schöbitz et al., 1999; Tantillo et al., 2002).

383 Finally, the antibacterial activity against *Bacillus cereus* reached values between 20% and 25%
384 inhibition (Figure 7), the higher percentage of inhibition obtained in our study. Furthermore,
385 no significant differences between the control and the inoculated batches were observed.
386 After gastrointestinal digestion, the activity was maintained except for P200S34 batches that
387 suffered a significant decreased. The high inhibition obtained on *B. cereus* could be of great

388 interest because a few bacteriocins produced by lactic acid bacteria are effective against the
389 genus *Bacillus* (Lücke, 2000).

390

391 *Low molecular weight nitrogen compounds and their influence on functional activities*

392 The analysis of the low molecular weight nitrogen compounds of different batches after of
393 simulation of gastrointestinal digestion *in vitro* stage allowed detection for a total of 22 major
394 compounds, 13 of which were potentially identified (Table 2). The extracts were mainly
395 constituted by several endogenous compounds and their degradation products (6) but also
396 small peptides (9), free amino acids (6), and biogenic amines (1) from meat protein
397 degradation. Most of the identified nitrogen compounds have been reported as majority
398 components of the NPN fraction in meat products, including fermented sausages (Broncano *et*
399 *al.* 2012).

400 Natural nitrogen compounds were the most abundant compounds in the extract profiles of
401 both meat products. This group of compounds included as the major components creatine
402 (15.30–24.07% of total area) and creatinine (15.23–24.22% of total area), the latter derived
403 from creatine degradation. These compounds together carnosine were most abundant in
404 ‘chorizo’ after de gastrointestinal digestion *in vitro*. As well as ‘chorizo’, creatinine (11.76–
405 27.56% of total area) was most abundant in ‘salchichón’ samples.

406 Another group of nitrogen compounds included amino acids and amines, and indeed it is
407 known that some of these compounds show antiproliferative activity (Netke *et al.*, 2003;
408 Roomi *et al.*, 2005, 2006). The free amino acids Lys, Leu, Ile, Pro, Met, and Phe, detected in the
409 studied extracts, have been described as among the most abundant compounds derived from
410 proteolytic activity during the process of sausage fermentation (Benito *et al.* 2005; Leggio *et*
411 *al.*, 2012). The biogenic amine tyramine was also detected, which is produced mainly by
412 microbial decarboxylation of free amino acids that are formed during the maturation process
413 (Suzzi and Gardini, 2003).

414 Finally, the group of presumed peptides (a total of nine compounds) at the final stage of
415 ripening represented 23.21 and 19.81% of the total area for 'chorizo' and 'salchichón',
416 respectively (Table 2). The compounds with m/z 191, 118 and 146 were found in relevant
417 amounts in both sausages. The compound with m/z 365 were only find out in 'salchichón'
418 whereas the compounds with m/z 277, 124, and 159 were only clearly detected in 'salchichón'
419 samples.

420 In order to determine the influence of the extract components on the activities studied, a PCA
421 was performed with the extract profiles of the samples obtained after the gastrointestinal
422 digestion and their ACE-inhibitory, antibacterial and antiproliferative activities (Figures 8 and
423 9). For 'salchichón', the most of the identified nitrogen compounds were mainly explained by
424 the first axis (PC 1) of the PCA. These compounds were clearly associated with P200S34 batch,
425 suggesting a higher proportion of NPN derived from proteolysis products in the extracts of
426 inoculated batches. In fact, the second axis (PC 2) of the PCA was defined by the functional
427 activities, and the amino acids lysine and proline (Figure 8). These amino acids were related
428 with the antiproliferative activity and have been widely used in combination with arginine and
429 ascorbic acid, among others, to inhibit the growth of cancer cell lines (Neetke et al., 2003;
430 Roomi et al., 2005, 2006). The ACE inhibition activity was not associated with any of the
431 compounds detected.

432 Regarding the 'chorizo' samples, again the natural nitrogen compounds and most amino acids
433 were related with the first axis (PC1) of the PCA, while activities were again mainly explained
434 by the second axis (PC2) (Figure 9). The compounds with m/z 146 and 277 showed a significant
435 correlation with the ACE inhibition activity while antiproliferative activity was associated again
436 with the amino acids lysine.

437 The nitrogen compounds and amino acids linked to PC1 in 'salchichón' included natural
438 compounds that were related to inoculated batches P200S34. However, in contrast to
439 'salchichón', the control samples of 'chorizo' were mainly associated with presumed peptides

440 and amino acids, probably as a consequence of the higher proteolytic activity of
441 autochthonous microorganisms in this meat product.

442 In conclusion, the microbial population found in fermented sausages significantly influences
443 the profile of the low molecular weight nitrogen compounds and the functional activities. The
444 inoculation of well-adapted starter cultures with high proteolytic activity increased the ACE-
445 inhibitory and antiproliferative activity of these extracts, mainly due to an increase in free
446 amino acids such as Lys and Pro, but also small peptides.

447

448 **Acknowledgments**

449 This work was supported by Proyect PRI08A093 from the Government of Extremadura (Spain)
450 and FEDER. M. Fernández is the beneficiary of a predoctoral grant from the Valhondo Calaff
451 Foundation (Cáceres, Spain). The authors are grateful to M. Cabrero and J. Barneto for
452 technical assistance.

453

454 **References**

455 Ambrosiadis, J., Soutosa, N., Abrahima, A. & Bloukas, J. G. (2004). Physicochemical,
456 microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages.
457 *Meat Science*, 66, 279–287.

458

459 Ammor MS, Mayo B. 2007. Selection criteria for acid lactic bacteria to be used as functional
460 starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 76:138-146.

461

462 Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. y Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid
463 bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale
464 facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17(6),
465 454-461.

466

467 Bauchard, C., Rémond, D., Chambon, C., Patureau Mirand, P., Savary-Auzeloux, I., Reynès, C. &
468 Morzel, M. (2006). Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Science*, 74,
469 658-666.

470

471 Benito, M. J., Rodríguez, M., Córdoba, M. G., Andrade, M. J. & Córdoba, J. J.(2005). Effect of
472 the fungal protease Epg 222 on proteolysis and texture in the dry fermented sausage
473 "Salchichon." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 273-280.

474

475 Benito, M. J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Navado, F., Ruiz-Moyano, S. & Córdoba, M. G.
476 (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from
477 traditional Iberian dry-fermented 'salchichón' and 'chorizo' sausages. *Journal of Food Science*,
478 72, M193-M201.

479

480 Benito, M. J., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Pérez-Navado, F. & Córdoba, M. G.
481 (2008a). Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of
482 Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, 80, 656-661.

483

484 Benito, M. J., Serradilla, M. J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A. & Córdoba, M. G. (2008b).
485 Differentiation of Staphylococci from Iberian dry fermented sausages by protein fingerprinting.
486 *Food Microbiology*, 25, 676-682.

487

488 Berdagué, J.L., Bonnaud, N., Rousset, S. & Touraille, C. (1993). Influence of pig crossbreed on
489 the composition volatile compound content and flavour of dry cured ham. *Meat Science*, 34,
490 119-129.

491

- 492 Broncano, J. M., Otte, J., Petró, M. J., Parra, V. & Timón, M. L. (2012). Isolation and
493 identification of low molecular weight antioxidant compounds from fermented "chorizo"
494 sausages. *Meat Science*, 90, 494-501.
495
- 496 Callewaert, R., Hugas, M. y De Vuyst, L. (2000). Competitiveness and bacteriocin production of
497 Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *International Journal of*
498 *Food Microbiology*, 57(1), 33-42.
499
- 500 Casaburi, A., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. y Villani, F. (2005). Technological activities of
501 *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented
502 sausages. *Meat Science*, 71, 643-650.
503
- 504 Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D. y Villani, F. (2008). Proteolytic
505 and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and
506 sensory traits. *Food Microbiology*, 25, 335-347.
507
- 508 Casquete, R., Martín, A., Benito, M.J., Ruiz-Moyano, S., Pérez-Nevado, F. & Córdoba, M.G.
509 (2011a). Impact of pre-selected autochthonous starter cultures on the flavor quality of iberian
510 dry-fermented "salchichón" sausage with different ripening processes. *Journal of Food Science*,
511 76 (1), S535-S544.
512
- 513 Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz Moyano, S., Hernández, A. & Córdoba, M.G.
514 (2011b). Effect of autochthonous starter cultures in the production of "salchichón", a
515 traditional Iberian dry-fermented sausage, with different ripening processes. *LWT - Food*
516 *Science and Technology*, 44, 1562-1571.
517

- 518 Cinq-Mars, C.D., Hu, C., Kitts, D.D., & Li-Chan, E.C.Y. (2008). Investigations into Inhibitor type
519 and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I-
520 converting enzyme-inhibitory peptides in pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate.
521 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 410–419
522
- 523 De Ketelaere, A., Demeyer, D., Vandekerckhove, P. & Vervaeke I. (1974). Stoichiometry of
524 carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. *Journal of Food Science*, 39, 297-300.
525
- 526 Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. & Metaxopoulos, J. (2005).
527 Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat*
528 *Science*, 69, 307–317.
529
- 530 Drosinos, E.H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I., y Metaxopoulos, I., (2007).
531 Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from
532 traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, 24, 260-270.
533
- 534 Engelvin, G., Feron, G., Perrin, C., Molle, D. & Talon, R. (2000). Identification of β -oxidation and
535 thioesterase activities in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *FEMS Microbiology Letters*, 190,
536 115–120.
537
- 538 Escudero, E., Aristoy, M.C., Nishimura, H., Arihara, K. & Toldrá, F. (2012). Antihypertensive
539 effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham.
540 *Meat Science*, 91, 306-311.
541

- 542 Escudero, E., Mora, L., Fraser, P.D., Aristoy, M.C., Arihara, K. y Toldrá, F. (2013). Purification
543 and identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham. *Journal of*
544 *Proteomics*, 78, 499-507.
- 545
- 546 Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C, Oliver, G. y Toldrá, F. (1999a). Hydrolysis of pork
547 muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*. *Applied and*
548 *Environmental Microbiology*, 65, 578-584.
- 549
- 550 Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. y Toldrá, F. (1999b). Characterization of
551 muscle sarcoplasmic and miofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*.
552 *Applied and Environmental Microbioly*, 65, 3540-3546.
- 553
- 554 Fadda, S., López, C. y Vignolo, G. (2010). Role of lactic acid bacteria during meat conditioning
555 and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat science*,
556 86(1), 66-79.
- 557
- 558 Fista, G. A., Bloukas, J. G. & Siomos, A. S. (2004). Effect of leek and onion on processing and
559 quality characteristics of Greek traditional sausages. *Meat Science*, 68, 163-172.
- 560
- 561 Flores M. & Toldrá F. 2011. Microbial enzymatic activities for improved fermented meats.
562 *Trends in Food Science and Techonolgy*, 22:81–90.
- 563
- 564 Foley, S.L. & Lynne, A.M. (2007). Fod animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity
565 and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, 86, E173-E187.
- 566

- 567 Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A. y Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive
568 peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical*
569 *Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 223-239.
- 570
- 571 Gobbetti, M., Minervini, F. y Rizzello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory
572 and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Tehcnology*, 57, 172-188.
- 573
- 574 Gómez-Ruiz, J. A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M. & Recio, I. (2008). Antioxidant
575 activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS.
576 *European Food Research and Technology*, 227, 1061-1067.
- 577
- 578 González, B. & Díez, V. (2002). The effect of nitrite and starter culture on microbiological
579 quality of “chorizo”—a Spanish dry cured sausage. *Meat Science*, 60, 295–298.
- 580
- 581 Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and
582 meat products. *Meat Science*, 49 (1), S139-S150.
- 583
- 584 Hugas, M. & Monfort, J.M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food*
585 *Chemistry*, 29, 547-554.
- 586
- 587 Hugas, M., Garriga, M. & Aymerich, M.T. (2003). Functionality of enterococci in meat products.
588 *International Journal of Food Microbiology*, 88, 223-233.
- 589
- 590 ISO, 1973. Meat and meat product-determination of moisture content method 1442, ISO,
591 Geneva (1973).
- 592

593 Johnson, J.L., Doyle, M.P. & Cassens, R.G. (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria*
594 *spp.* in meat and meat products: a review. *Journal of Food Protection*, 53, 81-91.

595

596 Jones, R.J., Hussein, H.M., Zagorec, M., Brightwell, G. & Tag, J.R. (2008). Isolation of lactic acid
597 bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with
598 fresh meat. *Food Microbiology*, 25, 228-234.

599

600 Korhonen, H. y Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Milk protein-derived bioactive peptides-novel
601 opportunities for health promotion. *IDF Bulletin*, 363, 17-26.

602

603 Korhonen, H. y Pihlanto-Leppälä, A. (2004). Milk-derived bioactive peptides: Formation and
604 prospects for health promotion. In C. Shortt, & J. O'Brien (Eds.), *Handbook of Functional Dairy*
605 *Products. Functional Foods and Nutraceuticals Series 6.0* (pp. 109-124). Florida, USA: CRC
606 Press.

607

608 Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality.
609 *International Dairy Journal*, 16, 945-960.

610

611 Leggio, A., Belsito, E. L., Marco, R. D., Di Gioia, M. L., Liguori, A., Siciliano, C. & Spinella, M.
612 (2012). Dry fermented sausages of southern Italy: A comparison of free amino acids and
613 biogenic amines between industrial and homemade products. *Journal of Food Science*, 77,
614 S170-S175.

615

616 Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food
617 fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.

618

- 619 Lücke, F.K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 56,
620 105-115.
621
- 622 Martín, A., Colín, B., Aranda, E., Benito, M. J. & Córdoba, M. G. (2007). Characterization of
623 *Micrococcaceae* isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Science*, 75, 696–708.
624
- 625 Matar, C., LeBlanc, J.G., Martin L. y Perdigón, G. (2003). Biologically active peptides released in
626 fermented milk: Role and functions. In. E. R. Farnworth (Ed.), *Handbook of Fermented*
627 *Functional Foods. Functional Foods and Nutraceuticals Series* (pp. 177-201). Florida, USA: CRC
628 Press.
629
- 630 Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. y Drosinos, E.H. (2003). Influence of pH and
631 temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and
632 *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64, 265– 271.
633
- 634 Matsui, T., Yuki-yoshi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. y Matsumoto, K. (2002).
635 Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their
636 antihypertensive ability in SHR. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 80-86.
637
- 638 Mauriello, G., Casaburi, A. y Villani, F. (2002). Proteolytic activity of *Staphylococcus xylosus*
639 strains on pork myofibrillar and sarcoplasmic proteins and use of selected strains in the
640 production of Naples type salami. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 482-490.
641
- 642 Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. & Villani, F. (2004). Isolation and technological
643 properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of southern Italy.
644 *Meat Science*, 67, 149–158.

645

646 McEwen, S.A. & Fedorka-Cray, J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical*
647 *Infectious Diseases*, 34 (3), S93-S106.

648

649 Netke, S. P., Roomi, M. W., Ivanov, V., Niedzwiecki, A., & Rath, M. (2003). A specific
650 combination of ascorbic acid, lysine, proline and epigallocatechin gallate inhibits proliferation
651 and extracellular matrix invasion of various human cancer cell lines. *Research Communications*
652 *in Pharmacology and Toxicology*, 8(1/2), IV-37.

653

654 Olesen, P. T., Meyer, A. S. & Stahnke, L. H. (2004). Generation of flavor compounds in
655 fermented sausages the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and
656 ripening time. *Meat Science*, 66, 675 – 687.

657

658 Olsen, H., Grimmer, S., Aaby, K., Saha, S. y Borge, G.I. (2012). Antiproliferative effects of fresh
659 and thermal processed green and red cultivars of curly kale (*Brassica oleracea* L. acephala var.
660 sabellica). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7375-7383.

661

662 Ordóñez, J.A., Hierro, E.V., Bruna, J.M. y de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of
663 dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39,
664 329-367.

665

666 Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Bergé,
667 J.P., Guérard, F., Chabeaud, A. y Piot, J.M. (2006). Antiproliferative activity of fish protein
668 hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41(5), 1217-1222.

669

- 670 Quirós, A., Ramos, M., Mugerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A. y Recio, I.
671 (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus*
672 *faecalis*. *International Dairy Journal*, 17, 33-41.
- 673
- 674 Rodríguez, M.M., Nuñez, F., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A. (1998). Evaluation of
675 proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry cured ham. *Journal of Applied*
676 *Microbiology*, 85, 905-912.
- 677
- 678 Roomi, M. W., Ivanov, V., Kalinovsky, T., Niedzwiecki, A., & Rath, M. (2005). In vitro and in vivo
679 antitumorigenic activity of a mixture of lysine, proline, ascorbic acid, and green tea extract on
680 human breast cancer lines MDA-MB-231 and MCF-7. *Medical Oncology*, 22(2), 129-138.
- 681
- 682 Roomi, M. W., Ivanov, V., Netke, S., Kalinovsky, T., Niedzwiecki, A., & Rath, M. (2006). In vivo
683 and in vitro antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human
684 melanoma cell line A2058. *In vivo*, 20(1), 25-32.
- 685
- 686 Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Casquete, R., Serradilla, M.J. & Córdoba, M.G. (2009).
687 Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-
688 fermented sausages. *Meat Science*, 83, 460-467.
- 689
- 690 Rutherford-Markwick, K.J y Moughan, P.J. (2005). Bioactive peptides derived from food.
691 *Journal of AOAC International*, 88, 955-966.
- 692
- 693 Schöbitz, R., Zaror, T., León, O. y Costa, M. (1999). A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola*
694 for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged meat. *Food microbiology*, 16(3),
695 249-255.

696

697 Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (2006a). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for
698 the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, 97, 546-554.

699

700 Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (2006b). A fluorescence-based protocol for quantifying
701 angiotensin-converting enzyme activity. *Nature Protocols*, 1(5), 2423-2427.

702

703 Shahidi, A. y Zhong, B. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91, 914-931.

704

705 Smacchi, E. y Gobetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and
706 interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17, 129-141.

707

708 Spaziani, M., Del Torre, M. & Stecchini, L. (2009). Changes of physicochemical, microbiological,
709 and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and
710 volatile profiles. *Meat Science*, 81, 77-85.

711

712 Stahnke, L. H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A. & Zanardi, E. (2002). Maturity acceleration of
713 Italian dried sausage by *Staphylococcus carnosus*—relationship between maturity and flavor
714 compounds. *Journal of Food Science*, 67, 1914–1921.

715

716 Suzzi, G. & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review.
717 *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54.

718

719 Tantillo, M.G., Di Pinto, A. y Novello, L. (2002). Bacteriocin-producing *Lactobacillus sake* as
720 starter culture in dry sausages. *Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences*,
721 25(1), 45-50.

722

723 Tjener, K., Stahnke, L. H., Andersen, L. & Martinussen, J. (2004). Growth and production of
724 volatiles by *Staphylococcus carnosus* in dry sausages: influence of inoculation level and
725 ripening time. *Meat Science*, 67, 447–452.

726

727 Vermeirssen, V., Van Camp, J. y Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I
728 converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.

729

730 You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M. & Ren, J. (2010). Purification and identification of
731 antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by
732 consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research*
733 *International* 43, 1167–1173.

734

735

736

737 Figure 1. ACE inhibitory activity values of the peptidic extracts of 'salchichón' and 'chorizo'
738 obtained during the ripening period and differences among control and inoculated batches
739 with starter cultures 198S34 (198) and 200S34 (200). SSB: Statistical significance bar using the
740 Tukey HSD test.

741

742 Figure 2. Antiproliferative activity values of the peptidic extracts of 'salchichón' and 'chorizo'
743 obtained during the ripening period and differences among control and inoculated batches
744 with starter cultures 198S34 (198) and 200S34 (200). SSB: Statistical significance bar using the
745 Tukey HSD test.

746

747 Figure 3. Percent inhibition of the starter cultures obtained from the different sausages against
748 *Escherichia coli* CECT4267 before and after simulated gastrointestinal digestion. SSB: Statistical
749 significance bar using the Tukey HSD test.

750

751 Figure 4. Percent inhibition of the starter cultures obtained from the different sausages against
752 *Salmonella choleraesuis* CECT4395 before and after simulated gastrointestinal digestion. SSB:
753 Statistical significance bar using the Tukey HSD test.

754

755 Figure 5. Percent inhibition of the starter cultures obtained from the different sausages against
756 *Staphylococcus aureus* CECT976 before and after simulated gastrointestinal digestion. SSB:
757 Statistical significance bar using the Tukey HSD test.

758

759 Figure 6. Percent inhibition of the starter cultures obtained from the different sausages against
760 *Listeria monocytogenes* CECT911 before and after simulated gastrointestinal digestion. SSB:
761 Statistical significance bar using the Tukey HSD test.

762

763 Figure 7. Percent inhibition of the starter cultures obtained from the different sausages against
764 *Bacillus cereus* CECT131 before and after simulated gastrointestinal digestion. SSB: Statistical
765 significance bar using the Tukey HSD test.

766

767 Figure 8. PC1 and PC2 (48.6% and 19.6% of the explained variance, respectively) of the PCA for
768 the 'salchichón' samples at the end of processing. Score plot showing the detected nitrogen
769 compounds in the peptidic extracts and the functional activities (A). Loading plot indicating the
770 location of the batches analyzed (B). N1-N6; A1-A7; P1-P9: Code for nitrogen compounds in

771 Table 2. IACE: Inhibition of Angiotensin-I converting enzyme activity; AP: Antiproliferative
772 acticity; AB5: Antibacterial activity against *Bacillus cereus*.

773

774 Figure 9. PC1 and PC2 (50.4% and 20.7% of the explained variance, respectively) of the PCA for
775 the 'chorizo' samples at the end of processing. Score plot showing the detected nitrogen
776 compounds in the peptidic extracts and the antioxidant activity (A). Loading plot indicating the
777 location of the batches analyzed(B). N1-N6; A1-A7; P1-P9: Code for nitrogen compounds in

778 Table 2. IACE: Inhibition of Angiotensin-I converting enzyme activity; AP: Antiproliferative
779 acticity; AB5: Antibacterial activity against *Bacillus cereus*.

780

781

782 Table 1. Physicochemical parameters and microbial counts at final of the processing of Iberian dry-fermented sausages.

783

		Physicochemical parameters ¹						Microbial counts (log CFU/g) ¹			
		Moisture (%)		A _w		pH		LAB		GPCPC	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Salchichón	Control	21.2 ± 2.02		0.74 ^a ± 0.010		5.79 ^b ± 0.36		6.62 ^{a,b} ± 0.89		4.87 ^{a,b,c} ± 0.41	
	P198S34	23.8 ± 2.31		0.74 ^a ± 0.009		5.72 ^b ± 0.10		5.76 ^{a,b} ± 0.49		3.51 ^a ± 0.48	
	P200S34	26.4 ± 1.91		0.77 ^b ± 0.004		5.15 ^a ± 0.05		5.95 ^{a,b} ± 0.89		4.67 ^{a,b} ± 0.13	
Chorizo	Control	25.3 ± 2.36		0.78 ^{b,c} ± 0.008		5.79 ^b ± 0.09		5.57 ^a ± 0.62		5.38 ^{b,c} ± 0.20	
	P198S34	21.9 ± 3.23		0.81 ^c ± 0.015		5.92 ^b ± 0.04		7.05 ^b ± 0.13		5.43 ^{b,c} ± 0.38	
	P200S34	20.2 ± 1.74		0.80 ^c ± 0.010		5.85 ^b ± 0.03		7.05 ^b ± 0.50		6.05 ^c ± 0.95	

¹ Mean values correspond to the analysis of three sausages and each analysis was done in triplicate.

² For a given parameter or count. values with different lowercase are significantly different (P<0.05).

784

785

786

787

788

789

790

791

792 Table 2. Nitrogen compounds detected by HPLC-ESI-MS in extracts of 'chorizo' and 'salchichón' batches after the gastrointestinal digestion *in vitro*.

Rt	Cd ¹	Compound	ID ²	m/z ³	Mass fragments	Salchichón ⁴				Δ	Chorizo ⁴				Δ
						Min	Max	Mean	SD		Min	Max	Mean	SD	
Natural compounds						34.04					43.64				
1.9	N1	Taurine	a	126.1	109.1; 126.1	0.73	0.98	0.87	0.08	+0.87		<1			-1.37
2.37	N2	Carnosine	b	227.1	227.1;210.1	4.59	9.81	7.65	1.94	-0.32	4.91	8.10	6.12	0.88	-3.33
2.49	N3	Anserine	b	241.1	241.1;170.1			<1		-2.35			<1		-2.25
2.54	N4	Carnitine	a	162.1	162.1	3.57	5.17	4.45	0.51	-2.06	2.93	7.98	5.38	1.47	-4.00
2.8	N5	Creatine	b	132.1	132.1; 115.1	15.30	24.07	18.58	2.73	+0.16	9.07	20.26	15.49	4.41	-4.86
2.81	N6	Creatinine	b	114.1	114.1	15.23	24.28	21.07	2.98	+7.75	11.76	27.56	16.65	6.27	-7.57
Amino acids and amines						27.56					30.52				
2.17	A1	Lysine	a	147.1	130.1; 147.1	6.63	12.30	9.14	1.84	+4.41	12.93	16.42	14.45	1.31	+11.98
2.56	A2	Proline	a	116.1	116.1	1.92	2.74	2.28	0.37	-5.85	3.96	6.33	5.18	0.75	+0.61
6.29	A3	Methionine	a	150.1	133; 150.1	1.28	2.53	1.87	0.42	+1.87	1.09	2.01	1.61	0.28	0+26
14.1	A4	Isoleucine	a	132.1	132.1	1.12	14.43	3.51	3.40	+3.51			<1		-1.21
15.24	A5	Leucine	a	132.1	132.1	6.40	15.97	5.92	3.46	+4.72	0.00	8.51	1.02	2.87	-1.91
16.31	A6	Tyramine	a	121.1	121.1-138.1	1.36	3.58	2.43	0.79	+0.93			<1		-3.97
31.09	A7	Phenylalanine	a	166.1	120.1-166.1			<1		-	5.36	8.73	7.24	1.27	+6.25
Presumed peptides and other compounds						19.81					23.21				
2.1	P1	Compound 1	c	190.9	190.9; 380.9; 478.9; 614.9; 750.9	1.95	3.72	2.43	0.54	-2.01	2.57	7.49	4.13	1.47	+0.63
2.15	P2	Compound 2	c	118.1	118.1; 203.1	7.72	12.35	10.48	1.76	+4.87	8.57	11.84	10.07	1.07	-0.27
2.23	P3	Compound 3	c	365.1	365.1	1.54	2.87	2.04	0.43	-0.23			<1		-1.01
3.16	P4	Compound 4	c	146.1	146.1	0.00	0.91	0.47	0.30	-1.77	1.88	10.92	4.31	3.37	+4.31
3.36	P5	Compound 5	c	277.1	227.1; 407.1; 504.1			<1		-1.92	0.08	1.80	0.59	0.70	+0.59
4.7	P6	Compound 6	c	124.1	124.1			<1		-7.82	1.36	3.66	2.43	0.76	+2.43

5.63	P7	Compound 7	c	159.1	159;1 295.1					<1	-5.16	1.32	2.44	1.68	0.35	-2.24
5.93	P8	Compound 8	c	137.1	137.1	2.42	5.26	3.94	0.92	-0.91	0.48	2.86	1.62	0.81	-4.75	
7.28	P9	Compound 9	c	205.1	204.1	0.25	1.11	0.45	0.27	-2.32	0.48	1.70	1.02	0.48	+1.02	

¹Code used in PCA analysis

²Identification levels: a: Standard; b: data base mass bank (<http://www.massbank.jp>); c: unidentified compound.

³The most abundant fragment ions.

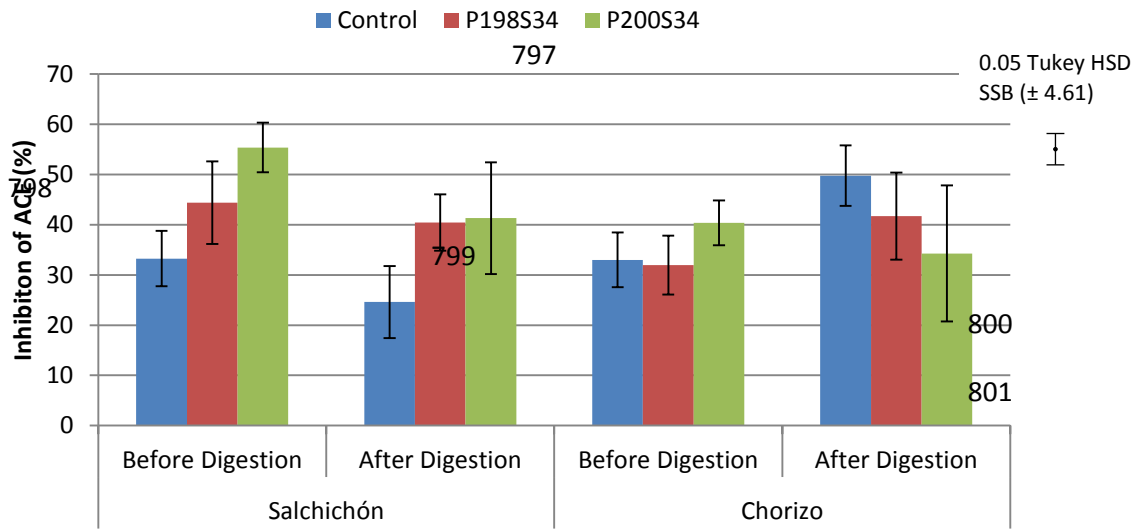
⁴Values expressed in percentage of the main fragment ions of the nitrogen compounds detected.

793

794

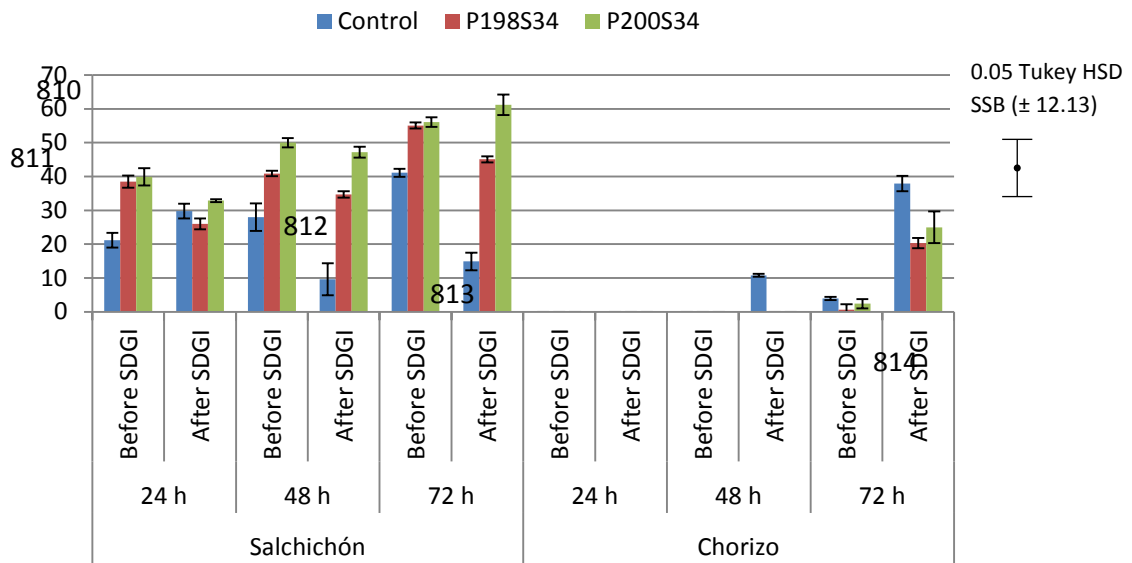
795 Figure 1.

796



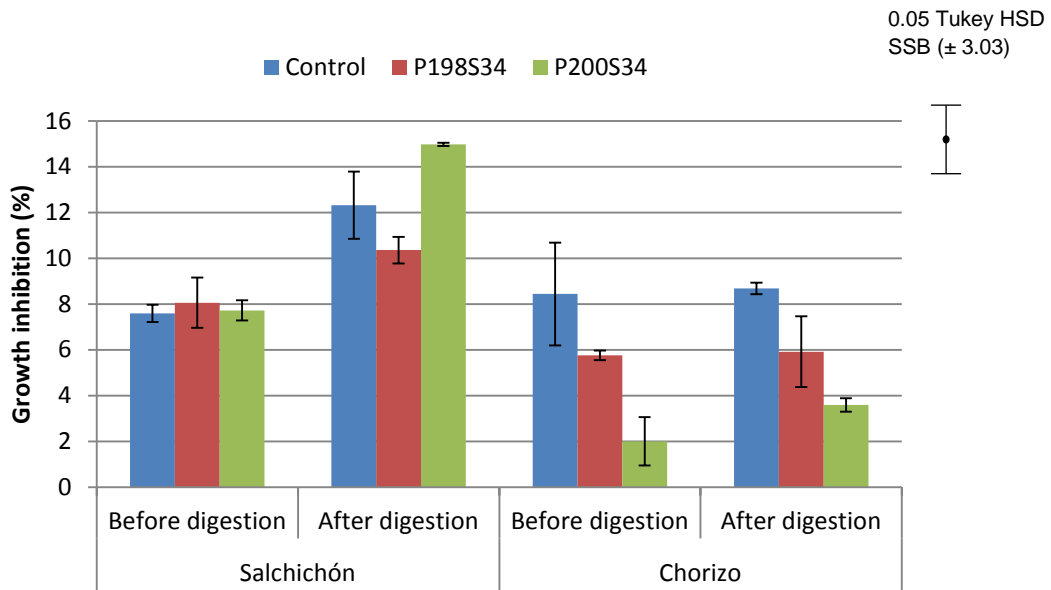
808 Figure 2.

809



819 Figure 3.

820



821

822

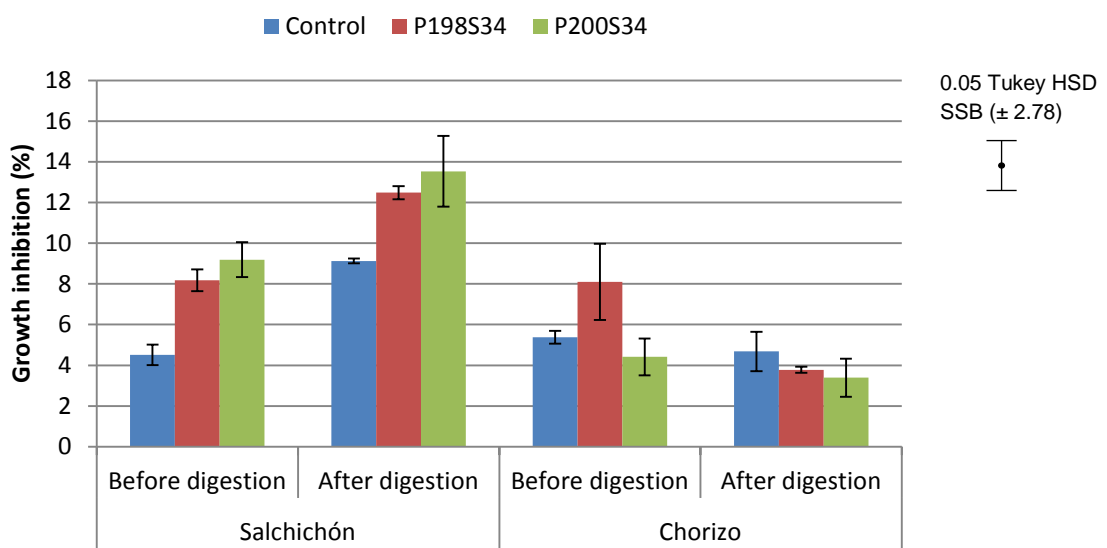
823

824

825

826

827 Figure 4.

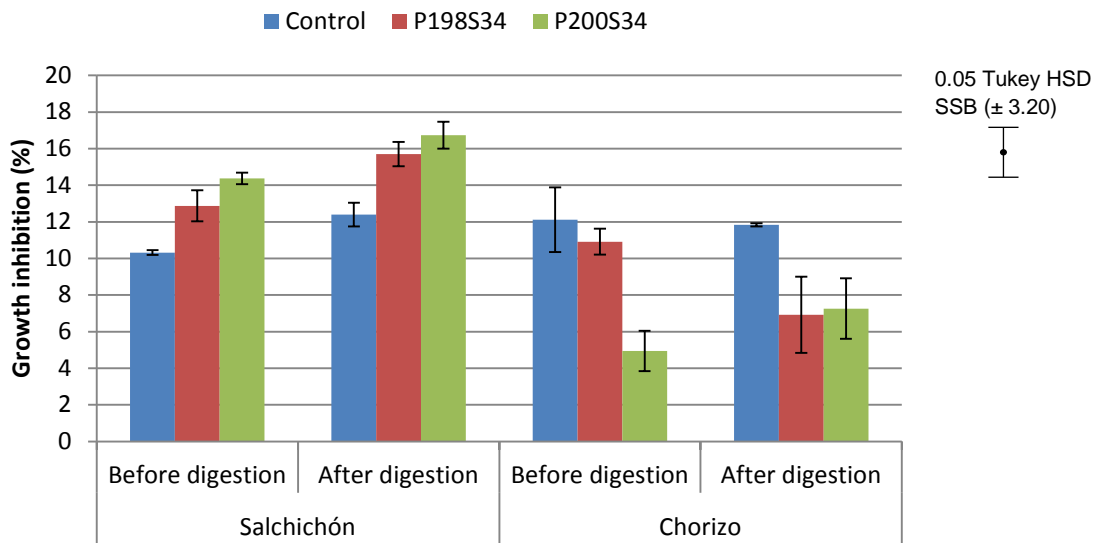


828

829

830

831 Figure 5.



832

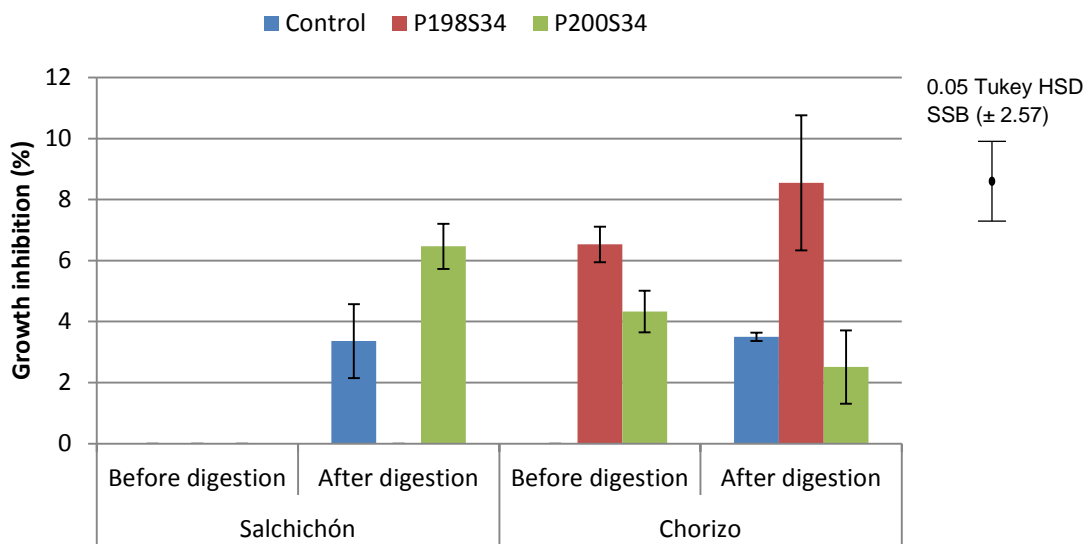
833

834

835

836 Figure 6.

837



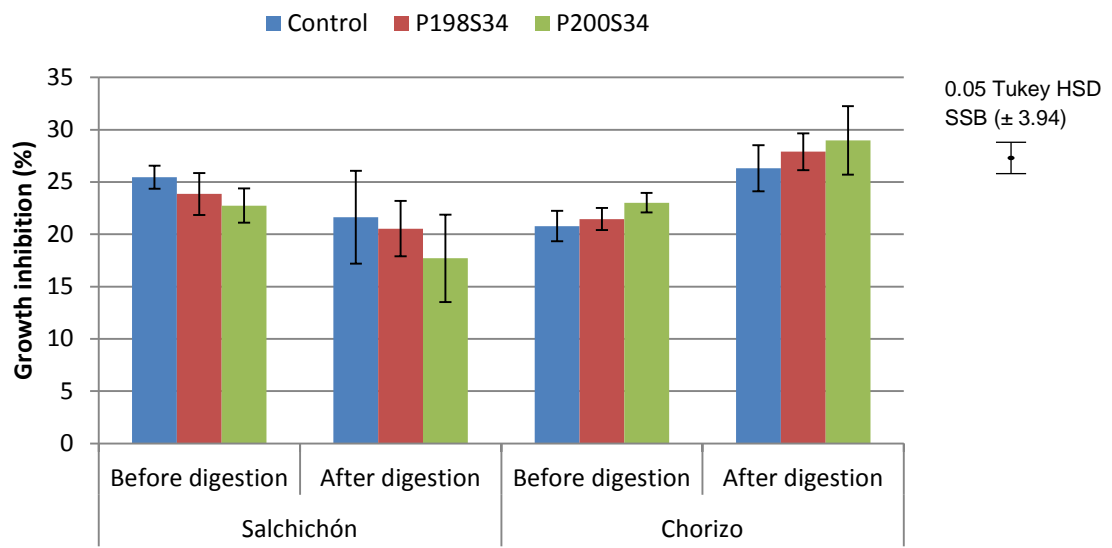
838

839

840

841

842 Figure 7.



843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

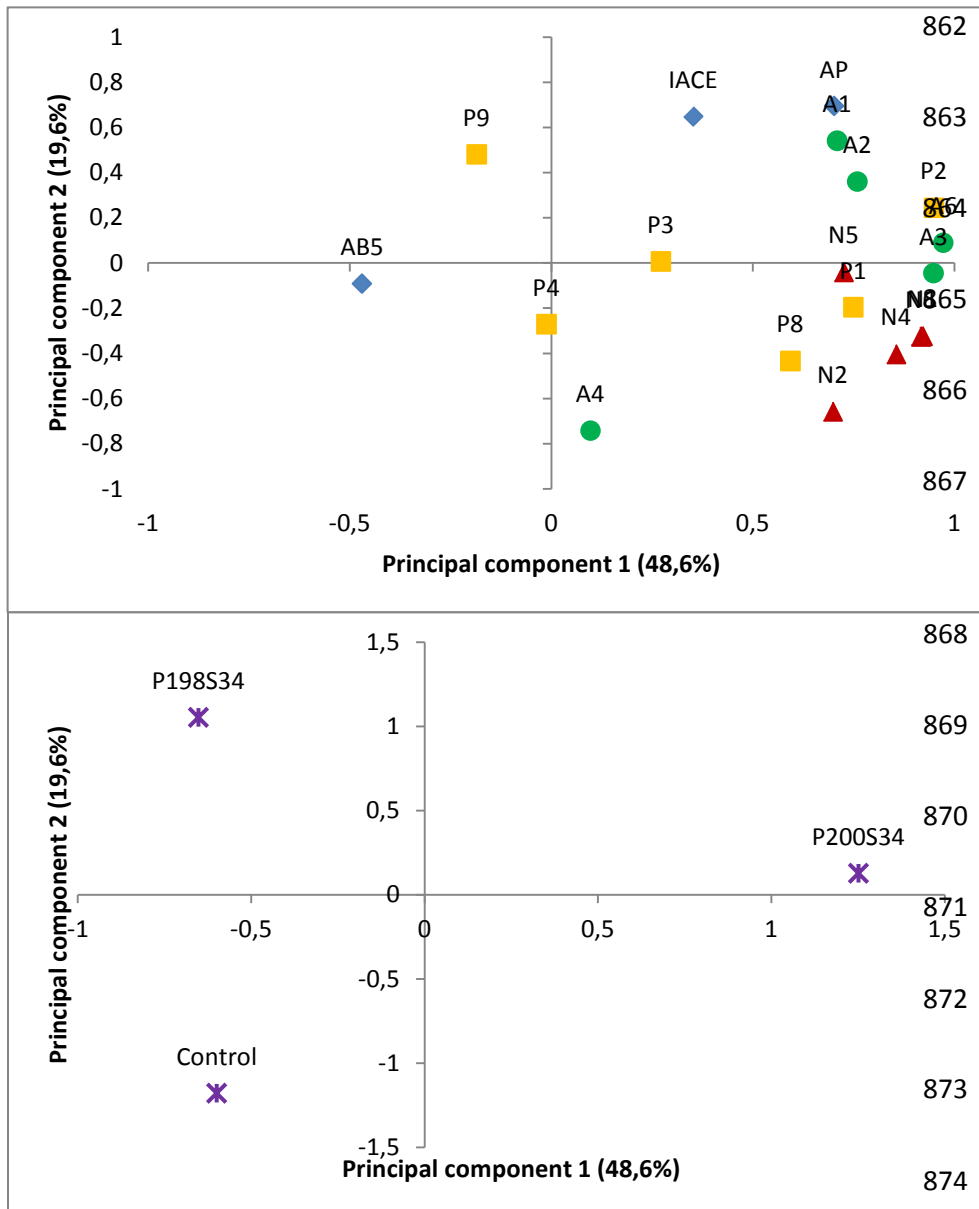
857

858

859

860

861 Figure 8.



875

876

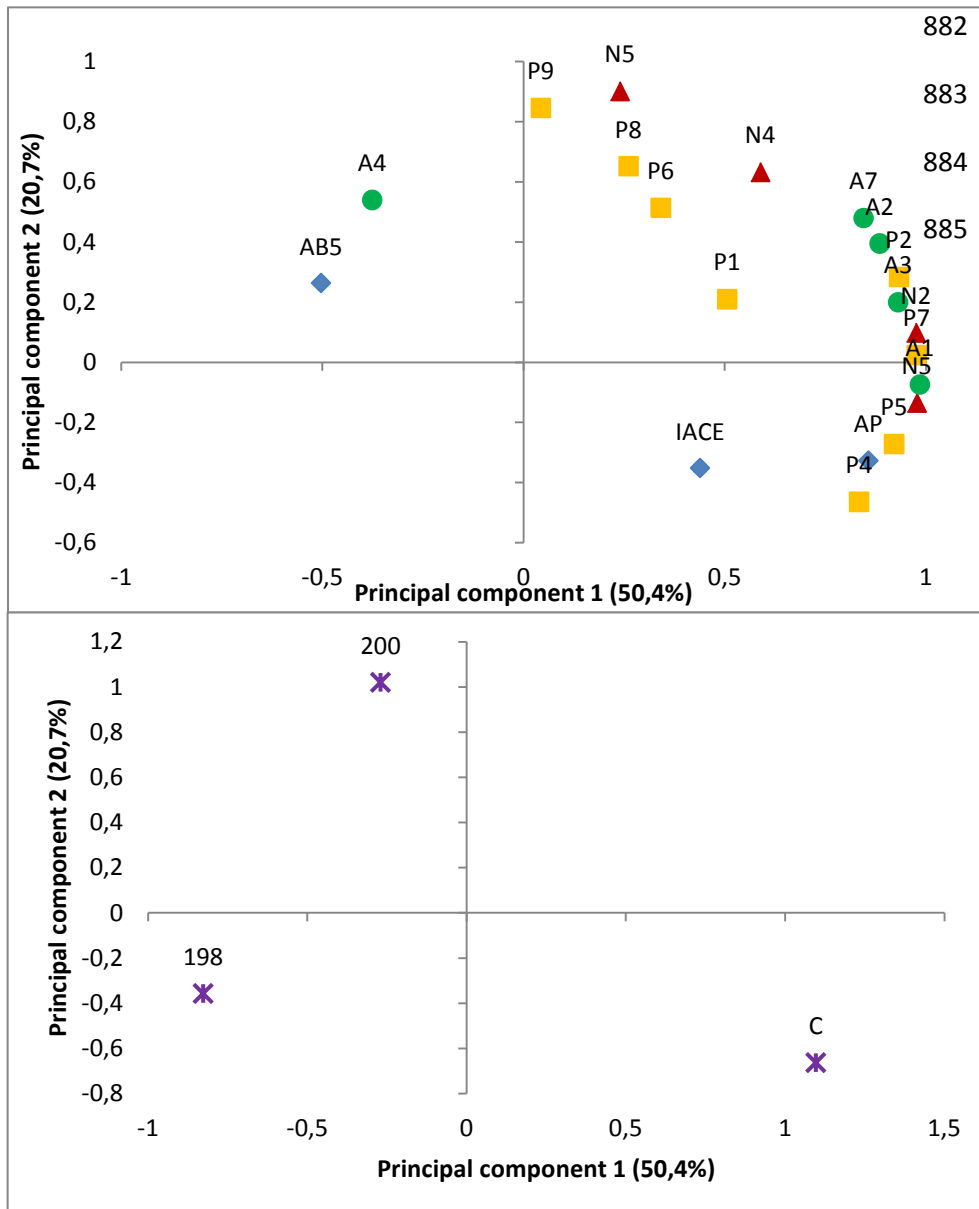
877

878

879

880

881 Figure 9.



IV.4.- Potential antimicrobial and antiproliferative activities of autochthonous starter cultures in dry-fermented sausages.

1 **Potential antimicrobial and antiproliferative activities of autochthonous starter culture in**
2 **dry fermented sausages**

3

4 Margarita Fernández; Santiago Ruiz Moyano, María José Benito^{*}; Alejandro Hernández, Alberto
5 Martín, María de Guía Córdoba

6

7 Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Avd.
8 Adolfo Suarez s/n, 06007, Badajoz, Spain

9

10 *Corresponding author

11 Tel.: +34 924 286200; fax: +34 924 286201

12 E-mail address: mjbenito@unex.es

13 <http://eia.unex.es>

14 **Abstract**

15 This work studied the presence of nitrogen compounds with antimicrobial and antiproliferative
16 activities in Iberian pork sausages manufactured using different autochthonous starter cultures
17 *Pediococcus* and *Staphylococcus* and protease EPg222. It was tested activity against spoilage
18 and pathogenic bacteria such as *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella cholerasuis*,
19 *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, and the antiproliferative activity on Caco-2
20 colon adenocarcinoma cell line. Nitrogen compounds smaller than 5 kDa were extracted on
21 different days of the ripening process. Inhibitory effects of nitrogen compound extracts before and
22 after simulated gastrointestinal digestion were studied by following the ability of the target
23 microbes and cell line to grow in a medium containing sterilised extracts. It was generally observed
24 that the extracts obtained after 90 days were more active, as evidenced by the highest activity
25 samples being obtained from sausages inoculated with the enzyme EPg222 and the starter
26 culture P200S34, both together and separately. The extracts were more active against *B.*
27 *cereus* and showed no activity against *L. monocytogenes*. We can conclude that starter cultures
28 containing P200S34 and protease EPg222 generate extracts which cause inhibition of the
29 growth of pathogens, making this a promising tool for biocontrol in the meat industry. On the
30 other hand, the inoculation of well-adapted starter cultures with high proteolytic activity
31 increased the antiproliferative activity of these extracts, mainly due to an increase in free amino
32 acids such as Lys and Pro, but also small peptides.

33

34

35

36 **Keywords:** biocontrol, autochthonous starter culture; protease EPg222; sausages; bioactive
37 nitrogen compounds.

38 1. Introduction

39

40 Iberian dry cured sausages are high quality meat products that are traditionally
41 manufactured from Iberian pigs of South West of Iberian Peninsula. They are not heat treated
42 products, and pathogenic or spoilage bacteria can be found both during and at the end of the
43 ripening process. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*
44 spp. and some *Escherichia coli* strains are known to be common foodborne pathogenic bacteria
45 and are frequently isolated from meat and meat products (Borch and Arinder 2002; Ferreira and
46 others 2006, 2007; Casquete and others 2012b). *L. monocytogenes* is a ubiquitous
47 microorganism which has been isolated from almost all environments due to the fact that it can
48 survive under a wide range of conditions, including in meat products (Soriano and others 2001;
49 Lücke and Zangerl 2014); several outbreaks of listeriosis have even been connected with its
50 consumption (Farber and Peterkin 1991; Cartwright and others 2013). In addition, *S. aureus* is
51 often found in food, being one of the principal causes of foodborne bacterial intoxications, and it
52 has occasionally been isolated from Iberian pork sausages (Martín and others 2007; Benito and
53 others 2008a). Despite this, the risk of the growth of foodborne pathogens in dry cured meat
54 products is considered low due to the composition of these products and the physicochemical
55 changes that occur during ripening. Therefore, the manufacturing process is essential for
56 reducing the number of pathogenic microorganisms, although it seems that pathogens can
57 sometimes survive this process (Moore 2004; Xavier and others 2014), thus making it essential
58 to control the presence of common pathogens in these kinds of foods.

59 To ensure appropriate hygiene and safety of these products, starter cultures which
60 provide the desired fermentation sausages parameters, are used to prevent the growth of
61 pathogenic and spoilage microorganisms. The most important microorganisms that have been
62 used as starter cultures in the manufacture of cured meat products are lactic acid bacteria
63 (LAB) and staphylococci (Leroy and De Vuyst 2004; Ammor and Mayo 2007). LAB, during
64 ripening, are responsible for the drop in pH as a consequence of organic acid production and
65 can also produce small peptides called bacteriocins, which contribute to the safety of the final
66 product (Hugas 1998). However, the effectiveness of bacteriocin in the sausage can be
67 conditioned to a wide range of factors such as the limited spectrum of action, physical

68 conditions, low production under the manufacturing conditions, genetic instability, low diffusion
69 throughout the product and solubility, inactivation by meat proteases, resistance of the target
70 strain, and interference by meat components, in particular adsorption to fat and meat particles
71 or inhibition by salt and curing agents (Schillinger and others 1996; Leroy and others 2006).
72 Consequently, research into new natural antimicrobial substances to control foodborne
73 pathogens in dry cured sausages remains an important objective for this industry. In this sense,
74 many authors have demonstrated the capacity of bioactive peptides derived from food to inhibit
75 foodborne pathogens (Mine and others 2004; Jang and others 2008; Gong and others 2009;
76 Daroit and others 2012; Silva and others 2012). These peptides can be produced from
77 precursor proteins through the proteolytic actions of microorganisms, starter and non-starter
78 cultures, by *in vitro* enzymatic hydrolysis with enzymes from microbial, animal or plant origins,
79 chemical synthesis or food processing (Sibel Akalin 2014). LAB and staphylococci possess
80 extracellular and intracellular proteinases and peptidases for possible application in the
81 production of bioactive peptides (Mauriello and others 2004; Flores and Toldrá 2011).
82 Proteolytic starter cultures have been used to generate antimicrobial peptides from different
83 food matrices (Gagnaire and others 2001; Rizzello and others 2005, 2013; Lee and others
84 2013). However, there are few studies on the release of antimicrobial peptides by
85 microorganisms in dry cured meat products.

86 On the other hand, antiproliferative activity studies against several tumor and normal
87 human cell lines of different compounds is nowadays very important. Cancer is one of the
88 largest single causes of death in both men and women (Kaufman and Earnshaw, 2000).
89 Frequently, resistance to anticancer drugs has been observed (Lind et al., 2001). Therefore, the
90 research and development of more effective and less toxic drugs by the pharmaceutical industry
91 has become necessary, prompting a growing interest in the identification and characterization of
92 natural antitumor agents. The elimination of cancer in the early stages is an integral part of
93 chemoprevention, and measuring the cytotoxic properties of a given compound against cancer
94 cells provides useful insight into its chemoprotective potential. However, no reference has been
95 made in previous reports of any antiproliferative/cytotoxic effect of fermented meat products
96 derived peptides on cancer cells

97 The starter cultures used in this study are highly proteolytic, and can generate bioactive
98 nitrogen compounds during ripening that may have a wide range of biological functions such as
99 antimicrobial or antiproliferative activities (Rutherford-Markwick and Moughan 2005; Korhonen
100 and Pihlanto 2006; Shahidi and Zhong 2008).

101 The aim of this work was to study the presence of nitrogen compounds with
102 antimicrobial and antiproliferative activities in the manufacture of Iberian pork sausages with
103 different autochthonous starter cultures and protease EPg222. It will be tested activity against
104 spoilage and pathogenic bacteria and the antiproliferative activity on Caco-2 colon
105 adenocarcinoma cell line.

106

107 **2. Materials and Methods**

108

109 **2.1. Biological material**

110 For this work, two kinds of dry fermented sausages, salchichón and chorizo, described
111 by Casquete and others (2011a, b, c, 2012a, b) in two different industries were used to obtain
112 nitrogen compound extracts. In the manufacture of dry fermented sausage, four autochthonous
113 microorganisms, three *Pedococcus acidilactici* (MC184, MS198 and MS200) and
114 *Staphylococcus vitulus* RS34, as well as the protease EPg222 were used (Benito and others
115 2006, 2007; Martín and others 2007; Benito and others 2008a). In total, six different batches for
116 each industry and product were prepared: a control batch without the addition of a starter
117 culture (Control), three batches with the association of each *P. acidilactici* strain and *S. vitulus*
118 RS34 (P184S34, P198S34, and P200S34), and finally two batches elaborated with the protease
119 EPg222, alone (EPg222) and in combination with the starter culture containing *P. acidilactici*
120 MS200 and *S. vitulus* RS34 (EPg222+P200S34). Samples were taken from three different
121 sausages from each batch at the end of the ripening, at 90 days.

122

123 **2.2. Preparation of nitrogen compounds extracts**

124 The nitrogen compounds were extracted according to De Ketelaere and others (1974)
125 and Bauchart and others (2006). Fifteen g of each sample was homogenised in 0.6N perchloric
126 acid with an Omni Mixer Homogeniser. The homogenate was centrifuged for 15 min at 4,000

127 rpm. The soluble fraction located between the upper layer and the precipitate was filtered
128 through Whatman No. 54 filter paper. The pH was neutralised to pH 6 with 30% KOH. To
129 eliminate the potassium perchlorate formed during neutralisation, extracts were filtered again.
130 Finally, extracts were ultrafiltrated through a hydrophilic 10 and 5 kDa cut-off membrane
131 (Pellicon XL, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The protein content of the 5 kDa-
132 permeates extracts was determined by the colorimetric method based on bicinchoninic acid
133 (BCA) assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA), using bovine serum albumin as standard protein.
134 The different extracts were lyophilised and kept frozen at -80°C until antibacterial activity testing.

135

136 **2.3. *In vitro* pepsin-pancreatin simulated GI digestion**

137 Simulated GI digestion using an *in vitro* pepsin–pancreatin hydrolysis was carried out
138 according to Cinq-Mars and others (2008) and You and others (2010), with slight modifications.
139 The pH of nitrogen compounds extracts was adjusted to pH 2.0 with 1 M HCl and incubated at
140 37°C with pepsin (4% weight as received/weight of protein in the powder (~85% protein)) for 90
141 min. Before pancreatic digestion, the pH was adjusted to pH 7.5 with 1 M NaOH. Pancreatin
142 was added (4% weight as received/weight of protein in the powder (~85% protein)), and the
143 mixture was incubated at 37°C for 2 h. To terminate the digestion, the test tubes were kept in
144 boiling water for 10 min and then cooled to room temperature and centrifuged at 5000 rpm for 5
145 min. Finally, the protein content of the 5 kDa-permeates extracts was determined by the BCA
146 method (Pierce, Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin as standard protein and the
147 different extracts were lyophilised and kept frozen at -80°C until antibacterial activity testing.

148

149 **2.4. Antibacterial activity testing**

150 Inhibitory effects of nitrogen compound extracts before and after GI digestion on selected
151 potentially harmful microorganisms were studied by following the ability of the target microbes to
152 grow in a medium containing sterilised extracts, as described Ruiz-Moyano and others (2009).
153 Selected pathogen bacteria were obtained from Spanish Type culture collection. The strains
154 were grown at least twice prior to the experiment in Brain-Heart Infusion broth (BHI) (Scharlab,
155 Barcelona, Spain) for 18h at 37°C (*E.coli* CECT4267, *S.cholerasuis* CECT4395, *S.aureus*
156 CECT976, *L.monocytogenes* CECT911, *B.cereus* CECT131). The nitrogen compounds extracts

157 were reconstituted in Milli-Q water at 600 µg/ml and filter-sterilised. The test was performed in
158 100-well flat-bottomed honeycomb plates; 247 µl of BHI broth was inoculated with 3 µl from a
159 suspension of tested microorganisms at 10⁸ (cfu/ml) and 50 µl of test fractions (Final
160 concentration 100 µg/ml). BHI broth inoculated with test microorganisms and 50 µl of Milli-Q
161 water, was used as a control. The ability of each strain to grow in supplemented broth was
162 evaluated by following microbial growth at 37°C for 24 h with an automated turbidometer
163 Bioscreen C Analysis System (Labsystems, Finland). The optical density was measured with a
164 wide band filter (OD 420-580 nm). Each assay was performed in triplicate. The absorbance was
165 measured at 15 min intervals during the incubation period preceded by 10 seconds shaking at
166 medium speed. The inhibitory effect of nitrogen compound extracts on the foodborne pathogens
167 was determined by comparing the turbidity readings of each strain with those obtained in the
168 absence of nitrogen compound extracts. The percentage inhibition was calculated with the
169 following formula:

$$170 \quad \%inhibition = (Abs_{control} - Abs_{assay} / Abs_{control}) \times 100$$

171 where Abs_{control} is the optical density of the growth of the test strain in the absence of nitrogen
172 compound extracts and Abs_{strain} is the optical density of the growth of the test strain in the
173 presence of nitrogen compound extracts.

174

175 **2.5. Determination of antiproliferative activity on HT-29 colon adenocarcinoma cell line.**

176 The antiproliferative test was development using the HT-29 ATCC HTB-38 human
177 colorectal adenocarcinoma cell line. The cells were routinely grown in flask with McCoy's 5A
178 medium containing 10% FBS and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%
179 CO₂. The medium was renewal every 48 h. When cells got 90% confluence, were trypsinized by
180 adding 1.6 ml of trypsin-EDTA solution for 5 min. Then, 6 mL of complete fresh medium was
181 added and cells were centrifuged at 120 g for 5 min. The pellet of cells was suspended in fresh
182 media and the concentration of cells determined with a hemocytometer. Cells were seeded at
183 5x10³ cells per well in 96-well plate, and incubated in 100 µL of complete culture medium for 24
184 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ prior to the addition of the samples.
185 After 24 h, the medium was replaced with 95 µL of complete medium plus 5 µL of phosphate
186 buffer saline pH 7.4 (PBS) in negative control wells, 99 µL of complete medium plus 1 µL of

187 quercetin (Sigma) solution at 20 mM in methanol, and in treatment wells 95 μ L of complete
188 medium plus 5 μ L of nitrogen compounds extracts in PBS obtained as above at 20 mg/mL. The
189 medium of each treatment and controls was replaced in 96 well plates every 24 h. The
190 proliferation of the cells was assessment using the colorimetric MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-
191 2,5-difeniltetrazol; Sigma) assay according to Olsen et al. (2012) with slight modification, at 24,
192 48 and 72 h. To determine the living cells, the medium was removed and 200 μ L of not
193 supplemented medium and 50 μ L of MTT solution at 5 mg/ml were added to each well and
194 plates were incubated for 4h at 37°C. After incubation, the medium was removed and the
195 resulting blue MTT formazan precipitated was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (200 μ L).
196 Finally, the absorbance at 570 nm was measured using a spectrophotometer (Fluostar Optima
197 microplate reader; BMG LABTECH, Offenburg, Germany). The antiproliferative effect was
198 determined as the percentage of growth inhibition with respect to the negative control cells,
199 according to the following equation: % Antiproliferative activity= [(Absorbance negative
200 control- Absorbance samples)/(Absorbance negative control)]*100

201

202 **2.6. HLPC-ESI-MS analysis of the extracts**

203 The nitrogen compounds presents in the extracts were analyzed by HLPC-ESI-MS as
204 explained Gómez-Ruiz *et al.* (2008) on an Agilent series 1100 apparatus (Agilent Technologies,
205 Palo Alto, USA). A Supelcosil LC-18 column (SUPELCO, Bellafonte, USA) was utilized with
206 mobile phases (A) a mixture of water-trifluoroacetic acid (1000:0,37, v/v) and (B) acetonitrile-
207 trifluoroacetic acid (1000:0,27, v/v) in a gradient of solvent B in A increasing from 0 to 45% in 60
208 min, and from 45 to 70% in 5 min at a flow rate of 0.8 ml min⁻¹. Nitrogen compounds were
209 distinguished on an Agilent series 6100 Series Single Quad LC/MS (Agilent Technologies, Palo
210 Alto, USA) equipped with a multimode source in electrospray ionization mode, in agreement to
211 their mass spectrum and retention time. Standards of amino acids (alanine, arginine, aspartic
212 acid, cystine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine,
213 phenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine, valine, and taurine), biogenic amines
214 (cadaverine, histamine, putrescine, tryptamine, tyramine, 2-phenylethylamine, spermine, and
215 spermidine), , and carnitine (Sigma–Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) were used. The other
216 nitrogen compounds detected were tentatively identified by their mass spectra.

217

218 **2.7. Statistical analysis**

219 Statistical analysis of the data was carried out using one-way analysis of variance, and
220 the means were separated by Tukey's honest significant difference (HSD) test, ($p \leq 0.05$) using
221 SPSS for Windows, 22.0. (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). The functional activities were studied
222 by variance mixed ANOVA. The relationships among the nitrogen compounds and the
223 functional activities found in the extracts at end of the processing of the meat fermented
224 sausages studied were estimated by principal component analysis (PCA).

225

226 **3. Results and Discussion**

227

228 **3.1. Antibacterial activity testing**

229 The results showed no significant differences due to type of product variables, chorizo
230 or salchichón, or type of industry. Therefore, the differences were considered only due to the
231 starter culture and enzyme EPg222. Proteolysis occurred during the ripening of dry-cured
232 sausages due to endogenous meat enzyme and microbial populations and is one of the most
233 important events resulting in the formation of peptides related to sensory quality of the final
234 product. The peptides generated during meat fermentation not only contribute to the
235 development of flavour and texture in the ripening, but could also have different bioactive
236 functions (Udenigwe and Howard 2013).

237 Table 1 shows the percent of inhibition of the extracts obtained from the different
238 batches against *E.coli* CECT4267. In general, the activity values after 60 days were lower than
239 at 90 days although no significant differences between days were appreciated, except in the
240 batch inoculated with P200S34 culture and protease EPg222. During ripening of sausages,
241 peptides and free amino acids increased due to hydrolysis of the proteins (DeMasi and others
242 1990; Díaz and others 1993, 1996; Bolumar and others 2001). Thus, at the beginning of the
243 ripening, high molecular weight peptides are generated, but over time, increasing lower
244 molecular weight compounds are formed (Henriksen and Stahnke 1997), which may be
245 responsible for the antimicrobial activity. Previous studies in water soluble extracts obtained
246 from cheese have demonstrated that the antimicrobial activity was significantly affected by the

247 ripening time (Rizzello and others 2005; Lignitto and others 2012). No significant differences
248 between the control and inoculated batch before or after *in vitro* gastrointestinal digestion were
249 observed, although after digestion a significant increase of activity was observed. It is important
250 that the bioactive compounds maintain their bioactivity to pass through the human digestive
251 system and perform their roles inside human (Korhonen and Pihlanto 2006; Martínez Augustin
252 and Martínez de Victoria 2006). The values after simulating gastrointestinal digestion indicate
253 that the compounds with antimicrobial activity present in the extracts are resistant to the action
254 of enzymes responsible for gastrointestinal digestion. Furthermore, this digestion can generate
255 new antimicrobial compounds from other inactive molecules in the extract (Vermeirssen and
256 others 2004; Rutherford-Markwick 2012). It has also been demonstrated in previous studies that
257 the addition of protease EPg222 during the curing process of meat results in the release of
258 peptides and free amino acids that may have functional activities (Benito and others 2003a, b).
259 Although inhibition is not high, the results are interesting because previous studies have not
260 found inhibition on gram negative bacteria growth of such as *E.coli*, by lactic acid bacteria
261 (Ammor et al., 2006; Jack et al., 1995; Tantillo et al., 2002).

262 For inhibition of the different extracts against *S. choleraesuis* CECT4395, as well as
263 against *E. coli*, the values of inhibition increased from 60 to 90 days of ripening (Table 2). No
264 significant differences were observed before digestion. However, after the simulation *in vitro*,
265 the extracts activity was maintained or even increased in control and P20034 + EPg222 batch
266 significantly, from 7.5% to 12% inhibition growth. Numerous studies have demonstrated the high
267 resistance of *Salmonella sp.* to different types of antimicrobial compounds due to the different
268 antimicrobial resistance mechanisms (McEwen and Fedorka-Cray 2002; Foley and Lynne
269 2007).

270 Table 3 shows percentages of inhibition against *S. aureus* CECT 976. The extracts
271 obtained after 60 days of ripening did not show any inhibition, while at 90 days the different
272 extracts reached values of around 16% inhibition in most cases. The antimicrobial activity of the
273 extract is due to low molecular weight nitrogen compounds. These compounds are inactive in
274 the native protein, but they can be activated for release during the ripening of sausages (Vioque
275 and Millán 2005). This could explain why at 60 days of ripening, no antimicrobial activity
276 appeared and, due to the increased amount of low molecular weight compounds throughout

277 ripening, the activity was increased at the end of this process. No significant differences were
278 observed between the control and inoculated batches. Ammor et al., 2006 examined the
279 antimicrobial activity of 87 lactic acid bacteria and found that only three strains of *Lactococcus*
280 *garvieae* showed activity against *S.aureus*. Proteolysis that takes place during ripening of meat
281 products is influenced by the starter cultures used (Hughes and others 2002), with microbial
282 proteolysis being most important during the last stages of ripening (Hugas and Monfort 1997;
283 Lizaso and others 1999; Hughes and others 2002).

284 With respect to *L. monocytogenes* CECT911, antimicrobial activity was not detected at
285 60 days before and after digestion; however, slight inhibition was observed at 90 days, with
286 values of around 6-7%, but no significant differences between batches were appreciated (Table
287 4). Although previous studies with water soluble peptide extract from different cheeses have
288 demonstrated a large spectrum of inhibition against foodborne pathogens including *Listeria* sp.,
289 differences in the spectrum of action and in the inhibitory concentration were observed and the
290 anti-listerial activity was also affected by time of ripening (Rizzelo and others 2005; Lignitto and
291 others 2012). Moreover, different authors have reported the influence of the LAB in inhibition of
292 *L. monocytogenes* growth during the ripening of dry cured sausages, with this antimicrobial
293 effect probably being the consequence of other factors such as organic acid production or
294 bacteriocin by LAB (Johnson and others 1990; Hugas and others 2003; Jones and others
295 2008).

296 Finally, results of inhibition of the extracts obtained from the different batches against *B.*
297 *cereus* CECT131 are shown in Table 5. As before, samples obtained at 60 days did not show
298 any inhibition of *B. cereus*. However, after 90 days of sausage ripening, extracts obtained
299 inhibited growth clearly, reaching values around 25% inhibition, the highest percentage of
300 inhibition obtained with the different microorganisms tested. Control batch showed lower activity
301 than other studied extracts. After gastrointestinal digestion, all extracts values were maintained
302 except P200S34 batch which suffered a significant decline of activity. This result is interesting
303 because few bacteriocins produced by lactic acid bacteria are effective against *Bacillus* sp.
304 (Lücke 2000). *B. cereus* has been isolated from fresh meat and meat products (Van Netten and
305 others 1990; Giffel and others 1996; Konuma and others 1988). This microorganism grows at
306 temperatures between 5 and 55°C, and pH 4.5 to 9.3, and supports up to 7.5% salt, which

307 enables it to grow easily in dry cured sausages. The toxin production is shown to be greater at
308 12 to 15°C than at 30°C (Finlay and others 2000), which makes *B. cereus* a microbiological risk
309 to consider in meat products (Borch and Arinder 2002).

310 The high proteolytic activity of EPg222 has been previously studied during controlled
311 ripening of pork sausages containing this enzyme, either alone or with other starter cultures
312 (Benito and others 2004, 2005; Casquete and others 2011a). It has been observed that the
313 batches in which the enzyme was added showed a high concentration of nitrogen compounds
314 (Casquete and others 2011a). Therefore, batches containing EPg222 have a higher activity due
315 to the increased amount of antimicrobial nitrogen compounds formed by protease activity.
316 Furthermore, high values of proteolysis in batches with starter culture P200S34 are also due to
317 the activity of microbial proteases present in the starter culture (Benito and others 2007; Martín
318 and others 2007; Casquete and others 2011b, c).

319 It is generally observed that the extracts obtained after longer maturation showed higher
320 antimicrobial activity, presumably due to the fact that higher protein hydrolysis increases the
321 generation of different nitrogen compounds. In addition, between batches, the highest
322 antimicrobial activity was obtained from sausages inoculated with the enzyme EPg222 and the
323 starter culture P200S34, both together and separately, probably due to the higher proteolytic
324 activity, as has been shown previously by Casquete and others (2012b). Therefore, the results
325 of this study showed that the control of the ripening process of dry fermented sausages with
326 proteolytic starter cultures, alone or in combination with a protease EPg222, can lead to the
327 production of nitrogen compounds with moderate antimicrobial activity, contributing to
328 potentially controlling the presence of foodborne pathogens and ensuring the hygienic quality of
329 this meat product.

330

331 **3.2. Determination of antiproliferative activity on HT-29 colon adenocarcinoma cell line.**

332 In Figure 1 proliferative activity of the extracts against Caco-2 tumor cells can be
333 observed. It is noted that all batches increased their antiproliferative activity with the incubation
334 time. Batches inoculated with the starter culture and EPg222 enzyme, together or separately,
335 reached their maximum activity at 72 hours of incubation, however the control batch reached its
336 maximum activity at 48 hours and then decreased to 72 hours. All batches inoculated showed

337 significantly higher activity than the control batch, with values around 30% inhibition of tumor
338 cells at 24 hours of incubation and more than 40% after 72 hours of incubation. Several studies
339 show that the use of commercial protease is an efficient way to produce bioactive compounds
340 from food proteins (Korhonen y Pihlanto, 2003, 2006; Lafarga y Hayes, 2014; Pihlanto y
341 Korhonen, 2003). Several bioactive peptides have been generated by hydrolysis with proteases,
342 including antiproliferative or antitumor peptides. Hsu et al. (2011) identified two peptides with
343 high antiproliferative activity of hydrolysates from tuna muscle with papain and protease XXIII.
344 On the other hand, Alemán et al. (2011) treated gelatin squid with different commercial
345 proteases obtaining hydrolysates tested on two tumor cells lines finding growth inhibition in all
346 cases. In addition, they found that the most active hydrolysates were composed mostly of
347 peptides with molecular weights between 500 Da and 1400 Da.

348 After *in vitro* gastrointestinal digestion is observed a decrease in the percentage of
349 growth inhibition of tumor cells in all batches except batches prepared with the starter culture
350 P200S34 which maintained its activity. Only in the batch produced with the protease EPg222
351 increased antiproliferative activity at 72 hours after digestión was observed.

352

353 **3.3. HLPC-ESI-MS analysis of the extracts**

354 The analysis of the low molecular weight nitrogen compounds of different batches at the
355 final ripening stage allowed detection for a total of 22 major compounds, 13 of which were
356 potentially identified (Table 2). The extracts were mainly constituted by several endogenous
357 compounds and their degradation products (6) but also small peptides (9), free amino acids (6),
358 and biogenic amines (1) from meat protein degradation. Most of the identified nitrogen
359 compounds have been reported as majority components of the NPN fraction in meat products,
360 including fermented sausages (Broncano *et al.* 2012).

361 A group of nitrogen compounds included amino acids and amines, were the most
362 abundant compounds in the extract profiles. The free amino acids Lys, Leu, Ile, Pro, Met, and
363 Phe, detected in the studied extracts, have been described as among the most abundant
364 compounds derived from proteolytic activity during the process of sausage fermentation (Benito
365 *et al.* 2005; Leggio *et al.*, 2012). The biogenic amine tyramine was also detected, which is

366 produced mainly by microbial decarboxylation of free amino acids that are formed during the
367 maturation process (Suzzi and Gardini, 2003).

368 Another group of nitrogen compounds included natural nitrogen compounds. This
369 group of compounds included as the major components carnosine (7.79–11.86% of total area).
370 This compound together carnitina were most abundant in batches before SGID. On the
371 contrary, creatine (12.44–23.526.51% of total area) was most abundant in samples after SGID.

372 Finally, the group of presumed peptides (a total of nine compounds) at the final stage of
373 ripening represented 20.8 and 17.51% of the total area for batches before and after SDGI,
374 respectively (Table 6). These percentages suggest a noticeable influence of these compounds
375 on functional activities of the extracts. The compounds with m/z 146, 277 and 159 were not
376 found in significant amounts in both sausages.

377 In order to determine the influence of the extract components on the activities studied, a
378 PCA was performed with the extract profiles of the samples obtained at the final stage of the
379 ripening process before simulation of gastrointestinal digestion *in vitro* and their antibacterial
380 and antiproliferative activities (Figures 2 and 3). Before SGID, the natural nitrogen compounds
381 and most of the presumed peptides were mainly explained by the first axis (PC 1) of the PCA.
382 These compounds were mainly linked to samples of the highly proteolytic batch
383 P200S34+EPg222, suggesting a higher proportion of NPN derived from proteolysis products in
384 the extracts of inoculated batches. In fact, the second axis (PC 2) of the PCA was defined by
385 antibacterial activities. Methionine and lysine showed a significant correlation with the
386 antiproliferative activity. Lysine was related with the antiproliferative activity and have been
387 widely used in combination with arginine and ascorbic acid, among others, to inhibit the growth
388 of cancer cell lines (Neetke et al., 2003; Roomi et al., 2005, 2006).

389 Regarding the samples after SGID, again the natural nitrogen compounds and most
390 presumed peptides were related with the first axis (PC1) of the PCA, while activities were again
391 mainly explained by the second axis (PC2) (Figure 3). In this case, also relationship between
392 the antiproliferative activity and methionine and lysine was observed. The inoculated batches
393 were related with natural nitrogen compounds, amino acids and presumed peptides, probably
394 as a consequence of the higher proteolytic activity of autochthonous microorganisms in this
395 meat product. However, the control samples were only associated with antibacterial activity.

396

397 In conclusion, the microbial population found in fermented sausages significantly
398 influences the profile of the low molecular weight nitrogen compounds and the functional
399 activities. We can conclude that starter cultures containing P200S34 and protease EPg222
400 generate extracts which cause inhibition of the growth of pathogens, making this a promising
401 tool for biocontrol in the meat industry. On the other hand, the inoculation of well-adapted starter
402 cultures with high proteolytic activity increased the antiproliferative activity of these extracts,
403 mainly due to an increase in free amino acids such as Lys and Pro, but also small peptides.

404

405 **Acknowledgements**

406 This work formed part of the Projects PDT05A037 and PDT08A062 funded by the Consejería
407 de Educación y Tecnología (Junta de Extremadura co-funded with FEDER funding). Margarita
408 Fernández received a grant from the Valhondo Calaff Foundation. The authors are grateful to
409 M. Cabrero and Juan Barneto for their technical assistance.

410

411 **References**

412 Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M.C. y
413 Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant
414 activity. *Food Research International*, 44, 1044-1051.

415

416 Ammor MS, Mayo B. 2007. Selection criteria for acid lactic bacteria to be used as functional
417 starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci* 76:138-146.

418

419 Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. y Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid
420 bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale
421 facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17(6),
422 454-461.

423

424 Bauchard C, Rémond D, Chambon C, Patureau Mirand P, Savary-Auzeloux I, Reynès C,
425 Morzel M. 2006. Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Sci* 74:658-666.

426

427 Benito MJ, Córdoba JJ, Alonso M, Asensio MA, Núñez F. 2003a. Hydrolytic activity of
428 *Penicillium chrysogenum* Pg222 on pork myofibrillar proteins. Int J Food Microbiol 89:155-161.

429

430 Benito MJ, Rodríguez M, Acosta R, Córdoba JJ. 2003b. Effect of the fungal extracellular
431 protease EPg222 on texture of whole pieces of pork loin. Meat Sci 65:877-884.

432

433 Benito MJ, Rodríguez M, Martín A, Aranda E, Córdoba JJ. 2004. Effect of the fungal protease
434 EPg222 on the sensory characteristics of dry fermented sausage "salchichón" ripened with
435 commercial starter cultures. Meat Sci 67:497-505.

436

437 Benito MJ, Rodríguez M, Córdoba MG, Andrade MJ, Córdoba JJ. 2005. Effect of the fungal
438 protease EPg222 on proteolysis and texture in the dry fermented sausage 'salchichón'. J Sci
439 Food Agr 85:273-280.

440

441 Benito MJ, Connerton IF, Córdoba JJ. 2006. Genetic characterisation and expression of the
442 novel fungal protease, EPg222 active in dry-cured meat products. Appl Microbiol Biot 73:356-
443 365.

444

445 Benito MJ, Martín A, Aranda E, Pérez-Nevado F, Ruiz-Moyano S, Córdoba MG. 2007.
446 Characterisation and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional
447 Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. J Food Sci 72:M193-201.

448

449 Benito MJ, Serradilla MJ, Martín A, Aranda E, Hernández A, Córdoba, MG. 2008a.
450 Differentiation of *Staphylococci* from Iberian dry fermented sausages by protein fingerprinting.
451 Food Microbiol 25:676-682.

452

453 Benito MJ, Serradilla MJ, Ruiz-Moyano S, Martín A, Pérez-Nevado F, Córdoba MG. 2008b.
454 Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-
455 fermented sausages. Meat Sci 80:656-661.

456

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

459

460 Borch E, Arinder P. 2002. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat
461 products, as well as control measures. *Meat Sci* 62:381–390.

462

463 Broncano, J. M., Otte, J., Petró, M. J., Parra, V. & Timón, M. L. (2012). Isolation and
464 identification of low molecular weight antioxidant compounds from fermented “chorizo”
465 sausages. *Meat Science*, **90**, 494-501.

466

467 Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD, Graves LM, Silk BJ, Mahon BE. 2013. Listeriosis
468 outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis* 19:1–9.

469

470 Casquete R, Benito MJ, Martín A, Ruiz-Moyano S, Córdoba JJ, Córdoba MG. 2011a. Role of
471 autochthonous starter culture and the protease EPg222 on the sensory and safety properties of
472 a traditional Iberian dry-fermented sausage “salchichón”. *Food Microbiol* 28:1432–1440.

473

474 Casquete R, Benito MJ, Martín A, Ruiz-Moyano S, Hernández A, Córdoba MG. 2011b. Effect of
475 autochthonous starter cultures in the production of "salchichón", a traditional Iberian dry-
476 fermented sausage, with different ripening processes. *LWT-Food Sci Technol* 44:1562–1571.

477

478 Casquete R, Martín A, Benito MJ, Ruiz-Moyano S, Pérez-Nevado F, Córdoba MG. 2011c.
479 Impact of pre-selected autochthonous starter cultures on the flavour quality of Iberian dry-
480 fermented “salchichón” sausage with different ripening processes. *J Food Sci* 76(1):S535–S544

481

482 Casquete R, Benito MJ, Martín A, Ruiz-Moyano S, Aranda E, Córdoba MG. 2012a. Use of
483 autochthonous *Pediococcus acidilactici* and *Staphylococcus vitulus* starter cultures in the
484 production of “chorizo” in 2 different traditional industries. *J Food Sci* 71(1):70–79.

485

- 486 Casquete R, Benito MJ, Martín A, Ruiz-Moyano S, Aranda E, Córdoba MG. 2012b.
487 Microbiological quality of salchichón and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages
488 from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. Food Control
489 24:191–198.
490
- 491 Cinq-Mars CD, Hu C, Kitts DD, Li-Chan ECY. 2008. Investigations into Inhibitor type and mode,
492 simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I-converting enzyme-
493 inhibitory peptides in pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. J Agr Food Chem
494 56:410–419.
495
- 496 Daroit DJ, Corrêa APF, Canales MM, Coelho JG, Hidalgo ME, Tichota DM, Risso PH, Brandelli
497 A. 2012. Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates.
498 Dairy Sci Technol 92:335–351.
499
- 500 De Ketelaere A, Demeyer D, Vandekerckhove P, Vervaeke I. 1974. Stoichiometry of
501 carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. J Food Sci 39:297–300.
502
- 503 DeMasi TW, Wardlaw FB, Dick RL, Acton JC. 1990. Non protein nitrogen (NPN) and free amino
504 acid contents of dry fermented and non-fermented sausages. Meat Sci 27:1–12.
505
- 506 Díaz O, Fernández M, García de Fernando GD, De la Hoz L, Ordóñez JA. 1993. Effect of the
507 addition of Pronase E on the proteolysis in dry fermented sausages. Meat Sci 34:205–216.
508
- 509 Díaz O, Fernández M, García de Fernando GD, De la Hoz L, Ordóñez JA. 1996. Effect of the
510 addition of Papain on the dry fermented sausages proteolysis. J Sci Food Agr 71:13–21.
511
- 512 Farber JM, Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev
513 55:476–511.
514

- 515 Ferreira V, Barbosa J, Verdeiro S, Mota A, Silva F, Monteiro MA, Hogg T, Gibbs P, Teixeira P.
516 2006. Chemical and microbiological characterisation of alheira: A typical Portuguese fermented
517 sausage with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Sci* 73:570–575.
518
- 519 Ferreira V, Barbosa J, Silva J, Felicio MT, Mena C, Hogg T, Gibbs P, Teixeira P. 2007.
520 Characterisation of alheiras, traditional sausages produced in the North of Portugal, with
521 respect to their microbiological safety. *Food Control* 18:436–440.
522
- 523 Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. 2000. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at
524 lower temperatures. *Lett Appl Microbiol* 31:385–389.
525
- 526 Flores M, Toldrá F. 2011. Microbial enzymatic activities for improved fermented meats. *Trends*
527 *Food Sci Tech* 22:81–90.
528
- 529 Foley SL, Lynne AM. 2007. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and
530 antimicrobial resistance. *J Anim Sci* 86:E173–E187.
531
- 532 Gagnaire V, Mollé D, Herrouin M, Léonil J. 2001. Peptides identified during emmental cheese
533 ripening: Origin and proteolytic systems involved. *J Agr Food Chem* 49:4402–4413.
534
- 535 Giffel MC, Beumer RR, Leijendekkers S, Rombouts FM. 1996. Incidence of *Bacillus cereus* and
536 *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiol* 13:53–58.
537
- 538 Gómez-Ruiz, J.A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M. y Recio, I. (2008). Antioxidant
539 activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS.
540 *European Food Res and Tech*, 227, 1061-1067.
541
- 542 Gong D, Kalina J, Bain MM, Wilson PW, Dunn IC. 2009. Gallin: a new antimicrobial peptide
543 from egg white. *Brit Poultry Abstr* 5(1):8–9.
544

- 545 Henriksen AP, Stahnke LH. 1997. Sensory and chromatographic evaluations of water soluble
546 fractions from dried sausages. J Agr Food Chem 45:2679–2684.
547
- 548 Hugas M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat
549 products. Meat Sci 49:S139-S150.
550
- 551 Hugas M, Monfort JM. 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chem
552 29:547–554.
553
- 554 Hugas M, Garriga M, Aymerich MT. 2003. Functionalty of enterococci in meat products. Int J
555 Food Microbiol 88:223-233.
556
- 557 Hughes MC, Kerry JP, Arendt EK, Kenneally PM, McSweeney PLH, O'Neill EE. 2002.
558 Characterisation of proteolysis during the ripening of semidry fermented sausages. Meat Sci
559 62:205–216.
560
- 561 Hsu, K.C., Li-Chan, E.C., y Jao, C.L. (2011). Antiproliferative activity of peptides prepared from
562 enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. Food
563 Chem, 126(2), 617-622.
564
- 565 Jack, R. W., Tagg, J.R. y Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol
566 Reviews, 59(2), 171-200.
567
- 568 Jang A, Jo C, Kang KS, Lee M. 2008. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of
569 synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. Food Chem 107: 327–336.
570
- 571 Johnson JL, Doyle MP, Cassens RG. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in
572 meat and meat products: a review. J Food Protect 53:81–91.
573

- 574 Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brightwell G, Tag JR. 2008. Isolation of lactic acid bacteria
575 with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat.
576 Food Microbiol 25:228–234.
577
- 578 Kaufmann SH, Earnshaw WC (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy.
579 Experimental cell research, 256 (1): 42-49.
580
- 581 Konuma H, Shinagawa K, Tokumaru M, Onoue Y, Konno S, Fujino N, Shigehisa T, Kurata H,
582 Kuwabara Y, Lopes CAM. 1988. Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and
583 meat product additives. J Food Protect 51:324–326.
584
- 585 Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides – Opportunities for
586 designing future foods. Current Pharmaceutical Desing, 9, 1297-1308.
587
- 588 Korhonen H, Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. Int Dairy J
589 16:945–960.
590
- 591 Lafarga, T. y Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products:
592 generation, functionality and application as functional ingredients. Meat Sci, 98(2), 227-239.
593
- 594 Lee JS, Rho SJ, Kim YW, Lee KW, Lee HG. 2013. Evaluation of biological activities of the
595 short-term fermented soybean extract. Food Sci Biotechnol 22:973–978.
596
- 597 Leggio, A., Belsito, E. L., Marco, R. D., Di Gioia, M. L., Liguori, A., Siciliano, C. & Spinella, M.
598 (2012). Dry fermented sausages of southern Italy: A comparison of free amino acids and
599 biogenic amines between industrial and homemade products. J Food Sci, 77, S170-S175.
600
- 601 Leroy F, De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food
602 fermentation industry. Trends Food Sci Tech 15:67-78.
603

- 604 Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage
605 fermentation. *Int J Food Microbiol* 106:270–285.
606
- 607 Lignitto L, Segato S, Balzan S, Cavatorta V, Oulahal N, Sforza S, Degraeve P, Galaverna G,
608 Novelli E. 2012. Preliminary investigation on the presence of peptides inhibiting the growth of
609 *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in Asiago d'Allevo cheese. *Dairy Sci Technol*
610 92:297–308.
611
- 612 Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland EM,
613 MacKay S. (2001). Nuclear factor- κ B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery*, 130(2), 363-
614 369.
615
- 616 Lizaso G, Chasco J, Beriain J. 1999. Microbiological and biochemical changes during ripening
617 of salchichón, Spanish dry cured sausages. *Food Microbiol* 6:219–228.
618
- 619 Lücke FA, Zangerl P. 2014. Food safety challenges associated with traditional foods in German-
620 speaking regions. *Food Control* 43:217–230.
621
- 622 Lücke FK. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci* 56:105–115.
623
- 624 Martín A, Colín B, Aranda E, Benito MJ, Córdoba MG. 2007. Characterisation of
625 Micrococcaceae isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Sci* 75:696–708.
626
- 627 Martínez Agustín O, Martínez de Victoria E. 2006. Proteínas y péptidos en nutrición enteral.
628 *Nutr Hosp* 21(2):1–14.
629
- 630 Mauriello G, Casaburi A, Blaiotta G, Villani F. 2004. Isolation and technological properties of
631 coagulase negative *Staphylococci* from fermented sausage of Southern Italy. *Meat Sci* 67:149–
632 158.
633

- 634 McEwen SA, Fedorka-Cray J. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. Clin Infect Dis
635 34(3):S93–S106.
- 636
- 637 Mine Y, Ma FP, Lauriau S. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of
638 hen egg white lysozyme. J Agr Food Chem 52:1088–1094.
- 639
- 640 Moore JE. 2004. Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats. Meat Sci
641 67(4):565–568.
- 642
- 643 Netke, S. P., Roomi, M. W., Ivanov, V., Niedzwiecki, A., & Rath, M. (2003). A specific
644 combination of ascorbic acid, lysine, proline and epigallocatechin gallate inhibits proliferation
645 and extracellular matrix invasion of various human cancer cell lines. Research Communications
646 in Pharmacology and Toxicology, 8(1/2), IV-37.
- 647
- 648 Olsen, H., Grimmer, S., Aaby, K., Saha, S. y Borge, G.I. (2012). Antiproliferative effects of fresh
649 and thermal processed green and red cultivars of curly kale (*Brassica oleracea L. acephala var.*
650 *sabellica*). J Agr Food Chem, 60, 7375-7383.
- 651
- 652 Pihlanto-Leppälä, A. y Korhonen, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. Advances in Food
653 & Nutrition Research, 47, 175-276.
- 654
- 655 Rizzello CG, Losito I, Gobbetti M, Carbonara T, De Bari MD, Zambonin PG. 2005. Antibacterial
656 activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. J Dairy Sci
657 88:2348–2360.
- 658
- 659 Rizzello CG, Cassone A, Coda R, Gobbetti M. 2013. Antifungal activity of sourdough fermented
660 wheat germ used as an ingredient for bread making. Food Chem 127:952–959.
- 661

- 662 Roomi, M. W., Ivanov, V., Kalinovsky, T., Niedzwecki, A., & Rath, M. (2005). In vitro and in vivo
663 antitumorigenic activity of a mixture of lysine, proline, ascorbic acid, and green tea extract on
664 human breast cancer lines MDA-MB-231 and MCF-7. *Medical Oncology*, 22(2), 129-138.
- 665
- 666 Roomi, M. W., Ivanov, V., Netke, S., Kalinovsky, T., Niedzwecki, A., & Rath, M. (2006). In vivo
667 and in vitro antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human
668 melanoma cell line A2058. *In vivo*, 20(1), 25-32.
- 669
- 670 Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Casquete R, Serradilla MJ, Córdoba MG. 2009. Safety
671 and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented
672 sausages. *Meat Sci* 83:460–467.
- 673
- 674 Rutherfurd-Markwick KJ. 2012. Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse
675 functions. *Brit J Nutr* 108(S2):149-157.
- 676
- 677 Rutherfurd-Markwick, K.J y Moughan, P.J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal*
678 *of AOAC International*, 88, 955-966.
- 679
- 680 Schillinger U, Geisen R, Holzapfel WH. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and
681 bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci Tech* 7(5): 158–164.
- 682
- 683 Shahidi A, Zhong B. 2008. Bioactive peptides. *J AOAC Int* 91:914–931.
- 684
- 685 Sibel Akalin A. 2014. Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical
686 uses and production proposals. *Trends Food Sci Tech* 36:79–95.
- 687
- 688 Silva RA, Lima MSF, Viana JBM, Bezerra VS, Pimentel MCB, Porto ALF, Cavalcanti MTH, Lima
689 Filho JL. 2012. Can artisanal "coalho" cheese from Northeastern Brazil be used as a functional
690 food?. *Food Chem* 135:1533–1538.
- 691

- 692 Soriano JM, Rico H, Molto JC, Manes J. 2001. *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods
693 from restaurants. *J Food Protect* 64:551–553.
694
- 695 Suzzi, G. & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review.
696 *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54.
697
- 698 Tantillo, M.G., Di Pinto, A. y Novello, L. (2002). Bacteriocin-producing *Lactobacillus sake* as
699 starter culture in dry sausages. *Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences*,
700 25(1), 45-50.
701
- 702 Udenigwe CC, Howard A. 2013. Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Res*
703 *Int* 54:1021–1032.
704
- 705 Van Netten P, Van de Moosdijk A, Van Hoesel P, Mossel DAA, Perales I. 1990. Psychrotrophic
706 strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J Appl Bacteriol* 69:73–79.
707
- 708 Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting
709 enzyme inhibitory peptides. *Brit J Nutr* 92:357–366.
710
- 711 Vioque J, Millán F. 2005. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores
712 de salud. *AgroCSIC* 26:103–107.
713
- 714 Xavier C, Gonzales-Barron U, Paula V, Estevinho L, Cadavez V. 2014. Meta-analysis of the
715 incidence of foodborne pathogens in Portuguese meats and their products. *Food Res Int*
716 55:311–323.
717
- 718 You L, Zhao M, Regestein JM, Ren J. 2010. Changes in the antioxidant activity of loach
719 (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion.
720 *Food Chem* 120:810–816.
721

722

723

724 Figure 1. Growth inhibition on Caco-2 colon adenocarcinoma cell line expressed in percentage,
725 obtained with the starter cultures and protease EPg222 at the end of ripening process, before
726 and after gastrointestinal digestion.

727 Figure 2. PC1 and PC2 (55.4% and 13.8% of explained variance, respectively) of the PCA for
728 the 'Salchichón' samples during processing. Score plot showing the detected nitrogen
729 compounds in the peptidic extracts and the antibacterial and antiproliferative activities, before
730 gastrointestinal digestion. Loading plot indicating the location of the batches analysed.

731 Figure 3. PC1 and PC2 (33.6% and 23.5% of explained variance, respectively) of the PCA for
732 the 'Salchichón' samples during processing. Score plot showing the detected nitrogen
733 compounds in the peptidic extracts and the antibacterial and antiproliferative activities, after
734 gastrointestinal digestion. Loading plot indicating the location of the batches analysed.

735

736

737 Table 1. Percent inhibition of the extracts obtained from the different batches against
 738 *Escherichia coli* CECT4267.

739

Sampling Time		60 days		90 days		P ¹
		Mean	SD	Mean	SD	
Before Digestion	Control	1.4 ± 1.73 ^a		7.2 ± 1.70 ^{a,b}		***
	P184S34	3.4 ± 0.97 ^{a,b}		4.5 ± 1.64 ^a		
	P198S34	3.5 ± 2.09 ^{a,b}		7.6 ± 1.48 ^{a,b}		*
	P200S34	6.4 ± 1.81 ^b		9.7 ± 1.93 ^{a,b,c}		**
	EPg222	5.6 ± 3.73 ^b		11.4 ± 5.92 ^{b,c}		***
	P200S34 + EPg222	0.8 ± 0.19 ^a		11.0 ± 2.57 ^{b,c}		***
After Digestion	Control	n.d.		10.8 ± 3.12 ^{b,c}		***
	P184S34	n.d.		10.2 ± 2.02 ^{b,c}		***
	P198S34	n.d.		10.4 ± 1.38 ^{b,c}		***
	P200S34	n.d.		13.6 ± 1.31 ^c		***
	EPg222	n.d.		10.8 ± 0.24 ^{b,c}		***
	P200S34 + EPg222	n.d.		12.6 ± 0.47 ^{b,c}		***

740

741 n.d.: Not detected.

742 ¹ P values for 60 an.d. 90 days of ripening: *** (P < 0.001); ** (P < 0.01); * (P < 0.05).

743 ^{a,b,c} For a given determination (column), values with different superscript letters are significantly
 744 different (P < 0.001).

745

746 Table 2. Percent inhibition of the extracts obtained from the different batches against
 747 *Salmonella choleraesuis* CECT4395.

748

		60 days		90 days		P ¹
		Mean	SD	Mean	SD	
749	Before Digestion	Control	n.d.	4.0 ± 3.82 ^a		***
		P184S34	5.4 ± 8.34 ^{a,b}	7.1 ± 1.13 ^{a,b,c}		*
		P198S34	6.9 ± 3.78 ^{a,b,c}	8.9 ± 1.01 ^{a,b,c}		
		P200S34	3.9 ± 4.77 ^{a,b}	8.5 ± 1.93 ^{a,b,c}		*
		EPg222	n.d.	8.7 ± 2.20 ^{a,b,c}		**
		P200S34 + EPg222	8.4 ± 0.22 ^{a,b,c}	7.5 ± 0.18 ^{a,b,c}		
750	After Digestion	Control	3.0 ± 3.49 ^{a,b}	9.1 ± 2.91 ^{a,b,c}		***
		P184S34	11.8 ± 1.60 ^c	11.0 ± 6.04 ^{b,c}		
		P198S34	n.d.	13.6 ± 1.68 ^c		***
		P200S34	1.0 ± 1.15 ^a	12.3 ± 3.01 ^{b,c}		***
		EPg222	n.d.	8.4 ± 0.06 ^{a,b,c}		**
		P200S34 + EPg222	9.9 ± 4.77 ^{b,c}	12.1 ± 0.17 ^{b,c}		

751

752 n.d.: Not detected.

753

754 ¹ P values for 60 and 90 days of ripening: *** (P < 0.001); ** (P < 0.01); * (P < 0.05).

755

756 ^{a,b,c} For a given determination (column), values with different superscript letters are significantly
 757 different (P < 0.001).

759

760 Table 3. Percent inhibition of the extracts obtained from the different batches against
 761 *Staphylococcus aureus* CECT976.

Sampling Time		60 days		90 days		P ¹
		Mean	SD	Mean	SD	
Before Digestion	Control	n.d.		10.2 ± 2.33 ^a		***
	P184S34	n.d.		15.9 ± 0.03 ^{a,b}		***
	P198S34	n.d.		13.2 ± 1.20 ^a		***
	P200S34	n.d.		13.7 ± 2.97 ^{a,b}		***
	EPg222	n.d.		12.5 ± 1.34 ^a		***
	P200S34 + EPg222	n.d.		15.1 ± 0.94 ^{a,b}		***
After Digestion	Control	n.d.		11.7 ± 2.40 ^a		***
	P184S34	n.d.		18.7 ± 2.15 ^b		***
	P198S34	n.d.		15.4 ± 1.40 ^{a,b}		***
	P200S34	n.d.		16.0 ± 1.77 ^{a,b}		***
	EPg222	n.d.		15.0 ± 2.83 ^{a,b}		***
	P200S34 + EPg222	n.d.		14.8 ± 1.42 ^{a,b}		***

762

763 n.d.: Not detected.

764 ¹ P values for 60 an.d. 90 days of ripening: *** (P < 0.001).

765 ^{a,b,c} For a given determination (column), values with different superscript letters are significantly

766 different (P < 0.01).

767 Table 4. Percent inhibition of the extracts obtained from the different batches against *Listeria*
 768 *monocytogenes* CECT911.

		Sampling Time		P ¹	
		60 days	90 days		
		Mean	SD	Mean	SD
Before Digestion	Control	n.d.		4.7 ± 3.97	**
	P184S34	n.d.		2.8 ± 3.91	
	P198S34	n.d.		3.1 ± 3.71	
	P200S34	n.d.		4.1 ± 3.23	*
	EPg222	n.d.		7.3 ± 2.39	**
	P200S34 + EPg222	n.d.		3.8 ± 0.73	
After Digestion	Control	n.d.		3.3 ± 2.44	*
	P184S34	n.d.		2.3 ± 0.07	
	P198S34	n.d.		2.6 ± 3.07	
	P200S34	n.d.		3.1 ± 2.97	*
	EPg222	n.d.		1.7 ± 1.13	
	P200S34 + EPg222	n.d.		n.d.	

769

770 n.d.: Not detected.

771 ¹ P values for 60 an.d. 90 days of ripening: ** (P < 0.01); * (P < 0.05).

772 Table 5. Percent inhibition of the extracts obtained from the different batches against *Bacillus*
 773 *cereus* CECT131.

Sampling Time		60 days		90 days		<i>P</i> ^a
		Mean	SD	Mean	SD	
Before Digestion	Control	n.d.		11.9 ± 3.96 ^a		***
	P184S34	n.d.		24.5 ± 2.65 ^b		***
	P198S34	n.d.		24.5 ± 1.89 ^b		***
	P200S34	n.d.		24.6 ± 2.12 ^b		***
	EPg222	n.d.		23.2 ± 1.67 ^b		***
	P200S34 + EPg222	n.d.		24.3 ± 1.82 ^b		***
After Digestion	Control	n.d.		15.2 ± 3.17 ^a		***
	P184S34	n.d.		14.6 ± 5.03 ^a		***
	P198S34	n.d.		19.5 ± 2.69 ^{a,b}		***
	P200S34	n.d.		18.7 ± 3.03 ^{a,b}		***
	EPg222	n.d.		21.1 ± 2.33 ^b		***
	P200S34 + EPg222	n.d.		22.8 ± 1.27 ^b		***

774

775 n.d.: Not detected.

776 ¹ *P* values for 60 an.d. 90 days of ripening: *** (*P* < 0.001).

777 ^{a,b,c} For a given determination (column), values with different superscript letters are significantly
 778 different (*P* < 0.001).

779

780

781

782

783

784

785

786

787 Table 6. Nitrogen compounds detected by HPLC-ESI-MS in extracts of 'salchichón' batches at the end of the ripening process.

Rt	Cd ¹	Compound	ID ²	m/z ³	Mass fragments	Before SDGI ⁴				After SDGI ⁴			
						Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD
Natural compounds						19.33				27.21			
1.9	N1	Taurine	a	126.1	109.1; 126.1	0.84	1.35	1.09	0.19	0.52	1.41	0.83	0.29
2.37	N2	Carnosine	b	227.1	227.1;210.1	7.79	11.86	10.73	1.20	5.29	9.79	7.43	1.27
2.49	N3	Anserine	b	241.1	241.1;170.1	0.74	1.39	0.98	0.17	0.00	0.18	0.09	0.06
2.54	N4	Carnitine	a	162.1	162.1	4.28	8.26	6.53	1.41	2.66	4.98	3.55	0.65
2.8	N5	Creatine	b	132.1	132.1; 115.1			n.d.		12.44	23.52	15.31	3.13
2.81	N6	Creatinine	b	114.1	114.1			n.d.				n.d.	
Amino acids and amines						35.33				55.27			
2.17	A1	Lysine	a	147.1	130.1; 147.1	1.79	7.28	5.14	1.50	6.73	12.18	9.44	1.92
2.56	A2	Proline	a	116.1	116.1	2.36	9.65	5.58	2.11	0.42	11.55	3.23	3.64
6.29	A3	Methionine	a	150.1	133; 150.1	0.72	2.45	1.64	0.56	0.33	6.36	2.26	1.59
14.1	A4	Isoleucine	a	132.1	132.1	1.17	20.25	10.87	6.21	0.00	31.40	10.94	9.35
15.24	A5	Leucine	a	132.1	132.1	1.19	23.70	18.35	6.56	0.00	34.75	18.47	9.63
16.31	A6	Tyramine	a	121.1	121.1-138.1	0.00	0.06	0.01	0.02	2.68	4.81	3.50	0.58
31.09	A7	Phenylalanine	a	166.1	120.1-166.1	3.15	7.91	4.61	1.49	0.86	9.19	7.43	2.18
Presumed peptides and other compounds						20.8				17.51			
2.1	P1	Compound 1	c	190.9	190.9; 380.9; 478.9; 614.9; 750.9	0.76	8.39	3.34	2.46	0.78	2.95	1.80	0.69
2.15	P2	Compound 2	c	118.1	118.1; 203.1	7.10	13.63	9.89	2.25	0.94	11.70	9.74	2.90
2.23	P3	Compound 3	c	365.1	365.1	0.68	3.30	1.89	0.61	0.70	4.55	2.15	1.07
3.16	P4	Compound 4	c	146.1	146.1			n.d.				n.d.	
3.36	P5	Compound 5	c	277.1	227.1; 407.1; 504.1			n.d.				n.d.	

788	4.7	P6	Compound 6	c	124.1	124.1	0.00	1.91	0.16	0.55	0.00	2.33	1.55	0.57
	5.63	P7	Compound 7	c	159.1	159;1 295.1				n.d.				n.d.
789	5.93	P8	Compound 8	c	137.1	137.1	2.66	11.12	5.15	2.44	0.00	2.33	1.55	0.57
	7.28	P9	Compound 9	c	205.1	204.1	0.26	0.56	0.37	0.10	0.00	1.04	0.72	0.25

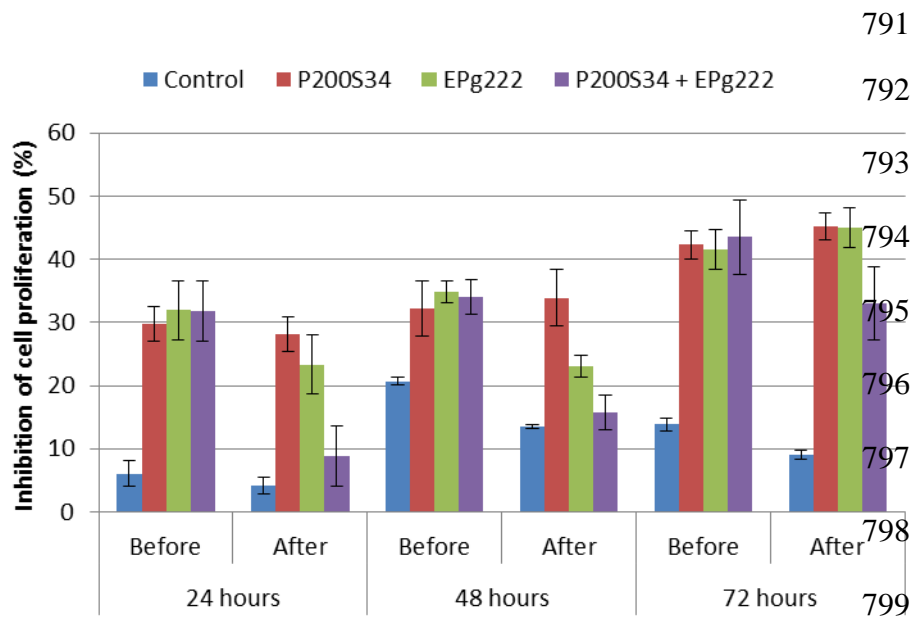
¹Code used in PCA analysis

²Identification levels: a: Standard; b: data base mass bank (<http://www.massbank.jp>); c: unidentified compound.

³The most abundant fragment ions.

⁴Values expressed in percentage of the main fragment ions of the nitrogen compounds detected.

790 Figure 1.



800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815

816 Figure 2.

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

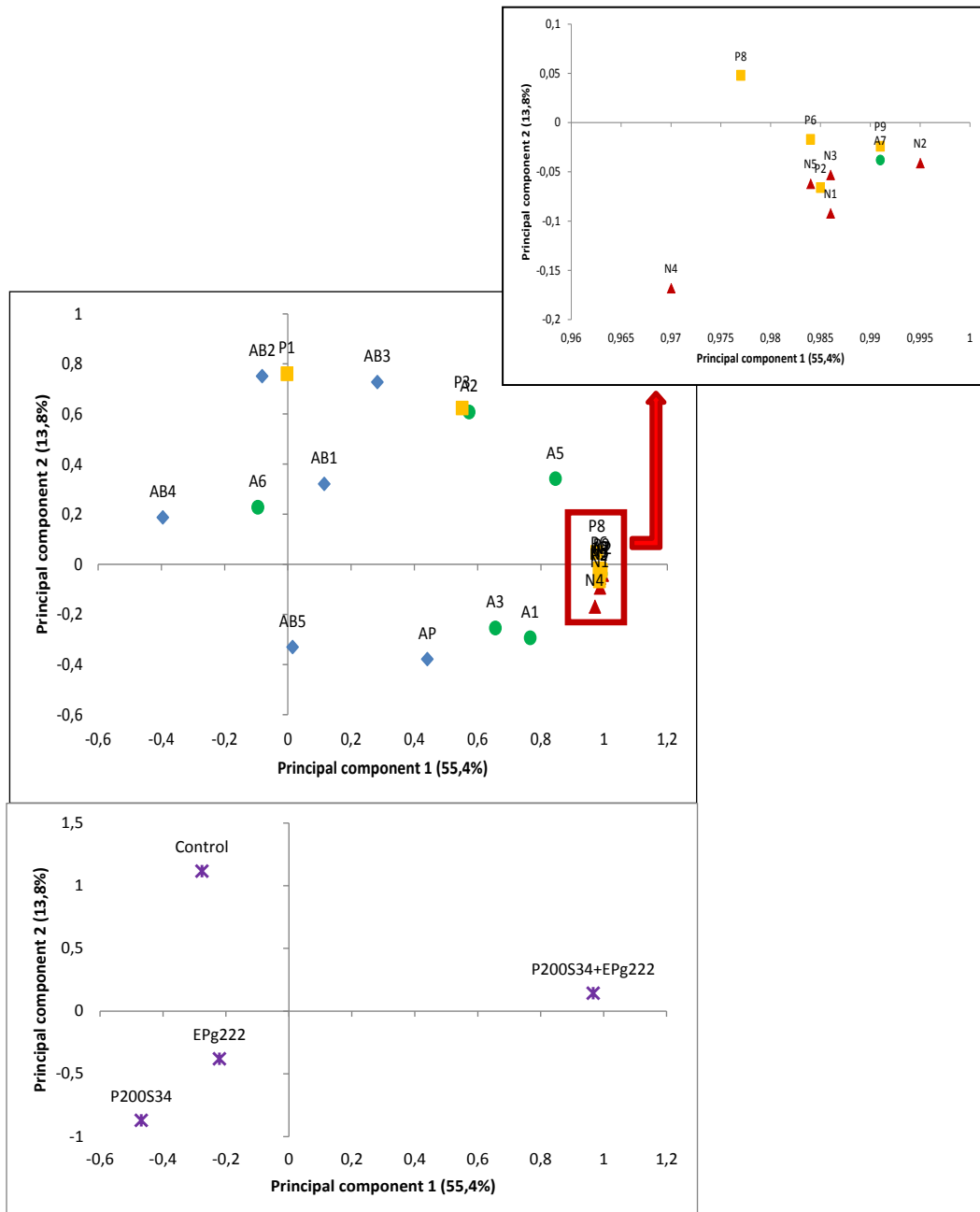
837

838

839

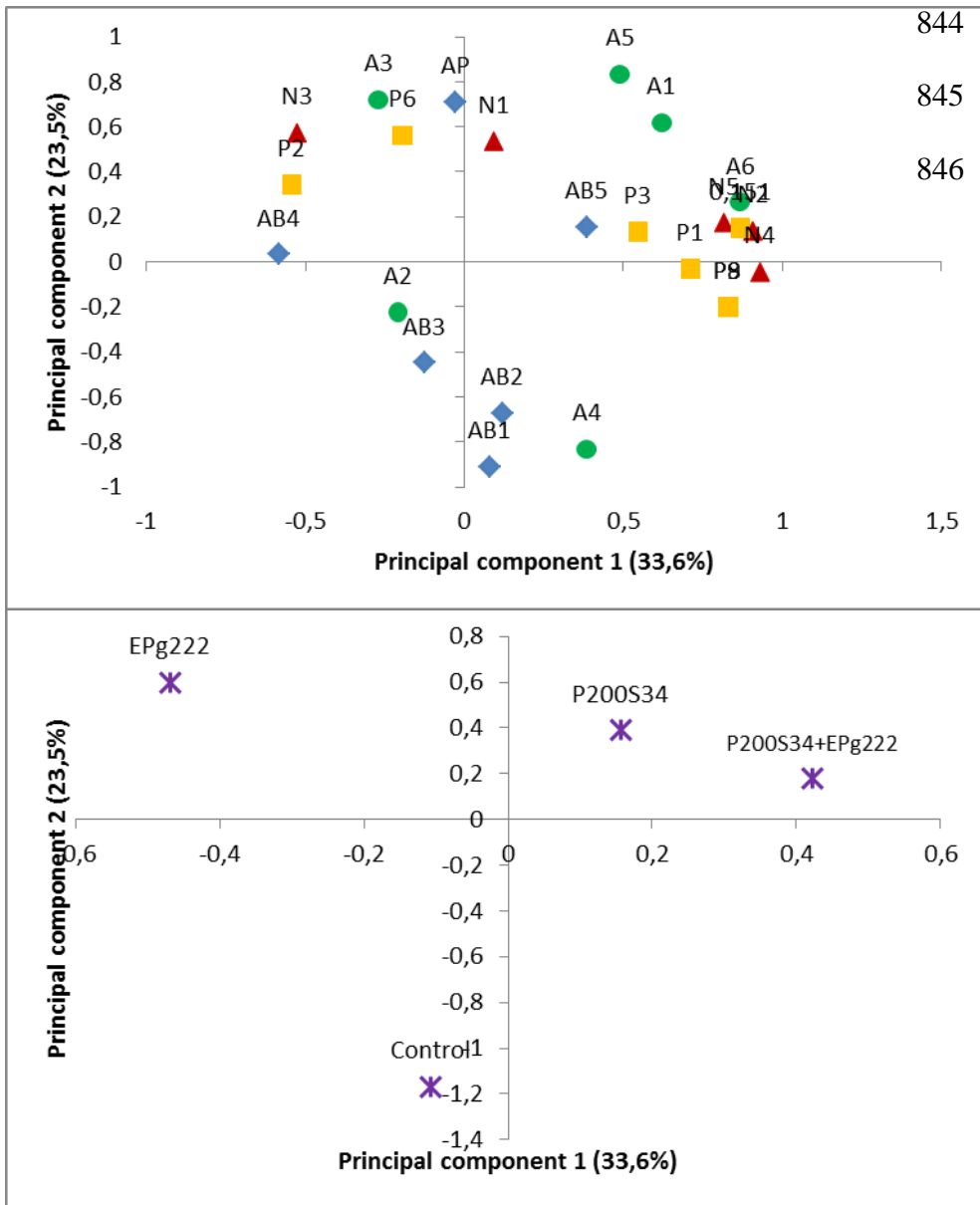
840

841



842 Figure 3.

843



V.- DISCUSIÓN

V.1.- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LOS EMBUTIDOS ELABORADOS

V.1.1.- Humedad

A lo largo de la maduración de los embutidos se produjo un descenso paulatino de la humedad de forma similar en todos los lotes elaborados, no produciéndose diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los lotes inoculados con cultivos iniciadores y los controles (Casquete, 2011). En todos los casos, la reducción de la humedad se produjo desde niveles iniciales del 60-65% hasta niveles del 20-30%. La evolución de la pérdida de humedad que sufrieron las muestras del presente estudio, fue similar a los niveles observados por Casaburi y col., (2008) y Franco y col., (2002), siendo estos valores normales para este tipo de embutidos.

V.1.2.- Actividad de agua

De forma paralela al descenso de la humedad, se pudo apreciar una disminución paulatina en el contenido de a_w durante el proceso de elaboración de los embutidos, tanto en los lotes inoculados con cultivos iniciadores, como en los controles, no mostrando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). En los chorizos, los valores descendieron desde 0,95 hasta valores próximos a 0,80 al final de la maduración mientras que en los salchichones se produjo un descenso desde niveles iniciales de 0,96 hasta un rango entre 0,82-0,86 al final del procesado (Casquete, 2011). Por otro lado, en el ensayo con la proteasa EPg222 en la industria 2, se apreció una disminución paulatina en el contenido de a_w durante el proceso de elaboración en todos los lotes elaborados, desde niveles iniciales de 0,95 hasta un rango de 0,81-0,84 al final del procesado, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($P < 0,05$) (Casquete, 2011).

Los valores de actividad de agua obtenidos en los chorizos y salchichones fueron similares a los citados por Casaburi y col., (2008) y Rubio y col., (2008) que llegaron a niveles finales entre 0,85-0,86 y 0,80-0,83 respectivamente.

V.1.3.- pH

La evolución del pH de los embutidos elaborados con el procesado corto durante el presente estudio no mostró diferencias significativas entre los lotes de los distintos productos, chorizos y salchichones, excepto para las muestras de salchichón inoculadas con el cultivo iniciador P200S34. Este lote comenzó con niveles de pH de 6,3 y a partir de la primera semana del procesado fue descendiendo hasta valores de 5,3. Después de los 25 días de maduración, se apreció una estabilización e incluso un ligero aumento hasta el final del procesado. Sin embargo, el resto de los lotes de ambos embutidos elaborados mostraron un descenso de pH menos acusado, desde valores próximos a 6 hasta alcanzar valores de 5,8 - 5,7 al final de la maduración (Casquete, 2011).

Varios autores han constatado una evolución similar a los niveles de pH de los salchichones elaborados con el cultivo iniciador P200S34 (Benito y col., 2004, 2007; González-Fernández y col., 2006; Martín y col., 2007; Roseiro y col., 2008). Además, el incremento del pH al final del procesado es consecuencia de la intensa actividad proteolítica desarrollada por los microorganismos, como ha sido puesto de manifiesto por varios autores (Ansorena y col., 2002; Astiasarán y col., 1993). Casaburi y col., (2007) reseñaron niveles similares a los observados en el resto de los embutidos.

En el caso de los salchichones elaborados con el procesado largo, en el ensayo llevado a cabo con la proteasa EPg222, la evolución del pH fue similar en todos los lotes. Durante la primera semana del procesado, el lote P200S34 sufrió un descenso de pH significativamente mayor que el resto de los salchichones, lo cual está relacionado con un mayor desarrollo de las BAL inoculadas en este lote (Casquete, 2011). Posteriormente, el pH disminuyó hasta valores de 4,8 a los 76 días de maduración en todas las muestras, excepto el lote EPg222 que llegó a valores de 5,2. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron al final del periodo de maduración tras sufrir el pH un aumento significativo alcanzando valores en torno a 5,8. Varios autores han constatado los valores de pH finales obtenidos (Benito y col., 2004, 2007; Casaburi y col., 2007; Martín y col., 2007), que son normales para este tipo de productos.

Casquete (2011) observó una correlación negativa entre los valores de pH encontrados en los embutidos elaborados para este estudio y los recuentos de bacterias ácido lácticas, lo

cual indica que la evolución de pH observada está relacionada con el crecimiento de la población láctica inoculada como cultivo iniciador durante la elaboración de este tipo de productos, ya que estas bacterias contribuyen a la producción de ácido láctico. Esto se cumple de manera clara en los embutidos de salchichón inoculados con el *P. acidilactici* MS200.

V.2.- DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

V.2.1.- Recuento de bacterias ácido lácticas

Al inicio de la maduración, en los salchichones elaborados en la industria 1 se pudo observar como los lotes inoculados con cepas autóctonas presentaron valores en torno a 7 log ufc/g, valores superiores ($P < 0,05$) que los encontrados en el lote control, que mostró recuentos entre 4 y 5 log ufc/g. Durante las primeras fases del procesado, los lotes inoculados con cepas autóctonas mostraron un crecimiento significativamente más elevado que el control, siendo este crecimiento más acusado en el lote P200S34 ya que a los 15 días presentó valores de 9,5 log ufc/g, significativamente mayores que el resto de las muestras. Posteriormente, la evolución de las BAL mostró un ligero descenso para mantenerse hasta el final del procesado en torno a niveles de 7,2 log ufc/g en todos los lotes (Casquete, 2011; Casquete y col., 2012a).

En el inicio del proceso de elaboración de los chorizos, los lotes inoculados presentaron valores en torno a 8 log ufc/g, sin embargo, en los controles se observaron recuentos menores, con valores entre 4 y 5 log ufc/g. Los recuentos de los lotes inoculados se mantuvieron durante todo el proceso con niveles comprendidos entre 8 log ufc/g y 7 log ufc/g, mientras que en el control los recuentos fueron más bajos, en torno a 6 log ufc/g.

Casquete (2011) constató que las cepas de BAL inoculadas se implantan y desarrollan en ambos embutidos, siendo la cepa de *P. acidilactici* MS200 la que mejor se adaptó.

En cuanto al ensayo realizado con la proteasa EPg222 en la industria 2, los recuentos de BAL sufrieron una evolución similar en todas las muestras. Al inicio del proceso de elaboración, los lotes inoculados con cultivos iniciadores presentaron valores en torno a 7 log ufc/g mientras que el control y el lote EPg222 tuvo niveles de 5 log ufc/g. A los 15 días del procesado, todos los lotes elaborados, incluyendo tanto el lote control como el EPg222,

alcanzaron valores en torno a 9 log ufc/g, disminuyendo ligeramente estos niveles hasta valores de 8 log ufc/g al final de la maduración.

La evolución de los recuentos de BAL observados en los lotes inoculados en nuestro trabajo ha sido citada en la mayoría de la bibliografía consultada en embutidos fermentados inoculados con cultivos iniciadores (Baka y col., 2011; Casaburi y col., 2007, 2008; González y Díez, 2002; Talon y col., 2008). Por otro lado, la evolución de los recuentos de BAL observados para los controles de los salchichones fue similar a las reseñadas en estudios (Benito y col., 2004, 2007; Drosinos y col., 2005) de embutidos con un procesado tradicional, sin cultivos iniciadores. Así mismo, los niveles en los recuentos de las BAL obtenidos en el lote control de los chorizos, así como en el control del ensayo con la proteasa EPg222 y en el lote inoculado con la proteasa EPg222, han sido descritos en embutidos sin inocular por diferentes autores (Benito y col., 2004; Cocolin y col., 2001; Comi y col., 2005; Lebert y col., 2007).

El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA muestra la presencia de *P. acidilactici* MS198 y *P. acidilactici* MS200 entre las BAL predominantes en los lotes inoculados hasta el final del procesamiento (Casquete, 2011).

V.2.2.- Recuento de cocos gram + catalasa +

En los salchichones elaborados en la industria 1, los recuentos de cocos gram + catalasa + en agar MSA durante las primeras horas del procesado oscilaron entre 6,4 - 6,7 log ufc/g en los lotes inoculados con los cultivos iniciadores y entre 4,3 y 5,3 log ufc/g en el lote control. El crecimiento en las primeras etapas de maduración fue muy acusado, llegando a niveles de 7,8 log ufc/g. Al final del procesado, tanto en lotes inoculados como en los controles los valores descendieron hasta niveles finales entre 4 y 5 log ufc/g (Casquete, 2011).

Estos valores fueron similares a los descritos por Hierro y col., (1997) que obtuvieron los máximos recuentos cercanos a 8 log ufc/g en los 2 y 7 días del procesado en lotes inoculados con *Staphylococcus* spp., mientras que en el control los valores máximos no pasaron de 6 log ufc/g.

Durante las primeras horas del procesado de los chorizos, y al igual que en los salchichones, los recuentos de cocos gram + catalasa + oscilaron entre 6,4 – 6,7 log ufc/g, niveles superiores a los encontrados en el control (entre 4,2 y 5,2 log ufc/g). Sin embargo, en este caso los recuentos no descendieron al final de la maduración como ocurrió en los salchichones, sino que los recuentos en todos los lotes se mantuvieron en niveles de 6,5 log ufc/g (Casquete, 2011).

Los recuentos en medio MSA observados en estos chorizos, fueron similares a los descritos por Bover-Cid y Holzapfel (1999) y Casaburi y col., (2007) que obtuvieron en embutidos inoculados recuentos en MSA de 6 log ufc/g durante todo el procesado.

En las muestras elaboradas en la industria 2 mediante el ensayo con la proteasa EPg222, de modo similar a como ocurre con las bacterias ácido lácticas, los recuentos al inicio del procesado oscilaron alrededor de 7 log ufc/g en los lotes inoculos con cultivos iniciadores, siendo estos valores significativamente mayores que los encontrados en los lotes control y EPg222. A lo largo del procesado, los recuentos aumentaron, siendo este aumento significativamente mayor en los lotes inoculados (P200S34 y P200S34+EPg222), llegando a niveles entre 8 y 9 log ufc/g. Posteriormente, los valores descendieron en los lotes inoculados con estas cepas hasta el final del procesado entre valores de 6 y 7 log ufc/g. En cambio, en los lotes EPg222 y control el descenso fue de manera más marcada llegando a niveles entre 4 y 6 log ufc/g al final de la maduración, observándose diferencias significativas entre el lote control y los lotes inoculados (Casquete, 2011).

La evolución de los recuentos observada en los controles fue similar a la encontrada por Drosinos y col., (2005) y Mauriello y col., (2004).

Con respecto al análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, este evidenció la implantación de *S. vitulus* RS34 en los lotes inoculados (Casquete, 2011).

V.3.- DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO NO PROTEICO (NNP) Y AMINOACÍDICO (NA).

V.3.1.- Cuantificación del nitrógeno no proteico (NNP)

Los resultados obtenidos para el NNP de los salchichones estudiados, mostraron las concentraciones más elevadas de NNP al inicio del procesado, con valores entre 3,9-4,3 mg/g. Dichas concentraciones no presentaron muchas variaciones a lo largo del procesado, observándose una tendencia a disminuir, con concentraciones finales entre 3,0 y 4,1 mg/g (Casquete, 2011, 2011b).

Al igual que ocurre en los salchichones, los chorizos estudiados no mostraron variaciones significativas en las primeras etapas del proceso de maduración. En estas fases presentaron las concentraciones máximas con valores entre 4,6 y 7,1 mg/g. Estas concentraciones van disminuyendo a partir de los 20 días del procesado de manera significativa en el control llegando a valores de 3,9 (Casquete, 2011, 2012b).

El hecho de que al inicio del procesado se encuentren las concentraciones máximas, están en consonancia con la reducción de proteínas miofibrilares en este periodo de la maduración encontrado por Casquete (2011), ya que otros estudios muestran que la proteólisis va seguida de un incremento en el contenido de NNP durante el proceso de fermentación de los productos cárnicos fermentados (Astiasarán y col., 1993; DeMasi y col., 1990; García de Fernando y Fox, 1991; Hughes y col., 2002). Además, el incremento de la concentración del NNP hasta los 20 días de maduración ha sido puesto de manifiesto por Lois y col., (1987). León y col., (1978) partieron de valores iniciales de 4,66 g NNP/100 g de materia seca observaron un aumento progresivo del NNP hasta el día 16 de maduración, donde se alcanzaron los máximos valores para descender posteriormente.

Los valores finales de NNP obtenidos, entre 3,9 y 4,7 mg/g en los salchichones y entre 3,0 y 4,1 mg/g en los chorizos, fueron inferiores a los encontrados por Roseiro y col., (2010) que obtuvieron 10 mg NNP/g de extracto seco a los tres meses de maduración y a los descritos por Benito y col., (2004) que a los cuatro meses de maduración observaron niveles entre 4 y 6 mg NNP/g de extracto seco. Estas diferencias encontradas en los niveles de NNP

podrían estar relacionadas con el grado de picado de la materia prima. Cid y col., (1992) señalan que los productos con un grado más intenso de picado de la materia prima sufren un mayor aumento del NNP durante la curación que los productos que mantienen más íntegra la estructura de su tejido muscular. La rotura de las fibras facilita la actuación de las enzimas proteolíticas endógenas produciendo cambios más intensos en la proteólisis (Toldrá y col., 2000).

Esta evolución del NNP encontrada en los embutidos del presente estudio no coincide con las descritas por otros autores (Benito y col., 2004,2005b; Candogan y col., 2009; Roseiro y col., 2008, 2010) que obtuvieron un incremento a medida que se desarrollaba la maduración tanto en embutidos elaborados de forma tradicional como en embutidos inoculados con cultivos iniciadores.

Por el contrario, en la industria 2, en los salchichones elaborados en el ensayo con la proteasa EPg222 con el procesado largo, los niveles del NNP no mostraron grandes variaciones durante las primeras etapas del procesado, presentando concentraciones entre 3 y 4 mg NNP/g extracto seco hasta los 20 días de maduración. Posteriormente, estos niveles aumentaron hasta valores comprendidos entre 5 y 6 mg/g al final de la maduración. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los lotes, si se apreció un aumento más acusado de los valores de NNP en los lotes inoculados con cepas (P200S34 y P200S34+EPg222) con respecto al lote control. Benito y col., (2004) obtuvieron concentraciones de 4 y 6 mg NNP/g de extracto seco a los cuatro meses de maduración.

V.3.2.- Cuantificación del nitrógeno aminoacídico (NA)

En cuanto al nitrógeno aminoacídico (NA) de los lotes de salchichones elaborados en la industria 1, se observó que todos presentaron una evolución de la fracción del NA similar. Las concentraciones de las muestras inoculadas fueron incrementándose progresivamente desde valores entre 0,3 y 0,8 mg/g hasta niveles comprendidos entre 3,5 y 3,8 mg/g, cantidades significativamente superiores a las encontradas en el lote control (Casquete, 2011, 2011b).

Lo mismo ocurrió en los chorizos elaborados, en los cuales se observó que todas las muestras sufrieron un incremento progresivo desde valores entre 0,92 y 2,67 mg/g hasta niveles entre 2,24 y 3,85 mg/g al final de la maduración (Casquete, 2011, 2012b).

El incremento de la concentración del NA a medida que se desarrolla la maduración ha sido puesto de manifiesto por numerosos autores (Franco y col., 2002; Mateo y col., 1996; Salgado y col., 2005), que observaron mayores concentraciones en las primeras etapas, para posteriormente los niveles permanecer más o menos estables hasta el final de la maduración. Los valores finales de NA obtenidos están dentro del rango a los encontrados por Salgado y col., (2005) que observaron niveles de 1,22 y 3,44 mg NA/g de materia seca en lotes de procesado industrial y tradicional, respectivamente.

Los valores máximos de producción de aminoácidos libres coinciden con el periodo de fermentación de los embutidos, dado que se produce un intenso metabolismo de los carbohidratos y el máximo crecimiento microbiano (García de Fernando y Fox, 1991; Nishimura y col., 1988; Ordóñez y col., 1999).

La fracción del NA de los salchichones elaborados en el ensayo con la proteasa EPg222, fue aumentando progresivamente desde valores entre 1 y 2 mg NA/g de extracto seco hasta niveles superiores a 3 mg/g al final de la maduración, siendo éstos sus valores máximos en esta etapa y no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Sin embargo, si se apreció un aumento superior de los niveles del NA en el lote EPg222 desde la primera semana del procesado. Los valores finales de NA obtenidos fueron similares a los reseñados en estudios previos (Ruíz-Moyano y col., 2011; Salgado y col., 2005), estos autores encontraron valores de NA superiores a 3 mg NA/g extracto seco.

V.4.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS

Los fenómenos de proteólisis que tienen lugar en la elaboración de los productos cárnicos fermentados se ven influenciados, entre otros factores, por los cultivos iniciadores utilizados (Hughes y col., 2002). Numerosos autores han descrito el papel que juegan los microorganismos durante la maduración de los embutidos fermentados tradicionales y sus características sensoriales (Berdagué y col., 1993; Casaburi y col., 2008; Engelvin y col.,

2000; Olesen y Stahnke, 2000; Stahnke y col., 2002; Tjener y col., 2004). Concretamente, la actividad proteolítica sobre las proteínas de la carne ha sido descrita para numerosas cepas de bacterias ácido lácticas y los estafilococos (Casaburi y col., 2008), siendo estos los microorganismos más usados comúnmente en la elaboración de productos cárnicos fermentados (Ammor y Mayo, 2007; Benito y col., 2007; Leroy y De Vuyst, 2004; Martín y col., 2007).

Debido a esto, los cultivos iniciadores utilizados para la elaboración de nuestros embutidos fueron seleccionados por sus buenas propiedades tecnológicas, su acción proteolítica frente a las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas, su moderada actividad lipolítica sobre la carne de cerdo así como la baja o nula producción de aminas biógenas (Benito y col., 2007, 2008; Casquete y col., 2011b, c; 2012a, b, c; Martín y col., 2007). Además, estos microorganismos han sido propuestos por Talón y Leroy (2011) para el estatus de presunción cualificada de seguridad (QPS) debido a su nula o baja producción de toxinas, aminas biógenas y resistencia a antibióticos.

Para la determinación de la concentración de compuestos nitrogenados en los extractos obtenidos de los embutidos elaborados con los distintos cultivos iniciadores se utilizó el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA). Smith y col. (1985) demostraron que, comparado con el método de Lowry y col. (1951), este método muestra una gran tolerancia hacia las interferencias más comunes encontradas a la hora de la determinación de la concentración de proteínas y péptidos. Además, el método del BCA mantiene la alta sensibilidad y la baja variabilidad proteína a proteína que se asocian al método de Lowry. Por otro lado, para la cuantificación de proteínas no glicosiladas, como es el caso de nuestros compuestos nitrogenados, es más fiable el método BCA que el Bradford (Fountoulakis y col., 1992).

Tras realizar el análisis de los extractos obtenidos a partir de los chorizos elaborados en el presente estudio, se pudo apreciar que no existió un aumento significativo de la concentración de compuestos nitrogenados a lo largo de la maduración de los distintos lotes elaborados (Figura V.1). A pesar de no producirse un aumento a lo largo de la maduración, las concentraciones de compuestos nitrogenados encontradas en los chorizos tuvieron valores más elevados del estudio, oscilando durante todo el proceso de elaboración de los embutidos entre 2.000 y 3.000 $\mu\text{l/ml}$.

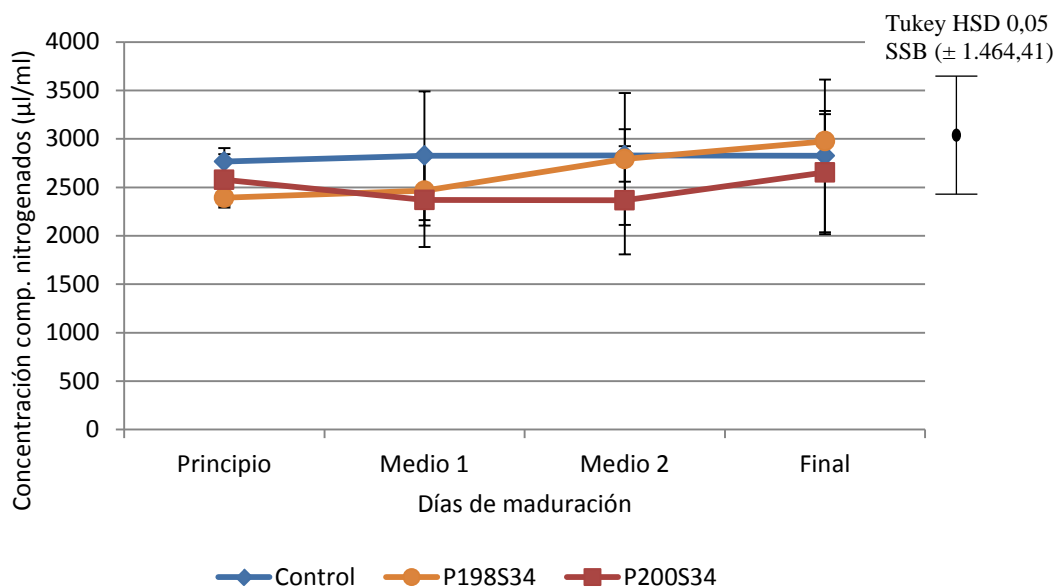


Figura V.1- Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados menores de 5 KDa a lo largo de la maduración de los chorizos, medidos mediante el método del ácido bicinconínico (BCA).

Al contrario que sucedió en los chorizos, en los salchichones sí se observó un aumento significativo en la concentración de compuestos nitrogenados a lo largo de la maduración, tanto en los controles como en los lotes inoculados con cultivos iniciadores (Figura V.2).

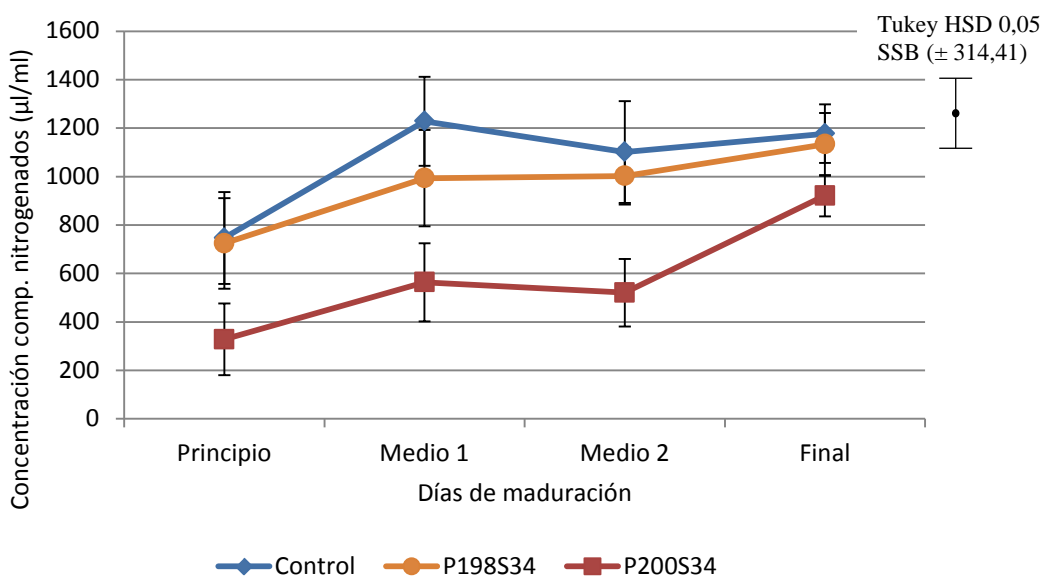


Figura V.2- Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados menores de 5 KDa a lo largo de la maduración de los salchichones, medidos mediante el método del ácido bicinconínico (BCA).

Cabe destacar el aumento significativo que se produjo en el lote inoculado con el cultivo iniciador P200S34, que presentó una concentración de compuestos nitrogenados de 327,89 $\mu\text{l/ml}$ al inicio de la maduración y aumentó hasta valores de 921,42 $\mu\text{l/ml}$ al final de la misma. Esta cepa de *P. acidilactici* fue la que mejor adaptación presentó durante la maduración de salchichones elaborados por Casquete y col. (2011b). Además, su uso junto al *S. vitulus* RS34, mostró los mejores resultados en la producción tradicional de embutidos curados, manteniendo sus características sensoriales típicas a la vez que mejoraba su homogeneidad y seguridad (Casquete y col., 2011a). Asimismo, el alto grado de proteólisis presentado por el lote elaborado con el cultivo iniciador P200S34 también es debido a la actividad de las proteasas microbianas presentes en dicho cultivo iniciador (Benito y col. 2007; Casquete y col., 2011a, b; Martín y col., 2007). A pesar de este aumento, este lote presentó una concentración de compuestos nitrogenados significativamente menor que el lote control y el lote inoculado con el cultivo iniciador P198S34. Ambos lotes no presentaron diferencias entre ellos y su concentración de compuestos nitrogenados varió desde valores de 720-750 $\mu\text{l/ml}$ al inicio de la maduración y 1100 y 1200 $\mu\text{l/ml}$ al final de la misma. Estos datos difieren de los observados por Casquete y col. (2011b), en cuyo estudio observó que no existían diferencias significativas en los valores de NA, al final de la maduración, entre el lote control y los embutidos inoculados con cultivos iniciadores autóctonos.

Unos valores tan bajos de compuestos nitrogenados en los extractos obtenidos a partir de los salchichones, en relación a los que se observaron en los chorizos, se explicaría debido a que los patrones de proteólisis que tienen lugar durante la maduración de los productos cárnicos fermentados se ven influenciados por variables como es la composición inicial de los ingredientes utilizados, así como los cultivos iniciadores adicionados (Hughes y col., 2002). Bergarmini y col., (2006) demostraron que el uso de distintas bacterias ácido lácticas influían de manera diferente en la proteólisis producida en la maduración de quesos. En embutidos, Aro Aro y col., (2010) estudiaron el efecto de varios cultivos iniciadores sobre la proteólisis durante la maduración de productos cárnicos fermentados, señalando que los cultivos iniciadores compuestos por la combinación de cepa de bacteria ácido láctica y un estafilococo, frente a las cepas por separado, fueron los que mayor grado de proteólisis produjeron. Otros autores también han llegado a la conclusión de que la combinación de ambas cepas de bacterias producen mayores grados de proteólisis en productos cárnicos fermentados (Casaburi y col., 2008; Dalmis y Soyer., 2008).

La actividad proteolítica sobre las proteínas de la carne que se ha descrito *in vitro* para cepas de bacterias ácido lácticas y estafilococos (Casaburi y col., 2005; Drosinos y col., 2007; Fadda y col., 1999a, b; Mauriello y col., 2002, 2004; Rodríguez y col., 1998) conduce a la hipótesis de que las peptidasas bacterianas son necesarias para la hidrólisis completa de los oligopéptidos presentes en la carne. La liberación de aminoácidos, así como de otros compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, a partir de proteínas y péptidos mediante la proteólisis que tiene lugar durante la maduración, se ha atribuido a la acción de enzimas bacterianas, además de a las enzimas endógenas de la carne (Verplaetse, 1994; Hughes y col., 2002; Casaburi y col., 2007, 2008). Los péptidos generados por las enzimas endógenas durante la proteólisis muscular pueden ser absorbidos por las bacterias y convertidos en aminoácidos y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (Leroy y col., 2006). Además, cabe destacar que la diferencia en el contenido de los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular encontrados al final de la maduración se debe a los cultivos iniciadores utilizados (Aro Aro y col., 2010; Cardogan y col., 2009; Casaburi, 2008).

En los lotes de salchichones elaborados durante el ensayo con la proteasa EPg222, también se observó un incremento en la concentración de los compuestos nitrogenados durante la maduración de los embutidos (Figura V.3), la cual alcanzó su máximo valor a partir de los 65 días de maduración.

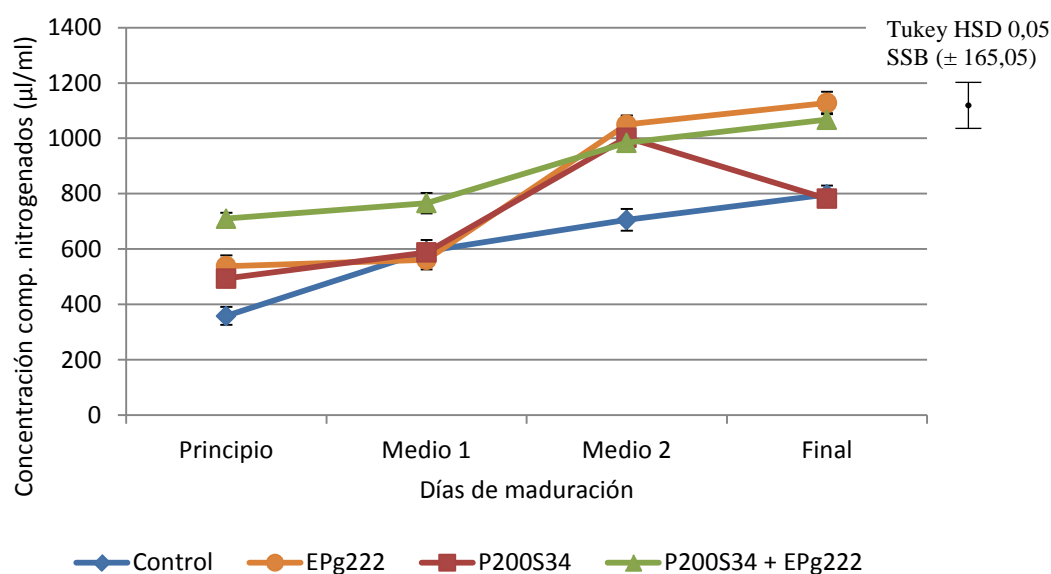


Figura V.3- Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados menores de 5 KDa a lo largo de la maduración de los salchichones elaborados en el ensayo con la proteasa EPg222, medidos mediante el método del ácido bicinconínico (BCA).

A partir de este momento, en el lote inoculado con el cultivo iniciador P200S34 se produjo una disminución de la concentración de compuestos nitrogenados. Esto se debe a que los microorganismos del cultivo iniciador metabolizan péptidos pequeños durante las últimas fases de la maduración (Bover-Cid y col., 2001a, b; Ordoñez y col., 1999; Sekikawa y col., 2003). Numerosos autores han puesto de manifiesto, que aunque la proteólisis en los productos cárnicos fermentados se debe principalmente a la acción de las catepsinas, que son las responsables de la descomposición de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares, las enzimas microbianas son más importantes durante las últimas etapas de la maduración (Hugas y Monfort, 1997; Hughes y col., 2002; Lizaso y col., 1999; Molly y col., 1997; Sanz y col., 1999).

Por otro lado, los lotes con la proteasa EPg222, con o sin el cultivo iniciador, mantuvieron la cantidad de compuestos nitrogenados hasta el final de la maduración debido a la actividad adicional de la proteasa. La capacidad de una gran variedad de proteasas microbianas para acelerar la proteólisis durante la maduración de los productos cárnicos fermentados ha sido estudiada por numerosos autores (Díaz y col., 1993, 1997; Fernández y col., 2000; Naes y col., 1995; Zapelena y col., 1997, 1999). Así, la mayor proteólisis producida por el uso de proteasa exógenas durante la maduración de productos cárnicos crudos curados ha sido demostrada en el caso de la pronasa E (Díaz y col., 1993, 1997) o la neutrasa procedente de *Bacillus subtilis* (Zapelena y col., 1997), entre otras. Todos estos datos están en concordancia con los obtenidos por Casquete y col. (2011a), en cuyo estudio encontraron que el uso de cultivos iniciadores y la proteasa EPg222 producían un incremento en la cantidad de nitrógeno no proteico (NNP) al final de la maduración de los embutidos, siendo el lote inoculado con EPg222 el que mostró el mayor valor de NNP.

De este modo, al final de la elaboración de los embutidos, se obtuvieron extractos cuyos valores se encontraban entre 782,17 y 1176,83 $\mu\text{l/ml}$ en los salchichones, y entre 2650,89 y 2975,33 $\mu\text{l/ml}$ en los chorizos (Figura V.4). Como se ha comentado anteriormente, el hecho de que la concentración encontrada en los chorizos sea significativamente superior ($P < 0,05$) a la presente en los salchichones, se debe a la diferente composición que tienen ambos tipos de embutido (Hughes y col., 2002), así como al grado de picado de la materia prima (Cid y col., 1992; Toldrá y col., 2000), ya que ambos factores influyen en el patrón de proteólisis que tiene lugar durante la maduración.

Al observar la concentración obtenida con cada cultivo iniciador, se pudo comprobar que en los chorizos, no aparecían diferencias significativas entre las cantidades de compuestos nitrogenados obtenidos en el lote control y los lotes inoculados con los cultivos iniciadores. Sin embargo, en los salchichones el lote inoculado con el cultivo iniciador P200S34 mostró una concentración de compuestos nitrogenados menor que el resto de lotes de salchichones. Por otro lado, en el ensayo llevado a cabo con la proteasa EPg222, destacaron los lotes inoculados con la proteasa EPg222 y la combinación de esta con el cultivo iniciador P200S34, ya que ambos presentaron concentraciones de compuestos nitrogenados significativamente más altas que el resto de los lotes elaborados. Esto se debe a la actividad exopeptidasa de la enzima EPg222, la cual también es responsable del incremento en la generación de NA durante la maduración de lomo de cerdo y embutidos que contenían la enzima EPg222 (Benito y col., 2003a, 2004). Además de la actividad de la enzima, la alta concentración de compuestos nitrogenados producida por el lote P200S34+EPg222 también se deben al efecto de las proteasas procedentes del cultivo iniciador (Benito y col., 2007; Martín y col., 2007).

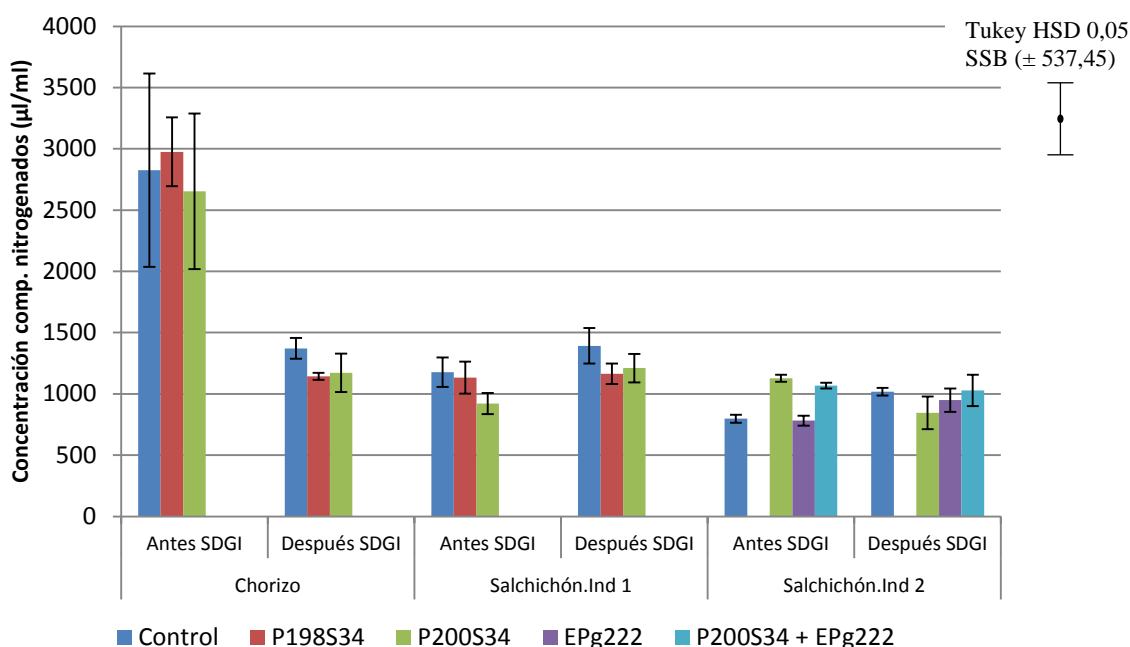


Figura V.4- Concentración de compuestos nitrogenados menores de 5 KDa al final de la maduración de los embutidos, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal in vitro (SDGI).

Es importante conocer cómo se comportan los compuestos nitrogenados presentes en los extractos de nuestro estudio tras la simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal ya que, para que los compuestos nitrogenados con funciones bioactivas liberados durante la maduración de los embutidos puedan ejercer su actividad, deben ser liberados de las proteínas en las que se encuentran, superar la acción de las proteasas gástricas e intestinales y han de poder atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea (Korhonen y Pihlanto, 2003; Meisel, 2004; Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Vermeirssen y col., 2004). Por lo tanto, la aplicación de modelos de digestión *in vitro* es un paso necesario para estudiar la liberación de péptidos potencialmente bioactivos a partir de proteínas de alimentos e identificar las secuencias más interesantes (Bax y col., 2013; Bordoni y col., 2014; Storcksdieck y col., 2007). Los modelos que, como el nuestro, son modelos simplificados basados en el uso de enzimas gástricas y duodenales con el pH típico de cada ambiente, han sido ampliamente utilizados (Alemán y col., 2013; Escudero y col., 2010; Hernández-Ledesma y col., 2004).

De este modo, tras realizar la simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal (SDGI) de los extractos, las diferencias significativas que se observaban entre los lotes de chorizo y salchichones desaparecieron debido a que se produjo una disminución en la concentración de los compuestos nitrogenados presentes en los extractos de chorizo, mientras que en el caso de los salchichones, estas concentraciones aumentaron o se mantuvieron, oscilando todas entre valores de 1000 y 1400 $\mu\text{l/ml}$. Es de suponer que los compuestos presentes en los extractos de chorizo son más sensibles a la acción de las enzimas digestivas (Vermeirssen y col., 2003) mientras que en el caso de los salchichones, se produjeron nuevos compuestos nitrogenados a partir de los ya formados durante la maduración de los embutidos. Los compuestos nitrogenados pueden presentar actividad funcional y ser generados a partir de las proteínas de los alimentos por acción de las enzimas digestivas durante la digestión gastrointestinal (Pihlanto-Leppälä y Korhonen, 2003). Adje y col., (2011) determinaron que la generación de péptidos bioactivos puede ocurrir de forma natural en los mamíferos dentro del tracto gastrointestinal durante el metabolismo normal de las proteínas, incluyendo entre estas a las proteínas cárnicas. Majumder y Wu (2009) realizaron la digestión gastrointestinal de huevo frito y cocido y encontraron que se producían péptidos bioactivos con una potente capacidad antihipertensora. También Lo y Li-Chan (2005) comprobaron que algunos de los péptidos bioactivos presentes en hidrolizados de proteína de soja se formaban tras la simulación de la digestión gastrointestinal. En el caso de los péptidos procedentes de

productos lácteos también se ha estudiado la resistencia a las enzimas digestivas. Picariello y col., (2010) encontraron regiones de la β -lactoglobulina con una alta resistencia tras someter a caseínas y proteínas del suero a la acción de las enzimas digestivas.

Aunque cada vez hay más estudios sobre la liberación de compuestos nitrogenados con actividad funcional procedentes de matrices cárnicas, bien por la acción del procesado del alimento o bien por la digestión gastrointestinal, todavía son pocos los que se centran en los productos cárnicos fermentados.

V.5.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERSORA DE LA ANGIOTENSINA I (IECA).

Al analizar la capacidad de inhibir a la enzima conversora de la angiotensina-I en los extractos obtenidos de los chorizos elaborados, se observó una disminución en la actividad inhibidora de la ECA desde el inicio hasta la mitad de la maduración de los lotes elaborados con los cultivos iniciadores. A partir de este momento, se produce un aumento significativo de la actividad en ambos lotes inoculados, llegando a valores en torno al 35% de inhibición de la ECA (Figura V.5). Por el contrario, en el lote control se observó un aumento de la actividad que tuvo el máximo hacia la mitad de la maduración del embutido para después disminuir significativamente hasta similares a los obtenidos con el cultivo iniciador P198S34.

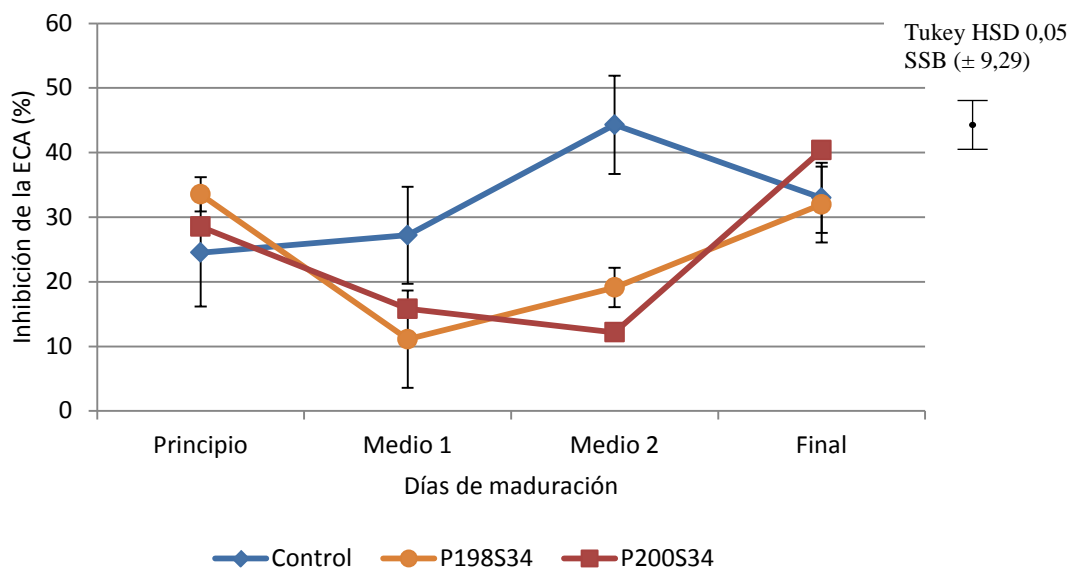


Figura V.5- Evolución de la actividad inhibidora de la enzima convertora de la angiotensina-I presente en los compuestos nitrogenados menores de 5 KDa de los chorizos elaborados, a lo largo de la maduración.

Numerosos autores están de acuerdo en la importancia que tienen las proteasas endógenas de la carne en la ruptura inicial de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares de la misma, siendo las principales responsables de la proteólisis los primeros días de maduración (Hughes y col., 2002; Kenneally y col., 1999; Molly y col., 1997; Verplaetse y col., 1989). Este hecho explicaría la diferencia en el comportamiento del lote control respecto a los lotes inoculados con cultivos iniciadores. Por otro lado, las proteasas microbianas son más importantes durante las últimas etapas de la maduración (Hughes y col., 2002; Lizaso y col., 1999; Sanz y col., 1999;). Estas enzimas bacterianas son además más activas en la degradación de oligopéptidos hasta pequeños péptidos y aminoácidos libres (Verplaetse, 1994; Molly y col., 1997), lo cual se traduce en el aumento de la actividad inhibidora de la ECA que se observa al final de la maduración y que es debido a que los péptidos bioactivos se encuentran en un estado “latente” en el interior de las proteínas y mediante la proteólisis son liberados (Meisel, 1997; Smacchi y Gobetti, 1998). Asimismo, numerosos autores han descrito la liberación de péptidos inhibidores de la ECA a partir de proteínas de la leche mediante la proteólisis microbiana (Gobetti y col., 2002, 2004; Korhonen y Pihlanto-Leppälä, 2001, 2004; Matar y col., 2003). Tsai y col., (2008) comprobaron que en leche fermentada con bacterias ácido lácticas (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) aumentaba el contenido de proteínas solubles a la vez que lo hacía la actividad inhibidora de

la ECA. En queso Cheddar elaborado con distintas cepas de bacterias ácido lácticas, Ong y Shah (2008) identificaron 6 péptidos con una potente actividad inhibidora de la ECA. Este tipo de péptidos también ha sido generado a partir de proteínas de músculo esquelético de cerdo por acción de bacterias ácido lácticas (Arihara y col., 2004).

Por otro lado, la actividad inhibidora de la ECA encontrada en los extractos obtenidos de los salchichones se mantuvo constante durante todo el periodo de maduración en todos los lotes de embutidos, tanto en el lote control como en los lotes inoculados. Únicamente, el lote elaborado con el cultivo iniciador P200S34 presentó un aumento significativo de la actividad al final de la maduración, alcanzando un 55% de inhibición de la enzima convertora de la angiotensina (Figura V.6). Este porcentaje de inhibición es similar al obtenido por Sentandreu y Toldrá (2007) cuando utilizaron dipeptidil peptidasas para degradar carne de cerdo, encontrando varios dipéptidos de los cuales el más potente inhibió a la enzima convertora de la angiotensina-I en un 60%.

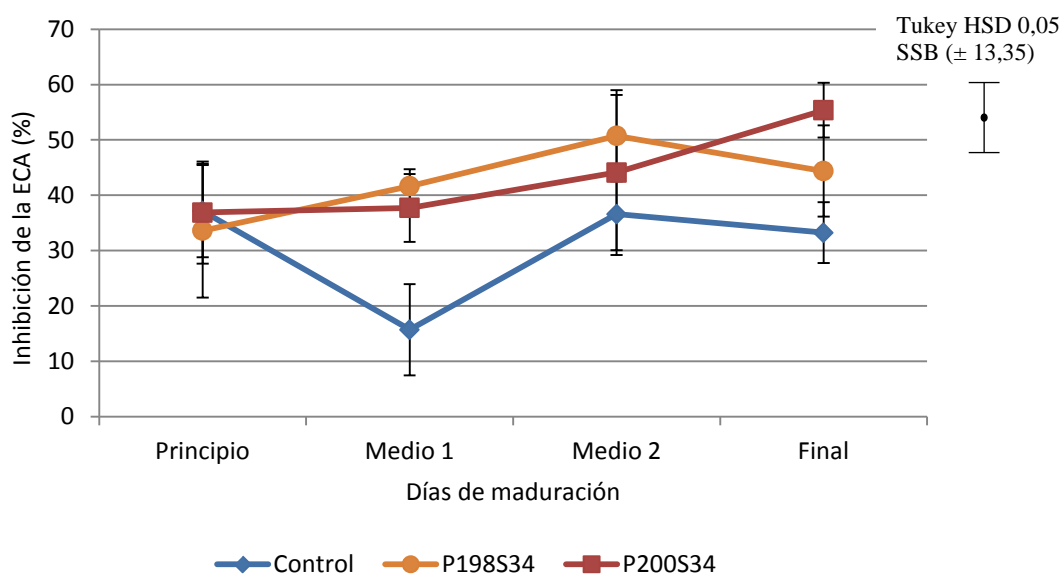


Figura V.6- Evolución de la actividad inhibidora de la enzima convertora de la angiotensina-I presente en los compuestos nitrogenados menores de 5 KDa de los salchichones elaborados, a lo largo de la maduración.

Cabe destacar que el lote inoculado con el cultivo iniciador P200S34 presente el mayor grado de actividad, ya que la cepa de *P. acidilactici* MS200 fue la que mejor adaptación presentó durante la maduración de salchichones (Casquete y col. 2011b). Además, como se ha comentado anteriormente, el alto porcentaje de actividad inhibidora de la

angiotensina-I observado por este lote también es debido a la actividad de las proteasas microbianas presentes en dicho cultivo iniciador (Benito y col., 2007; Casquete y col., 2011a, b; Martín y col., 2007).

En la Figura V.7 se muestra la evolución de la actividad inhibidora de la enzima conversora de la angiotensina-I producida por los extractos obtenidos en el ensayo con la proteasa EPg222, elaborados con el procesado más largo en la industria 2.

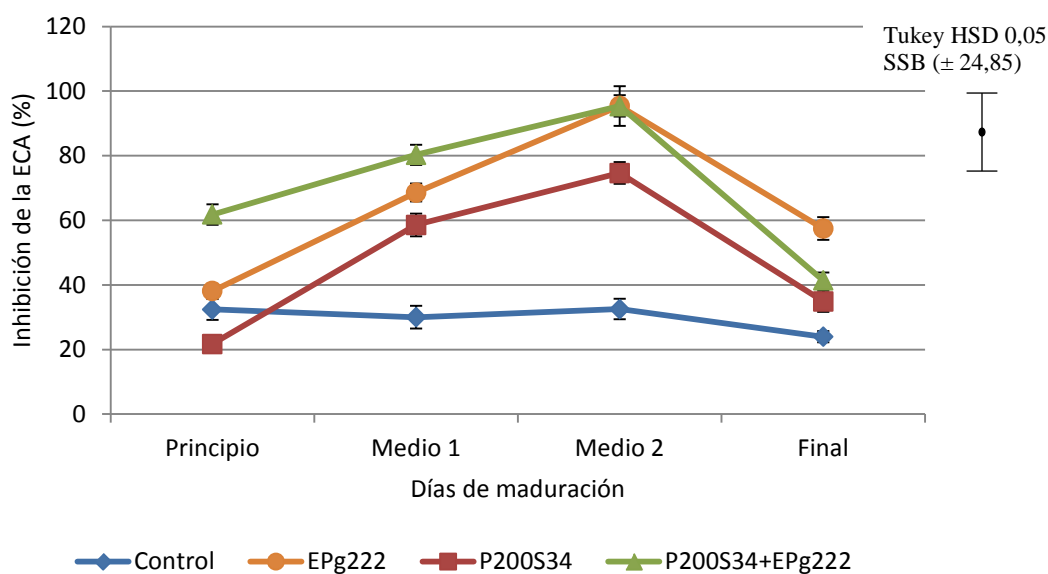


Figura V.7- Evolución de la actividad inhibidora de la enzima conversora de la angiotensina-I presente en los compuestos nitrogenados menores de 5 KDa de los salchichones elaborados en el ensayo con la proteasa EPg222, a lo largo de la maduración.

Exceptuando el lote control, que mantuvo valores constantes, todos los lotes que habían sido inoculados con la proteasa, el cultivo iniciador o la combinación de ambos, presentaron altos niveles de actividad inhibidora de la ECA, con máximos valores a los 65 días de maduración. Estos valores fueron del 74,64% para el lote P200S34 y en torno al 95% para los lotes que contenían la enzima, sola o en combinación con el cultivo iniciador P200S34. Después de ese momento y hasta el final de la maduración, la actividad disminuyó significativamente en los tres lotes alcanzando una inhibición del 57,47% en el lote inoculado con la proteasa EPg222, llegando a valores similares a los encontrados al inicio de la maduración en el lote P200S34 y siendo incluso significativamente inferiores a los del inicio en el lote P200S34+EPg222. Este hecho se debe a la proteólisis que sigue teniendo lugar hasta el final de la maduración de los embutidos y, por tanto, a la degradación de los

compuestos inhibidores de la ECA activos hasta moléculas inactivas (Ryhänen y col., 2001). Este suceso se ha observado anteriormente en quesos, en los cuales la proteólisis que tiene lugar durante la maduración incrementa la actividad inhibidora de la ECA hasta un pico, tras el cual la actividad disminuye (Smacchi y Gobbetti, 2000).

La utilización de proteasas comerciales es una manera eficiente de producir péptidos bioactivos a partir de proteínas de los alimentos. Muchos péptidos bioactivos se han generado experimentalmente de esta forma (Korhonen y Pihlanto, 2003; Pihlanto y Korhonen, 2003). En estudios previos, se ha comprobado la liberación de péptidos inhibidores de la ECA en hidrolizados de proteínas y en productos fermentados de soja (Gibbs y col., 2004) así como en hidrolizados de proteínas de huevo (You y Wu, 2011) mediante la adicción de proteasas. Proteinasas de origen animal, vegetal y microbiano se han utilizado para la generación de péptidos bioactivos a partir de proteínas de la carne. Fujita y col., (2000) aislaron péptidos inhibidores de la ECA a partir de proteínas de músculo de pollo tratadas con termolisina. Arihara y col., (2001) hidrolizaron proteínas de músculo esquelético de cerdo con ocho proteasas distintas y encontraron que el hidrolizado con termolisina mostraba una potente actividad inhibidora de la ECA. Más recientemente, Jang y Lee (2005) hidrolizaron carne de ternera con varias combinaciones de proteasas obteniendo un hidrolizado con termolisina y proteinasa A que poseía un 66,4% de inhibición de la ECA. Más recientemente, Chen y col., (2007b) observaron que la fermentación de leche con un cultivo iniciador compuesto por cinco cepas de bacterias ácido lácticas seguido de una hidrólisis con una proteasa microbiana incrementaba la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados.

Comparando las actividades obtenidas al final de la maduración de todos los embutidos elaborados, no se observaron diferencias significativas en la actividad inhibidora de la ECA en los lotes controles y los lotes elaborados con el cultivo iniciador P198S34 (Figura V.8). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, destaca el lote inoculado con la cepa de *P.acidilactici* MS200 en los salchichones de la industria 1, así como el lote elaborado con la proteasa EPG222 en la industria 2, presentando ambas muestras porcentajes de inhibición cercanos al 60%.

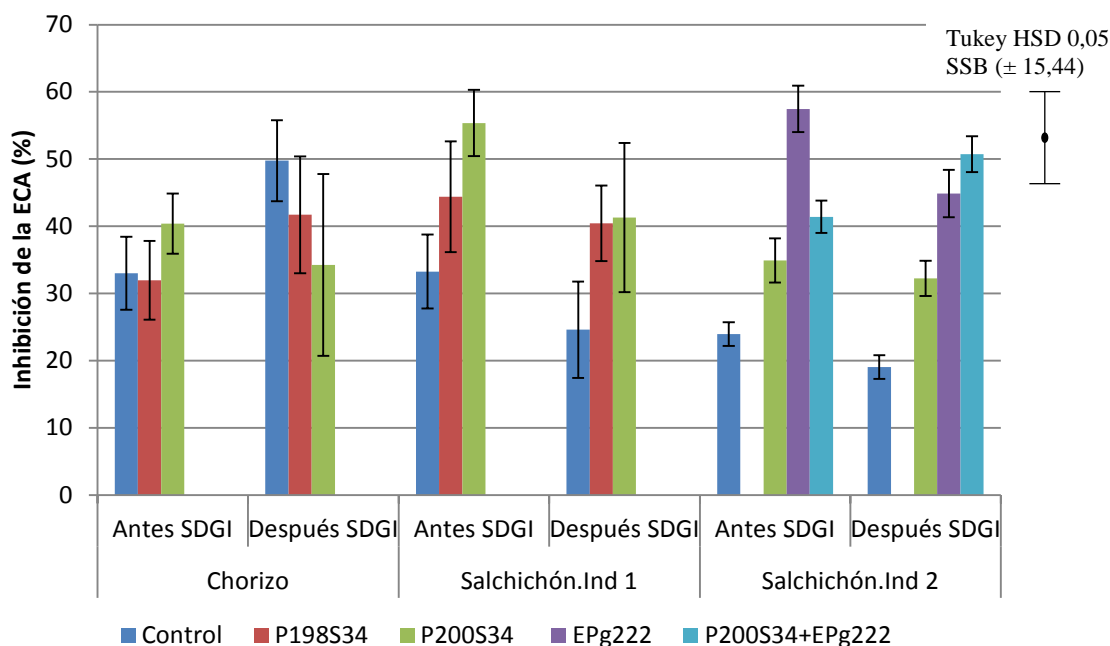


Figura V.8- Porcentajes de inhibición de la enzima convertora de la angiotensina-I presente en los extractos obtenidos al final de la maduración de los embutidos, antes de la simulación de la digestión gastrointestinal (SDGI).

Tras la simulación de la digestión gastrointestinal, en general todos los extractos obtenidos al final de las maduraciones de los embutidos mantuvieron la actividad inhibidora de la ECA sin que aparecieran diferencias significativas entre las actividades presentadas en cada extracto (Figura V.8). El hecho de que la actividad se mantenga es importante ya que los compuestos inhibidores de la ECA producidos durante la maduración de los embutidos tienen que poder sobrevivir a la digestión gastrointestinal para ser absorbidos y alcanzar el sistema cardiovascular como forma activa para poder ejercer su potencial efecto hipotenso (Vermeirssen y col., 2004). Por este motivo, la simulación de la digestión gastrointestinal es importante para determinar si estos compuestos bioactivos permanecen intactos y mantienen su actividad tras pasar a través del sistema digestivo humano (Korhonen y Pihlanto, 2003; Meisel, 2004; Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Vermeirssen y col., 2004). Por otro lado, esta digestión puede generar nuevos componentes bioactivos a partir de moléculas inactivas presentes en los extractos (Matsui y col., 2002; Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Vermeirssen y col., 2004), ya que las proteínas que son ingeridas con los alimentos son atacadas por enzimas como la pepsina, tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa (Pihlanto y Korhonen, 2003). Así, algunos péptidos que han demostrado ser bioactivos *in vitro*, pierden su actividad *in vivo*, mientras que, por el contrario, compuestos que no

presentaban ningún tipo de actividad *in vitro* han demostrado ser activos en experimentos con animales (Iwaniak y col., 2014). Esto se relaciona con la degradación o modificación del péptido debido a la acción de las enzimas existentes en el tracto digestivo o por su modificación en el hígado (Iwaniak y col., 2014; Yamada y col., 2002).

A este respecto, varios estudios han señalado la importancia del papel de la digestión gastrointestinal en la formación de péptidos inhibidores de la ECA. Maeno y col. (1996) encontraron un potente péptido antihipertensivo *in vivo* que mostraba baja actividad *in vitro*. Estos autores demostraron que este péptido de bajo peso molecular era liberado por acción de la digestión pancreática a partir de una forma del péptido más larga. Del mismo modo, otros estudios han confirmado un incremento en la actividad inhibidora de la ECA debido a la acción de las enzimas digestivas sobre soluciones de caseínas fermentadas (Pihlanto-Lepälä y col., 1998; Vermeirssen y col., 2003), así como en huevos cocinados (Majumder y Wu, 2009). En hidrolizados de colágeno de calamar, Alemán y col., (2013) encontraron que la digestión con pepsina apenas modificó la actividad encontrada en los extractos, mientras que tras la digestión con pepsina seguida de pancreatina se produjo un aumento de los péptidos de bajo peso molecular, incrementándose así la actividad inhibidora de la ECA. Además, Matsui y col., (2002) comprobaron que la acción de las enzimas digestivas hacía que apareciera poder inhibidor de la ECA en jalea real, que anteriormente carecía de él. En contraste, compuestos que muestran una actividad inhibidora de la ECA evidente *in vitro*, pueden no mostrar actividad antihipertensora *in vivo* si estos compuestos son sustratos de la ECA en lugar de verdaderos inhibidores de la enzima (Fujita y col., 2000).

Finalmente, la hidrólisis de proteínas procedentes de carne por acción de enzimas digestivas también puede generar péptidos capaces de inhibir considerablemente la ECA (Arihara y col., 2001; Jang y Lee, 2005). En estudios previos se han encontrado péptidos inhibidores de la ECA *in vitro* generados por la simulación de la digestión gastrointestinal sobre carne de cerdo (Escudero y col., 2010). Además, cuando estos péptidos fueron administrados a ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se comprobó que mantuvieron su actividad, lo cual sugiere que la carne de cerdo constituye una importante fuente de componentes bioactivos (Escudero y col., 2012b).

En conclusión, la actividad inhibidora de la ECA producida por nuestros extractos se vio influenciada por el tipo de producto y por el procesado del mismo, apareciendo

diferencias significativas entre el lote de salchichones elaborado con el cultivo iniciador P200S34 en la industria 1 y el lote que incluía a la proteasa EPg222 en la industria 2. Sin embargo, no se vio afectada tras la realización de la simulación de la digestión gastrointestinal, lo cual hace creer que los compuestos presentes en nuestros extractos podrían tener efecto hipotensor en los seres vivos.

V.6.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES DE OXÍGENO (ORAC).

La industria de la carne busca soluciones cada vez más naturales para minimizar la rancidez oxidativa y prolongar la vida útil de los productos cárnicos, en lugar de usar aditivos sintéticos que pueden tener efectos negativos en la salud (Saito y col., 2003). Por otro lado, también se investiga la presencia de antioxidantes naturales en los alimentos que pueden proteger el cuerpo contra los radicales libres y retardar muchas enfermedades crónicas (Liu y Finley, 2005).

La actividad antioxidante de los extractos de los compuestos nitrogenados se determinó como la capacidad de absorción de radicales de oxígeno por la fluoresceína (ORAC-FL), expresada como μmol de Trolox/mg de compuestos nitrogenados presentes en el extracto. De este modo, el valor 1 indica que la capacidad antioxidante del extracto es igual que la del Trolox.

Al analizar las muestras de los chorizos elaborados en el presente estudio, se observó que la actividad antioxidante mostró valores entre 0,53 y 0,71 μmol de equivalentes de Trolox/mg de extracto al final de la maduración, sin que aparecieran diferencias significativas a lo largo del procesado (Figura V.9).

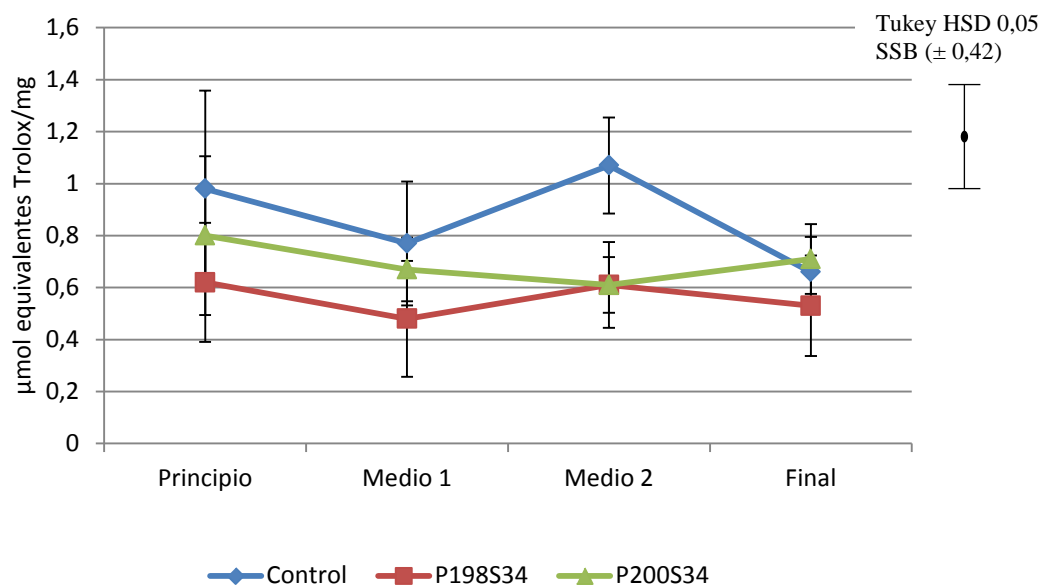


Figura V.9- Evolución de la actividad antioxidante, expresada como $\mu\text{mol Trolox/mg}$ proteína, presente en los compuestos nitrogenados menores de 5 KDa de los chorizos elaborados, a lo largo de la maduración.

Los valores de ORAC de las muestras de chorizo inoculados con los distintos cultivos iniciadores no mostraron diferencias o fueron puntualmente menores que el lote control. Al final de la maduración tampoco se encontraron diferencias significativas entre los lotes inoculados y el control, sugiriendo un escaso o un menor efecto de los cultivos iniciadores en la generación de compuestos antioxidantes en comparación con los microorganismos autóctonos presentes en el lote control de los chorizos. Estos datos difieren de los obtenidos por Broncano y col. (2011), que utilizaron proteasas de origen microbiano para mejorar la estabilidad oxidativa de chorizos, consiguiendo un incremento en la actividad antioxidativa de los mismos.

Por otro lado, la actividad antioxidante de los extractos de salchichones se incrementó durante la maduración debido a la extensa degradación enzimática de proteínas y polipéptidos, la cual libera amino ácidos libres y pequeños péptidos nuevos con actividad antioxidante (Korhonen y Pihlanto, 2006; Smacchi y Gobetti, 2000). Las actividades encontradas en los lotes control y P200S34 aumentaron a lo largo del periodo de maduración mientras que la actividad antioxidante encontrada en el lote elaborado con el cultivo iniciador P198S34 se mantuvo constante durante todo el proceso (Figura V.10).

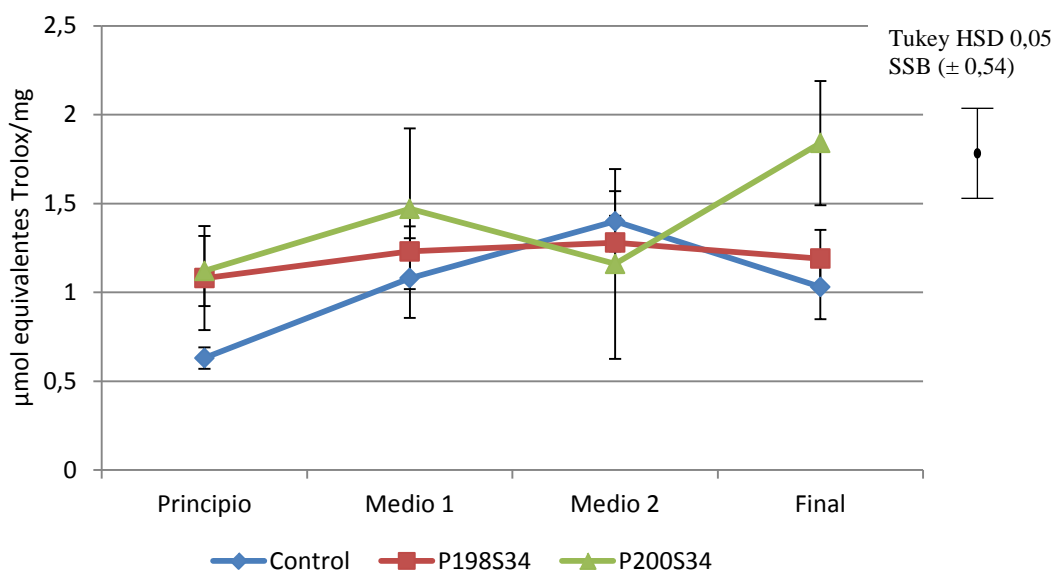


Figura V.10- Evolución de la actividad antioxidante, expresada como $\mu\text{mol Trolox/mg}$ proteína, presente en los compuestos nitrogenados menores de 5 KDa de los salchichones, a lo largo de la maduración.

El lote inoculado con el cultivo iniciador P200S34, que fue el cultivo iniciador que mejor se adaptó a las condiciones de maduración de los salchichones (Casquete y col., 2011b), mostró una actividad antioxidante de 1,84 μmol equivalentes de Trolox/mg de extracto peptídico, valor significativamente mayor a los obtenidos en el lote control y en el lote inoculado con el cultivo iniciador P198S34, que presentaron valores de 1,03 y 1,19 μmoles equivalentes de Trolox/mg de extracto peptídico, respectivamente. Este hecho sugiere una generación de péptidos antioxidantes debido a la actividad de las proteasas microbianas presentes en dicho cultivo iniciador (Benito y col., 2007; Casquete y col., 2011a, b; Martín y col., 2007).

En la Figura V.11 se presentan los resultados obtenidos durante el ensayo realizado con la proteasa EPg222. Se observa que todos los lotes elaborados sufrieron un ligero aumento de la actividad antioxidante a lo largo de la maduración de los salchichones aunque únicamente en el caso del lote elaborado con la enzima EPg222 este aumento fue significativo, alcanzando un valor de 2,57 μmol equivalentes de Trolox/mg de extracto peptídico al final del proceso de maduración. Al igual que ocurre en la actividad inhibidora de la ECA, los lotes con la proteasa EPg222 mostraron la mayor actividad antioxidante. Esto se debe a su alta actividad proteolítica (Benito y col., 2002b, 2003a, 2004, 2006, Casquete y

col., 2011a), responsable de que dichos lotes muestren también una alta concentración de compuestos nitrogenados (Casquete y col., 2011a). Además, el uso de la enzima EPg222 mejora las características sensoriales de los productos crudos curados y, en asociación con el cultivo iniciador P200S34, reduce la acumulación de aminas biogénicas en carne (Casquete y col., 2011c).

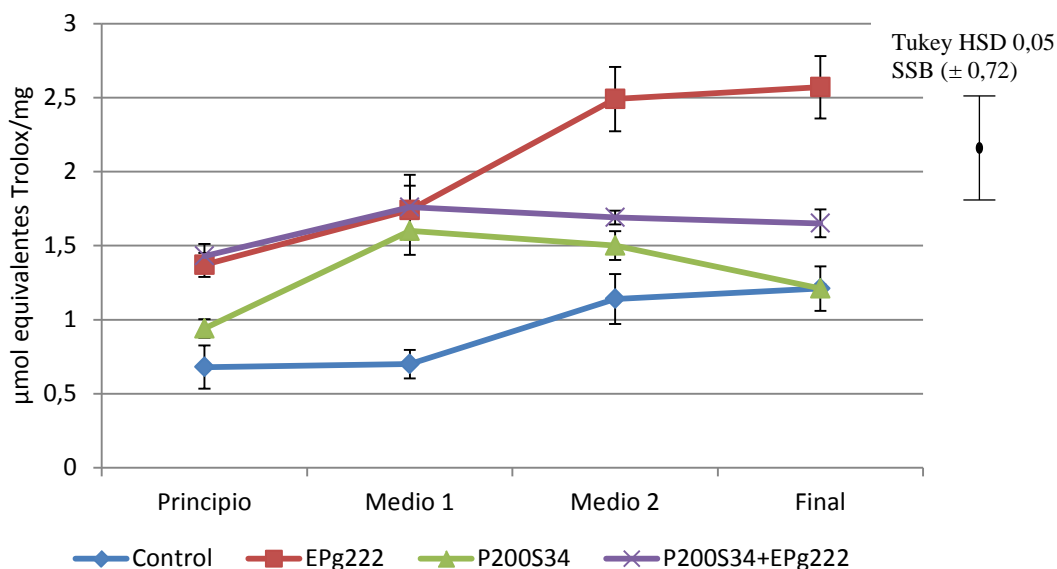


Figura V.13- Evolución de la actividad antioxidante, expresada como $\mu\text{mol Trolox/mg}$ proteína, presente en los compuestos nitrogenados menores de 5 KDa de los salchichones elaborados en el ensayo con la proteasa EPg222, a lo largo de la maduración.

Los valores de actividad antioxidante obtenidos con la proteasa EPg222 fueron similares a los obtenidos por otros autores en hidrolizados de proteínas del suero con distintas proteasas (Hernández-Ledesma y col., 2005), quienes encontraron una secuencia de aminoácidos con una actividad antioxidante de 2,621 $\mu\text{moles equivalentes de Trolox}/\mu\text{moles}$ de péptidos. Sin embargo, estos resultados son superiores a los obtenidos por otro autores en hidrolizados de proteínas de suero de leche (Tavares y col., 2011) y proteína de huevo (You y Wu, 2011). El uso de otras proteasas ha demostrado el importante papel que juegan en la producción de compuestos con actividad antioxidante. Así, Wang y col., (2013) utilizaron diferentes proteasas para hidrolizar proteínas de mejillones demostrando que el uso de la neutrasa aumentaba significativamente la actividad antioxidante de los extractos. Del mismo modo, el uso de papaína y actinasa E para hidrolizar proteínas miofibrilares porcinas produjo hidrolizados con una alta actividad antioxidante (Saiga y col., 2003b). En proteínas de la leche, Hogan y col., (2009) demostraron la utilidad de utilizar proteasas de origen microbiano

para generar péptidos antioxidantes. Además, varios autores han puesto de manifiesto que el uso de proteasas de origen microbiano aumenta la actividad antioxidante en productos cárnicos. Li y col., (2007) aislaron cuatro péptidos con gran actividad antioxidante de hidrolizados de colágeno de cerdo con una mezcla de proteasas que incluía una proteasa de *Streptomyces* y otra de *Bacillus polymyxa*. Otros autores han utilizado proteasas comerciales de origen microbiano para aumentar significativamente la cantidad de compuestos con actividad antioxidante en chorizos y mejorar así su estabilidad oxidativa (Broncano y col., 2011; Petró y col., 2013). Por todo esto, se resalta la importancia de añadir enzimas a los procesos de curado.

En resumen, al final del procesado de los embutidos se puede observar que los chorizos fueron los productos cárnicos que menor actividad antioxidante mostraron y que, como se ha comentado anteriormente, destacan el lote de salchichones inoculado con el cultivo iniciador PS200S34 en la industria 1 y el lote elaborado con la proteasa EPg222 en la industria 2 (Figura V.12).

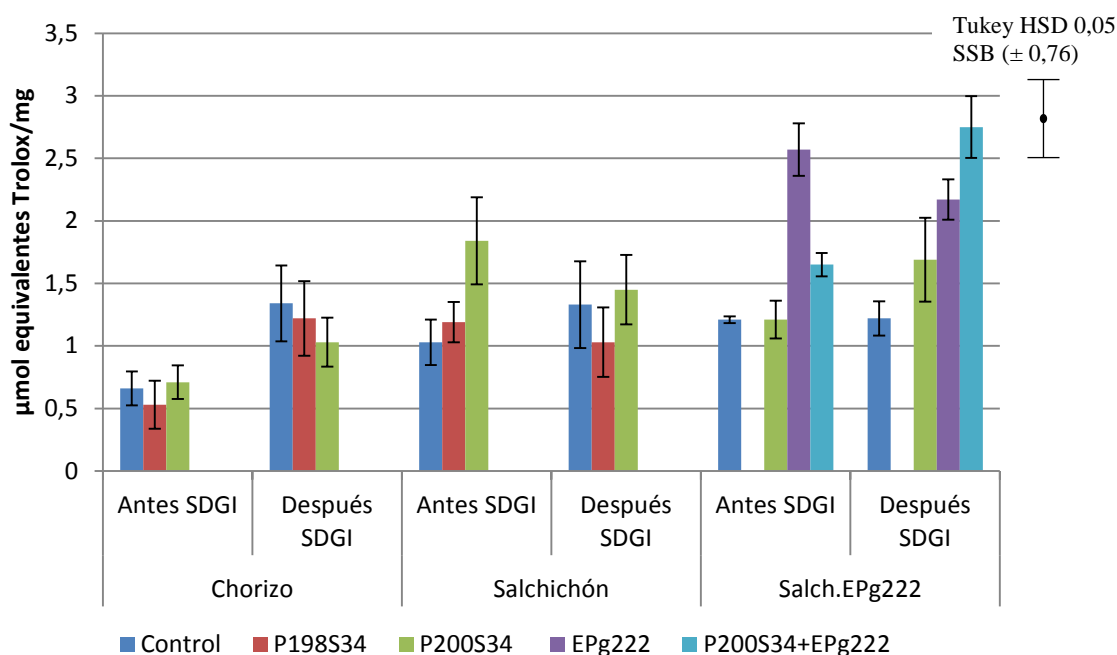


Figura V.12- Actividad antioxidante, expresada como $\mu\text{mol Trolox/mg}$ proteína, presente en los extractos obtenidos al final de la maduración de los embutidos, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal (SDGI).

Los resultados obtenidos después de llevar a cabo la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* con pepsina y pancreatina se muestran en la Figura V.12. Al igual que ocurre con otras actividades biológicas, es importante que los compuestos antioxidantes mantengan su actividad al pasar a través del sistema digestivo humano para poder realizar su función en el organismo (Korhonen & Pihlanto, 2006; Martínez Augustin & Martínez de Victoria, 2006). En los lotes de chorizo elaborados se observó que se produjo un aumento de la actividad antioxidante tras la acción de las enzimas digestivas, aunque no se presentaron diferencias significativas entre el lote control y los lotes inoculados con los cultivos iniciadores. Esto indica que los compuestos con capacidad antioxidante presentes en los extractos de chorizo son resistentes a la acción de las enzimas activas en la digestión gastrointestinal, y además, estas enzimas producen nuevos compuestos con actividad antioxidante a partir de las moléculas inactivas presentes en los extractos (Matsui y col., 2002; Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Vermeirssen y col., 2004), lo cual incrementa la bioactividad después de la digestión. Varios autores han utilizado enzimas digestivas con el fin de simular la digestión gastrointestinal y liberar péptidos antioxidantes (Rival y col., 2001; Suetsuna y col., 2000). Gómez-Ruiz y col., (2008) obtuvieron varios péptidos con una potente actividad antioxidante hidrolizando caseína ovina con enzimas gastrointestinales. Del mismo modo, Ko y col., (2013) purificaron dos péptidos antioxidantes de hidrolizados de pescado usando para ello enzimas digestivas. You y col., (2010) también utilizaron proteasas gastrointestinales para producir péptidos antioxidantes a partir de carne de pescado, con la ventaja añadida de que estos compuestos son resistentes a la digestión que se produce en el tracto gastrointestinal.

En el caso de los salchichones, la actividad antioxidante no se alteró tras la simulación de la digestión gastrointestinal, exceptuando al lote inoculado con la proteasa EPg222 en combinación con el cultivo iniciador P200S34, que aumentó significativamente su actividad antioxidante tras sufrir la digestión gastrointestinal. De nuevo, esto se debe a la alta capacidad proteolítica de la enzima EPg222 (Benito y col., 2002b, 2003a, 2004, 2006, Casquete y col., 2011a) en combinación con la actividad de las proteasas microbianas presentes en el cultivo iniciador (Benito y col., 2007; Casquete y col., 2011a, b; Martín y col., 2007). Estudios sobre los productos finales de la proteólisis han descrito varios péptidos de bajo y medio peso molecular, oligopéptidos y aminoácidos libres con efecto antioxidante de extractos de proteínas obtenidos de productos cárnicos fermentados (Sun y col., 2009; Vařtag y col., 2010).

En términos de los efectos sobre la salud humana, la actividad antioxidante es importante porque los compuestos antioxidantes son sustancias presentes en los alimentos que disminuyen significativamente los efectos adversos producido por especies reactivas, tales como el oxígeno y el nitrógeno reactivos, en las funciones fisiológicas normales (Huang y col., (2005). Además, en relación a los alimentos, los antioxidantes son capaces de retrasar o prevenir los procesos de autooxidación (Mielnik y col., 2003).

V.7.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA.

La actividad antiproliferativa producida por compuestos naturales (fenoles, índoles o flavonas, entre otros) presentes en frutas como frambuesas o arándanos (Parry y col., 2006) y en hortalizas como la col rizada (Olsen y col., 2012) o el brócoli (Bachiega y col., 2016) ha sido estudiada. Proteínas, péptidos y aminoácidos también pueden presentar actividad antitumoral o antiproliferativa. Así ha sido descrito para hidrolizados de garbanzo (Xue y col., 2012, 2105), soja (Kim y col., 1999), huevo (Yi y col., 2003) y proteínas de pescado (Hsu y col., 2001; Picot y col., 2006) y calamar (Alemán y col., 2011), pero apenas hay estudios sobre la actividad antiproliferativa que se puede encontrar en compuestos presentes en la carne y en los productos cárnicos fermentados.

Tras llevar a cabo el estudio de la actividad antiproliferativa en los chorizos elaborados, se observó que los extractos obtenidos presentaban una baja inhibición del crecimiento de las células tumorales (Figura V.13).

La inhibición observada sólo apareció cuando las muestras se incubaron con las células tumorales durante 72 horas y aun así, esta inhibición no superó el 4%. Tras llevar a cabo la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*, la actividad de los extractos aumentó significativamente ($p < 0,05$) aunque tras 24 horas de incubación los extractos siguieron sin presentar actividad. Después de 48 horas, apareció actividad en el lote control llegando a valores en torno al 10% de inhibición del crecimiento de las células tumorales. Finalmente, cuando el tiempo de incubación fue de 72 horas, todos los extractos de chorizos digeridos mostraron un aumento significativo de la actividad, alcanzando valores que oscilaron entre el 20% y el 37%. Este aumento en la actividad se debe, como se ha comentado anteriormente, a la acción de las enzimas digestivas que producen nuevos

compuestos a partir de las moléculas inactivas presentes en los extractos (Matsui y col., 2002; Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Vermeirssen y col., 2004). En los casos observados, la actividad presentada por los extractos obtenidos de los lotes inoculados con cultivos iniciadores fue igual o inferior a la mostrada por el lote control, lo cual indica que, en los chorizos, los compuestos nitrogenados producidos por acción de las proteasas bacterianas no son los responsables de la actividad antiproliferativa encontrada.

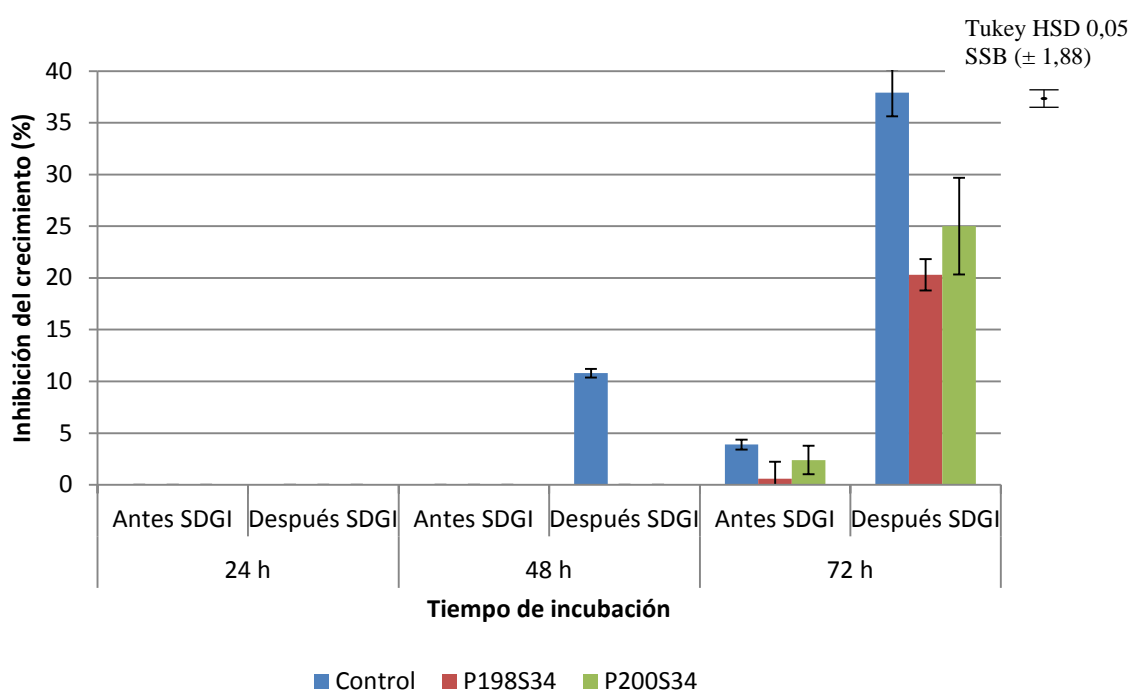


Figura V.13. Efecto de los extractos obtenidos al final de la maduración de los chorizos sobre el crecimiento de las células tumorales Caco-2, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Sin embargo, en los salchichones estudiados sí apareció un alto grado de inhibición del crecimiento de las células tumorales por parte de los extractos, y se observó un claro efecto del tiempo de incubación, de modo que a mayor tiempo de incubación, se produjo mayor inhibición del crecimiento celular (Figura IV.14). Además, la inhibición producida por los lotes inoculados fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la del lote control durante todo el ensayo, por lo que en este caso, la actividad proteolítica producida por las bacterias ácido lácticas y los estafilococos sobre las proteínas de la carne (Casaburi y col., 2005, 2008; Drosinos y col., 2007; Fadda y col., 1999a, b, 2010; Mauriello y col., 2002, 2004; Rodríguez y col., 1998) durante la maduración de los salchichones, da lugar a compuestos nitrogenados con actividad antiproliferativa.

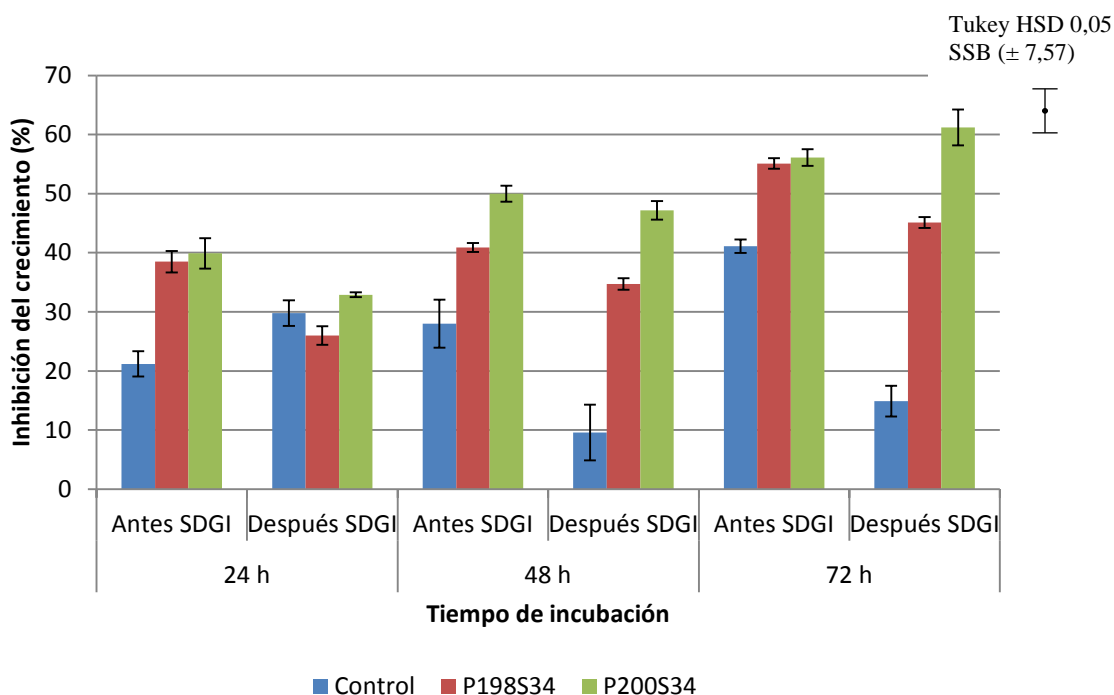


Figura V.14. Efecto de los extractos obtenidos al final de la maduración de los salchichones sobre el crecimiento de las células tumorales Caco-2, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de los extractos de compuestos nitrogenados, la actividad se mantuvo o disminuyó ligeramente. A pesar de esto, el extracto del lote inoculado con el cultivo iniciador P200S34 siguió destacando por su alto porcentaje de inhibición, ya que mostró un 47,2% tras 48 horas y un 61,2% tras 72 horas de incubación con las células tumorales. Nuestros resultados son superiores a los obtenidos por Picot y col., (2006) cuando estudiaron la actividad antiproliferativa de 18 hidrolizados de proteínas de pescado sobre las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, encontrando que la mayoría de los hidrolizados inhibía el crecimiento celular entre un 25% y un 40% a las 72 horas de incubación.

En la Figura V.15 puede observarse que todos los salchichones elaborados en la industria 2, durante el ensayo con la proteasa EPg222, también aumentaron su actividad antiproliferativa con el tiempo de incubación. Todos los lotes inoculados produjeron una inhibición significativamente superior a 72 horas de incubación. Además, todos los lotes inoculados presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento de las células tumorales significativamente superiores al control ($p < 0,05$) sin que aparecieran diferencias entre ellos.

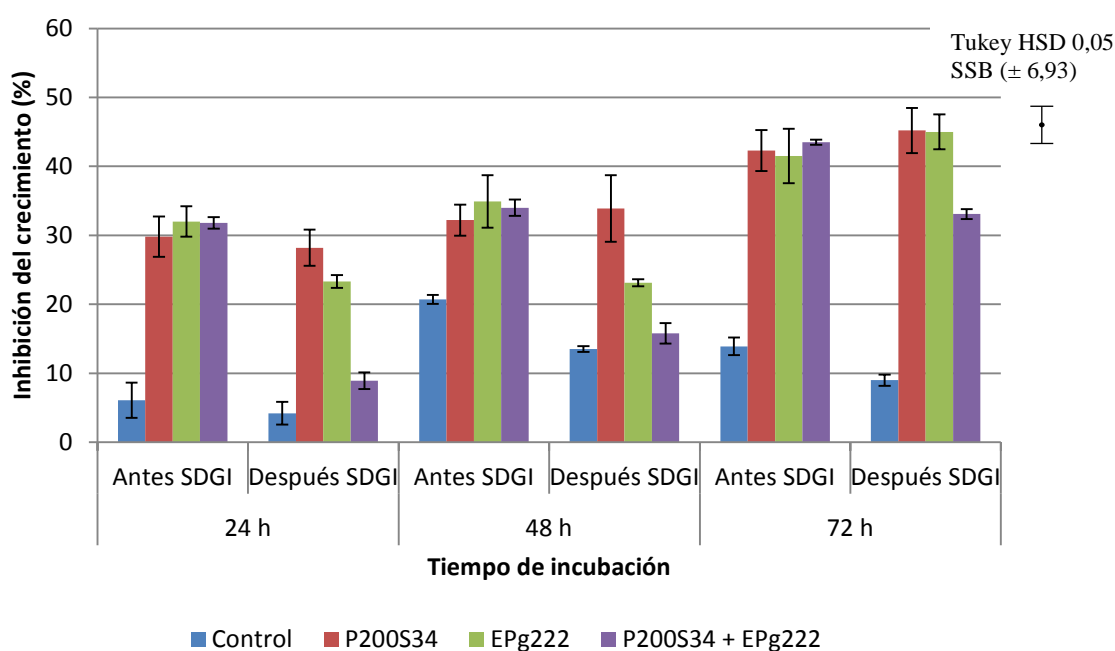


Figura V.15. Efecto de los extractos obtenidos al final de la maduración de los salchichones elaborados en la industria 2 sobre el crecimiento de las células tumorales Caco-2, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

La utilización de proteasas comerciales es una manera eficiente de producir péptidos bioactivos a partir de proteínas de los alimentos (Korhonen y Pihlanto, 2003, 2006; Lafarga y Hayes, 2014; Pihlanto y Korhonen, 2003). Numerosos péptidos bioactivos, incluidos péptidos antiproliferativos o antitumorales, se han generado experimentalmente de esta forma. Hsu y col., (2011) identificaron dos péptidos con alta actividad antiproliferativa a partir de hidrolizados de músculo de atún con papaína y proteasa XXIII. Por otro lado, Alemán y col., (2011) trataron gelatina de calamar con distintas proteasas comerciales obteniendo hidrolizados que probaron sobre dos líneas de células tumorales. En ellas observaron que en todos los casos se producía inhibición del crecimiento. Además, comprobaron que los hidrolizados más activos, estaban compuestos en su mayoría por péptidos con pesos moleculares entre 500 Da y 1400 Da.

Tras la digestión gastrointestinal *in vitro* se observó una disminución en el porcentaje de inhibición del crecimiento de las células tumorales que presentaban todos los lotes, a excepción de las muestras del lote elaborado con el cultivo iniciador P200S34 que mantuvo

su actividad. Únicamente en el lote elaborado con la proteasa EPg222 se observa un aumento de la actividad antiproliferativa a las 72 horas, tras la SDGI.

V.8.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS.

Péptidos antimicrobianos han sido aislados y caracterizados a partir de proteínas de leche (Hayes y col., 2006; McCann y col., 2005, 2006; Minervini y col., 2003) y de huevo y col., 2007). Liu y col., (2008) produjeron un péptido antimicrobiano, a partir de carne de ostra mediante la digestión con alcalasa y bromelina, que inhibió el crecimiento de *E. Coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*, entre otros. A partir de proteínas de ternera, Jang y col., (2008) obtuvieron hidrolizados por la acción de enzimas de distintos orígenes como la termolisina, la proteasa A, la proteasa K, la pepsina, la tripsina, la tirosinasa y la papaína. Probaron la actividad antimicrobiana de los péptidos presentes en los hidrolizados péptidos frente a bacterias gram negativas como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, y gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* y *Listeria monocytogenes*, descubriendo que todos los péptidos estudiados presentaban actividad frente a uno o varios de los patógenos probados. En nuestro estudio se pudo comprobar la acción de las bacterias ácido lácticas y la proteasa extracelular EPg222 sobre el crecimiento de estos microorganismos patógenos.

Los porcentajes de inhibición de los extractos obtenidos de los distintos lotes al final de la maduración de los embutidos frente a *Escherichia coli* CECT 4267 se muestran en la Figura V.16. En general, hasta el final de la maduración de los embutidos no se observó actividad antimicrobiana frente a *E. Coli*. Este aumento de la actividad al final del procesado, se debe a que al principio de la maduración predomina la formación de fragmentos de alto peso molecular, pero a lo largo del tiempo se van incrementando los compuestos de menor peso (Henriksen y Stahnke, 1997) que son los responsables de las actividades funcionales.

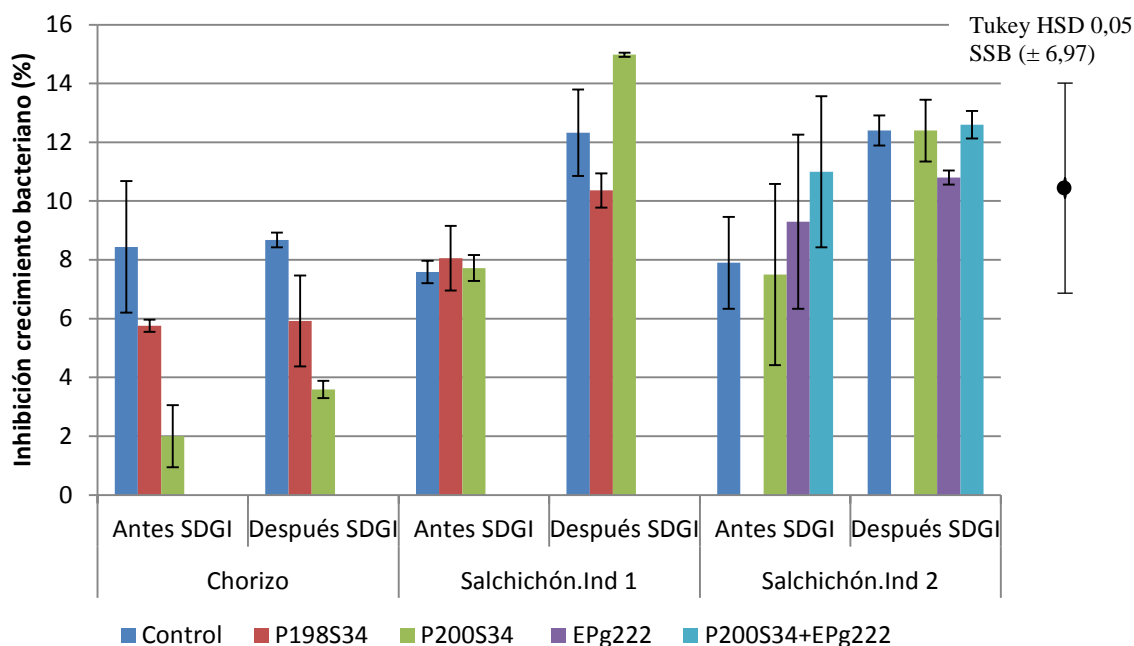


Figura V.16. Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos al final de la maduración de los embutidos elaborados contra *Escherichia coli* CECT 4267, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

En los chorizos elaborados, al final de la maduración el lote control fue el que mayor actividad antimicrobiana presentó, siendo esta significativamente superior a la de los lotes inoculados. Además, el lote elaborado con el cultivo iniciador P200S34 tuvo una actividad antimicrobiana significativamente menor que el resto de los lotes, en torno al 2%. Tras la simulación de la digestión gastrointestinal, no se produjo ninguna variación en la actividad antimicrobiana frente a *E.coli* presente en los extractos.

En los salchichones, no se apreciaron diferencias significativas entre el lote control y los lotes inoculados con los cultivos iniciadores, con valores en torno al 8% de inhibición del crecimiento de *E.Coli*. Como se ha indicado en los apartados anteriores, la digestión gastrointestinal puede generar nuevos compuestos antimicrobianos a partir de otras moléculas inactivas presentes en la matriz (Matsui y col., 2002; Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Vermeirssen y col., 2004). Así, tras la SDGI, se produjo un aumento significativo en la actividad antimicrobiana presente en todos los extractos. Además, el lote inoculado con el cultivo iniciador P200S34 fue significativamente superior al control y al lote elaborado con el cultivo iniciador P198S34, presentando un porcentaje de inhibición en torno al 15%. Al igual que ocurrió en las actividades antihipertensora y antimicrobiana, vuelve a destacar el cultivo

iniciador P200S34, altamente proteolítico (Benito y col., 2007; Casquete y col., 2011a, b; Martín y col., 2007), y que fue el que mejor se adaptó a las condiciones de maduración de los salchichones (Casquete y col., 2011b).

En el ensayo llevado a cabo con la proteasa EPg222, no se observaron diferencias significativas entre el lote control y los inoculados, ni antes ni después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Aunque la inhibición producida no es muy alta, los resultados obtenidos son interesantes ya que estudios anteriores no han encontrado inhibición en el crecimiento de bacterias gram negativas, como *E.coli*, por parte de bacterias ácido lácticas (Ammor y col., 2006; Jack y col., 1995; Tantillo y col., 2002). Además, aunque los niveles de este microorganismo durante la fermentación y el secado de embutidos fermentados disminuyen de 1 a 2 unidades logarítmicas (Hinkens y col., 1996; Muthukumarasamy y Holley, 2007; Naim y col., 2003; Riordan y col., 1998) debido a la disminución de los niveles de pH, a la a_w , a la sal y al aumento de los niveles de nitritos (Casey y Condon, 2000; Riordan y col., 1998), numerosos estudios han indicado que cepas de *E. coli* pueden sobrevivir tras la maduración de los productos cárnicos fermentados siendo difícil su eliminación completamente (Calicioglu y col., 2002; Glass y col., 1992; Whiting, 1993). En esta situación, el efecto inhibitorio de las BAL adicionadas como cultivo iniciador, es decisivo para la obtención de embutidos de una elevada calidad higiénica (Coppola y col., 2000; Papa y col., 1995).

En cuanto a la inhibición de los diferentes extractos frente a *Salmonella choleraesuis* CECT 4395, así como ocurría frente a *E. coli*, la actividad inhibitoria no se presentó hasta el final de la maduración de los embutidos.

Al final del proceso de maduración (Figura V.17) se observó que el lote de chorizos inoculado con el cultivo iniciador P198S34 presentó una actividad significativamente superior a la del control y el lote P200S34, aunque esta no fue muy alta, sino que estuvo próxima al 8% de inhibición del crecimiento. Esta diferencia entre los lotes de chorizo desapareció tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, debido a que la actividad presente en el lote P198S34 disminuyó significativamente.

En los salchichones, los lotes inoculados presentaron mayor actividad antibacteriana frente al lote control. Al igual que ocurrió para la actividad inhibidora del crecimiento de E.Coli, tras la SDGI, todos los lotes aumentaron significativamente su actividad, aunque los lotes inoculados siguieron siendo mayores que el lote control.

En los lotes elaborados en el ensayo con la proteasa EPg222 no se observaron diferencias significativas antes de la SDGI. Sin embargo, tras realizar la simulación in vitro, la actividad presente en los extractos se mantuvo o en el caso de los lotes control y P20034+EPg222 aumentó significativamente, aumentando este último de presentar una actividad del 7,5% al 12% de inhibición del crecimiento.

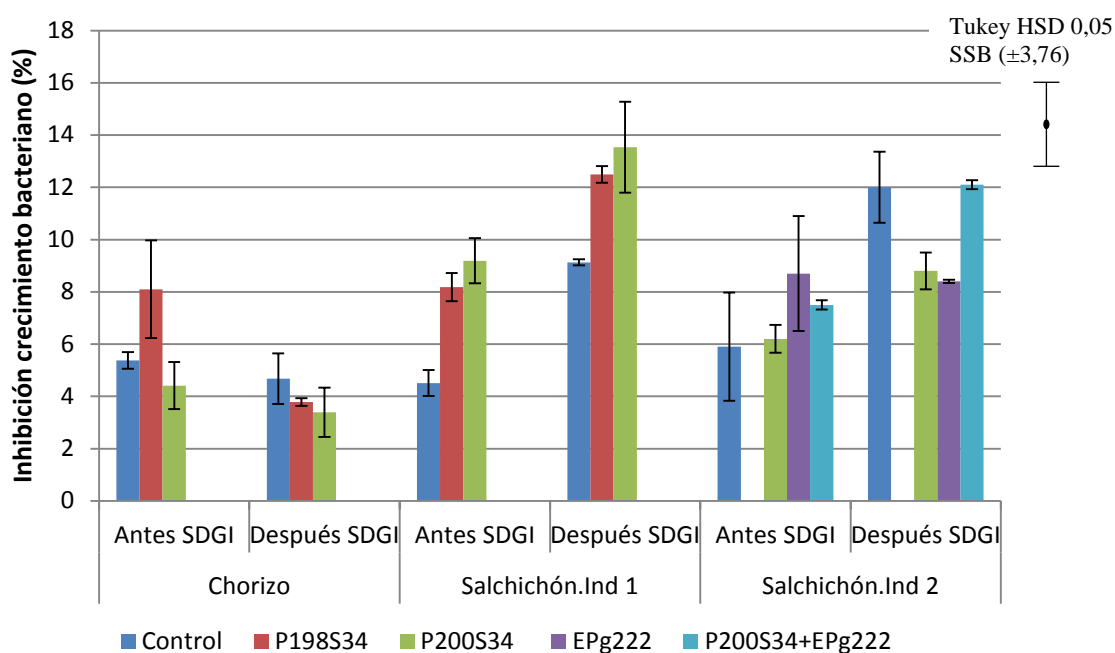


Figura V.17. Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos al final de la maduración de los embutidos elaborados contra *Salmonella choleraesuis* CECT 4395, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Son numerosos los estudios que demuestran la alta resistencia del género *Salmonella* a distintos tipos de compuestos antimicrobianos debido a la facilidad que muestran estos microorganismos para crear resistencias (Foley y Lynne, 2008; McEwen y Fedorka-Cray, 2002). El uso extensivo de aditivos alimentarios y el control y tratamiento de infecciones de *Salmonella* en el ganado son factores importantes en la aparición de cepas multi-resistentes, como *Salmonella typhimurium* DT104 (John y col., 1997; Gustafson y Bowen, 1997). Este

hecho explicaría la baja sensibilidad de nuestra cepa de *Salmonella choleraesuis* a los compuestos antimicrobianos presentes en el extracto.

En la Figura V.18 se muestran los porcentajes de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* CECT 976 al final de la procesado de los embutidos. Los extractos obtenidos a lo largo de la maduración de los embutidos no mostraron ninguna actividad, mientras que al final, los diferentes extractos alcanzaron valores en torno al 15% de inhibición. La actividad antimicrobiana de los extractos se debe a aminoácidos libres, así como a compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (Martínez Augustin y Martínez de la Victoria, 2006; Mulero y col., 2011; Vioque y Millán, 2005). Como se ha dicho anteriormente, estos compuestos se encuentran inactivos dentro de la proteína intacta pero pueden activarse al ser liberados durante la maduración de los embutidos (Vioque y Millán, 2005). De este modo se explica a lo largo del proceso de maduración no aparezca actividad antimicrobiana y que, debido al aumento de la concentración de compuestos de bajo peso molecular (Henriksen y Stahnke, 1997), la actividad se incremente al final de dicho proceso.

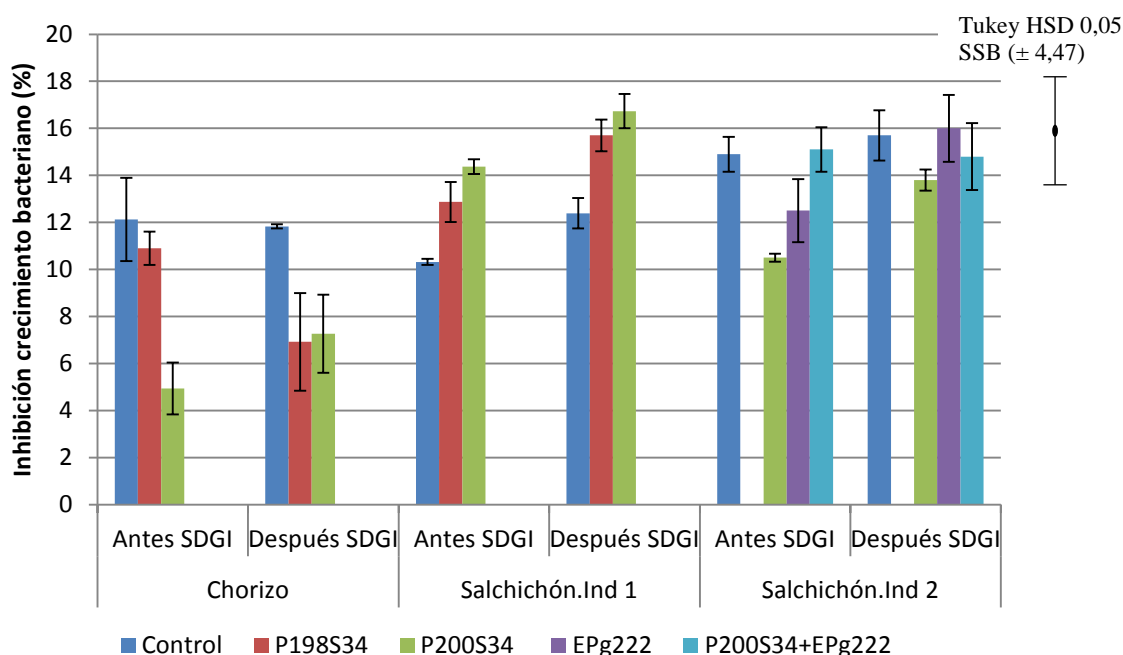


Figura V.18. Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos al final de la maduración de los embutidos elaborados contra *Staphylococcus aureus* CECT 976, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Al igual que ocurría frente a *E. coli*, en los chorizos elaborados, el lote control presentó una actividad antimicrobiana significativamente superior a la de los lotes inoculados, al final de la maduración. Tras la simulación de la digestión gastrointestinal, no se perdió actividad antimicrobiana en los lotes y además, se mantuvo la diferencia entre el lote control y los lotes inoculados con los cultivos iniciadores.

En los salchichones, el lote control fue el que mostró el menor porcentaje de inhibición (10,32 %), mientras que los extractos obtenidos de los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores presentaron valores de actividad significativamente superior, variando desde 12,8 al 14,3 %. Estos valores aumentaron tras la digestión gastrointestinal, alcanzando valores del 16% frente al 12% que mostró el control.

En los extractos elaborados en el ensayo con la proteasa EPg222, la actividad antibacteriana giró en torno al 15% y no se apreciaron diferencias significativas entre el lote control y los lotes inoculados, ni tras la digestión con enzimas gastrointestinales.

S. aureus es un microorganismo endémico en el entorno de la industria cárnica (Borch y col., 1996) por lo que su presencia en la carne de cerdo no es infrecuente (Atanassova y col., 2001; Pala y Sevilla, 2004). El grado de contaminación en productos cárnicos fermentados por *S. aureus* depende fundamentalmente de las materias primas empleadas y de la manipulación durante el procesado. Drosinos y col., (2005) y Lebert y col., (2007) no encontraron presencia de *S. aureus* durante la elaboración y maduración de embutidos fermentados, en cambio, Garriga y col., (2005) detectaron *S. aureus* en el 5,9% de las muestras que estudiaron. Previo a nuestro estudio, Ammor y col., 2006 estudiaron la inhibición en el crecimiento de *S.aureus* por parte de numerosas cepas de bacterias ácido lácticas, encontrando que sólo tres cepas de *Lactococcus garvieae* mostraban actividad antimicrobiana González-Fandos y col., (1994) y Schillinger y Lücke, (1991) también han investigado la inhibición que produce el crecimiento de las bacterias lácticas sobre el de *S. aureus*.

En la Figura V.19 puede observarse la actividad antibacteriana de los extractos de embutidos de nuestro estudio frente a *Listeria monocytogenes* CECT 911. En ella puede observarse que la actividad frente a este patógeno fue prácticamente inexistente, con valores

máximos del 7% de inhibición en los salchichones elaborados en el ensayo con la proteasa EPg222.

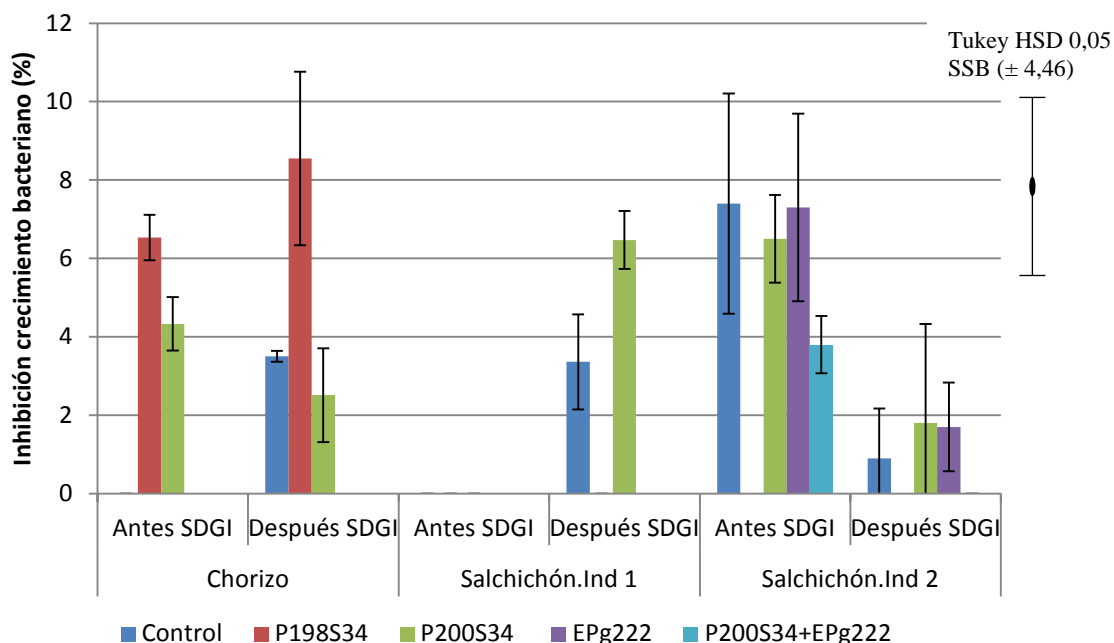


Figura V.19. Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos al final de la maduración de los embutidos elaborados contra *Listeria monocytogenes* CECT 911, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Estos resultados indican que los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular no son los responsables de la inhibición de *L. monocytogenes*. Además, diferentes autores han investigado la influencia de las bacterias ácido lácticas en la inhibición de *L. monocytogenes* comprobando que esta inhibición tiene lugar debido a la producción de bacteriocinas (Callewaert y col., 2000; Hugas, 1998; Hugas y Monfort, 1997; Hugas y col., 2003; Johnson y col., 1990; Jones y col., 2008; Mataragas y col., 2003; Schöbitz y col., 1999; Tantillo y col., 2002).

Finalmente, los resultados de la inhibición obtenida con los extractos de los distintos lotes contra *Bacillus cereus* CECT 131 se muestran en la Figura V.20. Como ocurre con el resto de microorganismos patógenos, a lo largo de la maduración de los embutidos no apareció inhibición de *Bacillus cereus* en ninguno de los embutidos elaborados. Sin embargo, al final de la maduración, los extractos obtenidos inhibieron el claramente el crecimiento del

microorganismo, alcanzándose valores entre el 20% y el 25 % de inhibición, el mayor porcentaje de inhibición obtenido con los diferentes microorganismos ensayados.

Únicamente el extracto del lote control del salchichón elaborado en el ensayo con la proteasa EPg222 presentó una actividad significativamente menor al resto de extractos estudiados.

Tras la SDGI, los valores de todos los extractos se mantuvieron exceptuando la actividad presente en los dos lotes de salchichones inoculados con el cultivo iniciador P200S34, que sufrieron una disminución significativa.

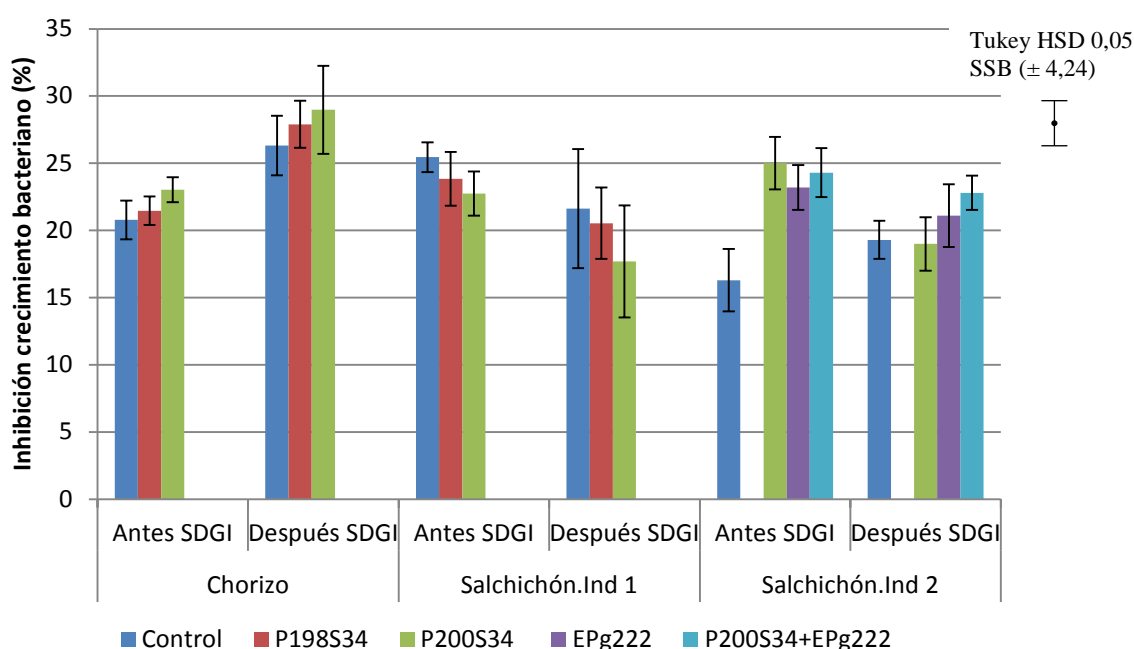


Figura V.20. Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos al final de la maduración de los embutidos elaborados contra *Bacillus cereus* CECT 131, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Es interesante la alta inhibición obtenida sobre *B. cereus* ya que pocos compuestos producidos por las bacterias ácido lácticas son efectivos frente al género *Bacillus* (Lücke, 2000). Además, se ha aislado *Bacillus cereus* de diferentes tipos de alimentos, incluyendo carne fresca y productos cárnicos (Konuma y col., 1988; Giffel y col., 1996; Van Netten y col., 1990), y aparece con facilidad en los embutidos debido a que crece a temperaturas entre 5 y 55°C, a pH de 4,5 a 9,3 y soporta hasta el 7,5% de sal. Asimismo, el alto predominio de las especies de *Bacillus* en productos cárnicos comparados con la carne fresca (Konuma y

col., 1988; Kramer y Gilbert, 1989), confirma el papel que juegan los aditivos cárnicos utilizados, especias, sal y/o aliños, como fuente de contaminación. Giffel y col. (1996) analizaron todas las especias y aliños que se añadieron a distintos productos cárnicos, encontrando que todas estaban contaminadas con *B. cereus* y *B. subtilis*. Sin embargo, en los productos en los que estos agentes fueron usados como aditivos, *B. cereus* fue el microorganismo encontrado. Por otro lado, se ha demostrado que la producción de tóxina es mayor a 12-15°C que a 30°C (Finlay y col., 2000). Todo esto hace de *B. cereus* un riesgo microbiológico a tener en cuenta en los productos cárnicos curados (Borch y Arinder, 2002).

En conclusión, se observa que los extractos no presentaron actividad antibacteriana hasta el final de la maduración de los embutidos, presumiblemente debido al mayor tiempo de maduración y por tanto, a la mayor hidrólisis proteica y un incremento en la generación de diferentes compuestos nitrogenados. Por otro lado, es evidente que las muestras que presentan las mayores actividades son las obtenidas con los embutidos inoculados con la enzima EPg222 y el cultivo iniciador P200S34, juntos o separados. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Casquete y col. (2011, 2012b), en cuyo estudio demostró que el uso de cultivos iniciadores autóctonos tiene efecto sobre la flora microbiana presente en los embutidos así como disminuía la presencia de microorganismos patógenos a lo largo de la maduración. Además, al igual que en nuestro estudio, se observó que el cultivo iniciador P200S34 era el que mayor inhibición en el crecimiento de patógenos producía.

V.9.- IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS MEDIANTE HPLC-ESI-MS.

El análisis de los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular obtenidos de los distintos lotes de embutidos elaborados, al final de la maduración y tras la simulación de la digestión gastrointestinal, permitió detectar un total de 22 componentes mayoritarios, 13 de los cuales fueron potencialmente identificados (Tablas V.1 y V.2). Los extractos se constituían principalmente por compuestos endógenos de la carne y sus productos de degradación (6) pero también por pequeños compuestos de naturaleza peptídica (9), amino ácidos libres (6) y aminas biógenas (1) procedentes de la degradación de las proteínas de la carne. Muchos de los compuestos nitrogenados han sido descritos como componentes

mayoritarios de la fracción de NNP de productos cárnicos, incluyendo los embutidos fermentados (Broncano y col., 2012).

Los compuestos nitrogenados naturales fueron los más abundantes en los perfiles de los extractos de los embutidos elaborados en la industria 1 (Tabla V.1). En estos embutidos, este grupo de compuestos incluye como mayores componentes la creatina (20,33-18,42% del total) y la creatinina (24,22-13,32% del total), este último derivado de la degradación de la creatina. Estos compuestos junto a la carnosina (9,45-7,97% del total) fueron los más abundantes en ambos embutidos al final del proceso de maduración. Por el contrario, en los salchichones elaborados en la industria 2, con el procesado más largo, este grupo de compuestos fue el menos abundante. Debido al mayor tiempo de maduración y a la alta acción proteolítica producida por la proteasa EPg222 y el cultivo iniciador, los compuestos nitrogenados naturales en la carne fueron degradados a aminoácidos libres y otros compuestos nitrogenados (Benito y col., 2007; Casquete y col., 2011a,b; 2012b; Martín y col., 2007). A pesar de esto, la carnosina fue el compuesto más abundante (10,73% del total). Tras la simulación de la digestión gastrointestinal, este grupo siguió siendo el más abundante en los embutidos de la industria 1 (Tabla V.2) y, del mismo modo que anteriormente, la creatinina (16,65-21,07% del total), la creatina (20,26-18,58% del total) y la carnosina (6,12-7,65% del total) fueron los compuestos en mayor concentración. Sin embargo, en los salchichones de la industria 2 la creatina (15,3% del total) superó a la carnosina (7,43% del total).

Tabla V.1. Compuestos nitrogenados detectados por HPLC-ESI-MS en los extractos de los embutidos obtenidos al final del proceso de maduración.

Tr ¹	Cd ²	Compuesto	ID ₃	m/z ⁴	Fragmentos	Chorizo.Industria 1 ⁵				Salchichón.Industria 1 ⁵				Salchichón.Industria 2 ⁵			
						Min	Max	Media	DTE	Min	Max	Media	DTE	Min	Max	Media	DTE
Componentes naturales						59,00				48,57				19,33			
1.9	N1	Taurina	a	126,1	109,1; 126,1	0,82	1,91	1,37	0,41			<1		0,84	1,35	1,09	0,19
2.37	N2	Carnosina	b	227,1	227,1; 210,1	4,81	14,09	9,45	3,18	5,33	12,70	7,97	2,64	7,79	11,86	10,73	1,20
2.49	N3	Anserina	b	241,1	241,1; 170,1	1,20	3,78	2,25	0,84	1,43	3,60	2,35	0,60	0,74	1,39	0,98	0,17
2.54	N4	Carnitina	a	162,1	162,1	0,57	2,23	1,38	0,47	5,21	9,14	6,51	1,08	4,28	8,26	6,53	1,41
2.8	N5	Creatina	b	132,1	132,1; 115,1	16,10	39,67	20,33	7,38	13,44	27,41	18,42	4,54				n.d.
2.81	N6	Creatinina	b	114,1	114,1	16,21	37,31	24,22	6,62	9,21	20,04	13,32	3,39				n.d.
Aminoácidos y aminas						17,49				15,55				46,2			
2.17	A1	Lisina	a	147,1	130,1; 147,1	1,27	3,76	2,47	0,82	2,61	6,53	4,73	1,22	1,79	7,28	5,14	1,50
2.56	A2	Prolina	a	116,1	116,1	3,83	6,46	4,57	0,82	6,11	10,39	8,13	1,57	2,36	9,65	5,58	2,11
6.29	A3	Metionina	a	150,1	133; 150,1	0,59	2,21	1,35	0,55			<1		0,72	2,45	1,64	0,56
14.1	A4	Isoleucina	a	132,1	132,1	0,49	1,99	1,21	0,54			<1		1,17	20,25	10,87	6,21
15.24	A5	Leucina	a	132,1	132,1	1,25	4,24	2,93	0,95	0,62	2,12	1,2	0,58	1,19	23,70	18,35	6,56
16.31	A6	Tiramina	a	121,1	121,1; 138,1	2,42	5,76	3,97	1,26	0,54	2,07	1,50	0,49				<1
31.09	A7	Fenilalanina	a	166,1	120,1; 166,1	0,00	2,04	0,99	0,83			<1		3,15	7,91	4,61	1,49
Posibles péptidos y otros compuestos						25,64				37,58				20,8			
2.1	P1	Compuesto 1	c	190,9	190,9; 478,9; 614,9; 750,9	2,69	7,28	3,50	1,43	3,41	6,22	4,44	0,81	0,76	8,39	3,34	2,46
2.15	P2	Compuesto 2	c	118,1	118,1; 203,1	7,07	12,75	10,34	2,24	3,85	7,77	5,61	1,17	7,10	13,63	9,89	2,25
2.23	P3	Compuesto 3	c	365,1	365,1	0,89	4,09	1,51	1,02	2,19	3,65	2,77	0,51	0,68	3,30	1,89	0,61
3.16	P4	Compuesto 4	c	146,1	146,1			<1		1,74	3,13	2,24	0,52				n.d.
3.36	P5	Compuesto 5	c	277,1	227,1; 407,1; 504,1			<1		1,15	3,15	1,92	0,52				n.d.
4.7	P6	Compuesto 6	c	124,1	124,1			<1		6,55	9,49	7,82	0,84				<1

5.63	P7	Compuesto 7	c	159,1	159;1 295,1	2,79	6,90	3,92	1,20	4,38	6,47	5,16	0,70					n.d.
5.93	P8	Compuesto 8	c	137,1	137,1	4,91	9,57	6,37	1,46	2,61	7,75	4,85	1,47	2,66	11,12	5,15	2,44	
7.28	P9	Compuesto 9	c	205,1	204,1			<1		1,63	3,34	2,77	0,48					<1

n.d.: No detectado

¹ Tiempo de retención

² Nomenclatura utilizada en el análisis de componentes principales

³ Niveles de identificación: a: Estándar; b: base de datos del “mass bank” (<http://www.massbank.jp>); c: compuestos sin identificar

⁴ Fragmento iónico más abundante.

⁵ Valores expresados en porcentajes del fragmento iónico principal del compuesto nitrogenado detectado.

Otro grupo de compuestos nitrogenados incluye los aminoácidos y aminas. Los aminoácidos libres Lys, Leu, Ile, Pro, Met, y Phe, detectados en los extractos estudiados, se han descrito como uno de los compuestos más abundantes derivados de la actividad proteolítica durante el proceso de fermentación de los embutidos (Benito et al 2005; Leggio et al., 2012). También se detectó amina biogénica tiramina, que se produce principalmente por descarboxilación microbiana de los aminoácidos libres que se forman durante el proceso de maduración (Suzzi y Gardini, 2003). Este grupo de compuestos fue el más abundante en los extractos obtenidos de los salchichones elaborados en la industria 2 (Tabla V.1). Además, cabe destacar que la cantidad de tiramina que se detectó fue del 0,01%. La concentración de este grupo de compuestos, tras la simulación de la digestión gastrointestinal, aumentó en todos los embutidos estudiados (29,5%, 25,15% y 55,27% en chorizos y salchichón elaborados en la industria 1, y salchichón de la industria 2, respectivamente) (Tabla V.2).

Finalmente, el grupo de presuntos péptidos (un total de nueve compuestos) al final de la maduración de los embutidos representó el 25,64%, el 37,58% y el 20,8% del total del chorizo y salchichón de la industria 1 y el salchichón de la industria 2, respectivamente (Tabla V.1). Los compuestos con m/z 191, 118, 365 y 137 se encuentran en cantidades relevantes en todos los embutidos elaborados, mientras que el compuesto con m/z 159 sólo aparece en cantidades notables en los embutidos (chorizo y salchichón) elaborados en la industria 1. Los compuestos con m/z 146, 277, 124, y 205 solo se detectaron claramente en las muestras de salchichón elaborado en la industria 1, con el procesado corto. Al llevar a cabo la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* se observó una disminución en la cantidad de compuestos incluidos en estos grupos y solo los compuestos con m/z 191, 118 y 137 aparecieron en los extractos de los tres embutidos elaborados. El compuesto denominado P3 sólo fue detectado en cantidades relevantes en el salchichón elaborado en la industria 1 mientras que los compuestos P4 (m/z 146), P7 (m/z 159) y P9 (m/z 204) sólo se apreciaron en los chorizos. Finalmente, el compuesto con m/z 277 no se detectó en cantidades apreciables en ninguno de los extractos.

Tabla V.2. Compuestos nitrogenados detectados por HPLC-ESI-MS en los extractos de los embutidos obtenidos al final del proceso de maduración, tras la simulación de la digestión gasrointestinal

Tr ¹	Cd ²	Compuesto	ID ₃	m/z ⁴	Fragmentos	Chorizo.Industria 1 ⁵				Salchichón.Industria 1 ⁵				Salchichón.Industria 2 ⁵			
						Min	Max	Media	DTE	Min	Max	Media	DTE	Min	Max	Media	DTE
Componentes naturales						43,64				51,75				26,29			
1.9	N1	Taurina	a	126,1	109,1; 126,1			n.d.			<1			<1			
2.37	N2	Carnosina	b	227,1	227,1; 210,1	4,91	8,10	6,12	0,88	4,59	9,81	7,65	1,94	5,29	9,79	7,43	1,27
2.49	N3	Anserina	b	241,1	241,1; 170,1			n.d.				n.d.				<1	
2.54	N4	Carnitina	a	162,1	162,1	2,93	7,98	5,38	1,47	3,57	5,17	4,45	0,51	2,66	4,98	3,55	0,65
2.8	N5	Creatina	b	132,1	132,1; 115,1	9,07	20,26	15,49	4,41	15,30	24,07	18,58	2,73	12,44	23,52	15,31	3,13
2.81	N6	Creatinina	b	114,1	114,1	11,76	27,56	16,65	6,27	15,23	24,28	21,07	2,98				n.d.
Aminoácidos y aminas						29,5				25,15				55,27			
2.17	A1	Lisina	a	147,1	130,1; 147,1	12,93	16,42	14,45	1,31	6,63	12,30	9,14	1,84	6,93	12,18	9,44	1,92
2.56	A2	Prolina	a	116,1	116,1	3,96	6,33	5,18	0,75	1,92	2,74	2,28	0,37	0,42	11,55	3,23	3,64
6.29	A3	Metionina	a	150,1	133; 150,1	1,09	2,01	1,61	0,28	1,28	2,53	1,87	0,42	0,33	6,36	2,26	1,59
14.1	A4	Isoleucina	a	132,1	132,1			<1		1,12	14,43	3,51	3,40	0,00	31,40	10,94	9,35
15.24	A5	Leucina	a	132,1	132,1	0,00	8,51	1,02	2,87	6,40	15,97	5,92	3,46	0,00	34,75	18,47	9,63
16.31	A6	Tiramina	a	121,1	121,1; 138,1			n.d.		1,36	3,58	2,43	0,79	2,68	4,81	3,50	0,58
31.09	A7	Fenilalanina	a	166,1	120,1; 166,1	5,36	8,73	7,24	1,27					0,86	9,19	7,43	2,18
Posibles péptidos y otros compuestos						25,26				18,89				16,79			
2.1	P1	Compuesto 1	c	190,9	190,9; 380,9; 478,9; 614,9; 750,9	2,57	7,49	4,13	1,47	1,95	3,72	2,43	0,54	0,78	2,95	1,80	0,69
2.15	P2	Compuesto 2	c	118,1	118,1; 203,1	8,57	11,84	10,07	1,07	7,72	12,35	10,48	1,76	0,94	11,70	9,74	2,90
2.23	P3	Compuesto 3	c	365,1	365,1			n.d.		1,54	2,87	2,04	0,43	0,70	4,55	2,15	1,07
3.16	P4	Compuesto 4	c	146,1	146,1	1,88	10,92	4,31	3,37			<1					n.d.
3.36	P5	Compuesto 5	c	277,1	227,1; 407,1; 504,1			<1				n.d.					n.d.

4.7	P6	Compuesto 6	c	124,1	124,1	1,36	3,66	2,43	0,76			n.d.	0,00	2,33	1,55	0,57	
5.63	P7	Compuesto 7	c	159,1	159,1 295,1	1,32	2,44	1,68	0,35			n.d.			n.d.		
5.93	P8	Compuesto 8	c	137,1	137,1	0,48	2,86	1,62	0,81	2,42	5,26	3,94	0,92	0,00	2,33	1,55	0,57
7.28	P9	Compuesto 9	c	205,1	204,1	0,48	1,70	1,02	0,48			<1				<1	

n.d.: No detectado

¹ Tiempo de retención

² Nomenclatura utilizada en el análisis de componentes principales

³ Niveles de identificación: a: Estándar; b: base de datos del “mass bank” (<http://www.massbank.jp>); c: compuestos sin identificar

⁴ Fragmento iónico más abundante.

⁵ Valores expresados en porcentajes del fragmento iónico principal del compuesto nitrogenado detectado.

Para considerar de forma general la relación de los compuestos nitrogenados identificados en los extractos peptídicos con las actividades estudiadas (actividad antioxidante, actividad inhibidora de la ECA, actividad antiproliferativa y actividad antibacteriana frente a *B. cereus*), se realizó un análisis de componentes principales (ACP) englobando el total de muestras del estudio obtenidas al final de la maduración (Figura V.21).

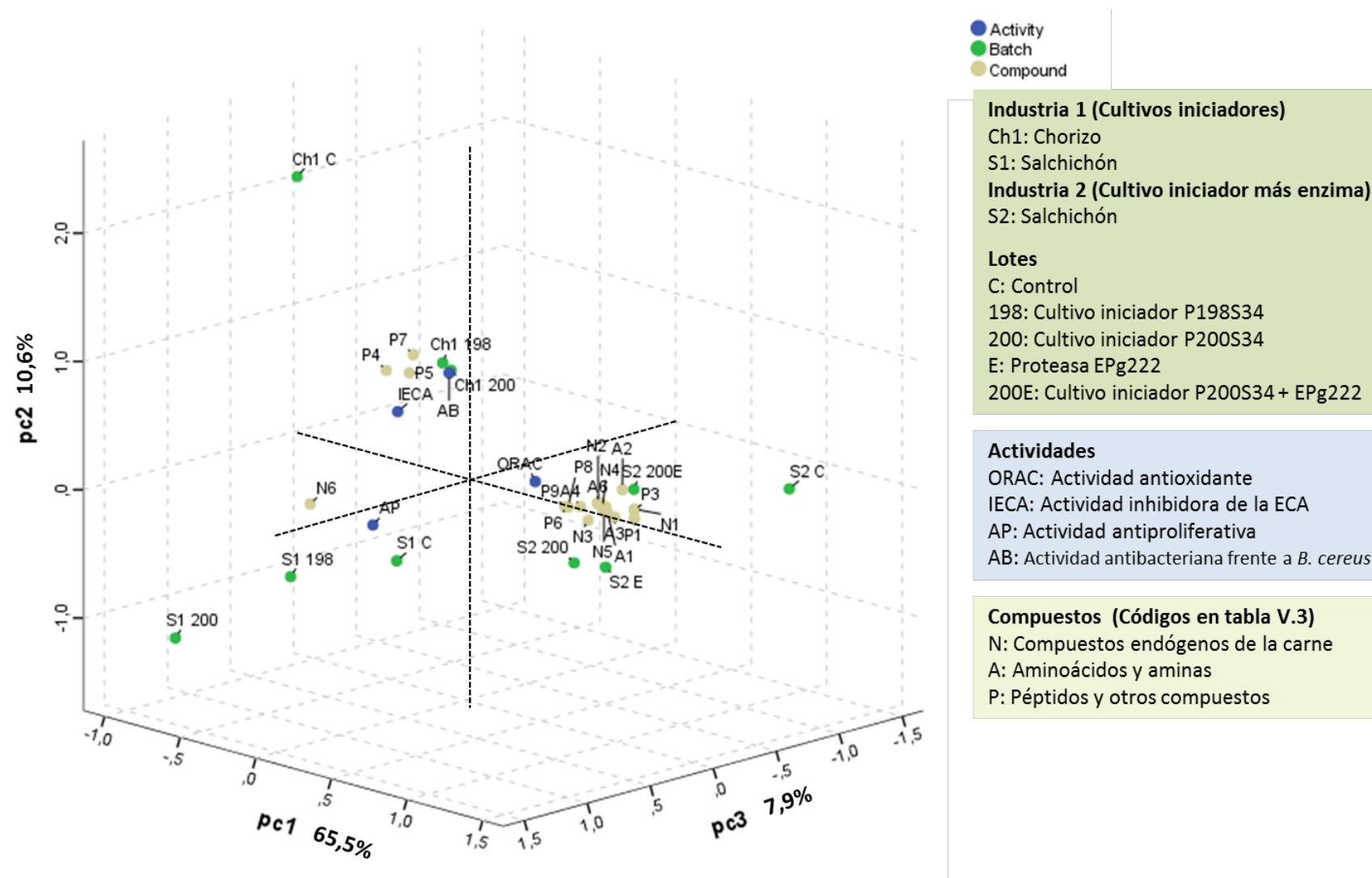
El componente principal 1 (PC1), que explicó el 65,5 % de la varianza del modelo, se relacionó positivamente con la mayoría de los compuestos identificados. Varios de los mismos mostraron una correlación significativa con la actividad antioxidante de los extractos. Es el caso de compuestos de naturaleza endógena como la carnosina (N2), aminoácidos como la lisina (A1), la metionina (A3) o aminas como la tiramina (A6). Todos ellos presentaron coeficientes de correlación (r) con la actividad antioxidante superiores a 0,730 ($p < 0,001$). También algunos compuestos de naturaleza peptídica como los denominados P6 (m/z 124,1), P8 (m/z 137,1) y P9 (m/z 205,1) se correlacionaron positivamente con dicha actividad. La carnosina es un histidil dipéptido y es uno de los antioxidantes naturales más relevantes de la carne fresca (Arihara, 2006; Guiotto y col., 2005; Wu y col., 2003). Por otro lado, los efectos antioxidantes de la tiramina han sido descritos como comparables a los del α -tocoferol (Yen y Hsieh, 1997). Además, algunos de estos compuestos peptídicos que se relacionan con la actividad antioxidante (m/z 137 y 205) han sido descritos por otros autores como compuestos antioxidantes de bajo peso molecular en chorizos (Broncano y col., 2012). La mayor abundancia de estos compuestos fue encontrada en las muestras de salchichón correspondientes a la industria 2, en especial en las muestras de lotes inoculados con P200S34 y la enzima EPg222 de manera individual o conjunta asociados a una mayor actividad proteolítica.

En el caso de los extractos de los lotes de chorizo de la industria 1, son los inoculados con los cultivos iniciadores P198S34 y P200S34 los que muestran una mayor cantidad de compuestos péptidos como el P4, P5 y P7, explicados principalmente por el PC2 (10,6% de la varianza del modelo). Estos compuestos se correlacionan de manera significativa con la actividad inhibidora de la ECA y con la moderada actividad antimicrobiana de los extractos hacia *B. cereus*. En estudios anteriores, se han identificado numerosos péptidos cuyas secuencias incluyen entre tres y diez aminoácidos obtenidos de hidrolizados de carne con actividad inhibidora de la ECA (Alemán y col., 2013; Jang y Lee, 2005; Sentandreu y Toldrça, 2007). Así, Arihara y col., (2001) identificaron hasta seis tripéptidos en cuya

secuencia incluían aminoácidos como la lisina, la prolina o la metionina, con una potente actividad inhibidora de la ECA. Más recientemente, Escudero y col., (2012b) aislaron e identificaron un tripéptido y dos decapeptidos a partir de jamón curado, que presentaban actividad inhibidora de la ECA. Sin embargo, no son muchos los péptidos inhibidores del crecimiento bacteriano identificados a partir de matrices cárnicas.

Por otra lado la PC3, que explica el 7,9% de la variabilidad del modelo, se asocia a la actividad antiproliferativa, más intensa en los extractos de los lotes de salchichón de la industria 1. Dicha actividad no muestra correlación con ninguno de los compuestos nitrogenados identificados pudiéndose atribuir la misma a compuestos minoritarios no identificados durante en análisis. En otros tipos de matrices proteicas, han sido identificados compuestos nitrogenados de bajo peso molecular con actividad antiproliferativa. En hidrolizados de carne de atún rojo, Hsu y col., (2011) encontraron que la fracción de compuestos con pesos moleculares comprendidos entre 390 y 1400 Da, era la que mayor grado de actividad antiproliferativa presentaba. Del mismo modo, Alemán y col.,(2013) hidrolizaron gelatina de calamar observando que el hidrolizado que mayor actividad presentaba era una combinación de compuestos con pesos moleculares entre 500 y 1400 Da.

Figura V.21. Representación de los compuestos nitrogenados y de las muestras de extracto peptídico de las industrias 1 y 2 al final de la maduración en el espacio definido por las componentes 1, 2 y 3 del análisis factorial.



Estos resultados corroboran el papel de los cultivos iniciadores ensayados y del enzima EPg222 en la generación de compuestos nitrogenados con efectos saludables en embutidos de cerdo Ibérico. Si bien, también ponen de manifiesto la importancia del procesado y tipo de embutido en la producción de estos compuestos, discriminándose en el ACP de forma clara los lotes pertenecientes al mismo embutido. Queda probado a lo largo del estudio la importancia en el papel antioxidante de los extractos péptidicos (digeridos y sin digerir) de varios compuestos tanto de naturaleza endógena (carnosina, anserina, entre otros) como provenientes de la proteólisis (lisina, metionina, tiramina, entre otros).

Respecto a la actividad inhibidora de la ECA, más patente en los extractos de chorizo (industria 1) inoculados, su correlación con varios péptidos (P4, P5 y P7) en los extractos digeridos se manifiesta tanto en el análisis de los datos referidos a este embutido (chorizo de la industria 1) como en el estudio global de los mismos.

La correlación del resto de actividades ensayadas (actividad antimicrobiana y actividad antiproliferativa) con los compuestos identificados no es clara, pudiéndose deber las mismas a diversos compuestos nitrogenados minoritarios, los cuales pueden variar en función de los factores estudiados (tipo de embutido, inoculación de cultivo iniciador y enzima EPg222 o digestión del extracto). De hecho, en el estudio de los extractos digeridos del salchichón de la industria 2 (con un gran peso de los aminoácidos en el perfil de compuestos identificados), actividad antiproliferativa se vinculó a una mayor cantidad de lisina y prolina.

VI.- CONCLUSIONES

PRIMERA

Los dos tipos de embutidos elaborados con los cultivos iniciadores P198S34 y P200S34 mostraron una alta actividad proteolítica a lo largo del proceso de maduración. Una tendencia similar mostraron los lotes inoculados con la enzima EPg222. Se ha constatado que esta intensa proteólisis deriva en una elevada proporción de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular. La simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* mostró que los compuestos nitrogenados presentes en los extractos obtenidos de los chorizos fueron sensibles a la acción de las enzimas digestivas mientras que los compuestos generados durante la maduración de los salchichones fueron resistentes a la misma. En ambos casos, las concentraciones finales de compuestos nitrogenados presentes en los extractos fueron elevadas.

SEGUNDA

El análisis de la actividad inhibidora de la enzima convertora de la angiotensina I reveló una mayor actividad en los lotes, tanto de salchichones como de chorizos, elaborados con el cultivo iniciador P200S34 en la industria 1. En cuanto a los salchichones elaborados en la industria 2, el ensayo mostró que el máximo de actividad se conseguía a los 65 días de maduración, destacando el lote elaborado con la proteasa EPg222 y la combinación de esta con el cultivo iniciador P200S34. Esta actividad se encontró más asociada a los lotes de chorizos elaborados en la industria 1 y a los compuestos nitrogenados P4, P5 y P7. Por otro lado, en los lotes de salchichones no ha podido asociarse a ninguno de los compuestos nitrogenados mayoritarios encontrados en los extractos obtenidos al final de la maduración, por lo que la inhibición de la enzima convertora de la angiotensina I detectada se atribuye a otros compuestos sin identificar que se encuentran en los extractos en concentraciones minoritarias.

TERCERA

La inoculación de cultivos iniciadores bien adaptados con alta actividad proteolítica aumentó la actividad antioxidante en los extractos de embutidos estudiados, debido no solo a un aumento en aminoácidos libres y aminas tales como lisina, metionina y tiramina, sino también a los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular P6, P8 y P9 detectados entre los componentes mayoritarios de los extractos. Destacan los lotes de salchichón inoculados con el cultivo iniciador P200S34 en la industria 1, así como los lotes que contenían la enzima EPg222, sola o en combinación con el cultivo iniciador,

en la industria 2. Por tanto, el uso de estos cultivos iniciadores en embutidos ibéricos puede contribuir a retrasar cambios oxidativos durante el almacenamiento.

CUARTA

La mayor actividad antiproliferativa frente al crecimiento de células tumorales de colón Caco-2 la presentaron los lotes de salchichones elaborados en ambas industrias, apreciándose una clara relación positiva entre el grado de actividad y el tiempo de incubación de las células con los compuestos nitrogenados. Destacan los lotes inoculados con el cultivo iniciador P200S34 en la industria 1, y con la proteasa EPg222, en combinación o separada del cultivo iniciador P200S34, en la industria 2, en los que la inhibición del crecimiento celular se asoció con aminoácidos libres como la lisina, prolina y metionina.

QUINTA

La actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas no apareció en los extractos de compuestos nitrogenados hasta el final del proceso de maduración de los embutidos. La mayor inhibición se observó sobre el crecimiento de *Bacillus cereus*, siendo los lotes de embutidos que contienen el cultivo iniciador P200S34 y la proteasa EPg222 los que provocaron las mayores inhibiciones sobre el crecimiento de los microorganismos patógenos, haciendo de estos una herramienta prometedora para el control biológico en la industria cárnica. Además, se ha constatado una correlación entre la actividad inhibidora del crecimiento de *B. cereus* y los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular P4, P5 y P7.

SEXTA

La realización de la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre los extractos obtenidos en ambas industrias y en ambos productos no produjo disminución de las actividades funcionales, haciendo que estas se mantuvieran e incluso en algunos casos aumentaran significativamente. Esto se relaciona con el hecho de que estas actividades están asociadas a compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, como los aminoácidos libres, que son resistentes o pueden ser liberados por la acción de las enzimas digestivas a partir de péptidos de mayor peso molecular

SÉPTIMA

Dado que el uso de la enzima EPg222 en asociación con el cultivo iniciador P200S34 mejora las características sensoriales, su uso en la elaboración de productos cárnicos curados podría ser de gran importancia debido a su probada capacidad para producir compuestos con excelentes actividades biológicas, tales como actividad inhibidora de la ECA, antioxidante, antiproliferativa y antimicrobiana.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, A.M., Higashiguchi, S., Aboueleinin, A.M., Kim, M. y Ibrahim, H.R. (2007). *Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against Bacillus species*. Food Control, 18(2), 173-178.
- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T. (1998). *Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion*. Journal of Dairy Science, 81, 3131-3138.
- Adams, M.R. y Moss, M.O. (1997). *Fermented flesh foods*. Microbiología de los alimentos. Acribia, Zaragoza. España.
- Adje, E.Y., Balti, R., Guillochon, D. y Nedjar-Arroume, N. (2011). *α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides*. European Food Research and Technology, 232(4), 637-646.
- Agawa, Y., Lee, S., Ono, S., Aoyagi, H., Yanoguchi, T., Anzai, K. y Kirino, Y. (1991). *Interaction with phospholipid bilayers: ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipatic α -helical model peptides of various chain lengths*. Journal of Biological Chemistry, 296, 20218-20222.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M.C. y Montero, P. (2011). *Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity*. Food Research International, 44, 1044-1051.
- Alemán, A., Gómez-Guillén, M.C. y Montero, P. (2013). *Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after in vitro gastrointestinal digestión*. Food Research International, 54, 790-795.
- Amarowicz, R. y Shahidi, F. (1997). *Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates*. Food Chemistry, 58(4), 355-359.
- Amarowicz, R., Karamac, M. y Shahidi, F. (1999). *Synergistic activity of capelin protein hydrolysates with synthetic antioxidants in a model system*. Journal of Food Lipids, 6(4), 271-275.
- Ammor, M.S. y Mayo, B. (2007). *Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update*. Meat Science, 76, 138-146.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. y Chevallier, I. (2006). *Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the*

- same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds.* Food Control, 17(6), 454-461.
- Andersen, H.J. y Hinrichsen, L.L. (1995). *Changes in curing agents, microbial counts and volatile compounds during processing of green bacon using two different production technologies.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 68, 477-487.
- Andersen, H. J., Ostdal, H. y Blom, H. (1995). *Partial purification and characterization of a lipase from Lactobacillus plantarum Mf32.* Food Chemistry, 53, 369-373.
- Ansorena, D., Montel, M.C., Rokka, M., Talon, R.M., Erola, S., Rizzo, A., Raemaekers, M. y Demeyer, D. (2002). *Analysis of biogenic amines in noethern and southern European sausages and role of flora in amine production.* Meat Science, 61, 141-147.
- AOAC (2005). *Official Methods of Analysis, nineteenth ed.* Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.
- APHA, (1976). *Recomended Methods for the microbiological examinations of foods.* American Public Health Association. Washington. USA.
- Arihara, K. (2006). *Strategies for desinging novel functional meat products.* Meat Science, 74, 219-229.
- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. y Itoh, M. (2001). *Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins.* Meat Science, 57, 319-324.
- Arihara, K., Nakashima, Y., Ishikawa, S. y Itoh, M. (2004). *Antihypertensive activities generated from porcine skeletal muscle proteins by lactic acid bacteria.* En: Abstracts of 50th international congress of meat science and technology (p. 236), 8-13. Agosto 2004. Helsinki, Finlandia.
- Arihara, K., Tomita, K., Ishikawa, S., Itoh, M., Akimoto, M. y Sameshima, T. (2005). *Anti-fatigue peptides derived from meat proteins.* Patente japonesa.
- Ariyoshi, Y. (1993). *Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins.* Trends in Food Science & Technology, 4, 193-144.
- Armstrong, W.B., Kennedy, A.R., Wan, X.S., Taylor, T.H., Nguyen, Q.A., Jensen, J., Thompson, W., Lagerberg, W. y Meyskens, F.L. (2000). *Clinical modulation of*

- oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. Clinical Cancer Research, 6(12), 4684-4691.*
- Armstrong, W. B., Wan, X. S., Kennedy, A. R., Taylor, T. H., & Meyskens, F. L. (2003). *Development of the Bowman-Birk inhibitor for oral cancer chemoprevention and analysis of Neu immunohistochemical staining intensity with Bowman-Birk inhibitor concentrate treatment. Laryngoscope, 113, 1687-1702.*
- Aro Aro, J.M., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K., Fukushima, M. y Sekikawa, M. (2010). *The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. Food Chemistry, 119, 279-285.*
- Asakura, K., Kojima, T. y Shirasaki, K. (1990). *Evaluation of the effects of antigen specific immunotherapy on chronic sinusitis in children with allergy. Auris Nasus Larinx, 17, 33-38.*
- Ashar, M.N. y Chand, R. (2004). *Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. Milchwissenschaft, 59, 363-366.*
- Astawan, M., Wahyuni, M., Yasuhara, T., Yamada, K., Tadokoro, T. y Maekawa, A. (1995). *Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59, 425-429.*
- Astiasarán, I., Redin, R., Cid, C., Iriarte, J. y Bello, J. (1993). *Comparison of dry sausages produced by different methods: adition of nitrite/nitrate salts and sodium chloride at different phases. Meat Science, 34, 255-260.*
- Atanassova, V., Meindl, A. y Ring, C. (2001). *Prevalence of Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. International Journal of Food Microbiology, 68(1), 105-113.*
- Azuma, N., Nagaune, S., Ishino, Y., Mori, H., Kaminogawa, S. y Yamauchi, K. (1989). *DNA-synthesis stimulating peptides from human β -casein. Agricultural Biology and Chemistry, 53, 2631.*

- Azuma, N., Machida, K., Saeki, T., Kanamoto, R. y Iwami, K. (2000). *Preventive effect of soybean resistant proteins against experimental tumorigenesis in rat colon*. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 46, 23-29.
- Bachiega, P., Salgado, J.M., Carvalho, J.E., Ruíz, A.L.T.G. Schwarz, K., Tezotto, T. y Morzelle, M.C. (2016). *Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (Brassica oleracea Italica) biofortified with selenium*. Food Chemistry, 190, 771-776.
- Bagchi, D. (2006). *Nutraceuticals and functional foods regulations in the United States and around the world*. Toxicology, 221(1), 1.
- Baka, A.M., Papavergou, E.J., Pragalaki, T., Bloukas, J.G. y Kotzekidou, P. (2011). *Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages*. Food Science and Technology, 44, 54-61.
- Balti, R., Bougatef, A., Sila, A., Guillochon, D., Dhulster, P. y Nedjar-Aroume, N. (2015). *Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (Sepia officinalis) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats*. Food Chemistry, 170, 519-525.
- Barbieri, G., Bolzon, L., Palolari, G., Virgilli, R., Careri, M. y Mangia, A. (1992). *Flavor compounds of dry-cured ham*. Journal Agricultural and Food Chemistry, 40, 2389-2394.
- Bauchard, C., Rémond, D., Chambon, C., Patureau Mirand, P., Savary-Auzeloux, I., Reynès, C. y Morzel, M. (2006). *Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat*. Meat Science, 74, 658-666.
- Bax, M.L., Sayd, T., Aubry, L., Ferreira, C., Viala, D., Chambon, C., Rémond, D. y Santé-Lhoutellier, V. (2013). *Muscle composition slightly affects in vitro digestion of aged and cooked meat: Identification of associated proteomic markers*. Food Chemistry, 136(3), 1249-1262.
- Belem, M.A.F., Gibbs, B.F. y Lee, B.H. (1999). *Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites*. Journal of Dairy Science, 82, 486-493.

- Belitz, H. D. y Grosch, W. (1997). *Química de los Alimentos*. 2ª edición. Acribia, Zaragoza.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. y Tomita, M. (1992). *Identification of the bactericidal domain of lactoferrin*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1121, 130-136.
- Benito, M.J., (2002a). *Caracterización de una proteasa de Penicillium chrysogenum aislado de jamón curado y determinación de su efecto en carne y embutidos madurados*. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Benito, M. J., Rodríguez, M., Núñez, F., Asensio, M. A., Bermúdez, M. E., & Córdoba, J. J. (2002b). *Purification and characterization of an extracellular protease from Penicillium chrysogenum (Pg222) active against meat proteins*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3532–3536.
- Benito, M.J., Córdoba, J.J., Alonso, M., Asensio, M.A. y Núñez, F. (2003a). *Hydrolytic activity of Penicillium chrysogenum Pg222 on pork myofibrillar proteins*. *International Journal of Food Microbiology*, 89 (2-3), pp. 155-161.
- Benito, M.J., Rodriguez, M., Acosta, R. y Córdoba, J.J. (2003b). *Effect of the fungal extracellular protease EPg222 on texture of whole pieces of pork loin*. *Meat Science*, 65, 877-884.
- Benito, M.J., Rodriguez, M., Martín, A., Aranda, E. y Córdoba, J.J. (2004). *Effect of the fungal protease EPg222 on the sensory characteristics of dry fermented sausage “salchichón” ripened with commercial starter cultures*. *Meat Science*, 67, 497-505.
- Benito, M.J., Rodriguez, M., Córdoba, M.G. y Andrade, M.J. (2005a). *Effect of the fungal protease EPg222 on proteolysis and texture in the dry fermented sausage “salchichón”*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 273-280.
- Benito, M.J., Núñez, F., Córdoba, M.G., Martín, A., Córdoba, J.J (2005b). *Generation of non-protein nitrogen and volatile compounds by Penicillium chrysogenum Pg222 activity on pork myofibrillar proteins*. *Food Microbiology*, 22, 513-519.
- Benito, M.J., Connerton, I.F. y Córdoba, J.J. (2006). *Genetic characterization and expression of the novel fungal protease, EPg222 active in dry-cured meat products*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 356-365.

- 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 (6), M193-M201.
- Benito, M.J., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Pérez-Nevado, F. y Córdoba, M.G. (2008). *Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages*. Meat Science, 80, 656-661.
- Berdagué, J. L., Monteil, P., Montel, M. C. y Talon, R. (1993). *Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage*. Meat Science, 35, 275-287.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R. y Zalazar, C.A. (2006). *Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese*. International Dairy Journal, 16, 856-866.
- Bersani, C., Cantoni, C. y D'Aubert, S. (1991) *Observation of the coagulase negative staphylococci (CNS) present in dry sausages*. Industrie Alimentari, 30, 12-14.
- Beucher, S., Levenez, F., Yvon, M. y Corring, T. (1994). *Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat*. Journal of Nutritional Biochemistry, 5, 578-584.
- Bolumar, T., Nieto, P. y Flores, J. (2001). *Acidity, proteolysis and lipolysis changes in rapid cured fermented sausage dried at different temperatures*. Food Science and Technology International, 7, 269-276.
- 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., Flores, M., Aristoy, M. C., Toldrá, F. y Flores, J. (2006). *Sensory improvement of dry-fermented sausages by the addition of cell-free extracts from Debaryomyces hansenii and Lactobacillus sakei*. Meat Science, 72, 457-466.

- Borch, E. y Arinder, P. (2002). *Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures*. Meat Science, 62(3), 381-390.
- Borch, E., Nesbakken, T. y Christensen, H. (1996). *Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 30(1), 9-25.
- Bordoni, A., Laghi, L., Babini, E., Di Nunzio, M., Picone, G., Ciampa, A., Valli, V., Danesi, F. y Capozzi, F. (2014). *The foodomics approach for the evaluation of protein bioaccessibility in processed meat upon in vitro digestion*. Electrophoresis, 35(11), 1607-1614.
- Bover-Cid, S., y Holzapfel, W.H., (1999). *Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 59, 391-396.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., (2001a). *Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages*. International Journal of Food Microbiology, 66, 185-189.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., y Vidal-Carou, C. (2001b). *Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar*. Meat Science, 57, 215-221.
- Brandsch, M., Brust, P., Neubert, K. y Ermisch, A. (1994). *B-casomorphins – chemical signals of intestinal transport systems*. En β -casomorphins and Related Peptides: Recent Developments. Brantl, V. y Teschemacher, H. (eds). Weinheim: VCH, 297-219.
- Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A. y Lottspeich, F. (1979). *Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 360(2), 1211-1216.
- Bray, T.M. (2000). *Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress*. Nutrition, 16, 578-581.
- Broncano, J.M., Timón, M.L., Parra, V., Andrés, A.I. y Petró, M.J. (2011). *Use of proteases to improve oxidative stability of fermented sausages by increasing low molecular weight compounds with antioxidant activity*. Food Research International, 44, 2655-2659.

- Broncano, J.M., Otte, J., Petrón, M.J., Parra, V. y Timón, M.L. (2012). *Isolation and identification of low molecular weight antioxidant compounds from fermented "chorizo" sausages*. Meat Science, 90, 494-501.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C.T. y Sawyer, L. (1997). *Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still and enigmatic lipocalin*. Structure, 5, 481-495.
- Brule, G., Roger, L., Fauquant, J. y Piot, M. (1982). *Phosphopeptides from casein-based material*. United States Patent, 4, 358-465.
- Bruna, J.M., Fernández, M., Hierro, E.M., Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. (2000). *Combined use of pronase E and fungal extract (Penicillium aurantiogriseum) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages*. Meat Science, 54, 135-145.
- Bruna, J. M., Hierro, E. M., de la Hoz, L., Mottram, D. S., Fernandez, 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.
- Bukowski, R.M. (2003). *AE-941, a multifunctional antiangiogenic compound: trials in renal cell carcinoma*. Expert Opinion on Investigational Drugs, 12(8), 1403-1411.
- Bolumar, T., Nieto, P. y Flores, J. (2001). *Acidity, proteolysis and lipolysis changes in rapid cured fermented sausage dried at different temperatures*. Food Science and Technology International, 7, 269-276.
- Buckenhüskes, H.J. (1993). *Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities*. FEMS Microbiol. Rev. 12, 253-272.
- Burdock, G.A., Carabin, I.G. y Griffiths, J.C. (2006). *The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries*. Toxicology, 221, 17-27.
- Buscailhon, S., Berdagué, J. L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., Touraille, C. y Monin, G. (1994a). *Relations between compositional traits and sensory qualities of French dry-cured ham*. Meat Science, 37, 229-243.
- Buscailhon, S., Monin, G., Cornet, M. y Bousset, J. (1994b). *Time-related changes in nitrogen fractions and free amino acids of lean tissue of French dry-cured ham*. Meat Science, 37, 449-456.

- Calicioglu, M., Faith, N.G., Buege, D.R. y Luchansky, J.B. (2002). *Viability of Escherichia coli O157: H7 during manufacturing and storage of a fermented, semidry soudjouk-style sausage*. Journal of Food Protection®, 65(10), 1541-1544.
- Callewaert, R., Hugas, M. y De Vuyst, L. (2000). *Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages*. International Journal of Food Microbiology, 57(1), 33-42.
- Campbell-Platt, G. y Cook, P.E., (1995). *Fermented Meats*. Blackie Academic and Professional, London.
- Candogan, K., Wardlaw, F.B. y James C. (2009). *Effect of starter culture on proteolytic changes during processing of fermented beef sausages*. Food Chemistry, 116, 731-737.
- Carmel, A. y Yaron, A. (1978). *An intramolecularly quenched fluorescent tripeptide as a fluorogenic substrate of angiotensin-i-converting enzyme and of bacterial dipeptidyl carboxypeptidase*. European Journal of Biochemistry, 87(2), 265-273.
- Casaburi, A., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. y Villani, F. (2005). *Technological activities of Staphylococcus carnosus and Staphylococcus simulans strains isolated from fermented sausages*. Meat Science , 71, 643-650.
- Casaburi, A., Aristoy, M.C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldra, F. Y Villani, F. (2007). *Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of vallo di diano (Southern Italy) as affected by use of starter cultures*. Meat Science, 76, 295-307.
- Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D. y Villani, F. (2008). *Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on tradicional fermented sausages ripening and sensory traits*. Food Microbiology, 25, 335-347.
- Casey, P. y Condon, S. (2000). *Synergistic lethal combination of nitrite and acid pH on a verotoxin-negative strain of Escherichia coli O157*. International Journal of Food Microbiology, 55(1), 255-258.
- Casquete, R. (2011). *Evaluación de las características microbiológicas, físico-químicas y sensoriales, de productos cárnicos crudos curados extremeños, elaborados con cultivos iniciadores autóctonos y la proteasa EPg222*. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.

- Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, J.J. y Córdoba, M.G. (2011a). *Role of an autochthonous starter cultura and the protease EPg222 on the sensory and safety properties of a traditional Iberian dry-fermented sausage “salchichón”*. Food Microbiology, 28, 1432-1440.
- Casquete R, Benito M.J, Martín A, Ruiz Moyano S, Hernández A, Córdoba M.G. (2011b). *Effect of autochthonous starter cultures in the production of "salchichón", a traditional Iberian dry-fermented sausage, with different ripening processes*. LWT - Food Science and Technology, 44, 1562-1571.
- Casquete, R., Martín, A., Benito, M.J., Ruiz-Moyano, S., Pérez-Nevado, F. & Córdoba, M.G. (2011c). *Impact of pre-selected autochthonous starter cultures on the flavor quality of iberian dry-fermented “salchichón” sausage with different ripening processes*. Journal of Food Science, 76 (1), S535-S544.
- Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E. & Córdoba, M.G. (2012a). *Microbiological quality of salchichón and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures*. Food Control, 24, 191-198.
- Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E. & Córdoba, M.G. (2012b). *Use of autochthonous *Pediococcus acidilactici* and *Staphylococcus vitulus* starter cultures in the production of “chorizo” in 2 different traditional industries*. Journal of Food Science, 71(1), M70-M79.
- Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Pérez-Nevado, F. y Córdoba, M.G. (2012c). *Comparison of the effects of a comercial and a autochthonous *Pediococcus acidilactici* and *Staphylococcus vitulus* starter culture on the sensory and safety properties of a traditional Iberian dry-fermented sausage “salchichón”*. International Journal of Food Science & Technology, 47, 1011-1019.
- Chabance, B., Jollès, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L. y Fiat, A.M. (1995). *Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion*. British Journal of Nutrition, 73, 582-590.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J.C. Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jollés, P. y Fiat, A.M. (1998). *Casein peptide release and passage*

- to the blood in humans during digestion of milk and yogurt. *Biochimie*, 80, 155-165.
- Chang, K.J., Lillian, A., Hazum, E. y Cuatrecasas, P. (1981). *Morphicetin: a potent and specific agonist for morphine (μ) receptors*. *Science*, 212, 75-77.
- Chatterton, D.E., Smithers, G., Roupas, P. y Brodkorb, A. (2006). *Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin—Technological implications for processing*. *International Dairy Journal*, 16(11), 1229-1240.
- Cheison, S.C., Wang, Z. y Xu, S.Y. (2007). *Preparation of whey protein hydrolysates using a single-and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties: characterization by multivariate data analysis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3896-3904.
- Chen, D., Liu, Z., Huang, W., Zhao, Y., Dong, S. y Zeng, M. (2013). *Purification and characterization of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate*. *Journal of Functional Foods*. *In press*.
- Chen, G.T., Zhao, L., Zhao, L.Y., Cong, T. y Bao, S.F. (2007). *In vitro study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(2), 357-362.
- Chen, G.W., Tsai, J.S. y Pan, B.S. (2007). *Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation*. *International Dairy Journal*, 17, 641-647.
- Chen, H.M., Muramoto, K. y Yamauchi, F. (1995). *Structural analysis of antioxidative peptides from soybean. beta.-conglycinin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 574-578.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F. y Nokihara, K. (1996). *Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619-2623.
- Chen, J.R., Okada, T., Muramoto, K., Suetsuna, K. y Yang, S. (2003). *Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein*. *Journal of Food Biochemistry*, 26(6), 543-54.
- Chen, J.R., Yang, S.C., Suetsuna, K. y Chao, J.C.J. (2004). *Soybean protein-derived hydrolysate affects blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. *Journal of Food Biochemistry*, 28, 61-73.

- Chiba, H. y Yoshikawa, J.R. (1986). *Biologically functional peptides from food proteins. New opioid peptides from milk proteins*. En Protein Tailoring for Food and Medical Uses. Feeney, R.E. y Whitaker, B.J. (eds). Marcel Dekker. New York, 123-153.
- Chiba, H., Tani, F. y Yoshikawa, M. (1989). Opioid antagonist peptides derived from κ -casein. *Journal of Dairy Research*, 56, 363-366.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A. y Steele, J.L. (1999). *Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 217-246.
- Cid, C., Astiasaran, I. y Bello, J. (1992). *Influencia de las tecnologías de elaboración de diferentes productos cárnicos crudos curados sobre la fracción miofibrilar de las proteínas*. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 32, 59-70.
- Cinq-Mars, C.D., Hu, C., Kitts, D.D. y Li-Chan, E.C.Y. (2008). *Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides in pacific hake (Merluccius productus) fillet hydrolysate*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 410-419.
- Clare, D.A. y Swaisgood, H.E. (2000). *Bioactive milk peptides: a prospectus*. *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-1195.
- Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Cantoni, C. y Comi, G. (2001). *A novel polymerase chain reaction (PCR) – denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations*. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Journal Meat Science*, 57, 59-64.
- Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P. y Cantoni, C. (2005). *Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy*. *Meat Science*, 69, 381–392.
- Contreras, M.M., Carrón, R., Montero, M.J., Ramos, M. y Recio, I. (2009). *Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity*. *International Dairy Journal*, 19, 566-573.

- 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. (1990). *Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo ibérico*. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Córdoba, J.J., Antequera, T., Ventanas, J., López-Bote, C.J., García, C. y Asensio, M.A. (1994). *Hydrolysis and loss of extractability of proteins during ripening of Iberian ham*. Meat Science, 37, 217-227.
- Corrêa, A.P., Daroit, D.J., Fontoura, R., Meira, S.M.M., Segalin, J. y Brandelli, A. (2014). *Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities*. Peptides, 61, 48-55.
- Costa, R.L. y Summa, M.A. (2000). *Soy protein in the management of hyperlipidemia*. Annals of Pharmacotherapy, 34, 931-935.
- Cook, J.J., Huang, T.F., Rucinsky, B., Tuma, R.F., Williams, J.A. y Niewiarowski, S. (1988). *Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD-peptide*. Circulation, 78, 1248.
- Cudic, M. y Otvos, L.J. (2002). *Intracellular targets of antibacterial peptides*. Currents Drugs Targets, 3, 101-106.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M. y Shahidi, F. (2008). *Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates*. Food Chemistry, 109(1), 144-148.
- Curt, C., Hossenlopp, J., Perrot, N. y Trystram, G. (2002). *Dry sausage ripening control integration of sensory-related properties*. Science Direct, 13,151-159.
- Daemon, M., Lombardi, D., Bosman, F. y Schwartz, S. (1991). *Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall*. Circular Research, 68, 450–456.
- Dalmış, U. y Soyer, A. (2008). *Effect of processing methods and starter culture (Staphylococcus xylosus and Pediococcus pentosaceus) on proteolytic changes in Turkish sausages (sucuk) during ripening and storage*. Meat Science, 80, 345-354.

- Daniel, H., Vohwinkel, H. y Rehner, G. (1993). *Effects of casein and β -casomorphin on gastrointestinal motility in rats*. Journal of Nutrition, 120, 252-257.
- Darragh, A.J. (2002). Physiological impact of milk protein-encrypted bioactive peptides. Bull International Dairy Federation, 375, 25-31.
- Dathe, M. y Wieprecht, T. (1999). *Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells*. Biochimica et Biophysica Acta, 1462, 71-87.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. y Bartolomé, B. (2004). *Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 48-54.
- De Ketelaere, A., Demeyer, D., Vandekerckhove, P. y Vervaeke, I. (1974). *Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening*. Journal of Food Science, 39, 297-300.
- De Llano, D.G., Cuesta, P., y Rodríguez, A., (1998). *Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains*. Letters in Applied Microbiology, 26, 270-274.
- De Lumen, B.O. (2008). *Lunasin: A novel cancer preventive seed peptide that modifies chromatin*. Journal of AOAC International, 91(4), 932-935.
- De Masi, T. W., Wardlaw, F. B., Dick, R. L. y Acton, J. C. (1990). *Non protein nitrogen (NPN) and free amino acid contents of dry fermented and non fermented sausages*. Meat Science, 27, 1-12.
- Deibel, R. H. (1956). *Bacteriological aspects of pure starter culture in the manufacture of sausage*. American Meat Institute Foundation, 20, 14-18.
- Dewel, A., Hollenbeck, P.L. y Hollenbeck, C.B. (2006) A critical evaluation of the role of soy protein and isoflavone supplementation in the control of plasma cholesterol concentrations. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 91(3), 772-780.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., De la Hoz L. y Ordóñez, J.A. (1993). *Effect of the addition of Pronase E on the proteolysis in dry fermented sausages*. Meat Science, 34, 205-216.

- Díaz, O., Fernández, M., Hierro, E., García de Fernando, G.D., de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. (1995). *Modificaciones de las proteínas durante la maduración de los embutidos*. Alimentación Equipos y Tecnología, 3, 113-118.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., De la Hoz L. y Ordóñez, J.A. (1996). *Effect of the addition of Papain on the dry fermented sausages proteolysis*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 71, 13-21.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G. D., De la Hoz, L. y Ordóñez, J. A. (1997). *Proteolysis in dry fermented sausages: The effect of selected exogenous proteases*. Meat Science, 46, 115-128.
- Diehl-Jones, W.L. y Askin, D.F. (2004). *Nutritional modulation of neonatal outcomes*. AACN Clinical Issues, 15, 83-96.
- Dittmann, K.H., mayer, C. y Rodemann, H.P. (2003). *Radioprotection of normal tissue to improve radiotherapy: the effect of the Bowman-Birk protease inhibitor*. Current Medicinal Chemistry – Anticancer Agents, 3, 360-363.
- Diz, M.S.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A.G.C., Da Cunha, M., Alves, E.W., Okorokova-Facanha, A.L., Oliveira, M.A., Perales, J., Machado, O.L.T. y Gomes, V.M. (2006). *Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells*. Biochimica et Biophysica Acta, 1760(9), 1323-1332.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Singh, T.K., Vasiljevic, T. y Shah, N.P. (2007). *ACE-inhibitory activity of probiotic yogurt*. International Dairy journal, 17, 1321-1331.
- Drider, D., Fimland, G., Héchar, Y., McMullen, L.M. y Prévost, H. (2006). *The continuing story of class IIa bacteriocins*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70(2), 564-582.
- Drosinos, H.E., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. y Metaxopoulos, J. (2005). *Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage*. Meat Science, 69, 307-17.
- Drosinos, E.H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I., y Metaxopoulos, I., (2007). *Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece*. Food Microbiology, 24, 260-270.

- Drouet, L., Bal di Sollier, C., Cissie, M., Pignaud, G., Mazoyer, E., Fiat, A.M., Jollès, P. y Caen, J.P. (1990). *The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS*. Nouvelle Revue Francaise D Hematologie, 32, 59-62.
- Durá, M. A, Flores, F. y Toldrá, F. (2004). *Effect of Debaryomyces spp. on the proteolysis of dry fermented sausages*. Meat Science, 68, 319-328.
- Dziuba, J., Iwaniak, A. y Minkiewicz, P. (2003). *Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides*. Polimery, 48(1), 50-53.
- Dziuba, J., Niklewicz, M., Iwaniak, a., Darewicz, M y Minkiewicz, P. (2005). *Structural properties of bioactive animal protein fragments accessible for proteolytic enzymes*. Polimery, 6, 424-429.
- Edwards, R. A., Ordóñez, J. A., Dainty, R. H., Hierro, E. M. y de la Hoz, L. (1999). *Characterization of the headspace volatile compounds of selected Spanish dry fermented sausages*. Food Chemistry, 64, 461-465.
- Elias, R.J., Bridgewater, J.D., Vachet, R.W., Waraho, T., McClements, D.J. y Decker, E. A. (2006). *Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin in food lipid dispersions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(25), 9565-9572.
- Engelvin, G., Feron, G., Petrin, C., Mollé, D. y Talon, R. (2000). *Identification of beta-oxidation and thioesterase activities in Staphylococcus carnosus 833 strain*. FEMS Microbiology Letters, 190, 115-120.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. y Ishizaki, A. (1999). *Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87(6), 705-716.
- Escudero, E., Sentandreu, M.A., Arihara, K. y Toldrá, F. (2010). *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 2895-2901.
- Escudero, E., Aristoy, M.C., Nishimura, H., Arihara, K. y Toldrá, F. (2012a). *Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham*. Meat Science, 91, 306-311.

- Escudero, E., Toldrá, F., Sentandreu, M.A., Nishimura, H. y Arihara, K. (2012b). *Antihypertensive activity of peptides identified in the in vitro gastrointestinal digest of pork meat*. Meat Science, 91, 382-384.
- Escudero, E., Mora, L., Fraser, P.D., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. (2013a). *Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham*. Food Chemistry, 138, 1282-1288.
- Escudero, E., Mora, L., Fraser, P.D., Aristoy, M.C., Arihara, K. y Toldrá, F. (2013b). *Purification and identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham*. Journal of Proteomics, 78, 499-507.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C, Oliver, G. y Toldrá, F. (1999a). *Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by Lactobacillus curvatus and Lactobacillus sake*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 578-584.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. y Toldrá, F. (1999b). *Characterization of muscle sarcoplasmic and miofibrillar protein hydrolysis caused by Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiololy, 65, 3540-3546.
- Fadda, S., Lebert, A., Leroy-Setrin, S. y Talon, R. (2002). *Decarboxylase activity involved in methyl ketone production by Staphylococcus carnosus 833, a strain used in sausage fermentation*. Fems Microbiology Letters, 210, 209-214.
- Fadda, S., López, C. y Vignolo, G. (2010). *Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers*. Meat science, 86(1), 66-79.
- Farnaud, S. y Evans, R.W. (2003). *Lactoferrin, a multifunctional protein with antimicrobial properties*. Molecular Immunology, 40, 395-405.
- Fazel, A. (1998). *Nutritional and health benefits of yogurt and fermented milks. Functional peptides*. Danone World Newsletter.
- Fernández, M., Ordóñez, J.A., Bruna, J.M., Herranz, B. y De la Hoz, L. (2000). *Accelerated ripening of dry fermented sausages*. Trends in Food Science & Technology, 11, 201-209.
- Fernández-Musoles, R., López-Díez, J.J., Torregrosa, G., Vallés, S., Alborch, E., Manzanares, P y Salom, J.B. (2010). *Lactoferricin β -derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction*. Peptides, 31, 1926-1933.

- Fernández-Musoles, R., Salom, J.B., Martínez-Maqueda, D., López-Díez, J.J., Recio, I. y Manzanares, P. (2013). *Antihypertensive effects of lactoferricin hydrolysates: Inhibition of angiotensin- and endothelin-converting enzymes*. Food Chemistry, 139, 994-1000.
- Fiat, A.M. y Jollès, P. (1989). *Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects*. Molecular and Cellular Biochemistry, 87, 5-30.
- Fiat, A.M., Lévy-Toledano, S., Caen, J.P. y Jollès, P. (1989). *Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function*. Journal of Dairy Research, 56, 351-355.
- Fiat, A.M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Bal di Sollier, C. y Caen, J. (1993). *Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities*. Journal of Dairy Science, 76, 301-310.
- Field, C.J. (2005). *The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants*. Journal of Nutrition, 135, 1-4.
- Finlay, W.J.J., Logan, N.A. y Sutherland, A. D. (2000). *Bacillus cereus produces most emetic toxin at lower temperatures*. Letters in Applied Microbiology, 31(5), 385-389.
- FitzGerald, R.J. y Meisel, H. (2000). *Milk protein derived inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme*. British Journal of Nutrition, 84, Suppl. 1, S33-S37.
- FitzGerald, R.J., Murray, B.A., y Walsh, D.J. (2004). *Hypotensive peptides from milk proteins*. The Journal of Nutrition, 134 (4), 980S-988S.
- Flores, M. (1997). *Mediterranean vs northern European meat products. Processing technologies and main differences*. Food Chemistry, 59, 505-510.
- Flores, M., Cuellas, A. y Voget, C.E. (1999). *The proteolytic system of the yeast Kluyveromyces lactis*. Yeast, 15, 1437-1448.
- 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.
- Foeding, E.A y Larick, D.K. (1986). *Tenderization of beef with bacterial collagenase*. Meat Science, 18, 201-210.

- Fogh, J. y Trempe, G. (1975). *New human tumor cell lines*. Human tumor cells in vitro, 115, 12-19.
- Foley, S.L. y Lynne, A.M. (2008). *Food animal-associated challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance*. Journal of animal science, 86(14), E173-E187.
- Fountoulakis, M., Juranville, J.F. y Mannenberg, M. (1992). *Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24, 265-274.
- Franco, I., Prieto, B., Cruz, J. M., López, M. y Carballo, J. (2002). *Study of the biochemical changes during the processing of Androlla, a Spanish dry-cured pork sausage*. Food Chemistry, 78, 339-345.
- Friedman, M. y Brandon, D.L. (2001). *Nutritional and health benefits of soy proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(3), 1069-1086.
- Fujita, H. y Yoshikawa, M. (1999). *LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein*. Immunopharmacology, 44(1/2), 123-127.
- Fujita, H., Yokoyama, K., Yasumoto, R. y Yoshikawa, M. (1995). *Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 22(s1), S304-S305.
- Fujita, H., Yokohama, K. y Yoshikawa, M. (2000). *Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins*. Journal of Food Science, 65, 564-569.
- Gálvez, A.F., Chen, N., Macasieb, J. y Ben, O. (2001). *Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation*. Cancer Research, 61(20), 7473-7478.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas-López, R. y Omar, N.B. (2007). *Bacteriocin-based strategies for food biopreservation*. International Journal of Food Microbiology, 120(1), 51-70.
- García, C., Berdagué, J.J., Antequera, T., López-Bote, C., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (1991). *Volatile components of dry cured Iberian ham*. Food Chemistry, 41, 23-32.

- García, M.L., Casas, C., Toledo, V.M. y Selgas, M.D., (2001). *Effect of selected mould strains on the sensory properties of dry fermented sausages*. European Food Research and Technology, 212, 287-291.
- García de Fernando, D.G. y Fox, P.F. (1991). *Study of proteolysis during the ripening of a dry fermented pork sausage*. Meat Science, 30, 367-383.
- Garriga, M., Marcos, B., Martín, B., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Hugas, M. y Aymerich, T. (2005). *Starter cultures and high-pressure processing to improve the hygiene and safety of slightly fermented sausages*. Journal of Food Protection®, 68(11), 2341-2348.
- Geisen, R., Luecke, F. K. y Kroeckel, L. (1992). *Starter and protective cultures for meat and meat products*. Fleischwirtschaft, 72, 894-901.
- Geisterfer, A.A., Peach, M.J., y Owens, G.K. (1988). *Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells*. Circulation Research, 62(4), 749-756.
- Gerelt, B., Ikeuchi, Y. y Suzuki, A. (2000). *Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration*. Meat Science, 56, 311-318.
- Giansanti, F., Rossi, P., Massucci, M. T., Botti, D., Antonini, G., Valenti, P. y Seganti, L. (2002). *Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin*. Biochemistry and Cell Biology, 80(1), 125-130.
- Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R. y Mulligan, C. (2004). *Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food*. Food research international, 37(2), 123-131.
- Gifford, J.L., Hunter, H.N. y Vogel, H.J. (2005). *Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties*. Cellular and Molecular Life Sciences, 62, 2588-2598.
- Gil, A. (2005). *Tratado de nutrición*. Tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Acción médica. Madrid.
- Gilani, G.S., Cockell, K.A. y Sepehr, E. (2005). *Effects of antinutritional factor on protein digestibility and amino acid availability in foods*. Journal of AOAC International, 88, 967-987.

- Gill, I., López-Fandiño, R., Jorba, X. y Vulfson, E.N. (1996). *Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production*. Enzyme and Microbial Technology, 18, 162-183.
- Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P. y Doyle, M.P. (1992). *Fate of Escherichia coli O157: H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage*. Applied and Environmental Microbiology, 58(8), 2513-2516.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. y Addeo, F. (2000). *Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus SS1 and Lactococcus lactis subsp. Cremoris FT4*. Applied and Environmental Microbiology, 66, 3898-3904.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A. y Di Cagno, R. (2002). *Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42, 223-239.
- Gobbetti, M., Minervini, F. y Rizzello, C.G. (2004). *Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides*. International Journal of Dairy Tehcnology, 57, 172-188.
- Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M. y Recio, I. (2002). *Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures*. International Dairy Journal, 12, 697-706.
- Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M. y Recio, I. (2004). *Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion*. International Dairy Journal, 14, 1075-1080.
- Gómez-Ruiz, J.A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M. y Recio, I. (2008). *Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS*. European Food Research and Technology, 227, 1061-1067.
- González, B. y Díez, V. (2002). *The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of chorizo a Spanish dry cured sausage*. Meat Science, 60, 295-298.
- González-Fandos, E., Otero, A., Sierra, M., Garcia-Lopez, M.L. y Prieto, M. (1994). *Effect of three commercial starters on growth of Staphylococcus aureus and enterotoxins (A–D) and thermonuclease production in broth*. International Journal of Food Microbiology, 24(1), 321-327.

- González-Fernández, C., Santos, E.M., Rovira, J. y Jaime, I. (2006). *The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage*. Meat Science, 74, 467-475.
- González-García, E., Puchalska, P., Marina, M.L. y García, M.C. (2015). *Fractionation and identification of antioxidant and angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from plum (Prunus domestica L.) stones*. Journal of Functional Foods, 19, 376-384.
- Griffiths, C.E., Cumberbatch, M., Tucker, S.C., Dearman, R.J., Andrew, S., Headon, D.R. and Kimber, I. (2001). *Exogenous topical lactoferrin inhibits allergen-induced Langerhans cell migration and cutaneous inflammation in humans*. British Journal of Dermatology, 144, 715-725.
- Guérard, F., Sumaya-Martínez, M.T., Linard, B. y Dufossé, L. (2005). *Marine protein hydrolysates with antioxidant properties*. Agro Food Industry Hi-tech, 16(3), 16-18.
- Guesdon, B., Pichon, L. y Tome, D. (2006). *Opioid peptides*. En Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease. Mine, Y. y Shahidi, F. (eds), Taylor & Francis Group, Boca Ratón, FL, 367-376.
- Guiotto, A., Calderan, A., Ruzza, P. & Borin, G. (2005). *Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review*. Current Medicinal Chemistry, 12, 2293-2315.
- Gustafson, R.H. y Kaplon, B. (1997). *Federal agencies collaborate to control dangerous new Salmonella strain*. JAMA-Journal of the American Medical Association, 210, 1712-1716.
- Hagen, B.F., Berdagué, J.L., Holck, A.L., Naes, H. y Blom, H. (1996). *Bacterial proteinase reduces maturation time of dry fermented sausages*. Journal of Food Science, 61, 1024-1029.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., y Holzapfel, W., (1994). *Biogenic amines and their production by micro-organisms in food*. Trends in Food Science & Technology, 5, 42-48.
- Hammes, W.P. y Bantleon, A. (1990). *Lactic acid bacteria in meat fermentation*. FEMS Microbiology Reviews, 87, 165-174.
- Haque, E. y Chand, R. (2006). Milk protein derived bioactive peptides. [On-line] Disponible en: <http://www.dairyscience.info/bio-peptides.htm>.

- Hatate, H., Numata, Y. y Kochi, M. (1990). *Synergistic effect of sardine myofibril protein hydrolyzates with antioxidants*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 56, 1011.
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C. y Stanton, C. (2006). *Casein-derived antimicrobial peptides generated by Lactobacillus acidophilus DPC6026*. Applied and environmental microbiology, 72(3), 2260-2264.
- Henriksen, A.P. y Stahnke, L.H. (1997). *Sensory and chromatographic evaluations of water soluble fractions from dried sausages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2679-2684.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2004). *Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion*. Journal of agricultural and food chemistry, 52(6), 1504-1510.
- Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2005). *Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(6), 1041-1048.
- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L. y Recio, I. (2007a). *Identification of bioactive peptides after digestión of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin*. International Dairy Journal, 17, 42-49.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I. y Bartolomé, B. (2007b). *ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f (19-25). Interactions with ascorbic acid*. Journal of agricultural and food chemistry, 55(9), 3392-3397.
- Hierro, E., de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. (1997). *Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the lipolysis of dry fermented sausages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2989-2995.
- Hinkens, J.C., Faith, N.G., Lorang, T.D., Bailey, P., Buege, D., Kaspar, C.W. y Luchansky, J.B. (1996). *Validation of pepperoni processes for control of Escherichia coli O157: H7*. Journal of Food Protection®, 59(12), 1260-1266.
- Hinrichsen, L.L. y Pedersen, S.B. (1995). *Relationship among flavor, volatile compounds, chemical changes, and microflora in italian type dry-cured ham during processing*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2932-2940.

- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Wang, H. y Zhou, K. (2009). *Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef*. Food Chemistry, 117(3), 438-443.
- Hsu, K.C., Li-Chan, E.C., y Jao, C.L. (2011). *Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7*. Food Chemistry, 126(2), 617-622.
- Huang, D., Ou, B. y Prior, R.L. (2005). *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of agricultural and food chemistry, 53(6), 1841-1856.
- Hugas, M. (1998). *Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products*. Meat Science, 49, S139-S150.
- Hugas, M. y Monfort, J.M. (1997). *Bacterial starter cultures for meat fermentation*. Food Chemistry, 29, 547-554.
- Hugas, M., Garriga, M. y Monfort, J.M. (1992). *Developing microbial cultures as starters for meat processing*. En: New Technologies for meat and meat products. Smulders F.J.M.; Toldrá F., Flores, J. y Prieto, M (ed), pp:91-107. ECCEAMST, Utrecht.
- Hugas, M., Garriga, M. y Aymerich, M. T. (2003). *Functionality of enterococci in meat products*. International journal of food microbiology, 88(2), 223-233.
- 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 semidry fermented sausages*. Meat Science, 62, 205-216.
- Huis in't Veld, J.H. (1996). *Biopreservation of Foods*. Meeting of Concerted Action CT94-1456. Eds. Hinton, M.H. and Rowlings, C. Bristol, U.K. pp.133-140.
- Hwang, H.I., Hartman, T.G., Rosen, R.T., Lech, J. y Ho, C.T. (1994). *Formation of pyrazines from the Maillard reaction of glucose and lysine- α -amine-15N*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 1000-1004.
- Hwang, H.I.m, Hartman, T.G. y Ho, C.T. (1995). *Relative reactivities of amino acids in pyrazine formation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 179-184.
- Iigo, M., Shimamura, M., Matsuda, E., Fujita, K., Nomoto, H., Satoh, J., Kojima, S., Alexander, D.B., Moore, M.A. y Tsuda, H. (2004). *Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa:*

- a posible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. Cytokine*, 25, 36-44.
- Ishii, K., Takamura, N., Shinohara, M., Wakui, N., Shin, H., Sumino, Y., Ohmoto, Y., Teraguchi, T. y Yamauchi, K. (2003). *Long-term follow-up of chronic hepatitis C patients treated with oral lactoferrin for 12 months*. *Hepatology Research*, 25(3), 226-233.
- ISO R-2917:1999. *International Standards Meat and Meat Products. Measurement of the pH (Reference Method)*. International Organization for Standardization, Ginebra.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P. y Darewicz, M. (2014). *Food-Originating ACE Inhibitors, Including Antihypertensive Peptides, as Preventive Food Components in Blood Pressure Reduction*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 114-134.
- Jack, R. W., Tagg, J.R. y Ray, B. (1995). *Bacteriocins of gram-positive bacteria*. *Microbiological Reviews*, 59(2), 171-200.
- Jang, A. y Lee, M. (2005). *Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates*. *Meat Science*, 69, 653-661.
- Je, J.Y., Park, P.J. y Kim, S.K. (2005). *Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate*. *Food Research International*, 38(1), 45-50.
- Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G. y Kim, S.K. (2007). *Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis*. *Process Biochemistry*, 42(5), 840-846.
- Jensen, L.B. y Paddock, L.S. (1940). *Sausage treatment*. U.S. Pat. 2225783.
- Jenssen, B. (1995). *Starter cultures for meat fermentation*. *Fermented Meats*. G. Campbell-Platt and P.E. Cook. Glasgow. U.K., 130-154.
- Jeong, H.J., Lam, Y. y De Lumen, B. O. (2002). *Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5903-5908.
- Jezova, D., Tokarev, L., Kostalova, L. y Strbak, V. (1996). *Presence of atriopentin-like immunoreactivity in human and rat milk*. *General Physiology Biophysics*, 15, 333-338.

- John, E. Threlfall, E.J., Rowe, B. y Ward, L.R. (1997). *Increase in multiple antibiotic resistance in nontypical Salmonellas from humans in England and Wales: A comparison of data for 1994 and 1996*. Microbial Drug Resistance, 3.
- Johnson, J.L., Doyle, M.P. y Cassens, R.G. (1990). *Listeria monocytogenes and other Listeria spp. in meat and meat products: a review*. Journal of Food Protection, 53, 81-91.
- Johnson, M.J. (1941). *Isolation and properties of a pure yeast polypeptidase*. Proceedings of the Third International Congress of Microbiology. New York. pp. 348.
- Jollès, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A.M., Soria, C., Gillensen, D., Thomaidis, A., Dunn, F.W. y Caen, J.P. (1996). *Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from κ -casein on platelet function*. European Journal of Biochemistry, 158, 379-382.
- Jones, R.J., Hussein, H.M., Zagorec, M., Brightwell, G. y Tag, J.R. (2008). *Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat*. Food Microbiology, 25, 228-234.
- Kanamoto, R., Azuma, N., Miyamoto, T., Saeki, T., Tsuchihashi, Y. y Iwami, K. (2001). *Soybean resistant proteins interrupt an enterohepatic circulation of bile acids and suppress liver tumorigenesis induced by azoxymethane and dietary deoxycholate in rats*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 65(4), 999-1002.
- Kang, J.H., Lee, M.K., Kim, K.L. y Hahm, K.S. (1996). *Structure-biological activity relationship of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin*. International Journal of Peptide Research, 48, 357-363.
- Kansci, G., Genot, C., Meynier, A., Gaucheron, F. y Chobert, J.M. (2004). *Caseinophosphopeptide (f1-25) confers on-casein tryptic hydrolysate an antioxidant activity during iron/ascorbate-induced oxidation of liposomes*. Le Lait, 84(5), 449-462.
- Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y. y Muguruma, M. (2003a). *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of porcine skeletal muscle proteins following enzyme digestion*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 16(3), 417-424.

- Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y. y Muguruma, M. (2003). *Purification and characterization of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C*. *Animal Science Journal*, 74(1), 53-58.
- Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Kodama, Y., Kawamura, Y. y Muguruma, M. (2004). *Inhibitory profile of nonapeptide derived from porcine troponin C against angiotensin I-converting enzyme*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 771-775.
- Kayser, H. y Meisel, H. (1996). *Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from milk proteins*. *FEBS Letters*, 383, 18-20.
- Kenneally, P.M., Fransen, N.G., Grau, H., O'Neill, E.E. y Arendt, E.K. (1999). *Effects of environmental conditions on microbial proteolysis in a pork myofibril model system*. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 794– 803.
- Kennedy, A.R. (1998). *Chemopreventive agents: protease inhibitors*. *Pharmacology & Therapeutics*, 78, 167-209.
- Kennedy, R.S., Konok, G.P., Bounous, G., Baruchel, S. y Lee, T.D. (1995). *The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study*. *Anticancer Research*, 15, 2643-2649.
- Kilara, A., y Panyam, D. (2003). *Peptides from milk proteins and their properties*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6), 607-633.
- Kim, H.D., lee, J.H., Shin, Z.I., nam, H.S. y Woo, H.J. (1995). *Anticancer effects of hydrophobic peptides derived from a cheese slurry*. *Foods and biotechnology*, 4, 268-272.
- Kim, J.Y., Woo, H.J., Ahn, C.W., Nam, H.S., Shin, Z.I. y Lee, H.J. (1999). *Cytotoxic effects of peptides fractionated from bromelain hydrolyzates of soybean protein*. *Food Science and Biotechnoly*, 8(5), 333–7.
- Kim, S.E., Kim, H.H., Kim, J.Y., Kang, Y.I., Woo, H.J. y Lee, H.J. (2000) *Anticancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins*. *BioFactors*, 12(1–4), 151–5.
- Kim, S.H., Kim, J.Y., Park, S.W., Lee, K.W., Kim, K.H. y Lee, H. (2003). *Isolation and Purification of Anticancer Peptides from Korean Ginseng*. *Food Science Biotechnology*, 12, 79-82.

- Kim, S.K., Byun, H.G., Park, P.J. y Shahidi, F. (2001a). *Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(6), 2992-2997.
- Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, H.G., Nam, K.S., Joo, D.S. y Shahidi, F. (2001b). *Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(4), 1984-1989.
- Kim, S.Y., Je, J.Y. y Kim, S.K. (2007). *Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 18(1), 31-38.
- Kitts, D.D., Yuan, Y.V., Nagasawa, T. y Moriyama, Y. (1992). *Effect of casein, casein phosphopeptides, and calcium intake on ileal ^{45}Ca disappearance and temporal systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. British Journal of Nutrition, 68, 765-781.
- Kitts, D.D. y Weiler, K. (2003). *Bioactive proteins and peptides from food source. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery*. Current Pharmaceutical Desing, 9, 1309-1323.
- Ko, J.Y., Lee, J.H., Samarakoon, K., Kim, J.S. y Jeon, Y.J. (2013). *Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases*. Food and Chemical Toxicology, 52, 113-120.
- Kohmura, M., nio, N., Kubo, K., Minoshima, Y., Munekata, E. y Ariyoshi, Y. (1989). *Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein*. Agricultural Biology and Chemistry, 53, 2107-2114.
- Kong, B. y Xiong, Y.L. (2006). *Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(16), 6059-6068.
- Konuma, H., Shinagawa, K., Tokumaru, M., Onoue, Y., Konno, S., Fujino, N., Shigehisa, T., Kurata, H., Kuwabara, Y. y Lopes, C.A.M. (1988). *Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and meat product additives*. Journal of Food Protection, 51, 324-326.

- Korhonen, H. (2002). *Technology options for new nutritional concepts*. International Journal of Dairy Technology, 55, 79-88.
- Korhonen, H. (2009). *Milk-derived bioactive peptides: From science to applications*. Journal of Functional Foods, 1, 117-187.
- Korhonen, H. y Pihlanto-Leppälä, A. (2001). *Milk protein-derived bioactive peptides- novel opportunities for health promotion*. IDF Bulletin, 363, 17-26.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2003). *Food-derived bioactive peptides – Opportunities for designing future foods*. Current Pharmaceutical Desing, 9, 1297-1308.
- Korhonen, H. y Pihlanto-Leppälä, A. (2004). *Milk-derived bioactive peptides: Formation and prospects for health promotion*. In C. Shortt, & J. O'Brien (Eds.), Handbook of Functional Dairy Products. Functional Foods and Nutraceuticals Series 6.0 (pp. 109-124). Florida, USA: CRC Press.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). *Bioactive peptides: Production and functionality*. International Dairy Journal, 16, 945-960.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P. y Tupasela, T. (1998). Impact of proteolytic systems of lactic acid bacteria. Trends in Food Science and Technology, 9, 307-319.
- Kovacs-Nolan, J., Phillips, M. y Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 8421-8431.
- Kramer, J.M. y Gilbert, R.J. (1989). *Bacillus cereus* and others *Bacillus* species. In *Food-borne Bacterial Pathogens* (Ed. Doyle, J.P.). New York, Marcel Dekker. pp. 21-77.
- Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K. y Oki, T. (2001). *Antioxidative peptide from milk fermented with Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus IFO13953*. Journal of the Japanese Society of Food Science, 48, 44–50.
- Kuwabara, Y., Nagai, S., Yoshimitsu, N., Nakagawa, I., Watanabe, Y. y Tamai Y. (1995). *Antihypertensive effect of the milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 80, 294-295.

- Lafarga, T. y Hayes, M. (2014). *Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients*. Meat science, 98(2), 227-239.
- Lahov, E. y Regelson, W. (1996). *Antibacterial and simulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides*. Food and Chemical Toxicology, 34, 131-145.
- Lam, Y., Galvez, A. y De Lumen, B. O. (2003). *Lunasin™ suppresses E1A-mediated transformation of mammalian cells but does not inhibit growth of immortalized and established cancer cell lines*. Nutrition and cancer, 47(1), 88-94.
- Lawrie, R.A. (1991). Meat Science, 5th ed., p. 48–50, 184–190. Pergamon Press, Oxford .
- Lawrie, R.A. (1998). *Lawrie's meat science*. 6th edn. Ed: Lawrie, R.A. Woodhead Publishing Ltd., Londres.
- Lebert, I., Leroy, S. y Talon, R. (2007). *Microorganisms in traditional fermented meats – Chapter 11*. In F. Toldra, Y. H. Hui, I. Astiasaran, W. K. Nip, J. G. Sebranek, E. T. F. Silveira, L. H. Stahnke, & R. Talon (Eds.), Handbook of fermented meat and poultry, 113-1124.
- LeBlanc, J.G., Matar, C., Valdez, J.C., LeBlanc, J. y Perdigon, G. (2002). *Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with Lactobacillus helveticus*. Journal of Dairy Science, 85, 2733-2742.
- Lee, J.E., Bae, I.Y., Lee, H.G. y Yang, C.B. (2006). *Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (Brassica oleracea)*. Food chemistry, 99, 143-148.
- Leggio, A., Belsito, E. L., Marco, R. D., Di Gioia, M. L., Liguori, A., Siciliano, C. & Spinella, M. (2012). *Dry fermented sausages of southern Italy: A comparison of free amino acids and biogenic amines between industrial and homemade products*. Journal of Food Science, 77, S170-S175.
- Legrand, D., Ellass, E., Pierce, A. y Mazurier, J. (2004). *Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties*. Biometals, 17, 225-229.
- Lehninger, A.L. (1991). *Proteínas: esqueleto covalente y secuencia aminoacídica*. En Bioquímica. Omega, S.A. (ed.). Ingosprint, S.A. Barcelona, España. pp. 73-96.

- Lehninger, A. L. (1993). *El ciclo del ácido cítrico*. En: Principios de Bioquímica. Eds.: Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Cuchillo, C. M. y Vendrell, C. M. Omega S. A.. Barcelona.
- Leistner, L. (1986). Allgemeines über Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, 66, 299-300.
- Leistner, L. y Echardt, C. (1979). Vorkommen toxinogener Penicillien bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, 59, 1892-1896.
- Leistner, L. (1995). *Stable and safe fermented sausages world-wide*. In: *Fermented Meats*. Eds. G.Cambell-Platt and P.E. Cook. Blackie Academic and Professional, Londres, pp 160-175.
- Lendl, F. (1990). *Chemical pathways of the Maillard reaction*. En: *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Ed.: Finot, P. A.; Aeschbacher, H. U.; Hurrell, R. F. y Liardon, R. Birkhauser Verlag. Basel.
- León, F., Millan, R. y Serrano-Moreno, A. (1978). *Cambios químicos durante la maduración del salchichón*. 3. Modificaciones experimentadas por los compuestos nitrogenados solubles en agua. *Archivos de zootecnia*, 27, p. 105.
- Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004). *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry*. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Leroy, F., Verluyten, J. y De Vuyst, L. (2006). *Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation*. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 270-285.
- Leung, E.H. y Ng, T.B. (2007). *A relatively stable antifungal peptide from buckwheat seeds with antiproliferative activity toward cancer cells*. *Journal of Peptide Science*, 13(11), 762-767.
- Li, C., Matsui, T., Matsumoto, K., Yamakasi, R. y Kawasaki, T. (2002). *Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein*. *Journal of Peptide Science*, 8(6), 267-274.
- Li, L., Wang, J., Zhao, M., Cui, C. y Jiang, Y. (2006). *Artificial neural network for production of antioxidant peptides derived from bighead carp muscles with alcalase*. *Food technology and biotechnology*, 44(3), 441.

- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. y Wu, Y. (2007). *Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry*. Food Chemistry, 102(4), 1135-1143.
- Li, Y., Sadiq, F.A., Liu, T., Chen, J. y He, G. (2015). *Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast Kluyveromyces marxianus*. Journal of Functional Foods, 16, 278-288.
- Li-Chan, E. y Nakai, S. (1989). *Biochemical basis for the properties of egg white*. Critical Review in Poultry Biology, 2, 21-58.
- Lichtenstein, G.R., Deren, J., Katz, S., Kennedy, A. y Ware, J.H. (2002). *The Bowman Birk protease inhibitor: a novel therapy for treatment of patients with active ulcerative colitis*. Gastroenterology, 122, A-60.
- Lignitto, L., Cavatorta, V., Balzan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E., Sforza, S. y Segato S. (2010). *Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevio cheese*. International Dairy Journal, 20, 11-17.
- Lin, L., Umahara, M., York, D.A. y Bray, G.A. (1998). *Betacasomorphins stimulate and enterostatin inhibits the intake of dietary fat in rats*. Peptides, 19- 325-331.
- Liu, R.H. y Finley, J. (2005). *Potential cell culture models for antioxidant research*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4311-4314.
- Liu, Z., Dong, S., Xu, J., Zeng, M., Song, H. y Zhao, Y. (2008). *Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (Crassostrea gigas) with alcalase and bromelin*. Food Control, 19, 231-235.
- Lizaso, G., Chasco, J. y Beriain, J. (1999). *Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichon, a Spanish dry cured sausages*. Food Microbiology, 6, 219-228.
- Lo, W.M. y Li-Chan, E.C. (2005). *Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein*. Journal of agricultural and food chemistry, 53(9), 3369-3376.
- Lois, A. L., Gutiérrez, L. M., Zumalacárregui, J. M., y López, A. (1987). *Changes in several constituents during the ripening of “Chorizo” – A Spanish dry sausage*. Meat Science, 19, 169-177.

- Lonnerdal, N. (2003). *Nutritional and physiologic significance of human milk proteins*. American Journal of Clinical Nutrition, 77, 1537S-1543S.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). *Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Letters, 199, 9-13.
- López-Expósito, I., Pellegrini, A., Amigo, L., y Recio, I. (2008). *Synergistic effect between different milk-derived peptides and proteins*. Journal of Dairy Science, 91(6), 2184-2189.
- López-Fandiño, R., Otte, J. y van Camp, J. (2006). *Physiological chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity*. International Dairy Journal, 16, 1277-1293.
- Loukas, S., Varaucha, D., Zioudrou, C., Streaty, R.A. y Klee, W.A. (1983). *Opioid activities and structures of alpha-casein-derived-exorphins*. Biochemistry, 22, 4567-4573.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.I., Farr, A.L. y Randall, R.I. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, 193 (1), 265-275.
- Lücke, F. K., (1998). *Fermented sausages*. In B. J. B. Wood (Ed.), Microbiology of fermented foods (pp. 441-483). London: Blackie Academic and Professional.
- Lücke, F.K., (2000). *Utilization of microbes to process and preserve meat*. Meat Science, 56, 105-115.
- Lücke, F.K. y Hechelmann, H. (1985). *Staterkulturen für Rohwurst und Rohschinken, Zusammensetzung und Wirkung*. En: Mikrobiologie, Toxikologie und Histologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, pp. 193-218.
- Ma, M.S., Bae, I.Y., Lee, H.G. y Yang, C.B. (2006). *Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (Fagopyrum esculentum)*. Food Chemistry, 96, 36-42.
- Mader, J.S., Salsman, J., Conrad, D.M. y Hoskin, D.W. (2005). *Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines*. Molecular Cancer Therapeutics, 4, 612-624.
- Maeno, M., Yamamoto, N., y Takano, T. (1996). *Isolation of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by proteinase from Lactobacillus helveticus CP790*. Journal of Dairy Science, 79, 1316-1321.

- Maijala, R., Eerola, S., Aho, M., y Hirn, J., (1993). *The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat*. Journal of Food Protection, 56, 125-129.
- Majumder, K. y Wu, J. (2009). *Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from simulated in vitro gastrointestinal digestion of cooked eggs*. Journal of agricultural and food chemistry, 57(2), 471-477.
- Majumder, K., Chakrabarti, S., Morton, J.S., Panahi, S., Kaufman, S., Davidge, S.T. y Wu, J. (2015). *Egg-derived ACE-inhibitory peptides IQW and LKP reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. Journal of Functional Foods, 13, 50-60.
- Malkowicz, S.B., Mckenna, W.G., Vaughn, D.J., Wan, X.S., Propert, K.J., Rockwell, K., Marks, S.H., Wein, A.J. y Kennedy, A.R. (2001). *Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia*. Prostate, 48, 16-28.
- Mao, X.Y., Ni, J.R., Sun, W.L., Hao, P.P. y Fan, L. (2007). *Value-added utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides*. Food Chemistry, 103(4), 1282-1287.
- Marshall, K. (2004). *Therapeutic applications of whey protein*. Alternative Medicine Review, 9, 136-156.
- Martín, A., Asensio, M.A., Bermúdez, E., Córdoba, G., Aranda, E. y Córdoba, J.J. (2000). *Proteolytic activity of Penicillium chrysogenum and Debaryomyces hansenii during ripening of a model system for meat products*. Systematic and Applied Microbiology, 62, 123-127.
- Martín, A., Córdoba, J. J., Rodríguez, M. M., Nunez, F. y Asensio, M. A. (2001). *Evaluation of microbial proteolysis in meat products by capillary electrophoresis*. Journal of Applied Microbiology, 90, 163-171.
- Martín, A., Asensio, M. A., Bermúdez, M. 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, 62, 129-137.
- 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 drycured ham*. International Journal of Food Microbiology, 94, 55-66.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G. y Asensio (2006a). *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 Micrococaceae isolated from Iberian dry-cured sausages*. Meat Science, 75, 696-708.
- Martínez Augustín, O. y Martínez de Victoria, E. (2006). *Proteínas y péptidos en nutrición enteral*. Nutrición hospitalaria, 21(2), 1-14.
- Maruyama, S. y Suzuki, H. (1982). *A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein*. Agricultural Biology and Chemistry, 46, 1393-1394.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1985). *Angiotensin-I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats*. Agricultural Biology and Chemistry, 49, 1405-1409.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1987a). *Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α_{s1} -casein*. Agricultural Biology and Chemistry, 51, 2557-2561.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1987b). *Studies of the active site and antihypertensive activity of angiotensin-I-converting enzyme inhibitors derived from casein*. Agricultural Biology and Chemistry, 53, 1077-1081.
- Matar, C., Valdez, J.C., Medina, M., Rachid, M. y Perdigón, G. (2001). *Immunomodulating effects of milks fermented by Lactobacillus helveticus and its non-proteolytic variant*. Journal of Dairy Research, 68, 601-609.
- Matar, C., LeBlanc, J.G., Martin L. y Perdigón, G. (2003). *Biologically active peptides released in fermented milk: Role and functions*. In. E. R. Farnworth (Ed.),

- Handbook of Fermented Functional Foods. Functional Foods and Nutraceuticals Series (pp. 177-201). Florida, USA: CRC Press.
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. y Drosinos, E.H. (2003). *Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by Leuconostoc mesenteroides L124 and Lactobacillus curvatus L442*. Meat Science 64, 265–271.
- Mateo, J., Domínguez, M. C., Aguirrezábal, M. M. y Zumalacárregui, J. M. (1996). *Taste compounds in chorizo and their changes during ripening*. Meat Science, 44, 245-254.
- Matoba, N., Usui, h., Fujita, H. y Yoshikawa, M. (1999). A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. FEBS Letters, 452(3), 181-184.
- Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. y Osajima, Y. (1994). *Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 58, 2244-2245.
- Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. y Osajima, Y. (1993). *Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by Bacillus-licheniformis alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 57(6), 922-925.
- Matsui, T., Li, C. y Osajima, Y. (1999). *Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ*. Journal of Peptide Science, 5(7), 289-297.
- Matsui, T., Yukiyoishi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. y Matsumoto, K. (2002). *Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 13, 80-86.
- Matsumoto, H., Ito, K., Yamagishi, M., Nakamura, Y. y Tokunaga, T. (2004). *Synergic effects of α -tocopherol and peptide derived from sardine protein hydrolysates on blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 51(10), 546-553.

- Mauriello, G., Casaburi, A. y Villani, F. (2002). *Proteolytic activity of Staphylococcus xylosum strains on pork myofibrillar and sarcoplasmic proteins and use of selected strains in the production of Naples type salami*. Journal of Applied Microbiology, 92, 482-490.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. y Villani, F. (2004). *Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausage of Southern Italy*. Meat Science, 67, 149-158.
- Mazoyer, E., Lévy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat, A.M., Jollès, P. y Caen, J. (1990). *KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction*. European Journal of Biochemistry, 194, 43-49.
- McCann, K.B., Shiell, B.J., Michalski, W.P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. y Coventry, M.J. (2005). *Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the f (164–207) region of bovine α s2-casein*. International Dairy Journal, 15(2), 133-143.
- McCann, K.B., Shiell, B.J., Michalski, W.P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. y Coventry, M.J. (2006). *Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α S1-casein*. International Dairy Journal, 16(4), 316-323.
- McEwen, S.A. y Fedorka-Cray, J. (2002). *Antimicrobial use and resistance in animals*. Clinical Infectious Diseases, 34 (3), S93-S106.
- Meade, S.J., Reid, E.A. y Gerrard, J.A. (2005). *The impact of processing on the nutritional quality of food proteins*. Journal of AOAC International, 88, 904-922.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. y Vioque, J. (2007). *Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(10), 3949-3954.
- Meisel, H. (1997). *Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins*. Peptide Science, 43(2), 119-128.
- Meisel, H. (1998). *Overview on milk protein-derived peptides*. International Dairy Journal, 8, 367-373.
- Meisel, H. (2004). *Multifunctional peptides encrypted in milk proteins*. Biofactors, 21, 55-61.

- Meisel, H. y FitzGerald, R.J. (2003). *Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects*. *Current Pharmaceutical Design*, 9 (16), 1289-1295.
- Meisel, H., Behrens, S. y Schlimme, E. (1991). *Calcium-bindungsstudien an phosphopeptidfraktionen aus der in vitro-proteolyse von casein*. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 43(3), 199-212.
- Melendo, J. A., Beltran, J. A., Jaime, I., Sancho, R. y Roncales, P. (1996). *Limited proteolysis of myofibrillar proteins by bromelain decreases toughness of coarse dry sausage*. *Food Chemistry*, 57, 429-433.
- Mercado, L., Schmitt, P., Marshall, S. H. y Arenas, G. (2005). *Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(3), 284-290.
- Mielnik, M.B., Aaby, K. y Skrede, G. (2003). *Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat*. *Meat Science*, 65(3), 1147-1155.
- Mierke, D.F., Nöbner, G., Schiller, P.W. y Goodman, M. (1990). *Morphictin analogs containing 2-aminocyclopentane carboxylic acid as a peptidomimetic for proline*. *International Journal of Peptide Research*, 35, 34-45.
- Migliore-Samour, D., Floch, F. y Jollès, P. (1989). *Biologically active peptides implicated in immunomodulation*. *International Dairy Research*, 56, 357-362.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C.G., Fox, P.F., Monnet, V. y Gobbetti, M. (2003). *Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5297-5305.
- Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., Aminlari, M. y Hosseini, E. (2015). *Purification and identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae* protein hydrolysate*. *Journal of Functional Foods*, 19, 259-268.
- Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T. y Yamamoto, N. (2004). *Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease*. *Journal of Dairy Science*, 87, 3183-3188.
- 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.
- Montel, M.C., Reitz, J., Talon, G., Berdagué, J.L. y Roussetakrim, S. (1996). *Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profile and odours of 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, S111-S123.
- Moore, S. y Stein, W.H. (1954). *A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds*. *Journal of Biological Chemistry*, 211(2), 907-913.
- Morimatsu, F. y Kimura, S. (1992). Hypocholesterolemic effect of partial hydrolyses of pork meat in rats. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 39, 770-777.
- Morimatsu, F., Ito, M., Budijano, S., Watanabe, I., Furukawa Y. y Kimura, S. (1996). Plasma cholesterol-suppressing effect of papain-hydrolyzed pork meat in rats fed hypercholesterolemic diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 42, 145-153.
- Mottram, D. S. y Whitfield, F. B. (1995). *Maillard-lipid interactions in nonaqueous systems: volatiles from the reaction of cysteine and ribose with phosphatidylcholine*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1302-1306.
- Mulally, M.M., Meisel, H. y FitzGerald, R.J. (1997). *Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digest of whey proteins*. *International Dairy Journal*, 7, 299-303.
- Mulero Cánovas, J., Zafrilla Rentero, P., Martínez-Cachá Martínez, A., Leal Hernández, M. y Abellán Alemán, J. (2011). *Péptidos bioactivos*. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 23(5), 219-227.
- Muthukumarasamy, P. y Holley, R.A. (2007). *Survival of Escherichia coli O157: H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria*. *Food Microbiology*, 24(1), 82-88.

- Naes, H., Chrzanowska, J., Nissen-Meyer, J., Pedersen, B.O. y Blom, H. (1991). *Fermentation of dry sausage. The importance of proteolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria*. Proc. 38th ICoMST, Kulmbach. 914-917.
- Naes, H. y Nissen-Meyer, J. (1992). *Purification and N-terminal amino acid sequence determination of the cell-wall-bound proteinase from Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*. Journal of General Microbiology, 138, 313-318.
- Naes, H., Holck, A.L., Axelsson, L., Andersen, H.J. y Blom, H. (1995). *Acelerated ripening of dry fermented sausage by addition of a Lactobacillus proteinase*. International Journal of Food Science and Technology, 29, 651-659.
- Nagao, J.I., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K.I., Nakayama, J. y Sonomoto, K. (2006). *Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 102(3), 139-149.
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamura, Y., Tadashi, K. y Kuwata, T. (2001). *Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk betalactoglobulin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 281, 11-17.
- Naim, F., Messier, S., Saucier, L. y Piette, G. (2003). *A model study of Escherichia coli O157: H7 survival in fermented dry sausages-influence of inoculum preparation, inoculation procedure, and selected process parameters*. Journal of Food Protection®, 66(12), 2267-2275.
- Nakamura, Y., Yamamoto, M., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. y Takano, T. (1995a). *Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk*. Journal of Dairy Science, 78, 777-783.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. y Takano, T. (1995b). *Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme*. Journal of Dairy Science, 78, 1253-1257.
- Nakano, D., Ogura, K., Miyakoshi, M., Ishii, F., Kawanishi, H., Kurumazuka, D., Chol-Jun-Kwan, Ikemura, K., Takaoka, M., Morigushi, S., Iino, T., Kusumoto, A., Asami, S., Shibata, H., Kiso, Y. y Matsumura, Y. (2006). *Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 70(5), 1118-1126.

- Nakashima, Y., Arihara, K., Sasaki, A., Mio, H., Ishikawa, S. y Itoh, M. (2002). *Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats*. Journal of Food Science, 67(1), 434-437.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. y Shahidi, F. (2011). *Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna*. Food Chemistry, 124, 1354-1362.
- Nes, I.F., Yoon, S.S. y Diep, D.B. (2007). *Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review*. Food Science and Biotechnology, 16(5), 675-690.
- Niinivaara, F. P. (1955). *Über den einfluß von bakterien-reinkulturen auf die reifung und umrötung der rohwürst*. Acta Agralia Fennica, 85, 1-128.
- Nishimura, T., Rhue, M. R., Okitani, A. y Kato, H. (1988). *Components contributing to the 5 improvement of meat taste during storage*. Agricultural and Biological Chemistry, 52, 2323-2330.
- Niven, C. F., Brettner, L. G. y Evans, J. B. (1954). *Thermal tolerance studies on the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products*. Application of Microbiology, 2, 26-29.
- Nurmi, E. (1966). *Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage*. Acta Agralia Fennica, 108, 1-77.
- Okada, S., Tanaka, K., Sato, T., Ueno, H., Saito, S., Okusaka, T., Sato, K., Seiichiro, Y. y Kakizoe, T. (2002). *Dose-response trial of lactoferrin in patients with chronic hepatitis C*. Japanese Journal of Cancer Research, 93(9), 1063-1069.
- Okitsu, M., Morita, A., Kakitami, M., Okada, M. y Yokogoshi, H. (1995). *Inhibition of the endothelin-converting enzyme by pepsin digest of food proteins*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59, 325-326.
- Okuda, M., Nakazawa, T., Yamauchi, K., Miyashiro, E., Koizumi, R., Booka, M., Teraguchi, S., Tamura, Y., Yoshikawa, N., Adachi, Y. y Imoto, I. (2005). *Bovine lactoferrin is effective to suppress Helicobacter pylori colonization in the human stomach: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Journal of Infection and Chemotherapy, 11(6), 265-269.

- 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.
- Olsen, H., Grimmer, S., Aaby, K., Saha, S. y Borge, G.I. (2012). *Antiproliferative effects of fresh and thermal processed green and red cultivars of curly kale (Brassica oleracea L. acephala var. sabellica)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 7375-7383.
- Ondetti, M.A. y Cushman, D.W. (1982). *Enzymes of the rennin-angiotensin system and their inhibitors*. Annual Review of Biochemistry, 51, 283-308.
- Ong, L., Henriksson, A. y Shah, N.P. (2008). *Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic Lactobacillus casei sp.* Le Lait, 87(2), 149-165.
- Ordóñez, J.A. y De La Hoz, L. (2001). *Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones*. En: Enciclopedia de la Carne y Productos Cárnicos. Vol. II. Martín y Macías. Cáceres.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E.V., 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.
- Orsi, N. (2004). *The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives*. Biometals, 17, 189-196.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M. y Prior, R. L. (2001). *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4619-4626.
- Pagelow, I. y Werner, H. (1996). *Immunomodulation by some oligopeptides*. Methods and Findings of Experimental Clinical Pharmacology, 8, 91-95.
- Pala, T.R. y Sevilla, A. (2004). *Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iberian pork cutting plant*. Journal of Food Protection®, 67(8), 1624-1629.
- Pan, D., Luo, Y. y Tanokura, M. (2004). *Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of Lactobacillus helveticus JCM1004*. Food Chemistry, 91, 123-129.

- Papa, F., Zambonelli, C. y Grazia, L. (1995). *Production of Milano style salami of good quality and safety*. Food Microbiology, 12, 9-12.
- Papadimitriou, C.G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S.V., Gomes, A.M., Malcata, F.X. y Alichanidis, E. (2007). *Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity*. Food chemistry, 105(2), 647-656.
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivraprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E. y Kraulis, P.J. (1986). *The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein*. Nature, 324, 383-385.
- Parker, F., Migliore-Samour, D., Floc'h, F., Zerial, A., Wemer, G.H., Jollès, J., Casaretto, M., Zahn, H. y Jollès, P. (1984). *Immunostimulating hexapeptide from human casein: aminoacid sequence, synthesis and biological properties*. European Journal of Biochemistry, 45, 677-682.
- Parodi, P.W. (1998). *A role for milk proteins in cancer prevention*. Australian Journal of Dairy Technology, 53(1), 37-47.
- Parry, J., Su, L., Moore, J., Cheng, Z., Luther, M., Rao, J.N., Wang, J.Y. y Yu, L. L. (2006). *Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(11), 3773-3778.
- Pascual Anderson, M.R. y Calderón, V. (1999). *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y Bebidas*. 2º Edición. Ed. Díaz de Santos.
- Pasi, A., Mahler, H., Linsel, N., Bernasconi, C. y Messiha, F.S. (1993). *B-casomorphin-immunoreactivity in the brain stem of the human infant*. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 80, 305-322.
- Pätäja, M.R. (1977). *The effect of some gram-negative bacteria on the ripening and quality of dry sausage*. Journal of Agricultural Science in Finland, 49, 107-166.
- 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 I: evaluation of*

- their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns.* Meat Science, 75, 676-686.
- Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. y Millan, F. (2007). *Obtaining of Brassica carinata protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases.* Food Research International, 40(7), 931-938.
- Peña-Ramos, E.A. y Xiong, Y.L. (2001). *Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system.* Journal of Dairy Science, 84(12), 2577-2583.
- Peña-Ramos, E.A. y Xiong, Y.L. (2002). *Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system.* Journal of Food Science, 67(8), 2952-2956.
- Peña-Ramos, E.A. y Xiong, Y.L. (2003). *Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties.* Meat Science, 64(3), 259-263.
- Peña-Ramos, E.A., Xiong, Y.L. y Arteaga, G.E. (2004). *Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(14), 1908-1918.
- Petrón, M.J., Broncano, J.M., Otte, J., Martín, L. y Timón, M.L. (2013). *Effect of commercial proteases on shelf-life extension of Iberian dry-cured sausage.* LWT-Food Science and Technology, 53(1), 191-197.
- Phillips, A.L., Means, W.J., Kalchayanand, N., McCormick, R.J. y Miller, K.W. (2000). *Bovine placental protease toward muscle connective tissue proteins.* Journal of Animal Science, 78, 1861-1866.
- Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamone, G., Caira, S., Di Luccia, A., Monica, S. y Addeo, F. (2010). *Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications.* Journal of Chromatography B, 878(3), 295-308.
- Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Bergé, J.P., Guérard, F., Chabeaud, A. y Piot, J.M. (2006). *Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines.* Process Biochemistry, 41(5), 1217-1222.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2000). *Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides.* Trends in Food Science & Techonology, 11, 347-356.

- Pihlanto-Leppälä, A. (2006). *Antioxidative peptides derived from milk proteins*. International Dairy Journal, 16, 1306-1314.
- Pihlanto-Leppälä, A. y Korhonen, H. (2003). *Bioactive peptides and proteins*. Advances in Food & Nutrition Research, 47, 175-276.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. y Korhonen H. (1998). *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins*. International Dairy Journal, 8, 325-331.
- Pohja, M.S. (1960). *Micrococci in fermented meat products*. Acta Agralia Fennica, 96, 1-80.
- Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T. y Sinell, H.J. (1994). *Embutidos crudos*. En: Tecnología e higiene de la carne. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España. pp. 543-577.
- Pritchard, S.R., Phillips, M. y Kailasapathy K. (2010). *Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese*. Food Research International, 43, 1545-1548.
- Qi, W., Su, R. y He, Z. (2007). *Transformation of antimicrobial into bradykinin-potentiating peptides during peptic hydrolysis of bovine haemoglobin: identification, release kinetics and reaction network of peptides*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 87(3), 461-469.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A. y Recio, I. (2007). *Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with Enterococcus faecalis*. International Dairy Journal, 17, 33-41.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.K., Je, J.Y. y Kim, S.K. (2005). *Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties*. Food Research International, 38(2), 175-182.
- Recio, I. y Visser, S. (1999a). *Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein*. Biochimica et Biophysica Acta, 1428, 314-326.
- Recio, I. y Visser, S. (1999b). *Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane*. Journal of Chromatography A, 831, 191-201.

- Reddy, M.i., Kela, N.K.D. y Kinsella, J.E. (1988). *Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36, 737-741.
- Reynolds, E. (1987). International Patent Application WO87/07615 A1.
- Riordan, D.C., Duffy, G., Sheridan, J.J., Eblen, B.S., Whiting, R.C., Blair, I.S. y McDowell, D.A. (1998). *Survival of Escherichia coli O157: H7 during the manufacture of pepperoni*. Journal of Food Protection®, 61(2), 146-151.
- Rival, S.G., Boeriu, C.G. y Wichers, H.J. (2001). *Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(1), 295-302.
- Rocabayera, X. (1992). *Composition and industrial production of starter cultures for the meat industry*. En: News technologies for meat and meat products. Smulders F.J.M., Toldrá F., Flores J. y Prieto M. (eds.), pp: 91-107. ECCEAMST, Utrech.
- Rodríguez, M.M., Nuñez, F., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A. (1998). *Evaluation of proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry cured ham*. Journal of Applied Microbiology, 85, 905-912.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J.P., Jiménez-Gúzman, J. y García-Garibay, M. (2012). *Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by Lactobacillus casei Shirota*. International Dairy Journal, 26(2), 147-154.
- Rokka, T., Syväoja, E.L., Tuominen, J. y Korhonen, H. (1997). *Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of Lactobacillus GG fermented UHT-milk*. Milchwissenschaft, 52, 675–678.
- Roseiro, L.C., Santos, C., Sol, M., Borges, M.J., Anjos, M., Gonçalves, H. y Carvalho, A.S. (2008). *Proteolysis in Painho de Portoalegre dry fermented sausage in relation to the ripening time and salt content*. Meat Science, 79, 784-794.
- Roseiro, L.C., Gomes, A., Gonçalves, H., Sol, M., Cercas, R. y Santos, C. (2010). *Effect of processing on proteolysis and biogenic amines formation in a Portuguese traditional dry fermented ripened sausage “Chouriço Grosso de Estremoz e Borba 552 PGI”*. Meat Science, 84, 172-179.

- Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán, M.D., Rovira, J. y Jaime, I. (2008). *Effect of the packaging method and the storage time on lipid oxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichón manufactured with raw material with a high level of mono and polyunsaturated fatty acids*. Meat Science, 80, 1182-1187.
- Ruíz, J., López-Bote, C., Antequera, T., Tejeda, J. F., Timón, M. L. y Cava, R. (1996). *Odd-numbered chain fatty acids content of iberian pig as affected by fed composition*. Proceedings of the 42th ICoMST.
- Ruíz, J., Cava, R., Ventanas, J. y Jensen M.T. (1998). *Headspace solid phase microextraction for the análisis of volatiles in a meat product: dry cured Iberian ham*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4688-4694.
- Ruíz, J., Muriel, E. y Ventanas, J. (2002). *The flavour of iberian ham*. En: Research Advances in the Quality of Meat and Meat Products, Toldrá (ed), F. Research Trivandrum, Signpost, India.
- Ruíz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Casquete, R., Serradilla, M.J. y Córdoba, M.G. (2009). *Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages*. Meat Science, 83, 460-467.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Hernández, A., Casquete, R., Córdoba, M.G. (2011). *Application of Lactobacillus fermentum HL57 and Pediococcus acidilactici SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages*. Food Microbiology, 28, 839-847.
- Rutherford-Markwick, K.J y Moughan, P.J. (2005). *Bioactive peptides derived from food*. Journal of AOAC International, 88, 955-966.
- Rydlo, T., Miltz, J. y Mor, A. (2006). *Eukaryotic antimicrobial peptides: promises and premises in food safety*. Journal of Food Science, 71(9), R125-R135.
- Ryhänen, E-V., Pihlanto-Lepälä, A. y Pahkala, E. (2001). *A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties*. International Dairy Journal, 11, 441-447.
- Sabbione, A.C., Scilingo, A. y Añón, M. C. (2015). *Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates*. LWT-Food Science and Technology, 60(1), 171-177.
- Saiga, A., Okamura, T., Makihara, T., Katsuta, S., Shimizu, T., Yamada, R. y Nishimura, T. (2003a). *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a*

- hydrolyzed chicken breast muscle extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1741-1745.
- Saiga, A., Tanabe, S. y Nishimura, T. (2003b). *Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 3661-3667.
- Saito, K., Jin, D.H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T. y Nokihara, K. (2003). *Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(12), 3668-3674.
- Saito, T., Abubakar, A., Itoh, T., Arai, I. y Aimar, M.V. (1997). *Development of a new type of fermented cheese whey beverage with inhibitory effects against angiotensin-converting enzyme*. Tohoku Journal of Agricultural Research, 48, 15-23.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T. (2000). *Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese*. Journal of Dairy Science, 83, 1434-1440.
- Sakanaka, S. y Tachibana, Y. (2006). *Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates*. Food Chemistry, 95(2), 243-249.
- Salgado, A., García Fontán, M.C., Franco, I., López, I. y Carballo, J. (2005). *Biochemical changes during the ripening of Chorizo de cebolla, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial)*. Food Chemistry, 92, 413-424.
- Sandtorv, B.F., Holck, A.L., Naes, H., Langsrud, O., Pedersen, B.O. y Blom, H. (1995). *The effect of two bacterial proteinases on dry sausage ripening*. Proc.41 st ICoMST, San Antonio. 503-504.
- Sanz, Y. y Toldrá, F. (2002). *Purification and characterization of an arginine aminopeptidase from Lactobacillus sakei*. Applied and Environmental Microbiology, 68, 1980-1987.
- Sanz, Y., Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. y Toldrá, F. (1999). *Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmatic proteins by Lactobacillus curvatus and Lactobacillus sake*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 578-584.

- Schanbacher, F.L., Talhouk, R.S., Murray, F.A., Gherman, L.I. y Willet, L.B. (1998). *Milk borne bioactive peptides*. International Dairy Journal, 8, 393-403.
- Schillinger, U., Kaya, M. y Lücke, F.K. (1991). *Behaviour of Listeria monocytogenes in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of Lactobacillus sake*. Journal of Applied Bacteriology, 70, 473– 478.
- Schimtzová, J., Klaudivy, J., Albert, Š., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J. y Šimúth, J. (1998). *A family of major royal jelly proteins of the honeybee Apis mellifera L.* Cellular and Molecular Life Sciences, 54, 1020-1030.
- Schlimme, E. y Meisel, H. (1995). *Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects*. Nahrung, 39, 1-20.
- Schmidt, D.G. y Poll, J.K. (1991). *Enzymatic hydrolysis of whey protein. Hydrolysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes*. Netherlands Milk and Dairy Journal, 47, 15-22.
- Schmidt, D.G. y van Markwijk, B.W. (1993). *Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain*. Netherlands Milk and Dairy Journal, 47, 15-22.
- Schöbitz, R., Zaror, T., León, O. y Costa, M. (1999). *A bacteriocin from Carnobacterium piscicola for the control of Listeria monocytogenes in vacuum-packaged meat*. Food microbiology, 16(3), 249-255.
- Sekikawa, M., Kawamura, T., Fujii, H., Shimada, K., Fukushima, M. y Mikami, M. (2003). *Effect of arginine on growth of lactic acid bacteria for fermented sausage under high concentration of salt*. Hokkaido Animal Science and Agriculture Society, 45, 17-23.
- Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (2006a). *A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme*. Food Chemistry, 97, 546-554.
- Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (2006b). *A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity*. Nature Protocols, 1(5), 2423-2427.
- Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (2007). *Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases*. Food Chemistry, 102(2), 511-515.

- Shalaby, A.R., (1996). *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. Food Research International, 29, 675-690.
- Shahidi, F. y Amarowicz, R. (1996). *Antioxidant activity of protein hydrolyzates from aquatic species*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 73(9), 1197-1199.
- Shahidi, A. y Zhong, B. (2008). *Bioactive peptides*. Journal of AOAC International, 91, 914-931.
- Shebuski, R.J., Berry, D.E., Romoff, R., Storer, B.L., Ali, F. y Samanen, J. (1989). *Demonstration of Ac-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂ as an antiaggregatory agent in the dog by intracoronary administration*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 61, 183-188.
- Shimizu, M. (2004). *Food-derived peptides and intestinal functions*. Biofactors, 21, 43-47.
- Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M., Dhulster, P. y Bougatef, A. (2014). *Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria*. LWT-Food Science and Technology, 55(1), 183-188.
- Silva, S.V., Pihlanto, A. y Malcata, F.X. (2006). *Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from Cynara cardunculus*. Journal of dairy science, 89(9), 3336-3344.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H. y Nurminen, M.L. (2002). *Effects of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats*. Journal of Dairy Research, 69, 103-111.
- Smacchi, E. y Gobetti, M. (1998). *Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, Pseudomonas fluorescens ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme*. Enzyme and microbial technology, 22(8), 687-694.
- Smacchi, E. y Gobetti, M. (2000). *Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes*. Food Microbiology, 17, 129-141.
- Smith, J.L. y Palumbo, S.A. (1983). *Use of Starter Cultures in meat*. Journal of Food Protection, 46 (11), 997-1006.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985). *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 150, 76-85.
- Speck, M.L. (1972). *Control of food-borne pathogens by starter cultures*. Journal of Dairy Science 55(7), 1019-1022.
- Stahnke, L.H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A. y Zanardi, E. (2002). *Maturity acceleration of Italian dried sausage by Staphylococcus carnosus—relationship between maturity and flavor compounds*. Journal of Food Science, 67, 1914–1921.
- Steijns, J. (1996). *Dietary proteins as the source of new health promoting bioactive peptides with special attention to glutamine peptide*. Food Technology in Europe, 3, 80-84.
- Stepanovic, S., Dakić, I., Morrison, D., Hauschild, T., Jesek, P., Petráš, P., Martel, A., Vukovic, D., Shitu, A. y Devriese, L.A. (2005). *Identification and characterization of clinical isolates of members of the Staphylococcus sciuri group*. Journal of Clinical Microbiology, 43(2)956-958.
- Storcksdieck, S., Bonsmann, G. y Hurrell, R.F. (2007). *Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources*. Journal of food science, 72(1), S019-S029.
- Suetsuna, K. y Chen, J.R. (2001). *Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae: Chlorella vulgaris and Spirulina platensis*. Marine Biotechnology, 3, 305-309.
- Suetsuna, K., Ukeda, H. y Ochi, H. (2000). *Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 11(3), 128-131.
- Sun, W., Zhao, H., Zhao, Q., Zhao, M., Yang, B. y Wu, N. (2009). *Structural characteristics of peptides extracted from Cantonese sausage during drying and their antioxidant activities*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 558–563.
- Sunesen, L.O. y Stahnke, L.H., (2003). *Mould starter cultures for dry sausages selection, application and effects*. Meat Science, 65, 935-948.

- Sunesen, L.O., Trihaas, J. y Stahnke, L.H. (2004). *Volatiles in a sausage surface model influence of Penicillium nalgiovense, Pediococcus pentosaceus, ascorbate, nitrate and temperature*. Meat Science, 66, 447- 456.
- Sütas, Y., Soppi, E., Korhonen, H., Syväoja, E-L., Saxelin, M., Rokka, T. y Isolauri, E. (1996). *Suppression of lymphocyte proliferation in vitro by bovine caseins hydrolyzed with Lactobacillus casei GG-derived enzymes*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 98, 216-224.
- Suzzi, G. y Gardini, F. (2003). *Biogenic amines in dry fermented sausages: a review*. International Journal of Food Microbiology, 88, 41-54.
- Svedberg, J., de Haas, J., Leimenstoll, G., Paul, F. y Teschemacher, H. (1985). *Demonstration of β -casomorphin immunoreactive material in in vitro digest of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans*. Peptides, 6, 825-830.
- Talon, R. y Leroy, S. (2011). *Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations*. Meat Science, 89, 303-309.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S. y Fadda, S. (2002). *Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products*. En: Research advances in the quality of meat and meat products. Toldrá, F. (Ed.). Research Signpost, Kerala, India. pp. 175-191.
- Talon, R., Leroy, S., Lebert, I., Giammarinaro, P., Chacornac, J.-P. y Latorre-Moratalla, M. (2008). *Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures*. International Journal of Food Microbiology, 126, 227-234.
- Tani, F., Shiota, A., Chiba, H. y Yoshikawa, M. (1994). *Serophin, an opioid peptide derived from bovine serum albumin*. En β -casomorphins and Related Peptides: Recent Developments. Brantl, V. y Teschemacher, H. (eds). Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH-Verlag, 49-53.
- Tantillo, M.G., Di Pinto, A. y Novello, L. (2002). *Bacteriocin-producing Lactobacillus sake as starter culture in dry sausages*. Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences, 25(1), 45-50.
- Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A. y Chamani, J. (2012). *An antioxidant peptide derived from Ostrich (Struchio camelus) egg white protein hydrolysates*. Food Research International, 49, 105-111.

- Tavares, T.G., Contreras, M.M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P J., Pintado, M.E., Recio, I. y Malcata, F. X. (2011). *Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract*. International Dairy Journal, 21(12), 926-933.
- Teschemacher, H. (2003). *Opioid receptor ligands derived from food proteins*. Current Pharmaceutical Desing, 9(16), 1331-1344.
- Teschemacher, H., Koch, G. y Brantl, V. (1997). *Milk protein-derived opioid receptor ligands*. Biopolymers, 43, 99-117.
- Tjener, K., Stahnke, L. H., Andersen, L. y Martinussen, J. (2004). *Growth and production of volatiles by Staphylococcus carnosus in dry sausages: Influence of inoculation level and ripening time*. Meat Science, 67, 447-452.
- Toldrá, F. (1998). *Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products*. Meat Science, 49(1), 101-110.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C. y Flores, M. (2000). *Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham*. Food Research International, 33, 181-185.
- Toldrá, F., Sanz, Y. y Flores, M. (2001). *Meat fermentation technology*. En: Meat Science and Applications. Y.H. Kui, W.-K. Nip, R.W. Rogers, O.A. Young (eds). Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp. 537-561.
- Toldrá, F. (2006). *The role of muscle enzymes in dry cured meat products with different drying conditions*. Trends in Food Science and Technology, 17, 164-168.
- Tomé, D., Dumontie, A.M., Hautefeuille, M. y Desjeux, F.J. (1987). *Opiate activity and transepithelial passage of intact β -casomorphins in rat ileum*. American Journal of Physiology, 253, G737-G744.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M. y Vioque, J. (2011). *Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates*. Food Chemistry, 129, 485-490.
- Trigueros, G., García, M. L., Casa, C., Ordóñez, J. A. y Selgas, M. D. (1995). *Proteolytic and lipolytic activities of mould strains isolated from Spanish dry fermented sausage*. Z. Lebensm Unters Forch, 201, 298-305.

- Tsai, J.S., Chen, T.J., Pan, B.S., Gong, S.D. y Chung, M.Y. (2008). Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry*, 106(2), 552-558.
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Petrović, L. y Peričin, D. (2010). *Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity in the water-soluble protein extract from Petrovac Sausage (Petrovska Kolbasa)*. *Food Control*, 21(9), 1298-1302.
- Venéreo, J.R. (2002). *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31, 126-133.
- 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.
- Vercruyse, L., Van Camp, J. y Smaghe, G. (2005). *ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8106-8115.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Decroos, K., Van Wijmelbeke, L., & Verstraete, W. (2003). The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. *Journal of Dairy Science*, 86, 429-438.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J. y Verstraete, W. (2004). *Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides*. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.
- Verplaetse, A. (1994). *Influence of raw meat properties and processing technology on aroma quality of raw fermented meat products*. In *International Congress of Meat Science and Technology*, 40, 45-45.
- Verplaetse, A., De Bosschere, M. y Demeyer, D. (1989). *Proteolysis during dry sausage ripening*. In *Proceedings of the 35th international congress of meat science and technology*. Denmark: Copenhagen. pp. 20-25.
- Villalobos, M.C. (2011). *Estudio de la vida útil de cerezas tipo picota tradicionalmente cultivadas en el Valle del Jerte*. Trabajo de Grado. Universidad de Extremadura.
- Vioque, J. y Millán, F. (2005). *Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud*. *AgroCSIC*, 26, 103-107.

- Vistica, D.T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. y Boyd, M.R. (1991). *Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production*. *Cancer Research*, 51(10), 2515-2520.
- Wang, B., Li, L., Chi, C.F., Ma, J.H., Luo, H.Y. y Xu, Y.F. (2013). *Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate*. *Food Chemistry*, 138, 1713-1719.
- Wang, J.S., Zhao, M.M., Zhao, Q.Z. y Jiang, Y.M. (2007). *Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems*. *Food Chemistry*, 101, 1658–1663.
- Wang, L.L. y Xiong, Y.L. (2005). *Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9186-9192.
- Wang, W. y González, E. (2005). *A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 63-78.
- Ward, P.P., Paz, E. y Conneely, O.M. (2005). *Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2540-2548.
- Weidenfeller, P. y Fegeler, W. (1990). *Methodological aspects of a micro-identification technique for the differentiation of coagulase-negative staphylococci to species level*. *Zentralb Bakteriologie*, 274, 78-90.
- Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O.A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z., Mork, S. y Berge, R.K. (2004). *Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats*. *Journal of Nutrition*, 134(6), 1320-1327.
- Whitfield, F.B. (1992). *Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31, 1-58.
- Whiting, R.C. (1993). *Modeling bacterial survival in unfavorable environments*. *Journal of Industrial Microbiology*, 12(3-5), 240-246.
- Wijesekara, I., Qian, Z., Ryu, B., Ngo, D. y Kim, S. (2011). *Purification and identification of antihypertensive peptides from seaweed pipefish (*Syngnathus schlegeli*) muscle protein hydrolysate*. *Food research International*, 44, 703-707.

- Williams, A.G., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D. y Banks, J.M. (2002). *Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese*. International Dairy Journal, 12, 841-852.
- Wong, J.H. y Ng, T.B. (2003). *Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Baill)*. Peptides, 24(7), 963-968.
- Wu, J. y Ding, X. (2001). *Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(1), 501-506.
- Wu, H. C., Shiau, C. Y., Chen, H. M. & Chiou, T. K. (2003). *Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination*. Journal of Food and Drug Analysis, 11, 148-153.
- Xiao, R., Badger, T.M. y Simmen, F.A. (2005). *Dietary exposure to soy or whey proteins alters colonic global gene expression profiles during rat colon tumorigenesis*. Molecular Cancer, 4, 1-17.
- Xue, Z., Gao, J., Zhang, Z., Yu, W., Wang, H. y Kou, X. (2012). *Antihyperlipidemic and antitumor effects of chickpea albumin hydrolysate*. Plant foods for human nutrition, 67(4), 393-400.
- Xue, Z., Wen, H., Zhai, L., Yu, Y., Li, Y., Yu, W., Chen, A., Wang, C. y Kou, X. (2015). *Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.)*. Food Research International. In Press.
- Yamada, Y., Matoba, N., Usui, H., Onishi, K. y Yoshikawa, M. (2002). *Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on ovokinin (2-7)*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 66(6), 1213-1217.
- Yamamoto, N., Akino, A. y Takano, T. (1994). *Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790*. Journal of Dairy Science, 77, 917-922.
- Yamamoto, N. y Takano, T. (1999). *Antihypertensive peptides derived from milk proteins*. Nahrung, 43, 159-164.
- Yamamoto, N., Maeno, M. y Takano, T. (1999). *Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4*. Journal of Dairy Science, 82, 1388-1393.

- Yamamoto, N., Ejiri, M. y Mizuno, S. (2003). *Biogenic peptides and their potential use*. Current Pharmaceutical Design, 9, 1345-1355.
- Yang, L., Tada, Y., Yamamoto, M.P., Zhao, H., Yoshikawa, M. y Takaiwa, F. (2006). *A transgenic rice seed accumulating an anti-hypertensive peptide reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats*. FEBS letters, 580(13), 3315-3320.
- Ye, X.Y. y Ng, T.B. (2001). *Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to Cowpea 10-kDa protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 285(2), 424-429.
- Yen, G.C. y Hsieh, C.L. (1997). *Antioxidant effects of dopamine and related compounds*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 1646-1649.
- Yi, H.J., Kim, J.Y., Kim, K.H., Lee, H.J. y Lee, H.J. (2003). *Anticancer activity of peptide fractions from egg White hydrolysate against mouse lymphoma cells*. Food Science and Biotechnology, 12, 224-227.
- Yoo, Y.C., Watanabe, R., Koike, Y., Mitobe, M., Shimazaki, K., Watanabe, S. y Azuma, I. (1997). *Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 237, 624-628.
- Yoshikawa, M. y Chiba, H. (1990). *Biologically active peptides derived from milk proteins*. Japanese Journal of Dairy and Food Science, 39, A315-A321.
- Yoshikawa, M., Tani, F. y Chiba, H. (1988). *Structure-activity relationship of opioid antagonist peptides derived from milk proteins*. En Peptide Chemistry. Shiba, T. (ed). Osaka: protein research foundation, 473-476.
- Yoshikawa, M., Fujita, H., Matoba, N., Takenaka, Y., Yamamoto, T., Yamauchi, R., Tsukuri, H. y Takahata, K. (2000). *Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases*. BioFactors, 12(1-4), 143-146.
- Yoshikawa, M., Takahashi, M. y Yang, S. (2003). *Delta opioid peptides derived from plant proteins*. Current Pharmaceutical Desing, 9(16), 1325-1330.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M. y Ren, J. (2010). *Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion*. Food Chemistry, 120, 810-816.

- You, S.J. y Wu, J. (2011). *Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities of Egg Protein Hydrolysates Produced with Gastrointestinal and Nongastrointestinal Enzymes*. Journal of food science, 76(6), C801-C807.
- Yustm, M., Pedroche, J., Girón-Calle, j., Alaiz, M., Millán, F. y Vioque, J. (2003). *Production of ACE inhibitory peptides by digestión of chickpea legumin with alcalase*. Food Chemistry, 81, 363-369.
- Yvon, M., van Hille, J.P., Péliissier, J.P., Guilloteau, P. y Toullec, R. (1984). *In vivo milk digestion in the calf abomasums. 2. Milk and whey proteolysis*. Reproduction Nutrition Development, 24, 835-843.
- Zapelena, M.J., Zalacaín, I., De Peña M.P., Astiasarán, I. y Bello, J. (1997). *Addition of a neutral proteinase from Bacillus subtilis (Neutrase) together with a starter to a dry fermented sausage elaboration and its effect on the amino acid profiles and the flavor development*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 472-475.
- Zapelena, M.J., Asorena, D., Zalacain, I., Astiasarán, I. y Bello, J. (1998). *Dry fermented sausages manufactured with different amounts of comercial proteinases: evolution of total free α -NH₂-N groups and sensory evaluation of the texture*. Meat Science, 49, 213-221.
- Zapelena, M.J., Astiasarán, I. y Bello, J. (1999). *Dry fermented sausages made with a protease from Aspegillus oryzae and/or a starter culture*. Meat Science, 52, 403-409.
- Zhang, M., Mu, T.H. y Sun, M. J. (2014). *Purification and identificacion of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase*. Journal of Functional Foods, 7, 191-200.
- Zhong, F., Liu, J., Ma, J. y Shoemaker, C.F. (2007a). *Preparation of hypocholesterolemic peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice*. Food Research International, 40, 661-667.
- Zhong, F., Zhang, X., Ma, J. y Shoemaker, C.F. (2007b). *Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates*. Food Research International, 40, 756-762.

- Zhu, K., Zhou, H. y Qian, H. (2006). *Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase*. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.
- Zucht, H.D., Raida, M., Andermann, K., Mägert, H.J. y Forsmann, W.G. (1995). *Casocidin-I: a casein- α_{s2} -derived- peptide exhibits antibacterial activity*. *FEBS Letters*, 372, 185-188.

VIII.- RESUMEN

En este trabajo se han utilizado, de entre las cepas de BAL, micrococáceas y estafilococáceas autóctonas de embutidos de cerdo ibérico de diferentes industrias de Extremadura, dos cepas de *Pediococcus acidilactici* (MS198 y MS200) y una de *Staphylococcus vitulus* (RS34), que fueron las que mostraron mejores características acorde con los criterios tecnológicos y de seguridad para ser usadas como cultivos iniciadores mixtos en la elaboración de embutidos de cerdo Ibérico de procesado tradicional. Así, dos cultivos iniciadores mixtos (P198S34 y P200S34) formados por la combinación de una cepa de *P. acidilactici* y la cepa de *S. vitulus* han sido inoculados en dos productos diferentes (chorizo y salchichón) elaborados en la industria 1, donde los embutidos sufría un proceso de maduración más corto. El cultivo iniciador P200S34 y la proteasa EPg222, obtenida por sobreexpresión de *Penicillium chrysogenum*, se utilizaron en también, juntos y por separado, para elaborar salchichones en la industria 2, con un procesado de maduración más largo.

El análisis de las diferentes muestras a lo largo de la maduración de los embutidos, mostró que todos los cultivos iniciadores mixtos estudiados fueron capaces de implantarse y desarrollarse en los dos procesos de elaboración ensayados, sin modificar significativamente las características físico-químicas de los embutidos. Además el cultivo mixto P200S34, formado por la cepa de *P. acidilactici* MS200 y *S. vitulus* RS34 mostró una mejor adaptación a las condiciones del procesado de los salchichones de la industria 1.

Se ha estudiado la actividad proteolítica de los distintos cultivos iniciadores y su capacidad para formar compuestos nitrogenados con actividades funcionales. Además, se ha comprobado la estabilidad de estos compuestos nitrogenados frente a la acción de las enzimas digestivas mediante la simulación de la digestión gastrointestinal (SDGI) *in vitro*.

Los resultados obtenidos mostraron que se producía una mayor concentración de compuestos nitrogenados en las muestras obtenidas de los chorizos, sin que aparecieran diferencias significativas entre los cultivos iniciadores utilizados y el lote control. En las muestras de salchichones, destacaron los lotes elaborados con la proteasa EPg222, sola o en combinación con el cultivo iniciador P200S34. Tras la SDGI, las concentraciones de los chorizos descendieron a la vez que aumentaba la de los salchichones, de modo

que se igualaron las concentraciones de compuestos nitrogenados, sin que aparecieran diferencias significativas entre los distintos cultivos iniciadores utilizados.

El análisis de la actividad inhibidora de la enzima convertora de la angiotensina reveló una mayor actividad en los lotes elaborados con el cultivo iniciador P200S34 en la industria 1. Además, la inhibición producida fue similar a la que mostraron los lotes inoculados con la proteasa EPg222 al final de la maduración (90 días) en la industria 2. Sin embargo, el máximo de actividad se observó en estos dos últimos lotes a los 65 días de maduración de los salchichones en la industria 2. En cuanto a la actividad antioxidante presente en los extractos, volvieron a destacar el cultivo iniciador P200S34 en los salchichones elaborados en la industria 1, así como el lote que contenía la enzima EPg222, sola o en combinación con el cultivo iniciador P200S34. La actividad observada en los chorizos. La SDGI mantuvo o produjo un aumento de ambas actividades en todos los lotes elaborados, excepto en el lote de salchichones inoculado con el cultivo iniciador P200S34 en la industria 1 que disminuyó, lo cual hace pensar que los compuestos nitrogenados liberados por este cultivo iniciador durante los 65 días de maduración de los salchichones son más sensibles a la acción de las enzimas digestivas.

Se observó un claro efecto del tiempo de incubación de los extractos de compuestos nitrogenados con las células tumorales de colón, de modo que a mayor tiempo de incubación, mayor inhibición del crecimiento se produjo. Así, tras 72 horas de incubación se observaron los mayores porcentajes de inhibición por parte de los compuestos nitrogenados presentes en los extractos. A pesar de esto, apenas se observó inhibición por parte de los extractos obtenidos de los chorizos. Sin embargo, en los extractos obtenidos de los salchichones se observaron porcentajes de inhibición entre el 40% y el 60%, destacando los lotes inoculados frente a los lotes control. La SDGI aumentó significativamente la actividad presente en las muestras de chorizo mientras que en los salchichones, dicha actividad se mantuvo e incluso en algunos lotes disminuyó.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas no se observó en los extractos de los distintos lotes y embutidos hasta el final del proceso de maduración de los embutidos. No se detectó inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes*, aunque si se produjo inhibición en el crecimiento de otros patógenos

gram negativos como *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis*, y gram positivos como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Sobre este microorganismo se produjo la mayor inhibición observada. Los cultivos iniciadores que contienen el cultivo iniciador P200S34 y la proteasa EPg222 tuvieron los mayores efectos inhibitorios sobre el crecimiento de patógenos, haciendo de estos una herramienta prometedora para el control biológico en la industria cárnica. De nuevo, la SDGI aumentó el grado de actividad presente en los extractos.

Finalmente, se identificaron los componentes nitrogenados mayoritarios presentes en los extractos y se observó una clara relación entre estos y el tipo de producto y procesado utilizado, sin existir muchas diferencias en cuanto al cultivo iniciador inoculado.

IX.- ANEXOS

Tabla IX.1. - Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados menores de 5 KDa a lo largo de la maduración de los chorizos elaborados en la industria 1, antes y después de la SDGI, medidos mediante el método del ácido bicinónico (BCA).

	Toma de muestra	Principio ¹		Medio 1 ²		Medio 2 ³		Final ⁴	
		Media	DTE ⁵	Media	DTE	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	2765,11 ± 138,318 ^b		2825,78 ± 664,673 ^b		2830,22 ± 270,593 ^b		2825,44 ± 787,987 ^b	
	P198S34	2391,78 ± 100,480 ^{a,b}		2464,78 ± 359,255 ^b		2792,33 ± 680,826 ^b		2975,33 ± 280,587 ^b	
	P200S34	2577,33 ± 265,665 ^{a,b}		2369,22 ± 484,229 ^b		2366,44 ± 559,324 ^b		2652,89 ± 634,826 ^b	
Después de SDGI	Control	2068,67 ± 102,076 ^{a₃}		1257,83 ± 69,753 ^{a_{1,2}}		1232,00 ± 129,747 ^{a_{1,2}}		1371,58 ± 84,130 ^{a₂}	
	P198S34	2183,67 ± 325,325 ^{a₂}		1207,83 ± 68,532 ^{a₁}		1074,92 ± 99,152 ^{a₁}		1143,25 ± 28,777 ^{a₁}	
	P200S34	1923,11 ± 25,019 ^{a₃}		1273,67 ± 97,924 ^{a₂}		1042,83 ± 47,168 ^{a₁}		1171,58 ± 157,084 ^{a_{1,2}}	

^{a,b} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tomas de muestra

¹ 20 días de maduración

² 35 días de maduración

³ 45 días de maduración

⁴ 65 días de maduración

⁵ DTE: desviación típica

Tabla IX.2. - Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados menores de 5 KDa a lo largo de la maduración de los salchichones elaborados en la industria 1, antes y después de la SDGI, medidos mediante el método del ácido bicincontínico (BCA).

	Toma de muestra	Principio ¹		Medio 1 ²		Medio 2 ³		Final ⁴	
		Media	DTE ⁵	Media	DTE	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	746,78 ± 189,331	^b ₁	945,58 ± 183,655	^{b,c} _{1,2}	1101,42 ± 210,059	^b ₂	1176,83 ± 120,866	^b ₂
	P198S34	724,00 ± 186,461	^b ₁	993,08 ± 198,684	^{b,c} _{1,2}	1002,25 ± 117,606	^b _{1,2}	1133,08 ± 129,739	^b ₂
	P200S34	327,89 ± 147,876	^a ₁	563,92 ± 161,386	^a _{1,2}	520,58 ± 139,371	^a _{1,2}	921,42 ± 85,281	^a ₃
Después de SDGI	Control	1228,11 ± 123,188	^c _{1,2}	990,56 ± 42,487	^{b,c} ₁	1249,33 ± 136,681	^b _{1,2}	1391,67 ± 144,826	^c ₂
	P198S34	1351,00 ± 215,814	^c ₂	1142,78 ± 96,590	^c _{1,2}	1156,11 ± 202,390	^b _{1,2}	1163,56 ± 83,584	^b _{1,2}
	P200S34	1210,22 ± 110,829	^c ₂	842,06 ± 190,061	^b ₁	1068,89 ± 116,665	^b _{1,2}	1210,22 ± 115,867	^{b,c} ₂

^{a,b,c} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tomas de muestra

¹ 20 días de maduración

² 35 días de maduración

³ 45 días de maduración

⁴ 65 días de maduración

⁵ DTE: desviación típica

Tabla IX.3. - Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados menores de 5 KDa a lo largo de la maduración de los salchichones elaborados con los distintos cultivos iniciadores y la proteasa EPg222 en la industria 2, antes y después de la SDGI, medidos mediante el método del ácido bicinónico (BCA).

Toma de muestra		Principio ¹		Medio 1 ²		Medio 2 ³		Final ⁴	
		Media	DTE ⁵	Media	DTE	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	358,67 ± 32,286	^a ₁	592,33 ± 40,700	^a ₁	705,67 ± 39,375	^a ₂	797,44 ± 31,791	^a ₂
	EPg222	538,22 ± 38,662	^a ₁	561,44 ± 35,234	^a ₁	1050,11 ± 32,162	^a ₂	1127,78 ± 40,581	^b ₂
	P200S34	493,83 ± 25,296	^a _{1,2}	587,86 ± 21,731	^a ₁	1002,83 ± 43,103	^a ₃	782,17 ± 29,403	^a ₂
	P200S34 + EPg222	710,17 ± 21,524	^a ₁	766,00 ± 37,404	^b _{1,2}	984,00 ± 22,856	^a _{1,2}	1067,56 ± 22,798	^b ₂
Después de SDGI	Control	1049,44 ± 285,719	^b ₁	1396,89 ± 92,290	^{c,d} ₂	1377,44 ± 44,804	^b ₂	1017,22 ± 30,744	^b ₁
	EPg222	1079,44 ± 60,504	^b _{1,2}	1354,67 ± 53,114	^c ₃	1295,22 ± 77,679	^b _{2,3}	844,44 ± 95,024	^b ₁
	P200S34	1230,56 ± 69,926	^b _{2,3}	1428,00 ± 65,583	^{c,d} ₃	1401,89 ± 73,791	^b _{2,3}	948,89 ± 133,090	^b ₁
	P200S34 + EPg222	1194,44 ± 27,521	^b _{1,2}	1540,22 ± 69,046	^d ₃	1274,67 ± 108,546	^b ₂	1028,33 ± 126,903	^b ₁

^{a,b,c,d} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tomas de muestra

¹ 20 días de maduración

² 40 días de maduración

³ 65 días de maduración

⁴ 90 días de maduración

⁵ DTE: desviación típica

Tabla IX.4. – Actividad antihipertensora, expresada en porcentajes de inhibición de la enzima convertora de la angiotensina, obtenida con los distintos cultivos iniciadores a lo largo de la maduración de los chorizos elaborados en la industria 1, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal

Toma de muestra		Principio ¹		Medio 1 ²		Medio 2 ³		Final ⁴	
		Media	DTE ⁵	Media	DTE	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	24,52 ± 8,335	^a ₁	27,20 ± 7,484	^b ₁	44,31 ± 7,614	^c ₂	32,99 ± 5,436	^a ₁
	P198S34	33,54 ± 2,655	^{a,b} ₃	11,12 ± 7,513	^a ₁	19,12 ± 3,052	^{a,b} ₂	31,97 ± 5,862	^a ₃
	P200S34	28,52 ± 2,966	^a ₂	15,82 ± 5,023	^a ₁	12,18 ± 6,432	^a ₁	40,37 ± 4,478	^{a,b} ₃
Después de SDGI	Control	36,27 ± 3,166	^b ₁	45,73 ± 11,483	^c _{1,2}	40,39 ± 9,437	^c _{1,2}	49,76 ± 6,031	^b ₂
	P198S34	37,01 ± 4,389	^b _{1,2}	38,53 ± 4,225	^c _{1,2}	29,71 ± 11,128	^b ₁	41,71 ± 8,684	^{a,b} ₂
	P200S34	30,76 ± 6,020	^{a,b} _{1,2}	37,12 ± 4,321	^c ₂	26,92 ± 5,721	^b ₁	34,26 ± 13,539	^a _{1,2}

^{a,b,c} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tomas de muestra

¹ 15 días de maduración

² 35 días de maduración

³ 44 días de maduración

⁴ 62 días de maduración

⁵ DTE: desviación típica

Tabla IX.5. – Actividad antihipertensora, expresada en porcentajes de inhibición de la enzima convertora de la angiotensina, obtenida con los distintos cultivos iniciadores a lo largo de la maduración de los salchichones en la industria 1, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal

Toma de muestra		Principio ¹		Medio 1 ²		Medio 2 ³		Final ⁴	
		Media	DTE ⁵	Media	DTE	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	37,14	± 8,341 ₂	15,73	± 8,230 ^a ₁	36,59	± 7,397 ^a ₂	33,26	± 5,488 ^a ₂
	P198S34	33,62	± 12,092 ₁	41,67	± 3,056 ^{b,c} _{1,2}	50,75	± 8,259 ^{b,c} ₂	44,39	± 8,232 ^b _{1,2}
	P200S34	36,88	± 9,237 ₁	37,72	± 6,139 ^b ₁	44,11	± 14,000 ^{a,b} _{1,2}	55,37	± 4,937 ^c ₂
Después de SDGI	Control	43,82	± 17,611 ₂	56,22	± 8,727 ^c ₃	51,16	± 4,410 ^{b,c} _{2,3}	24,60	± 7,183 ^a ₁
	P198S34	46,48	± 13,693 _{1,2}	62,99	± 13,318 ^c ₂	58,37	± 4,791 ^c ₂	40,43	± 5,624 ^{a,b} ₁
	P200S34	47,40	± 11,387 ₁	44,01	± 20,968 ^{b,c} ₁	64,10	± 6,086 ^c ₂	41,30	± 11,110 ^{a,b} ₁

^{a,b,c,d} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tomas de muestra

¹ 21 días de maduración

² 35 días de maduración

³ 49 días de maduración

⁴ 63 días de maduración

⁵ DTE: desviación típica

Tabla IX.6. – Actividad antihipertensora, expresada en porcentajes de inhibición de la enzima convertora de la angiotensina, obtenida con los distintos cultivos iniciadores y la proteasa EPg222 a lo largo de la maduración de los salchichones elaborados en la industria 2, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Toma de muestra		Principio ¹		Medio 1 ²		Medio 2 ³		Final ⁴	
		Media	DTE ⁵	Media	DTE	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	32,40	± 3,182 ^b	29,99	± 3,506 ^{a,b}	32,52	± 3,179 ^a	23,96	± 1,759 ^{a,b}
	EPg222	38,14	± 1,905 ^b _{1,2}	68,61	± 2,769 ^c ₂	95,41	± 3,291 ^c ₃	57,47	± 3,472 ^c ₂
	P200S34	21,70	± 1,938 ^a ₁	58,57	± 3,521 ^c ₂	74,64	± 3,378 ^b ₃	34,92	± 3,285 ^{a,b,c} ₁
	P200S34 + EPg222	61,79	± 3,174 ^d ₂	80,27	± 3,140 ^d ₃	95,35	± 6,132 ^c ₃	41,41	± 2,393 ^{b,c} ₁
Después de SDGI	Control	41,26	± 1,166 ^{b,c} ₂	24,43	± 1,404 ^{a,b} ₁	31,06	± 2,855 ^a _{1,2}	19,04	± 1,765 ^a ₁
	EPg222	47,08	± 2,234 ^c _{1,2}	37,78	± 0,790 ^{a,b,c} ₁	89,83	± 3,763 ^{b,c} ₃	44,86	± 3,532 ^{b,c} _{1,2}
	P200S34	41,08	± 0,639 ^{b,c} ₂	28,60	± 2,324 ^{a,b} ₁	48,39	± 3,126 ^a ₂	32,24	± 2,627 ^{a,b,c} _{1,2}
	P200S34 + EPg222	53,90	± 1,444 ^{c,d} ₂	42,91	± 1,690 ^{b,c} _{1,2}	93,44	± 3,445 ^c ₃	50,72	± 2,666 ^c _{1,2}

^{a,b,c,d} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tomas de muestra

¹ 21 días de maduración

² 35 días de maduración

³ 49 días de maduración

⁴ 63 días de maduración

⁵ DTE: desviación típica

Tabla IX.7. – Actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol Trolox/mg proteína}$, obtenida con los distintos cultivos iniciadores a lo largo de la maduración de los chorizos elaborados en la industria 1, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Toma de muestra		Principio ¹		Medio 1 ²		Medio 2 ³		Final ⁴	
		Media	DTE ⁵	Media	DTE	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	0,98 ± 0,378	_{1,2}	0,77 ± 0,238	^a ₁	1,07 ± 0,185	^b _{1,2}	0,66 ± 0,135	^a ₁
	P198S34	0,62 ± 0,229		0,48 ± 0,223	^a	0,61 ± 0,165	^a	0,53 ± 0,193	^a
	P200S34	0,80 ± 0,306	_{1,2}	0,67 ± 0,122	^a ₁	0,61 ± 0,107	^a ₁	0,71 ± 0,134	^a ₁
Después de SDGI	Control	0,98 ± 0,238	_{1,2}	1,24 ± 0,229	^b ₂	1,37 ± 0,322	^b ₂	1,34 ± 0,303	^b ₂
	P198S34	1,04 ± 0,263		1,07 ± 0,280	^{a,b}	1,19 ± 0,349	^b	1,22 ± 0,298	^b
	P200S34	1,20 ± 0,461	₂	1,26 ± 0,294	^b ₂	0,96 ± 0,282	^{a,b} _{1,2}	1,03 ± 0,196	^{a,b} _{1,2}

^{a,b,c} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tomas de muestra

¹ 15 días de maduración

² 35 días de maduración

³ 44 días de maduración

⁴ 62 días de maduración

⁵ DTE: desviación típica

Tabla IX.8. – Actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol Trolox/mg proteína}$, obtenida con los distintos cultivos iniciadores a lo largo de la maduración de los salchichones elaborados en la industria 1, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Toma de muestra		Principio ¹		Medio 1 ²		Medio 2 ³		Final ⁴	
		Media	DTE ⁵	Media	DTE	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	0,63	$\pm 0,061^a$ ₁	1,08	$\pm 0,224$ _{1,2}	1,40	$\pm 0,170$ ₂	1,03	$\pm 0,182^a$ _{1,2}
	P198S34	1,08	$\pm 0,293^{a,b}$ ₁	1,23	$\pm 0,141$	1,28	$\pm 0,151$	1,19	$\pm 0,162^a$
	P200S34	1,12	$\pm 0,197^b$ _{1,2}	1,47	$\pm 0,452$ _{1,2}	1,16	$\pm 0,534$ _{1,2}	1,84	$\pm 0,349^b$ ₂
Después de SDGI	Control	1,01	$\pm 0,427^{a,b}$ ₁	1,57	$\pm 0,356$ _{1,2}	1,71	$\pm 0,519$ ₂	1,33	$\pm 0,346^a$ _{1,2}
	P198S34	1,07	$\pm 0,309^{a,b}$ ₁	1,37	$\pm 0,348$ _{1,2}	1,70	$\pm 0,385$ ₂	1,03	$\pm 0,278^a$ ₁
	P200S34	1,08	$\pm 0,214^{a,b}$ ₁	1,66	$\pm 0,530$ _{1,2}	1,55	$\pm 0,530$ ₂	1,45	$\pm 0,277^{a,b}$ _{1,2}

^{a,b,c,d} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tomas de muestra

¹ 21 días de maduración

² 35 días de maduración

³ 49 días de maduración

⁴ 63 días de maduración

⁵ DTE: desviación típica

Tabla IX.9. – Actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol Trolox/mg proteína}$, obtenida con los distintos cultivos iniciadores y la proteasa EPg222 a lo largo de la maduración de los salchichones elaborados en la industria 2, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

Toma de muestra		Principio ¹		Medio 1 ²		Medio 2 ³		Final ⁴	
		Media	DTE ⁵	Media	DTE	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	0,68	$\pm 0,146^a_1$	0,70	$\pm 0,096^a_1$	1,14	$\pm 0,169^a_{1,2}$	1,21	$\pm 0,027^a_{1,2}$
	EPg222	1,37	$\pm 0,081^b_1$	1,74	$\pm 0,164^{b,c}_{1,2}$	2,49	$\pm 0,217^c_2$	2,57	$\pm 0,210^c_2$
	P200S34	0,94	$\pm 0,063^{a,b}_1$	1,60	$\pm 0,163^{b,c}_{1,2}$	1,50	$\pm 0,097^{a,b}_{1,2}$	1,21	$\pm 0,151^a_{1,2}$
	P200S34+EPg222	1,43	$\pm 0,081^b_1$	1,76	$\pm 0,218^{b,c}_{1,2}$	1,69	$\pm 0,046^b_{1,2}$	1,65	$\pm 0,094^{a,b}_{1,2}$
Después de SDGI	Control	1,38	$\pm 0,209^b_1$	1,41	$\pm 0,146^b_1$	1,90	$\pm 0,146^{b,c}_{1,2}$	1,22	$\pm 0,137^a_1$
	EPg222	1,20	$\pm 0,178^b_1$	1,94	$\pm 0,107^c_{1,2}$	2,57	$\pm 0,218^c_2$	2,17	$\pm 0,162^{b,c}_2$
	P200S34	1,37	$\pm 0,125^b_1$	1,49	$\pm 0,085^{b,c}_1$	2,14	$\pm 0,093^{b,c}_2$	1,69	$\pm 0,335^{a,b}_{1,2}$
	P200S34+EPg222	1,39	$\pm 0,067^b_1$	1,60	$\pm 0,119^{b,c}_{1,2}$	2,29	$\pm 0,180^{b,c}_2$	2,75	$\pm 0,247^c_2$

^{a,b,c} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes (0,05) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tomas de muestra

¹ 19 días de maduración

² 40 días de maduración

³ 63 días de maduración

⁴ 90 días de maduración

⁵ DTE: desviación típica

Tabla IX.10. - Inhibición del crecimiento de células tumorales (Caco-2) expresada en porcentaje, obtenida con los distintos cultivos iniciadores al final de la maduración de los chorizos elaborados en la industria 1, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

	Tiempo de incubación	24 horas		48 horas		72 horas	
		Media	DTE ¹	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	n.d. ₁		n.d. ^a ₁		3,9 ± 0,48 ^a ₂	
	P198S34	n.d. ₁		n.d. ^a		0,6 ± 1,62 ^a	
	P200S34	n.d. ₁		n.d. ^a ₁		2,4 ± 1,39 ^a ₂	
Después de SDGI	Control	n.d. ₁		10,8 ± 0,24 ^b ₂		37,9 ± 2,27 ^d ₃	
	P198S34	n.d. ₁		n.d. ^a ₁		20,3 ± 1,52 ^b ₂	
	P200S34	n.d. ₁		n.d. ^a ₁		25,0 ± 4,68 ^c ₂	

n.d.: No detectado

^{a,b,c,d,e,f} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tiempos de incubación

¹ DTE: desviación típica

Tabla IX.11. - Inhibición del crecimiento de células tumorales (Caco-2) expresada en porcentaje, obtenida con los distintos cultivos iniciadores al final de la maduración de los salchichones elaborados en la industria 1, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

	Tiempo de incubación	24 horas		48 horas		72 horas	
		Media	DTE ¹	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	21,2 ± 2,16 ^a ₁		28,0 ± 4,07 ^b ₁		41,1 ± 1,14 ^b ₂	
	P198S34	38,5 ± 1,81 ^c ₁		40,9 ± 0,77 ^c ₁		55,1 ± 0,91 ^c ₂	
	P200S34	39,9 ± 2,56 ^c ₁		50,0 ± 1,35 ^d ₂		56,1 ± 1,41 ^c ₂	
Después de SDGI	Control	29,8 ± 2,16 ^b ₂		9,6 ± 4,72 ^a ₁		14,9 ± 2,59 ^a ₁	
	P198S34	26,0 ± 1,57 ^{a,b} ₁		34,7 ± 0,97 ^{b,c} ₂		45,1 ± 0,92 ^b ₃	
	P200S34	32,9 ± 0,42 ^{b,c} ₁		47,2 ± 1,57 ^{c,d} ₂		61,2 ± 3,01 ^c ₃	

^{a,b,c,d,e,f} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tiempos de incubación

¹ DTE: desviación típica

Tabla IX.12. - Inhibición del crecimiento de células tumorales (Caco-2) expresada en porcentaje, obtenida con los distintos cultivos iniciadores y la proteasa EPg222 a lo largo de la maduración de los salchichones elaborados en la industria 2, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

	Tiempo de incubación	24 horas		48 horas		72 horas	
		Media	DTE ¹	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	6,1 ± 2,55 ^a ₁		20,7 ± 0,64 ^{a,b} ₃		13,9 ± 1,26 ^a ₂	
	P200S34	29,8 ± 2,93 ^c ₁		32,2 ± 2,24 ^c ₁		42,3 ± 2,96 ^c ₂	
	EPg222	32,0 ± 2,20 ^c ₁		34,9 ± 3,81 ^c ₁		41,5 ± 3,96 ^c ₂	
	P200S34 + EPg222	31,8 ± 0,83 ^c ₁		34,0 ± 1,17 ^c ₁		43,5 ± 0,39 ^c ₂	
Después de SDGI	Control	4,2 ± 1,66 ^a ₁		13,5 ± 0,42 ^a ₂		9,0 ± 0,82 ^a ₂	
	P200S34	28,2 ± 2,64 ^{b,c} ₁		33,9 ± 4,84 ^c ₁		45,2 ± 3,27 ^c ₂	
	EPg222	23,3 ± 0,93 ^b ₁		23,1 ± 0,51 ^b ₁		45,0 ± 2,53 ^c ₂	
	P200S34 + EPg222	8,9 ± 1,20 ^a ₁		15,8 ± 1,49 ^a ₂		33,1 ± 0,72 ^b ₃	

^{a,b,c,d,e,f} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tiempos de incubación

¹ DTE: desviación típica

Tabla IX.13. - Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos de los embutidos elaborados contra *Escherichia coli* CECT 4267, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

	Muestra	Chorizo.Ind 1		Salchichón.Ind 1		Salchichón.Ind 2	
		Media	DTE ¹	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	8,44 ± 2,24 ^c		7,59 ± 0,38 ^a		7,9 ± 1,56	
	P198S34	5,76 ± 0,21 ^{b,c}		8,06 ± 1,10 ^a			
	P200S34	2,00 ± 1,06 ^a		7,72 ± 0,44 ^a		7,5 ± 3,08	
	EPg222					9,3 ± 2,96	
	P200S34+EPg222					11,0 ± 2,57	
Después de SDGI	Control	8,68 ± 0,25 ^c		12,32 ± 1,47 ^b		12,4 ± 0,51	
	P198S34	5,92 ± 1,55 ^{b,c}		10,36 ± 0,58 ^b			
	P200S34	3,59 ± 0,29 ^{a,b}		14,98 ± 0,07 ^c		12,4 ± 1,05	
	EPg222					10,8 ± 0,24	
	P200S34+EPg222					12,6 ± 0,47	

^{a,b} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre embutidos

¹ DTE: desviación típica

Tabla IX.14. - Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos de los embutidos elaborados contra *Salmonella choleraesuis* CECT4395, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

	Muestra	Chorizo.Ind 1		Salchichón.Ind 1		Salchichón.Ind 2	
		Media	DTE ¹	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	5,38 ± 0,32 ^{a,b}		4,51 ± 0,50 ^a		5,9 ± 2,07 ^a	
	P198S34	8,10 ± 1,87 ^b		8,18 ± 0,54 ^b			
	P200S34	4,41 ± 0,90 ^a		9,19 ± 0,86 ^b		6,2 ± 0,53 ^a	
	EPg222					8,7 ± 2,20 ^{a,b}	
	P200S34+EPg222					7,5 ± 0,18 ^{a,b}	
Después de SDGI	Control	4,68 ± 0,97 ^a		9,13 ± 0,12 ^b		12,0 ± 1,36 ^b	
	P198S34	3,78 ± 0,15 ^a		12,49 ± 0,32 ^c			
	P200S34	3,39 ± 0,94 ^a		13,54 ± 1,74 ^c		8,8 ± 0,70 ^{a,b}	
	EPg222					8,4 ± 0,06 ^{a,b}	
	P200S34+EPg222					12,1 ± 0,17 ^b	

^{a,b} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre embutidos

¹ DTE: desviación típica

Tabla IX.15. - Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos de los embutidos elaborados contra *Staphylococcus aureus* CECT976, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

	Muestra	Chorizo.Ind 1		Salchichón.Ind 1		Salchichón.Ind 2	
		Media	DTE ¹	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	12,12 ± 1,77 ^c		10,32 ± 0,13 ^a		14,9 ± 0,74	
	P198S34	10,9 ± 0,71 ^{b,c}		12,87 ± 0,85 ^b			
	P200S34	4,94 ± 1,10 ^a		14,37 ± 0,31 ^{b,c}		10,5 ± 0,17	
	EPg222					12,5 ± 1,34	
	P200S34+EPg222					15,1 ± 0,94	
Después de SDGI	Control	11,83 ± 0,09 ^c		12,39 ± 0,65 ^b		15,7 ± 1,07	
	P198S34	6,92 ± 2,08 ^a		15,70 ± 0,67 ^c			
	P200S34	7,26 ± 1,66 ^{a,b}		16,73 ± 0,73 ^c		13,8 ± 0,45	
	EPg222					16,0 ± 1,42	
	P200S34+EPg222					14,8 ± 1,42	

^{a,b} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre embutidos

¹ DTE: desviación típica

Tabla IX.16. - Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos de los embutidos elaborados contra *Listeria monocytogenes* CECT911, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

	Muestra	Chorizo.Ind 1		Salchichón.Ind 1		Salchichón. Ind 2	
		Medi a	DTE ¹	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	n.d.		n.d.		7,4 ± 2,81	
	P198S34	6,53 ± 0,58	^{b,c}	n.d.			
	P200S34	4,33 ± 0,68	^{a,b}	n.d.		6,5 ± 1,12	
	EPg222					7,3 ± 2,39	
	P200S34+EPg222					3,8 ± 0,73	
Después de SDGI	Control	3,50 ± 0,14	^a	3,36 ± 1,21	^a	0,9 ± 1,27	
	P198S34	8,55 ± 2,21	^c	n.d.			
	P200S34	2,51 ± 1,20	^a	6,47 ± 0,74	^b	1,8 ± 2,53	
	EPg222					1,7 ± 1,13	
	P200S34+EPg222					n.d.	

^{a,b} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre embutidos

¹ DTE: desviación típica

Tabla IX.17. - Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos de los embutidos elaborados contra *Bacillus cereus* CECT131, antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal.

	Muestra	Chorizo.Ind 1		Salchichón.Ind 1		Salchichón. Ind 2	
		Media	DTE ¹	Media	DTE	Media	DTE
Antes de SDGI	Control	20,78 ± 1,45 ^a		25,45 ± 1,11 ^b		16,3 ± 2,32 ^a	
	P198S34	21,46 ± 1,06 ^a		23,85 ± 2,00 ^b			
	P200S34	23,02 ± 0,93 ^a		22,74 ± 1,64 ^b		25,0 ± 1,95 ^b	
	EPg222					23,2 ± 1,67 ^b	
	P200S34+EPg222					24,3 ± 1,82 ^b	
Después de SDGI	Control	26,32 ± 2,21 ^b		21,63 ± 4,43 ^{a,b}		19,3 ± 1,41 ^a	
	P198S34	27,90 ± 1,76 ^b		20,54 ± 2,65 ^{a,b}			
	P200S34	28,98 ± 3,28 ^b		17,7 ± 4,17 ^a		19,0 ± 1,99 ^a	
	EPg222					21,1 ± 2,33 ^{a,b}	
	P200S34+EPg222					22,8 ± 1,27 ^b	

^{a,b} Valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre los lotes

^{1,2,3} Valores con subíndices distintos son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre embutidos

¹ DTE: desviación típica

