

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

RESPUESTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS EN MOHOS Y LEVADURAS
NO CONVENCIONALES

ABIOTIC STRESS RESPONSES IN MOULD AND NON-
CONVENTIONAL YEASTS

Directora: Carmen M^a Michán Doña

Co-director: José Ramos Ruiz

Laura Ramos Moreno

TITULO: *RESPUESTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS EN MOHOS Y
LEVADURAS NO CONVENCIONALES*

AUTOR: *Laura Ramos Moreno*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



TÍTULO DE LA TESIS: RESPUESTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS EN MOHOS Y LEVADURAS NO CONVENCIONALES

DOCTORANDO/A: Laura Ramos Moreno

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Este trabajo posee todos los requerimientos para ser presentado. La memoria, bien estructurada, contiene resultados de interés, originales y novedosos en su campo. Además de haberse presentado en diversos Congresos y reuniones científicas, estos resultados han dado lugar a cuatro publicaciones más otra en fase de revisión, en revistas internacionales indexadas y de reconocido prestigio

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, __23__ de diciembre __ de __2019__

Firma del/de los director/es

**MICHAN DOÑA
CARMEN MARIA
- 31838358X**
Firmado digitalmente por
MICHAN DOÑA CARMEN
MARIA - 31838358X
Fecha: 2019.12.27
10:01:55 +01'00'

Fdo.: _Carmen Michán Doña_____ Fdo.: José Ramos Ruiz_

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Carmen M. Michán Doña y al Dr. José Ramos Ruiz el haberme permitido realizar esta Tesis Doctoral. Y no sólo esto, sino dar gracias por ese apoyo y ánimo durante estos 4 años, cuando parece que la desgana va a vencer...sin sus gestos no estaría entregando esta tesis hoy.

Agradezco en segundo lugar a los profesores Stefan Hohmann (Universidad de Goteborg); Joaquín Ariño (Universidad Autónoma de Barcelona); George Diallinas (Universidad de Atenas); José L. Martínez (Universidad Técnica de Dinamarca) y Amparo Querol (Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos) el haberme dado la oportunidad de realizar estancias en sus laboratorios tanto antes como durante el periodo de mi tesis. Cada laboratorio es un mundo, una familia. El estar en diferentes laboratorios hace que el aprendizaje sea más productivo, abre puertas y permite incorporar nuevos conocimientos que de otra manera no habría conseguido.

También he de agradecer al Plan Propio de la UCO por la financiación económica durante este periodo de investigación. A la empresa Navalpedroche por poner a nuestra disposición sus mejores productos y su colaboración para realizar los experimentos. Al SCAI por permitirnos realizar distintos análisis gracias a su servicio y así terminar de completar nuestra investigación.

A mis padres, en especial, sin ellos...sobran las palabras.

A todo mi laboratorio, a las maravillosas Tere y Esther, a todos mis compañeros que han pasado por él y han hecho de un modo u otro más fácil esta etapa, ya sea con una sonrisa, un mensaje de ánimo, compañía en horas muertas, ayuda en un determinado momento... o por todo a la vez (Francis ;) afortunada yo).

A Esteban (por todo y cada detalle), por repetir una y otra vez “ya mismo” y el apoyo que esas palabras llevan en sí.

A mi padre, una y mil veces.

Índice

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	6
1 LA LEVADURA <i>Debaryomyces hansenii</i>	7
2 ESTRÉS SALINO	10
2.1 Estrés salino en levaduras.....	12
3 ESTRÉS OXIDATIVO	14
3.1 Estrés oxidativo en levaduras.....	16
4 SALINIDAD Y METABOLISMO EN <i>D. hansenii</i>	17
5 LEVADURAS Y MADURACIÓN DE EMBUTIDOS	18
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
1 MATERIAL BIOLÓGICO. MICROORGANISMOS	25
2 MEDIOS DE CULTIVO. CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	25
3 ENSAYOS DE TOXICIDAD Y ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS	27
4 ENSAYOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	28
4.1 Extracción de ARN.....	28
4.2 Retrotranscripción.....	29
4.3 Extracción de ADN genómico.....	29
4.4 Extracción de ADN mitocondrial.....	30
4.5 Preparación de extractos proteicos y cuantificación de proteínas.....	31
4.6 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	31
4.7 Determinación de la expresión génica mediante RTq-PCR.....	31
4.8 Identificación filogenética de cepas de levaduras mediante PCR convencional.....	34
4.9 Análisis de restricción mediante ADNmt.....	35
5 ENSAYOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS	35
5.1 Ensayos de actividades enzimáticas antioxidantes y determinación de glutatión total	35
5.2 Niveles de ROS.....	36
5.3 Daño oxidativo a los lípidos.....	36
5.4 Determinación del estado redox de las proteínas.....	37
5.5 Otras actividades enzimáticas.....	37
5.6 Análisis del contenido en sodio.....	38
5.7 Tinción de vacuolas.....	38
5.8 Cultivos en biorreactores.....	39

5.9 Análisis de metabolitos.....	40
5.10 Procesos analíticos.....	40
5.11 Medición de gas producido y oxígeno disuelto.	40
6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFORMÁTICA.	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
CAPITULO I	43
Interconexiones en las vías de respuesta a estrés salino y oxidativo en <i>D. hansenii</i>	43
1 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE ESTRÉS SALINO U OXIDATIVO.	44
2 EFECTO DE LOS NIVELES SALINOS Y OXIDATIVPS SOBRE LAS DEFENSAS ANTIOXIDATIVAS ENZIMÁTICAS Y NO-ENZIMÁTICAS.	50
3 NIVELES INTRACELULARES DE ROS Y Na⁺ TRAS LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS SALINO Y/O ESTRÉS OXIDATIVO.	52
4 DAÑO CAUSADO POR ESTRÉS OXIDATIVO Y SALINO A LÍPIDOS Y PROTEÍNAS.	54
5 ESTRÉS SALINO Y FRAGMENTACIÓN VACUOLAR.	56
DISCUSIÓN 1: INTERCONEXIONES EN LAS VÍAS DE RESPUESTA A ESTRÉS SALINO Y OXIDATIVO en <i>D. hansenii</i>.	59
CAPITULO II	64
Análisis del carácter halotolerante/halófilo de <i>D. hansenii</i>	64
1 ESTUDIOS EN MATRACES.	65
2 ESTUDIOS DE CRECIMIENTO EN BIORREACTORES, CULTIVO DISCONTINUO EN PRESENCIA DE SAL.	67
3 MEDIDAS DE BIOMASA FINAL EN CULTIVOS CON NaCl y KCl.	69
4 DETERMINACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO Y COCIENTE RESPIRATORIO.	71
5 ENSAYOS EN BIORREACTORES EN CONDICIONES NO CONTROLADAS DE pH.	74
DISCUSIÓN 2: ANÁLISIS DEL CARÁCTER HALOTOLERANTE/HALÓFILO DE <i>D. hansenii</i>.	77
CAPITULO III	79
Función de <i>D. hansenii</i> en la maduración de lomos ibéricos de la zona del Valle de los Pedroches.....	79
1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE LAS LEVADURAS.	80
2 IMPLANTACIÓN DE LA LEVADURA INOCULADA EN EL LOMO.	83
3 EFECTO DE LA LEVADURA SOBRE DIVERSAS CARACTERÍSTICAS DEL LOMO IBÉRICO. ...	85
3.1 Determinación de pH, actividad de agua y contenido en sodio.....	86
3.2 Perfil lipídico.....	88
3.3 Producción de compuestos aromáticos y volátiles.....	89
3.4 Análisis sensorial.....	91

4 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS.	93
DISCUSIÓN 3: FUNCIÓN DE <i>D. hansenii</i> EN LA MADURACIÓN DE LOMOS IBÉRICOS DE LA ZONA DEL VALLE DE LOS PEDROCHES (CÓRDOBA).	95
DISCUSIÓN GENERAL	97
CONCLUSIONES.....	103
BIBLIOGRAFÍA	106

Relación de figuras

Figura 1. <i>Debaryomyces hansenii</i>.....	8
Figura 2: Cladograma de levaduras.....	9
Figura 3: Representación ilustrativa del número y tamaño de los cromosomas de <i>D. hansenii</i>.	10
Figura 4. Mapa de la provincia de Córdoba. Los Pedroches.	21
Figura 5. Inoculación de lomos ibéricos con LR1.	28
Figura 6. Eficiencia de amplificación de los cebadores del gen <i>TRX2</i> de <i>D. hansenii</i>...34	34
Figura 7. Efecto de diferentes inductores de estrés sobre la viabilidad de <i>D. hansenii</i>.....	45
Figura 8. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre los niveles de ARNm de <i>CTA1</i> y <i>HOG1</i>.	46
Figura 9. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre los niveles de ARNm de <i>CTA1</i> y <i>HOG1</i> a lo largo del tiempo.	47
Figura 10. Efecto a lo largo del tiempo del estrés oxidativo y salino sobre los niveles de ARNm de <i>GSH1 MSN2</i> y <i>TRX2</i>.	48
Figura 11. Efecto a lo largo del tiempo del estrés oxidativo y salino sobre los niveles de ARNm de <i>ENA1</i> y <i>RCN1</i>.	49
Figura 12. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre la actividad catalasa a lo largo del tiempo.	51
Figura 13. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre la actividad glutathion reductasa.....	51
Figura 14. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre el contenido en glutathion total.....	52
Figura 15. Contenido en ROS.....	53
Figura 16. Contenido en Na⁺.....	54

Figura 17. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre el nivel de malondialdehído.....	55
Figura 18. Evaluación del estado redox de las cisteínas.....	56
Figura 19. Efecto de la concentración de NaCl en el número de vacuolas por células.....	58
Figura 20. Curvas de crecimiento de las levaduras.....	66
Figura 21. Ratio de crecimiento máximo específico y evolución del dióxido de carbono (CER) de cultivos discontinuos.....	68
Figura 22. Crecimiento en condiciones limitantes de glucosa.....	70
Figura 23. Perfil de oxígeno disuelto (DO) de cultivos discontinuos.....	72
Figura 24. Perfiles del cociente respiratorio (RQ) de los cultivos en biorreactores.....	73
Figura 25. Perfiles del ratio de evolución del CO₂ (CER) con y sin regulación de pH de los cultivos en biorreactores en presencia de diferentes concentraciones de sal.....	75
Figura 26. Amplificaciones de familia de genes específica de las cepas de <i>D. hansenii</i> aisladas de embutidos.....	81
Figura 27. Actividades enzimáticas de las cepas aisladas de embutidos ibéricos del Valle de los Pedroches.....	82
Figura 28. Actividades enzimáticas de las cepas aisladas de lomos ibéricos del Valle de los Pedroches.	83
Figura 29. Ejemplo del aspecto del lomo control (izquierda) y del inoculado M2 (derecha) al final del proceso de maduración.	84
Figura 30. Ejemplo de la evolución del aspecto del lomo inoculado.	84
Figura 31. Digestión de ADN mitocondrial de la cepa control de <i>D. hansenii</i> y de la cepa LR1.	85
Figura 32. Efecto de la levadura LR1 en las muestras de lomo ibérico sobre actividad de agua; pH y contenido en sodio.	87

Figura 33. Familias de compuestos volátiles en lomos inoculados específicamente con la cepa de *D. hansenii* LR1 al final del proceso de maduración.91

Figura 34. Análisis de componentes principales (PCA) de los cinco tratamientos usados en este estudio.94

Relación de tablas

Tabla 1: Características clave de algunos genomas de hongos secuenciados.....10

Tabla 2. Microorganismos utilizados en esta tesis.26

Tabla 3. Cebadores utilizados en el análisis mediante PCR a tiempo real.33

Tabla 4. Coeficientes de rendimiento y consumo específico de glucosa de los cultivos discontinuos.....69

Tabla 5. Crecimiento de *D. hansenii* en condiciones limitantes de glucosa.....71

Tabla 6. Ratio de crecimiento máximo específico ($\mu_{\text{máx}}$) de los cultivos en biorreactores sin regulación de pH.76

Tabla 7. Cambios en el pH, A_w , y contenido en sodio al final del periodo de maduración en lomos inoculados con LR1.87

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos totales (%) en lomos inoculados específicamente con la cepa de *D. hansenii* LR1 al final del proceso de maduración.88

Tabla 9. Compuestos volátiles más abundantes en lomos inoculados específicamente con la cepa de *D. hansenii* LR1 al final del proceso de maduración.90

Tabla 10. Aceptación sensorial de los lomos inoculados específicamente con la cepa de *D. hansenii* LR1 al final del proceso de maduración.92

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNg: ADN genómico

ADNmt: ADN mitocondrial

Agua DEPC: agua tratada con dietil-pirocarbonato

Agua mQ: agua mili-Q

ARN: Ácido ribonucleico

BSA: Seroalbúmina bovina

CAT: Catalasa

CT: Ciclo umbral (treshold cicle)

DCFA: Diacetato 2',7'-diclorofluoreceina

DNTB: Ácido 5-5-dithio-bis-2-nitrobenzoico

dNTPs: Desoxinucleótidos-trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutación disulfuro

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography)

Mb: Megabase

mBbm: monobromobimano

MDA: Malondialdehido

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

ORF: Marco de lectura abierto (Open reading frame)

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

qRT-PCR: PCR a tiempo real

ROS: Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)

SDS: Dodecil sulfato sódico

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBE: Tampón de electroforesis

T_m: Temperatura de fusión (melting)

TMP: 1,1,3,3-tetrametoxipropano

V_{vm}: Volumen máximo del vaso

RESUMEN

RESUMEN

Debaryomyces hansenii es una levadura ascomicética, de un gran potencial biotecnológico, que se encuentra habitualmente en ambientes salinos como pueden ser el agua de mar o algunos embutidos. Sin embargo, su caracterización molecular se ha visto ralentizada por algunas peculiaridades como el hecho de que la mayoría de las cepas son aneuploides, de ser una levadura difícil de transformar, ó mostrar un bajo porcentaje de recombinación homóloga. En este trabajo de tesis doctoral se han abordado diversos aspectos de la fisiología de *D. hansenii* tanto a nivel molecular cómo a nivel más aplicado.

Primero estudiamos las posibles relaciones entre las respuestas a estrés salino y oxidativo tanto a nivel molecular como enzimático o metabólico. Nuestros resultados muestran como la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo se indujo por exposición a estrés salino (NaCl y KCl), y viceversa, que la transcripción de algunos genes relacionados con el estrés osmótico/salino fue inducida por exposición a H₂O₂. Estos efectos también se han demostrado a nivel enzimático donde el estrés salino indujo la actividad de las enzimas catalasa y glutatión reductasa, típicamente consideradas defensas antioxidantes. Además, a nivel metabólico, ambos estreses indujeron la producción de ROS, y la exposición a peróxido de hidrogeno influyó en la acumulación intracelular de sodio.

Por otra parte, hemos abordado el tema del posible carácter halotolerante o halófilo de *D. hansenii* desde una aproximación novedosa, puesto que por primera vez se han utilizado biorreactores para este estudio que nos han permitido crecer las células bajo condiciones controladas. Nuestros resultados han demostrado que la presencia de altas concentraciones de NaCl o KCl fue beneficiosa para la velocidad de crecimiento de la levadura en comparación con los experimentos control (sin sales), tanto utilizando para su estimación la cosecha de biomasa como la producción de CO₂. De hecho, en condiciones de limitación de nutrientes como la glucosa, la presencia de NaCl produjo una mayor cantidad de biomasa que el KCl. En su conjunto estos resultados apoyan el carácter halófilo y no sólo halotolerante de esta levadura. En todos estos experimentos no se produjo etanol en ninguna de las condiciones de trabajo, lo que indica un metabolismo completamente respiratorio.

Finalmente, en la última parte de este trabajo se ha utilizado una cepa de *D. hansenii* aislada de embutidos de la zona del Valle de los Pedroches y se ha inoculado sobre la superficie de lomo ibérico con el fin de estudiar su posible efecto sobre las características fisicoquímicas del embutido. En todas las condiciones estudiadas la levadura fue capaz de implantarse en la superficie de las muestras de lomo y afectar a sus características de manera que estas muestras mantenían una mayor actividad de agua, un pH más alto, y un menor contenido en sodio al final de los tres meses de maduración del producto. Aunque la levadura no cambió el perfil general de ácidos grasos sí que afectó a los niveles de compuestos volátiles y aromáticos. Hay que señalar que las catas realizadas indican una tendencia a una mayor aceptación de los lomos inoculados específicamente con levadura por parte de los consumidores.

SUMMARY

Debaryomyces hansenii is an ascomycetic yeast with a high biotechnological potential that can be usually found in salty environments such as seawater or several sausages. However, its molecular characterization has been slowed down due to some peculiarities: most strains are aneuploid, horizontal gene transfer is difficult, and homologous recombination is low. In this thesis, we have studied several molecular and physiological aspects of *D. hansenii* using both basic and applied approaches.

We have studied possible interconnections between the responses to salt and oxidative stress at molecular, enzymatic and metabolic levels. Our results show that expression of genes related to oxidative stress was induced by NaCl and KCl. On the other hand transcription of genes related to osmotic/salt stress was induced by H₂O₂. These effects have been also demonstrated at the enzymatic level since salt stress induced the activity of antioxidants defenses such as catalase and glutathione reductase. Moreover, at metabolic level both stresses induced an increase in intracellular ROS, and H₂O₂ exposure influenced intracellular sodium accumulation.

Also, we have addressed the controversy over whether *D. hansenii* is halotolerant or halophilic from a new approach since, as far as we know, controlled growth in bioreactors has been used to study the physiology of this yeast. Our results have shown that the presence of NaCl or KCl improved the growth rate of the yeast since it increased total biomass or CO₂ production. In fact, under limiting glucose content, the presence of NaCl produced a higher amount of biomass than the presence of KCl. All together, these results support the halophilic behavior of this yeast. We did not detect significant amounts of ethanol under any of the different conditions used in this work, suggesting a fully respiratory metabolism in *D. hansenii*.

Finally we have used a *D. hansenii* wild terroir (Valle de los Pedroches) strain to inoculate the surface of Iberian pork loins in order to study its effect on the physicochemical characteristics in the product. Under all the conditions tested, this yeast was able to grow on the surface of the pork loin modifying its characteristics. All inoculated samples showed higher water activity and pH, and less sodium content after the three months ripening period. The yeast did not change the fatty acid profile but it affected the level

of volatile and aromatics compounds. Finally, the acceptability tests indicated a tendency to a better consumer acceptance of the pork loin specifically inoculated with the yeast.

INTRODUCCIÓN

1 LA LEVADURA *Debaryomyces hansenii*.

La mayoría de los estudios sobre levaduras se han realizado en la especie *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies afines. Sin embargo, existen más de 1500 especies de levaduras, que en su mayoría son escasamente conocidas, y por ello se denominan no convencionales, aunque este concepto está actualmente en revisión (Prista C. *et al.*, 2016). *D. hansenii* (Fig. 1) es una levadura no convencional osmo-, halo- y xerotolerante (Breuer U. y Harms H., 2006) presente en multitud de ambientes salinos y/o con baja actividad hídrica, como el agua de mar, salinas y diversos alimentos curados (Fleet G., 1990; Casas E. *et al.*, 2004). Además, es capaz de sobrevivir en ambientes contaminados con metales (Breuer U. y Harms H., 2006) y asimilar hidrocarburos como el naftaleno o el benzopireno (Cerniglia *et al.*, 1981). Desde el punto de vista industrial, cuenta con un gran interés biotecnológico. Entre sus características interesantes destacan su actividad lipolítica y proteolítica así como su capacidad para tolerar cambios en las condiciones de salinidad e inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes (Fatichenti F. *et al.*, 1983; Bintsis T. *et al.*, 2003). Otro ejemplo de este potencial biotecnológico, es su habilidad para la producción de exopeptidasas importantes durante la maduración de los embutidos, de las β -glucosidasas termófila esenciales para la producción de alcohol combustible o de xilitol, interesante en la industria alimentaria (Breuer U. y Harms H., 2006). Además puede metabolizar ácido láctico y ácido cítrico, y su capacidad de crecer a bajas temperaturas hace que sea una de las especies más representadas en alimentos (Lucci L. *et al.*, 2007). *D. hansenii* utiliza un amplio espectro de sustratos de carbono que generalmente son catabolizados por un metabolismo respiratorio, y se ha observado que produce toxinas “killer” efectivas contra otras levaduras como las especies patógenas del género *Candida* (Banjara N. *et al.*, 2016).

En lo que concierne a su filogenia, *D. hansenii* es una levadura hemiascomicética perteneciente a la familia *Saccharomycetaceae*, dentro de la cual se encuadra en la subfamilia *Saccharomycetoidae* (Sherman D. *et al.*, 2004). Dentro del género *Debaryomyces*, *D. hansenii* es sin duda la especie de mayor importancia industrial y biotecnológica. Filogenéticamente está más próxima a *Candida albicans* que a *S. cerevisiae* (Fig. 2).

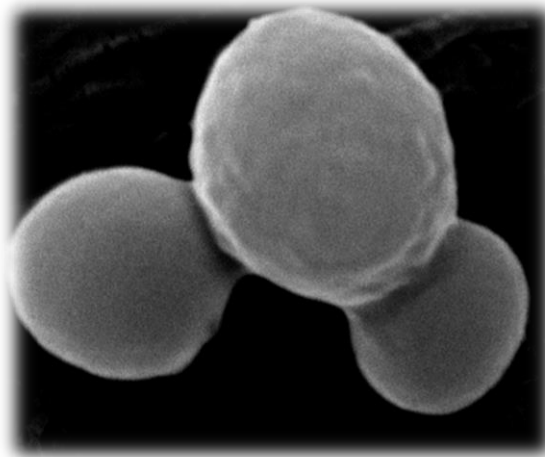


Figura 1. *D. hansenii*. Fotografía al microscopio electrónico, tomada por el Departamento de Microbiología de la Universidad De Córdoba.

Aunque no ha sido descrita como una especie patógena, existen publicaciones que muestran a *D. hansenii* y especialmente a su anamorfo *Candida famata* como patógenos emergentes (Wagner D. *et al.*, 2005; Pisa *et al.*, 2007). En 2004, el genoma de *D. hansenii* fue completamente secuenciado (Dujon B. *et al.*, 2004). Este hecho proporcionó mucha información sobre esta levadura, aunque con muy poca evidencia fisiológica asociada (Iragne F. *et al.*, 2008). Cuando se comparó el genoma de *D. hansenii* con el de otras levaduras no convencionales, el análisis de la divergencia de la secuencia de aminoácidos entre estas levaduras reveló que la distancia evolutiva entre ellas es mayor que la observada para todo el filo de cordados (Souciet JL., 2009).

Su genoma está constituido por 7 cromosomas, que representan un tamaño total de 12,2 Mb (Fig. 3). De todas las especies de levaduras secuenciadas, *Debaryomyces* es la que presenta la mayor capacidad codificante. Esta levadura cuenta con 6906 “ORFs” (marcos de lectura abierta), descritos por el consorcio francés Genolevures, lo que representa un 79,2% del material genético. Por este motivo, se considera la especie con mayor número de proteínas en relación a la longitud de su genoma. Si definimos la densidad génica como el número de genes por unidad de longitud del genoma (genes/Mb), *D. hansenii* tendría una densidad génica de 575, muy por encima de otras especies de levaduras como por ejemplo *S. cerevisiae* (480). Cabe resaltar como peculiaridad de esta levadura, el uso de un código genético alternativo, en el cual el

codón CUG (leucina) es traducido a principalmente a serina (97%) (Sherman D. *et al.*, 2004), un fenómeno sólo descrito previamente en *C. albicans* (Santos MA. *et al.*, 1997).

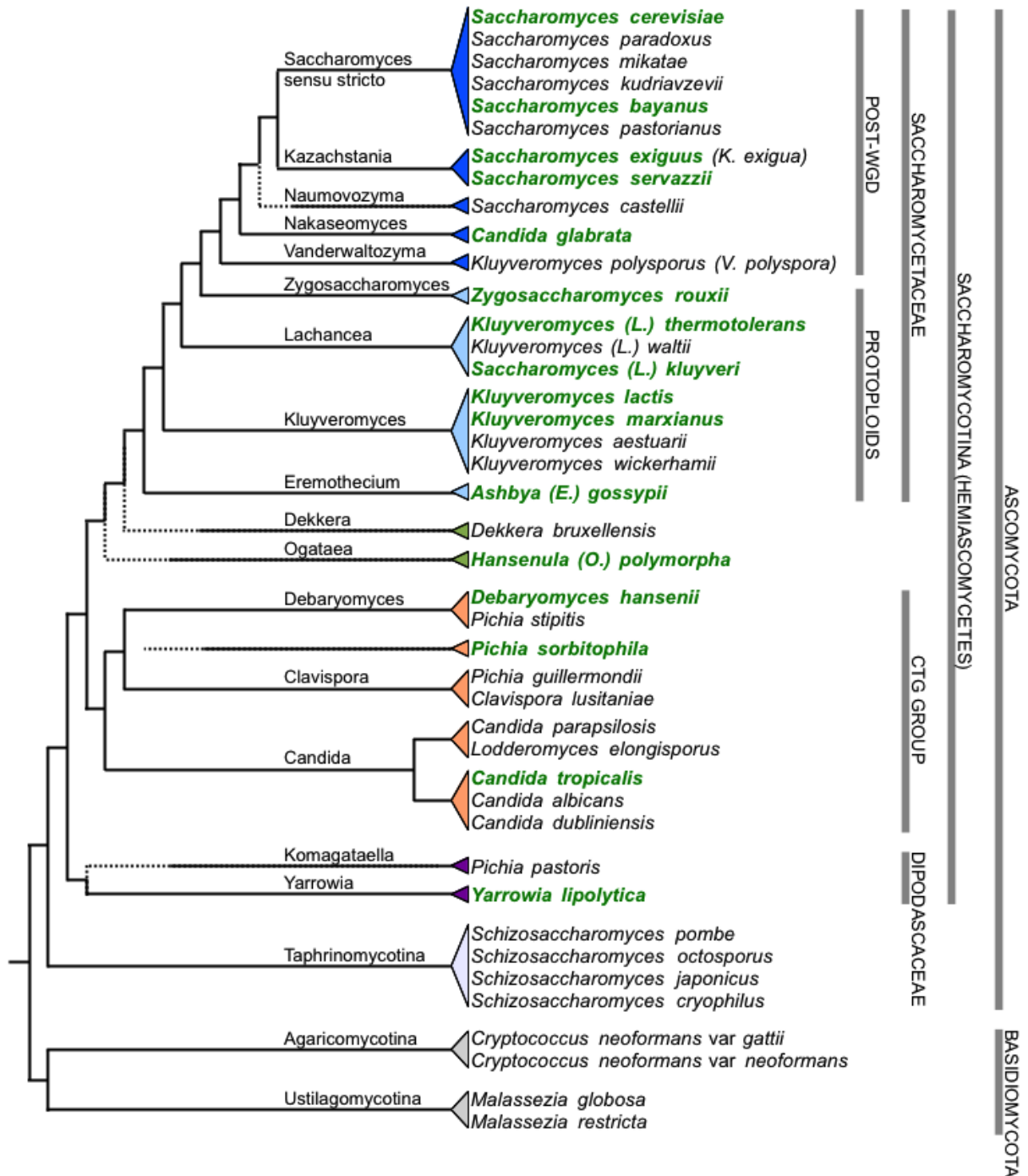


Figura 2: Cladograma de levaduras. El cladograma representa las relaciones filogenéticas de diferentes especies de levaduras basado en el análisis comparativo de 153 genes de distribución universal.

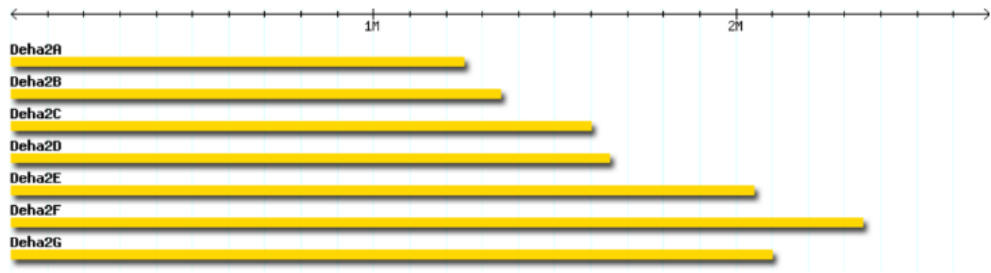


Figura 3: Representación ilustrativa del número y tamaño (Mb) de los cromosomas de la cepa tipo CBS767 de *Debaryomyces hansenii*. Imagen obtenida de la página web del consorcio Genolevures.

Adicionalmente, el genoma de esta levadura presenta otras características diferenciales con respecto a organismos próximos que se recogen en la Tabla 1 (Axelson- Fisk M. y Sunnerhagen P., 2006).

Tabla 1: Características clave de algunos genomas de hongos secuenciados.

	Tamaño genoma (Mb)	Número de genes	Genes por Kb
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12,5	5777	0,46
<i>Candida albicans</i>	14,9	6419	0,43
<i>Debaryomyces hansenii</i>	12,2	6906	0,57
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	14,1	4973	0,35
<i>Neurospora crassa</i>	38,9	10082	0,26

2 ESTRÉS SALINO.

La sal, desde un punto de vista químico es un compuesto formado por cationes enlazados a aniones mediante un enlace iónico. Son el producto típico de una reacción química entre una base y un ácido, donde la base proporciona el catión, y el ácido el anión. El estrés salino puede definirse como el conjunto de alteraciones moleculares y fisiológicas de un ser vivo en respuesta a altas concentraciones de sal.

Aunque el cloruro de sodio es la sal más habitual en la naturaleza (“sal común”), es fácil encontrar muchos otros tipos de sales como el sulfato de manganeso (MnSO₄) o el

cloruro potásico (KCl). Generalmente los estudios de estrés salino se realizan con NaCl por ser la más abundante en el agua de mar.

Las investigaciones relativas a los procesos de estrés no sólo son interesantes desde un punto de vista científico, sino que también tienen relevancia médica y económica (Ruis H. y Schüller C. *et al.*, 1995). La gran mayoría de los seres vivos son sensibles a la sal (NaCl), de hecho este compuesto está incluido entre los denominados “factores de estrés” que contribuyen a procesos como el envejecimiento celular, están implicados en enfermedades como el cáncer y afectan a procesos inmunológicos (Cross CE. *et al.*, 1987). Por otro lado, la resistencia de plantas superiores a condiciones de estrés provocadas por un ambiente salino, son de especial interés en agricultura junto con las de las altas temperaturas o la sequía (Boyer JS., 1982). En los microorganismos, la capacidad de tolerar ambientes de bajo potencial hídrico provocados por elevadas concentraciones de NaCl es una propiedad ampliamente distribuida, pudiendo encontrar especies halotolerantes y halófilas en todos los reinos: Archaea (Oren A., 1999), Bacteria (Ventosa A. *et al.*, 1998) y Eukarya (Gunde-Cimerman N. *et al.*, 2009). Cuando se utilizan levaduras en procesos industriales, no siempre es posible evitar el que las células estén sometidas a algún tipo de estrés. De hecho, muchas veces están expuestas a varios tipos de estrés de manera simultánea, siendo los más comunes aquellos provocados por la alta osmolaridad, variaciones de temperatura, o déficit de nutrientes o compuestos fundamentales. El estudio de los mecanismos fisiológicos y moleculares subyacentes a la osmorregulación y la osmoadaptación está relacionado con la importancia que ambos aspectos tienen sobre procesos biotecnológicos y sobre la agricultura. Como ejemplo, la mejora de la resistencia de cultivos al estrés salino es un objetivo perseguido desde hace tiempo en agricultura (Nuccio ML. *et al.*, 1999). De hecho, los factores más importantes que limitan la producción vegetal son estreses de origen ambiental, de los cuales la salinidad y la sequía son los más importantes (Serrano R. y Rodríguez PL., 2002). La salinidad, afecta a más del 40% de las tierras de regadío, especialmente a las regiones más productivas a lo largo del planeta, debido a los efectos acumulados de décadas, o incluso siglos, de continuamente añadir agua para el riego con moderadas concentraciones salinas sobre los mismos suelos de cultivo.

Así pues, la identificación de los mecanismos moleculares de homeostasis iónica junto con el desarrollo de levaduras y plantas tolerantes a sal mediante ingeniería genética son actualmente las metas más importantes de las investigaciones acerca del estrés salino (Attfield PV., 1997; Nuccio ML. *et al.*, 1999; Serrano R. y Rodriguez-Navarro A., 2001). Por otro lado, existe también la necesidad de mejorar el rendimiento de las cepas de levadura en condiciones industriales, frecuentemente asociadas a fenómenos de alteraciones súbitas de la osmolaridad (Randez-Gil F. *et al.*, 1999; Pretorius IS., 2000). La investigación sobre levaduras ha demostrado a lo largo de los años que la información contenida en sus genes puede ser transferida con éxito tanto a otros microorganismos como a plantas o incluso a eucariotas superiores, obteniendo como resultado la mejora de la capacidad de resistencia de estos organismos (Rodriguez-Navarro A., 2000). De este modo, la expresión heteróloga de genes asociados con la resistencia a estrés salino sigue siendo uno de los principales objetivos de las investigaciones en este campo. Sin embargo, aún queda mucho trabajo por hacer para llegar a comprender completamente los mecanismos responsables de la resistencia a largo plazo a elevadas concentraciones de sal.

2.1 Estrés salino en levaduras.

Las referencias de las que se disponen acerca de levaduras altamente tolerantes a sal en la literatura son aun escasas, aunque van aumentando paulatinamente. En relación a las especies de levaduras, es posible definir cuatro clases fenotípicas respecto a la tolerancia a NaCl (Lages F. *et al.*, 1999). En el grupo de las levaduras más halotolerantes se encuentran especies de los géneros *Candida* y *Pichia*, y excepcionalmente alguna especie perteneciente a otros géneros como es el caso de *D. hansenii*. En la mayoría de los casos, las especies descritas como más tolerantes a NaCl son igualmente tolerantes a otros tipos de estrés osmótico, como el originado por elevadas concentraciones de azúcares. No obstante, existen algunos casos como la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* que es osmotolerante pero no halotolerante.

A pesar de no ser una de las levaduras más resistente a sal, *S. cerevisiae* es la más utilizada comúnmente para los estudios de respuesta a estrés salino (Hohmann S. *et al.*, 2002). En ella se han estudiado toda una serie de factores determinantes de

halotolerancia, los cuales se encuentran presentes tanto en las levaduras más sensibles como en las más tolerantes a la sal. Así, una estrategia habitual para mantener bajo el nivel de sodio en el citoplasma es el secuestro del catión en el interior de la vacuola gracias a la actividad de transportadores en el tonoplasto, esta estrategia se ha descrito tanto en *S. cerevisiae* (relativamente sensible a sal) como en *D. hansenii* (resistente) (Herrera R. *et al.*, 2013). Tras *S. cerevisiae*, la levadura más estudiada en el campo del estrés salino es *D. hansenii*, de cuyas características se hablará más en detalle a lo largo de este trabajo de tesis. Además de estas dos levaduras, existen trabajos relacionados con la tolerancia a estrés salino en otras, como por ejemplo varias especies del género *Candida* (Krauke Y. y Sychrova H., 2010), *Picchia* (Maresova L. y Sychrova H., 2003), *S. pombe* (Balcells L. *et al.*, 1999) o *Zygosaccharomyces rouxii* (Jansen M. *et al.*, 2003).

La capacidad de crecer en presencia de sal se relaciona con múltiples factores no completamente conocidos y que en *D. hansenii* comprenden desde diversos transportadores de membrana a actividades enzimáticas o la composición específica de la membrana plasmática (Prista C. *et al.* 2016). Las levaduras más halotolerantes son un buen modelo para comprender nuevos aspectos intrínsecos a la tolerancia a sal.

Los transportadores de cationes más importantes en relación a la tolerancia a sal son los transportadores de sodio que actúan en la membrana plasmática. Los dos transportadores más conocidos son Ena (una ATPasa de sodio) y Nha (un antiportador sodio-protón) que se encargan de expulsar sodio al exterior y se han descrito tanto en levaduras sensibles como en levaduras resistentes a sal (Prista C. *et al.*, 2016). Además existen otros factores que no se encuentran directamente involucrados con el transporte de iones pero que regulan la actividad de los transportadores mencionados también influyen en la halotolerancia. Este es el caso del producto del gen *DhGZF3*, el primer y único factor de transcripción GATA negativo regulado por nitrógeno que se ha identificado en *D. hansenii*. Las investigaciones realizadas demuestran que DhGzf3 participa en la homeostasis iónica mediante la regulación que ejerce sobre la expresión del gen *ENA1* (García-Salcedo R. *et al.*, 2006).

El papel de diversas enzimas en la tolerancia a sal, ha sido estudiado por el grupo de Alex Mondal en India, que ha publicado diversos trabajos estudiando el efecto de la sal en diferentes actividades enzimáticas en *D. hansenii* y *S. cerevisiae*. Entre las actividades estudiadas se encuentran los productos del gen *HAL2*, que codifica para la enzima

3'(2'),5'-bisfosfato nucleotidasa, la cual cataliza la reacción que convierte 3'-fosfoadenosin-5'-fosfato (PAP) en adenosin-5'-fosfato (AMP) y en fosfato inorgánico (Pi) (Aggarwal M. *et al.*, 2005), ó de los genes *PPZ1* y *SIT4*, que codifican proteínas fosfatasas que regulan diversos procesos fisiológicos en hongos como son la homeostasis iónica o el tamaño celular (Minhas A. *et al.*, 2012; Chawla S. *et al.*, 2017). En estos trabajos demuestran que *in vitro* las actividades enzimáticas derivadas de estos genes son más resistentes a la presencia de NaCl y LiCl en *D. hansenii* que en *S. cerevisiae*.

La presencia de sal influye también en la composición de la membrana plasmática de *D. hansenii*, ya que cambia su fluidez y su composición lipídica. De esta manera, la relación esteroides/fosfolípidos de células de *D. hansenii* creciendo en presencia de altas cantidades de sal fue comparable a la publicada en otros organismos halófilos/halotolerantes, y a su vez significativamente inferior que la observada en *S. cerevisiae* (Turk M. *et al.*, 2007).

Todo lo expuesto anteriormente ilustra la complejidad de las respuestas a estrés salino en general y en *D. hansenii* en particular. La halotolerancia se lleva estudiando durante décadas en esta levadura y aunque se han descubierto varios genes implicados, no se conocen todos los factores de los que depende. Además, hay dos peculiaridades que incrementan la complejidad de la halotolerancia en este organismo: (i) la presencia de NaCl protege frente a factores adicionales de estrés como pueden ser pH o temperatura y (ii) el hecho de que *D. hansenii* contiene unos mil genes más que *S. cerevisiae*, muchos de los cuales son de función desconocida (Axelson-Fisk M. y Sunnerhagen P., 2006).

3 ESTRÉS OXIDATIVO.

El estrés oxidativo se define como un tipo de estrés asociado a una serie de respuestas celulares encaminadas a la protección frente a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Toledano MB. *et al.*, 2004). En células vivas, un coste debido al uso de oxígeno es la producción de ROS tales como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ó radicales hidroxilo. Las ROS pueden provocar efectos muy

perjudiciales sobre las células por la oxidación de lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos, resultando todo ello incluso en la muerte celular. Los radicales libres son productos normales de la respiración celular y son producidos también por un amplio rango de sustancias químicas medioambientales. Sin embargo, no solo provocan efectos perjudiciales sobre las células, las ROS generadas por diferentes reacciones celulares tienen un papel fundamental como mediadores de señalización en procesos como el crecimiento, la diferenciación o la muerte celular (Zhang J. *et al.*, 2016). Por este motivo, es esencial para los organismos aerobios el modular los niveles de ROS así como su actividad para protegerse frente a la toxicidad generada por las mismas (Toledano MB. *et al.*, 2004).

3.1 Estrés oxidativo en levaduras.

La mayoría de información bioquímica y molecular disponible sobre estrés oxidativo en levaduras ha sido también obtenida en *S. cerevisiae*, aunque se han publicado algunos trabajos en otras levaduras como *S. pombe* o *C. albicans* (Morgan BA. *et al.*, 1997; Moradas-Ferreira P. y Costa V., 2000; Ikner A. y Shiozaki K., 2005). Para contrarrestar el estrés oxidativo, las células de levadura han desarrollado diferentes mecanismos de defensa tanto enzimáticos como no enzimáticos. En conjunto, estos se denominan sistemas de defensa antioxidantes y juegan un papel muy importante en la sensibilidad, eliminación y reparación del daño causado por este estrés. Dentro de los sistemas antioxidantes no enzimáticos, podemos destacar el papel del glutatión (GSH), un tripéptido γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, que posee un grupo sulfhidrilo que reacciona con los oxidantes produciendo glutatión reducido (GSSG). El glutatión es posiblemente la molécula más importante para la eliminación de intermediarios reactivos de oxígeno más abundante en la célula, por lo que su función en el mantenimiento del estado redox celular se considera de gran importancia (Collinson LP. y Dawes W., 1995). El H_2O_2 y los peróxidos orgánicos son eliminados en la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa, en la que dos moléculas de GSH donan dos átomos de hidrógeno dando lugar a glutatión oxidado (GSSG). Este será posteriormente reducido por la enzima glutatión reductasa para restaurar los niveles de glutatión reducido, para lo cual se requiere NADPH

(Moradas-Ferreira P. y Costa V., 2000). Otros sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos son por ejemplo, las poliaminas, las vitaminas E y C, y el ácido α -lipoico.

Entre los sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos más importantes se encuentran la superóxido dismutasa, las tio- y gluta-rredoxinas, la catalasa o las glutatión peroxidasa y reductasa. *S. cerevisiae* posee dos superóxido dismutasa (SOD), una citoplásmica dependiente de Cu/Zn codificada por el gen *SOD1* y una mitocondrial dependiente de Mn, Sod2. Estas enzimas contribuyen a eliminar los radicales superóxido formando H_2O_2 y O_2 (Gralla EB. y Valentine JS., 1991; Jamieson DJ. *et al.*, 1994). Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas con dos cisteínas en su sitio activo y contribuyen a la detoxificación de ROS a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína (Pedrajas JR. *et al.*, 1999). Al igual que las tiorredoxinas, las glutarredoxinas también son proteínas pequeñas con cisteínas implicadas en la detoxificación pero que utilizan el glutatión como cofactor (Rodríguez-Manzaneque MT. *et al.*, 1999). La catalasa contiene hierro en su estructura y su función es reducir el H_2O_2 a H_2O más O_2 . En *S. cerevisiae* se han descrito dos catalasas, una citoplásmica y otra peroxisomal (Grant CM. *et al.*, 1998). La glutatión reductasa cataliza la reducción del glutatión disulfuro para formar glutatión (Lee J. *et al.*, 1997). La glutatión peroxidasa cataliza la reacción de glutatión a glutatión disulfuro, se han descrito hasta tres glutatión peroxidases denominadas Gpx1 Gpx2 y Gpx3 en *S. cerevisiae* (Avery AM. y Avery SV., 2001).

Poco se conoce sobre la naturaleza tolerante o sensible de *D. hansenii* ante este tipo de estrés. La búsqueda en base de datos sugiere que *D. hansenii* está dotada de genes que son ortólogos a los de *S. cerevisiae* y que, por tanto, podrían llevar a cabo mecanismos antioxidantes similares a los que se dan en la levadura modelo. Por ejemplo se han identificado genes similares a *SOD1*, *SOD2*, *GPX1*, *TRX1* y *GSH1* que codifican dos enzimas superóxido dismutasas, una glutatión peroxidasa, una tiorredoxina y una glutatión sintetasa, respectivamente. A pesar de ello, sólo se había publicado información detallada en relación con la existencia de actividad SOD (Ramírez-Orozco M. *et al.*, 1998) y el correspondiente gen *SOD1* (Hernández-Saavedra NY. *et al.*, 1998). Posteriormente trabajos del grupo en el que se ha realizado esta tesis han demostrado que *D. hansenii* es más sensible a estrés oxidativo que *S. cerevisiae*. Sin embargo, resulta especialmente interesante el hecho de que en *Debaryomyces*, y no en *Sacharomyces*, la

presencia de NaCl en el medio ejerce un efecto protector del que no se conoce su base a nivel molecular (Navarrete C. *et al.*, 2009).

4 SALINIDAD Y METABOLISMO EN *D. hansenii*.

Existen aún multitud de puntos oscuros que dificultan la comprensión del carácter halotolerante de *D. hansenii*. Uno de estos aspectos es la escasísima información de la que disponemos sobre cómo el estrés salino afecta al metabolismo de *D. hansenii*. El único estudio del proteoma de células de *D. hansenii* expuestas a NaCl reveló cambios importantes durante las 3 primeras horas de estrés por exposición a sal. En este estudio se observó que las células expuestas a sal tenían inducidas proteínas implicadas en el metabolismo del glicerol, y en las primeras etapas de la glucólisis, mientras que, por otra parte, enzimas implicadas en etapas posteriores de la glucólisis o en el ciclo de Krebs estaban reprimidas (Gori K. *et al.*, 2007).

Como ya hemos mencionado en el párrafo anterior, las consecuencias y respuestas metabólicas de *D. hansenii* a situaciones de estrés son prácticamente desconocidas. El grupo de A. Peña en México publicó entre los años 2008 y 2018 una serie de tres trabajos en los que se analizan adaptaciones metabólicas frente a situaciones de estrés como salinidad o elevado pH. Estos trabajos constituyen, hasta el momento, el único intento serio y sistemático de intentar comprender como el estrés puede afectar al metabolismo en *Debaryomyces*. En el primero de estos trabajos se realizó un estudio pormenorizado del efecto de la sal sobre el metabolismo aerobio de *D. hansenii* y se propuso que la presencia de altas concentraciones de NaCl o KCl en el medio de crecimiento, estimula la respiración (Sánchez NS. *et al.*, 2008). Las células crecidas en sal mostraron mayores niveles de succinato y fumarato, y una disminución en isocitrato y malato, además, disminuyeron las actividades isocitrato liasa y la malato sintasa. Por otra parte, se midieron mayores niveles de fosfato en células crecidas en sal, proponiéndose una activación del ciclo del glioxilato como consecuencia del estrés salino así como un incremento en la capacidad respiratoria de la célula. Casi inmediatamente, en 2009, el grupo publicó un trabajo complementando al anterior en el que se analizó el efecto de las sales sobre la fermentación (Calahorra M. *et al.*, 2009). Los autores mostraron un

incremento en la producción de etanol dependiente de sal y se propuso un incremento en las actividades alcohol deshidrogenasa y fosfofructoquinasa, lo que indicaría que estas enzimas son las responsables del incremento en la capacidad fermentadora de la levadura. Los autores proponen que este incremento en la fermentación permitiría a las células enfrentarse al problema de un mayor requerimiento energético relacionado con la entrada o la expulsión de cationes (Calahorra M. *et al.*, 2009). Recientemente, el grupo ha publicado un tercer trabajo que conjuga el estudio del efecto la salinidad con el del pH alcalino (Sanchez NS. *et al.*, 2018). Además de analizar el efecto de estos estreses sobre el crecimiento y la viabilidad celular, se realizó un estudio transcripcional global mediante microarrays. Este estudio reveló que en presencia de sal se producía una represión de genes relacionado con las vías metabólicas de la producción de energía y, en algunos, casos también genes implicados en el ciclo celular. Los autores concluyeron que a pesar de que *D. hansenii* puede tolerar un pH alcalino y altas concentraciones de sal, su comportamiento fisiológico es más eficiente a pH 6,0 y en ausencia de sodio, proponiendo que esta levadura sea definida como una levadura alcalino-halotolerante pero no halofílica como lo había sido anteriormente por algunos grupos de investigación.

Estos trabajos probablemente constituyen la única aproximación válida al efecto del estrés salino sobre el metabolismo de *D. hansenii*. Sin embargo hay que subrayar que se realizaron en condiciones que limitan su interpretación fisiológica: sin control de cambios de pH del medio, con muy poco control de la aireación (sólo por agitación) y, en condiciones de temperatura supra óptimas (30°C) para *D. hansenii*, que posee un óptimo de crecimiento a 26°C.

5 LEVADURAS Y MADURACIÓN DE EMBUTIDOS.

Los microorganismos ejercen un efecto importante en la maduración y características finales de múltiples tipos de embutidos. En el caso de las bacterias, las más importantes son las del grupo de las ácido lácticas, que generan ácido al metabolizar los azúcares, y son en muchas ocasiones utilizadas como cultivo iniciador para su fermentación (Coppola S. *et al.*, 1998; Papamanoli E. *et al.*, 2003; Bal J. *et al.*, 2015). Estas bacterias

además degradan las proteínas y los péptidos, lo que contribuye al sabor y textura general de los productos cárnicos fermentados (Ruiz-Moyano S., 2011; Bal J. *et al.*, 2015).

Las levaduras son también microorganismos muy importantes en este proceso y también contribuyen a las características finales de estos productos, aunque generalmente se hallen en menor proporción. La levadura que se encuentra de manera más frecuente en este tipo de productos cárnicos es *D. hansenii*, sin embargo también podemos encontrar otras como *Trichosporon ovoides*, *Yarrowia lipolytica*, *Citeromyces matritensis*, y *Candida spp.* (Samelis J. *et al.*, 1994; Encinas JP. *et al.*, 2000; Cocolin L. *et al.*, 2006; Aquilanti L. *et al.*, 2007). La producción de volátiles y compuestos aromáticos por *D. hansenii* se considera una importante contribución al proceso de maduración y es muy dependiente de los clones, cepas o biotipos presentes durante el proceso de maduración (Cano-García L. *et al.*, 2014a; Cano-García L. *et al.*, 2014b). *D. hansenii* puede prevenir la formación de productos de oxidación lipídica en embutidos, así como contribuir a mejorar sus características organolépticas. Esta levadura también interviene en el catabolismo de ácidos orgánicos (ácidos láctico y acético), en la reducción del nitrito, y en la producción de amonio (Flores M. *et al.*, 2004; Ozturk I. y Sagdic O., 2014).

No obstante, y como se ha mencionado anteriormente, *D. hansenii* es una especie altamente heterogénea con amplias diferencias fenotípicas entre las cepas en cuanto a las actividades bioquímicas que contribuyen a las características sensoriales del producto final (Cocolin L. *et al.*, 2011). La introducción de cultivos iniciadores en la producción industrial de embutidos, permite un período de maduración más corto, garantiza el desarrollo del color, mejora el sabor y mejora también la seguridad del producto (Cocolin L. *et al.*, 2011). Sin embargo, esto puede provocar la pérdida de las únicas características organolépticas de los productos fermentados naturalmente (Flores J. *et al.*, 1997). Aunque los microorganismos más utilizados como cultivos iniciadores son las bacterias ácido lácticas y *Staphylococcus* (Garriga M. *et al.*, 1996; Kumar P. *et al.*, 2017), en algunos países del sur de Europa también se utilizan mohos y levaduras como cultivos iniciadores por sus efectos positivos sobre el sabor y la textura (Encinas JP. *et al.*, 2000, Cano-García L. *et al.*, 2014a, Kumar P. *et al.*, 2017).

Introducción

Los Pedroches (Fig. 4), es una comarca, también denominada "Valle de los Pedroches", que curiosamente no es un valle, de 3.612 Km², situada en el norte de la provincia de Córdoba, España. Conformar el territorio más al norte de Andalucía, limita al norte con la provincia de Badajoz de la Comunidad Autónoma de Extremadura y la provincia de Ciudad Real, en Castilla-La Mancha. Los productos de El Valle de los Pedroches son de reconocida calidad, y se encuentran identificados con la marca "Calidad Rural-Los Pedroches" que pertenece a la asociación de marcas de Calidad Territorial Europea. Dentro de esta marca se integran cientos de productos, pertenecientes a decenas de empresas de sectores tan diferentes como el agroalimentario, el turismo o la artesanía.

El ecosistema típico de esta zona es la dehesa, formada básicamente por arboledas de encinas, alcornoques, y quejigos. El fruto de todos estos árboles es la bellota, que forma parte de la dieta del cerdo junto con las hierbas que crecen en libertad. Las bellotas de alcornoque, quejigo y encina maduran en tres fases distintas, por lo que durante la montanera se van escalonando). La empresa Navalpedroche (en colaboración con la cual se ha realizado esta parte del trabajo) posee más de 4.000 hectáreas de dehesa propias situadas en la comarca del Valle de Los Pedroches. Con una densidad media superior a los 50 árboles por hectárea, estos encinares constituyen el hábitat ideal para el cerdo ibérico. Este ecosistema típico del suroeste de la Península Ibérica es el soporte de la ganadería y la base de la calidad de los productos de empresas como Navalpedroche y les otorga auténtica singularidad.

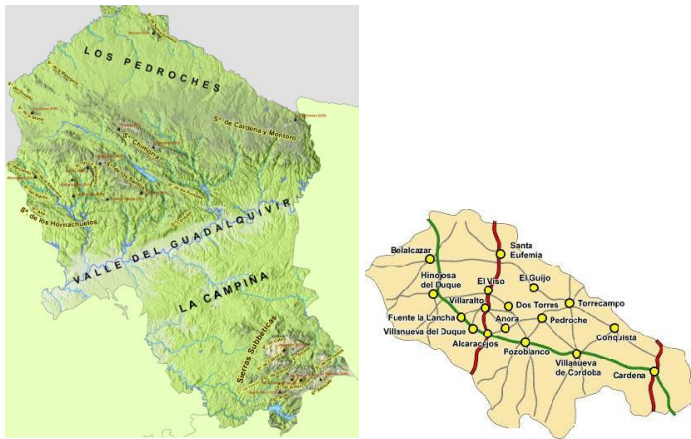


Figura 4. Mapa de la provincia de Córdoba. Los Pedroches.

OBJETIVOS

El Objetivo General de esta Tesis Doctoral es doble, por una parte se ha buscado obtener nueva información sobre los procesos implicados en las respuestas a estrés en la levadura de ambientes salinos *Debaryomyces hansenii*, y por la otra se ha explorado el potencial biotecnológico de esta levadura en la mejora de embutidos procedentes de cerdo ibérico. Estas ideas se han plasmado en una serie de Objetivos Específicos que se detallan a continuación:

- 1.- Identificar el solapamiento o posibles interconexiones en las vías de respuesta a estrés oxidativo y salino.
- 2.- Definir el comportamiento halotolerante/halófilo de *D. hansenii* cuando se cultiva en biorreactores bajo condiciones controladas y en presencia de altas concentraciones de sal.
- 3.- Caracterizar los cambios físico-químicos que la inoculación de una cepa seleccionada de *D. hansenii* produce sobre el lomo ibérico embuchado de la zona del Valle de los Pedroches (Córdoba).

MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIAL BIOLÓGICO. MICROORGANISMOS.

A lo largo de este trabajo se ha utilizado como organismo base la levadura *D. hansenii* de genotipo silvestre (CBS767), facilitada por la colección de Holanda “Central Bureau von Schimmelculturess” (<http://www.westerdijkinstituut.nl/>). Además, se han utilizado levaduras aisladas de embutidos en el grupo de investigación donde se ha realizado esta tesis. Adicionalmente en algunos experimentos se incluyó como control *S. cerevisiae* (BY4741) ó *S. cerevisiae* (W303.1A). Todas ellas se resumen en la Tabla 2.

2 MEDIOS DE CULTIVO. CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

Los medios de cultivo empleados en este trabajo fueron los siguientes:

- YPD: D-glucosa 2 %, extracto de levadura 1 % y peptona 2 % (Sherman F., 1991).
- YNB: medio mínimo completo (0,67 g/l del medio Yeast Nitrogen Base más glucosa 2 %) (Sherman F., 2002).

Cuando fue necesario se añadió agar al 2 % a estos medios para prepararlos en su versión sólida. Estos medios fueron esterilizados en autoclave, a temperatura de 120°C y sobrepresión de 1 atmósfera durante 20 minutos. Los diferentes medios se utilizaron en matraces, placas, tubos y biorreactores según el experimento realizado. Por lo general, para realizar los diferentes experimentos de exposición, las levaduras se crecieron en medio líquido, con agitación constante (600 r.p.m.) a 26°C hasta fase exponencial de crecimiento ($A_{600nm}=0,5-0,8$).

El mantenimiento de las levaduras se realizó en medio sólido YPD. Esta operación se refrescaba cada 15 días y las cajas de Petri con los microorganismos se mantenían a 4°C. Cuando fue requerido un almacenamiento por un periodo de tiempo prolongado se realizaron suspensiones celulares de glicerol al 20 % que se conservaron a -80°C.

Tabla 2. Microorganismos utilizados en esta tesis.

Microorganismo	Cepa	Descripción
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	W303.1A	Mata <i>ade-2-1 his3-11 15 ura3-1 leu 2-3 112 trp1</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS767	Silvestre. Netherland Collection
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LRB1	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LRB2	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LRB4	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LRC1	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LRC2	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LB2	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LR1	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LR2	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	CB1	Aislada de la piel de chorizo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	CB2	Aislada de la piel de chorizo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LRF1	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	LRF2	Aislada de la piel de lomo del Valle de los Pedroches
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	SRC1	Aislada de la piel de salchichón
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	SRC2	Aislada de la piel de salchichón

(*)Cepas aisladas de embutidos.

3 ENSAYOS DE TOXICIDAD Y ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS.

El efecto de la exposición a estrés oxidativo o el estrés salino sobre el crecimiento de *D. hansenii* se determinó en cultivos líquidos con células en fase exponencial ($A_{600nm}=0,6-0,7$) expuestos durante 10 minutos con H_2O_2 o NaCl, respectivamente. Tras esta incubación, se tomaron muestras de 5 μ l y se inocularon en medio sólido YPD. El crecimiento se determinó tras incubación a 26°C durante 24 h.

En el caso de los experimentos con birreactores, se utilizaron fermentadores con 1 litro de capacidad, a 28°C y 600 r.p.m., conteniendo medio litro de YNB suplementado con NaCl o KCl y bajo condiciones controladas o no de pH mediante la adición de HCl o NaOH. La determinación del crecimiento se realizó mediante toma de muestras en condiciones estériles en las que se determinó la A_{600nm} .

La inoculación de lomos con levadura seleccionada se realizó cultivando la levadura en YPD líquido, preparando una suspensión concentrada ($A_{600nm}=20$) e inoculando las cantidades de levadura deseadas con ayuda de una pipeta sobre la superficie del embutido (Figura 5). Esta inoculación dio lugar a 5 muestras de estudio, un control y 4 muestras inoculadas de diferentes maneras:

- M: levadura inoculada en la carne del embutido.
- C: levadura inoculada en la piel del embutido.
- 1: 0,52 g de levadura inoculados.
- 2: 1,04 g de levadura inoculados.

Los lomos se dejaron madurar durante 3 meses a una temperatura media de 13°C.



Figura 5. Inoculación de lomos ibéricos con la cepa LR1 de *D. hansenii*.

4 ENSAYOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

4.1 Extracción de ARN.

Para realizar los experimentos relacionados con la expresión génica, el ARN total de las células fue aislado usando el reactivo TRI-REAGENT (Sigma-Aldrich, Alemania). Brevemente, las células de 200 ml de cada cultivo, en fase exponencial fueron concentradas, lavadas con agua fría y resuspendidas en 1 ml de TRI-REAGENT junto con un volumen aproximado de 200 μ l de bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Para su ruptura, las levaduras se agitaron en un “vortex” 10 veces durante un minuto con intervalos de al menos un minuto en hielo. Posteriormente se incubaron 5 min a 70°C y se repitió otro periodo de tratamientos en “vortex” similar al anterior. Finalmente, se siguieron las indicaciones del protocolo estándar del TRI-REAGENT para aislamiento de

ARN (<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/trireagent.html>). El ARN aislado se trató con ADNasa I de ThermoFisher SCIENTIFIC (10 mg/ml) siguiendo el protocolo de la casa comercial (https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0012003_RNase_A_DNase_Proteasefree_UG.pdf), para eliminar la contaminación con ADN hasta que no hubo amplificación por PCR sin una síntesis previa de ADNc. La calidad y la cantidad del ARN se determinaron espectrofotométricamente utilizando su absorbancia a 260 y 280 nm. Al menos dos preparaciones de ARN fueron aisladas para cada condición experimental.

4.2 Retrotranscripción.

El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de cada muestra de ARN usando el Kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, E.E.U.U.) siguiendo las instrucciones de la casa comercial (<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106228.pdf>). La reacción se llevó a cabo en un Eppendorf Mastercycler Personal, siguiendo un ciclo con una etapa de hibridación a 25°C durante 5 minutos, una etapa de elongación a 42°C durante 30 minutos y finalmente un paso a 85°C durante 5 minutos para la desactivación de la enzima. De cada muestra se realizaron al menos 3 réplicas que posteriormente fueron combinadas en un solo tubo y almacenadas a -20°C hasta el momento de su amplificación por PCR.

4.3 Extracción de ADN genómico.

Para la identificación de levaduras aisladas de embutidos ibéricos, el ADN genómico de estas cepas fue extraído utilizando un método descrito previamente (Green MR. y Sambrook J., 2012). Brevemente, las levaduras crecieron en YPD hasta fase estacionaria y 3 ml de estos cultivos fueron centrifugados (5000 g, 10 minutos, 4°C). Se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se lavó con 1 ml de H₂O a 4°C. La resuspensión celular se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se volvió a eliminar el sobrenadante para descartar totalmente el medio de cultivo. Las pellas obtenidas se resuspendieron en 0,2 ml de tampón de lisis (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl,

10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), más aproximadamente un volumen de 0,2 ml de bolas de vidrio y 0,2 ml de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (24:24:1), y se agitaron en un "vortex" 5 veces durante 1 minuto con intervalos de al menos 1 minuto en hielo. Después de romper las células, se añadieron 0,2 ml de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) y se centrifugaron (12000 g, 15 minutos, 4°C) otra vez. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes conteniendo el ADN genómico, y se precipitaron con 500 µl de etanol. Tras centrifugar (12000 g, 15 minutos, 4°C), las pellas finales se resuspendieron en 0,1 ml de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). La calidad y cantidad de las muestras de ADNg fue determinada mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm y su integridad comprobada electroforéticamente en gel de agarosa.

4.4 Extracción de ADN mitocondrial.

La diferenciación de las cepas seleccionadas de los embutidos ibéricos se realizó mediante el análisis de su ADN mitocondrial. Las distintas estirpes se crecieron hasta fase exponencial en medio YPD a 26°C. 5 ml de estos cultivos se centrifugaron (12000 g, 3 minutos), se eliminó el sobrenadante, y se resuspendieron las pellas en 1 ml de agua estéril. Se centrifugaron en las mismas condiciones y se volvieron a eliminar los sobrenadantes. A continuación, se resuspendieron las pellas resultantes en 500 µl de una solución 0,9 M sorbitol y 0,1 M EDTA. Se suplementaron con 30 µl de Zimoliasa 20T 1 mg/ml, (ICN Biomedicals, Aurora, EEUU.). Se incubaron 20 minutos a 37°C y centrifugaron (7000 g, 3 minutos). Las pellas resultantes se resuspendieron en 500 µl de 50 mM Tris-HCl y 20 mM EDTA. Se suplementaron con 13 µl de SDS 10 %, se agitaron vigorosamente y se incubaron a 65°C 5 minutos. Se suplementaron con 200 µl de 5 M acetato potásico y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron (14000 g, 15 minutos, 4°C), y se recogieron los sobrenadantes, que se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones para eliminar todos los restos celulares. Los sobrenadantes se suplementaron con 700 µl de isopropanol e incubaron a temperatura ambiente 10 minutos. Se procedió a una nueva centrifugación (12000 r.p.m., 10 minutos), y se eliminaron los restos de isopropanol con la ayuda de una estufa

de vacío. Tras dos procesos consecutivos de lavado con etanol al 70 % y de centrifugación (12000 r.p.m., 5 minutos), se eliminaron los sobrenadantes. Finalmente, las pellas se resuspendieron en 20 µl de agua mQ estéril y se guardaron a -20°C hasta su digestión.

4.5 Preparación de extractos proteicos y cuantificación de proteínas.

Para la determinación de los ensayos bioquímicos se prepararon extractos proteicos. Para ello 200 ml de cultivo en fase exponencial se centrifugaron (5000 g, 10 minutos, 4°C) y se lavaron con agua destilada estéril. Los extractos se prepararon resuspendiendo las levaduras en 10 mM Tris-HCl pH 7,4 y agitando vigorosamente en un “vortex” durante 1 minuto con bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. El proceso se repitió con intervalos de 1 minuto en hielo hasta que las células fueron rotas, lo cual se comprobó al microscopio. Los extractos celulares fueron separados de los restos celulares y de las bolas mediante centrifugación (20000 g, 4°C, 15 minutos).

Para cuantificar estos extractos, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (BioRad, España) (Kruger NJ. et al., 1994) a partir valores de una curva estándar elaborada con concentraciones conocidas de BSA (seroalbúmina bovina).

4.6 Cuantificación de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos extraídos se cuantificaron utilizando un equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). En el mismo, se comprobó la pureza, estimada mediante el cociente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm, el cual se mantuvo siempre entre los valores óptimos de 1,8 a 2,2.

4.7 Determinación de la expresión génica mediante RTq-PCR.

Para el estudio del efecto del estrés oxidativo y salino sobre la expresión de los genes seleccionados se diseñaron cebadores específicos a partir de las secuencias depositadas

en las bases de datos. Estas secuencias fueron obtenidas por el consorcio de la ontología de genes (www.geneontology.org) y el consorcio Genolevures (<http://igenolevures.org/>). Los cebadores fueron diseñados con el programa OLIGO 7.60 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU.) con una alta T_m ($>80,7^{\circ}\text{C}$) y una óptima $3'\Delta G$ ($>-6,8$ kcal mol $^{-1}$) (Tabla 3). Todas las parejas de cebadores específicos amplificaron una secuencia con el tamaño apropiado y no se detectaron dímeros. Se estimaron las eficiencias de amplificación de los distintos cebadores, las cuales fueron cercanas al 100%. Para calcular estas eficiencias, se realizó una RT-PCR utilizando diluciones seriadas del ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN de buena calidad. La concentración de ADNc en estas diluciones fue de 2; 0,2; 0,02; y 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Con los datos de CT provenientes de esta PCR relacionado con el Log de las diferentes concentraciones de ADNc se calculó la eficiencia. La figura 6 es un ejemplo del resultado del cálculo de las eficiencias de todas las parejas de cebadores específicos.

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador MJMINI Personal Thermal Cycler de Bio-Rad. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μl , que contenía con 12,5 μl IQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad), 1 μl de ADNc (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) más 0,1 μM de los cebadores específicos. Las reacciones de PCR se realizaron al menos por triplicado. Las condiciones de la PCR a tiempo real consistieron en un paso inicial de desnaturalización, 95°C 3 minutos, seguido de cuarenta ciclos de PCR consistentes en 15 segundos de desnaturalización a 95°C , y 30 segundos de anillamiento más elongación a 70°C . Finalmente se determinaron las curvas de desnaturalización para comprobar que todas las amplificaciones correspondían a los mismos fragmentos de ADN. Los cebadores utilizados para el estudio de la expresión génica se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores utilizados en el análisis mediante PCR a tiempo real

Gene	Sequence forward/reverse (5'→3')
GSH1	ATGATGACCCGCAGATCAAGCAGATCGAGT CGGCAAGCCCCTTAGCCAATTCGTTAATCG
TRX2	ACTTGGTGTGGTCCATGTAAGGCATTGGAGC CCATGGCAGTATCCTGAGCTTTGTCAACGT
ENA1	TCCACCAAGGCCAGAGAGTGCTCCATCGG AGCCCTTGCAGTTCATGATGATCACCAGT
MSN2	TGAACGACGACGACGAGGAATTGGGAGGGG ACGAATTGTGCTGGTTGTAGCTCGACGGTG
RCN1	ACCTCCACTTTCACCTCCAGCGGAATGGGA CTGAGCTCTGAAGTCCTCCAAGCCTTTCCC
ACT1	CGAACACGGTATTGTCACCAACTGGGACGA CGGTCAACAAAACCTGGGTGTTCTTCTGGGG
CTA1	ACCCAGAACTCACTTGAAGGACCCAACC CTCTGTAAGTACTAGCTGGAGTACCACGGTCGG
HOG1	AGAGTTATTGGGTTCTCCACCTCCAGACGT GGCAAACCGCTCGCTGAATGGAATAGGG

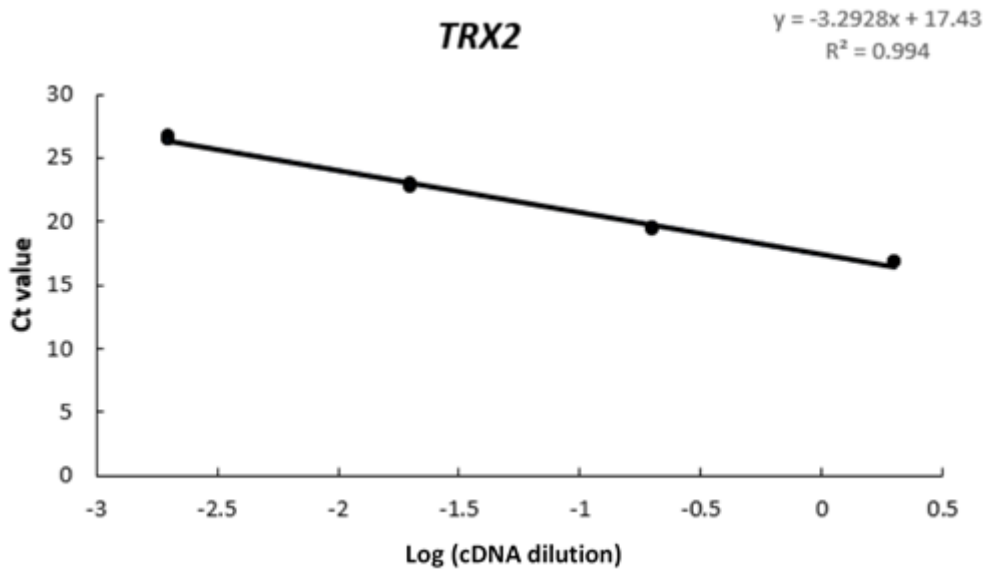


Figura 6. Eficiencia de amplificación de los cebadores del gen *TRX2* de *D. hansenii*. Las eficiencias del resto de parejas de cebadores empleados se calcularon del mismo modo.

4.8 Identificación filogenética de cepas de levaduras mediante PCR convencional.

La identificación filogenética de cepas aisladas de embutidos se realizó la amplificación de un fragmento de ADN exclusivo de *D. hansenii* en su ADN genómico. Dicha amplificación se realizó utilizando una mezcla de 25 μ l de volumen final, usando el kit BIO-X-ACT short DNA polymerase (Bioline, Reino Unido), añadiendo 5 μ l de buffer 10X, 1 μ l de *Taq* DNA polimerasa (4 u/ μ l), 1 μ l de dNTPs (10 mM), y 1 μ g de ADNg de las cepas, más 0,2 μ M de los cebadores específicos para dicha región común de una familia exclusiva de genes de *D. hansenii* (Directo: 5'-GTC GAC TCA GTC TGC TAT AGC CAA CTT CAA GAA ATA G-3'; Reverso: 5'-GAA TTC ATG GAA GCA CAC GGC ATA CGT-3') (datos no publicados procedentes del grupo del Prof. José Ramos) y completar con agua DEPC hasta 25 μ l. La reacción se componía de 40 ciclos de PCR, cada uno consistía en 45 segundos de desnaturalización a 95°C, 45 segundos de anillamiento a 50°C y 120 segundos de extensión a 72°C. La comprobación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, en tampón TBE (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8,3) y tinción con bromuro de etidio. Después de la electroforesis las

imágenes se capturaron usando un equipo Chemi Doc y se analizaron con el software Image Lab (Bio-Rad, EE.UU.).

4.9 Análisis de restricción mediante ADNmt.

Una vez extraído el ADN mitocondrial de cepas seleccionadas aisladas de embutidos, se digirió utilizando 20 μ l de ADN (1 μ g/ μ l), 2,5 μ l de tampón de digestión 10X, 1 μ l de la enzima fast digest Hinf I (Boehringer Mannheim, Alemania) (5 u/ μ l) y se incubó 2 h a 37°C. Una vez transcurridas las dos horas, este ADN se cargó en un gel de agarosa al 1 % en tampón TBE y teñido con el colorante GelRed (BioLabs, EE.UU.). Como marcador molecular se utilizó Lambda Pst I (Roche Molecular Biochemicals, Alemania). Posteriormente se corrió el gel a un voltaje de 90 V durante dos horas.

5 ENSAYOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS.

5.1 Ensayos de actividades enzimáticas antioxidantes y determinación de glutatión total.

Estas determinaciones se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro DU 650 (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.), de acuerdo con los protocolos habitualmente utilizados en el grupo BIO187 (Alhama J. *et al.*, 2018; Navarrete C. *et al.*, 2009).

La actividad catalasa (CAT) se determinó midiendo la desaparición del peróxido de hidrógeno a 240 nm. Esta reacción se llevó a cabo en tampón 17 mM de fosfato potásico, pH 7 y 20 mM de H₂O₂. La actividad específica se expresó como nmol de H₂O₂ consumido por minuto y por miligramo de proteína (coeficiente de extinción = 0,04 mM⁻¹).

La actividad glutatión reductasa (GR) se determinó midiendo el consumo de β -NADPH a 340 nm en presencia de glutatión oxidado (GSSG). La mezcla de reacción contenía 120 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 7,2, 0,275 mM EDTA, 2,125 mM GSSG y 0,1625 mM β -NADPH. La actividad específica se expresó en nmol de β -NADPH consumido por minuto y por mg de proteína usando un coeficiente de extinción de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹.

Materiales y métodos

La determinación de glutatión total se realizó mediante el uso de ácido 5-5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) para la formación de color después de la precipitación de las muestras con ácido metafosfórico. Brevemente, la glutatión reductasa fue añadida para convertir el GSSG en glutatión reducido (GSH). El glutatión reacciona con el DNTB en presencia de NADPH para dar lugar a la formación del color amarillo del ácido 5-thio-2-nitrobenzoico que absorbe a 412 nm. La mezcla de reacción contenía 90 mM de tampón fosfato potásico pH 7, 0,5 mM DNTB, 0,22 mM β -NADPH, y 1 μ l/ml de glutatión reductasa (Sigma-Aldrich, Alemania). La determinación de la concentración de glutatión total se realizó a partir de una curva estándar generada mediante concentraciones conocidas de GSSG.

5.2 Niveles de ROS.

El contenido intracelular de ROS fue determinado como se describe en (Chattopadhyay MK. *et al.*, 2006; Nomura y Takagi, 2004). Brevemente, las células fueron crecidas en YPD hasta fase exponencial ($A_{600nm}=0,6-0,7$). Treinta minutos antes de recogerlas, se añadió al medio 10 μ g ml⁻¹ de diacetato 2',7'-diclorofluoreceína (DCFA) (Sigma-Aldrich). 10 minutos antes de recoger las células, se dio un tratamiento añadiendo H₂O₂ (10-80 mM) ó NaCl (1 M). Después de centrifugar las células, éstas se rompieron con bolas de vidrio en agua durante 10 minutos, agitando vigorosamente en un "vortex" durante 1 minuto con bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. El proceso se repitió con intervalos de 1 minuto en hielo hasta que las células fueron rotas, lo cual se comprobó al microscopio. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de fluorescencia (LS 50B, Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) a λ_{ex} 504 nm y λ_{em} 529 nm. Las muestras se normalizaron mediante su concentración de proteínas.

5.3 Daño oxidativo a los lípidos.

El malondialdehído (MDA) fue detectado fluorométricamente usando un ensayo de reactividad con ácido tiobarbitúrico (TBA). Brevemente, 15 μ l de cada extracto proteico se mezclaron con 125 μ l de BHT (butilhidroxitolueno) al 0,5 % más 50 μ l de 0,66 N H₂SO₄,

y 37,5 μ l de 0,4 M Na_2WO_4 . El volumen fue ajustado a 1 ml con agua mili-Q. Tras centrifugar (5000 g, 5 minutos a temperatura ambiente), se añadieron 250 μ l de TBA al 1% a los sobrenadantes y se incubaron las mezclas a 95°C durante 1 h. Tras dejar enfriar hasta temperatura ambiente se determinó la fluorescencia en un espectrofotómetro de fluorescencia LS 50Ba a λ_{ex} 515 nm y λ_{em} 550 nm. La concentración de MDA se determinó en base a una curva generada con 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) y expresada en pmol mg^{-1} de proteína.

5.4 Determinación del estado redox de las proteínas.

Para determinar el estado redox de las proteínas se usaron 100 μ g de cada extracto proteico y se marcaron los tioles oxidados y reducidos. Los tioles reducidos se marcaron con monobromobimano (mBbm) (200mM) en presencia de SDS (1 %). Para determinar los tioles oxidados de las proteínas, los extractos fueron homogeneizados en iodoacetamida (200 mM) y SDS (1 %) para bloquear los tioles originalmente reducidos. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, se añadió ácido tricloroacético (TCA) (20 %) y se lavó el extracto dos veces con acetona fría (500 μ L) para eliminar el exceso de iodoacetamida. Los tioles oxidados fueron reducidos con 1 mM DTT y 1 % SDS, y marcados de nuevo con 200 mM mBbm. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 4 % para el gel concentrador y al 15 % para el gel separador usando el Laemmli buffer system, a un voltaje constante de 200 V en un Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad). Para reducir la fluorescencia del fondo, los geles se lavaron en metanol al 50 % durante 30 minutos. Las bandas fluorescentes de las proteínas fueron detectadas en un Gel Doc EQ system (Bio-Rad), y además teñidos con azul Coomassie R250 para visualizar las proteínas totales. Para conseguir la imagen del gel y su consiguiente análisis se usó el software Image Lab (Bio-Rad)

5.5 Otras actividades enzimáticas.

La actividad lipolítica extracelular de diversas cepas aisladas de embutidos se evaluó inoculando suspensiones concentradas de células en placas de agar tributirina (VWR

International, Eurolab S. L., EE.UU.) midiendo los diámetros de las zonas de lisis tras incubar las placas a 26°C durante 4 días (Atanassova MR. *et al.*, 2016).

Para determinar las características enzimáticas de las cepas aisladas en este trabajo se utilizaron tiras Apy ZYM más los reactivos ZYM A y ZYM B (bioMérieux S. A., Francia). Las tiras a las que se añadieron 100 µl de una suspensión de levaduras de $A_{600nm}=1$, se incubaron a 28°C durante 3 horas. Los resultados fueron interpretados de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

5.6 Análisis del contenido en sodio.

Para estimar el contenido interno de sodio, las células de *D. hansenii* fueron crecidas en medio YPD hasta fase exponencial ($A_{600nm}=0,6-0,7$). Después, se añadió NaCl al medio y se incubaron durante 30 minutos adicionales a 26°C. Se tomaron muestras de 5 ml a distintos tiempos, se filtraron (filtros de nitrocelulosa, Millipore, 0,8 µm de diámetro) y se lavaron con 5 ml de una solución 20 mM de MgCl₂. El contenido celular se obtuvo mediante lisis ácida de las células retenidas en los filtros con 5 ml de una solución de 0,2 M HCl y 10 mM MgCl₂ durante varias horas (3-5). Finalmente, los extractos fueron centrifugados (4500 g, 2 minutos). Los cationes presentes en los sobrenadantes obtenidos se midieron usando un espectrofotómetro de absorción atómica (SpectrAA-240FS, Varian, EE.UU.), resultados se expresaron en nmol de catión por mg de peso seco de células (Ramos J. *et al.*, 1990).

5.7 Tinción de vacuolas.

Las vacuolas de fueron teñidas usando el colorante FM4-64 (ThermoFisher Scientific) como se ha descrito previamente para *S. cerevisiae* con algunas modificaciones (Ogita A. *et al.*, 2010). Se realizaron dos tipos diferentes de experimentos. Por una parte *S. cerevisiae* y *D. hansenii* crecieron 13-18 horas a 28°C o 26°C a 150 o 180 r.p.m., respectivamente, en YPD y la posible fragmentación vacuolar fue inducida por la adición al medio de 0,4 M NaCl cuando las levaduras estaban en fase exponencial ($A_{600nm}=0,6-$

0,7). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente las células fueron observadas al microscopio de fluorescencia (Michaillat L. y Mayer A., 2013). Por otra parte, *D. hansenii* creció durante toda la noche en YPD suplementado con diversas concentraciones de NaCl (0-1,5 M) y los cultivos fueron analizados cuando se encontraban en fase exponencial ($A_{600nm}=0,6-0,7$). Brevemente, 1 ml de células se centrifugaron y se resuspendieron en 0,5 ml de medio YPD fresco, conteniendo 20 μ M del colorante FM4-64 y se incubaron a 28°C durante 15 minutos. Las células se centrifugaron y se incubaron en 1 ml de medio fresco durante 45 minutos más. Finalmente, se recogieron, se resuspendieron en tampón PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,4) y se observaron en el microscopio óptico de epifluorescencia (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania) y las fotos se tomaron con una cámara digital (Evolve Photometric PV) utilizando el programa Adobe Photoshop CS3.

5.8 Cultivos en biorreactores.

Para la caracterización fisiológica en HPLC “High Performance Liquid Chromatography”, se partió de cultivos en discontinuo (batch). En este tipo de cultivos se llena el biorreactor con medio de cultivo líquido, se esteriliza en autoclave, se inocula a partir de un preinóculo a la concentración deseada y se deja crecer. Los cultivos se llevaron a cabo en biorreactores “Biostast Qplus” (Startorius Stedim Biotech, Alemania) de 1 l de capacidad. La temperatura se controló a 28°C y el pH se mantuvo a 6,0 (cuando fue requerido) por la adición automática de NaOH (2 M) / H_2SO_4 (2 M), y medido por un sensor de pH (Model EasyFerm Plus K8 160, Hamilton, Alemania). El ratio de flujo volumétrico, o aireación fue de 1 vvm y la agitación fue constante a 600 r.p.m. La concentración de oxígeno disuelto fue medida por sensores DO (Model OxyFerm FDA 160, Hamilton, Alemania). El volumen con que se trabajó fue 0,5 l, usando el mismo medio de cultivo que en el precultivo, YNB completo. Para estudiar el efecto de la sal en *D. hansenii*, se añadió al medio 1 M y 2 M de NaCl ó KCl (PanReac Applichem, ITW Reagents) al medio antes de autoclavarlo. Los biorreactores fueron inoculados con un inóculo del precultivo hasta conseguir una $A_{600nm}=0,5-1,0$ inicial. Las muestras para peso

seco, densidad óptica y HPLC fueron tomadas desde que los valores de la producción de CO₂ alcanzaron el valor de 0,1 mmol/l/h, hasta llegar a fase estacionaria.

5.9 Análisis de metabolitos.

Las concentraciones de glucosa, glicerol, acetato y etanol fueron determinadas mediante análisis por HPLC (Modelo 1100-1200 Series HPLC System, Agilent Technologies, Alemania). El volumen de inyección de cada muestra fue 20 µl, el eluyente 5mM H₂SO₄ y un flujo puesto a punto a 0,6 ml/h. La temperatura de la columna de Aminex HPX-87H (Bio-Rad) se mantuvo a 60°C. La solución estándar usada se componía por 20 g/l glucosa, 2 g/l glicerol y 20 g/l etanol (Sigma-Aldrich, Alemania).

5.10 Procesos analíticos.

Los ratios de crecimiento específico en las diferentes condiciones de crecimiento fueron calculados basados en la densidad óptica (A_{600nm}) y en los valores de CO₂ acumulado.

Los coeficientes de rendimiento (Yield) y el equilibrio de carbono fueron usados para describir los metabolitos, los subproductos y la formación de biomasa por las levaduras y se calcularon en base a los datos de HPLC, a los de CO₂ acumulado y a los datos de peso seco. Se utilizó la fórmula mínima promedio CH_{1,79}O_{0,50}N_{0,20} para calcular la composición de biomasa de células secas de levadura como se propone Roels JA. en 1983 en. Los ratios de consumo específico de glucosa fueron calculados basados en métodos logarítmicos como los propuestos en Gorgens JF. *et al.* en 2005.

5.11 Medición de gas producido y oxígeno disuelto.

La concentración de CO₂ y O₂ fue analizada continuamente a tiempo real por espectrometría de masas acoplada a la línea de producción de gases (model Prima PRO Process MS, Thermo Scientific, Reino Unido). A partir de los datos de producción de CO₂, se calculó el ratio de crecimiento máximo específico. Los datos de producción de CO₂ y

la emisión de oxígeno disuelto también se usaron para determinar la evolución en la producción de CO₂ (CER, Ratio de Evolución de CO₂), el Ratio de Entrada de Oxígeno (OUR) y el Cociente Respiratorio (RQ).

Los valores de oxígeno disuelto se midieron con sensores DO (Model OxyFerm FDA 160, Hamilton), como los descritos en la sección anterior.

6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFORMÁTICA.

La significancia de los resultados en los diferentes experimentos realizados se determinó mediante el método ANOVA, seguido de una comparación múltiple *post hoc* según Dunnet para análisis paramétricos o Kruskal-Wallis para los no paramétricos. El programa utilizado fue InStat (GraphPad). Cada experimento fue realizado con al menos 3 réplicas biológicas. Las diferencias estadísticamente significativas se expresan como ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I

Interconexiones en las vías de respuesta a estrés salino y oxidativo en *Debaryomyces hansenii*

En un trabajo anterior a esta tesis realizado dentro de nuestro grupo de investigación se demostraba que, en *D. hansenii*, la presencia de sodio en el medio de crecimiento incrementa la tolerancia a estrés oxidativo (Navarrete C. *et al.*, 2009). Por ello, en el primer capítulo de esta tesis decidimos abordar las bases moleculares de las posibles interconexiones entre las respuestas a estrés salino y estrés oxidativo.

1 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE ESTRÉS SALINO U OXIDATIVO.

Varios estudios sugieren la existencia de puntos de solapamiento en las vías que regulan las respuestas a estrés salino y oxidativo (Navarrete C. *et al.*, 2009; Segal-kischinevzky C. *et al.*, 2011; Michán C. *et al.*, 2013; García Neto W. *et al.*, 2017), lo cual nos llevó a investigar si las respuestas a sales y a peróxido de hidrógeno podrían ser moduladas transcripcionalmente de forma conjunta en *D. hansenii*. Inicialmente, *CTA1* y *HOG1* fueron seleccionados como genes marcadores para cada ruta de estrés. Aunque la respuesta de cada uno de estos genes, a estrés oxidativo y salino respectivamente, no había sido estudiada previamente en *D. hansenii*, ambos se han relacionado con estos estreses en varios organismos. *CTA1* codifica una catalasa peroxisomal, que cataliza la descomposición de la especie reactiva de oxígeno H_2O_2 , la cual está directamente relacionada con la respuesta a estrés oxidativo y constituye una de las principales barreras intracelulares contra el daño oxidativo. Además, se ha descrito que en *D. hansenii*, la actividad catalasa se regula por la fuente de carbono (Segal-kischinevzky *et al.*, 2011). *HOG1* codifica una MAP-Quinasa (Proteína Mitogénica-Activada) que juega un papel importante como un regulador transcripcional en la respuesta a estrés salino mediante la ruta de la “High Osmolarity Glycerol (HOG)” (Alta Osmolaridad del Glicerol). En *S. cerevisiae* su mecanismo de activación ocurre a nivel post-transcripcional mediante mecanismos de fosforilación (Posas F. *et al.*, 2000; Melamed D. *et al.*, 2008; Saito H. y Posas F., 2012; Ma D. y Li R., 2013; García Neto W. *et al.*, 2017).

Nuestro primer experimento consistió en seleccionar las concentraciones de las sustancias inductoras de estrés que íbamos a utilizar en el resto de los experimentos, para que no afectaran de manera importante al crecimiento, y así intentar cuantificar la respuesta primaria. En la Figura 7 se observa cómo, los tratamientos utilizados (H_2O_2 ,

NaCl o KCl) apenas alteraron el crecimiento de las células, y sólo cuando la dosis de H₂O₂ empleada fue alta (80 mM) se observó una disminución del mismo.

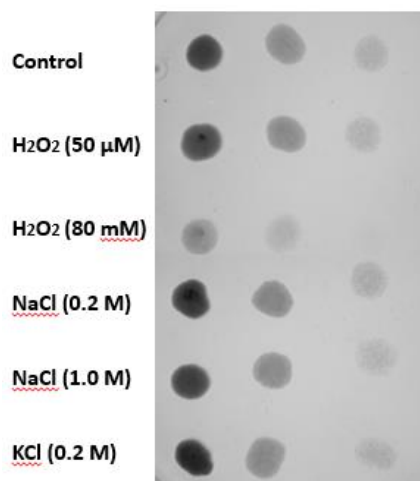


Figura 7. Efecto de diferentes inductores de estrés sobre la viabilidad de *D. hansenii*. Las células crecieron en medio líquido YPD y cuando la absorbancia alcanzó el valor 1 ($A_{600nm}=1$) se añadió el inductor de estrés hasta las concentraciones indicadas. Pasados 10 minutos se tomaron muestras, se centrifugaron y lavaron. Se resuspendieron en PBS ($A_{600nm}=1$) y se realizaron diluciones seriadas de 10 que se inocularon en placas de YPD y se incubaron 24 horas a 26 °C.

Una vez comprobado que las concentraciones a las que usábamos los inductores de estrés no alteraban el crecimiento celular, procedimos a estudiar la expresión de *CTA1* y *HOG1* después de exponer cultivos de *D. hansenii* en fase exponencial a H₂O₂ (como factor desencadenante de estrés oxidativo), NaCl ó KCl (como factores desencadenantes de estrés salino). Los transcritos de *CTA1* y *HOG1* mostraron incrementos estadísticamente significativos en todas las condiciones analizadas. Ambos aumentaron su expresión tras la exposición a estos tipos de estrés, aunque los mayores niveles de ARNm de *CTA1* fueron obtenidos después de la exposición a H₂O₂, y los mayores niveles de ARNm de *HOG1* fueron obtenidos después de la exposición a NaCl (Fig. 8).

Resultados

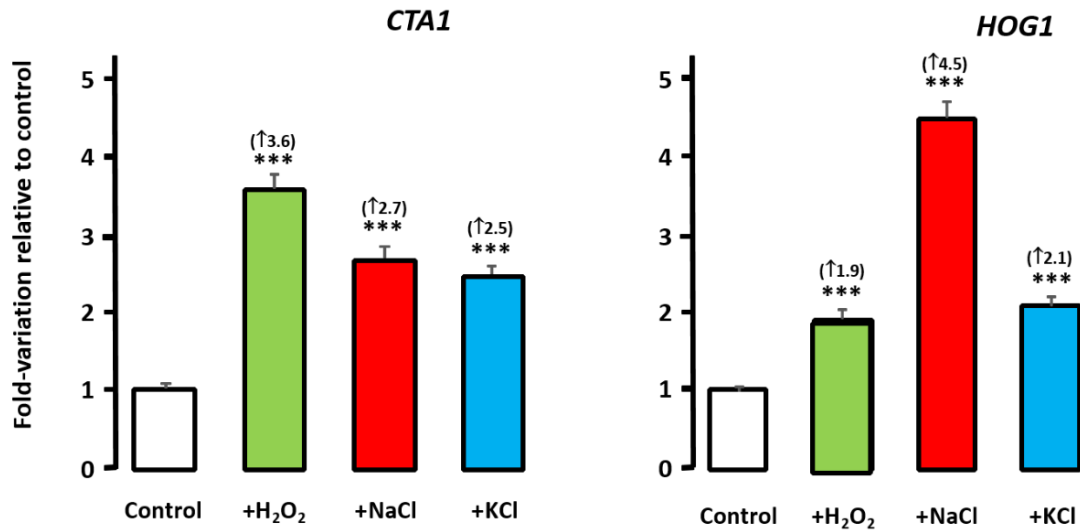


Figura 8. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre los niveles de ARNm de *CTA1* y *HOG1*. Las células de *D. hansenii* crecieron en medio YPD hasta fase exponencial y se trataron durante 10 minutos con H₂O₂ (50 μ M), NaCl (200 mM) o KCl (200 mM). En ese momento se tomaron muestra para aislar ARNs y se determinaron los transcritos de *CTA1* y *HOG1* mediante qRT-PCR. Los datos proceden de las medias de $n \geq 6$. El número de veces que varían se indica entre paréntesis. La significancia estadística está expresada como *, $p < 0,01$; **, $p \leq 0,001$; y ***, $p \leq 0,0001$.

Posteriormente, cinco genes adicionales fueron seleccionados para un estudio más profundo de los cambios en la transcripción tras la exposición a estrés en *D. hansenii*. *GSH1* codifica la primera enzima en la síntesis del glutatión, el metabolito clave para el control del estado “redox” intracelular (Navarrete C. *et al.*, 2009). *MSN2*, es homólogo de los genes que en *S. cerevisiae* codifican reguladores transcripcionales fundamentales en la respuesta a oxidación, choque térmico, y estrés por falta de nutrientes (Morano *et al.* 2012; Kuang *et al.* 2018), y también ha sido asociado con la ruta HOG en la respuesta osmótica (Capaldi AP. *et al.*, 2008). Las tiorredoxinas, representadas por el gen *TRX2*, son pequeñas proteínas redox que juegan un papel central en la respuesta a estrés oxidativo. *ENA1* codifica un transportador de la membrana plasmática del tipo Na⁺, K⁺-ATPasa que es un factor clave para la supervivencia a estreses salinos y alcalinos en *S. cerevisiae* (Ariño J. *et al.*, 2019). En *S. cerevisiae*, las proteínas RCN, regulan la proteína fosfatasa calcineurina, implicada en señalización por Ca²⁺. *RCN1* codifica un inhibidor relacionado con estreses osmótico, por calor, etanol y factores de estrés que afectan a la síntesis de la pared celular (Kingsbury TJ. y Cunningham KW., 2000; Anderson MJ. *et al.*, 2012). En este trabajo decidimos investigar la regulación de todos estos genes por

estrés oxidativo o salino en *D. hansenii*, y examinamos cambios en la expresión a lo largo del tiempo, tras la exposición a niveles subletales de H₂O₂, NaCl o KCl (Fig. 9-11).

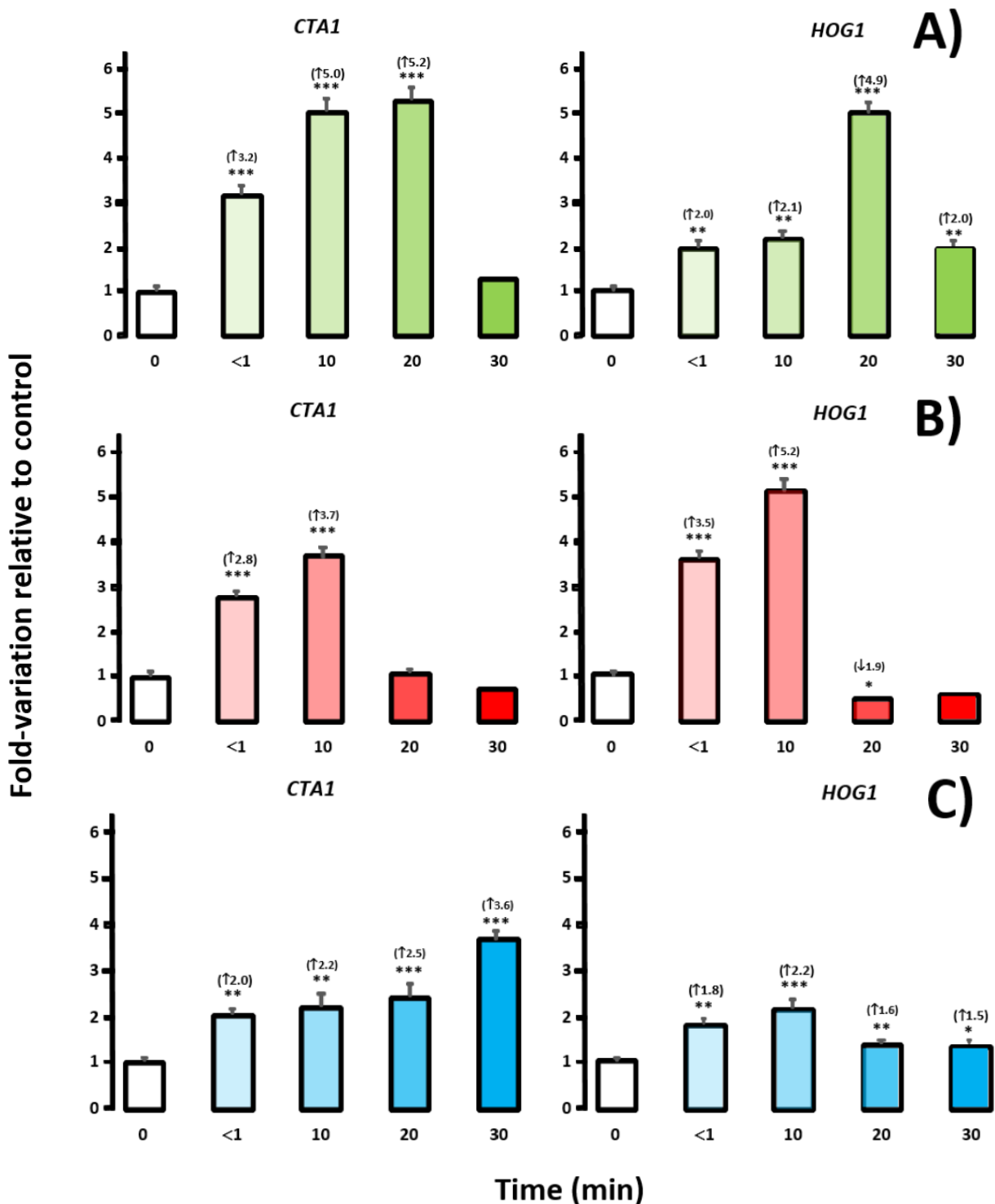


Figura 9. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre los niveles de ARNm de *CTA1* y *HOG1* a lo largo del tiempo. Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron durante <1, 10, 20, y 30 minutos con A) 50 μ M H₂O₂, B) 200 mM NaCl y C) 200 mM KCl. La muestra 0 se refiere a células no tratadas. Se tomaron muestras para aislamiento de ARN y se determinaron los transcritos de *CTA1* y *HOG1* mediante qRT-PCR. El resto de información como se describe en la Fig. 8.

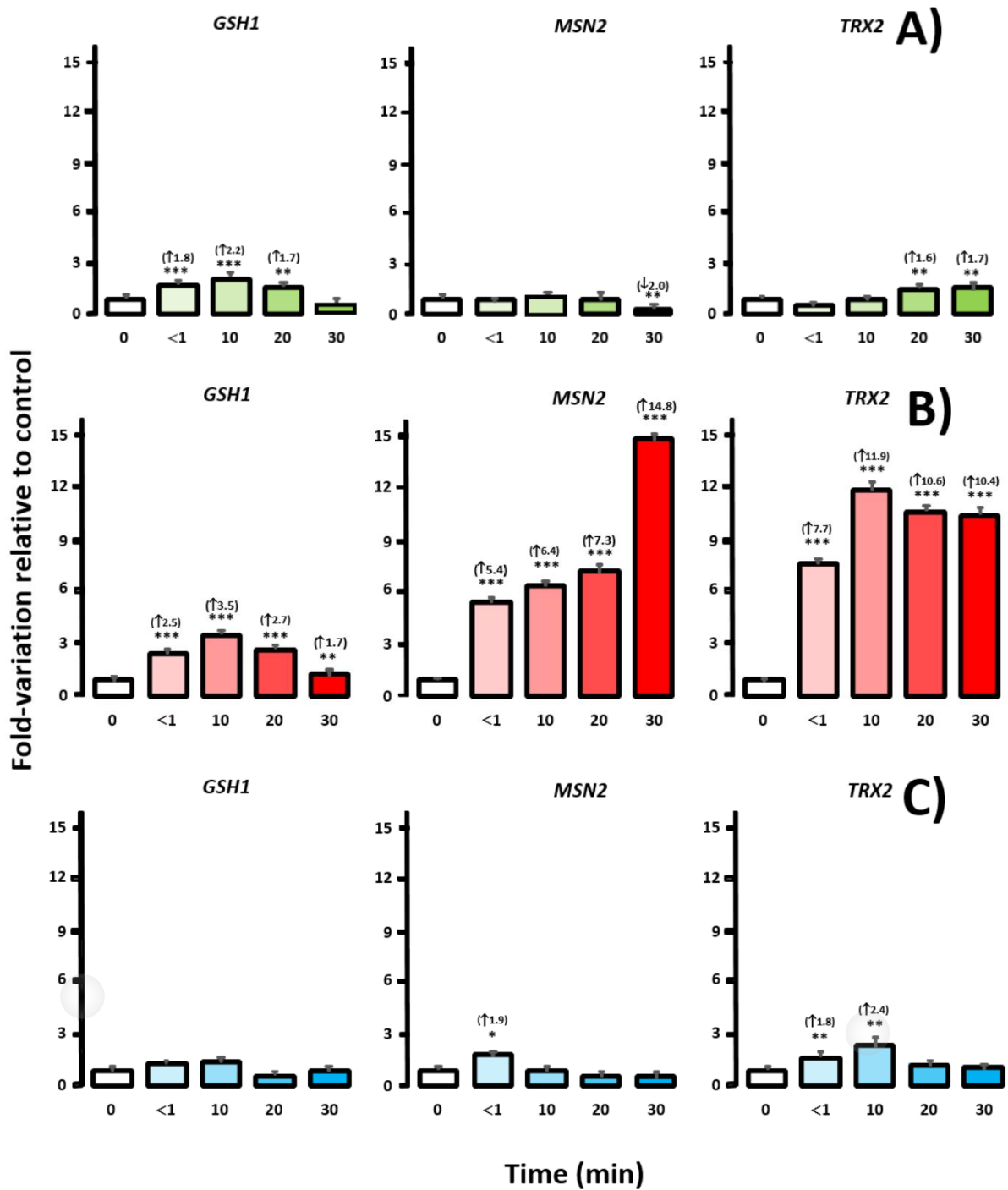


Figura 10. Efecto a lo largo del tiempo del estrés oxidativo y salino sobre los niveles de ARNm de *GSH1*, *MSN2* y *TRX2*. Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron durante <1, 10, 20, y 30 minutos con **A)** 50 μM H₂O₂, **B)** 200 mM NaCl y **C)** 200 mM KCl. La muestra 0 se refiere a células no tratadas. Se tomaron muestras para aislamiento de ARN y se determinaron los transcritos de *CTA1* y *HOG1* mediante qRT-PCR. El resto de información como se describe en la Fig. 8.

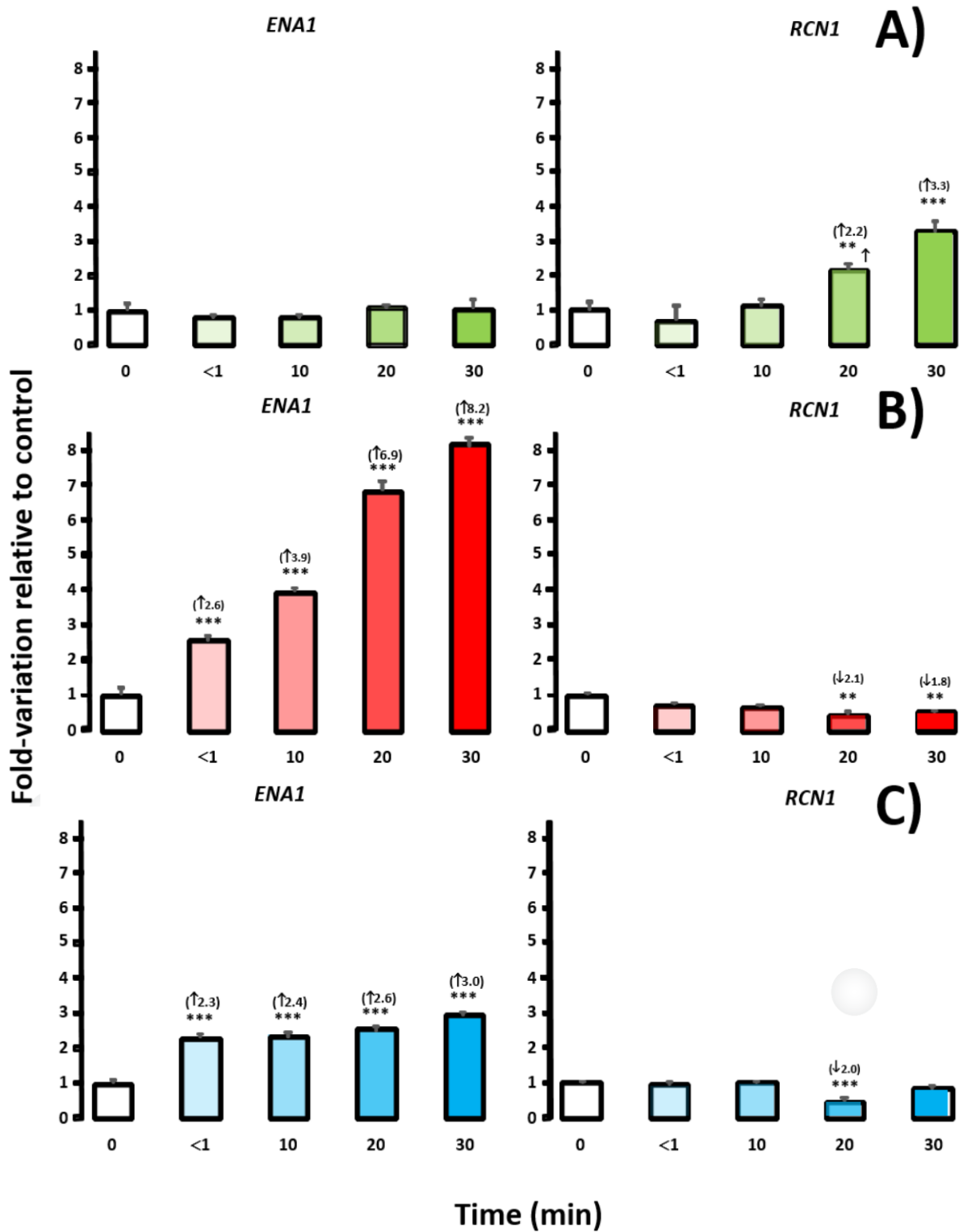


Figura 11. Efecto a lo largo del tiempo del estrés oxidativo y salino sobre los niveles de ARNm de *ENA1* y *RCN1*. Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron durante <1, 10, 20, y 30 minutos con **A)** 50 μM H_2O_2 , **B)** 200 mM NaCl y **C)** 200 mM KCl. La muestra 0 se refiere a células no tratadas. Se tomaron muestras para aislamiento de ARN y se determinaron los transcritos de *CTA1* y *HOG1* mediante qRT-PCR. El resto de información como se describe en la Fig. 8.

2 EFECTO DE LOS NIVELES SALINOS Y OXIDATIVOS SOBRE LAS DEFENSAS ANTIOXIDATIVAS ENZIMÁTICAS Y NO-ENZIMÁTICAS.

Para investigar si la respuesta transcripcional a estrés detectada en *D. hansenii* descrita en la sección anterior podría afectar a su respuesta antioxidante, se estudió la actividad de dos enzimas antioxidantes importantes, catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR), durante la exposición a los inductores de estrés (Fig. 12-13). Como podría esperarse, por su papel en la respuesta antioxidante, la exposición de las células a peróxido de hidrógeno aumentó la actividad de las dos enzimas. Además, la actividad catalasa, coincidiendo con los datos obtenidos en los experimentos de transcripción de este gen, y la actividad glutatión reductasa también aumentaron en presencia de NaCl y KCl hasta niveles similares a los provocados por estrés oxidativo (Fig. 12-13).

Sin embargo, los patrones observados a lo largo del tiempo de exposición no fueron similares ni para las enzimas ni para los factores desencadenantes de estrés. La respuesta de la actividad CAT a peróxido de hidrógeno aumentó progresivamente con el tiempo hasta los 60 minutos de inducción mientras que la respuesta a sales, en el caso del NaCl alcanzó el máximo a los 45 min, y en el caso del KCl a los 15 min, aunque manteniéndose hasta los 45 min. En ambos casos disminuyó después de 45 min de exposición. Además, los aumentos de la actividad CAT en respuesta a los factores de estrés analizados fueron ligeramente inferiores a los detectados a niveles transcripcionales, es decir la comparación del número de veces que se incrementó esta expresión o actividad respecto al control, fue ligeramente mayor en los estudios de transcripción que en los de actividad enzimática. Por otra parte, la inducción de esta actividad en presencia de peróxido de hidrógeno o NaCl, pudo ser observada hasta 60 min después de añadir el factor de estrés, independientemente de que ese momento no fuese el punto más alto de actividad. Sin embargo, no observamos aumentos en ARNm de *CTA1* después de 30 min de exposición a peróxido de hidrógeno o de 20 min a NaCl.

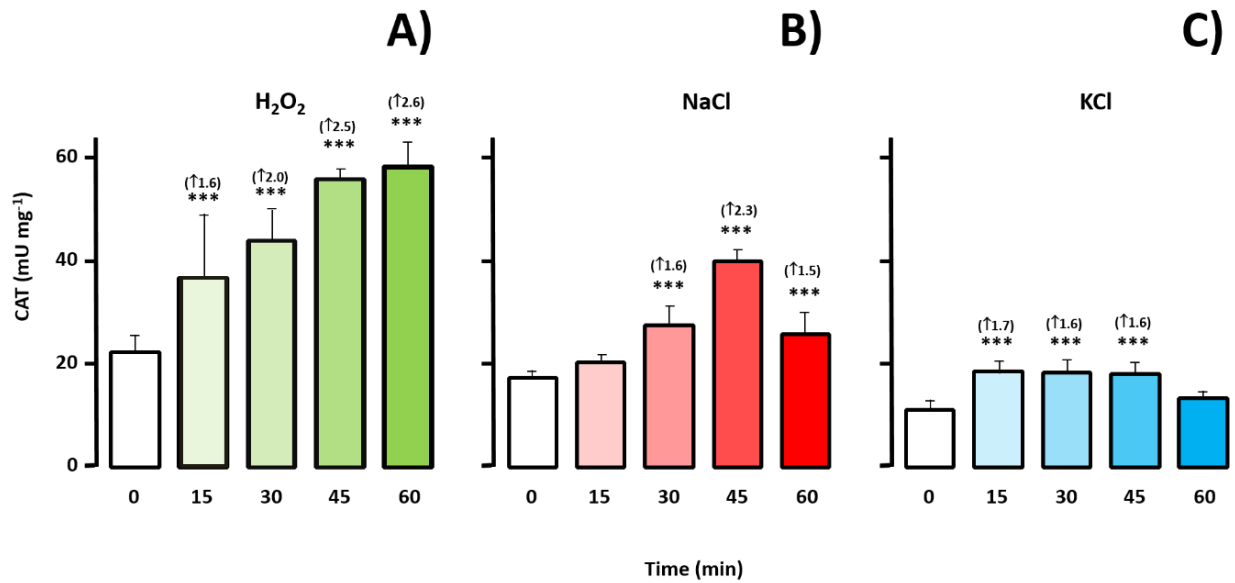


Figura 12. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre la actividad catalasa a lo largo del tiempo. Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron durante 15, 30, 45, ó 60 minutos con **A)** 50 μ M H₂O₂, **B)** 200 mM NaCl y **C)** 200 mM KCl, a estos tiempos se recogieron y se realizó una extracción de proteínas para medir la actividad catalasa (mU por microgramo de proteína total) \pm DE de tres experimentos independientes. La muestra 0 se refiere a células no tratadas. El resto de información como se describe en la Fig. 8.

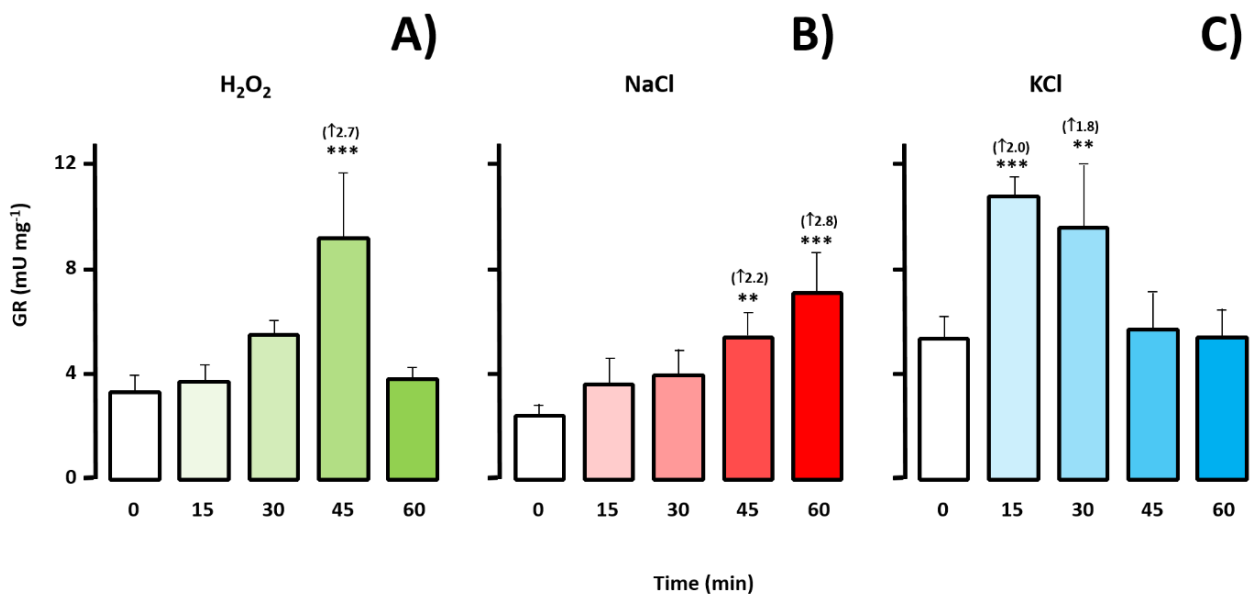


Figura 13. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre la actividad glutatión reductasa. Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron durante 15, 30, 45, ó 60 minutos con **A)** 50 μ M H₂O₂, **B)** 200 mM NaCl y **C)** 200 mM KCl, a estos tiempos se recogieron y se realizó una extracción de proteínas para medir la actividad glutatión reductasa (mU por microgramo de proteína total) \pm DE de tres experimentos independientes. La muestra 0 se refiere a células no tratadas. El resto de información como se describe en la Fig. 8.

Resultados

Como sistema de defensa no enzimático se seleccionó el glutatión. Este metabolito es un tiol de bajo peso molecular muy abundante en el citosol, que desempeña un papel fundamental como un antioxidante no-enzimático. El contenido en glutatión total fue determinado en *D. hansenii* después de la exposición a estrés oxidativo o salino, pero no detectamos cambios estadísticamente significativos, aunque si unas bajadas puntuales que habría que investigar con más detalle (Fig. 14).

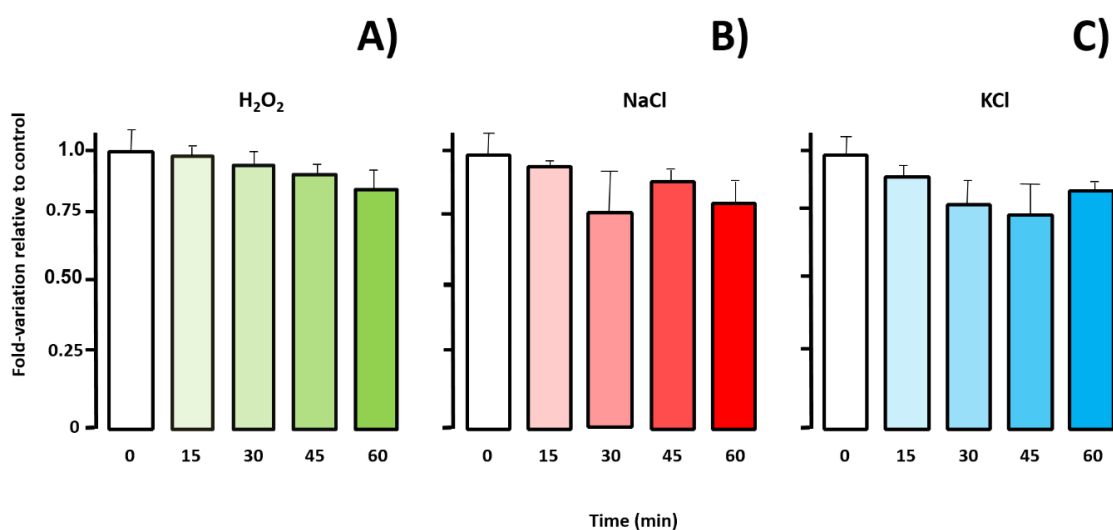


Figura 14. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre el contenido en glutatión total. Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron durante 15, 30, 45, ó 60 minutos con **A)** 50 μ M H₂O₂, **B)** 200 mM NaCl y **C)** 200 mM KCl, a estos tiempos se recogieron y se realizó una extracción de proteínas para medir el glutatión total y se comparó cada muestra con el control (muestra 0) \pm DE de tres experimentos independientes. La muestra 0 se refiere a células no tratadas.

3 NIVELES INTRACELULARES DE ROS Y Na⁺ TRAS LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS SALINO Y/O ESTRÉS OXIDATIVO.

Para comprobar si el estrés salino estaba afectando a los genes relacionados con la oxidación induciendo estrés oxidativo dentro de las células, se calcularon los niveles intracelulares de ROS con 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH₂DA), una técnica ampliamente usada para la medición directa de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares. Cuando usamos bajos niveles de peróxido de hidrógeno y NaCl, como los empleados en los análisis de transcripción y análisis enzimáticos, no se incrementó significativamente la fluorescencia. Sin embargo, un segundo análisis usando unas concentraciones más

altas de estos inductores de estrés (NaCl y H₂O₂) mostró un incremento en los niveles de ROS aproximadamente de la misma medida para ambos agentes (Fig. 15).

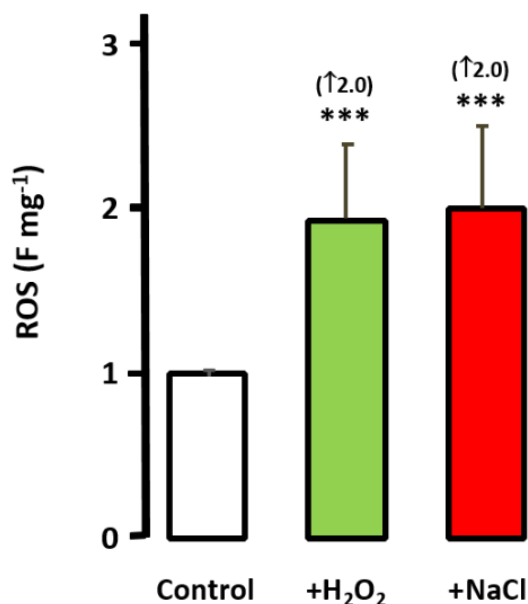


Figura 15. Contenido en ROS. Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron con 80mM H₂O₂ ó 1 M NaCl durante 10 minutos. La fluorescencia DCFA se determinó como se describe en Material y Métodos. Los datos son las medias (unidades de fluorescencia arbitraria por mg de peso) ± DE de tres experimentos independientes. El resto de información como se describe en la Fig. 8.

Estudios previos habían demostrado que la presencia de estrés salino en el medio puede afectar los niveles de Na⁺ intracelular en *D. hansenii* (Herrera R. *et al.*, 2017; Montiel V. y Ramos J., 2007). Para investigar si el estrés oxidativo podría alterar la acumulación de Na⁺, se determinó el contenido intracelular del catión a diferentes tiempos después de añadir H₂O₂, NaCl o ambos desencadenantes de estrés (Fig. 16). Como se podría esperar, no se detectaron cambios después de añadir sólo peróxido de hidrógeno, ya que bajo estas condiciones la concentración de sodio presente en el medio complejo YPD es baja (aproximadamente 10 mM). Por otra parte, la concentración interna de Na⁺ aumentó un 50 % después de añadir NaCl (200 mM) al medio de cultivo. Pero lo más interesante

Resultados

sucedió cuando los dos factores de estrés fueron añadidos simultáneamente al medio, el nivel de Na^+ intracelular aumentó antes y hasta un nivel más alto que el que se alcanzó solo en presencia de sal (Fig. 16).

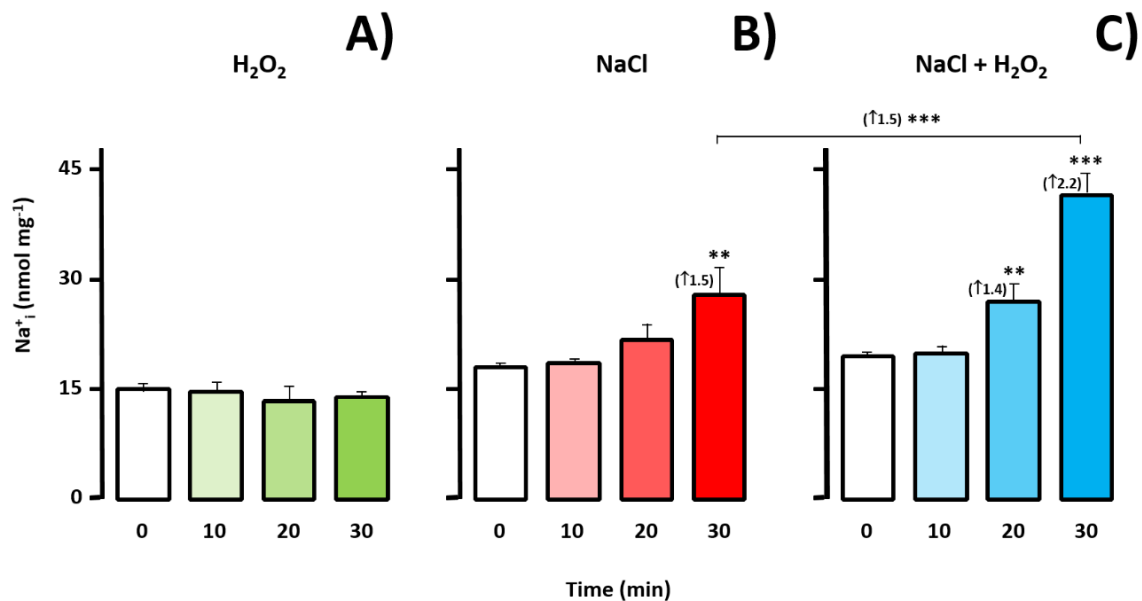


Figura 16. Contenido en Na^+ . Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron durante 0, 10, 20 ó 30 minutos con **A)** 50 μM H_2O_2 , **B)** 200 mM NaCl, o **C)** 50 μM H_2O_2 + 200 mM NaCl. Las células se filtraron en filtros Millipore y se trataron como se describe en Material y Métodos. El contenido en Na^+ intracelular se determinó por espectrofotometría de absorción atómica. Los datos son medias (nmol por mg de células) \pm DE de tres experimentos independientes. El resto de información como se describe en la Fig. 8.

4 DAÑO CAUSADO POR ESTRÉS OXIDATIVO Y SALINO A LÍPIDOS Y PROTEÍNAS.

Las ROS pueden causar un gran daño en las biomoléculas, como lípidos o proteínas. Nosotros investigamos si el estrés oxidativo y salino estaba afectando a estas biomoléculas determinando la peroxidación lipídica y el estado redox de los tioles de las proteínas. La peroxidación lipídica en *D. hansenii* se midió analizando el contenido en malondialdehído (MDA) después de la exposición a ambos tipos de estrés, oxidativo y salino, a las concentraciones subletales que se habían utilizado para los análisis transcripcionales y enzimáticos. No se observó ninguna alteración en los niveles de MDA en las condiciones estudiadas, resultados que están de acuerdo con la ausencia de inducción de ROS a estas concentraciones de factores de estrés (Fig. 17).

El contenido en ROS también puede afectar a la formación reversible de enlaces

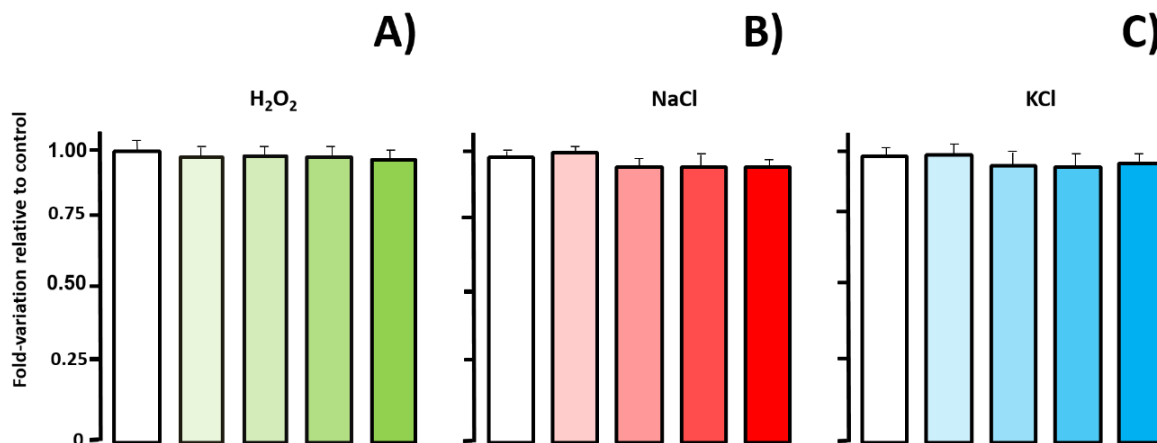


Figura 17. Efecto del estrés oxidativo y salino sobre el nivel de malondialdehído. Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron durante 15, 30, 45, ó 60 minutos con **A)** 50 μM H₂O₂, **B)** 200 mM NaCl y **C)** 200 mM KCl, a estos tiempos se recogieron y se realizó una extracción de proteínas para medir el contenido en MAD y se comparó cada muestra con el control (muestra 0) ± DE de tres experimentos independientes. La muestra 0 se refiere a células no tratadas.

disulfuro en las proteínas y, por tanto, alterar la fisiología celular (Paulsen CE. y Carroll KS., 2013). Por esta razón, una de las principales maneras de determinar los niveles del daño oxidativo en proteínas es estimar el estado redox global de sus residuos de cisteína, ya que estos cambios reversibles determinan la formación de enlaces disulfuro (Alhama J. *et al.*, 2018; Paulsen CE. y Carroll KS., 2013). Los residuos de cisteínas reducidos y oxidados se cuantificaron globalmente después de ser marcados fluorescentemente y se normalizaron mediante una tinción del total de proteínas (ver material y métodos para más detalles). Al igual que en el caso de la peroxidación lipídica, no observamos ninguna variación significativa del estado redox de las cisteínas después de la exposición de células de *D. hansenii* a estrés salino. Sin embargo, la exposición a una dosis baja de peróxido de hidrógeno produjo un claro incremento en la oxidación de las proteínas (Fig. 18).

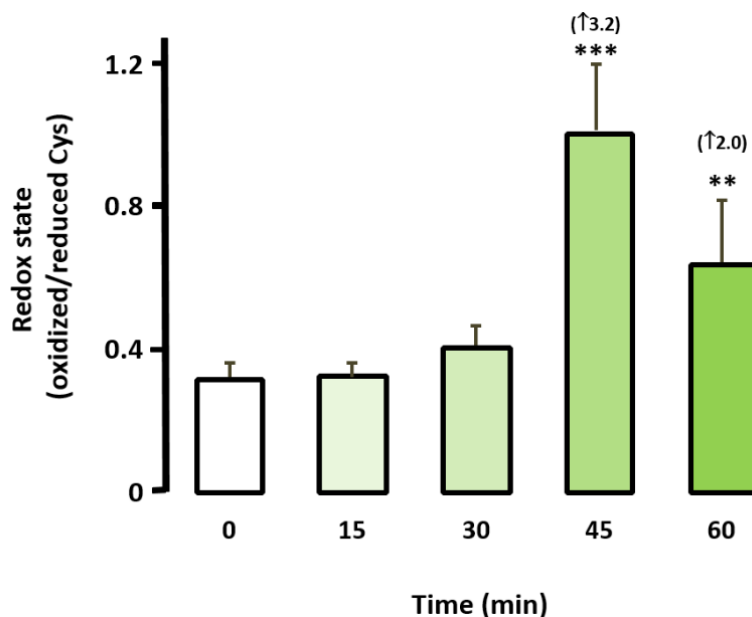


Figura 18. Evaluación del estado redox de las cisteínas. Las células de *D. hansenii* crecieron en YPD hasta fase exponencial y se trataron durante 0, 15, 30, 45, Ó 60 minutos con 50 μM H_2O_2 . Las células se recogieron y centrifugación y se procesaron como se describe en material y métodos. Las proteínas marcadas se separaron por SDS-PAGE y se cuantificaron en Gel Doc EQ system (Bio-Rad). El contenido total del nivel de proteínas fue determinado por tinción con azul Coomassie. Para su análisis se utilizó el programa Image Lab de Bio-Rad. Los datos son medias \pm DE de tres experimentos independientes. El resto de información como se describe en la Fig. 8.

5 ESTRÉS SALINO Y FRAGMENTACIÓN VACUOLAR.

Es conocido desde hace tiempo que la vacuola es un determinante de halotolerancia importante tanto en hongos como en plantas, puesto que parte del sodio que entra en la célula puede ser transportado a este orgánulo evitando así sus efectos tóxicos sobre el metabolismo de la célula (Montiel V. y Ramos J., 2007, Herrera R. *et al.*, 2013). Por otra parte, tanto la presencia de sal como otras situaciones de estrés inducen fragmentación vacuolar (vacuolización) en *S. cerevisiae* (Vida TA. y Emr SD., 1995, Calahorra M. *et al.* 1998, Michaille L. y Mayer A., 2013). Para obtener información sobre posibles respuestas similares en *Debaryomyces*, y en el contexto de un trabajo más amplio realizado en el grupo donde se ha llevado a cabo esta tesis, estudiamos el posible efecto del estrés salino sobre la fragmentación vacuolar de *D. hansenii*. Con este motivo realizamos una serie de observaciones microscópicas de la vacuola en distintas condiciones de salinidad. Los resultados muestran que mientras que la exposición

puntual durante 10 min a una concentración relativamente alta de NaCl (0,4 M) indujo fragmentación vacuolar en *S. cerevisiae*, las células de *D. hansenii* siguieron manteniendo en su inmensa mayoría solo una vacuola (Fig. 19A). En una segunda tanda de experimentos se analizaron las células de *D. hansenii* tras crecerlas en presencia de distintas concentraciones de NaCl hasta fase exponencial tardía ($A_{600nm}=1$). En las estas condiciones se observó que hasta la concentración de 1 M de sodio podemos afirmar que no hay fragmentación, y solo a 1,5 M se observan algunas células con más de una vacuola (Fig. 19B). Se cuantificó el número de vacuolas por células en las condiciones mencionadas y se observa como en cualquiera de las condiciones, al menos el 80 por ciento de las células contenían una sola vacuola, indicando que en nuestras condiciones el estrés salino no indujo una vacuolización elevada de *D. hansenii* (Fig. 19C).

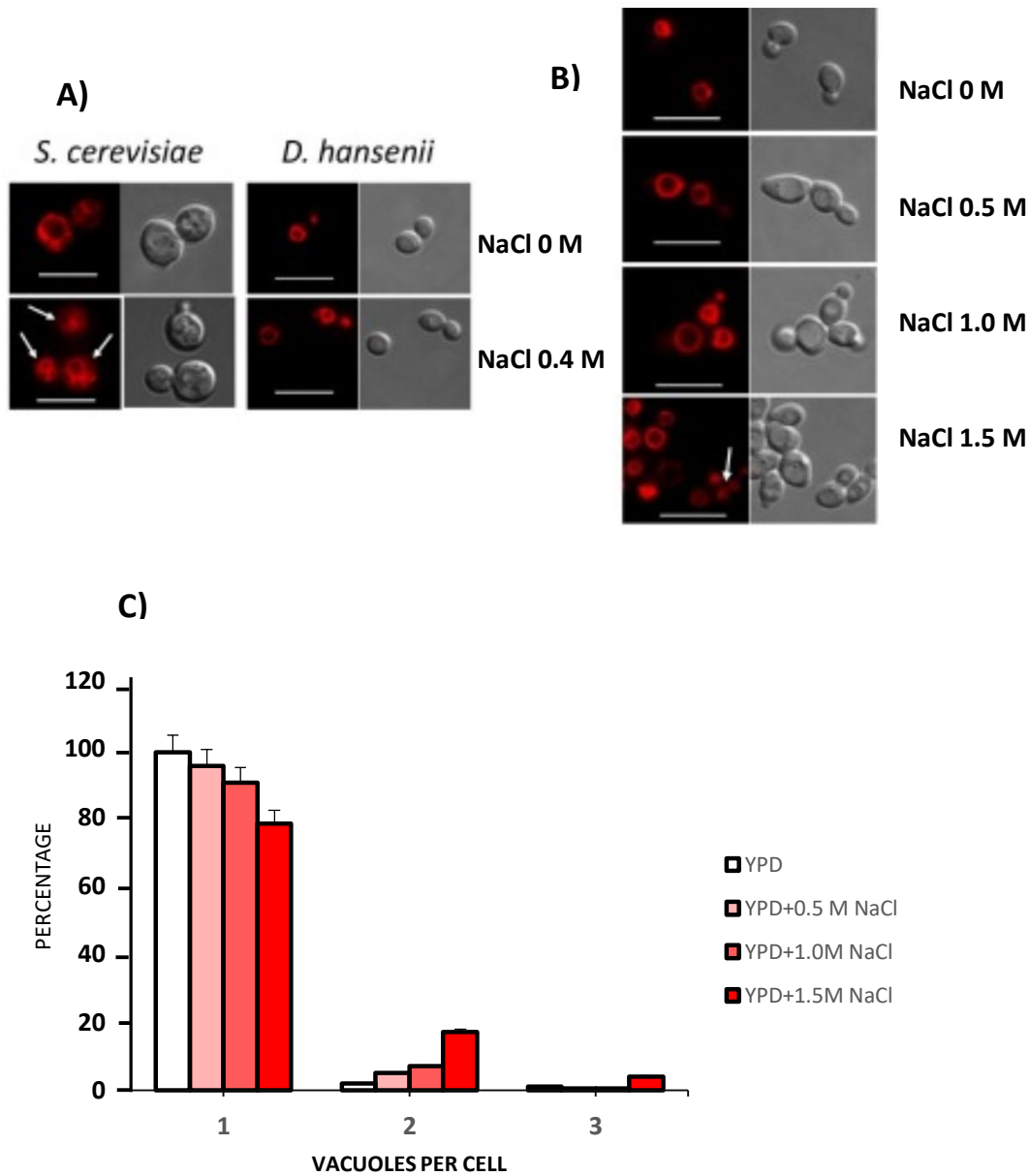


Figura 19. Efecto de la concentración de NaCl en el número de vacuolas por células. **A)** Fotografías representativas mostrando células de *S. cerevisiae* y *D. hansenii* después de incubarlas durante 10 minutos en las concentraciones indicadas de sal (derecha) y teñidas con FM4-64 (izquierda). Las células que contienen más de una vacuola están señaladas con flechas. Barras = 10 μ m. **B)** Fotografías representativas mostrando células de *D. hansenii* crecidas toda la noche bajo las condiciones de sal indicadas (derecha) and teñidas con FM4-64 (izquierda). Las células que contienen más de una vacuola están señaladas con flechas. Barras = 10 μ m. **C)** Cuantificación del número de vacuolas por célula de *D. hansenii* crecida en presencia de las concentraciones indicadas de sal. Los datos son las medias \pm DE de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN 1: INTERCONEXIONES EN LAS VÍAS DE RESPUESTA A ESTRÉS SALINO Y OXIDATIVO en *Debaryomyces hansenii*.

En *S. cerevisiae* y otras levaduras, las respuestas a diferentes estreses en general y al oxidativo y osmótico en particular, pueden estar fisiológicamente conectadas, por ejemplo, el estrés osmótico puede provocar un aumento en las defensas antioxidantes y los antioxidantes pueden atenuar la sensibilidad al estrés osmótico (Estruch F., 2000; Dolz-Edo L. *et al.*, 2013). En cuanto al estrés salino, en hongos halófilos, estas interacciones no están muy claras. En *D. hansenii* el sodio puede regular la expresión de la catalasa (Navarrete C. *et al.*, 2009; Segal-Kischinevsky C. *et al.*, 2011; Michán C. *et al.*, 2013) o proteger contra el estrés oxidativo (Navarrete C. *et al.*, 2009), pero en *Hortaea werneckii*, la supervivencia a la oxidación no se vio afectada por la exposición a sal (Petrovic U., 2006).

Con el fin de entender cómo el estrés osmótico puede provocar un efecto protector sobre la célula frente a un estrés oxidativo, o si las defensas antioxidantes pueden atenuar la sensibilidad a estrés osmótico, se seleccionaron siete genes para estudiar su expresión frente a estos estreses. Estos genes codifican proteínas previamente relacionadas con respuestas a estrés oxidativo y salino. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio transcripcional en *D. hansenii* sobre los genes seleccionados. La transcripción de todos los genes, tanto los relacionados con estrés oxidativo como los relacionados con estrés osmótico/salino, excepto *ENA1*, se vio regulada por las sales sodio o potasio y por peróxido de hidrógeno como factores inductores de estrés, y además, en general, el NaCl provocó los mayores cambios (Fig. 8-11). Aquellos genes que codifican proteínas directamente relacionadas con defensas antioxidantes en *D. hansenii* y/o en *S. cerevisiae* (*CTA1*, *TRX2* y *GSH1*) fueron inducidos por H₂O₂, como podría esperarse, pero también aumentaron su expresión en presencia de sal (Fig. 8-10). Incluso los transcritos de *GSH1* y *TRX2*, cuyos productos están normalmente relacionados con el control del estado redox intracelular, alcanzaron los niveles más altos después de la exposición a NaCl (Fig. 10). Los resultados de *CTA1* se contradicen con resultados previos que mostraban que la transcripción de este gen aumentó en presencia de etanol pero se inhibió cuando las células crecieron en sodio. Sin embargo, hay que mencionar que las condiciones de estos trabajos son muy diferentes, ya que el

trabajo de Segal-Kischinevzky C. se realizó una exposición crónica a estrés salino mientras que en el nuestro, las condiciones de estrés utilizadas han sido más suaves y durante menos tiempo para intentar evitar los efectos indirectos y analizar respuestas fisiológicas (Fig. 1) (Segal-Kischinevzky C. *et al.*, 2011).

Hay que mencionar que los cambios transcripcionales de los genes estudiados no siguieron siempre un patrón similar, lo cual sugiere diferentes tipos o niveles de regulación transcripcional. Por ejemplo, se observaron rápidas alteraciones en los transcritos de *CTA1* o *HOG1* después de las exposiciones, y desaparecieron no mucho tiempo después. Por el contrario, los transcritos de *MSN2* y *ENA1* alcanzaron los niveles más altos en presencia de sal en el último punto de tiempo analizado (30 min). Por otro lado, es interesante señalar que en el caso del gen *TRX2*, relacionado con respuestas oxidativas, observamos su máximo nivel de transcrito cuando se expuso a estrés salino (10 min), antes incluso que cuando la exposición fue a peróxido de hidrógeno (a los 30 min). Sin embargo, el caso del gen *GSH1* sí siguió el mismo patrón cuando la exposición fue a peróxido de hidrógeno y a NaCl, y prácticamente igual con KCl. Podemos afirmar que este es el primer trabajo sobre inducción transcripcional por exposición a estrés en la levadura *D. hansenii*, que sugiere que la regulación de esta ruta en *D. hansenii* es diferente de la que se ha descrito en *S. cerevisiae*. De hecho, los homólogos de varios de estos genes han sido investigados en *S. cerevisiae* y otras levaduras con resultados heterogéneos. En varios estudios previos, los cambios transcripcionales realizados en los genes estudiados fueron usualmente más altos que los descritos aquí, pero la comparación es difícil, ya que en la mayoría de estudios se usaron niveles de inductores de estrés que fueron bien crónicos o bien elevados (Posas F. *et al.*, 2000; Dormer UH. *et al.*, 2002; Brombacher K. *et al.*, 2006; Saijo T. *et al.*, 2010; Kavitha S. y Chandra TS., 2014), mientras que en este estudio nosotros hemos usado bajas concentraciones de estos inductores de estrés (ver Fig. 7). Aunque Msn2 ha sido previamente descrito como un regulador de estrés general relacionado con el estrés oxidativo en *S. cerevisiae* y otras levaduras, en *D. hansenii* la expresión de *MSN2* no aumentó por la exposición a peróxido de hidrógeno e incluso parece reprimirse a tiempos más prolongados de exposición (Fig. 4). En *S. cerevisiae*, los factores de transcripción Msn2/4 se encuentran en el citoplasma de células no estresadas, y migran al núcleo tras la exposición a estrés (Morano KA. *et*

al., 2012), implicando una regulación en cascada como es el caso de Hog1 (Saito H. y Posas F., 2012). Aunque es necesario más trabajo para profundizar en el tema y poder confirmar un mecanismo similar en *D. hansenii*, nuestros datos muestran que, al contrario que en *S. cerevisiae*, los genes *HOG1* y *MSN2* están claramente regulados a nivel transcripcional (Fig. 8-10). Finalmente, la expresión de *ENA1* está fuertemente inducida por NaCl y algo menos por KCl, pero no por H₂O₂ (Fig. 11). La inducción transcripcional de estos genes de respuesta a los cationes Na⁺ o Li⁺ ha sido antes descrita en otras levaduras y la regulación de este gen en *S. cerevisiae* parece seguir un patrón complejo relacionado con varias rutas diferentes: calcineurina, disponibilidad de nutrientes, Rim 101, etc (Ariño J. *et al.*, 2019).

Para avanzar en el estudio de estas posibles rutas de respuestas comunes a los diferentes tipos de estrés, oxidativo y osmótico/salino en *D. hansenii*, analizamos actividades enzimáticas relacionadas con la respuesta antioxidativa. En primer lugar hay que mencionar que los patrones de respuesta a nivel transcripcional y de actividad proteica en *CTA1*/CAT no fueron siempre coincidentes en el tiempo. Los aumentos de la actividad catalasa en los análisis de estrés fueron ligeramente inferiores a los detectados a nivel transcripcional. Además, la inducción de esta actividad en presencia de peróxido de hidrógeno o NaCl pudo ser observada hasta 60 minutos después de añadir el factor de estrés, mientras que su correspondiente ARNm recupera los niveles basales después de 20 y 10 minutos respectivamente. Estas diferencias pueden ser explicadas por el hecho de que las proteínas normalmente son más estables que los transcritos. En cuanto a la regulación de la transcripción de *CTA1*, los estudios previos de la actividad catalasa regulada por estrés no mostraron un patrón claro de inducción después de las exposiciones a estrés oxidativo y salino descritas en este trabajo, probablemente debido a las diferencias en las condiciones experimentales utilizadas (diferente cantidad de peróxido de hidrogeno, una exposición crónica a NaCl, etc.) (Mich,an C. *et al.*, 2013; Segal-Kischinevzky C. *et al.*, 2011). Hasta donde sabemos, no hay trabajos previos que estudien la actividad GR en *D. hansenii*.

La presencia combinada de H₂O₂ y NaCl en el medio de cultivo favorece la acumulación de sodio en *D. hansenii* (Fig. 16), aunque el nivel ARNm del transportador *Ena1* no fue inducido por las ROS. El hecho de que el peróxido de hidrógeno pueda influir en el nivel

de sodio de la célula y que el NaCl pueda influir en el nivel de ROS de la célula, sugiere la existencia de metabolitos intermediarios comunes en ambas respuestas de estrés. Además, se ha descrito previamente en *S. cerevisiae*, un aumento en las ROS intracelulares después de un estrés térmico no relacionado con el oxidativo (Zhang L. *et al.*, 2003). Por otra parte, cuando se expusieron las células de *D. hansenii* a una cantidad de H₂O₂ no inhibitoria del crecimiento, no se detectaron niveles elevados de ROS ni daño en los lípidos, pero el estado redox de las proteínas sí fue significativamente alterado. Esta aparente discrepancia podría estar relacionada con el hecho de que, aunque las proteínas y los lípidos son dianas primarias de estrés oxidativo, el grado de daño oxidativo a diferentes biomoléculas puede variar dependiendo del tipo de ROS, localización/concentración de dianas, o del nivel de las reacciones de reparación (Thorpe GW. *et al.*, 2013). Además, los niveles de ROS determinados mediante DCFA pueden estar sesgados en parte por el citocromo c, la existencia de peroxidasas o a los niveles de metales (Eruslanov E. y Kusmartsev S. 2010; Murphy MP. *et al.* 2012).

Por último, y para profundizar en la relación entre *D. hansenii* y el estrés salino, realizamos dos tipos de experimentos para comprobar el efecto del NaCl sobre la fragmentación vacuolar. Estos experimentos fueron una exposición aguda y otro de exposición crónica a NaCl. Los resultados demuestran un comportamiento diferente al de *S. cerevisiae* y sugieren, una vez más, que estas condiciones no son especialmente estresantes para *D. hansenii*, ya que, en general, podemos afirmar que no se observó fragmentación vacuolar inducida por la sal en *D. hansenii* como sí ocurre en *S. cerevisiae*.

Este estudio nos ayuda a entender las respuestas a estrés en *D. hansenii*. Nuestros resultados muestran claramente que esta levadura responde a la influencia de sal y de oxidantes con elementos reguladores comunes a nivel transcripcional, enzimático y metabolómico. Nuestros resultados también muestran que reguladores fundamentales de estrés como son Hog1 y Msn2, funcionan de manera diferente en *D. hansenii* y en la levadura modelo *S. cerevisiae*, lo que abre nuevas perspectivas en las rutas de regulación de respuesta a estrés en levaduras. Nuestra hipótesis es que los cambios fisiológicos que ocurren debido a la acumulación de sodio dentro de la célula pueden desencadenar la producción de un metabolito relacionado con ROS capaz de activar las defensas antioxidantes antes de que se produzca el daño oxidativo concreto. Adicionalmente, el

hecho de que no haya cambios en los niveles de transcritos de *ENA1* detectados por exposición a peróxido de hidrógeno sugiere que la respuesta a estrés salino puede ser regulada por más de una ruta, incluida la ruta propuesta anteriormente y al menos otra no conectada con la respuesta a estrés oxidativo.

CAPITULO II

Análisis del carácter halotolerante/halófilo de *Debaryomyces hansenii*

1 ESTUDIOS EN MATRACES.

D. hansenii es una levadura que vive habitualmente en ambientes salinos, aunque estudios previos polemizan sobre si debe ser calificada como halotolerante o halófila (González-Hernández JC. y Peña A. 2002; Cabrera-Orefice A. *et al.*, 2010). Esos estudios se han caracterizado por ser realizados en las condiciones de laboratorio habituales, en las que no se controlan los cambios de pH durante el crecimiento y la aireación se debe exclusivamente a la agitación del matraz. Además, en muchas ocasiones los experimentos se han realizado a 30°C, temperatura que resulta ser excesiva para un desarrollo óptimo de *D. hansenii* (Calahorra M. *et al.*, 2009; Sánchez NS. *et al.*, 2018). Por ello, en este segundo capítulo abordado por primera vez en este microorganismo un estudio del crecimiento detallado, determinando varios parámetros fisiológicos bajo condiciones controladas de pH, agitación, aireación y temperatura.

En un primer experimento y para conocer el comportamiento de la levadura en nuestras condiciones de trabajo, se realizó un estudio de crecimiento en presencia de sal en las condiciones habituales en las que se suelen realizar estos estudios: cultivos en matraces, con condiciones de temperatura y aireación controladas, pero sin ajustar pH, y con la aireación exclusivamente dependiente de agitación. En estas condiciones se observa que efectivamente hay un buen crecimiento en medio YNB a concentraciones relativamente altas (1 M) de sodio y de potasio, mientras que a las concentraciones más elevadas (2 M) produjeron una clara inhibición del crecimiento (Fig. 20).

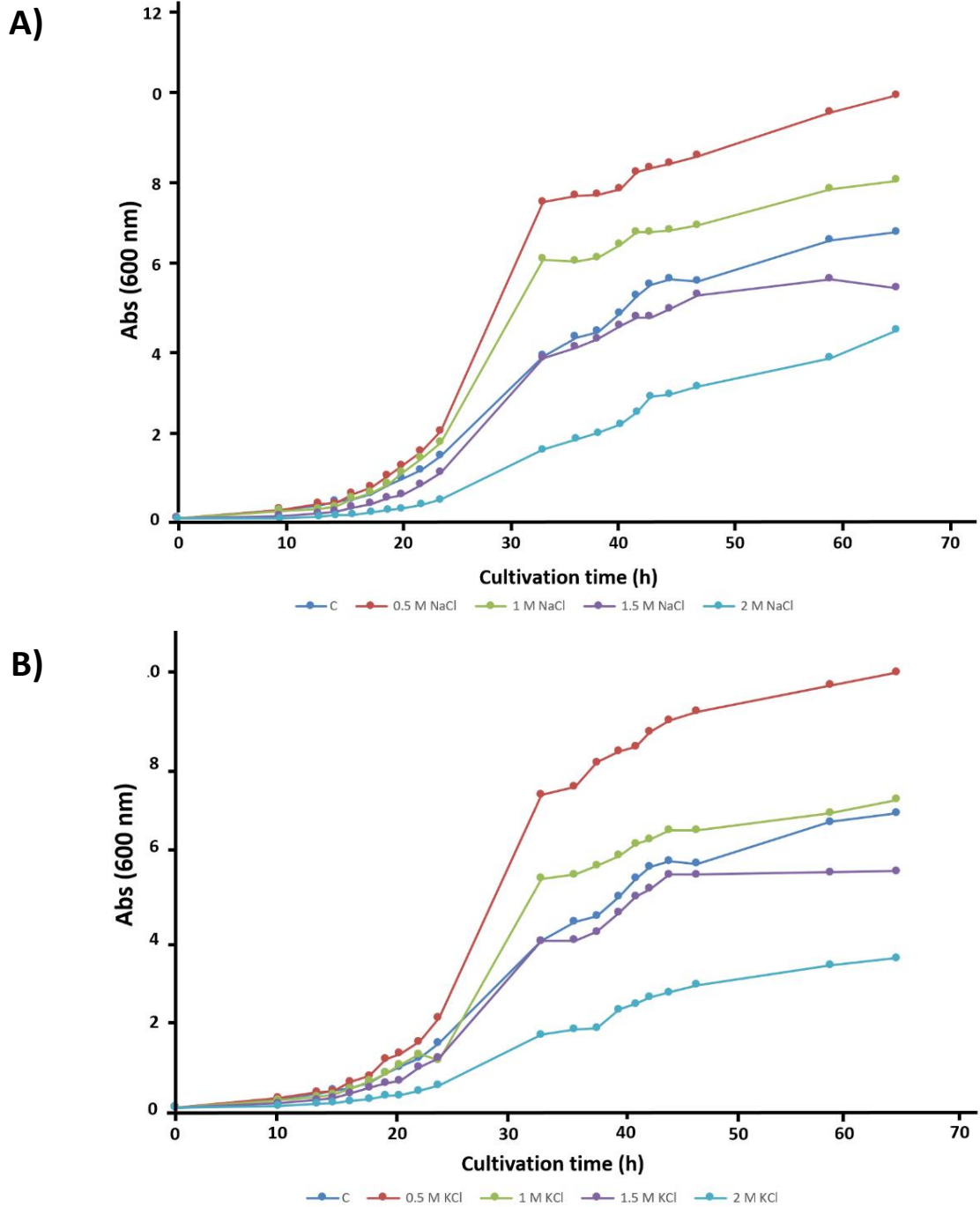


Figura 20. Curvas de crecimiento de las levaduras. Las células de *D. hanseni* crecieron en matraces con medio YNB, a 26°C y 180 r.p.m. en presencia de las cuatro concentraciones diferentes indicadas de A) NaCl ó B) KCl.

2 ESTUDIOS DE CRECIMIENTO EN BIORREACTORES, CULTIVO DISCONTINUO EN PRESENCIA DE SAL.

Seguidamente se estudió el efecto de sales sobre el crecimiento de *D. hansenii* en biorreactores y en condiciones controladas de pH y aireación. En estas condiciones observamos que tanto las medidas de densidad óptica como las medidas de CO₂ reflejaron un efecto positivo del NaCl y del KCl a 1 M sobre la velocidad de crecimiento respecto al control sin sales añadidas, siendo más efectivo el NaCl que el KCl (Fig. 21).

A partir de concentraciones de 1,25 M (NaCl o KCl) el crecimiento se vio progresivamente afectado, pero aún fue superior al que mostraron las células en el experimento control sin sales. Solo en condiciones de 2 M de sal pudimos observar un efecto claramente perjudicial en comparación con el control, ya que el valor de la producción del dióxido de carbono medido con 2 M (NaCl/KCl) en ningún momento llegó a acercarse al valor determinado cuando las concentraciones eran menores. Aproximadamente en el control se alcanzó una A₆₀₀ de 20 frente a 15 (2 M NaCl) y 10 (2 M KCl), respectivamente (Fig. 21).

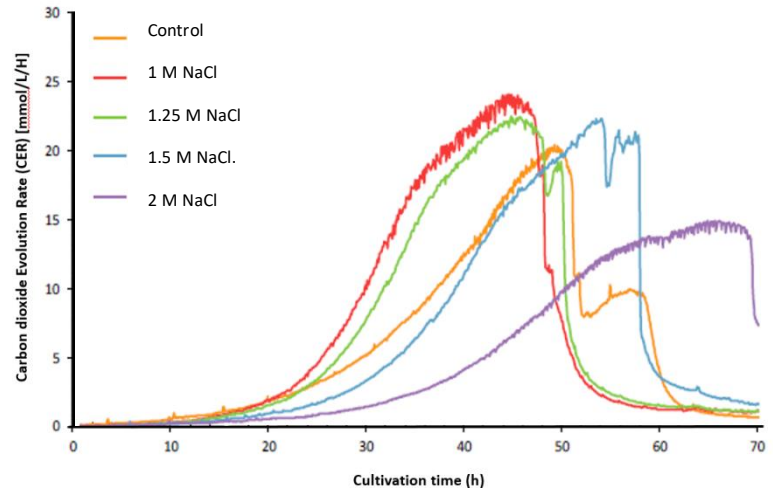
A)

Ratio de crecimiento máximo específico ($\mu_{\text{máx.}}$)

Conditions	$\mu_{\text{máx.}} - \text{OD}^1$	$\mu_{\text{máx.}} - \text{CO}_2^1$
Control	0.103±0.006	0.105±0.004
1 M NaCl	0.170±0.005	0.176±0.000
1.25 M NaCl	0.168±0.006	0.165±0.005
1.5 M NaCl	0.150±0.008	0.143±0.017
2 M NaCl	0.106±0.005	0.101±0.000

Nota: los datos son valores medios +/- intervalo de confianza de 95% de $n \geq 6$.

¹ El crecimiento máximo específico en glucosa se determinó por $A_{600\text{nm}}$ y producción de CO_2 .



B)

Ratio de crecimiento máximo específico ($\mu_{\text{máx.}}$)

Conditions	$\mu_{\text{máx.}} - \text{OD}^1$	$\mu_{\text{máx.}} - \text{CO}_2^1$
Control	0.103±0.006	0.105±0.004
1 M KCl	0.153±0.014	0.165±0.001
1.25 M KCl	0.131±0.002	0.162±0.004
1.5 M KCl	0.119±0.037	0.119±0.050
2 M KCl	0.086±0.009	0.092±0.003

Nota: los datos son valores medios +/- intervalo de confianza de 95% de $n \geq 6$.

¹ El crecimiento máximo específico en glucosa se determinó por $A_{600\text{nm}}$ y producción de CO_2 .

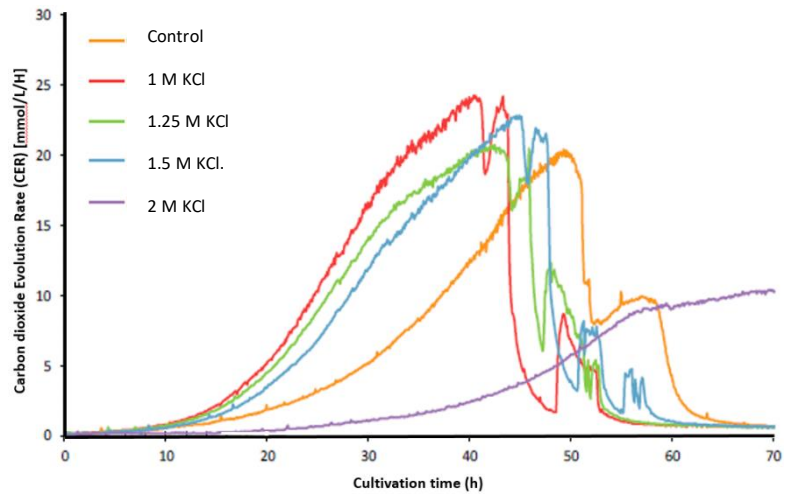


Figura 21. Ratio de crecimiento máximo específico y evolución del dióxido de carbono (CER) de cultivos discontinuos: Los ratios de crecimiento máximo específico se determinaron por $Abs_{600\text{nm}}$ y por datos de emisión de CO_2 de los cultivos en biorreactores de *D. hansenii* en medio sintético completo YNB a 28°C y pH 6 en presencia de **A)** NaCl ó **B)** KCl a las concentraciones indicadas. Los perfiles CER están basados en los datos de emisión de CO_2 a lo largo del tiempo. Los datos proceden de las medias de $n \geq 6$. En colaboración con C. Navarrete y A. Frost, UTD.

3 MEDIDAS DE BIOMASA FINAL EN CULTIVOS CON NaCl y KCl.

Cuando en condiciones controladas se emplearon en el biorreactor concentraciones altas de sal (>1 M), produjeron un efecto ralentizador del crecimiento. Sin embargo, la biomasa total (por U de glucosa) al final de la fase estacionaria no mostró diferencias importantes en el caso de las células crecidas en presencia de NaCl e incluso tendía a incrementarse en aquellas crecidas con KCl en comparación con el control (Tabla 4).

Tabla 4. Coeficientes de rendimiento y consumo específico de glucosa de los cultivos discontinuos. En colaboración con C. Navarrete y A. Frost, UTD.

Conditions	Y_{SC}^1	Y_{SX}^1	Y_{SE}^1	Y_{SG}^1	C-balance ²	SGCR (r_s) ³
Control	0.63±0.01	0.35±0.00	ns ⁴	ns	0.98±0.01	0.120±0.004
1 M NaCl	0.63±0.07	0.35±0.04	ns	ns	0.98±0.11	0.163±0.012
1.25 M NaCl	0.60±0.02	0.34±0.01	ns	ns	0.94±0.04	0.159±0.002
1.5 M NaCl	0.63±0.10	0.35±0.06	ns	ns	0.98±0.16	0.133±0.014
2 M NaCl	0.63±0.00	0.36±0.00	ns	ns	0.99±0.00	0.098±0.014
1 M KCl	0.68±0.05	0.38±0.03	ns	ns	1.05±0.08	0.159±0.012
1.25 M KCl	0.63±0.05	0.35±0.03	ns	ns	0.98±0.08	0.148±0.004
1.5 M KCl	0.68±0.04	0.38±0.02	ns	ns	1.06±0.06	0.144±0.000
2 M KCl	0.66±0.14	0.37±0.08	ns	ns	1.02±0.21	0.138±0.001

Se muestran en la tabla los coeficientes de rendimiento y el ratio específico de consumo de glucosa durante la fase exponencial de los cultivos en discontinuo de *D. hansenii*. Las células crecieron en medio sintético completo YNB a 28°C y pH 6 en presencia o no de diferentes concentraciones de NaCl /KCl como se indica. Los datos proceden de las medias de $n \geq 6$, +/- un intervalo del 95% de confianza.

¹ Rendimiento (Y) del CO₂ (C), Biomasa (X), Etanol (E), y Glicerol (G) a partir de Glucosa (G) en cmol/cmol.

² Balance del carbono en una base c-mol, donde el valor 1 indica un balance de carbono.

³ Ratio de consumo específico de glucosa en cmol/cmol/h.

Además, la velocidad específica del consumo de glucosa se incrementó en presencia de sal (Tabla 4). Sin embargo, este efecto también se vio afectado por la concentración ya que comenzó a revertir a concentraciones de sales > 1 M, aunque fue superior que en el control en todas las condiciones ensayadas excepto a 2 M de NaCl. A esta concentración de NaCl, nuestros resultados indican una menor velocidad de consumo, y una mayor duración de la fase de latencia. Los valores más altos de consumo específico de glucosa fueron medidos a concentraciones de 1 M de NaCl, lo que, unido al dato de velocidad de crecimiento en estas condiciones, refuerza la idea de que el NaCl ejerce un mejor efecto sobre la fisiología de *D. hansenii* que el KCl (Tabla 4).

Resultados

Para complementar nuestra visión sobre el efecto de las sales en *D. hansenii*, se estudió su crecimiento en condiciones limitantes de glucosa (0,2 %) tanto en ausencia como en presencia de sales. En estas condiciones, las células creciendo en 1 M de KCl se adaptaron mejor a la limitación nutricional puesto que se midieron valores más altos de absorbancia a lo largo del estudio. En la figura 22 se observa como a partir de 30 horas de incubación el crecimiento en 1 M de KCl se incrementó por encima de lo que lo hizo en las demás condiciones. Sin embargo al final del experimento la mayor cantidad de biomasa correspondía con las condiciones de 2 M de NaCl, de manera que, en estas condiciones, observamos un aumento de biomasa de casi 3 veces respecto al control (Fig. 22).

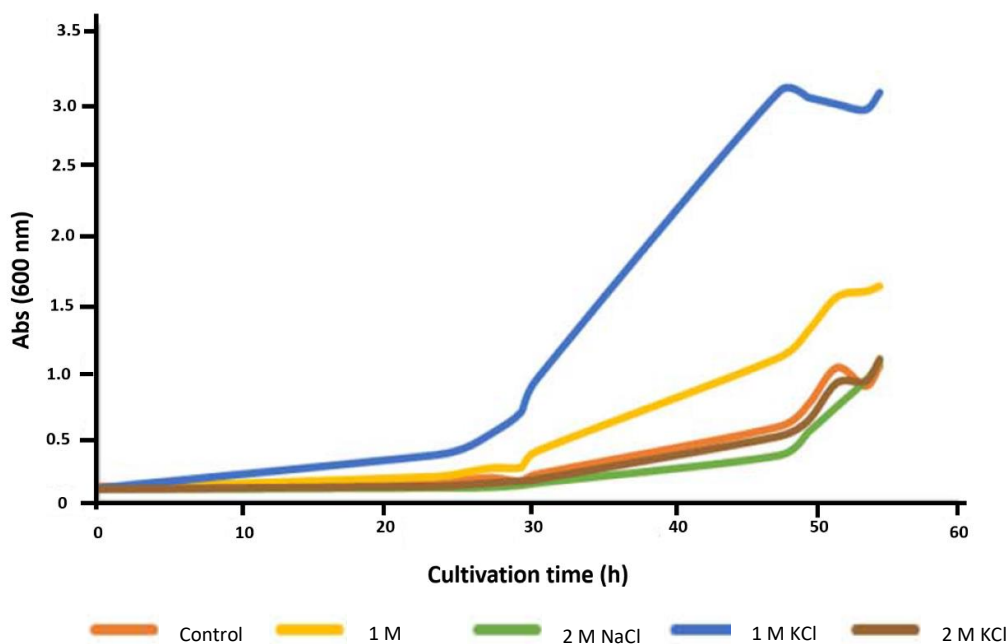


Figura 22. Crecimiento en condiciones limitantes de glucosa. Las células de *D. hansenii* fueron inoculadas en medio sintético YNB, pH 6, 28°C con o sin NaCl/KCl (como se indica en la figura), 150 r.p.m. Las células crecieron en matraces y se controló su absorbancia durante 191 horas. Los datos proceden de las medias de $n \geq 6$. Los datos finales se tomaron para comprobar por HPLC que la glucosa se había consumido completamente. En colaboración con C. Navarrete y A. Frost, UTD.

En definitiva, el potasio parece tener un efecto más positivo sobre la velocidad de crecimiento en concentraciones limitantes de glucosa, pero el sodio estimula más el crecimiento a más largo plazo (Tabla 5). Estos datos apoyan el carácter halófilico y no

solo halotolerante de *D. hansenii* como recientemente se ha publicado (Sánchez NS. *et al.*, 2018).

Tabla 5. Crecimiento de *D. hansenii* en condiciones limitantes de glucosa. En colaboración con C. Navarrete y A. Frost, UTD.

Time (h)	0	23.5	25.5	27.5	29.5	30.5	47.5	49.5	51.5	53.5	54.5	191.5
Control	0.11±0.01	0.13±0.01	0.16±0.00	0.18±0.02	0.15±0.01	0.20±0.03	0.55±0.35	0.71±0.48	0.98±0.52	0.85±0.67	0.99±0.68	1.13±0.52
1 M NaCl	0.10±0.00	0.18±0.00	0.21±0.01	0.25±0.01	0.25±0.01	0.37±0.05	1.06±0.62	1.26±0.66	1.51±0.67	1.55±0.83	1.59±0.59	2.36±0.34
2 M NaCl	0.09±0.00	0.10±0.00	0.10±0.00	0.11±0.01	0.12±0.00	0.14±0.01	0.34±0.17	0.51±0.24	0.70±0.45	0.89±0.52	1.03±0.47	3.10±0.06
1 M KCl	0.10±0.00	0.34±0.11	0.39±0.16	0.51±0.19	0.66±0.23	0.89±0.16	3.01±0.30	2.97±0.16	2.92±0.12	2.88±0.09	3.00±0.13	2.84±0.20
2 M KCl	0.09±0.00	0.11±0.01	0.12±0.00	0.14±0.01	0.15±0.00	0.16±0.00	0.48±0.06	0.60±0.15	0.88±0.46	0.89±0.36	1.05±0.48	2.73±0.30

La tabla muestra la absorbancia a 600 nm en células de *Dhansenii*. Las células fueron inoculadas en medio sintético YNB con 0,2 % glucosa, pH 6, 28°C con o sin NaCl/KCl, 150 r.p.m. Las células crecieron en matraces y se controló su absorbancia durante 191 horas. Los datos proceden de las medias de n≥6. El crecimiento se controló durante 191 horas.

4 DETERMINACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO Y COCIENTE RESPIRATORIO.

La determinación de niveles de oxígeno disuelto durante el cultivo de *D. hansenii* en biorreactores mostró que estos disminuían de manera más rápida cuando el NaCl o el KCl estaban presentes en el medio, alcanzando niveles mínimos a las concentraciones más altas de sales (Fig. 23). Esta mayor demanda de oxígeno sugiere una actividad metabólica más alta en *D. hansenii* a altas las concentraciones de sal, lo cual lleva de nuevo a afirmar un carácter halófilo de esta levadura. Además, confirma un metabolismo totalmente respiratorio independientemente de la presencia o ausencia de sal en el medio, lo que se corresponde con la ausencia de etanol. La presencia de etanol se comprobó siguiendo dos tecnologías diferentes, MS y HPLC (Tabla 4).

El cociente respiratorio se calcula midiendo el CO₂ producido respecto al oxígeno consumido y nos indica el metabolismo aeróbico o anaeróbico de un organismo de manera que valores por encima de 1 se corresponden con un metabolismo fermentativo (anaeróbico). En nuestro caso, este cociente fue calculado a lo largo del periodo de cultivo en biorreactores, y correspondía a un valor de 1 durante la fase de crecimiento exponencial y nunca por encima, lo cual indica un metabolismo plenamente aerobio (Fig. 24).

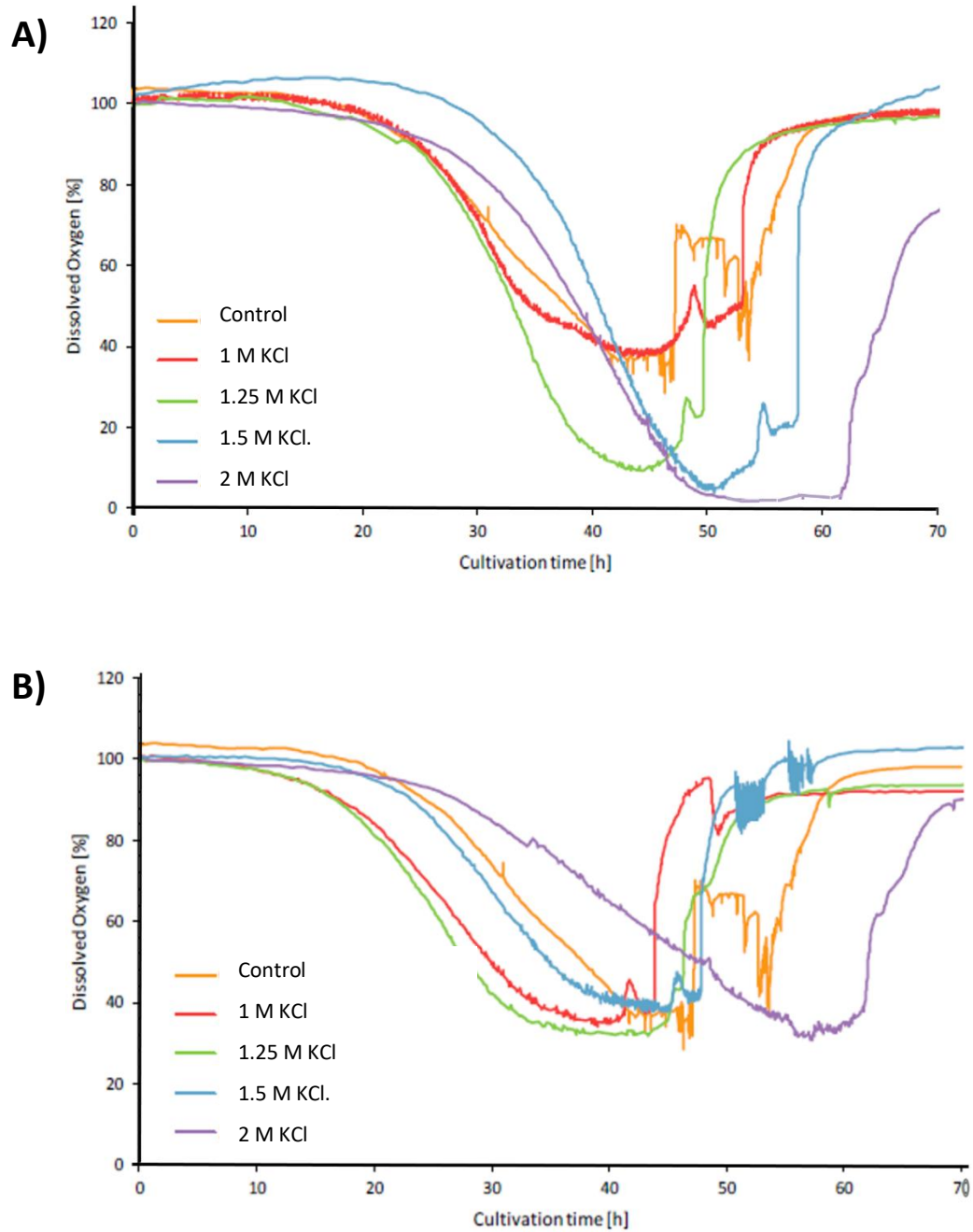


Figura 23. Perfil de oxígeno disuelto (DO) de cultivos discontinuos. Los niveles de oxígeno disuelto (%) se midieron durante 70 horas en YNB a 28°C y pH 6 en presencia de **A)** NaCl o **B)** KCl en las concentraciones indicadas. Los datos proceden de las medias de $n \geq 6$. En colaboración con C. Navarrete y A. Frost, UTD.

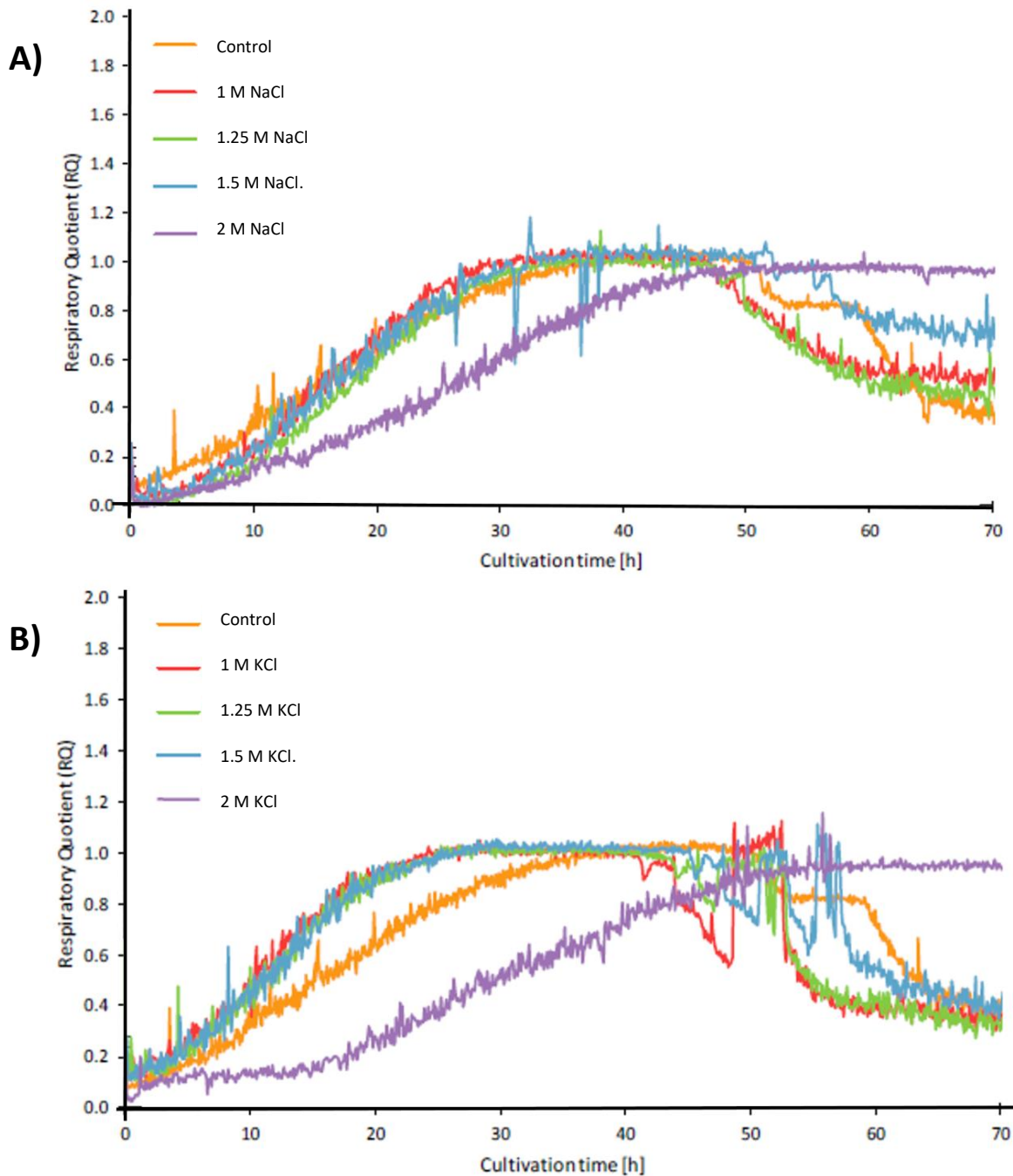
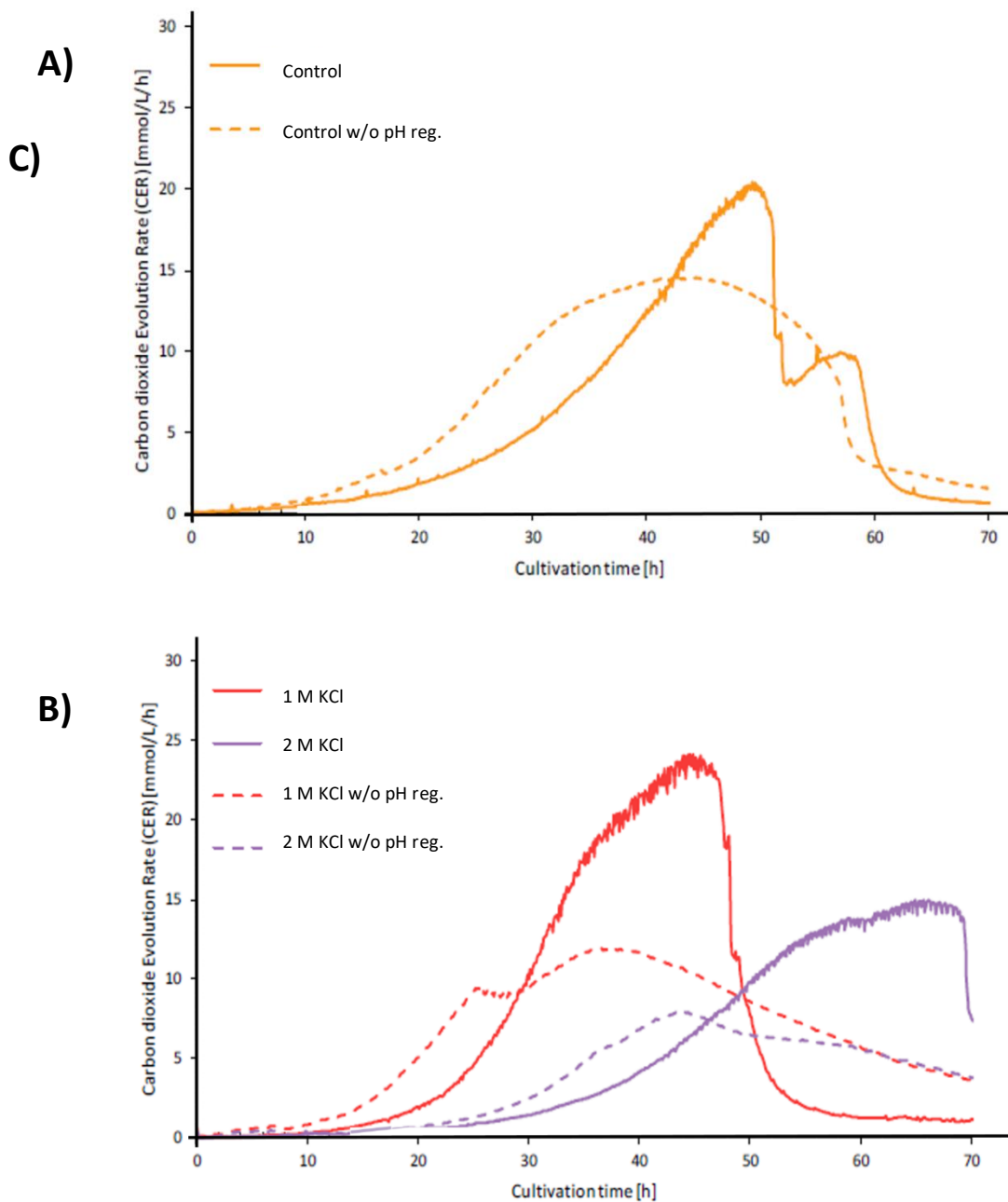


Figura 24. Perfiles del cociente respiratorio (RQ) de los cultivos en biorreactores. El RQ se midió a lo largo del tiempo en medio YNB a 28°C y pH 6 con **A)** NaCl ó **B)** KCl a las concentraciones indicadas. El perfil del RQ está basado en el CER calculado a partir de los datos de consumo de O₂ y producción de CO₂. Los datos proceden de las medias de $n \geq 6$. En colaboración con C. Navarrete y A. Frost, UTD.

5 ENSAYOS EN BIORREACTORES EN CONDICIONES NO CONTROLADAS DE pH.

Para estudiar la posible influencia de la regulación del pH del medio sobre el comportamiento halotolerante o halófilo en *D. hansenii*, se realizaron en paralelo otros cultivos en biorreactores en presencia no limitante de glucosa, pero sin regulación de pH. En esta ocasión se utilizaron solo dos concentraciones de sal, 1 M y 2 M, tanto de NaCl como de KCl. Los resultados mostraron que cuando no se controló el pH, el perfil de CO₂ mostraba una fase de meseta que no ocurría cuando el pH era controlado (Fig. 25). Esto sucedía tanto en presencia de sal como en su ausencia.



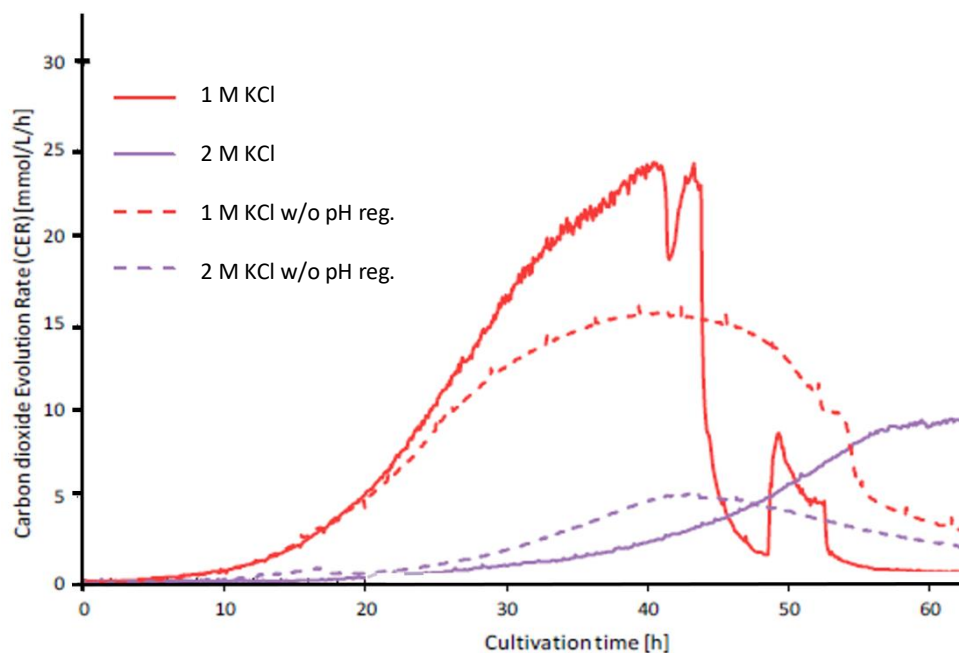


Figura 25. Perfiles del ratio de evolución del CO₂ (CER) con y sin regulación de pH de los cultivos en biorreactores en presencia de diferentes concentraciones de sal. El perfil del CER está basado en los datos de emisión de CO₂ a lo largo del tiempo. Las células crecieron en YNB a 28°C con y sin regulación de pH (pH 6) en: **A)** ausencia de sal, **B)** presencia de NaCl, o **C)** presencia de KCl. Los datos proceden de las medias de n≥6. En colaboración con C. Navarrete y A. Frost, UTD.

En estas condiciones, la velocidad de crecimiento se determinó por cambios en la medición de absorbancia (A_{600nm}) y en la producción de CO₂. Los resultados, de nuevo, demostraron que concentraciones de 1 M de NaCl o de KCl mejoraron el crecimiento, y que, en estas condiciones, el sodio fue más efectivo que el potasio. Por otra parte, a concentraciones de 2 M de cualquiera de ambas sales se produjo un efecto inhibitor en el crecimiento ya que la $\mu_{m\acute{a}x}$ medida fue menor que la del control (Tabla 6). Estos resultados obtenidos en condiciones no controladas de pH difieren de los obtenidos en condiciones controladas, e ilustran la dificultad de alcanzar conclusiones sobre la fisiología de *D. hansenii* comparando estudios no homogéneos.

Tabla 6. Ratio de crecimiento máximo específico ($\mu_{\text{máx}}$) de los cultivos en biorreactores sin regulación de pH. En colaboración con C. Navarrete y A. Frost, UTD.

Conditions	$\mu_{\text{max}} - \text{OD}^1$	$\mu_{\text{max}} - \text{CO}_2^1$
Control	0.143±0.006	0.140±0.000
1 M NaCl	0.172±0.000	0.175±0.005
2 M NaCl	0.093±0.008	0.100±0.019
1 M KCl	0.167±0.003	0.164±0.000
2 M KCl	0.108±0.001	0.097±0.006

La $\mu_{\text{máx}}$ se determinó mediante $A_{600 \text{ nm}}$ y los datos de emisión de CO_2 de los cultivos en biorreactores de *D. hansenii* en YNB a 28°C, con un pH inicial de 6 y diferentes concentraciones de NaCl/KCl indicadas. Los datos proceden de las medias de $n \geq 6$, +/- intervalo de confianza del 95 % de un número de réplicas.

¹El ratio de crecimiento máximo específico (h^{-1}) en glucosa se determinó por $A_{600 \text{ nm}}$ y por CO_2 producido.

DISCUSIÓN 2: ANÁLISIS DEL CARÁCTER HALOTOLERANTE/HALÓFILO DE *Debaryomyces hansenii*.

Los resultados obtenidos durante este estudio indican que una actividad metabólica óptima de *D. hansenii* requiere concentraciones altas de sal en el medio. Nuestros resultados parecen confirmar definitivamente el carácter halófilo de esta levadura, en contraste con algunas afirmaciones anteriores defendiendo un efecto perjudicial del sodio. Otro hecho de interés es que el NaCl ejerce generalmente un mayor efecto positivo que el KCl ya que, por ejemplo, las velocidades de crecimiento óptimas se alcanzan en presencia de 1 M de NaCl seguido de 1 M de KCl. Existe, sin embargo, una fase de latencia más prolongada cuando las levaduras crecen en presencia de 2 M de NaCl, lo que ha podido llevar a conclusiones erróneas en trabajos previos realizados en condiciones no controladas sobre una posible inhibición del crecimiento a estas concentraciones tan elevadas (Capusoni C. *et al.*, 2019). Nuestros datos muestran que en condiciones controladas no existe tal inhibición y que, además, en estas condiciones, se alcanza una mayor biomasa en presencia de glucosa al 2 %. Además, este efecto es mucho más visible en condiciones limitantes de glucosa (0,2 %). Todo este comportamiento puede estar relacionado con la estrategia adaptativa de *D. hansenii* hacia diversas condiciones ambientales y nutricionales permitiéndole proliferar más eficientemente que otros organismos en presencia de sales (Butinar *et al.* 2011). En presencia de altas concentraciones de sal, los niveles de oxígeno disuelto en el medio disminuyeron más rápidamente, lo que indica una mayor actividad metabólica, es decir, una velocidad de respiración más alta. Este hecho, apunta de nuevo al carácter halófilo de *Debaryomyces*. Además, tanto en presencia como ausencia de sal demostramos un metabolismo completamente respiratorio, ya que los valores del cociente respiratorio nunca fueron superiores a 1.

Los perfiles de producción de CO₂ obtenidos en experimentos realizados en biorreactores sin control de pH indican una restricción nutricional importante que se evidencia por una larga fase de meseta y que indica que experimentos de este tipo no son los más adecuados para obtener conclusiones fisiológicas y determinar parámetros metabólicos. También hay que señalar que el sodio y el potasio no ejercen los mismos efectos como ya ha sido sugerido previamente por Martínez JL. *et al.*, 2011; Martínez *et*

Discusión

al., 2012, lo que debería considerarse cuando se usa NaCl o KCl en los múltiples estudios de halotolerancia.

En su conjunto, los resultados presentados en este capítulo demuestran el efecto beneficioso de las sales, y en particular del sodio en *Debaryomyces* e indican la necesidad de futuras investigaciones sobre como el sodio y el potasio influyen en el metabolismo celular a nivel molecular. Este trabajo deja claro que la sal no es sólo tolerada en *D. hansenii* sino que juega un papel fundamental en su estrategia de supervivencia y que es necesaria para una actividad celular óptima.

CAPITULO III

Función de *Debaryomyces hansenii* en la maduración de lomos ibéricos de la zona del Valle de los Pedroches

Para la realización de este tercer capítulo de la tesis se ha colaborado con la empresa Navalpedroche, la cual ha puesto a nuestra disposición sus productos con los que hemos realizado diferentes estudios. Los embutidos ibéricos del Valle de los Pedroches con denominación de origen de la zona son conocidos por su calidad, sin embargo, nunca se han estudiado las comunidades microbianas que afectan la fermentación de estos productos, y que influyen finalmente en sus características organolépticas. En este capítulo, a partir de una pequeña colección de levaduras previamente obtenida por el grupo donde se ha realizado este trabajo y procedente de distintos productos de la zona (lomo, chorizo y salchichón), se han realizado experimentos que han permitido identificar y caracterizar las levaduras aisladas. Además, se ha evaluado el potencial como cultivo iniciador de una de estas cepas estudiando los cambios fisicoquímicos que induce en el lomo.

1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE LAS LEVADURAS.

La identificación bioquímica previa de las levaduras aisladas de los embutidos indicaba que la inmensa mayoría pertenecían a la especie *D. hansenii* aunque esos resultados no fueron siempre plenamente concluyentes, y por este motivo se decidió realizar un análisis molecular de estas levaduras. *D. hansenii* cuenta con una región común exclusiva, una familia de genes que no ha sido encontrada en ningún otro organismo mediante estudios "in silico" (Prista C. *et al.*, 2016, Ramos *et al.* no publicados). Para confirmar que las levaduras aisladas pertenecían a esta especie se aisló ADN genómico y se amplificó esta región común mediante PCR utilizando cebadores específicos. Se estudiaron todas las cepas aisladas de los embutidos y se incluyó un control negativo (*S. cerevisiae* BY4741) y uno positivo (*D. hansenii* CBS767). Todas las cepas previamente identificadas bioquímicamente en el seno de nuestro grupo como *D. hansenii* contenían la región específica de genes por lo que pudieron ser identificadas molecularmente como tal. Incluso dos cepas cuya identificación no fue positiva en las pruebas bioquímicas sí fueron identificadas como *D. hansenii* en la molecular (Fig. 26).

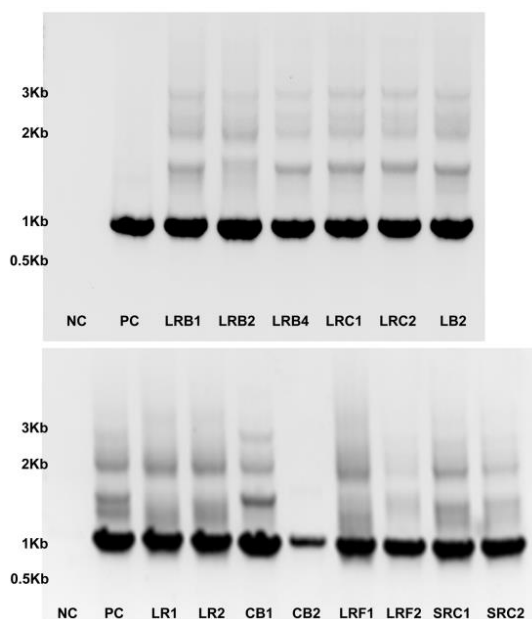


Figura 26. Amplificaciones de familia de genes específica de las cepas de *D. hansenii* aisladas de embutidos. El ADNg se extrajo de las levaduras aisladas y se amplificaron los genes específicos. La figura muestra las bandas de amplificación de PCR separadas en un gel de agarosa al 2 %. NC es el control negativo (*S. cerevisiae*) y PC el control positivo (*D. hansenii*).

El comportamiento de tolerancia a estrés salino, a pH y a temperatura de todas estas cepas también había sido estudiado previamente en el laboratorio donde se ha realizado esta tesis y los resultados demostraron una alta variabilidad siendo unas más tolerantes y otras más sensibles que la cepa control de laboratorio (Ramos J. *et al.*, 2017).

A partir de estos datos seleccionamos las cepas que mostraron un crecimiento más eficiente en las diversas condiciones mencionadas y realizamos un análisis metabólico más completo. Debido a que los microorganismos pueden alterar el sabor de los embutidos degradando sus aminoácidos y sus lípidos (Prista C. *et al.*, 2016) se decidió estudiar su actividad lipasa (Fig. 27). Para ello las levaduras crecieron en un medio de agar-tributirina y se determinaron los halos de lisis alrededor de las colonias. Todas las cepas estudiadas mostraron un halo mayor al que presentaba la cepa control *D. hansenii* CBS767 (Fig. 27A), lo cual indicó que las cepas aisladas de los embutidos poseían una actividad lipolítica mayor que la cepa control de laboratorio. Por otra parte, no se

Resultados

observaron diferencias apreciables entre las distintas cepas aisladas del embutido. La figura 27B es un ejemplo del halo formado por una de estas cepas en comparación con la cepa control.

Strain	Halo size
<i>D. hansenii</i> 767	+
LR1	++
LR2	++
LRF1	++
LRF2	++
CB2	++

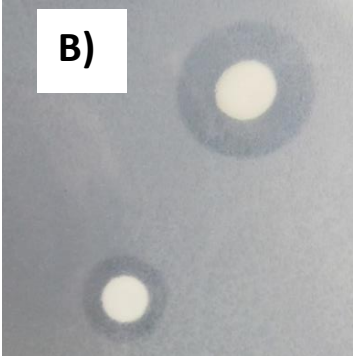


Figura 27. Actividades enzimáticas de las cepas aisladas de embutidos ibéricos del Valle de los Pedroches. Las actividades se determinaron mediante crecimiento en agar-tributirina. **A)** Diferencias entre el tamaño del halo formado por *D. hansenii* 767 (control de laboratorio) (+) y algunas de las cepas aisladas (++). **B)** Ejemplo de tamaño en la cepa control de laboratorio (inferior) y la cepa LR1 (superior). Los detalles del experimento se describen en Material y Métodos.

El siguiente experimento realizado fue una prueba de identificación microbiológica semicuantitativa Api ZYM (bioMérieux), en el que la intensidad de la coloración desarrollada nos indica la actividad de enzimas lipolíticas y proteolíticas en las cepas seleccionadas (Fig. 28). Prácticamente todas las cepas aisladas del embutido analizadas presentaron diferencias respecto a la cepa de laboratorio. La cepa LRF2 presentó el mayor potencial relacionado con el catabolismo de grasas y proteínas, además de una elevada actividad fosfatasa ácida. Además, por ejemplo, las cepas LR1, LR2 y LRF1 mostraron una buena capacidad enzimática (Fig. 28).

A partir de todos estos resultados más los previamente obtenidos en el grupo sobre tolerancias a pH, temperatura y sal, se seleccionó la cepa LR1 como posible cultivo iniciador. LR1 podía ser un buen cultivo iniciador debido a su comportamiento y su buena actividad metabólica y de tolerancia a estrés.

A)

strain	Fats			Aminoacids/Proteins				Phosphatases		
	Esterase (C4)	Esterase lipase	Lipase (C14)	Leu arylamidase	Val or Cys	Trypsin	α -Chemo-trypsin	Alkaline phosphatase	Acid phosphatase	Naphthol-AS-BI-Hydrolase
<i>D. hansenii</i> 767	-	-/+	-	-	-	-	-	-/+	+	+
LR1	-	+	-	+	-	-/+	-	-	+	+
LR2	-/+	-/+	-	+	-	-/+	-	-	+	++
LRF1	+	+	-	+	-/+	-	-/+	-	+	++
LRF2	++	++	+	+	-/+	+	-/+	-/+	++	+++
CB2	-/+	+	-	+	-	-/+	-	-	+	+

B)

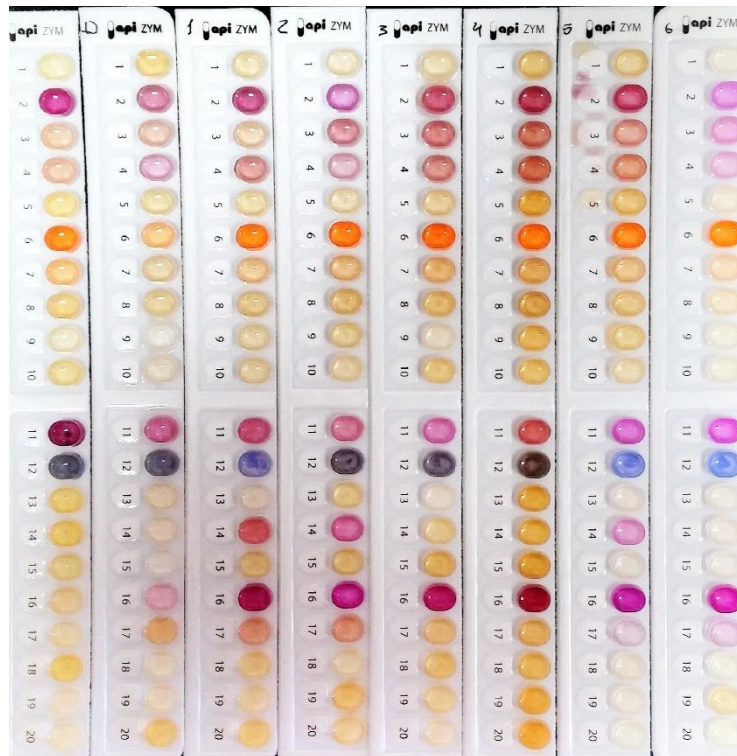


Figura 28. Actividades enzimáticas de las cepas aisladas de lomos ibéricos del Valle de los Pedroches. Las actividades se determinaron mediante API ZYM test. **A)** Tabla resumen de los resultados. Escala creciente de actividad, desde falta de actividad (-) hasta muy buena actividad (+++). **B)** Ejemplo de algunas puebas semicuantitativas API. Las columnas 1 y 2 corresponden a controles de *S. cerevisiae* y *D. hansenii* respectivamente. Las columnas 3-8 corresponden a muestras de algunas cepas aisladas.

2 IMPLANTACIÓN DE LA LEVADURA INOCULADA EN EL LOMO.

La levadura fue capaz de implantarse, colonizar y proliferar en la superficie del lomo, independientemente de que esta fuese inoculada en la piel (tratamiento C) o en la carne (tratamiento M) y de la dosis (0,52 g en los tratamientos M1 y C1, ó 1,04 g en los tratamientos M2 y C2, por pieza de lomo). Se eligieron estas cantidades porque a grosso modo permiten trabajar con una unidad de microorganismo por cada mil de producto

Resultados

cárnico, aproximadamente en una relación de 1 mg de levadura por cada gramo de carne. Después del periodo de maduración, una capa de levadura cubría toda la superficie de los lomos inoculados, lo cual no se observó en la muestra control, en la cual solo aparecían algunas manchas blancas en su superficie, procedentes de alguna levadura del ambiente que había sido capaz de crecer en los controles. No se observaron diferencias visuales en los distintos tratamientos (M1, M2, C1 y C2). Sin embargo, si pudimos apreciarlas entre el aspecto del lomo control y del inoculado al final del periodo de maduración de 90 días. La levadura ocupó una mayor superficie en el caso de los lomos inoculados (Fig. 29).



Figura 29. Ejemplo del aspecto del lomo control (izquierda) y del inoculado M2 (derecha) al final del proceso de maduración. No se observaron diferencias en el aspecto entre las muestras que habían sido inoculadas en diferentes condiciones con la levadura seleccionada.

La figura 30 muestra un ejemplo de la evolución del crecimiento de la levadura en la superficie lomo inoculado a lo largo del periodo de maduración.



Figura 30. Ejemplo de la evolución del aspecto del lomo inoculado. En las imágenes se distinguen tres momentos diferentes del periodo de maduración. A tiempo 0, a los 17 días y a los 38 días.

Posteriormente al proceso de maduración, cuatro muestras se tomaron al azar de la superficie de los lomos inoculados con LR1, que fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas y moleculares como LR1 mediante electroforesis de ADN mitocondrial, una técnica habitualmente utilizada para diferenciar cepas (Querol A. *et al.*, 1992). Esta técnica permitió diferenciar claramente las cepas control y LR1 mediante el perfil de bandas de ADN mitocondrial digerido con la enzima HaeIII (Fig. 31). Este mismo análisis se realizó antes y después de la inoculación de los embutidos, y se obtuvieron los mismos resultados, lo cual confirmó la implantación de la levadura LR1.

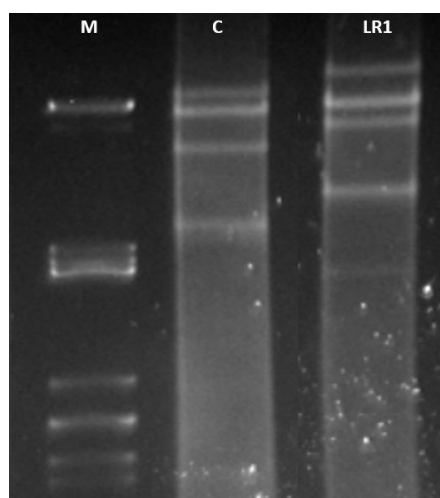


Figura 31. Digestión de ADN mitocondrial de la cepa control de *D. hansenii* y de la cepa LR1. M: Marcador molecular; C: *D. hansenii* control de laboratorio; LR1: Cepa aislada de los embutidos.

3 EFECTO DE LA LEVADURA SOBRE DIVERSAS CARACTERÍSTICAS DEL LOMO IBÉRICO.

Es conocido que los microorganismos en general y *D. hansenii* en particular afectan a múltiples parámetros físicos y químicos que pueden influir en las características finales de los embutidos (Cano-García L. *et al.*, 2014a; Cano-García L. *et al.*, 2014b; Corral S. *et al.*, 2017; Corral S. *et al.*, 2018). En nuestro caso se decidió realizar un estudio de factores

Resultados

como pH, actividad de agua, contenido en sodio, perfil lipídico, compuestos volátiles y aromáticos después del periodo de maduración de los lomos.

3.1 Determinación de pH, actividad de agua y contenido en sodio.

El pH, la actividad de agua (cantidad de agua disponible/aprovechable para un ser vivo) y el contenido en sodio, determinados después del periodo de 90 días de maduración fueron afectados claramente por la inoculación de los lomos con la levadura *D. hansenii* LR1 (Tabla 7).

Se observó una actividad de agua significativamente más alta en las cuatro muestras inoculadas con los diferentes tratamientos que en el control (Fig. 32A). Además, la actividad de agua final resultó ser dependiente de la cantidad de levadura inoculada, siendo más alta en los tratamientos que fueron inoculados con el doble de cantidad de levadura, M2 y C2.

La inoculación con levadura también produjo una menor disminución del pH en todas las condiciones. En el caso de la inoculación con una menor dosis de levadura (M1 y C1), los cambios de pH resultaron ser independientes del lugar de inoculación (carne o piel). Sin embargo, cuando se utilizó la dosis más alta de levadura (M2 y C2) sí se observó un efecto diferente y el pH final fue significativamente más alto cuando se inoculó en carne (Fig. 32B).

Curiosamente, la inoculación con levadura produjo una disminución significativa en el contenido de sodio del embutido, lo cual era especialmente notable en el caso del tratamiento C2 (Fig. 32C).

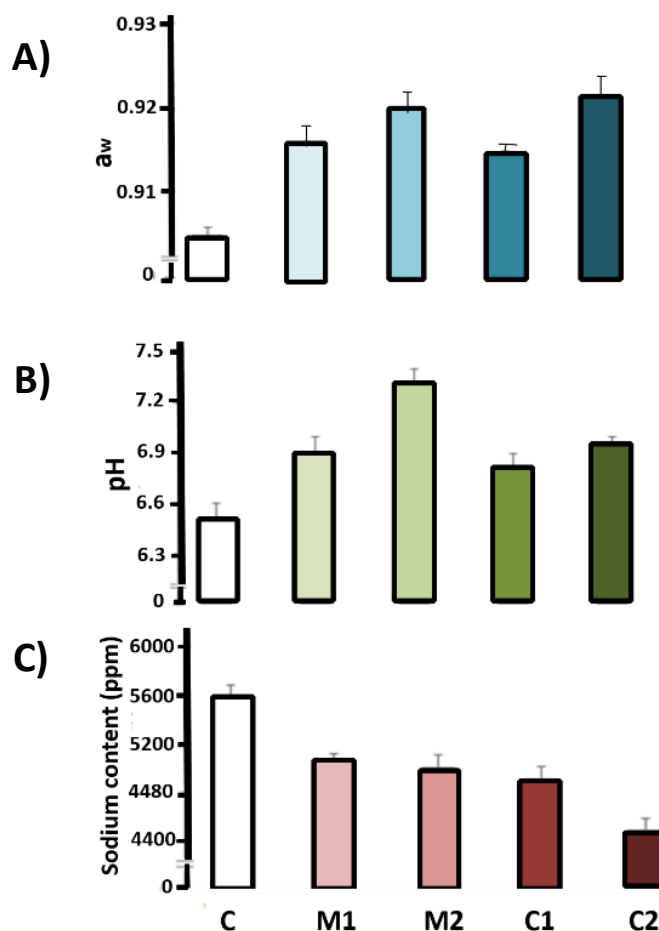


Figura 32. Efecto de la levadura LR1 en las muestras de lomo ibérico sobre: A) Actividad de agua (más altas en todos los tratamientos que en el control), B) pH final (más alto en todos los tratamientos que en el control) y C) Contenido en sodio (más bajo en todos los tratamientos que en el control). Se muestra el control sin inocular y los inoculados específicamente con levadura. (En colaboración con C. Bravo).

Tabla 7. Cambios en el pH, Aw, y contenido en sodio al final del periodo de maduración en lomos inoculados con LR1. En colaboración con C. Bravo.

	Control	Dose 1		Dose 2		SEM	P_Y	P_D	P_A	P_{DxA}
		M1	C1	M2	C2					
pH	6.492	6.900	6.867	7.308	6.900	0.268	***	***	***	***
A_w	0.905	0.914	0.915	0.920	0.919	0.005	***	***	***	***
Sodium (ppm)	5589.330	5064.750	4894.080	5033.920	4487.080	365.181	***	***	***	***

Control: No inoculado específicamente con levadura.

M1, C1, M2 y C2: Diferentes tratamientos usados en este estudio (ver Materiales y métodos).

P_Y : valor de probabilidad de efecto de la levadura.

P_D : valor de probabilidad de efecto de la dosis.

P_A : valor de probabilidad de efecto del lugar de aplicación.

P_{DxA} : valor de probabilidad de efecto de la dosis y el lugar.

ns = no-significativo $P > 0,05$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

3.2 Perfil lipídico.

Los detalles del perfil de ácidos grasos totales en lomos al final del proceso de maduración, y bajo las condiciones usadas en este trabajo se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos totales (%) en lomos inoculados específicamente con la cepa de *D. hansenii* LR1 al final del proceso de maduración. En colaboración con C. Bravo.

Fatty acid	Control	Dose 1		Dose 2		SEM	P_Y	P_D	P_A	P_{DxA}
		M1	C1	M2	C2					
C12:0	0.080	0.090	0.080	0.095	0.080	0.007	ns	ns	***	ns
C14:0	1.450	1.627	1.373	1.710	1.397	0.139	***	**	***	ns
C16:0	26.550	26.200	26.017	26.353	26.000	0.301	*	ns	ns	ns
C17:0	0.183	0.197	0.173	0.163	0.193	0.017	ns	ns	ns	**
C18:0	11.750	11.380	12.817	12.127	11.663	0.574	ns	*	***	**
C20:0	0.197	0.170	0.253	0.172	0.190	0.032	ns	***	***	***
C24:0	0.043	0.042	0.020	0.040	0.043	0.011	ns	**	*	**
SFA	40.253	39.706	40.733	40.660	39.566	0.603	ns	ns	ns	***
C16:1 n7	4.133	4.860	3.063	4.393	4.047	0.636	ns	ns	***	***
C17:1	0.230	0.270	0.173	0.177	0.223	0.038	**	**	***	***
C18:1 n9t	0.233	0.173	0.200	0.183	0.217	0.023	***	***	***	ns
C18:1	51.130	52.050	51.600	50.687	52.007	0.794	ns	ns	ns	*
C20:1 n11	1.000	0.798	1.173	0.793	0.990	0.153	ns	**	***	**
MUFA	56.726	58.151	56.209	56.233	57.484	1.016	ns	ns	ns	**
C18:2 n6c	3.020	2.723	3.160	3.123	3.127	0.250	ns	ns	ns	ns
C18:3 n3	0.177	0.173	0.210	0.197	0.207	0.025	ns	ns	ns	ns
PUFA	3.197	2.896	3.37	3.320	3.334	0.271	ns	ns	ns	ns
Total	100.176	100.753	100.312	100.213	100.384					

Control: No inoculado específicamente con levadura.

M1, C1, M2 y C2: Diferentes tratamientos usados en este estudio (ver Materiales y métodos).

P_Y : valor de probabilidad de efecto de la levadura.

P_D : valor de probabilidad de efecto de la dosis.

P_A : valor de probabilidad de efecto del lugar de aplicación.

P_{DxA} : valor de probabilidad de efecto de la dosis y el lugar.

ns = no-significativo $P > 0,05$; * $= P < 0,05$; ** $= P < 0,01$; *** $= P < 0,001$

Hay que mencionar que, en todos los casos, incluidas las muestras control, el lomo contenía un porcentaje muy bajo en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), siendo los

ácidos grasos más abundantes los monoinsaturados (MUFA). Por otra parte, la inoculación con la cepa LR1 no produjo ningún cambio importante en el perfil de ácidos grasos en ninguno de los tratamientos aplicados. El ácido oleico (C18:1), alrededor del 50%, el ácido palmítico (C16:0), alrededor del 26%, y el ácido esteárico (C18:0), alrededor del 10-12% de los ácidos grasos totales, fueron los más abundantes en todas las muestras. No se pudieron encontrar grandes diferencias que estuvieran claramente relacionadas con los diferentes tratamientos, aunque sí se observaron efectos muy suaves pero consistentes en los porcentajes de algunos ácidos grasos. Por ejemplo, en los tratamientos M, se determinó un aumento significativo en ácido mirístico (C14:0) y una disminución en el ácido araquídico (C20:0) y en el ácido gadoleico (C20:1 n11). Además todos los tratamientos produjeron una disminución en el porcentaje de ácido t-oleico (ácido elaidico, C18:1 n9t) cuando se comparó con el embutido control.

3.3 Producción de compuestos aromáticos y volátiles.

Los compuestos volátiles más representativos fueron determinados al final del proceso de maduración, tanto en las muestras control como en los lomos inoculados (Tabla 9 y Fig. 33). Para todas las muestras, los compuestos más abundantes fueron alcoholes (64,7%-73,2%) y aldehídos (14,2%-27,4%). Además, se encontraron una cantidad significativa de ésteres (2,6-7,5%), compuestos sulfurados (3,1-4,7%) y cetonas (0,8-2,1%). Se observaron tres claros efectos debidos a la inoculación específica con levadura: (1) una disminución de los aldehídos, (2) un incremento en los ésteres y (3) un incremento en los alcoholes. La disminución en aldehídos en comparación de los lomos control se observó en todas las muestras inoculadas con LR1 y en el caso de las muestras C la reducción fue especialmente importante. Además, algunos compuestos como pentanos y hexanos derivados de los procesos de oxidación lipídica fueron casi indetectables en los embutidos inoculados.

Por otra parte, bajo todas las condiciones estudiadas, la inoculación con levadura produjo un aumento en los ésteres, la cual fue más importante en el caso de la muestra C1.

Resultados

Tabla 9. Compuestos volátiles más abundantes (expresados como unidades relativas) en lomos inoculados específicamente con la cepa de *D. hansenii* LR1 al final del proceso de maduración. En colaboración con C. Bravo.

Volatile	Control	Dose 1		Dose 2		SEM	P_Y	P_D	P_A	P_{DxA}
		M1	C1	M2	C2					
Aldehydes										
Acetaldehyde	0.206	0.240	0.137	0.205	0.183	0.038	ns	ns	***	**
2-Methylpropanal	0.030	0.025	0.019	0.019	0.022	0.006	*	ns	ns	ns
2-Methylbutanal	0.019	0.014	0.012	0.009	0.012	0.004	**	ns	ns	ns
3-Methylbutanal	0.087	0.033	0.031	0.021	0.032	0.025	***	ns	ns	ns
Pentanal	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	**	ns	ns	ns
Hexanal	0.009	0.000	0.004	0.000	0.002	0.004	***	ns	*	ns
Ketones										
2,3-Butanedione	0.015	0.015	0.029	0.019	0.010	0.010	ns	ns	ns	ns
Sulfur compounds										
Methional	0.008	0.009	0.007	0.005	0.006	0.002	ns	*	ns	ns
Ethyl methyl sulfide	0.015	0.032	0.033	0.009	0.023	0.011	*	***	*	ns
Methanethiol	0.030	0.036	0.024	0.023	0.032	0.007	ns	ns	ns	*
Alcohols										
Ethanol	0.776	1.218	0.788	0.923	0.827	0.225	ns	ns	*	ns
1-Pentanol	0.005	0.000	0.008	0.000	0.002	0.004	ns	ns	**	ns
2-Methylbutanol	0.053	0.080	0.080	0.080	0.071	0.012	***	ns	ns	ns
Esters										
Methyl isobutyrate	0.000	0.008	0.007	0.006	0.005	0.003	***	ns	ns	ns
Methyl butyrate	0.004	0.001	0.002	0.003	0.002	0.001	*	ns	ns	ns
Methyl isovalerate	0.004	0.021	0.022	0.016	0.018	0.007	***	**	ns	ns
Methyl acetate	0.026	0.041	0.073	0.051	0.051	0.021	*	ns	ns	ns

Control: No inoculado específicamente con levadura.

M1, C1, M2 y C2: Diferentes tratamientos usados en este estudio (ver Materiales y métodos).

P_Y : valor de probabilidad de efecto de la levadura.

P_D : valor de probabilidad de efecto de la dosis.

P_A : valor de probabilidad de efecto del lugar de aplicación.

P_{DxA} : valor de probabilidad de efecto de la dosis y el lugar.

ns = no-significativo $P > 0,05$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$

Hay que mencionar, que las cantidades de metil isovalerato, relacionado con el olor y sabor a fruta, aumentaron más de un orden de magnitud en todos los tratamientos cuando se compararon con el control. Este aumento fue especialmente significativo en los tratamientos M1 y C1. De la misma manera, niveles de metil isobutirato fueron detectados solo en los embutidos que habían sido inoculados con LR1. La inoculación con levadura en la piel o en la carne indujo una producción de alcoholes, siendo el etanol el más abundante. Se sabe que este compuesto no contribuye de manera importante al

aroma final del embutido, sino que es un precursor de compuestos de ésteres, responsables de los olores afrutados (Olesen PT. y Stahnke LH., 2000). Por último, la inoculación con la levadura produjo un aumento del 2-metilbutanol en todos los casos. Finalmente, la cantidad de cetonas y compuestos sulfurados se mantuvieron a niveles relativamente bajos, independientemente de la presencia de levaduras inoculadas.

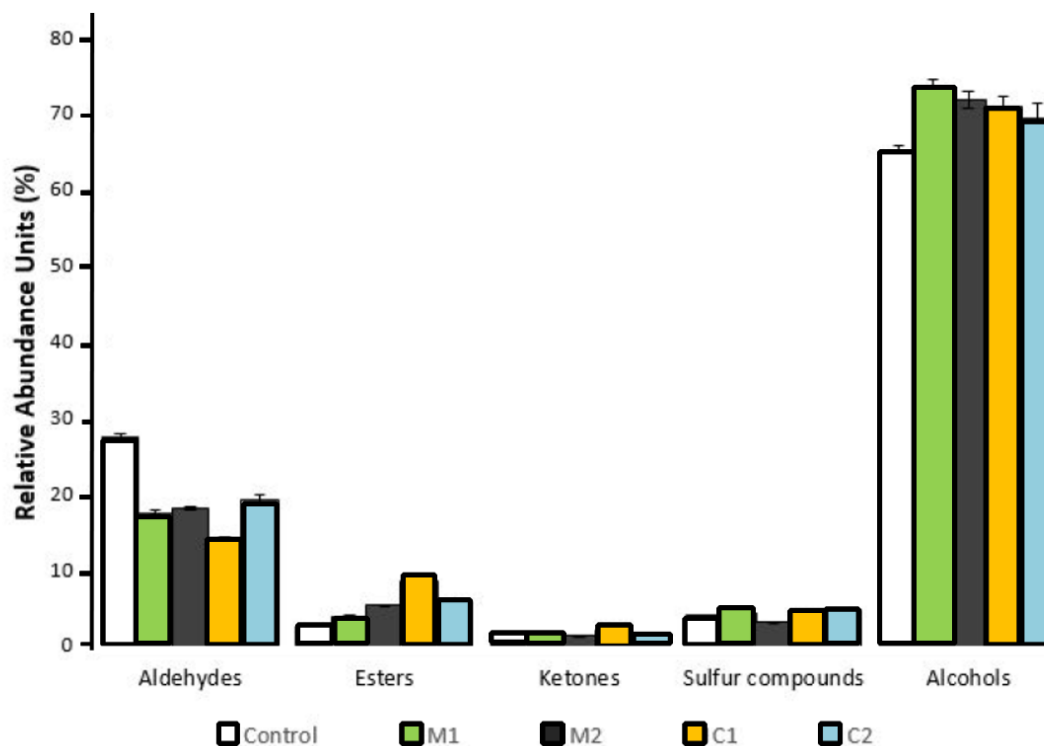


Figura 33. Familias de compuestos volátiles en lomos inoculados específicamente con la cepa de *D. hansenii* LR1 al final del proceso de maduración. La abundancia de compuestos totales está expresada como unidades relativas (%). Control, y los tratamientos M1, M2, C1 y C2 están descritos en resultados

3.4 Análisis sensorial.

Aunque algunos estudios afirman que la inoculación con levadura afecta a las características finales de los embutidos (Flores M. *et al.*, 2004; Iucci *et al.*, 2007), otros niegan este efecto (Olesen PT. y Stahnke LH., 2000; Selgas MD. *et al.*, 2003). En nuestro caso, el resultado obtenido tras el análisis sensorial del lomo se resume en la tabla 10. El consumidor no detectó diferencias en cuanto a texturas según los diferentes tratamientos. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en todos los demás

Resultados

atributos comparados con la muestra control. En general, todos los tratamientos con la cepa LR1 resultaron en una mayor aceptabilidad por el consumidor en comparación con el control, incluido el aspecto de las muestras. Además, se observó una mayor tendencia del consumidor hacia una aceptabilidad más alta en las muestras inoculadas con el doble de levadura (tratamientos M2 y C2). También se encontró un efecto positivo en cuanto al aroma y al sabor en las muestras inoculadas con la dosis más alta de levadura. Hay que añadir la relevante mejora que se produjo en el sabor salado debido a la inoculación con levadura, probablemente debida a las características que presenta *D. hansenii* como inclusora de sodio. Sin embargo, este análisis no mostró diferencias significativas debidas a la cantidad de levadura o al lugar de aplicación (tratamientos M o C).

En resumen, este estudio nos confirma la idea de la dificultad de obtener conclusiones generales y definitivas relacionadas con el efecto de la inoculación de levaduras sobre las características sensoriales de los embutidos. Sin embargo, podemos afirmar que la inoculación con la cepa LR1 produjo una mejor aceptación en muestras de lomo.

Tabla 10. Aceptación sensorial de los lomos inoculados específicamente con la cepa de *D. hansenii* LR1 al final del proceso de maduración.

	Control	Dose 1		Dose 2		SEM	P_Y	P_D	P_A	P_{DxA}
		M1	C1	M2	C2					
Aspect	5.73	6.10	6.20	6.10	6.30	0.38	***	ns	*	ns
Aroma	6.10	6.62	6.80	7.10	7.20	0.52	***	***	*	ns
Flavour	6.12	6.60	6.50	7.13	7.18	0.56	***	***	ns	ns
Texture	6.02	6.20	6.08	6.10	6.23	0.39	ns	ns	ns	ns
Salty taste	5.93	7.12	7.13	7.18	7.30	0.65	***	ns	ns	ns
Overall quality	6.52	6.81	6.93	7.00	7.22	0.39	***	***	**	ns

Control: No inoculado específicamente con levadura.

M1, C1, M2 y C2: Diferentes tratamientos usados en este estudio (ver Materiales y métodos).

P_Y : valor de probabilidad de efecto de la levadura.

P_D : valor de probabilidad de efecto de la dosis.

P_A : valor de probabilidad de efecto del lugar de aplicación.

P_{DxA} : valor de probabilidad de efecto de la dosis y el lugar.

ns = no-significativo $P > 0,05$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$

4 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS.

Para establecer la relación entre las cinco muestras (control, M1, M2, C1 y C2) usadas en este estudio usamos un Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando los parámetros descritos en este trabajo (Fig. 34). Este análisis asignó el 71,19% de la variabilidad, el primer componente (PC1) explicó el 55,4%, mientras que PC2 representó el 15,79%. Los cinco tratamientos se encontraron claramente separados en la representación indicando que eran grupos diferentes. Los tratamientos M (M1 y M2) se localizaron en la parte negativa del componente PC1 mientras el control y los tratamientos C (C1 y C2) se encontraban en la parte positiva. Además, los niveles de ácidos láurico, mirístico y palmítico estaban muy relacionados con el tratamiento M2, y los de etanol se correlacionaron con las muestras correspondientes al tratamiento M1. La representación también muestra una gran distancia entre los niveles de acetaldehído y las muestras C1, que por otra parte tienen una correlación cercana con los niveles de ácido esteárico o de metil-acetato.

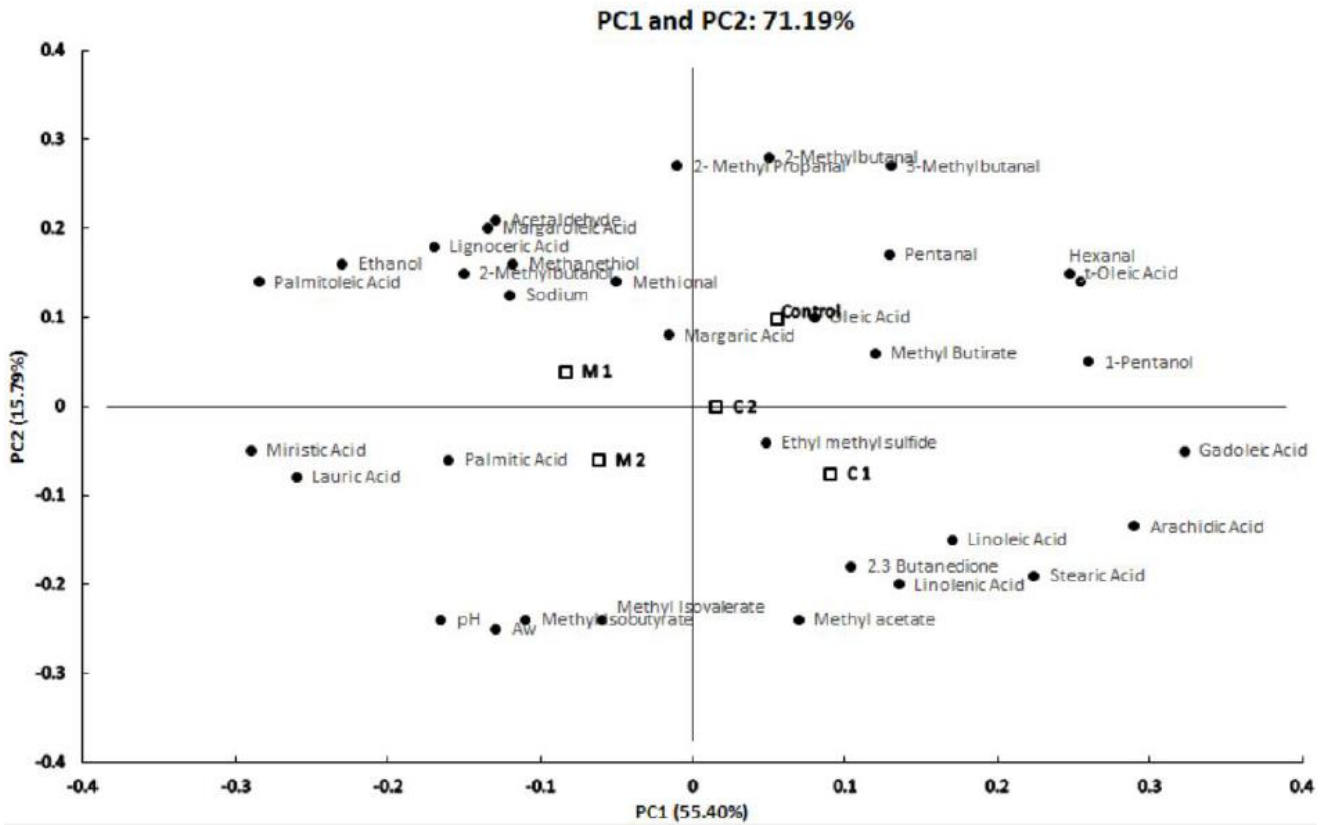


Figura 34. Análisis de componentes principales (PCA) de los cinco tratamientos usados en este estudio. El PCA se realizó usando las diferentes determinaciones físico-químicas de los tratamientos control, M1, M2, C1 y C2. Los ejes "x" e "y" son los componentes PC1 y PC2 respectivamente. En colaboración con FJ. Ruiz.

DISCUSIÓN 3: FUNCIÓN DE *Debaryomyces hansenii* EN LA MADURACIÓN DE LOMOS IBÉRICOS DE LA ZONA DEL VALLE DE LOS PEDROCHES (CÓRDOBA).

En esta parte de la tesis se ha estudiado y analizado el efecto de *D. hansenii* sobre distintos parámetros fisicoquímicos en los embutidos ibéricos del Valle de los Pedroches. La cepa LR1 fue seleccionada en base a sus características fisiológicas y metabólicas. Se identificó molecularmente antes de ser inoculada en las muestras y tras los tres meses de maduración de los lomos. Tanto los análisis identificando genes específicos como el análisis del ADN mitocondrial permitieron confirmar a nivel molecular que nuestra cepa de *D. hansenii* era la que había proliferado en la superficie del embutido. La presencia de la levadura permitió en todos los casos mantener una más alta actividad de agua final en los lomos. Este fenómeno ya ha sido descrito previamente en otros embutidos, de hecho, se ha publicado que el crecimiento de la levadura en la superficie de embutidos afecta a la humedad final del producto (Cano-García L., 2014a; Corral S. *et al.*, 2017). De igual manera el pH final bajó menos en los lomos inoculados, lo que puede estar ligado a un consumo de ácidos grasos por parte de las levaduras como ya se ha propuesto que ocurre con otros embutidos (Cano-García L.; 2014a; Corral S. *et al.*, 2017).

Además, los lomos inoculados con la levadura contenían una menor cantidad de sal, lo que no había sido descrito previamente en ningún tipo de embutido. Se sabe que *D. hansenii* puede acumular una alta cantidad de sodio del ambiente, por esta razón se ha definido como una levadura inclusora de sodio, lo que podría estar directamente relacionado con la disminución en el contenido de sodio en el producto inoculado (Herrera R. *et al.*, 2017; Martínez JL. *et al.*, 2011; Prista C. *et al.*, 1997).

Respecto a los compuestos volátiles, ha sido descrito previamente que su abundancia en algunos embutidos depende de la cepa utilizada en la inoculación de éstos (Cano-García, Belloch, & Flores, 2014a). En nuestro estudio la cepa LR1, produjo una reducción en los aldehídos y un incremento en los alcoholes y ésteres en los lomos bajo las diferentes condiciones usadas, lo que coincide con resultados previamente publicados en embutidos (“dry-fermented sausages”) con una cepa específica de *D. hansenii* P2 (Corral S. *et al.*, 2018). La baja cantidad de compuestos sulfurados en embutidos con *D.*

Discusión

hansenii también ha sido descrita anteriormente (Olesen PT. y Stahnke LH., 2000; Andrade MA. *et al.*, 2010).

El posible efecto de la inoculación de embutidos con *D. hansenii* sobre sus características sensoriales ha sido tema de controversia (Olesen PT. y Stahnke LH., 2000; Selgas MD. *et al.*, 2003; Flores M. *et al.*, 2004; Iucci L. *et al.*, 2007). Los resultados pueden verse afectados por la cepa seleccionada, la cantidad de levadura, el tipo de embutido, e incluso por la posible presencia de otros cultivos iniciadores. A pesar de las posibles dificultades para alcanzar conclusiones nuestros resultados muestran una clara tendencia a una mayor aceptación por parte del consumidor de los lomos inoculados con la levadura LR1.

DISCUSIÓN GENERAL

Debaryomyces hansenii es una levadura no convencional, ya que pertenece a un grupo de levaduras sobre las que no se dispone de mucha información, en contraposición a las más conocidas como la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* (Prista *et al.*, 2016). Existen más de 1500 especies de levaduras, que en su mayoría son escasamente conocidas, y por ello se denominan “no convencionales”. *D. hansenii* ha sido definida como osmo-, halo- y xerotolerante (Breuer y Harms, 2006), y está presente en multitud de ambientes salinos y/o con baja actividad hídrica, como el agua de mar, salinas y diversos alimentos curados (Fleet G., 1992; Casas E. *et al.*, 2004). Esta especie presenta con un gran interés biotecnológico debido a algunas de sus características. Destacan su actividad lipolítica y proteolítica, así como su capacidad para tolerar cambios en las condiciones de salinidad e inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes (Fatichenti F. *et al.*, 1983; Bintsis T. *et al.*, 2003). Otro ejemplo de este potencial biotecnológico, es su habilidad para la producción de exopeptidasas importantes durante la maduración de los embutidos (Breuer U. y Harms H., 2006). Además, su capacidad de crecer a bajas temperaturas hace que sea una de las especies más representadas en alimentos (Guerzoni ME. *et al.*, 1993)

El desarrollo tanto del conocimiento básico como el de las aplicaciones biotecnológicas en la industria se han visto perjudicados y ralentizados por una serie de características (Brewer y Harms, 2006; Prista C., 2016) y peculiaridades fisiológicas y moleculares de esta levadura. Otra dificultad añadida es que es su carácter aneuploide (Prista *et al.*, 2016). A pesar de todo, hay diversos grupos a nivel mundial que trabajan con *D. hansenii* debido a su tolerancia a sal y a sus múltiples aplicaciones biotecnológicas. En esta tesis se han abordado diversos aspectos de interés relacionados con aspectos tanto básicos como aplicados de esta levadura.

En la primera parte de este trabajo de Tesis Doctoral (Capítulo 1) se propone la existencia de vías comunes en las respuestas a estrés salino y oxidativo. Estas vías presentarían zonas comunes de solapamiento, basándonos en resultados tanto a nivel fisiológico como bioquímico y molecular. La hipótesis partió de resultados previos publicados por el grupo donde se ha realizado este trabajo en los que se demostraba que el sodio protege a la célula frente a diversos tipos de estrés (Navarrete C. *et al.*, 2009; Michán C. *et al.*, 2013). Además, la capacidad de crecer en presencia de sal se

relaciona con otros factores no del todo conocidos y que comprenden desde transportadores de membrana a actividades enzimáticas o la composición específica de la membrana plasmática (Prista C. *et al.* 2016). Por otra parte, la escasa información disponible sobre la tolerancia a estrés oxidativo sugiere que esta levadura no es especialmente resistente a este tipo de estrés. Estudios "*in silico*" muestran en *D. hansenii* la existencia de genes ortólogos a aquellos implicados en la defensa a estrés oxidativo en *S. cerevisiae*, y que, por tanto, podrían llevar a cabo mecanismos antioxidantes similares a los que se dan en la levadura modelo. En este trabajo hemos demostrado que estos genes aumentan su expresión después de tratamientos suaves con inductores de estrés salino y viceversa, que genes relacionados con la respuesta a estrés osmótico/salino están regulados a nivel transcripcional por estrés oxidativo. Además, hemos demostrado un aumento de actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo después de un tratamiento suave con NaCl. De cara al futuro, sería interesante realizar estudios más completos, a niveles "ómicos" para obtener una visión más completa de lo que está sucediendo en la célula. Un ejemplo sería observar que cambios hay en el proteoma celular después de someter a la levadura a dichos estreses, para identificar nuevos factores presentes en estas vías de regulación. De hecho, se ha descrito que la respuesta a estrés ambiental en levaduras incluye unos 900 genes cuya expresión se altera frente a distintos tipos de estrés y que la expresión de dichos genes debería estar coordinada en las distintas condiciones ambientales (Gasch AP., 2003).

Durante los años 60 y 70 del siglo pasado, el grupo de Norkrans, en la Universidad de Göteborg publicó una serie de trabajos excelentes en los que se establecieron las bases para el estudio de la homeostasis iónica y el crecimiento en medios salinos de *D. hansenii* (Gezelius K. B. y Norkrans B., 1970; Gustafsson. y Norkrans B., 1976). Desde entonces se ha avanzado en la comprensión de estos fenómenos, pero ha permanecido la polémica sobre el carácter halotolerante o halófilo de esta levadura. Aunque son conceptos muy relacionados, si hablamos de que la levadura es halotolerante asumimos que es capaz de adaptarse a condiciones de alta salinidad. Sin embargo, cuando la calificamos de halófila entendemos que además de estar adaptada a estas condiciones, necesita la presencia de sal para su crecimiento y desarrollo. Estos resultados divergentes se han visto en muchas ocasiones afectados por las distintas cepas y las distintas condiciones

de cultivo (González-Hernández JC. y Peña A., 2002; Cabrera-Orefice A., 2010). En un segundo capítulo de esta tesis hemos abordado, por primera vez, un estudio del efecto de la sal sobre el metabolismo trabajando en biorreactores con condiciones controladas. Los estudios previos se han caracterizado por estar realizados en condiciones de laboratorio sin el control de diversos parámetros cuando el microorganismo crece. Nosotros hemos realizado un estudio del crecimiento y hemos determinado una serie de parámetros fisiológicos bajo condiciones controladas de pH, agitación, aireación y temperatura. Hemos demostrado que la sal ejerce un efecto positivo en el metabolismo y fisiología de la célula, ya que en presencia de sal observamos una mayor velocidad específica del consumo de glucosa unido a una mayor velocidad de crecimiento. Por otro lado pudimos comprobar que en condiciones limitantes de glucosa, las levaduras que crecían en presencia de sal se adaptaban mejor a la limitación nutricional, lo cual apoya la idea de que no hablamos exclusivamente de un fenómeno de halotolerancia tal y como recientemente se ha propuesto (Sánchez NS. *et al.*, 2018). Por tanto, en este trabajo se demuestra que, en nuestras condiciones, la sal, y más concretamente el NaCl, ejerce un efecto muy positivo sobre el metabolismo de *D. hansenii*. Otro aspecto que también aclaramos con estos experimentos es el metabolismo exclusivamente respiratorio de esta levadura, tanto en presencia como ausencia de sal en el medio. Aunque es bien sabido que *D. hansenii* mayoritariamente respira, algunos autores habían propuesto una cierta capacidad fermentativa (Calahorra M. *et al.*, 2009). En nuestro diseño experimental controlado en biorreactores no hubo producción de etanol en ningún caso descartando cualquier indicio de fermentación alcohólica. En resumen, en esta parte del trabajo demostramos que la sal no es sólo tolerada por *D. hansenii* sino que juega un papel fundamental en su estrategia de supervivencia y que es necesaria para una actividad fisiológica óptima. De cara al futuro, podemos afirmar que, de nuevo, experimentos a nivel “ómico”, ayudarían a la identificación de nuevos elementos moleculares implicados en las respuestas metabólicas desencadenadas por la presencia de sal en *D. hansenii*.

En el último capítulo de esta tesis hemos abordado un aspecto muy diferente a los anteriores. En este caso hemos optado por intentar explotar el interés biotecnológico aplicado de esta levadura. En una línea de trabajo de este grupo de investigación, en un

primer momento, se aisló una colección de levaduras obtenida a partir de embutidos ibéricos del Valle de los Pedroches. Esta es una zona con productos de una calidad reconocida pero nunca se habían realizado estudios a nivel microbiológico. Esta colección de levaduras se aisló e identificó por diferentes métodos bioquímicos y moleculares y resultaron pertenecer a la especie *D. hansenii*. Una vez caracterizadas estas cepas, se seleccionaron algunas interesantes desde el punto de vista fisiológico y se caracterizaron también a nivel molecular. En este caso mediante ADN mitocondrial para comprobar que antes y después de nuestros experimentos, manejábamos la misma cepa. Una de las levaduras seleccionadas (LR1) se inoculó en diferentes condiciones en muestras de lomo ibérico. Una vez pasado el proceso de maduración del producto se analizaron diferentes parámetros fisiológicos y observamos que algunos como fueron la actividad de agua y el pH disminuían menos en aquellos lomos que habían sido inoculados específicamente con levadura. Estos resultados van en el mismo sentido que otros previos obtenidos en distintos embutidos (Cano-García L., *et al.*, 2014a,b; Corral S. *et al.*, 2017). Un resultado muy llamativo y completamente novedoso fue el hecho de que observásemos un notable descenso en el contenido en sodio de los lomos que habían sido inoculados específicamente respecto a los que no, lo que podría estar relacionado con el carácter inclusor de sodio de *D. hansenii* (Herrera R. *et al.*, 2017; Martínez JL. *et al.*, 2011; Prista C. *et al.*, 1997). La inoculación con LR1 también produjo cambios en el perfil de ácidos grasos y de compuestos volátiles y aromáticos del producto final. Todo ello probablemente influyó en los resultados de la realización de una cata por expertos de lomos con y sin levadura. Aunque existen trabajos publicados en todos los sentidos (Iucci *et al.*, 2007; Corral S. *et al.*, 2018), en nuestro caso el resultado fue una mayor aceptación y preferencia por parte del consumidor hacia el lomo que había sido inoculado específicamente con la levadura. Como hemos mencionado, el hecho de que la inoculación con la levadura *D. hansenii* influya en los parámetros finales y en las características organolépticas del producto ha sido tema de controversia ya que hay estudios que defienden que sí y otros que mantienen que no. En conjunto, todos estos resultados nos llevan a concluir que la cepa LR1 de *D. hansenii* puede ser un buen cultivo iniciador. Es por esto, que a corto plazo, y en colaboración con la empresa Navalpedroche, tenemos prevista la inoculación a gran escala de toda una partida de lomos.

Discusión general

Finalmente, cabe mencionar que en el contexto de esta tesis y con el fin de extender nuestros estudios a hongos filamentosos, realizamos una serie de ensayos para abordar la respuesta a estrés en *Aspergillus nidulans*. En estos trabajos, realizados en el laboratorio del Prof. George Diallinas (Universidad de Atenas) durante una estancia de tres meses, se analizó la posible relación entre la respuesta a distintos tipos de estrés con la biosíntesis de lípidos de membrana o los transportadores de purinas (FurD, AzgA, UapA). Resultados preliminares muestran que mutantes en la biosíntesis de ergosterol tienen el transporte de uracilo extremadamente afectado, y muestran un claro incremento en la acumulación de adenina. Todo ello se traduce además en respuestas diferenciadas a factores de estrés. Estos datos merecen un estudio más detallado que está actualmente en desarrollo, pero no ha podido ser completado hasta el momento y por ello no aparecen específicamente detallados en esta tesis.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1 Las vías de respuesta a estrés salino y a estrés oxidativo en *D. hansenii* comparten elementos comunes tanto a nivel transcripcional como metabólico o enzimático.

2 *D. hansenii* cultivada en biorreactores bajo condiciones controladas se comporta como una levadura halófila ya que la presencia de altas concentraciones de KCl y, sobre todo, de NaCl mejoran diversos aspectos relacionados con su crecimiento y metabolismo.

3 La inoculación de lomos con una cepa de *D. hansenii* autóctona afecta de manera significativa a las características físico-químicas del producto y mejora la aceptación por parte del consumidor.

Conclusions

1 Salt and oxidative stress responses pathways in *D. hansenii* share common steps at transcriptional, metabolic and enzymatic levels.

2 *D. hansenii* behaves as an halophilic yeast when grown under controlled conditions in bioreactors since high concentrations of KCl, and mainly NaCl, improve its growth and metabolism.

3 Inoculation of pork loin with a terroir strain of *D. hansenii* changes the physico-chemical characteristics of the product and improves consumer acceptance.

BIBLIOGRAFÍA

Referencias

Aggarwal M, Bansal PK, Mondal AK. (2005). Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 22: 457-470.

Alhama J, Fuentes-Almagro CA, Abril N, Michán C. (2018). Alterations in oxidative responses and post-translational modification caused by p,p-DDE in *Mus spretus* testes reveal Cys oxidation status in proteins related to cell-redox homeostasis and male fertility. *Sci Total Environ*. 636:656-669.

Anderson MJ, Barker S L, Boone C, Measday V. (2012). Identification of RCN1 and RSA3 as ethanol-tolerant genes in *Saccharomyces cerevisiae* using a high copy barcoded library. *FEMS Yeast Res*. 12:48-60.

Andrade MA, Córdoba JJ, Casado EM, Córdoba MG, Rodríguez M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage "salchichón". *Meat Science*, 85:256-264.

Aquilanti L, Santarelli S, Silvestri G, Osimani A, Petruzzelli A, Clementi F. (2007). The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *Int J Food Microbiol*. 120:136-145.

Arino J, Ramos J, Sychrova H. (2019). Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. *Yeast*. 36:177-193.

Atanassova MR, Fernandez-Otero C, Rodriguez-Alonso P, Fernandez-No IC, Garabal JI, Centeno JA. (2016). Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol*. 53:172-181.

Attfeld PV. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol*. 15:1351-1357.

Avery AM, Avery SV. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem*. 276:33730-33735.

Bibliografía

Axelsson-Fisk M, Sunnerhagen P. (2006). Comparative genomics and gene finding in fungi. En: Comparative Genomics; Using fungi as models. Pp 1-28. Springer. Heidelberg. Alemania.

Bal J, Yun SH, Choi MS, Yeo SH, Kim JM, Kim DH. (2015). Pyrosequencing reveals bacterial diversity in Korean traditional wheat-based nuruk. *J Microbiol.* 53:812-819.

Balcells L, Calero F, Gómez N, Ramos J, Ariño J. (1999). The Schizosaccharomyces pombe Pzh1 protein phosphatase regulates Na⁺ ion influx in a Trk1-independent fashion. *Eur J Biochem.* 260:31-37.

Banjara N, Nickerson KW, Suhr MJ, Hallen-Adams HE. (2016). Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *Int J Food Microbiol.* 222:23-29.

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

Boyer JS. (198). Plant productivity and environment. *Science.* 218:443-448.

Breuer U, Harms H. (2006). *Debaryomyces hansenii*--an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast.* 23:415-437.

Brombacher K, Fischer BB, Rufenacht K, Eggen RI. (2006). The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defence of *Saccharomyces cerevisiae* against singlet oxygen. *Yeast.* 23:741-750.

Butinar L, Strmole T, Gunde-Cimerman N. (2011). Relative incidence of Ascomycetous yeasts in Arctic coastal environments. *Microb Ecol.* 61: 832-843.

Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Luévano-Martínez LA, Peña A, Uribe-Carvajal S. (2010). Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?). *J Bioenerg Biomembr.* 42:11-19.

Calahorra M, Martínez GA, Hernández-Cruz A, Peña A. (1998). Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast.* 14:501-515.

Calahorra M, Sanchez NS, Pena A. (2009). Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 9:1293-1301.

Cano-Garcia L, Belloch C, Flores M. (2014a). Impact of *Debaryomyces hansenii* strains inoculation on the quality of slow dry-cured fermented sausages. *Meat Sci.* 96:1469-1477.

Cano-Garcia L, Rivera-Jimenez S, Belloch C, Flores M. (2014b). Generation of aroma compounds in a fermented sausage meat model system by *Debaryomyces hansenii* strains. *Food Chem.* 151:364-373.

Capaldi AP, Kaplan T, Liu Y, Habib N, Regev A, Friedman N, O'Shea EK. (2008). Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nat Genet.* 40:1300-1306.

Capusoni C, Arioli S, Donzella S, Guidi B, Serra I, Compagno C. (2019). Hyper-osmotic stress elicits membrane depolarization and decreased permeability in halotolerant marine *Debaryomyces hansenii* strains and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol.*10: 64 doi: 10.3389

Casas E, de Ancos B, Valderrama MJ, Cano P, Peinado JM. (2004). Pentadiene production from potassium sorbate by osmotolerant yeasts. *Int J Food Microbiol.* 94:93-96.

Cerniglia CE, Freeman JP, Van Baalen C. (1981). Biotransformation and toxicity of aniline and aniline derivatives of cyanobacteria. *Arch Microbiol.* 130:272-275.

Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. (2006). Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a spe2Delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 23:751-61.

Bibliografía

Chawla S, Kundu D, Randhawa A, Mondal AK. (2017). The serine/threonine phosphatase DhSIT4 modulates cell cycle, salt tolerance and cell wall integrity in halo tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Gene*. 606:1-9.

Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G. (2006). Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Res*. 6:692-701.

Cocolin L, Dolci P, Rantsiou K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Sci*. 89:296-302.

Collinson LP, Dawes IW. (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Gene*. 156:123-127.

Coppola S, Pepe O, Mauriello G. (1998). Effect of leavening microflora on pizza dough properties. *J Appl Microbiol*. 85:891-897.

Corral S, Belloch C, López-Díez JJ, Flores M. (2018). Lipolysis and aroma generation as mechanisms involved in masking boar taint in sodium reduced fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast. *J Sci Food Agric*. 98:2121-2130.

Corral S, Belloch C, López-Díez JJ, Salvador A, Flores M. (2017). Yeast inoculation as a strategy to improve the physico-chemical and sensory properties of reduced salt fermented sausages produced with entire male fat. *Meat Science*, 123:1-7.

Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, *et al.* (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*. 107:526-545.

Dolz-Edo L, Rienzo A, Poveda-Huertes D, Pascual-Ahuir A, Proft M. (2013). Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast. *Mol Cell Biol*. 33:2228-2240.

Dormer UH, Westwater J, Stephen DW, Jamieson DJ. (2002). Oxidant regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene. *Biochim Biophys Acta*. 1576:23-29.

Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, *et al.* (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*.430:35-44.

Encinas J P, Lopez-Diaz TM, Garcia-Lopez, ML, Otero A, Moreno B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* 54:203-208.

Eruslanov E, Kusmartsev S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol.* 594:57-72.

Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev.* 24:469-486.

Faticenti F, Bergere JL, Deiana P, Farris GA. (1983). Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. *J Dairy Res.* 50:449-457.

Fleet G. (1992). Spoilage yeasts. *Crit Rev Biotechnol.* 12:1-44.

Fleet GH. (1990). Yeasts in dairy products. *J Appl Bacteriol.* 68: 199-211.

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

Flores J, Marcus JR, Nieto P, Navarro JL, Lorenzo P. 1997. Effect of processing conditions on proteolysis and taste of dry-cured sausages. *Zeits Lebensmit Forschung.* 204:168-172.

Garcia-Neto W, Cabrera-Orefice A, Uribe-Carvajal S, Kowaltowski A J, Alberto Luevano-Martinez L. (2017). High Osmolarity Environments Activate the Mitochondrial Alternative Oxidase in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS One.* 12 doi: 10.1371.

García-Salcedo R, Casamayor A, Ruiz A, González A, Prista C, Loureiro-Dias MC, Ramos J, Ariño J. (2006). Heterologous expression implicates a GATA factor in regulation of nitrogen metabolic genes and ion homeostasis in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Eukaryot Cell.* 5:1388-1398.

Bibliografía

Garriga M, Hugas M, Gou P, Aymerich MT, Arnau J, Monfort JM. (1996). Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. *Int J Food Microbiol.* 32:173-183.

Gasch AP. (2003). The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. En: *Yeast Stress Responses*. Pp 11-70. Springer. Heidelberg. Alemania.

Gezelius K, Norkrans B. (1970). Ultrastructure of *Debaryomyces hansenii*. *Ark Microbiol.* 70:14-25.

González-Hernández JC, Peña A. (2002). Adaptation strategies of halophilic microorganisms and *Debaryomyces hansenii* (halophilic yeast). *Rev Latinoam Microbiol.* 44:137-156.

Gorgens JF, Van Zyl WH, Knoetze JH. (2005). Reliability of methods for the determination of specific substrate consumption rates in batch culture. *Biochem Eng J.* 25:109-112.

Gori K, Hébraud M, Chambon C, Mortensen HD, Arneborg N, Jespersen L. (2007). Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Res.* 7:293-303.

Gralla EB, Valentine JS. (1991). Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol.* 173:5918-5920.

Grant CM, Perrone G, Dawes IW. (1998). Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 253:893-898.

Green MR, Sambrook J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Guerzoni ME, Lanciotti R, Marchetti R. (1993). Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. *Int J Food Microbiol.* 17:329-341.

Gunde-Cimerman N, Ramos J, Plemenitas A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol Res.* 113:1231-41.

Gustafsson L, Norkrans B. (1976). On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch Microbiol.* 110:177-183.

Hernández-Saavedra NY, Egly JM, Ochoa JL. (1998). Cloning and sequencing of a cDNA encoding a copper-zinc superoxide dismutase enzyme from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.* 14:573-581.

Herrera R, Álvarez MC, Gelis S, Ramos J. (2013). Subcellular potassium and sodium distribution in *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and vacuolar mutants. *Biochem J.* 454:525-32.

Herrera R, Salazar A, Ramos-Moreno L, Ruiz-Roldan C, Ramos J. (2017). Vacuolar control of subcellular cation distribution is a key parameter in the adaptation of *Debaryomyces hansenii* to high salt concentrations. *Fungal Genet Biol.* 100:52-60.

Hohmann S, Krantz M, Nordlander B. (2002). Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* 428:29-45.

Ikner A, Shiozaki K. (2005). Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutant Res.* 569:13-27.

Iragne F, Nikolski M, Sherman D. (2008). Extrapolation of metabolic pathways as an aid to modelling completely sequenced non-Saccharomyces yeasts. *FEMS Yeast Res.* 8:132-139.

Lucci L, Patrignani F, Belletti N, Ndagijimana M, Elisabetta Guerzoni M, Gardini F, Lanciotti R. (2007). Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. Part 2: Evaluation of their effects on sensory quality and biogenic amine content. *Meat Science* 75:669-675.

Bibliografia

Jamieson DJ, Rivers SL, Stephen DW. (1994). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiol.* 140:3277-3283.

Jansen M1, Veurink JH, Euverink GJ, Dijkhuizen L. (2003). Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids. *FEMS Yeast Res.* 3:313-318.

Kavitha S, Chandra TS. (2014). Oxidative stress protection and glutathione metabolism in response to hydrogen peroxide and menadione in riboflavinogenic fungus *Ashbya gossypii*. *Appl Biochem Biotechnol.* 174:2307-2325.

Kingsbury TJ, Cunningham KW. (2000). A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev.* 14:1595-1604.

Kumar P, Chatli MK, Verma AK, Mehta N, Malav OP, Kumar D, Sharma N. (2017). Quality, functionality, and shelf life of fermented meat and meat products: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57:2844-2856.

Krauke Y, Sychrova H.(2010). Cnh1 Na(+) /H(+) antiporter and Ena1 Na(+) -ATPase play different roles in cation homeostasis and cell physiology of *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 11:29-41.

Kruger NJ. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 32:9-15.

Kuang Z, Ji H, Boeke JD. (2018). Stress response factors drive regrowth of quiescent cells. *Curr Genet.* 64:807-810.

Lages F, Silva-Graça M, Lucas C. (1999). Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiol* 145:2577-2585.

Lee J, Dawes IW, Roe JH. (1997). Isolation, expression, and regulation of the pgr1(+) gene encoding glutathione reductase absolutely required for the growth of Quality,

functionality, and shelf life of fermented meat and meat products: A review. *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 272:23042-23049.

Ma D, Li R. (2013). Current understanding of HOG-MAPK pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia*. 175:13-23.

Maresová L, Sychrová H. (2003). Physiological characterization of osmotolerant yeast *Pichia sorbitophila* and comparison with a putative synonym *Pichia farinosa*. *Folia Microbiol*. 48:211-217.

Martinez JL, Luna C, Ramos J. (2012). Proteomic changes in response to potassium starvation in the extremophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res*.12: 651-661.

Martinez JL, Sychrova H, Ramos J. (2011). Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genet Biol*.48:177-184.

Melamed D, Pnueli L, Arava Y. (2008). Yeast translational response to high salinity: global analysis reveals regulation at multiple levels. *Rna*. 14:1337-1351.

Michaillat L, Mayer A. (2013). Identification of genes affecting vacuole membrane fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS One*. 8doi: 10.1371.

Michán C, Martinez JL, Alvarez MC, Turk M, Sychrova H, Ramos J. (2013). Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and *Debaryomyces fabryi*. *FEMS Yeast Res*. 13:180-188.

Minhas A, Sharma A, Kaur H, Rawal Y, Ganesan K, Mondal AK.. (2012). Conserved Ser/Arg-rich motif in PPZ orthologs from fungi is important for its role in cation tolerance. *J Biol Chem*. 287: 7301-7312.

Montiel V, Ramos J. (2007). Intracellular Na and K distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of *DhNHX1*. *FEMS Yeast Res*. 7:102-109.

Bibliografía

Moradas-Ferreira P, Costa V. (2000). Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep.* 5:277-285.

Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 190:1157-1195.

Morgan BA, Banks GR, Toone WM, Raitt D, Kuge S, Johnston LH. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16:1035-1044.

Murphy MP. (2012). Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxid Redox Signal.* 16:476-495.

Navarrete C, Siles A, Martínez JL, Calero F., Ramos, J. (2009). Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 9:582-590.

Nomura M, Takagi H. (2004). Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:12616-12621.

Nuccio ML, Rhodes D, McNeil SD, Hanson AD. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr Opin Plant Biol.* 2:128-134.

Ogita A, Fujita K, Usuki Y, Tanaka T. (2010). Targeted yeast vacuole disruption by polyene antibiotics with a macrocyclic lactone ring. *Int J Antimicrob Agents.* 35:89-92.

Olesen PT, Stahnke LH. (2000). The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat Sci.* 56:357-368.

Oren A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:334-348.

Ozturk I, Sagdic O. (2014). Biodiversity of yeast mycobiota in "sucuk," a traditional Turkish fermented dry sausage: phenotypic and genotypic identification, functional and technological properties. *J Food Sci.* 79:2315-2322.

Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.*65:859-867.

Paulsen CE, Carroll KS. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev.* 113:4633-4679.

Pedrajas JR, Kosmidou E, Miranda-Vizueté A, Gustafsson JA, Wright AP, Spyrou G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 274:6366-6373.

Petrovic U. (2006). Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res.* 6:816-822.

Pisa D, Ramos M, Molina S, García P, Carrasco L. (2007). Evolution of antibody response and fungal antigens in the serum of a patient infected with *Candida famata*. *J Med Microbiol.* 56:571-578.

Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler J P, de Nadal E, Ariño J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem.* 275:17249-17255.

Pretorius IS. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16:675-729.

Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J. (1997). Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol.* 63:4005-4009.

Prista C, Michán C, Miranda IM, Ramos J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast.* 33:523-533.

Bibliografía

Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramón D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol.* 58:2948-2953.

Ramírez Orozco M, Hernández-Saavedra NY, Ascencio Valle F, Acosta González B, Ochoa JL. (1998). Cell yield and superoxide dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. *J Mar Biotechnol.* 6:255-259.

Ramos J, Haro R, Rodríguez-Navarro A. (1990). Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta,* 1029:211-217.

Ramos J, Melero Y, Ramos-Moreno L, Michán, C, Cabezas L. (2017). *Debaryomyces hansenii* Strains from Valle De Los Pedroches Iberian Dry Meat Products: Isolation, Identification, Characterization, and Selection for Starter Cultures. *J Microbiol Biotechnol.* 27:1576-1585.

Randez-Gil F, Sanz P, Prieto JA. (1999). Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol.* 17:237-244.

Rodríguez-Manzaneque MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A, Herrero E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19:8180-8190.

Rodríguez-Navarro A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta.* 469:1-30.

Roels JA. (1983). Energetics and kinetics in biotechnology. Pp 1-330. Elsevier, Amsterdam, NY.

Ruis H, Schüller C. (1995). Stress signalling in yeast. *Bioessays.* 17:959-965.

Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Hernández A, Casquete R, de Guía Córdoba M. (2011). Application of *Lactobacillus fermentum* HL57 and *Pediococcus acidilactici* SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* 28: 839-847.

Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K, Mihara T, Takazono T, Kosai K, Imamura Y, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. (2010). Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathol.* 169:81-90.

Saito H, Posas F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics.* 192:289-318.

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

Sánchez NS, Arreguin R., Calahorra M, Pena A. (2008). Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 8:1303-1312.

Sánchez NS, Calahorra M, Ramírez J, Peña A. (2018). Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Biol.* 122:977-990.

Santos MA, Ueda T, Watanabe K, Tuite MF. (1997). The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation? *Mol Microbiol.* 26:423-431.

Segal-Kischinevzky C, Rodarte-Murguía B, Valdés-López V, Mendoza-Hernández G, González A, Alba-Lois L. (2011). The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile. *Curr Microbiol.* 62:933-943.

Selgas MD, Ros J, García ML. (2003). Effect of selected yeast strains on the sensory properties of dry fermented sausages. *Eur Food Res Technol.* 217:475-480.

Serrano R, Rodríguez PL. (2002). Plants, genes and ions. Workshop on the molecular basis of ionic homeostasis and salt tolerance in plants. *EMBO Rep.* 3:116-119.

Serrano R, Rodríguez-Navarro A. (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol.* 13:399-404.

Bibliografía

Sherman D, Durrens P, Beyne E, Nikolski M, Souciet JL. (2004). Génolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res.* 32:315-318.

Sherman F. (1991). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 194:3-21.

Sherman F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350:3-41.

Souciet JL, Dujon B, Gaillardin C, Johnston M, Baret PV, Cliften P, *et al.* (2009). Comparative genomics of protoploid Saccharomycetaceae. *Genome res.* 19: 1696-1709.

Thorpe GW, Reodica M, Davies MJ, Heeren G, Jarolim S, Pillay B, Breitenbach M, Higgins VJ, Dawes IW. (2013). Superoxide radicals have a protective role during H₂O₂ stress. *Mol Biol Cell.* 24:28762884.

Toledano MB, Delaunay A, Monceau L, Tacnet F. (2004). Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* 29: 351-357.

Turk M, Montiel V, Zigon D, Plemenitas A, Ramos J. (2007). Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiol* 153: 3586-3592.

Ventosa A, Márquez MC, Garabito MJ, Arahal DR. (1998). Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles.* 2:297-304.

Vida TA, Emr SD. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol.* 128:779-792.

Wagner D, Sander A, Bertz H, Finke J, Kern WV. (2005). Breakthrough invasive infection due to *Debaryomyces hansenii* (teleomorph *Candida famata*) and *Scopulariopsis brevicaulis* in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin B and caspofungin for suspected aspergillosis. *Infection.* 33:397-400.

Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cel Longev*. doi: 10.1155/2016/4350965.

Zhang L, Onda K, Imai R, Fukuda R, Horiuchi H, Ohta A. (2003). Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Res Commun*. 307:308-314.