

ESTUDIO DE LA GENERACIÓN DE PÉPTIDOS Y SU CARACTERIZACIÓN COMO MARCADORES DE CALIDAD DEL JAMÓN CURADO

**MÁSTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA
2012-2013**

Marta Gallego Ibáñez

Director

Fidel Toldrà Vilardell

Codirectoras

M^a Concepción Aristoy Albert

Leticia Mora Soler

ESTUDIO DE LA GENERACIÓN DE PÉPTIDOS Y SU CARACTERIZACIÓN COMO MARCADORES DE CALIDAD DEL JAMÓN CURADO

Marta Gallego¹, Leticia Mora¹, M^a Concepción Aristoy¹ y Fidel Toldrá¹.

RESUMEN

Durante el procesado del jamón curado tiene lugar una extensa proteólisis debida a la acción de las peptidasas musculares. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la degradación de la proteína 3 de unión al dominio LIM (LDB3), localizada en las líneas Z del sarcómero, a diferentes tiempos durante la elaboración del jamón curado (2, 3.5, 5, 6.5 y 9 meses). La identificación de un gran número de péptidos derivados de dicha proteína así como su evolución a lo largo del proceso de curado se ha logrado por primera vez en jamón. Un total de 107 péptidos han sido identificados por espectrometría de masas en tándem, demostrándose la importante función de las endopeptidasas en la generación de polipéptidos y, principalmente, de las exopeptidasas en la generación de pequeños péptidos. La mayoría de los péptidos identificados han sido generados a partir de la primera región de la secuencia proteica (posición 1 a 90), aportando evidencia de la complejidad y dinamismo de las reacciones proteolíticas a lo largo del proceso de curado del jamón. Además, se ha observado la oxidación del aminoácido metionina en varios péptidos identificados al final del proceso. El potencial de algunos de los péptidos identificados para su uso como biomarcadores del proceso de curado ha sido considerado también en este estudio.

Palabras clave: péptidos, jamón curado, proteólisis, espectrometría de masas, biomarcador, proteína LDB3, oxidación de péptidos.

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)
Avda. Agustín Escardino, 7. 46980, Paterna (Valencia). Telf. 963900022 Ext. 2111

RESUM

Durant el processat del pernil curat té lloc una extensa proteòlisi deguda a l'acció de les peptidases musculars. L'objectiu del present treball va ser estudiar la degradació de la proteïna 3 d'unió al domini LIM (LDB3), la qual està localitzada en les línies Z del sarcòmer, a diferents temps durant l'elaboració del pernil curat (2, 3.5, 5, 6.5 i 9 mesos). La identificació d'un gran nombre de pèptids derivats de dita proteïna així com la seua evolució al llarg del procés de curat s'ha aconseguit per primera vegada en pernil. Un total de 107 pèptids han estat identificats per espectrometria de masses en tàndem, el que mostra la important funció de les endopeptidases en la generació de polipèptids i, principalment, de les exopeptidases en la generació de pèptids menuts. La majoria dels pèptids identificats han sigut generats a partir de la primera regió de la seqüència proteica (posició 1 a 90), aportant evidència de la complexitat i dinamisme de les reaccions proteolítiques al llarg del procés de curat del pernil. A més, l'oxidació de l'aminoàcid metionina s'ha observat en diversos pèptids identificats al final del procés. El potencial d'alguns dels pèptids identificats per al seu ús com biomarcadors del procés de curat ha estat considerat també en aquest estudi.

ABSTRACT

An extensive proteolysis takes places during the processing of dry-cured ham because of the action of muscle peptidases. The aim of this work was to study the degradation of LIM domain binding protein 3 (LDB3), which is located at the Z-lines of the sarcomere, at different times during the Spanish dry-cured ham processing (2, 3.5, 5, 6.5, and 9 months). The identification of a large number of peptides derived from this protein as well as their evolution throughout the dry-curing process has been achieved for the first time in dry-cured ham. A total of 107 peptides have been identified by mass spectrometry in tandem, which shows the role played by endopeptidases in the generation of polypeptides and mainly by exopeptidases in the generation of small peptides. Most of the identified peptides have been generated from the first region of the protein sequence (position 1 to 90) providing evidence for the complexity and dynamism of proteolytic reactions along the whole process of dry-curing. Methionine oxidation has been observed in several peptides by the end of the process. The potential of some of the identified peptides to be used as biomarkers of dry-cured ham processing has also been considered.

INTRODUCCIÓN

El jamón curado es un producto de alta calidad tanto por sus características organolépticas como nutricionales. Durante su proceso de elaboración tienen lugar una serie de reacciones enzimáticas entre las que destaca la proteólisis, donde las proteínas musculares son degradadas progresivamente dando lugar a una gran cantidad de péptidos y aminoácidos que contribuyen al sabor, aroma, textura y calidad final del jamón curado (Aristoy y Toldrá, 1995; Toldrá y Flores, 1998; Lametsch et al., 2003).

La proteína 3 de unión al dominio LIM (referida posteriormente como LDB3, de acuerdo a la base de datos proteica Uniprot), también llamada proteína ZASP (Z-band Alternatively Spliced PDZ-motif protein) o cifer, está localizada en el sarcómero y es esencial para el mantenimiento de la estructura de la línea Z y de la integridad del músculo (Zhou et al., 2001). Aunque es un componente minoritario de la línea Z (alrededor de 1 por 400 de α -actinina), esta proteína es muy importante para el desarrollo miofibrilar y la mecanotransducción durante la contracción muscular. Así, la proteína LDB3 puede actuar como adaptador en la señalización del músculo estriado, ya que une la proteína quinasa C a través de sus tres dominios LIM C-terminales al citoesqueleto, y puede interactuar a través de su dominio PDZ N-terminal con la α -actinina, la cual ayuda al anclaje de los filamentos de actina proporcionando fuerza mecánica a la línea Z (Klaavuniemi, et al., 2004; Luther, 2009).

Las enzimas musculares responsables de los cambios proteicos que ocurren durante el procesado del jamón curado son las endopeptidasas catépsinas y calpaínas, que hidrolizan las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares generando grandes polipéptidos, y las exopeptidasas, tales como las aminopeptidasas, carboxipeptidasas, peptidilpeptidasas y peptidasas, que degradan los polipéptidos en pequeños péptidos y aminoácidos libres (Toldrá et al., 2000; Toldrá y Flores, 1998).

La degradación de proteínas, así como la generación de péptidos y aminoácidos libres durante el proceso de curado del jamón han sido descritas en varios estudios, en los cuales se han usado técnicas como la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el fin de separar los fragmentos proteicos previamente a su identificación (Rodríguez-Núñez et al., 1995; Hansen-Møller et al., 1997; Sentrandreu et al., 2003). Sin embargo, la identificación de los péptidos generados de forma natural durante la proteólisis sólo ha sido posible a través del uso de técnicas proteómicas de última generación como la espectrometría de masas en tándem. De hecho, recientes estudios proteómicos han identificado péptidos derivados de proteínas miofibrilares tales como actina, cadena ligera de miosina, titina o troponina T (Luccia et al., 2005; Sentandreu et al., 2007; Mora et al., 2009a; Mora et al., 2010), y de proteínas sarcoplásmicas como creatina quinasa, mioglobina o enzimas glicolíticas (Mora et al., 2009b; Mora et al., 2011; Mora y Toldrá, 2012). Además, algunos estudios han investigado cómo algunos compuestos participantes en el metabolismo muscular tales como la ratio hipoxantina/inosina (Hx/Ino), podrían servir de

marcadores del tiempo de curado del jamón (Escudero et al., 2011). No obstante, de acuerdo a nuestro conocimiento, no hay estudios hasta la fecha basados en la evolución de péptidos generados de forma natural a partir de la degradación proteica durante el proceso de curado del jamón.

El principal objetivo de este estudio ha sido la caracterización proteómica de la proteína LDB3 para identificar los péptidos generados de forma natural a diferentes tiempos (2, 3.5, 5, 6.5 y 9 meses) durante el procesamiento del jamón curado, y así estudiar su evolución y describir algunos de los cambios proteolíticos que tienen lugar durante el proceso. Asimismo, se ha estudiado el potencial de algunos de los péptidos identificados como biomarcadores del tiempo de curado del jamón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del jamón curado

El estudio fue realizado por triplicado utilizando jamones crudos procedentes de cerdos de 6 meses de edad del cruce Landrace x Large White para la elaboración de los jamones curados. Los jamones fueron sangrados y preparados de acuerdo a los procedimientos tradicionales consistentes en el pre-salado, fase en la que los jamones se frotan con una mezcla de sales de curado (sal, nitrato y nitrito) durante 30 minutos; la fase de salado, en la que son cubiertos totalmente con sal, apilados y mantenidos durante 1,1 días/kg jamón, a 2-4 °C y a una humedad relativa de 90-95%; el post-salado, etapa en la que permanecen 60 días a 4-5 °C y 75-85% de humedad relativa; y finalmente la etapa de maduración-secado, en la que la temperatura va aumentando desde 5 °C a 14-20 °C y la humedad relativa va disminuyendo hasta un 70%. El tiempo total del proceso de curado de los jamones fue de 9 meses.

Las muestras de jamón a ensayar fueron seleccionadas a diferentes tiempos del proceso: 2 meses (al final del post-salado), 3.5, 5 y 6.5 meses (durante la fase de maduración-secado) y 9 meses (al final del curado).

Extracción y desproteización del jamón curado

Un total de 50 g de músculo *Biceps femoris* de cada tiempo de muestreo de los jamones procesados se picaron y se homogeneizaron con 200 ml de HCl 0.01 N durante 8 min en un stomacher (IUL Instrument, Barcelona, España). El homogenizado fue centrifugado a 10.000 rpm durante 20 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante tras filtrarse con lana de vidrio y el extracto resultante fue desproteizado mediante la adición de 3 volúmenes de etanol y manteniéndolo a 4 °C durante 20 h. A continuación, la muestra fue centrifugada a 10.000 rpm y 4 °C durante 10 min y el sobrenadante fue secado mediante un evaporador rotatorio, eliminando así el agente desproteizante. Finalmente, el extracto seco desproteizado fue disuelto en 25 ml de 0.01 N HCl, filtrado a través de filtros de membrana de nylon de 45 µm (Millipore, Bedford, MA) y guardado a -20 °C hasta su uso.

Fraccionamiento de péptidos por cromatografía de exclusión molecular

El fraccionamiento de los extractos desproteinizados de jamón curado se realizó de acuerdo a su tamaño mediante cromatografía de exclusión molecular. Para ello, se inyectó una alícuota de 5 ml en una columna Sephadex G25 (2,5 x 65 cm, Amersham Biosciencias, Uppsala, Suecia) previamente equilibrada con HCl 0,01 N. La separación se llevó a cabo a 4 °C, usando HCl 0,01 N como fase móvil y a un flujo de 15 ml/h. Un colector automático fue recogiendo fracciones de 5 ml, midiéndose después la absorción ultravioleta a 214 nm (Ultrospec 3000 UV/Visible spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) de cada una de ellas y así obtener el perfil peptídico de la muestra. Finalmente, se seleccionaron las fracciones correspondientes a los volúmenes de elución de 125 ml a 160 ml, se agruparon y se liofilizaron en alícuotas de 100 µl para la posterior separación e identificación peptídica.

Identificación de péptidos por cromatografía líquida de nanoflujo y espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS)

El análisis por nanoLC-MS/MS se llevó a cabo mediante cromatografía líquida utilizando el nano sistema Ultimate 3000 RSLC de Dionex (Thermo Fisher Scientific Ltd, Leicestershire, Reino Unido), acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica AmaZon ETD y equipado a su vez con una fuente de ionización por nanoelectrospray (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania)

Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en 100 µl de agua con 0,1% de ácido fórmico (AF). Seguidamente, se tomaron 10 µl de la solución y se añadieron 10 µl de agua:acetonitrilo (98:2, v/v) con 0,1 % v/v de AF. Las muestras fueron guardadas en frío durante 30 min y centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 min. Después, 2 µl del sobrenadante fueron inyectados en el sistema LC-MS mediante un inyector automático, en el que primeramente las muestras fueron preconcentradas en una columna Dionex Acclaim® PepMap 100 (100 µm x 2 cm, C18, 5 µm, 100 Å) (Dionex Corporation, LC Packings), a un flujo de 4 µl/min y usando 0,1 % v/v de AF como fase móvil. Tras 3 min de preconcentración, la precolumna fue conectada automáticamente a una nano columna Dionex Acclaim® PepMap RSLC (75 µm x 15 cm, C18, 2 µm, 100 Å) (Dionex Corporation, LC Packings). Las fases móviles utilizadas fueron fase A conteniendo 0,1 % v/v de AF en agua, y la fase B con 0,1 % v/v de AF en 100% de acetonitrilo. Las condiciones cromatográficas para la separación de los péptidos fueron un gradiente lineal desde 5 % a 40 % de fase B durante 70 min, un flujo de 0,250 µl/min y una temperatura de 30 °C.

La salida de la columna del cromatógrafo líquido fue directamente acoplada a una fuente de ionización por nanoelectrospray. El spray de iones fue generado mediante un voltaje entre 1,8 kV – 2,0 kV, y se utilizó nitrógeno como gas de colisión con una presión de nebulización de 15 psi y una temperatura capilar de 200 °C. El espectrómetro de masas de trampa iónica operó en modo positivo y la trampa iónica se utilizó en MS2 con el objetivo

de mejorar la resolución en el rango de m/z de 50 a 3.000 y a una velocidad de 8.100 m/z por segundo. El primer escáner de MS cubrió un intervalo de valores de 300 a 1.500 m/z , con un tiempo de acumulación máximo de 50 ms y una media de 5. Otros parámetros de la fuente se optimizaron con una digestión de la proteína BSA con la enzima tripsina.

El procesado automático de los espectros, la generación de la lista de picos y la búsqueda en la base de datos se realizó mediante el software Mascot Distiller v2.4.2.0 (Matrix Science, Inc., Boston, MA) (<http://www.matrixscience.com>). Se utilizó la oxidación de metionina como modificación variable en la interfase de búsqueda Mascot. Además, la identificación del origen proteico de los péptidos se llevó a cabo mediante las bases de datos de proteínas Uniprot y NCBI nr, con un nivel de significación de $p < 0,05$, y una tolerancia en las medidas de masas de 100 ppm en el modo MS y de 0,3 Da para los iones del MS/MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cada extracto de muestra desproteínizada fue fraccionado por cromatografía de exclusión molecular, y las fracciones correspondientes al primer pico eluido (un total de 7 fracciones de 5 ml cada una) fueron juntadas y liofilizadas, de forma que éstas contenían los péptidos de mayor tamaño que permanecieron en disolución tras la precipitación proteica con etanol. Posteriormente, las fracciones obtenidas a cada tiempo de procesado fueron analizadas por nLC-MS/MS para identificar su contenido peptídico.

Todas las secuencias peptídicas identificadas en este trabajo mediante Uniprot provienen, de acuerdo a esta base de datos de proteínas, de la proteína 3 de unión al dominio LIM (LDB3) de la especie *Homo sapiens*. Además, BLAST reveló un 100% de homología de los péptidos identificados con una proteína no caracterizada en *Sus scrofa*. Estos resultados se deben a que la proteína LDB3 ha sido caracterizada en humano y bovino (*Bos taurus*) pero no en la especie porcina. Así pues, la Figura 1 muestra el alineamiento de secuencias de la proteína estudiada entre las especies *Sus scrofa*, *Homo sapiens* y *Bos taurus*. La búsqueda de similitud de secuencias mediante BLAST reveló un 87% de homología entre las secuencias de la proteína porcina y humana (correspondientes a los números de acceso F1SEN8 y O75112, respectivamente, de la base de datos Uniprot). Sin embargo, la proteína LDB3 no ha sido completamente secuenciada en la especie bovina (número de acceso Q3ZBC9 de la base de datos Uniprot), de modo que *Sus scrofa* y *Bos taurus* sólo comparten un fragmento de secuencia correspondiente al 42% de la longitud total de la proteína. BLAST reveló un 93% de homología entre ambas especies.

El estudio de la acción de las enzimas proteolíticas sobre la secuencia de la proteína LDB3 a cada tiempo de procesado del jamón curado (2, 3.5, 5, 6.5 y 9 meses) se muestra en la Figura 2. Puede observarse que la región de la secuencia comprendida entre los residuos 1 y 90 es la que presenta mayor número de sitios de escisión, debido probablemente a una acción más intensa de las proteasas musculares sobre esta zona de la secuencia.

2 meses	
1	MSYSVTLTGP GPWGFRLQGG KDFNMPLTIS RITPGSKAAQ SQLSQGDIVV AIDGVNTDTM THLEAQNLIK SASYNLSLTL QKSKRPIPISTAVPPIQSPL
101	PVIPHQKDEA LDANSSLAAP SHPEARASP GTPGTPEHGL TFSSSFSQTS VFSHTEASD LGPPRGSFGA KTSLEGALDS LSLKGLGSS QRFQYNNPIG
201	LYSAETLREM AQMYQMSLRG KASGAGLLGG SLPIKDLTVD SASPVYQAVI KNQNKPEDEA DEWARRSSNL QRSFRILAQ MTGTEYMQDP DEEALRRSST
301	PIEHAFVCTS QAATPELLPAS AQFPAAASPS TASPPLATAA AHTATASAAA PASSPADSPR PQASAYSFAV ATSPAPAHT YSEAPAAPAP KPRVVTTASI
401	RPSVYQVFA STYSPSPGAN YSPTPYTSP APAYTSPAP TYSFPAPAY TSPFAPSYPN TFPYSGGPAES ASRPFVWTTD SFSQKFAFGK STTISIKQSL
501	PRGAPAYTTP LQGPQVSPLA RGTVQRAERF PASSRTPLOG HCNSIIRGPF LVAMGRSWHP EEFNCAYCKT SLADVCFVEE QNNVYCERCY EQFPAPVCAK
601	CNTKIMGEVM HALRQTWHTT CFVCAACKPK FGNSLFHMED GEPLYCEKDYV NLFSTKCHGC DFPVEAGDKF IEALGHTWHD TCFICAVCHV NLEGQPFYYSK
701	KDKPLCKKHA HAINV

3.5 meses	
1	MSYSVTLTGP GPWGFRLQGG KDFNMPLTIS RITPGSKAAQ SQLSQGDIVV AIDGVNTDTM THLEAQNLIK SASYNLSLTL QKSKRPIPISTAVPPIQSPL
101	PVIPHQKDEA LDANSSLAAP SHPEARASP GTPGTPEHGL TFSSSFSQTS VFSHTEASD LGPPRGSFGA KTSLEGALDS LSLKGLGSS QRFQYNNPIG
201	LYSAETLREM AQMYQMSLRG KASGAGLLGG SLPIKDLTVD SASPVYQAVI KNQNKPEDEA DEWARRSSNL QRSFRILAQ MTGTEYMQDP DEEALRRSST
301	PIEHAFVCTS QAATPELLPAS AQFPAAASPS TASPPLATAA AHTATASAAA PASSPADSPR PQASAYSFAV ATSPAPAHT YSEAPAAPAP KPRVVTTASI
401	RPSVYQVFA STYSPSPGAN YSPTPYTSP APAYTSPAP TYSFPAPAY TSPFAPSYPN TFPYSGGPAES ASRPFVWTTD SFSQKFAFGK STTISIKQSL
501	PRGAPAYTTP LQGPQVSPLA RGTVQRAERF PASSRTPLOG HCNSIIRGPF LVAMGRSWHP EEFNCAYCKT SLADVCFVEE QNNVYCERCY EQFPAPVCAK
601	CNTKIMGEVM HALRQTWHTT CFVCAACKPK FGNSLFHMED GEPLYCEKDYV NLFSTKCHGC DFPVEAGDKF IEALGHTWHD TCFICAVCHV NLEGQPFYYSK
701	KDKPLCKKHA HAINV

5 meses	
1	MSYSVTLTGP GPWGFRLQGG KDFNMPLTIS RITPGSKAAQ SQLSQGDIVV AIDGVNTDTM THLEAQNLIK SASYNLSLTL QKSKRPIPISTAVPPIQSPL
101	PVIPHQKDEA LDANSSLAAP SHPEARASP GTPGTPEHGL TFSSSFSQTS VFSHTEASD LGPPRGSFGA KTSLEGALDS LSLKGLGSS QRFQYNNPIG
201	LYSAETLREM AQMYQMSLRG KASGAGLLGG SLPIKDLTVD SASPVYQAVI KNQNKPEDEA DEWARRSSNL QRSFRILAQ MTGTEYMQDP DEEALRRSST
301	PIEHAFVCTS QAATPELLPAS AQFPAAASPS TASPPLATAA AHTATASAAA PASSPADSPR PQASAYSFAV ATSPAPAHT YSEAPAAPAP KPRVVTTASI
401	RPSVYQVFA STYSPSPGAN YSPTPYTSP APAYTSPAP TYSFPAPAY TSPFAPSYPN TFPYSGGPAES ASRPFVWTTD SFSQKFAFGK STTISIKQSL
501	PRGAPAYTTP LQGPQVSPLA RGTVQRAERF PASSRTPLOG HCNSIIRGPF LVAMGRSWHP EEFNCAYCKT SLADVCFVEE QNNVYCERCY EQFPAPVCAK
601	CNTKIMGEVM HALRQTWHTT CFVCAACKPK FGNSLFHMED GEPLYCEKDYV NLFSTKCHGC DFPVEAGDKF IEALGHTWHD TCFICAVCHV NLEGQPFYYSK
701	KDKPLCKKHA HAINV

6.5 meses	
1	MSYSVTLTGP GPWGFRLQGG KDFNMPLTIS RITPGSKAAQ SQLSQGDIVV AIDGVNTDTM THLEAQNLIK SASYNLSLTL QKSKRPIPISTAVPPIQSPL
101	PVIPHQKDEA LDANSSLAAP SHPEARASP GTPGTPEHGL TFSSSFSQTS VFSHTEASD LGPPRGSFGA KTSLEGALDS LSLKGLGSS QRFQYNNPIG
201	LYSAETLREM AQMYQMSLRG KASGAGLLGG SLPIKDLTVD SASPVYQAVI KNQNKPEDEA DEWARRSSNL QRSFRILAQ MTGTEYMQDP DEEALRRSST
301	PIEHAFVCTS QAATPELLPAS AQFPAAASPS TASPPLATAA AHTATASAAA PASSPADSPR PQASAYSFAV ATSPAPAHT YSEAPAAPAP KPRVVTTASI
401	RPSVYQVFA STYSPSPGAN YSPTPYTSP APAYTSPAP TYSFPAPAY TSPFAPSYPN TFPYSGGPAES ASRPFVWTTD SFSQKFAFGK STTISIKQSL
501	PRGAPAYTTP LQGPQVSPLA RGTVQRAERF PASSRTPLOG HCNSIIRGPF LVAMGRSWHP EEFNCAYCKT SLADVCFVEE QNNVYCERCY EQFPAPVCAK
601	CNTKIMGEVM HALRQTWHTT CFVCAACKPK FGNSLFHMED GEPLYCEKDYV NLFSTKCHGC DFPVEAGDKF IEALGHTWHD TCFICAVCHV NLEGQPFYYSK
701	KDKPLCKKHA HAINV

9 meses	
1	MSYSVTLTGP GPWGFRLQGG KDFNMPLTIS RITPGSKAAQ SQLSQGDIVV AIDGVNTDTM THLEAQNLIK SASYNLSLTL QKSKRPIPISTAVPPIQSPL
101	PVIPHQKDEA LDANSSLAAP SHPEARASP GTPGTPEHGL TFSSSFSQTS VFSHTEASD LGPPRGSFGA KTSLEGALDS LSLKGLGSS QRFQYNNPIG
201	LYSAETLREM AQMYQMSLRG KASGAGLLGG SLPIKDLTVD SASPVYQAVI KNQNKPEDEA DEWARRSSNL QRSFRILAQ MTGTEYMQDP DEEALRRSST
301	PIEHAFVCTS QAATPELLPAS AQFPAAASPS TASPPLATAA AHTATASAAA PASSPADSPR PQASAYSFAV ATSPAPAHT YSEAPAAPAP KPRVVTTASI
401	RPSVYQVFA STYSPSPGAN YSPTPYTSP APAYTSPAP TYSFPAPAY TSPFAPSYPN TFPYSGGPAES ASRPFVWTTD SFSQKFAFGK STTISIKQSL
501	PRGAPAYTTP LQGPQVSPLA RGTVQRAERF PASSRTPLOG HCNSIIRGPF LVAMGRSWHP EEFNCAYCKT SLADVCFVEE QNNVYCERCY EQFPAPVCAK
601	CNTKIMGEVM HALRQTWHTT CFVCAACKPK FGNSLFHMED GEPLYCEKDYV NLFSTKCHGC DFPVEAGDKF IEALGHTWHD TCFICAVCHV NLEGQPFYYSK
701	KDKPLCKKHA HAINV

Figure 2. Secuencia primaria de la proteína LDB3 de *Sus scrofa* (número de acceso F1SEN8 de la base de datos proteica Uniprot). Los sitios de escisión de las enzimas proteolíticas a cada tiempo de procesado se indican con flechas negras.

Un total de 107 péptidos generados a partir de la proteína LDB3 han sido identificados en los diferentes tiempos de procesado del jamón curado, como se muestra en las Tablas 1, 2 y 3. En ellas se enumeran las secuencias de los péptidos caracterizados, la posición de los péptidos identificados en la proteína de origen, los aminoácidos anterior y posterior a las secuencias identificadas, la masa observada y calculada junto con el estado de carga de cada péptido y los tiempos de procesado en los que los péptidos han sido identificados.

Como puede observarse en la Tabla 1, existe una evidente acción de las aminopeptidasas y carboxipeptidasas en la generación de los péptidos identificados desde la posición 1 a 90 de la secuencia de la proteína LDB3. Sin embargo, las catepsinas serían las responsables de la rotura de la proteína y la generación de la mayoría de polipéptidos identificados en el resto de la secuencia (posición 91 a 715), ya que las calpaínas no son activas tras la etapa de salado (Rosell y Toldrá, 1996). Así, los péptidos 11 a 17 muestran la pérdida secuencial de fenilalanina (F), asparagina (N), metionina-prolina (MP), leucina (L), treonina (T) e isoleucina-serina (IS) a partir del extremo N-terminal, probablemente por la acción de las aminopeptidasas y dipeptidilpeptidasas que permanecen activas durante todo el proceso de curado. Además, las carboxipeptidasas generan aminoácidos libres a partir del carboxilo terminal de los péptidos, como ocurre con los aminoácidos leucina (L, en el péptido 27), ácido aspártico (D, en el péptido 30), y glicina (G, en el péptido 31), compartiendo los tres péptidos la secuencia FNMPLTISRITPGSKAAQSQLSQ (péptido 31). Por otro lado, las tripeptidilpeptidasas podrían ser las responsables de la pérdida en N-terminal de tripéptidos como serina-valina-treonina (SVT), generando los péptidos 2, 4 y 6 a partir de los péptidos 1, 3 y 5 respectivamente, así como la pérdida del tripéptido asparagina-metionina-prolina (NMP) a partir del péptido 35 para generar el péptido 36, o del tripéptido ácido glutámico-alanina-glutamina (EAQ) a partir de los péptidos 58 y 60 para generar los péptidos 59 y 61, respectivamente. Como ejemplo, en la Figura 3 se observan los espectros de MS/MS obtenidos para la identificación de los péptidos 6 y 7, mostrando la pérdida del dipéptido arginina-leucina (RL) a partir del extremo C-terminal del péptido 6 para generar el péptido 7.

La generación de los péptidos identificados en la Tabla 2 podría ser el resultado de la acción de las endopeptidasas sobre la proteína LDB3. Por ejemplo, los péptidos 66, 74, 77, 81, 90 y 95, o el péptido 64 de la Tabla 1, los cuales han sido identificados durante la fase de curado, habrían sido generados por la acción de las catepsinas. Pero además, los péptidos pueden ser posteriormente degradados por exopeptidasas, dando lugar a pequeños péptidos y aminoácidos libres, como ocurre en el péptido 65 el cual es generado a partir del péptido 64, o los péptidos 83 y 84 que se generan a partir del péptido 82.

La proteólisis es un proceso dinámico y variable en el que las proteasas musculares llevan a cabo su acción de forma aleatoria a lo largo de todo el proceso de curado. La complejidad de la proteólisis es notable, ya que continuamente nuevos péptidos son generados e hidrolizados por la acción de las endopeptidasas y exopeptidasas (Rodríguez-Núñez et al., 1995;

Toldrá et al., 1997), tal como se muestra en las Tablas 1 y 2. De esta manera, la gran cantidad de enzimas que actúan durante la proteólisis darían lugar a la generación de una compleja mezcla de péptidos con sitios de escisión inespecíficos. Algunos de estos péptidos están presentes, a determinados tiempos de procesado, a bajas concentraciones y no llegan a acumularse debido a la constante degradación, por lo que no pueden ser detectados mediante técnicas de espectrometría de masas. Este hecho podría explicar la no identificación de algunos péptidos a ciertos tiempos de procesado pero sí su identificación a tiempos posteriores, como ocurre en el caso de los péptidos 33, 42 y 88, entre otros.

La preocupación por la oxidación de los aminoácidos esenciales, como la metionina, se debe a su efecto sobre la calidad de la carne y sobre su valor nutritivo, ya que este proceso supone una disminución tanto de la disponibilidad de aminoácidos esenciales como de la digestibilidad de las proteínas oxidadas (Strange, 1984; Lund et al., 2011). La mayoría de estudios realizados se han centrado en mejorar el conocimiento acerca de los mecanismos de oxidación de proteínas y en desarrollar nuevos métodos de análisis para evaluar la oxidación proteica en productos cárnicos cocinados o curados (Armenteros et al., 2009). Sin embargo, no hay estudios sobre la identificación de péptidos, con modificaciones en sus aminoácidos, generados de manera natural durante el procesado de los productos cárnicos. En este trabajo, la oxidación del aminoácido metionina ha sido observada en 12 péptidos (Tabla 3), y 6 de ellos muestran tal modificación al final del proceso de curado (9 meses), mientras los otros son oxidados un poco antes. Esto indica que la oxidación de metionina tiende a ocurrir principalmente en las últimas etapas del curado del jamón. Estos resultados están de acuerdo con un estudio previo que muestra que la oxidación de proteínas aumenta conforme avanza el tiempo de maduración del jamón (Koutina, et al., 2012).

Finalmente, la identificación de algunos péptidos que permanecen estables durante las primeras etapas del proceso de curado del jamón, como el caso del péptido 6 que ha sido identificado desde los 2 a los 6.5 meses, o el péptido 11 que ha sido identificado desde los 2 a los 5 meses, así como el hecho de que algunos péptidos sólo han sido detectados al final del proceso (a los 9 meses de curado) como ocurre en los péptidos 35, 36 y 37 o desde los péptidos 43 al 46, podría sugerir el uso potencial de estos péptidos como una manera de estimar y controlar el tiempo de procesado. Sin embargo, serían necesarios estudios adicionales para considerar y confirmar el uso de estos péptidos como biomarcadores del proceso del jamón curado.

Tabla 1. Péptidos identificados por nLC-MS/MS desde la posición 1 a 90 de la proteína LDB3 en jamón curado (número de acceso F1SEN8 de la base de datos de proteínas Uniprot).

No.	Posición ^a	P ₀ ^b	Secuencia	P _f ^c	Obs. ^d (m/z)	Carga (+)	Calc. ^e (m/z)	Identificación ^f				
								2 m.	3.5 m.	5 m.	6.5 m.	9 m.
1	4-22	Y	SVTLTGPGFPWGFRLQGGKD	F	658,23	3	1972,02		x			
2	7-22	T	LTGPGFPWGFRLQGGKD	F	562,49	3	1684,87		x			
3	4-19	Y	SVTLTGPGFPWGFRLQG	G	836,75	2	1671,87		x			
4	7-19	T	LTGPGFPWGFRLQG	G	693,40	2	1384,73		x			
5	4-17	Y	SVTLTGPGFPWGFRL	Q	744,22	2	1486,79	x	x			
6	7-17	T	LTGPGFPWGFRL	Q	600,73	2	1199,65	x	x	x	x	
7	7-15	T	LTGPGFPWGF	R	466,12	2	930,46		x			
8	7-15	T	LTGPGFPWGF	R	931,23	1	930,46	x	x			
9	7-12	T	LTGPGFP	W	540,79	1	540,29		x			
10	11-23	P	GPWGFRLQGGKDF	N	488,84	3	1463,73	x				
11	23-53	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSQLSQGDLVVAID	G	1086,60	3	3256,71	x	x	x		
12	24-53	F	NMPLTISRITPGSKAAQSQLSQGDLVVAID	G	1037,66	3	3109,64		x			
13	25-53	N	MPLTISRITPGSKAAQSQLSQGDLVVAID	G	999,39	3	2995,60		x			
14	27-53	P	LTISRITPGSKAAQSQLSQGDLVVAID	G	923,60	3	2767,51	x	x	x	x	x
15	28-53	L	TISRITPGSKAAQSQLSQGDLVVAID	G	885,56	3	2654,42		x			x
16	29-53	T	ISRITPGSKAAQSQLSQGDLVVAID	G	851,94	3	2553,38					x
17	31-53	S	RITPGSKAAQSQLSQGDLVVAID	G	785,24	3	2353,26		x	x	x	x
18	39-53	A	AQSQLSQGDLVVAID	G	772,21	2	1542,79		x	x	x	x
19	42-53	S	QSQLSQGDLVVAID	G	629,20	2	1256,66					x
20	44-53	L	SQGDLVVAID	G	1016,27	1	1015,52					x
21	47-53	G	DLVVAID	G	744,23	1	743,41			x		x
22	48-53	D	LVVAID	G	629,26	1	628,38					x
23	23-51	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSQLSQGDLVVA	I	1010,75	3	3028,60	x	x			x

Continuación Tabla 1

No.	Posición ^a	P ₀ ^b	Secuencia	P _i ^c	Obs. ^d (m/z)	Carga (+)	Calc. ^e (m/z)	Identificación ^f					
								2 m.	3.5 m.	5 m.	6.5 m.	9 m.	
24	47-51	G	DLVVA	I	516,01	1	515,30						x
25	23-50	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSLSQGLVV	A	986,59	3	2957,56		x				
26	23-48	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSLSQGL	V	920,90	3	2759,43	x	x	x	x	x	
27	23-47	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSLSQGD	L	882,87	3	2646,34	x	x	x	x	x	
28	27-47	P	LTISRITPGSKAAQSLSQGD	L	719,97	3	2157,14	x					x
29	31-47	S	RITPGSKAAQSLSQGD	L	581,96	3	1742,89						x
30	23-46	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSLSQG	D	844,41	3	2531,32		x				
31	23-45	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSLSQ	G	825,63	3	2474,30	x	x	x			x
32	31-45	S	RITPGSKAAQSLSQ	G	524,49	3	1570,84						x
33	23-43	D	FNMPLTISRITPGSKAAQS QL	S	753,91	3	2259,20	x		x	x	x	
34	23-43	D	FNMPLTISRITPGSKAAQS QL	S	1130,81	2	2259,20		x				x
35	24-43	F	NMPLTISRITPGSKAAQS QL	S	705,25	3	2112,14						x
36	27-43	P	LTISRITPGSKAAQS QL	S	590,86	3	1770,00						x
37	31-43	S	RITPGSKAAQS QL	S	678,71	2	1355,75						x
38	32-43	R	ITPGSKAAQS QL	S	401,25	3	1199,65			x			
39	23-42	D	FNMPLTISRITPGSKAAQS Q	L	716,44	3	2146,12		x				x
40	23-40	D	FNMPLTISRITPGSKAAQ	S	644,52	3	1931,03			x			x
41	23-38	D	FNMPLTISRITPGSKA	A	578,21	3	1731,93	x	x	x	x	x	
42	23-38	D	FNMPLTISRITPGSKA	A	866,76	2	1731,93	x	x	x			x
43	27-38	P	LTISRITPGSKA	A	415,15	3	1242,73						x
44	29-38	T	ISRITPGSKA	A	515,18	2	1028,60						x
45	31-38	S	RITPGSKA	A	415,17	2	828,48						x
46	23-37	D	FNMPLTISRITPGSK	A	554,64	3	1660,90						x
47	32-37	R	ITPGSK	A	301,64	2	601,34			x			

Continuación Tabla 1

No.	Posición ^a	P ₀ ^b	Secuencia	P _i ^c	Obs. ^d (m/z)	Carga (+)	Calc. ^e (m/z)	Identificación ^f						
								2 m.	3.5 m.	5 m.	6.5 m.	9 m.		
48	23-30	D	FNMPLTIS	R	461,62	2	921,46							x
49	23-30	D	FNMPLTIS	R	922,24	1	921,46	x	x	x	x			x
50	23-28	D	FNMPLT	I	722,20	1	721,35							x
51	23-27	D	FNMPL	T	621,18	1	620,30							x
52	28-58	L	TISRITPGSKAAQSQLSQGDLVVAIDGVNTD	T	1047,57	3	3140,63						x	
53	38-58	A	AQSQLSQGDLVVAIDGVNTD	T	677,36	3	2029,00		x					
54	42-57	L	SQGDLVVAIDGVNT	D	694,58	2	1386,70							x
55	48-63	D	LVVAIDGVNTDTMTHL	E	849,72	2	1697,87		x					
56	61-67	M	THLEAQN	K	406,61	2	811,38		x					
57	67-77	Q	NKIKSASYNLS	L	612,68	2	1223,65		x					
58	64-75	L	EAQNKIKSASYN	L	676,67	2	1351,67		x					
59	67-75	Q	NKIKSASYN	L	512,64	2	1023,53		x					
60	64-74	L	EAQNKIKSASY	N	619,68	2	1237,63		x					
61	67-74	Q	NKIKSASY	N	455,64	2	909,49	x	x	x	x	x		x
62	68-74	N	KIKSASY	N	398,64	2	795,45	x	x					x
63	68-74	N	KIKSASY	N	796,25	1	795,45		x					
64	78-90	S	LTLQKSKRPIPIIS	T	494,10	3	1479,91						x	
65	78-86	S	LTLQKSKRP	I	535,72	2	1069,66		x					

^a Posición de los péptidos identificados dentro de la secuencia de la proteína LDB3.

^b Residuo de aminoácido previo a la secuencia del péptido.

^c Residuo de aminoácido posterior a la secuencia del péptido.

^d Masa molecular del ion observado en el sistema nLC-MS/MS, calculada en Daltons (Da).

^e Masa relativa calculada en Daltons del péptido identificado.

^f Péptidos identificados a cada tiempo de procesamiento del jamón.

Tabla 2. Péptidos identificados por nLC-MS/MS desde la posición 91 a 715 de la proteína LDB3 en jamón curado (número de acceso F1SEN8 de la base de datos de proteínas Uniprot).

No.	Posición ^a	P ₀ ^b	Secuencia	P _f ^c	Obs. ^d (m/z)	Carga (+)	Calc. ^e (m/z)	Identificación ^f				
								2 m.	3.5 m.	5 m.	6.5 m.	9 m.
66	92-97	T	AVPPIQ	S	625,34	1	623,36		x			
67	112-128	L	DANSSLAAPSPHPEARA	S	845,71	2	1689,81					x
68	112-116	L	DANSS	L	493,68	1	492,18	x				
69	126-140	E	ARASPGTPTPEHGL	T	723,77	2	1446,72			x		
70	187-191	P	LGSSQ	P	490,82	1	490,24	x				
71	221-226	G	KASGAG	L	490,85	1	489,25					x
72	212-225	A	QMYQMSLRGKASGA	G	509,76	3	1526,73	x				
73	226-230	A	GLLGG	S	417,12	1	415,24		x			
74	239-243	T	VDSAS	P	478,56	1	477,21		x			
75	262-271	D	EWARRSSNLQ	S	623,43	2	1245,62		x			
76	304-308	E	HAPVC	T	525,05	1	525,24				x	
77	311-319	S	QAATPLLPA	S	440,88	2	880,50				x	
78	320-324	A	SAQPP	A	498,51	1	498,24				x	
79	322-326	A	QPPAA	A	482,34	1	482,25				x	
80	346-351	T	ASAAAP	A	487,77	1	486,24					x
81	361-366	R	PQASAY	S	637,25	1	635,29		x			
82	384-395	E	APAAPAPKPRVV	T	587,61	2	1172,70					x
83	387-391	A	APAPK	P	482,29	1	482,29	x				
84	385-390	A	PAAPAP	K	522,70	1	522,28			x		x
85	398-402	T	ASIRP	S	542,95	1	542,32	x				
86	406-410	Y	QFVPA	S	511,14	1	510,28	x				
87	408-413	P	VPASTY	S	637,12	1	636,31					x

Continuación Tabla 2

No.	Posición ^a	P ₀ ^b	Secuencia	P _f ^c	Obs. ^d (m/z)	Carga (+)	Calc. ^e (m/z)	Identificación ^f				
								2 m.	3.5 m.	5 m.	6.5 m.	9 m.
88	446-450	S	PAPAY	T	518,14	1	517,25	x	x		x	
89	435-444	Y	TPSPAPTYSP	S	340,20	3	1016,48	x		x	x	
90	467-472	G	PAESAS	R	560,19	1	560,24					x
91	499-510	Q	SLPRGAPAYTPP	L	409,20	3	1225,65		x			
92	506-511	P	AYTPPL	Q	662,40	1	660,35				x	
93	508-513	Y	TPPLQG	P	612,78	1	611,33	x				
94	596-604	A	PVCAKCNK	I	963,77	1	962,47		x			
95	665-669	V	EAGDK	F	519,97	1	518,23		x			

^a Posición de los péptidos identificados dentro de la secuencia de la proteína LDB3.

^b Residuo de aminoácido previo a la secuencia del péptido.

^c Residuo de aminoácido posterior a la secuencia del péptido.

^d Masa molecular del ion observado en el sistema nLC-MS/MS, calculada en Daltons (Da).

^e Masa relativa calculada en Daltons del péptido identificado.

^f Péptidos identificados a cada tiempo de procesado del jamón.

Tabla 3. Péptidos identificados por nLC-MS/MS a partir de la proteína LDB3 en jamón curado con una oxidación de metionina (número de acceso F1SEN8 de la base de datos de proteínas Uniprot).

No.	Posición ^a	P ₀ ^b	Secuencia	P _f ^c	Obs. ^d (m/z)	Carga (+)	Calc. ^e (m/z)	Identificación ^f					
								2 m.	3.5 m.	5 m.	6.5 m.	9 m.	
96	23-53	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSQSLVVAID	G	1091,71	3	3272,71		x	x			x
97	23-47	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSQSLQGD	L	888,30	3	2662,34						x
98	23-45	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSQSLQ	G	830,88	3	2490,29						x
99	23-43	D	FNMPLTISRITPGSKAAQSQL	S	759,28	3	2275,20						x
100	23-40	D	FNMPLTISRITPGSKAAQ	S	649,77	3	1947,02						x
101	23-38	D	FNMPLTISRITPGSKA	A	583,53	3	1747,93						x
102	59-63	D	TMTHL	E	309,63	2	617,28				x	x	
103	59-67	D	TMTHLEAQN	K	353,97	3	1059,47		x				
104	197-219	N	NPIGLYSAETLREMAQMYQMSLR	G	906,56	3	2717,30		x				
105	207-226	T	LREMAQMYQMSLRGKASGAG	L	733,99	3	2200,06	x					
106	593-611	Q	FFAPVCAKCN TKIMGEVMH ^g	A	1079,59	2	2156,99		x				
107	602-613	C	NTKIMGEVMHAL	R	680,83	2	1358,67				x		

^a Posición de los péptidos identificados dentro de la secuencia de la proteína LDB3.

^b Residuo de aminoácido previo a la secuencia del péptido.

^c Residuo de aminoácido posterior a la secuencia del péptido.

^d Masa molecular del ion observado en el sistema nLC-MS/MS, calculada en Daltons (Da).

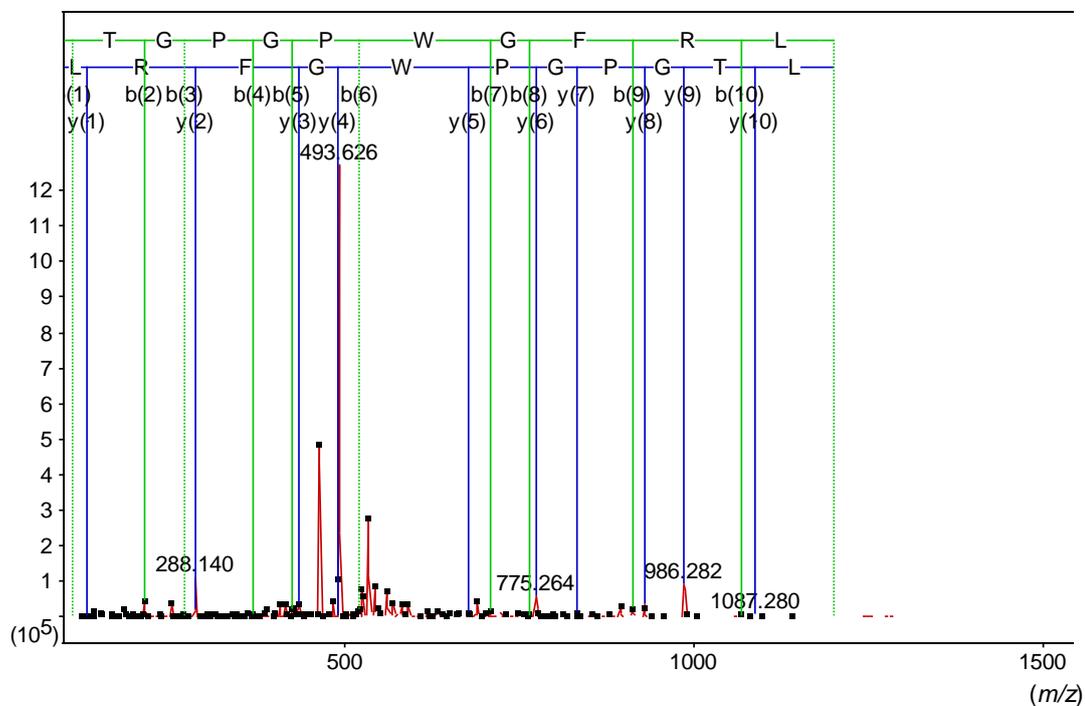
^e Masa relativa calculada en Daltons del péptido identificado.

^f Péptidos identificados a cada tiempo de procesado del jamón.

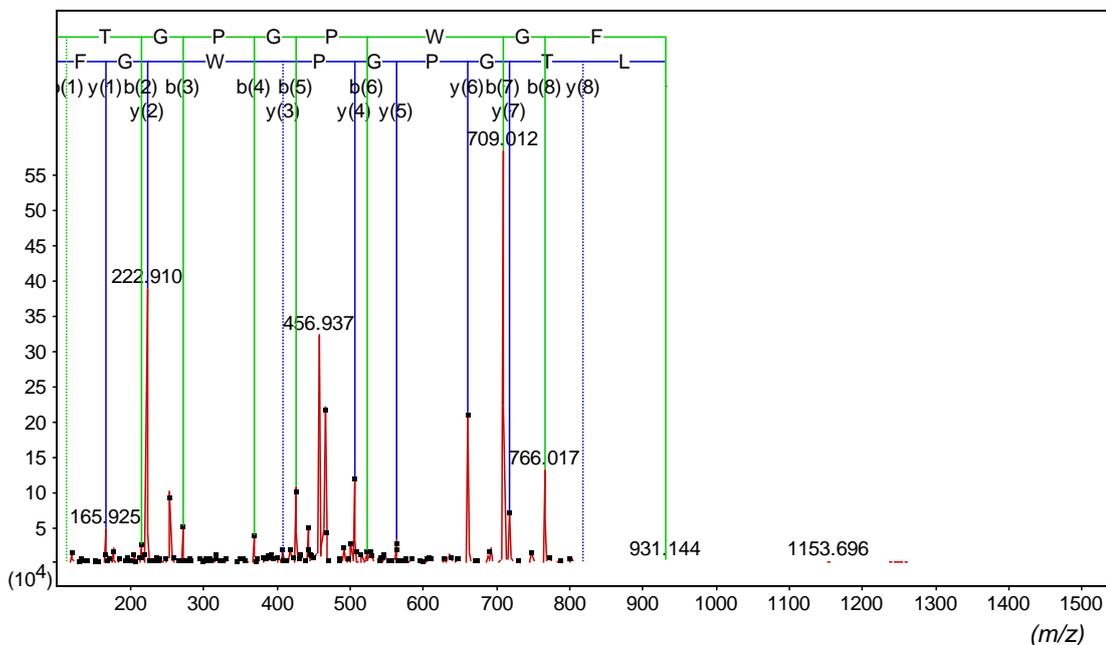
^g Péptido identificado con dos oxidaciones de metionina.

Figura 3. Espectros de MS/MS de los péptidos 6 y 7, obtenidos a partir del análisis de jamón curado tras 3.5 meses de procesado. Los espectros se muestran con los correspondientes iones *y* y *b*.

Péptido 6 LTGPGPWGFRL (600.73, 2+)



Péptido 7 LTGPGPWGF (466.12, 2+)



CONCLUSIONES

La proteólisis es un proceso complejo y dinámico que tiene lugar a lo largo de toda la elaboración del jamón curado. La evolución de los péptidos generados a partir de la degradación de la proteína LDB3 ha sido estudiada a diferentes tiempos de proceso, aportando evidencia de la acción de las catepsinas y, principalmente, de las aminopeptidasas, carboxipeptidasas, dipeptidilpeptidasas y tripeptidilpeptidasas en la liberación de péptidos y aminoácidos libres durante el proceso de curado del jamón. Además, este trabajo confirma estudios previos que destacan la importancia de la oxidación de amino ácidos en las últimas etapas de curado. Este estudio aporta los cimientos necesarios en materia de caracterización y seguimiento peptídico que permitirán futuras investigaciones centradas en la identificación de posibles marcadores biológicos del tiempo de curado del jamón.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Ministerio de Economía y Competitividad por la beca FPI BES-2011-046096 otorgada a M. Gallego, así como a dicho Ministerio y a los fondos FEDER por la concesión del proyecto AGL2010-16305. También agradecemos los contratos postdoctorales Marie Curie Intra-European Fellowship y JAEDOC-CSIC concedidos a L. Mora.

REFERENCIAS

- Aristoy, M.C., y Toldrá, F. (1995). Isolation of flavor peptides from raw pork meat and dry-cured ham. In G. Charalambous (Ed.), *Food flavors: Generation, analysis and processes influence* (pp. 1323-1344). Amsterdam: Elsevier Science.
- Armenteros, M., Heinonen, M., Ollilainen, V., Toldrá, F., y Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS). *Meat Science*, 83 (1), 104–112.
- Escudero, E., Mora, L., Aristoy, M. C., y Toldrá, F. (2011). Possible biological markers of the time of processing of dry-cured ham. *Meat Science*, 89 (4), 536-539.
- Hansen-Møller, J., Hinrichsen, L., y Jacobsen, T. (1997). Evaluation of peptides generated in Italian-style dry-cured ham during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (8), 3123-3128.
- Klaavuniemi, T., Kelloniemi, A., y Yläne, J. (2004). The ZASP-like motif in actinin-associated LIM protein is required for interaction with the α -actinin rod and for targeting to the muscle Z-line. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (25), 26402-26410.
- Koutina, G., Jongberg, S., y Skibsted, L.H. (2012). Protein and lipid oxidation in Parma ham during production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (38) , 9737-9745.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Roepstorff, P., y Bendixen, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (24), 6992-6997.
- Luccia, A. D., Picariello, G., Cacace, G., Scaloni, A., Faccia, M., Liuzzi, V., Alviti, G., y Musso, S. S. (2005). Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. *Meat Science*, 69 (3), 479-491.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., y Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55 (1), 83–95.

- Luther, P. K. (2009). The vertebrate muscle Z-disc: Sarcomere anchor for structure and signalling. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 30 (5-6), 171-185.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Toldrá, F., y Bramley, P. M. (2009a). Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in Serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (8), 3228-3234.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., Fraser, P. D., Toldrá, F., y Bramley, P. M. (2009b). Oligopeptides arising from the degradation of creatine kinase in Spanish dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (19), 8982-8988.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., y Toldrá, F. (2010). Identification of small troponin T peptides generated in dry-cured ham. *Food Chemistry*, 123 (3), 691-697.
- Mora, L., Valero, M. L., Sánchez del Pino, M. M., Sentandreu, M. A., y Toldrá, F. (2011). Small peptides released from muscle glycolytic enzymes during dry-cured ham processing. *Journal of Proteomics*, 74 (4), 442-450.
- Mora, L., y Toldrá, F. (2012). Proteomic identification of small (<2000 da) myoglobin peptides generated in dry-cured ham. *Food Technology and Biotechnology*, 50 (3), 343-349.
- Rodríguez-Núñez, E., Aristoy, M. C., y Toldrá, F. (1995). Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*, 53 (2), 187-190.
- Rosell, C. M., y Toldrá, F. (1996). Effect of curing agents on m-calpain activity throughout the curing process. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 203 (4), 320-325.
- Sentandreu M. A., y Toldrá, F. (2001). Dipeptidyl peptidase activities along the processing of Serrano dry-cured ham. *European Food Research and Technology*, 213 (2), 83-87
- Sentandreu, M. A., Stoeva, S., Aristoy, M. C., Laib, K., Voelter, W., y Toldrá, F. (2003). Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 68 (1), 64-69.
- Sentandreu, M. A., Armenteros, M., Calvete, J. J., Ouali, A., Aristoy, M. C., y Toldrá, F. (2007). Proteomic identification of actin-derived oligopeptides in dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (9), 3613-3619.
- Strange, E. D. (1984). Oxidation of methionine in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (2), 358-363.
- Toldrá, F., Rico E., y Flores, J. (1993). Cathepsin B, D, H and L activity in the processing of dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62 (2), 157-161.
- Toldrá, F., Flores, M., y Sanz, Y. (1997). Dry-cured ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry*, 59 (4), 523-530.
- Toldrá, F., y Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (4), 331-352.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., y Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International*, 33 (3-4), 181-185.
- Zhou, Q., Chu, P. H., Huang, C., Cheng, C. F., Martone, M. E., Knoll, G., Shelton, G. D., Evans, S., y Chen, J. (2001). Ablation of Cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy. *Journal of Cell Biology*, 155 (3), 605-612.