

## Temas de actualidad

# Influencia en el aroma de queso del catabolismo de aminoácidos por *Lactococcus lactis*

**Teresa Requena y Carmen Peláez**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos lácteos, Instituto del Frío (CSIC)  
C/José Antonio Nováis, 20. 28040 Madrid.  
trequena@if.csic.es, cpelaez@if.csic.es

En los países industrializados se utilizan cultivos iniciadores de forma generalizada para la elaboración de productos fermentados. Concretamente para la elaboración de quesos y leches fermentadas, la industria láctea utiliza cultivos de composición fija o variable que aseguran una homogeneidad aceptable en la calidad de los productos y mejoran considerablemente su seguridad. Para quesos, se utilizan generalmente cultivos simples o mixtos que están constituidos mayoritariamente por subespecies de *Lactococcus lactis*, aunque también pueden incluir otros géneros bacterianos como *Leuconostoc* o *Lactobacillus*. Durante las dos últimas décadas, se ha generado gran cantidad de información científica referente a la aceleración en el desarrollo de las características organolépticas de los quesos. Los estudios más recientes describen principalmente el empleo de herramientas genéticas para enriquecer el sistema proteolítico de *L. lactis* como la inclusión de peptidasas de *Lactobacillus*, de manera que al emplearse en la elaboración de quesos se obtienen

productos de características sensoriales uniformes y en un periodo corto de tiempo. No obstante, en la actualidad el consumidor no se conforma con productos seguros y de calidad aceptable, sino que demanda una oferta diversificada de productos que cumplan los más altos estándares de calidad organoléptica. Para conseguir estos objetivos, es necesario el diseño de tecnologías que permitan explotar al máximo el potencial de las bacterias lácticas en la formación de compuestos volátiles y que se obtenga en proporciones que establezcan un correcto balance para el desarrollo del aroma en queso. En este contexto, la actividad enzimática de bacterias lácticas implicada en el catabolismo de aminoácidos hasta la formación de potentes compuestos volátiles, juega un papel fundamental.

A diferencia del sistema proteolítico de las bacterias lácticas, objeto de numerosos estudios en la década de los 90 y tema de investigación de consorcios europeos en el Programa Marco Europeo, la degradación microbiana de aminoácidos hasta la formación de compuestos volátiles ha sido un tema desconocido durante mucho tiempo y de interés relativamente reciente (a partir de finales de los 90). Esto se ha debido en buena parte a la creencia generalizada de que muchos de los compuestos volátiles del queso se forman por vía química (Marilley y Casey, 2004). El catabolismo de aminoácidos por bacterias presentes en el queso, se ha revisado recientemente por Smit *et al.* (2005), Yvon (2006) y Fernández y Zúñiga (2006). Las rutas metabólicas más estudiadas son las de las bacterias lácticas, fundamentalmente *Lactococcus*. En bacterias lácticas las reacciones de degradación se basan en dos patrones (Figura 1): (i) reacciones de transaminación de aminoácidos de cadena ramificada, aromáticos, aspártico y metionina que se transforman en  $\alpha$ -cetoácidos con posterior conversión a hidroxiácidos, ácidos carboxílicos, aldehídos, alcoholes y ésteres y (ii) reacciones de demetilación de metionina que conducen a la formación de metanotiol y derivados. El

**Carmen Peláez** y **Teresa Requena** han establecido el Grupo de Bacterias Lácticas del Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos del Instituto del Frío del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid. Poseen una dilatada experiencia en biotecnología de bacterias lácticas y diseño de cultivos iniciadores para la industria de productos lácteos fermentados. Han dirigido varias tesis doctorales y son autoras de numerosas publicaciones, así como de varias patentes y resultados de interés tecnológico en el campo de la microbiología láctea. **C. Peláez** es Doctora en Ciencias Biológicas, Profesora de Investigación del CSIC y actualmente ocupa el cargo de Coordinadora del Área de Ciencia y Tecnología de Alimentos del CSIC. Investigadora invitada en el NIZO Food Research Institute (Holanda) durante el año 1986 y en la Royal Veterinary Agricultural University (Dinamarca) durante 1992. **T. Requena** es Doctora en Veterinaria e Investigador Científico del CSIC. Investigadora postdoctoral en la Universidad de Minnesota (EEUU) los años 1992 y 1993 y en la Universidad de Otago (Nueva Zelanda) en 2000.

balance adecuado del aroma que se genera en el queso deriva de la combinación adecuada de estos compuestos volátiles y sus precursores, los aminoácidos.

**Transaminación de aminoácidos**

*Actividad Aminotransferasa*

La transaminación de aminoácidos en bacterias lácticas es una etapa clave en su conversión hasta compuestos volátiles. En la reacción de transaminación, el aminoácido se transforma en  $\alpha$ -cetoácido y el aceptor del grupo amino, el  $\alpha$ -cetoglutarato, en glutámico. La reacción se cataliza reversiblemente por aminotransferasas dependientes de piridoxal-5-fosfato.

La actividad aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada se realiza fundamentalmente por la enzima BcaT y la de aminoácidos aromáticos por la enzima AraT. AraT es activa frente a aminoácidos aromáticos, principalmente fenilalanina y en mucha menor medida, leucina y metionina. BcaT es activa frente a los tres aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina y en menor medida metionina. El sustrato de mayor afinidad es isoleucina y se solapa con AraT en su actividad frente a leucina y metionina. Los

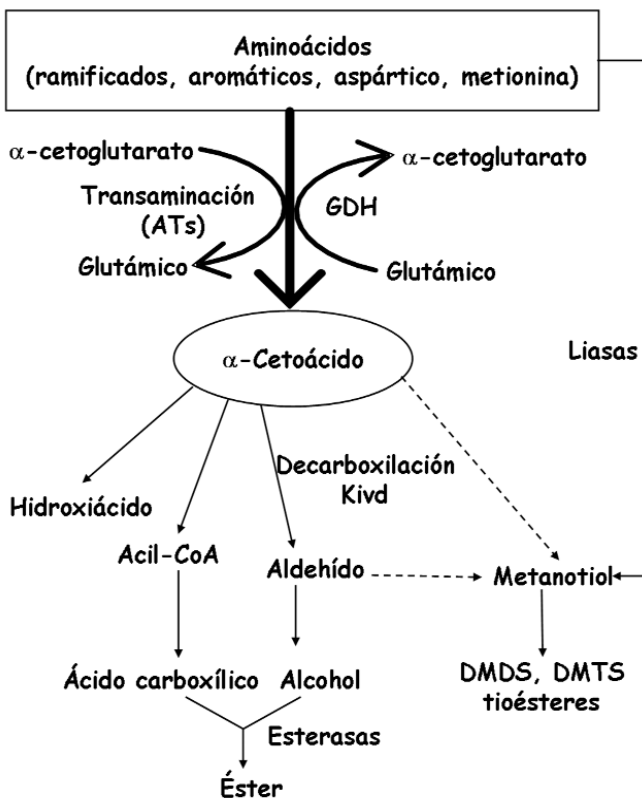
genes que codifican AraT y BcaT en *L. lactis* se encuentran en una única copia en el cromosoma y se transcriben monocistricamente. La transaminación de metionina conduce a la formación de ácido  $\alpha$ -cetometil-tio-butirato (KMBA), del que parte se convierte químicamente en metil-tioacetaldéhid, metanotiol y dimetilsulfuros. Tanto en lactococos como en lactobacilos, la conversión de metionina se inicia fundamentalmente por transaminación, aunque parte puede demetiolarse en una reacción de eliminación que da lugar a metanotiol y que se realiza por enzimas liasas (Figura 1).

*Actividad Glutamato Deshidrogenasa (GDH)*

La reacción de transaminación de aminoácidos en bacterias lácticas requiere obligatoriamente la presencia de un aceptor de grupos amino que es preferentemente  $\alpha$ -cetoglutarato. En *L. lactis*, este compuesto puede producirse por tres rutas metabólicas, vía actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) que lo forma a partir de ácido glutámico y por otras dos rutas que requieren citrato permeasa y citrato liasa, las cuales están sujetas, por tanto, a la disponibilidad de citrato. Se ha descrito además que la presencia de actividad GDH condiciona la capacidad de las bacterias para catabolizar aminoácidos. Recientemente, se ha caracterizado el gen que codifica la actividad GDH en una estirpe silvestre de *L. lactis* aislada de guisantes. La actividad se encuentra localizada en un plásmido que contiene 20 elementos IS, los cuales podrían haber intervenido en eventos de transferencia entre *L. lactis* y otros habitantes del mismo biotipo pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Yvon, 2006).

**Degradación de  $\alpha$ -cetoácidos**

Los  $\alpha$ -cetoácidos producidos por la transaminación de aminoácidos se transforman posteriormente por vía química y/o enzimática en compuestos derivados, algunos de los cuales son potentes compuestos volátiles (Tabla 1). La formación de  $\alpha$ -cetoácidos es, por tanto, un factor limitante en la generación de estos compuestos y juega un papel clave en el control de la formación de aroma. Este hecho ha quedado demostrado en estudios de sobreexpresión de enzimas catabólicas como  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa, que no han conducido al aumento de compuestos volátiles debido a la limitación de la presencia del cetoácido o en estudios de inducción de lisis bacteriana que han indicado el papel clave de la transaminación en las reacciones de catabolismo de aminoácidos.



**Figura 1.** Rutas enzimáticas clave en la conversión de aminoácidos a compuestos aromáticos por *Lactococcus lactis*.

**Tabla 1.** Compuestos del aroma derivados del catabolismo de aminoácidos.

Aminoácido	Metabolito	Descripción del aroma
Leucina	3-Metilbutanal (isovaleraldehído)	Malta, queso, chocolate
	3-Metilbutanol	Malta, alcohol, queso fresco
	Ácido 3-Metilbutanoico (isovalerato)	Sudor, queso fuerte, pútrido, rancio
Isoleucina	2-Metilbutanal	Malta, queso, chocolate
	2-Metilbutanol	Malta, alcohol
	Ácido 2-metilbutanoico	Sudor, queso fuerte, pútrido
Valina	2-Metilpropanal	Malta, queso, plátano, chocolate
	2-Metilpropanol	Malta, alcohol
	Ácido 2-Metilpropanoico (isobutirato)	Sudor, rancio, ácido
Fenilalanina	Fenilacetaldehído	Floral, rosa
	Feniletanol	Floral, rosa, miel
	Ácido fenilacético	Miel
	Benzaldehído	Aceite de almendra amarga, cereza dulce
	Ácido feniletilacético	Floral, pasto
Tirosina	Ácido hidroxifenilacético	
	<i>p</i> -Cresol	Medicinal
	Fenol	Medicinal
Triptófano	Escatol (3-metil indol)	Naftalina, fecal
	Indol	Pútrido, mohoso
Metionina	Metional (3-metilpropional)	Patata cocida, azufre
	Metionol (3-metilpropionol)	Patata
	Ácido metiltiopropiónico	
	Metanotiol	Col cocida, ajo, cebolla, azufre
	Dimetildisulfuro	Col, ajo, queso maduro
	Dimetiltrisulfuro	Ajo, pútrido, col
	Dimetilsulfido	Col, ajo, azufre
Ácido metiltioacético		
Ácido aspártico	Diacetilo (2,3-butanodiona)	Mantequilla, nuez
	Acetoína (3-hidroxi-2-butanona)	Mantequilla, leche ácida
	Ácido acético	Vinagre, agrio, ácido

**Hidroxiácidos.**- La reducción de los  $\alpha$ -cetoácidos producidos por transaminación da lugar a hidroxiácidos (Figura 1). Estos compuestos, sin embargo, no participan en el sabor ni el aroma de queso ni tampoco son precursores de compuestos del aroma. La reacción se cataliza por hidroxiácido deshidrogenasas dependientes de NADH, denominadas genéricamente hidroxiisocaproato deshidrogenasas, ya que el  $\alpha$ -cetoisocaproato es su sustrato preferente. Esta actividad aparece ampliamente distribuida en bacterias lácticas. Recientemente se ha descrito que ninguna de las cinco presuntas hidroxiácido deshidrogenasas deducidas de la secuencia nucleotídica del genoma de *L. lactis* IL1403 tiene dicha actividad, que finalmente ha sido identificada, mediante mutagénesis aleatoria, en el producto codificado por el gen *panE*, que había recibido dicha anotación por su homología con ketopantoato reductasas. Los hidroxiácidos son productos mayoritarios de la degradación de aminoácidos en quesos semiduros

elaborados con *L. lactis*, por lo que la existencia de esta actividad reduce la disponibilidad de  $\alpha$ -cetoácidos como sustratos para la formación de compuestos volátiles.

**Ácidos carboxílicos.**-La descarboxilación oxidativa de  $\alpha$ -cetoácidos resultantes de la transaminación da lugar a ácidos carboxílicos sin formación transitoria de aldehído, y se ha propuesto que esta conversión está catalizada por el llamado complejo cetoácido deshidrogenasa, compuesto por tres componentes:  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa, dihidrolipoiltransacilasa y lipoamida deshidrogenasa. Este complejo no se ha caracterizado en bacterias lácticas todavía, pero se conoce que actúa fundamentalmente a pH 5,5 y se inhibe por arsénico trivalente. Dicha actividad se ha descrito en *L. lactis* y en propionibacterias. Los ácidos carboxílicos derivados de aminoácidos de cadena ramificada como el isovalérico o de aminoácidos aromáticos como indolacético o hidroxifenilacético (Tabla 1),

son compuestos volátiles potentes que además pueden actuar como precursores de otros compuestos volátiles como ésteres, tioésteres, aldehídos o tioles.

**Aldehídos.**- La descarboxilación no oxidativa de  $\alpha$ -cetoácidos genera aldehídos, de los cuales los de cadena ramificada como 2- y 3-metil butanal han acaparado gran parte de la atención en los últimos años por intervenir de forma importante en el desarrollo del aroma de algunos quesos. Estos aldehídos aportan un aroma asociado a malta o chocolate y tienen bajos umbrales de detección. Debido además a que en concentraciones muy elevadas estos aldehídos pueden conferir sabores anormales, su correcta formación juega un papel fundamental en el balance del aroma final. Los aldehídos formados por la actividad  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa pueden oxidarse por una aldehído deshidrogenasa a los correspondientes ácidos orgánicos. Dado que estos ácidos también pueden formarse directamente por descarboxilación oxidativa de los  $\alpha$ -cetoácidos, es probable que las bacterias utilicen preferentemente esta vía que economiza energía, no habiéndose encontrado actividad  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa en bacterias lácticas de forma generalizada. Nuestro grupo de investigación ha caracterizado molecularmente por primera vez la actividad  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa de *L. lactis*. El gen *kivd* es idéntico en un 80% al anotado como *ipd* en el genoma de *L. lactis* IL1403, que presuntamente codifica una indolpiruvato descarboxilasa, el cual está interrumpido por la inserción de un elemento IS983, responsable de la pérdida de actividad de la enzima. Se trata de una enzima tiamin-difosfato dependiente, que pertenece a la familia de las piruvato descarboxilasas y que presenta una alta especificidad frente a  $\alpha$ -ceto isovalérico, metabolito intermedio de la síntesis de leucina y valina. Esta actividad enzimática también interviene en la descarboxilación de KMBA procedente de la transaminación de metionina dando lugar a metional.

#### **Demetilación de aminoácidos: Actividad metionina liasa**

A diferencia de los aminoácidos aromáticos y ramificados, la última reacción en la ruta de biosíntesis de la metionina no es una transaminación, sino que interviene una liasa que convierte cistationina en homocisteína que es metilada para obtener metionina. La cistationina liasa posee actividad  $\beta$ - y  $\gamma$ -liasa, y además se ha descrito su capacidad de demetilar metionina hasta la formación de metanotiol y volátiles derivados como

di- y tri-metil sulfuro. Sin embargo, su participación en el metabolismo de aminoácidos es fundamentalmente de biosíntesis, siendo su especificidad por la metionina muy inferior a la que presenta frente a cistationina. No se ha identificado en bacterias lácticas una metionina  $\gamma$ -liasa específica de metionina y comparable a la existente en *Brevibacterium* donde juega un papel relevante en la formación de metanotiol.

#### **Intervención de las enzimas del catabolismo de aminoácidos en la formación de aroma en quesos**

**Cepas silvestres.**- Se ha demostrado que estirpes silvestres de *L. lactis* aisladas de nichos naturales mantienen una capacidad de producción de compuestos volátiles muy superior a la de cepas industriales. Esto se ha relacionado con su mayor capacidad de biosíntesis de aminoácidos y por tanto, con una mayor actividad enzimática relacionada con el metabolismo de estos compuestos. En algunos casos, los aromas producidos por estas cepas se definen como achocolatados, afrutados o "de quesería" y se deben a la producción de aldehídos y alcoholes derivados de aminoácidos de cadena ramificada, que generalmente forman parte de la fracción volátil de quesos duros de larga maduración como el Parmesano y contribuyen positivamente a su aroma si se encuentran en un balance adecuado.

**Complementación de rutas metabólicas.**- La complementación de rutas metabólicas presentes en distintas cepas puede resultar una buena aproximación para conseguir un balance final adecuado de compuestos volátiles. Algunos ejemplos son la combinación de lactobacilos GDH positivos y lactococos GDH negativos *in vitro* a pH 5,5 para incrementar la producción de ácidos carboxílicos. Igualmente, la combinación de lactococos con elevada actividad aminotransferasa y actividad  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa incrementa la formación de compuestos volátiles derivados de aminoácidos ramificados en cultivos en leche, obteniéndose para estas combinaciones las puntuaciones más elevadas relativas a atributos de queso madurado y a intensidad de aroma. En relación a los volátiles derivados de la metionina, es posible incrementar su formación utilizando un modelo de complementación entre *Lactococcus* y *Brevibacterium linens*, donde los lactococos son los responsables de la liberación de la metionina y las brevibacterias de la formación de metanotiol. Un modelo similar se ha descrito entre *Geotrichum candidum* y *B. linens*.

### **Potenciación del aroma mediante utilización de agentes líticos.**

La utilización de bacteriocinas como agentes inductores del sistema autolítico bacteriano es una aproximación relativamente reciente para el control de la formación de aroma en queso. La acción lítica de algunas bacteriocinas es un efecto secundario causado por la desregulación del sistema autolítico de bacterias sensibles. La lacticina 3147 producida por *L. lactis* IFPL105 es activa frente a lactococos y lactobacilos, si bien la respuesta a la lisis es cepa dependiente. La lacticina 3147 provoca una permeabilización de la membrana celular que facilita la entrada de aminoácidos al interior. De esta forma, las células aún siendo inviables pueden contribuir a la formación de aroma en queso. La utilización de un cultivo iniciador compuesto por un transconjugante productor de lacticina 3147 y lactococos sensibles a la bacteriocina que mostraban actividad aminotransferasa y cetoácido descarboxilasa, dio lugar a un incremento en la formación de aldehídos procedentes de aminoácidos de cadena ramificada (Peláez y Requena, 2005). Se ha demostrado que la permeabilización celular causada por esta bacteriocina facilita la difusión de aminoácidos al interior celular y la reacción de transaminación, mientras que la descarboxilación de los  $\alpha$ -cetoácidos no se ve influenciada, indicando la posible difusión libre de estos compuestos a través de la membrana celular.

### **Regulación genética del metabolismo de aminoácidos**

El metabolismo de aminoácidos en bacterias está regulado por diferentes mecanismos específicos que incluyen tanto el control bioquímico de las enzimas como de su expresión en respuesta a la disponibilidad de sustratos, así como por sistemas de regulación globales que actúan a nivel transcripcional. La regulación de genes y operones relacionados con la biosíntesis de aminoácidos ha sido demostrada extensamente en *Bacillus subtilis*, en la que participan los reguladores globales del metabolismo de nitrógeno CodY y TnrA, así como CcpA que posee un papel central en la regulación del metabolismo de carbono. En *L. lactis*, CodY es responsable de la represión de genes que codifican la mayoría de enzimas del sistema proteolítico, del transporte de péptidos y aminoácidos, de las aminotransferasas AraT y BcaT y de la actividad cetoácido descarboxilasa. La activación del sistema represor CodY tiene lugar en respuesta al acúmulo en las células de aminoácidos de cadena ramificada, fundamentalmente isoleucina. En un estudio reciente, empleando tecnología de

DNA-microarray, se ha determinado que cerca de 100 genes expresados por *L. lactis* IL1403 están regulados por CodY, de los que el 45% codifican enzimas relacionadas con las rutas de biosíntesis de aminoácidos y prácticamente el resto de genes están relacionados con el suministro de nitrógeno, ejerciendo una función global de regulación (Guédon *et al.*, 2005). Empleando también DNA-microarrays, Sperandio *et al.* (2005) han descrito la influencia en el metabolismo de aminoácidos azufrados de un regulador transcripcional específico, FhuR. Sin embargo, no se han identificado en *L. lactis* IL1403 genes homólogos al operón *bkd*, que en *B. subtilis* codifica el complejo enzimático responsable del catabolismo de aminoácidos ramificados hasta ácidos carboxílicos ramificados y que se encuentra regulado por el activador transcripcional BkdR.

### **Conclusiones**

La elevada regulación genética a la que se ven sometidas las rutas biosintéticas de aminoácidos en *L. lactis* permite predecir un control equivalente en las reacciones catabólicas, siendo posible que su expresión esté sometida a los mismos factores reguladores globales del metabolismo de azúcares y de nitrógeno. No obstante, la identificación de genes asociados al catabolismo de aminoácidos en lactococos se puede enfrentar a problemas debidos a incorrecciones en su anotación en el genoma de *L. lactis* IL1403 (p. ej. *ipd*, *ytjE*, *panE*). En otros casos, estos genes podrían no encontrarse formando parte de operones que faciliten su estudio, o puede ocurrir que su expresión sea poco frecuente como consecuencia de mutaciones sufridas por adaptación a condiciones de crecimiento. Estas mutaciones son más habituales en cepas comerciales y de laboratorio y no tanto en cepas silvestres, por lo que éstas presentan generalmente una capacidad muy superior de generar compuestos volátiles. En otros casos, las dificultades se deben a que algunas reacciones podrían ser catalizadas por una variedad de enzimas con amplias especificidades de sustrato como son las actividades deshidrogenasas. Por todo ello, es imprescindible la demostración experimental de expresión de la actividad enzimática codificada por determinados genes anotados en los genomas, para su correcta identificación y poder posteriormente discernir los mecanismos que intervienen en su regulación y también para poder predecir y comparar el gran potencial de las bacterias lácticas en su capacidad para la formación de aroma en el queso.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida para esta investigación por los Proyectos AGL2006-12100 (Ministerio de Educación y Ciencia) y ALIBIRD: S-0505/AGR-0153 (Comunidad Autónoma de Madrid).

### Bibliografía

Fernández M, Zúñiga M (2006) Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol* 32:155-183  
 Guédon E, Sperandio BC, Pons M, Ehrlich SD, Renault P (2005) Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in *Firmicutes*. *Microbiology-SGM* 151:3895-3909

Marilley L, Casey MG (2004) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol* 90:139-159

Peláez C, Requena T (2005) Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int Dairy J* 15:831-844

Smit G, Smit BA, Engels WJM (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* 29:591-610

Sperandio B, Polard P, Ehrlich DS, Renault P, Guédon E (2005) Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *J Bacteriol* 187:3762-3778

Yvon M (2006) Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Aust J Dairy Technol* 61:88-96

# Sociedad Española de Microbiología

**Fundada en 1946**

Depósito Legal nº 36180-1.986



Miembro de:

FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGY SOCIETIES (FEMS)

INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES (IUMS)

Representada en numerosos Comités Internacionales relacionados con la especialidad.

Agrupada a los interesados en cualquier faceta científica o profesional relacionada con los microorganismos.

### Socios protectores de la SEM:

- Francisco Soria Melguizo, S.A.
- Merck Sharp & Dohme, S.A.
- Pfizer, S.A.

### Socios colaboradores de los Grupos Especializados de la SEM:

- AGBAR, S.A.
- BIOETANOL GALICIA
- EMASA
- EMASESA
- Iberdrola, S.A.
- Instituto Tecnológico Agroalimentario
- Iproma, S.L.
- Laboratorio Municipal de Vigo
- Millipore Ibérica, S.A.
- Proaguas Costablanca, S. A.
- THOR Especialidades, S.A.
- VWR International Eurolab (grupo Merck)

Para solicitar más información, inscripciones o publicidad, diríjase a la Secretaría de la

### Sociedad Española de Microbiología

Vitruvio, 8 - 28006 Madrid

Tel.: 915 613 381

Fax: 915 613 299

E-mail: [orgra46@orgc.csic.es](mailto:orgra46@orgc.csic.es)