



CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UAM
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada

(Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos)



**CONTROL DEL FLUJO CATABÓLICO DE
AMINOÁCIDOS EN *Lactococcus lactis* Y
EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE
COMPUESTOS VOLÁTILES**

TESIS DOCTORAL

M^a LUZ PÉREZ GÓMEZ DE CADIÑANOS

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada



CONTROL DEL FLUJO CATABÓLICO DE AMINOÁCIDOS EN *Lactococcus lactis* Y EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Memoria que, para optar al grado de Doctor con mención honorífica de "Doctorado Europeo", presenta la Licenciada M^a Luz Pérez Gómez de Cadiñanos

CIAL  **CSIC**
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

Madrid, 2011

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen/Summary.....	1
Capítulo I. Introducción general.....	11
1.1. Cultivos iniciadores.....	14
1.1.1. <i>Lactococcus lactis</i> como cultivo iniciador.....	17
1.2. Maduración en queso.....	19
1.2.1. Metabolismo de la lactosa y del citrato.....	21
1.2.2. Lipólisis.....	22
1.2.3. Proteólisis.....	23
1.2.3.1. Agentes proteolíticos.....	25
1.3. Catabolismo de aminoácidos: rutas, actividades enzimáticas y mecanismos de regulación.....	28
1.3.1. Catabolismo de aminoácidos iniciado por una reacción de transaminación.....	31
1.3.1.1. Actividad aminotransferasa.....	33
1.3.1.2. Actividad glutamato deshidrogenasa.....	35
1.3.1.3. Actividad hidroxiaácido deshidrogenasa.....	36
1.3.1.4. Actividad cetoácido deshidrogenasa.....	37
1.3.1.5. Actividad cetoácido descarboxilasa.....	38
1.3.1.6. Actividad alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa.....	40
1.3.1.7. Actividad esterasa.....	40
1.3.2. Catabolismo de aminoácidos iniciado por reacciones de eliminación.....	40
1.3.3. Catabolismo no enzimático de aminoácidos.....	43
1.3.4. Regulación del metabolismo de aminoácidos.....	44
1.3.4.1. Regulación general del metabolismo del nitrógeno por CodY.....	45
1.3.4.2. Regulación del sistema proteolítico.....	46
1.3.4.3. Regulación del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada....	47
1.3.4.4. Regulación del metabolismo de aminoácidos azufrados.....	47

1.3.4.5. Regulación del metabolismo de otros aminoácidos.....	48
1.4. Intensificación y diversificación del aroma en queso mediante el control del metabolismo de aminoácidos.....	49
1.4.1. Compuestos asociados al aroma en queso.....	49
1.4.2. Control de la formación de aroma a nivel de la transaminación de aminoácidos.....	51
1.4.3. Control de la formación de aroma a nivel de la reacción de eliminación a partir de metionina.....	52
1.4.4. Potencial de las bacterias lácticas para formar compuestos volátiles.....	53
1.5. Factores físicos implicados en la formación de aroma durante la maduración del queso.....	54
1.5.1. Influencia de la sal.....	55
1.5.2. Influencia del pH.....	56
1.5.3. La temperatura de maduración.....	57
1.5.4. La actividad de agua.....	58
Capítulo II. Objetivo y Plan de Trabajo.....	59
Capítulo III. Identificación y caracterización de la actividad glutamato deshidrogenasa en estirpes silvestres de <i>Lactococcus lactis</i>.....	63
3.1. Introducción.....	65
3.2. Materiales y métodos.....	66
3.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	68
3.2.2. Técnicas para la detección de la actividad enzimática GDH.....	68
3.2.2.1. Obtención de los extractos intracelulares.....	68
3.2.2.2. Determinación de la actividad enzimática GDH.....	69
3.2.3. Técnicas de biología molecular.....	71
3.2.3.1. Obtención de ADN plasmídico.....	71
3.2.3.2. Obtención de ADN genómico.....	72
3.2.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	73
3.2.3.4. Hibridación Southern.....	74

3.3. Resultados y discusión.....	76
3.3.1. Evaluación de la actividad GDH en <i>L. lactis</i>	76
3.3.2. Detección de <i>gdh</i> por PCR.....	79
3.3.3. Localización plasmídica del gen <i>gdh</i> en <i>L. lactis</i>	81
3.4. Conclusiones finales del capítulo.....	85
Capítulo IV. Control del flujo metabólico de formación y degradación de α-cetoácidos mediante inactivación del gen <i>panE</i> en estirpes de <i>Lactococcus lactis</i> con actividad GDH.....	87
4.1. Introducción.....	89
4.2. Materiales y métodos.....	91
4.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	91
4.2.2. Determinación del crecimiento bacteriano.....	93
4.2.3. Inactivación del gen <i>panE</i> en <i>L. lactis</i> IFPL953.....	93
4.2.3.1. Manipulación del ADN.....	95
4.2.3.2. Construcción del plásmido recombinante pG ⁺ 9:: Δ <i>panE</i>	96
4.2.3.3. Mutación por doble sobrecruzamiento del gen <i>panE</i> en <i>L. lactis</i> IFPL953.....	97
4.2.4. Determinación de la actividad hidroxilácido deshidrogenasa.....	100
4.2.4.1. Obtención de los extractos intracelulares.....	100
4.2.4.2. Medida de la actividad Hic-DH.....	100
4.2.5. Producción de compuestos volátiles por <i>L. lactis</i> IFPL953 Δ <i>panE</i>	101
4.2.6. Análisis estadístico.....	102
4.3. Resultados.....	102
4.3.1. Inactivación del gen <i>panE</i> y su efecto sobre la actividad hidroxilácido deshidrogenasa en <i>L. lactis</i> IFPL953.....	102
4.3.2. Crecimiento de <i>L. lactis</i> IFPL953 Δ <i>panE</i>	104
4.3.3. Cambios en la producción de compuestos volátiles en <i>L. lactis</i> por la mutación del gen <i>panE</i>	105
4.4. Discusión.....	109

4.5. Conclusiones finales del capítulo..... 113

Capítulo V. Estudio de la expresión de enzimas del catabolismo de aminoácidos en *Lactococcus lactis* y evaluación de la formación de compuestos volátiles en condiciones de maduración de queso..... 115

5.1. Introducción..... 117

5.2. Materiales y métodos..... 118

5.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo..... 118

5.2.2. Determinación del crecimiento bacteriano en medios con diferente contenido en aminoácidos ramificados. Condiciones empleadas en la incubación de *L. lactis* en medios de maduración..... 120

5.2.3. Extracción de ARN y transcripción inversa..... 121

5.2.4. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real..... 122

5.2.4.1. Diseño de cebadores y evaluación de su eficiencia..... 122

5.2.4.2. Reacción de qRT-PCR y análisis de los resultados obtenidos mediante esta técnica..... 125

5.2.5. Análisis de compuestos volátiles..... 126

5.2.6. Análisis estadístico..... 127

5.3. Resultados..... 127

5.3.1. Crecimientos de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* en medios con diferente contenido en aminoácidos de cadena ramificada..... 127

5.3.2. Expresión relativa de los genes que codifican enzimas clave implicadas en el catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE*..... 131

5.3.2.1. Especificidad y eficiencia de los cebadores empleados en las reacciones qRT-PCR..... 131

5.3.2.2. Expresión relativa de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos durante el crecimiento de *L. lactis* en medios de cultivo con variaciones en la concentración de aminoácidos ramificados..... 132

5.3.2.3. Expresión relativa de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* en condiciones de incubación equivalentes a las de maduración del queso..... 135

5.3.3. Análisis de compuestos volátiles producidos por <i>L. lactis</i> en diferentes condiciones de incubación.....	139
5.3.3.1. Comparación de los compuestos volátiles producidos por <i>L. lactis</i> IFPL953 frente a los producidos por IFPL953 Δ <i>panE</i> en medios de cultivo con variaciones en la concentración de aminoácidos ramificados.....	139
5.3.3.2. Análisis de compuestos volátiles producidos durante la incubación de <i>L. lactis</i> IFPL953 e IFPL953 Δ <i>panE</i> en condiciones de incubación que simulan la maduración del queso.....	142
5.4. Discusión.....	147
5.4.1. Caracterización de la expresión génica de <i>L. lactis</i> en medios con diferente contenido en aminoácidos ramificados.....	148
5.4.2. Estudio de la expresión de enzimas del catabolismo de aminoácidos en <i>L. lactis</i> y evaluación de la formación de compuestos volátiles en condiciones de maduración de queso.....	151
5.4. Conclusiones finales del capítulo.....	154
Capítulo VI. Discusión general.....	153
Capítulo VII. Conclusiones/Conclusions.....	161
Bibliografía.....	167
Apéndice.....	201

RESUMEN

SUMMARY

RESUMEN

Las actividades enzimáticas de las bacterias lácticas implicadas en el catabolismo de aminoácidos hasta la formación de potentes compuestos volátiles, juegan un papel fundamental en el desarrollo del aroma de los quesos. Las rutas de degradación de aminoácidos en *Lactococcus lactis* se inician por una reacción de transaminación que conduce a la formación de α -cetoácidos, los cuales constituyen el metabolito central de bifurcación entre las rutas biosintéticas y catabólicas y son limitantes en la formación de aroma. Estos α -cetoácidos serán posteriormente transformados en compuestos volátiles, como los aldehídos, ácidos carboxílicos y ésteres; aunque también pueden producirse hidroxiaácidos, que son compuestos que no participan en el aroma. La eficiente conversión de α -cetoácidos hasta compuestos volátiles podría conseguirse aumentando la disponibilidad de α -cetoglutarato como aceptor de grupos amino en la reacción de transaminación a través de la actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) y bloqueando la ruta de conversión de α -cetoácidos a los correspondientes hidroxiaácidos.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido la utilización de estrategias enzimáticas relacionadas con el catabolismo de aminoácidos y encaminadas al control de la formación de compuestos volátiles por *L. lactis*.

En este estudio se llevó a cabo la determinación de la presencia del gen *gdh* y la caracterización de la actividad GDH a partir de estirpes silvestres de *L. lactis* procedentes de quesos de leche cruda. Los resultados indicaron que es una actividad poco frecuente en *L. lactis*, ya que sólo se encontró en 10 cepas de las 41 estudiadas. Las cepas con actividad GDH mostraron preferencia por NAD^+ como cofactor en la reacción, indicando un papel fundamentalmente catabólico de la actividad GDH en estas cepas. En todas las cepas con actividad GDH, el gen *gdh* tenía una localización plasmídica. Se seleccionó del estudio la cepa *L. lactis* IFPL953 por su elevada actividad GDH con preferencia para la formación de α -cetoglutarato y por presentar una organización genética del gen *gdh* equivalente a la de *L. lactis* Til504, empleada en este estudio como referencia de actividad GDH.

Con objeto de aumentar la disponibilidad de α -cetoácidos por *L. lactis* y optimizar su degradación hasta compuestos volátiles, se bloqueó la ruta de conversión de α -cetoácidos a los correspondientes hidroxiaácidos mediante la

inactivación del gen *panE* en *L. lactis* IFPL953. El gen *panE* codifica la enzima hidroxiiisocaproato deshidrogenasa (Hic-DH), que posee la principal actividad α -cetoácido deshidrogenasa de *L. lactis*. La mutación del gen *panE* se llevó a cabo mediante mutagénesis por doble sobrecruzamiento, y condujo a la pérdida total de actividad Hic-DH en la cepa mutante *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*. Además, se analizó la capacidad de *L. lactis* para formar compuestos volátiles mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (SPME y GC-MS). Esto nos permitió obtener un perfil aromático con mayor formación de aldehídos, ácidos carboxílicos y compuestos volátiles totales en la cepa mutante que el encontrado en la cepa silvestre. La inactivación de *panE* en *L. lactis* IFPL953, caracterizada por poseer actividades GDH, AraT, BcaT y KivD, dio lugar a la acumulación de α -cetoisocaproato y al aumento de 3-metilbutanal y 3-metilbutanol. *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* resultó ser más eficiente que la cepa parental en la formación de compuestos volátiles relacionados con el aroma del queso.

Para profundizar en el conocimiento del catabolismo de aminoácidos en *L. lactis*, estudiamos la expresión de los genes que codifican enzimas clave en el catabolismo de aminoácidos en condiciones de crecimiento variando el contenido de aminoácidos ramificados (BCAAs) y simulando condiciones de maduración del queso. Para ello, el estudio se centró en la expresión de los genes *araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *ytjE* y *panE* y se analizó mediante transcripción inversa y PCR a tiempo real. Además, se establecieron las diferencias de expresión génica por la ausencia del gen *panE*. Adicionalmente, se estudió la capacidad de formar compuestos volátiles en el medio mediante SPME y GC-MS. La limitación de BCAAs en el medio de crecimiento de *L. lactis* provocó el incremento de la expresión de todos los genes en estudio, especialmente en los genes *gdh* y *kivD*. Estos cambios indican que la expresión de estos genes está regulada por CodY. Del mismo modo, pudimos observar que la incubación de *L. lactis* en condiciones que simulan la maduración del queso, en especial la falta de azúcar en el medio, provocaron cambios significativos en la expresión de los genes *gdh* y *kivD*. En todas las condiciones de incubación, la inactivación del gen *panE* provocó un incremento de la expresión del gen *gdh*. Los cambios observados a nivel genético repercutieron en la capacidad de *L. lactis* para producir compuestos volátiles en las condiciones estudiadas. El análisis de los perfiles de volátiles producidos por *L. lactis* mostraron que la estirpe mutante en actividad Hic-DH, *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, fue más eficiente en el catabolismo de aminoácidos que la cepa parental, obteniéndose un incremento en la producción de compuestos volátiles procedentes del catabolismo de los BCAAs, como 2- y 3-metilbutanal y sus correspondientes alcoholes.

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral nos ha permitido profundizar en el estudio del catabolismo de aminoácidos en *L. lactis*. Mediante la inactivación de la actividad Hic-DH en una cepa silvestre con elevadas actividades GDH y KivD se ha logrado incrementar el flujo catabólico de aminoácidos hacia la formación de compuestos representativos del aroma en queso.

SUMMARY

Flavour formation in dairy products is directly related to lactic acid bacteria (LAB), which are equipped with a large number of key intracellular enzymes responsible for its formation from amino acid catabolism. Amino acid degradation in *Lactococcus lactis* is initiated by a transamination reaction that results in the formation of the corresponding α -keto acid. α -Keto acids are a limiting factor in aroma formation and the central metabolites between biosynthetic and catabolic pathways. These α -keto acids are subsequently degraded into different aroma compounds such as aldehydes, alcohols, carboxylic acids and esters, as well as hydroxy acids which are not aroma compounds. Enhancement of α -keto acid conversion to volatile compounds could be approached by increasing the availability of α -ketoglutarate through glutamate dehydrogenase activity (GDH), as the amino group acceptor for transamination, and by limiting α -keto acids conversion into their corresponding hydroxy acids through mutation of hydroxyacid dehydrogenase activity in *L. lactis*.

The main objective of this Doctoral Thesis has been the development of enzymatic strategies related to amino acids catabolism, driven to control volatile compounds formation by *L. lactis* wild type strains.

This study has focused in the determination of the presence of the *gdh* gene and the characterization of GDH activity in *L. lactis* strains from raw goats' milk cheese. We used 41 wild *L. lactis* strains to determine the presence/absence of the *gdh* gene and to characterise GDH activity biochemically. Our results indicated a low presence of GDH activity in *L. lactis* as it was only found in 10 out of the 41 wild strains used in the study. In those GDH active strains, we observed a preference in the use of NAD^+ as co-factor in the reaction. In all GDH active strains the *gdh* gene was localized in plasmid DNA. From all strains studied, *L. lactis* IFPL953 was remarkable as it showed a high GDH activity mainly involved in α -ketoglutarate synthesis and had a *gdh* genetic organization similar to that observed for *L. lactis* Til504 strain, used in this study as a reference of GDH activity.

With the aim of increasing the α -keto acids availability by *L. lactis* and optimizing its degradation to volatile compounds, we inactivated *panE* gene in *L. lactis* IFPL953. This gene codes for the dehydrogenase hydroxyisocaproate enzyme

(Hic-DH) that possess main α -keto acid dehydrogenase activity from *L. lactis*. After inactivation of *panE* through mutagenesis by double crossing over, we confirmed the total loss of Hic-DH activity by *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* mutant. Moreover, production of volatile compound was analysed by solid-phase micro-extraction (SPME) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Mutant strain led to a flavour profile with higher presence of aldehydes, carboxylic acids and total volatile compounds, than that observed for the wild type strain. Inactivation of *panE* in *L. lactis* IFPL953 which also possess GDH, AraT, BcaT and KivD activities, led to an accumulation of α -ketoisocaproate and an increase of 3-methylbutanal and 3-methylbutanol. *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* was more efficient than the parental strain in the formation of volatile compounds related to cheese aroma.

In order to study with more detail amino acid catabolism in *L. lactis*, we studied the expression of the genes that codify key enzymes in amino acid catabolism under different growing conditions by modifying branched chain amino acids (BCAAs) content and simulating cheese ripening conditions. Therefore, we focused on studying the expression of *araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *panE* and *ytjE* genes by performing reverse transcription and real time PCR assays. Moreover, gene expression differences were established due to *panE* gene absence. Additionally, strains capacity for volatile compound production was studied by SPME and GC-MS. The limitation on BCAAs content in *L. lactis* growing medium led to an increase on the expression of all genes studied, especially *gdh* and *kivD* genes. These changes indicate that the expression of these genes is controlled by CodY global regulator. Similarly, when studying *L. lactis* under simulated cheese ripening conditions, we could also observe significant changes in *gdh* and *kivD* relative expression, especially when there was no sugar in the incubation culture. It happened that in all the incubation conditions assayed, *panE* inactivation caused an increase of *gdh* gene expression. Changes observed at genetic level determined *L. lactis* capability for producing volatile compounds under studied conditions. Volatile profile generated by *L. lactis* showed that the mutant strain for Hic-DH activity, *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, was more efficient than the parental strain for amino acid catabolism. Hence, with *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, an increase on the production of volatile compounds from BCAAs catabolism like 2- and 3-methylbutanal and their corresponding alcohols were observed.

Studies carried out during this Doctoral Thesis have improved our knowledge on amino acid catabolism in *L. lactis*. It has been demonstrated that the inactivation of Hic-DH activity on a wild type strain with high GDH and KivD activities, enables increasing amino acid catabolic flux towards formation of volatile compounds that are representative in cheese aroma.

CAPÍTULO I

Introducción General

CAPÍTULO I

Introducción general

El empleo de cultivos iniciadores para la elaboración de productos fermentados es una práctica generalizada en los países industrializados. Concretamente, para la elaboración de quesos, la industria láctea utiliza generalmente cultivos que están constituidos mayoritariamente por subespecies de *Lactococcus lactis*, aunque también pueden incluir otros géneros bacterianos como *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. La utilización de cultivos iniciadores asegura una homogeneidad aceptable en la calidad de los productos fermentados y mejora considerablemente su seguridad.

En la elaboración del queso intervienen una serie de factores externos, como las técnicas empleadas en el proceso de fabricación y las condiciones de maduración, e intrínsecos, como son la composición fisicoquímica y las interacciones que tienen lugar entre las diferentes poblaciones de microorganismos que lo componen. Durante la maduración del queso tienen lugar el mayor número de reacciones bioquímicas e interacciones de la microbiota presente, siendo durante este proceso cuando se van a generar la mayor parte de las características deseables del producto, como son la textura, el sabor y el aroma (Peláez y Requena, 2005).

Durante las últimas décadas se ha generado una gran cantidad de información referente al desarrollo de las características organolépticas de los quesos, pudiéndose obtener productos seguros y de características sensoriales uniformes en un periodo corto de tiempo (Irlinger y Mounier, 2009). El mercado actual de productos fermentados en general y, especialmente en el caso de productos lácteos, se caracteriza por una importante disminución de los ciclos de vida del producto y por un incremento en la demanda de productos diversificados que aporten beneficios específicos a la salud del consumidor o tengan unas características organolépticas novedosas. Desde la industria láctea se busca, por tanto, ingredientes o cultivos iniciadores que sirvan para generar productos innovadores con alto valor añadido (Pedersen *et al.*, 2005).

Con este objetivo, es necesario el diseño de tecnologías que permitan explotar al máximo el potencial de las bacterias lácticas en la formación de compuestos volátiles y en proporciones que establezcan un balance correcto para el desarrollo del aroma en queso. En este contexto, el contenido enzimático de las bacterias lácticas relacionado con el catabolismo de aminoácidos hasta la formación de potentes compuestos volátiles, juega un papel fundamental.

1.1. Cultivos iniciadores

En la actualidad, los cultivos iniciadores constituyen una parte importante de una industria plenamente desarrollada y son en muchas ocasiones, condición indispensable para la fabricación de gran variedad de productos lácteos fermentados. En la industria láctea, los cultivos iniciadores se definen como cultivos de una o varias cepas, pertenecientes a una o varias especies de bacterias deseables, que se utilizan para inocular leche pasteurizada o cruda, fundamentalmente con el objeto de iniciar la fermentación (Sandine, 1979).

Aunque los cultivos iniciadores pueden estar constituidos por diferentes tipos de microorganismos (Tabla 1.1), el grupo más importante está integrado casi exclusivamente por bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Además de BAL, en algunas ocasiones se añaden a los fermentos para la fabricación de queso, los llamados cultivos secundarios o adjuntos, constituidos también por bacterias o por mohos y levaduras, los cuales actúan durante la maduración de los quesos produciendo compuestos que intervienen en el aspecto, textura, sabor y aroma de los mismos. La principal función de los cultivos iniciadores es la producción de ácido láctico por fermentación de la lactosa presente en la leche, creando unas condiciones favorables para: (i) favorecer la formación de la cuajada por enzimas coagulantes, (ii) estabilizar y concentrar la cuajada favoreciendo el drenaje del suero, (iii) prevenir o inhibir el crecimiento de la flora patógena y alterante mediante la reducción del pH y (iv) contribuir a la formación de la textura y compuestos del sabor y aroma característicos.

Tabla 1.1. Microorganismos empleados en fermentaciones lácticas. Adaptado de Smit (2004).

	Organismo	Tipo de producto	Beneficio
Bacterias			
<i>Lactococcus lactis</i>	subsp. <i>lactis</i>	Mayor parte de quesos, cremas agrias y suero de mantequillas	Acidez, aroma
	subsp. <i>cremoris</i>		Acidez, aroma
	subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>		Acidez, aroma, ojos
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	Yogur, queso	Acidez
<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	Quesos de pasta prensada	Acidez, aroma
	<i>acidophilus</i>	Leches fermentadas, quesos de pasta prensada y curados	Acidez, aroma, probiótico
	<i>plantarum</i>	Adjunto en quesos	Estructura, probiótico
	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Yogur, kéfir, Koumiss, quesos semi curados	Acidez, aroma
	<i>casei</i>	Adjunto en quesos	Aroma, estructura
	<i>rhamnosus</i>	Adjunto en quesos	
	<i>buchneri</i>	Quesos maduros	
	<i>fermentum</i>	Quesos maduros	
	<i>kefiri</i>	Kéfir	Acidez
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	Quesos de pasta prensada, cremas agrias y suero de mantequillas	Aroma
<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Quesos tipo Massdam y Suizo	Aroma, formación de ojos
	<i>acidipropionici</i>	Queso	
<i>Arthrobacter</i>	spp.	Quesos de pasta blanda y corteza lavada	Aroma, color
<i>Bifidobacterium</i>	spp.	Yogur, leches fermentadas	Acidez, aroma, saludable
<i>Brevibacterium</i>	<i>linens</i>	Quesos de pasta blanda-corteza lavada y suaves	Aroma, color
	<i>casei</i>	Quesos de pasta blanda-corteza lavada	
<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>	Quesos desnatados	Aroma
	<i>acidilacti</i>	Quesos maduros	
<i>Micrococcus</i>	spp.	Quesos de pasta blanda-corteza lavada	
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	Quesos de leche cruda	
	<i>faecium</i>		
<i>Staphylococcus</i>	spp.	Quesos de pasta blanda-corteza lavada	
Hongos y Levaduras			
<i>Penicillium</i>	<i>roqueforti</i>	Quesos blandos (vena azul)	Aroma, color
	<i>camemberti</i>	Quesos blandos (superficie)	Aroma, textura, color
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	Quesos de pasta blanda-corteza lavada, Camembert	Aroma
<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>	Quesos de pasta blanda-corteza lavada	Favorecer el crecimiento de otros
<i>Sacharomyces</i>	spp.		microorganismos

Además, los cultivos iniciadores desempeñan un papel fundamental en la maduración del queso. La contribución al sabor y aroma durante la maduración del queso por los cultivos puede ser de dos formas: (i) mediante la formación de diferentes compuestos como consecuencia del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos de la leche; (ii) indirectamente, regulando la presencia de otros microorganismos.

La clasificación más habitual de los cultivos iniciadores se basa fundamentalmente en dos aspectos: atendiendo a su composición y a la temperatura de crecimiento. Aunque también pueden clasificarse atendiendo a aspectos tecnológicos, como velocidad de acidificación, producción de compuestos aromáticos o actividad proteolítica. Atendiendo a su composición, se clasifican en cultivos de una única cepa, también conocidos como cultivos simples (sólo contienen una cepa de una especie definida), cultivos de múltiples cepas de una especie, también conocidos como cultivos múltiples (contienen más de una cepa de la misma especie) y cultivos de varias especies o cultivos mixtos (contienen cepas pertenecientes a varias especies). En función de la temperatura óptima de crecimiento, los cultivos iniciadores se componen de bacterias lácticas mesófilas o termófilas. Las bacterias lácticas mesófilas pueden crecer a temperaturas entre 18 °C y 37 °C y las termófilas entre 30 °C y 45 °C.

Los cultivos iniciadores mesófilos son los más utilizados en la industria quesera, así como en la fabricación de nata ácida, mantequilla, etc. Estos cultivos pueden contener cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* y *Leuconostoc*. Por otro lado, los cultivos termófilos se utilizan en la fabricación de quesos de pasta cocida, suizos e italianos, como Emmental, Gruyère, Parmesano, etc., en los que se alcanzan temperaturas de cocción de la cuajada muy elevadas (50-55 °C). Las especies que pueden componer los cultivos termófilos son *Streptococcus thermophilus* y diferentes especies de lactobacilos como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus* y *Lb. fermentum*, además de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en el caso de quesos suizos.

En las últimas décadas, algunos estudios han puesto de manifiesto que el uso de cultivos iniciadores comerciales para la elaboración de queso resulta, en algunas ocasiones, en una pérdida de algunas de las características típicamente asociadas a esa variedad de queso cuando se elabora a partir de leche cruda (González-Crespo y Mas, 1993; Mendia *et al.*, 2000). De ahí que se esté haciendo un esfuerzo importante en la caracterización bioquímica, genética y tecnológica de cepas silvestres aisladas de quesos elaborados artesanalmente, con el fin de

potenciar caracteres directamente asociados a la microbiota del queso como son el aroma o el sabor del mismo (Nuñez *et al.*, 1989; Ayad *et al.*, 2000; Randazzo *et al.*, 2008; Pavlidou *et al.*, 2011; Rhen *et al.*, 2011).

1.1.1. *Lactococcus lactis* como cultivo iniciador

Lactococcus lactis es una bacteria láctica Gram-positiva mesófila, que crece a una temperatura óptima de 27 a 32 °C y a un pH óptimo de 6,5. Posee un metabolismo homofermentativo, ya que sólo produce ácido láctico como producto final de la fermentación, y tolera la presencia de oxígeno (anaerobia facultativa). Además, ha sido aislada de diferentes ambientes, tanto de plantas como de leche y productos lácteos fermentados.

La taxonomía de *L. lactis* (Fig. 1.1) ha ido cambiando a lo largo del tiempo. En la primera descripción que data de 1878, se describió como *Bacterium lactis* (Lister, 1878), en los años 70 se dividió en tres especies diferentes de *Streptococcus* (*S. cremoris*, *S. diacetylactis* y *S. lactis*) y posteriormente en los años 80 se separó el género *Lactococcus* de los estreptococos, dando lugar a la reclasificación de estas especies (Schleifer *et al.*, 1985; Pot *et al.*, 1994). Esta clasificación taxonómica distingue dos subespecies (subsp. *lactis* y subsp. *cremoris*) y una biovariante (subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*). Los fenotipos *lactis* y *cremoris* se diferencian de acuerdo a la tolerancia salina, temperatura de crecimiento y la utilización de la arginina, mientras que la biovariante *diacetylactis* tiene la capacidad adicional de metabolizar el citrato (Teuber *et al.*, 1992). Numerosos estudios, incluyendo hibridación DNA-DNA, análisis del gen que codifica el 16S rRNA y secuenciación génica, han demostrado la existencia de dos genotipos principalmente (Makarova y Koonin, 2007; Tam-a-Ram *et al.*, 2011). Esos dos grupos han sido denominados como *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* (Teuber *et al.*, 1992), aunque en ocasiones, desafortunadamente genotipo y fenotipo no se corresponden necesariamente (De la Plaza *et al.*, 2006).

Debido a su relevancia industrial, *L. lactis* se ha convertido en la bacteria láctica mejor estudiada, aunque la mayoría de trabajos se han realizado con un grupo reducido de cepas de origen lácteo (Kelly *et al.*, 2010). Hasta ahora se han publicado las secuencias completas de los genomas de seis lactococos. Tres de ellos (IL1403, MG1363 y NZ9000) son cepas de laboratorio sobre las que se han llevado a cabo la mayoría de estudios bioquímicos y genéticos de la especie (Bolotin *et al.*, 2001; Wegmann *et al.*, 2007; Linares *et al.*, 2010). La cuarta cepa (SK11) ha sido

usada como cultivo iniciador en queso (Makarova *et al.*, 2006), la quinta (KF147) es una cepa de origen vegetal (Siezen *et al.*, 2010) y la sexta (CV56) ha sido recientemente aislada de vaginas de mujeres sanas (Chen *et al.*, 2011).

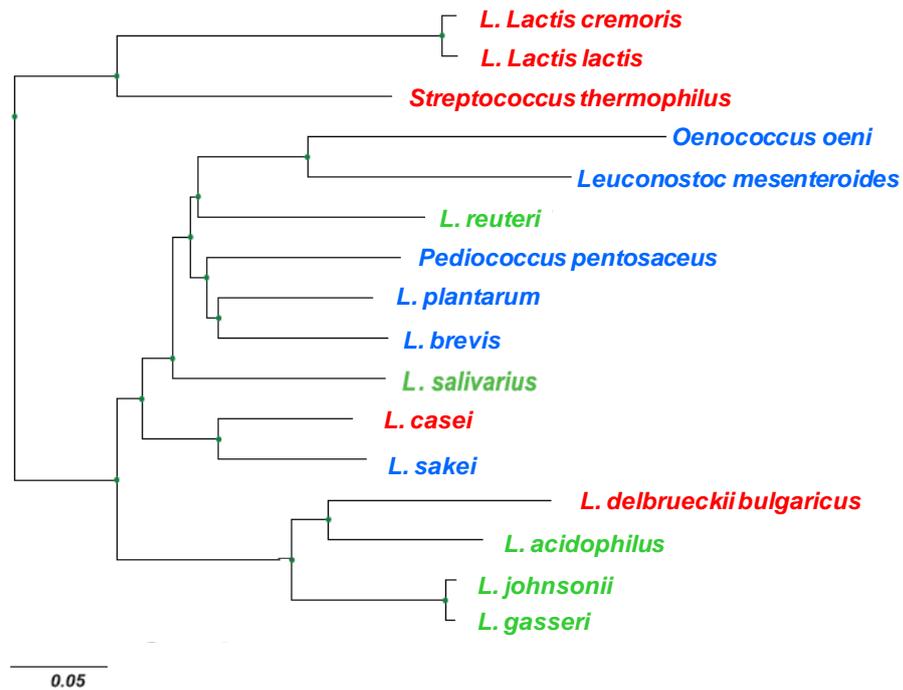


Figura 1.1. Árbol filogenético de las BAL elaborado en base a alineamientos concatenados de cuatro subunidades (α , β , β' , δ) de la DNA-dependiente ARN polimerasa. Los colores representan los orígenes o usos de las BAL: rojo, fermentaciones lácticas; azul, otras fermentaciones como cerveza, vino, de vegetales o carne; verde para bacterias gastrointestinales. Adaptado de Liu *et al.* (2008).

L. lactis es el principal componente de la mayoría de los cultivos iniciadores utilizados en la fabricación de queso (Fox *et al.*, 2000), contribuyendo a la acidificación y prevención del crecimiento de bacterias no deseables y a la formación de compuestos del aroma a través de su sistema proteolítico y rutas de conversión de aminoácidos (Smit *et al.*, 2005b). Debido a estas características, *L. lactis* representa un papel significativo en la producción de distintas variedades de quesos: frescos (Cottage, Mozzarella, Quark), de pasta blanda (Camembert, Brie), de pasta prensada (Cheddar, Edam, Gouda, Manchego, Montasio, Roncal) y azules (Roquefort, Stilton) (Gobetti *et al.*, 2007). La selección y aplicación de cepas

silvestres como cultivos iniciadores constituye una aproximación importante para la modificación de determinadas características del producto, como puede ser la percepción aromática asociada a un tipo de queso.

1.2. Maduración del queso

Durante la maduración del queso se llevan a cabo una serie de cambios físicos, químicos, microbiológicos y enzimáticos que van a conferir al producto final unas características determinadas. Pequeñas modificaciones ambientales e intrínsecas pueden producir desplazamientos del equilibrio de las diversas reacciones implicadas, lo que constituye el fundamento científico de algunas de las manipulaciones a las que se someten la cuajada y el propio queso en la industria alimentaria.

Los cambios microbiológicos ocurridos en un queso durante su maduración incluyen tres aspectos fundamentales: (1) la inviabilidad y lisis de los cultivos iniciadores; (2) el crecimiento de una microbiota ambiental (bacterias ácido lácticas no integrantes de los cultivos iniciadores [NSLAB], principalmente lactobacilos heterofermentativos facultativos); y (3) en muchas variedades de queso, el desarrollo de una microbiota secundaria como por ejemplo, *Propionibacterium freudenreichii* en queso Suizo, mohos en variedades tipo Camembert y una población compleja de bacterias Gram positivas en algunos quesos de pasta blanda y corteza lavada, que en numerosas ocasiones tiene un papel relevante en el aroma y a veces también en la textura de estas variedades de queso (Beresford y Williams, 2004).

En el curso de la maduración se van acumulando diferentes compuestos (aminas, aldehídos, cetonas, ácidos grasos libres, etc.) que contribuyen al aroma (Marilley y Casey, 2004). Estos compuestos, generalmente ausentes o en baja concentración en la cuajada, surgen como consecuencia de las transformaciones bioquímicas sufridas por los componentes mayoritarios de la leche (lactosa, lípidos, sobre todo los triglicéridos, y proteínas, especialmente las caseínas) (Fig. 1.2).

Los cambios bioquímicos ocurridos durante la maduración del queso pueden agruparse en eventos primarios, que incluyen el metabolismo de la lactosa residual

y el del citrato, así como los procesos de lipólisis y proteólisis. A continuación, sucederían los eventos secundarios, que incluirían el metabolismo de los ácidos grasos y de aminoácidos, que juegan un papel muy importante en el desarrollo de compuestos aromáticos (McSweeney y Sousa, 2000). Todas estas transformaciones bioquímicas están catalizadas por enzimas de diversa procedencia: unas forman parte de la composición de la leche, algunas son añadidas en el procesado del queso, y otras son enzimas extra e intracelulares de origen microbiano.

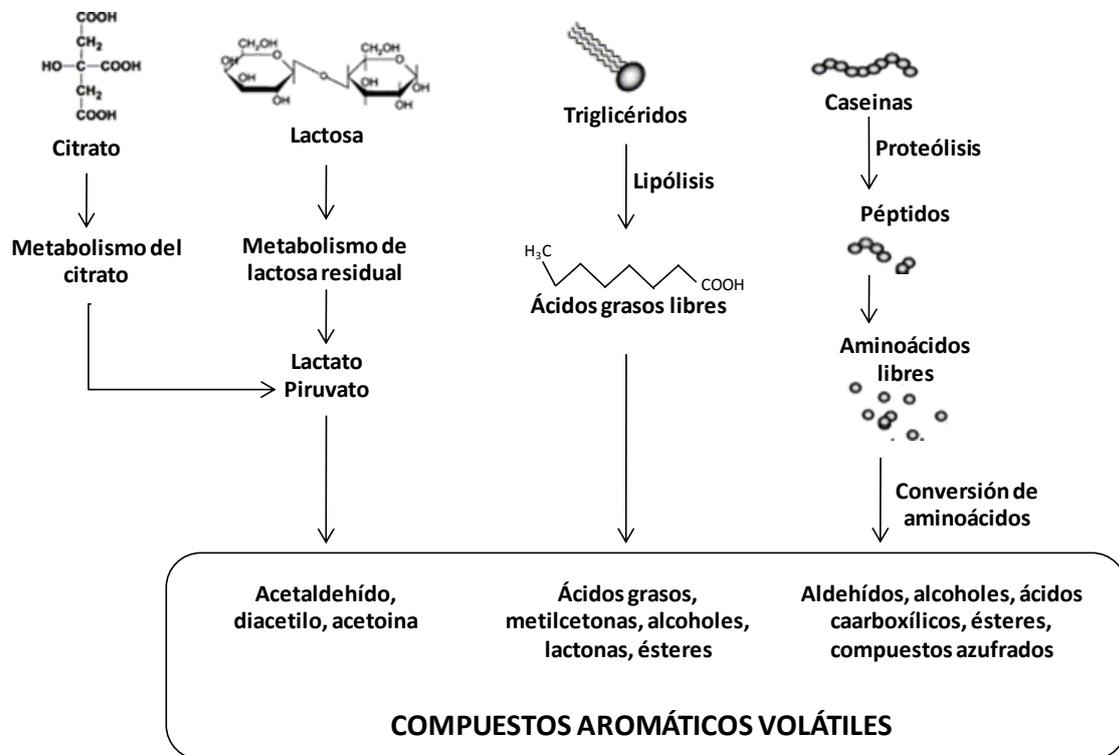


Figura 1.2. Rutas bioquímicas generales para la transformación de los constituyentes mayoritarios de la leche en compuestos aromáticos. Adaptado de Marilley y Casey (2004) y Hugenholtz y van Hylckama Vlieg (2007).

Durante el proceso de maduración del queso también son relevantes algunos factores físico-químicos, como son el porcentaje de humedad, la temperatura, el pH y el contenido en sal, cuyos efectos acumulativos pueden determinar y limitar los

cambios microbiológicos y bioquímicos previamente descritos. Durante el proceso de obtención de la cuajada es importante controlar el contenido en humedad de la misma, ya que en igualdad de condiciones, un queso con mayor contenido en humedad madurará rápidamente, mientras que en las cuajadas muy desueradas el período de maduración se prolonga considerablemente (Fox *et al.*, 2000). La temperatura es un factor importante que regula el desarrollo microbiano y la actividad de las enzimas. Durante la producción de queso se pueden alcanzar temperaturas muy elevadas, como por ejemplo en los de tipo Suizo, mientras que en la práctica industrial, la maduración se efectúa a temperaturas generalmente comprendidas entre 8 y 16 °C. El pH varía a lo largo de las distintas etapas en la fabricación de queso y juega un papel importante en la estructura y aroma del mismo. Las primeras fases de fabricación de queso determinan la velocidad de producción de la acidez hasta la adición de cloruro sódico, que junto a la pérdida de lactosa, determina el pH más bajo del queso. Posteriormente, durante la maduración se elevan los niveles de pH, cuyos valores máximos se registran cuando la actividad proteolítica es muy fuerte. La cantidad de NaCl presente en el queso durante la maduración es una característica propia de cada variedad de queso y tiene efectos a nivel microbiológico (por ejemplo, niveles bajos de NaCl en quesos tipo Camembert favorecen el crecimiento de *Penicillium camemberti*), así como en el aroma y la textura como consecuencia del efecto que tiene sobre el contenido en humedad y en la actividad de agua del queso (Guinee y Fox, 2004).

1.2.1. Metabolismo de la lactosa y del citrato

La hidrólisis de la lactosa comienza en la cuba de fermentación y continúa durante la maduración con una intensidad variable dependiendo del tipo de queso. Aunque la mayor parte de la lactosa se pierde en el desuerado, la cuajada fresca aún presenta un pequeño porcentaje de lactosa residual. Durante las primeras etapas de la maduración, esta lactosa residual es rápidamente metabolizada hasta ácido láctico (ya sea D-/L-lactato o una mezcla racémica de ambos) por la acción de las BAL, provocando la acidificación de la leche y de la cuajada (McSweeney y Sousa, 2000). Esta acidificación va a acelerar la coagulación de las caseínas durante el proceso de elaboración y va a favorecer la sinéresis (expulsión del suero de la cuajada). Como producto intermediario se genera piruvato, que puede ser alternativamente convertido en varios componentes aromáticos de cadena corta como diacetilo, acetoína y acetaldehído (Smit *et al.*, 2005b).

Por otra parte, aunque la leche contiene bajos niveles y la mayoría se pierde con el suero, el citrato puede ser metabolizado hasta compuestos aromáticos importantes en algunas variedades de queso elaboradas con cultivos iniciadores mesófilos (Fox *et al.*, 1990; Cogan y Hill, 1993; Parente y Cogan, 2004). Sólo BAL como *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y algunas especies de *Leuconostoc*, que son capaces de transportar citrato al interior celular, metabolizan el citrato generando CO₂ y compuestos aromáticos como diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol (Cogan, 1987; Cogan y Daly, 1987; Marilley y Casey, 2004). Debido a la producción de CO₂, el metabolismo del citrato es el responsable de la formación de los ojos característicos en los quesos tipo holandeses y de la textura abierta indeseable y los defectos de flotación de la cuajada en queso Cheddar y Cottage, respectivamente (Fox *et al.*, 1990).

1.2.2. Lipólisis

La lipólisis consiste en la hidrólisis de triglicéridos, con liberación de ácidos grasos así como glicerol y mono- o diglicéridos, que se acumulan en el medio contribuyendo al aroma final. Como en todos los alimentos que tienen un elevado contenido en grasa, los lípidos presentes en el queso puede experimentar degradaciones vía lipólisis u oxidación, si bien, el grado de oxidación en los quesos es limitado debido probablemente a su bajo potencial redox (Marilley y Casey, 2004).

La contribución de las BAL a este proceso es poco relevante ya que poseen una escasa actividad lipolítica, aunque en el caso de los lactococos, cuando se encuentran en elevado número de células o en procesos de maduración prolongados, pueden contribuir a la liberación de cantidades de ácidos grasos de cadena corta, sobre todo mono- y diglicéridos (McSweeney y Sousa, 2000). Además del impacto directo sobre el aroma que supone la liberación de ácidos grasos, también son precursores en reacciones catabólicas que dan lugar a sustancias igualmente aromáticas, como metilcetonas, alcoholes secundarios, ésteres y lactonas.

En la mayoría de los quesos, las actividades lipolíticas altas son indeseables, puesto que pueden originar procesos de rancidez (Collins *et al.*, 2003). A pesar de ello, en algunos casos la microbiota secundaria, compuesta predominantemente por mohos y levaduras, es responsable de una masiva liberación de ácidos grasos y de

su transformación en compuestos altamente aromáticos, como ocurre en los quesos tipo Camembert y Roquefort (Smit *et al.*, 2005b).

1.2.3. Proteólisis

La proteólisis es uno de los fenómenos bioquímicos más complejos y, en muchas variedades de queso, es el proceso más importante que tiene lugar durante la maduración. Durante la proteólisis las caseínas son hidrolizadas a péptidos y aminoácidos libres, los cuales participan directamente en el aroma y en el sabor del queso o sirven de precursores para el desarrollo del sabor (Fox, 1989).

En el queso la proteólisis es la principal responsable de: (1) cambios en la textura provocados fundamentalmente por la hidrólisis de la matriz proteica, por una disminución en la actividad de agua, causada por la unión de moléculas de agua con grupos carboxilo y amino liberados, y también, por el aumento del pH debido a la producción de NH_3 por la desaminación de aminoácidos libres; (2) constituir una contribución directa al aroma y al sabor mediante la formación de péptidos y aminoácidos y en algunos casos, también es la causante de sabores indeseables (especialmente amargor, que está producido por la formación de péptidos hidrófobos); (3) liberación de sustratos, principalmente aminoácidos libres, para otras reacciones generadoras de compuestos del sabor, como por ejemplo la desaminación, descarboxilación, transaminación, desulfuración, reacciones de aminoácidos con otros compuestos y el catabolismo de los aminoácidos aromáticos; (4) cambios en la matriz del queso, que provoca la liberación de sus compuestos sápidos durante la masticación (Fox y McSweeney, 1996).

El grado de proteólisis varía entre los distintos tipos de queso, desde las variedades que sufren una débil proteólisis, por ejemplo Mozzarella, a aquellas otras como quesos azules madurados por mohos, donde la proteólisis es mucho más intensa (McSweeney y Fox, 1997; Smit *et al.*, 2000).

Las BAL utilizadas como cultivos iniciadores participan principalmente en los fenómenos proteolíticos secundarios, es decir, en la degradación de los péptidos que se acumulan como resultado de la hidrólisis primaria de las caseínas (Law *et al.*, 1992). Gracias a la gran variedad de peptidasas que poseen las BAL (Fox *et al.*, 1996), estos péptidos serán transformados en aminoácidos que pueden, junto a los compuestos generados durante la glicólisis y lipólisis, participar por sí mismos en el

sabor o quedar en el medio dispuestos para iniciar transformaciones catabólicas posteriores (Fig. 1.3).

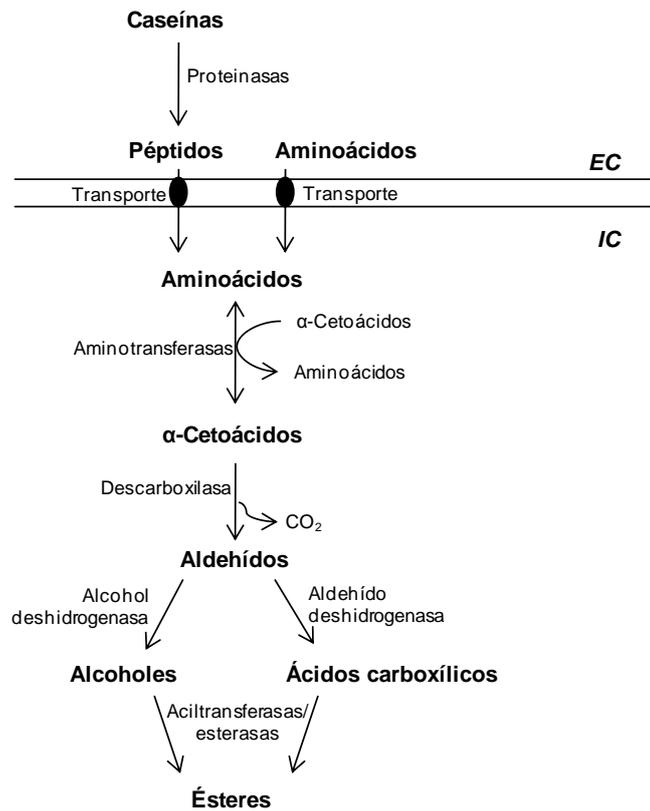


Figura 1.3. Esquema general de las rutas de degradación de proteínas hasta compuestos aromáticos en BAL. EC, medio extracelular; IC, medio intracelular. Adaptado de Liu *et al.* (2006).

Una vez que la lactosa se agota, los aminoácidos constituyen las únicas moléculas disponibles para las bacterias no lipolíticas para obtener energía (ATP), carbono, nitrógeno y azufre, produciendo a su vez compuestos con impacto en el aroma final (Urbach, 1995). Por lo tanto, la conversión de aminoácidos representa un proceso dual: constituye un mecanismo de supervivencia de las bacterias y supone a la vez el desarrollo de compuestos que influyen en el aroma y sabor del producto.

1.2.3.1. Agentes proteolíticos

Los agentes proteolíticos son enzimas procedentes del cuajo o coagulante utilizado (fundamentalmente quimosina), de la leche (generalmente plasmina), de las bacterias del cultivo iniciador, de enzimas exógenas añadidas para acelerar la maduración o acentuar el sabor, y de los cultivos secundarios en algunas variedades de queso. La contribución relativa de las enzimas proteolíticas de estas fuentes depende de la variedad de queso (Fox, 1989 y 1993).

Los coagulantes empleados para la leche consisten en preparaciones de proteinasas seleccionadas que poseen generalmente una actividad proteolítica considerable. La quimosina es la proteinasa que se encuentra en mayor proporción en los cuajos animales tradicionales, siendo el resto pepsina. El papel principal de la quimosina en la fabricación de queso es la hidrólisis específica del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la proteína estabilizadora de la caseína, la κ -caseína, durante la coagulación de la leche. La mayor parte del cuajo añadido a la leche se pierde en el suero, pero aproximadamente un 6% queda retenido en la cuajada, dependiendo del tipo de coagulante, temperatura de cocción y pH en el momento del desuerado. El cuajo residual contribuye a la proteólisis en muchas variedades de queso (Creamer *et al.*, 1985), en cambio, en quesos de pasta cocida, como el Emmental, la quimosina es desnaturalizada en su mayor parte y apenas contribuye a la maduración. La principal proteinasa nativa de la leche es la plasmina, cuyo complejo sistema proteolítico consiste en la enzima activa (plasmina), su zimógeno (plasminógeno), activadores e inhibidores de la plasmina y de los activadores del plasminógeno, los cuales están todos presentes en la leche. La plasmina, el plasminógeno y los activadores del plasminógeno están asociados a las micelas de caseína de la leche, mientras que los inhibidores de la plasmina se encuentran en la fase del suero. La plasmina es una proteinasa tripsín-serina con una actividad óptima a pH 7,5 y 37 °C y es altamente específica para enlaces peptídicos en el extremo C-terminal de residuos lisil y, en menor grado, arginil (Weinstein y Doolittle, 1972). La leche también contiene proteinasas ácidas, como la catepsina D, la cual es relativamente sensible al calor (se inactiva a 70 °C/10 min.) y tiene un pH óptimo de 4,0 (Kaminogawa *et al.*, 1980). La especificidad de la catepsina D es similar a la de la quimosina, pero esta enzima presenta una escasa actividad coagulante de la leche (McSweeney *et al.*, 1995).

En general, las BAL son microorganismos muy restrictivos en cuanto a sus requerimientos nutricionales, necesitando obligatoriamente la presencia de aminoácidos libres en el medio (Chopin *et al.*, 1993). Dado que en la leche las

concentraciones de péptidos y aminoácidos libres son muy bajas, y por tanto no son suficientes para el crecimiento celular óptimo de estos microorganismos, las BAL dependen fundamentalmente de su sistema proteolítico para sobrevivir en ese medio (Smit *et al.*, 2005b). Presentan un sistema proteolítico complejo (Fig. 1.4) que implica la acción concertada de proteinasas y peptidasas en la hidrólisis de la caseína de la leche hasta el nivel de aminoácidos esenciales necesarios para su desarrollo celular, contribuyendo a su vez en la formación de aroma (Law y Mulholland, 1995).

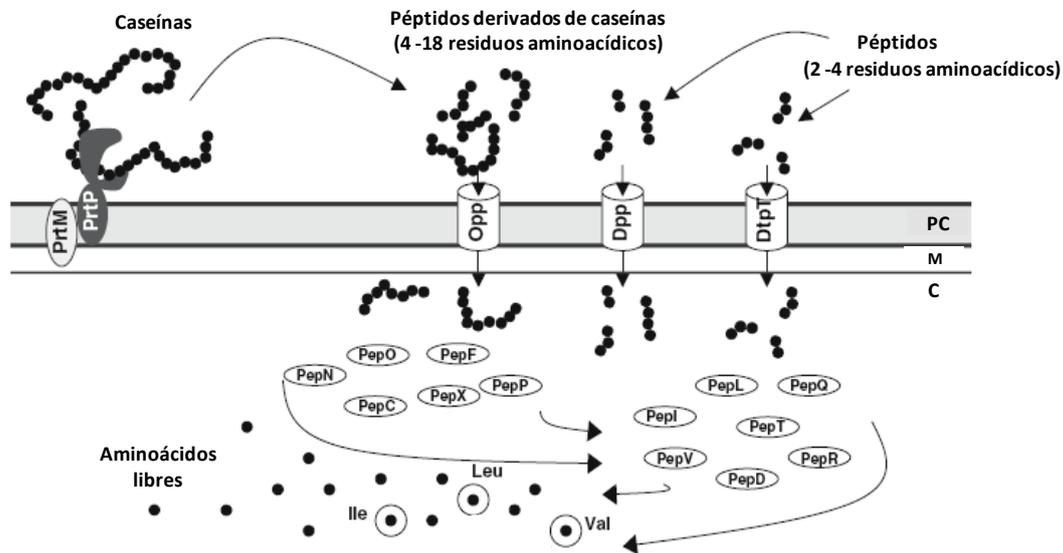


Figura 1.4. Resumen del sistema proteolítico de lactococos tras la hidrólisis de las caseínas. PC, M y C se corresponden con pared celular, membrana y citoplasma, respectivamente. PrtM, proteína de maduración de PrtP; PrtP, proteinasa de pared celular. Sistemas de transporte peptídico: Opp, transportador de oligopéptidos; DtpT, transportador de di- y tripéptidos hidrofílicos; Dpp, sistema de transporte de di- y tripéptidos hidrofóbicos. Peptidasas intracelulares: endopeptidasas PepO y PepF; aminopeptidasas generales PepN y PepC; aminopeptidasas específicas PepX, PepP y PepL, iminopeptidasas PepI, tripeptidasas PepT, prolidasas PepQ, dipeptidasas PepD y PepV, prolinasas PepR. Adaptado de Savijoki *et al.* (2006).

El sistema proteolítico mejor estudiado y revisado entre las BAL es el perteneciente al género *Lactococcus* (Kunji *et al.*, 1996; Siezen, 1999). Tal y como se representa en la Fig. 1.4, poseen una proteinasa asociada a la pared celular (PrtP), varias oligoendopeptidasas (PepO y PepF), al menos dos aminopeptidasas generales (PepN y PepC), una glutamil-aminopeptidasas (PepA), una prolil-

dipeptidasa aminopeptidasa (PepX), una prolidasa (PepQ), una tripeptidasa genérica (PepT), y una dipeptidasa general (PepV); también poseen sistemas para el transporte de péptidos (Opp, Dpp, DtpT) y aminoácidos.

La proteinasa de pared celular, PrtP, se sintetiza como una pre-pro-proteína de aproximadamente 2000 residuos aminoacídicos conteniendo varios dominios funcionales (Siezen, 1999; Fernández-Esplá *et al.*, 2000). La pre-pro-proteína es transportada al exterior celular a través de la membrana, en donde se ancla por el extremo C-terminal y se activa mediante hidrólisis de la pro-secuencia. La enzima madura es una proteína monomérica del tipo serínproteasa con una masa molecular aproximada de 200 kDa. El género *Lactococcus* posee varias proteinasas (PrtPs) en función de los diferentes perfiles de degradación de α_{S1} -, β - y κ -caseínas, las proteinasas P_I y P_{III} (Kunji *et al.*, 1996). A su vez, las PrtPs pueden ser clasificadas en siete grupos (a, b, c, d, e, f y g) en función de la especificidad de hidrólisis frente al fragmento α_{S1} -CN (fl-23) (Kunji *et al.*, 1996).

La proteinasa de pared da lugar a la formación de diferentes oligopéptidos, principalmente de entre 4-8 residuos, que contienen todos los aminoácidos esenciales para el crecimiento de estas bacterias y que son transportados al interior celular para su degradación final hasta aminoácidos (Juillard *et al.*, 1995). Para trasladar aminoácidos y los di-, tri- y oligopéptidos al interior celular se han descrito diferentes sistemas de transporte, que en *Lactococcus* pueden dividirse en las siguientes categorías:

- Sistemas de transporte de aminoácidos, altamente específicos frente a aminoácidos estructuralmente similares. Algunos utilizan la hidrólisis del ATP como fuente de energía (Glu, Gln, Asn y Asp), otros la fuerza motriz de protones (Ala, Ser, Leu, Val, Ile y Lys), mientras que otros actúan a través de un gradiente de concentración (Arg/Orn, His/Hin, Tyr/Tyn y Asp/Ala) (Ganesan y Weimer, 2007).
- Sistema de transporte de di- y tripéptidos hidrofílicos (DtpT), que actúa bajo la fuerza motriz de protones.
- Sistema de transporte de di- y tripéptidos hidrofóbicos (Dpp), que requiere la hidrólisis de ATP.
- Sistema de transporte de oligopéptidos, que utiliza la hidrólisis del ATP y está formado por cinco tipos de proteínas: una proteína de unión a los péptidos que van a ser transportados (OppA), dos proteínas integradas en la

membrana (OppB y OppC) y dos proteínas del tipo ABC -ATP Binding Cassette- (OppD y OppF) (Doeven *et al.*, 2005).

El sistema peptidásico descrito en BAL está compuesto por distintas enzimas (Fig. 1.4) que han sido ampliamente estudiadas (Kunji *et al.*, 1996; Law y Haandrikman, 1997; Siezen *et al.*, 2002). Estas enzimas pueden dividirse, en función de su mecanismo de acción, en: endopeptidasas (PepO, PepE y PepF), aminopeptidasas (PepN, PepC, PepA y PepL), carboxipeptidasas, di- y tripeptidasas (PepV y PepT) y peptidasas específicas de prolina (PepX, PepI, PepP, PepQ y PepR).

Durante mucho tiempo, la proteólisis fue considerada como la etapa limitante para la formación del aroma durante el proceso de maduración del queso. Sin embargo, a partir de los trabajos de Christensen *et al.* (1995) y Wallace y Fox (1997), se observó que una intensificación en los procesos de proteólisis y peptidólisis no suponía un incremento en la formación de compuestos aromáticos, llamando así la atención sobre la degradación de aminoácidos. En este sentido, cobran especial relevancia los trabajos de Gao *et al.* (1997) e Yvon *et al.* (1998) en los que se demuestra que es posible lograr un incremento en la producción de aroma estimulando el catabolismo de los aminoácidos.

1.3. Catabolismo de aminoácidos: rutas, actividades enzimáticas y mecanismos de regulación

El catabolismo de los aminoácidos representa para las BAL la generación de ATP, carbono, azufre y nitrógeno necesarios para los procesos fisiológicos. Además, el conjunto de reacciones que forman parte del catabolismo de aminoácidos libres durante el proceso de maduración en el queso da lugar a la formación de compuestos volátiles con una importante contribución al sabor y al aroma (McSweeney y Sousa, 2000). Hasta los años 90 existía la creencia generalizada de que muchos de los compuestos aromáticos del queso se forman por vía química (Marilley y Casey, 2004), dejando los estudios acerca de la degradación microbiana de aminoácidos relegados a un segundo plano. Sin embargo, tal y como se describe

en diversas revisiones científicas, en los últimos años, el estudio del catabolismo de aminoácidos en BAL ha ido cobrando relevancia (McSweeney y Sousa, 2000; Yvon y Rijnen, 2001; Curtin y McSweeney, 2004; Smit *et al.*, 2005b; Ardö, 2006; Fernández y Zúñiga, 2006; Yvon, 2006; Liu *et al.*, 2008). Estos estudios han puesto de manifiesto que la contribución principal de la proteólisis al desarrollo del aroma en queso es a través de la liberación de aminoácidos, los cuales actúan como precursores para las reacciones catabólicas.

Se han descrito varios procesos de conversión de aminoácidos, incluyendo tanto mecanismos enzimáticos como no enzimáticos (Visser, 1993) y en BAL, de forma general, se pueden distinguir dos patrones de degradación principales que se inician por la acción de una enzima aminotransferasa o por una enzima liasa (Yvon y Rijnen, 2001) (Fig. 1.5).

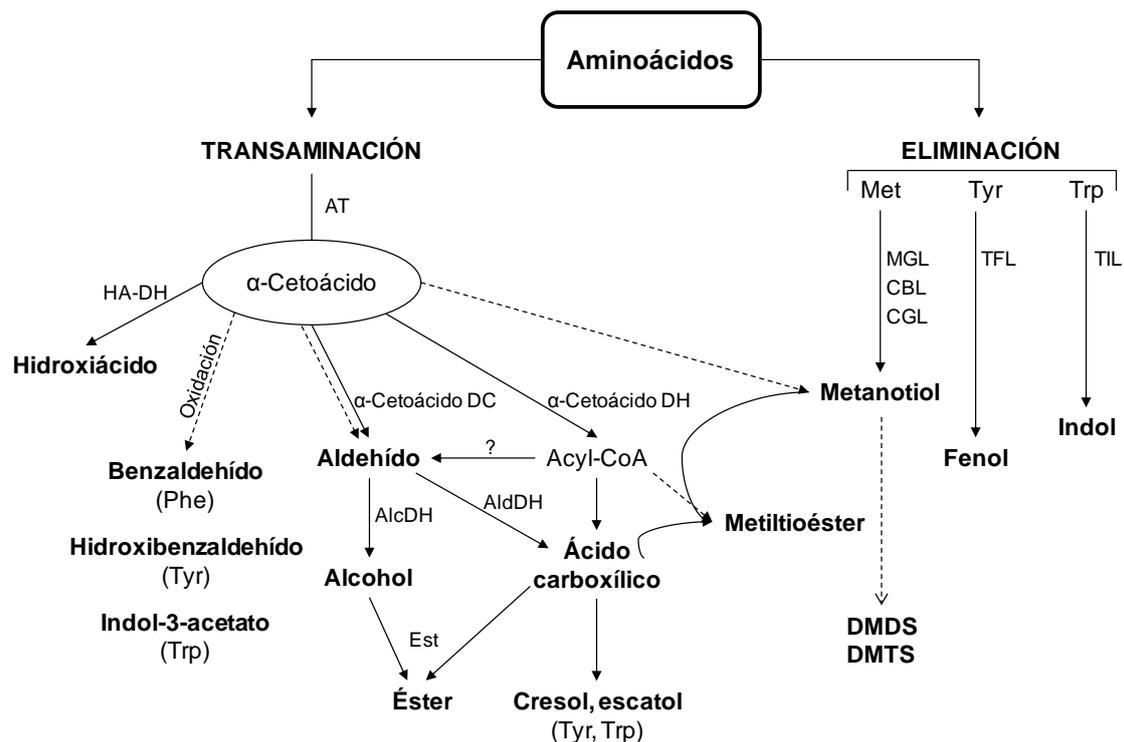


Figura 1.5. Esquema general de las principales rutas catabólicas que participan en la conversión de aminoácidos durante la maduración del queso. AT, aminotransferasa; HA-DH, hidroxiaácido deshidrogenasa; α-Cetoácido DC, α-cetoácido decarboxilasa; α-Cetoácido DH, α-cetoácido deshidrogenasa; AlcDH, alcohol deshidrogenasa; AldDH, aldehído deshidrogenasa; Est, esterasa; MGL, metionina γ-liasa; CGL, cistationina γ-liasa; CBL, cistationina β-liasa; TFL, tirosina-fenol liasa; TIL, triptófano-indol liasa; DMDS, dimetildisulfuro; DMTS, dimetiltrisulfuro; línea discontinua, degradación no enzimática. Adaptado de Yvon y Rijnen (2001).

La primera ruta de degradación, transaminación, la inicia una enzima aminotransferasa que transfiere el grupo amino de un aminoácido a un α -cetoácido. Los α -cetoácidos producidos por la transaminación de los aminoácidos serán degradados a otros compuestos bien por reacciones químicas o bien por reacciones enzimáticas (Fig. 1.5). Esta vía del catabolismo es la que siguen los aminoácidos de cadena ramificada (Val, Ile, Leu), los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp), la metionina y el ácido aspártico. La segunda ruta, eliminación, comienza con la actividad de una enzima liasa, catalizando una reacción de eliminación que dará lugar a la formación de compuestos azufrados y otros compuestos (Fig. 1.5). Esta ruta es particularmente importante para el catabolismo de los aminoácidos aromáticos y la metionina (Smit *et al.*, 2005b).

Tal y como se muestra en la Tabla 1.2, los aminoácidos son precursores de compuestos importantes del aroma. El aroma final del queso dependerá de la combinación adecuada de aminoácidos y del equilibrio entre los compuestos volátiles generados. Durante el proceso de maduración del queso se dan unas condiciones ambientales lejanas a las óptimas para la supervivencia de las BAL, como son la ausencia de lactosa, baja temperatura, un pH ácido y elevado contenido en sal, que hacen que estas bacterias activen el catabolismo de aminoácidos, siendo el dominante en la fase final de maduración (Christensen *et al.*, 1999; Tamman *et al.*, 2000). Además, los procesos catabólicos que ocurren dependen tanto del género bacteriano y su fisiología como de procesos metabólicos específicos (Ganesan *et al.*, 2004a y b), por lo que la capacidad de formación de compuestos volátiles de las bacterias lácticas se ha considerado como un proceso cepa-dependiente (Seefeldt y Weimer, 2000; Yvon y Rijnen, 2001; Ganesan *et al.*, 2004a).

Tabla 1.2. Compuestos del aroma derivados del catabolismo de aminoácidos (Requena y Peláez, 2007).

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
Triptófano	Fenol	Medicinal
	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
Ácido aspártico	Dimetilsulfido	Col, ajo, azufre
	Ácido metiltioacético	
	Diacetilo (2,3-butanodiona)	Mantequilla, nuez
	Acetoína (3-hidroxi-2-butanona)	Mantequilla, leche ácida
	Ácido acético	Vinagre, agrio, ácido

1.3.1. Catabolismo de aminoácidos iniciado por una reacción de transaminación

La ruta de transaminación se inicia por la actividad de aminotransferasas que convierten los aminoácidos en sus correspondientes α -cetoácidos (Hemme *et al.*, 1982). Los α -cetoácidos se transforman posteriormente por vía química y/o enzimática en aldehídos, alcoholes y ésteres, algunos de los cuales son potentes compuestos volátiles. En la Tabla 1.3 se muestran los compuestos generados por esta vía a partir de los aminoácidos relevantes en la formación de aroma. En los siguientes apartados se detallan cada una de las actividades enzimáticas implicadas en esta ruta metabólica (Fig.1.6).

Tabla 1.3. Nombre y naturaleza química de los principales compuestos derivados del catabolismo de aminoácidos a través de la ruta iniciada por una aminotransferasa. AA, aminoácido. Adaptado de Smit *et al.* (2005b) y Ardö (2006).

AA	Cetoácido	Aldehído	Alcohol	Ácido carboxílico	Éster	Otros
Leu	α -Ceto-isocaproato	3-Metilbutanal	3-Metilbutanol	Ác. 3-metilbutírico	Etil-3-metil-butanoato	-
Ile	α -Ceto-3-metilpentanoato	2-Metilbutanal	2-Metilbutanol	Ác. 2-metilbutírico	-	-
Val	α -Ceto-isovalerato	2-Metilpropanal	2-Metilpropanol	Ác. 2-metil propanoico	Etilisobutanoato	-
Phe	Fenilpiruvato	Fenilacetaldehído Benzaldehído	Feniletanol Fenilmetanol	Ác. Fenilacético Ác. benzoico	Feniletilacetato Etilbenzoato	-
Tyr	Hidroxi-fenilpiruvato	Hidroxi-fenilacetaldehído	Hidroxi-feniletanol	Ác. Hidroxi-fenilacético	Fenol	<i>p</i> -Cresol
Trp	Indole-3-piruvato	Indol-3-acetaldehído	Triptofol	Indol-3-acetato	-	Escatol
Met	α -Ceto-metiltiobutirato	Metional	Metiltiopropanol	Ác. metiltio-butírico	Etilmetiltio-propionato	Metanotio l
Asp	Oxalacetato	-	-	Malato	-	Diacetilo, acetoina

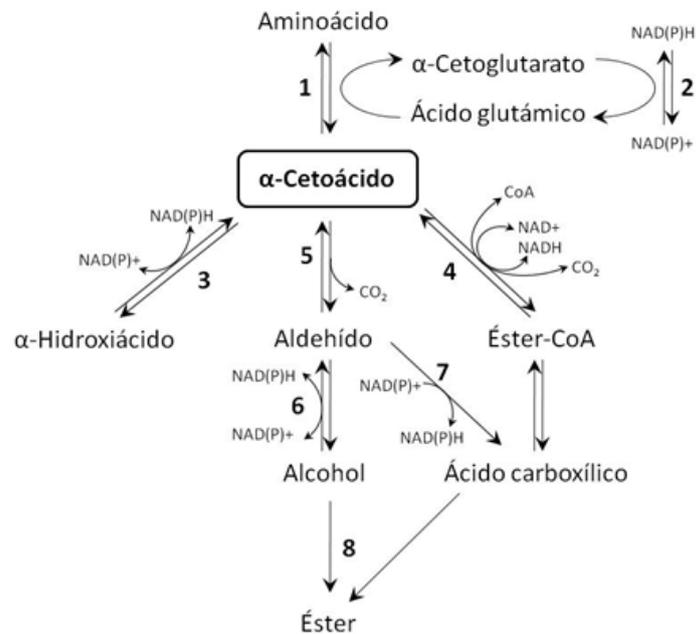


Figura 1.6. Esquema de la ruta de degradación de los α -cetoácidos. Adaptado de Liu *et al.* (2008) y Smit *et al.* (2009). Claves numéricas: 1, aminotransferasa; 2, glutamato deshidrogenasa; 3, hidroxiácido deshidrogenasa; 4, α -cetoácido deshidrogenasa; 5, α -cetoácido descarboxilasa; 6, alcohol deshidrogenasa; 7, aldehído deshidrogenasa; 8, esterasa.

1.3.1.1. Actividad aminotransferasa

Las aminotransferasas son enzimas dependientes de piridoxal-5-fosfato responsables de la conversión de los aminoácidos en su correspondiente α -cetoácido mediante la transferencia del grupo amino del aminoácido a una molécula aceptora, que generalmente es el α -cetoglutarato, que se transforma en ácido glutámico (Yvon *et al.*, 1998) (Figs. 1.6 y 1.7). Aunque en las reacciones de transaminación en *L. lactis*, el α -cetoglutarato es el principal aceptor de grupos amino (Yvon *et al.*, 1997; Engels *et al.*, 2000; Yvon *et al.*, 2000), también hay otros α -cetoácidos que pueden ser utilizados como aceptores, como son piruvato y oxalacetato (Ganesan y Weimer, 2007). Sin embargo, en estos dos últimos casos las actividades aminotransferasas resultaron ser mucho menores que con el α -cetoglutarato (Yvon *et al.*, 1997; Yvon *et al.*, 2000).

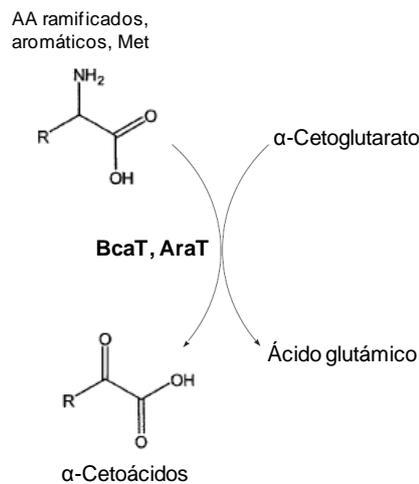


Figura 1.7. Conversión de los aminoácidos (AA) en α -cetoácidos por la acción de enzimas aminotransferasas. BcaT, aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada; AraT, aminotransferasa de aminoácidos aromáticos.

En BAL, se han identificado y caracterizado diversas enzimas aminotransferasas (Yvon *et al.*, 1997; Gao y Steele, 1998; Rollan *et al.*, 1998; Rijnen *et al.*, 1999a; Engels *et al.*, 2000; Yvon *et al.*, 2000) siendo BcaT la enzima que realiza la actividad aminotransferasa preferentemente en los aminoácidos de

cadena ramificada (BCAA, "branched chain amino acids") y AraT la de aminoácidos aromáticos. En el genoma de *L. lactis* IL1403 se han anotado 12 posibles aminotransferasas (Bolotin *et al.*, 2001), algunas de las cuales están aún sin caracterizar. La actividad BcaT de *L. lactis* ha sido caracterizada por Yvon *et al.* (2000) y la de aminoácidos aromáticos AraT por Yvon *et al.* (1997) y Gao y Steele (1998). BcaT es activa frente a los tres BCAA (leucina, isoleucina y valina) y en menor medida frente a metionina (Rijnen *et al.*, 2003). AraT es activa frente a aminoácidos aromáticos, principalmente fenilalanina, y en mucha menor medida frente a leucina y metionina, solapándose así con los sustratos de la enzima BcaT (Rijnen *et al.*, 1999a y 2003). Aunque el papel individual de las aminotransferasas de *L. lactis* en el catabolismo de aminoácidos sólo se conoce parcialmente, estudios realizados mediante la inactivación de ambos genes *araT* y *bcaT*, tanto separadamente como en conjunto, demostraron que estas enzimas son esenciales para la formación de compuestos volátiles derivados de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada y que participan de manera importante en la formación de compuestos volátiles azufrados (Rijnen *et al.*, 1999b y 2003; Yvon *et al.*, 2000).

Para que las reacciones de transaminación se produzcan es necesaria la presencia de un aceptor del grupo amino, que generalmente es el α -cetoglutarato, ya que es el α -cetoácido aceptor con el que tienen más afinidad las aminotransferasas. Por ello, se considera que la transaminación y más aún, la formación de α -cetoglutarato, es uno de los factores limitantes en la formación de compuestos volátiles en queso durante el proceso de maduración. Diversos estudios realizados con pastas de quesos en los que se empleaba la adición exógena de α -cetoglutarato para mejorar el aroma en queso a través del incremento en la actividad aminotransferasa, demostraron que se producía un aumento significativo de la cantidad de compuestos aromáticos producto del catabolismo de los aminoácidos (Yvon *et al.*, 1998; Banks *et al.*, 2001; Shakeel-Ur-Rehman y Fox, 2002). Igualmente se ha demostrado que las aminotransferasas compiten por el α -cetoglutarato, de ahí que la producción de compuestos volátiles se vea afectada por las actividades relativas que tengan sobre determinados aminoácidos (Kieronczyk *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha descrito que el α -cetoglutarato puede autodegradarse hasta ácidos grasos (Ganesan *et al.*, 2004a), lo que limitaría aun más la reacción de transaminación.

La transaminación de metionina conduce a la formación de ácido α -cetometil-tio-butirato (KMBA) (Fig. 1.5), del que parte se convierte químicamente en metil-tioacetaldehído, metanotiol y dimetilsulfuros. Tanto en lactococos como en lactobacilos, la conversión de metionina se inicia principalmente por

transaminación, aunque parte puede demetiolarse en una reacción de eliminación que da lugar a metanotiol (Requena y Peláez, 2007) (Fig. 1.5).

1.3.1.2. Actividad glutamato deshidrogenasa

En BAL, la reacción de transaminación se encuentra generalmente ligada a la desaminación oxidativa del glutamato hacia ácido oxoglutarico (α -cetoglutarato), reacción catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) (Fig. 1.6 [2]). En *L. lactis*, el α -cetoglutarato puede producirse por tres rutas metabólicas, dos de ellas requieren citrato permeasa y citrato liasa (Lapujade *et al.*, 1998) y por vía GDH.

Las enzimas GDH son un grupo muy heterogéneo, lo que ha llevado a distintas clasificaciones a lo largo de su estudio. Una clasificación reciente divide a estas enzimas en cuatro grupos distintos. Las clases GDH-1 y GDH-2 son pequeñas enzimas hexaméricas ampliamente distribuidas en bacterias y que son capaces de emplear indistintamente NAD^+ o NADP^+ como coenzima (Andersson y Roger, 2003). Según esta clasificación, el grupo GDH-3 lo componen GDHs de mayor tamaño (115 kDa) encontradas mayoritariamente en hongos y protistas (Andersson y Roger, 2003). Finalmente, el grupo GDH-4 son enzimas NAD^+ específicas, con un tamaño aproximado de 180 kDa y que han sido descritas en algunos géneros de eubacterias (Miñambres *et al.*, 2000; Andersson y Roger, 2003). Sin embargo, la clasificación habitual de las GDHs se realiza en función de sus especificidades metabólicas, las dependientes de NAD^+ (E.C. 1.4.1.2) y aquellas dependientes de NADP^+ (E.C. 1.4.1.3). La actividad GDH- NAD^+ se relaciona con un papel fundamentalmente catabólico, mientras que la dependencia de NADP^+ supone una implicación de la enzima en la asimilación de amonio y por tanto en la síntesis de ácido glutámico (Smith *et al.*, 1975).

Es importante tener en cuenta que las enzimas GDH juegan un papel relevante en el metabolismo del nitrógeno ya que permiten la asimilación del amonio libre empleando el glutamato como molécula de almacenaje de nitrógeno, cuando los niveles de amonio son elevados. En cambio, cuando los niveles de amonio son bajos, la GDH degradaría el exceso de glutamato, generando el α -cetoglutarato que quedaría a disposición de la célula para procesos de obtención de energía y biosíntesis (Smith *et al.*, 1975; Brunhuber y Blanchard, 1994). También se han descrito otras funciones importantes asociadas a la actividad GDH y su capacidad de producir α -cetoglutarato, como por ejemplo, su papel en el

crecimiento y supervivencia de *Lactobacillus plantarum* bajo diferentes condiciones ambientales (Siragusa *et al.*, 2011), su papel en la protección frente al estrés oxidativo en *Pseudomonas fluorescens* (Mailloux *et al.*, 2009), o su intervención en la regulación de la producción de β -lactano en *Penicillium chrysogenum* (Thykaer *et al.*, 2008).

Se ha detectado la presencia de la actividad GDH en algunas cepas de diferentes BAL, incluidas cepas de *L. lactis* de origen no lácteo (Tanous *et al.*, 2002; Kieronczyk *et al.*, 2003; Helinck *et al.*, 2004; Guttierrez-Méndez *et al.*, 2008) y además, se ha caracterizado el gen que codifica la actividad GDH en una estirpe silvestre de *L. lactis* aislada de guisantes (Tanous *et al.*, 2005a). La actividad se encuentra localizada en un plásmido que contiene múltiples elementos IS, los cuales podrían haber intervenido en eventos de transferencia entre *L. lactis* (Tanous *et al.*, 2006) y otros microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Yvon, 2006; Tanous *et al.*, 2007).

Como se ha comentado anteriormente, se considera la disponibilidad de α -cetoglutarato como el factor limitante para la producción de compuestos aromáticos a partir de aminoácidos en queso (Yvon *et al.*, 2000; Tanous *et al.*, 2002; Yvon, 2006). De ahí la importancia de intensificar las reacciones iniciales del catabolismo de aminoácidos, para lo cual se han descrito dos estrategias fundamentalmente: la primera de ellas, mediante la adición exógena de α -cetoglutarato previa a la maduración del queso (Yvon *et al.*, 1998; Banks *et al.*, 2001); la segunda opción consistiría en el empleo de cepas con actividad GDH y así con capacidad para producir α -cetoglutarato a partir del glutamato presente en el queso. La actividad GDH es poco frecuente en *L. lactis* aunque, como ya se ha mencionado con anterioridad, tiene un papel relevante en la formación de precursores de compuestos aromáticos a partir de aminoácidos, lo que le conferiría a la cepa que la contenga un gran valor añadido para la maduración de queso.

1.3.1.3. Actividad hidroxíácido deshidrogenasa

Los α -cetoácidos producidos por transaminación pueden reducirse dando lugar a hidroxíácidos (Roudot-Algaron e Yvon, 1998) (Fig. 1.6 [3]). Estos compuestos, sin embargo, no participan en el sabor ni en el aroma de queso, ni tampoco son precursores de compuestos del aroma (Yvon y Rijnen, 2001). La reacción de hidrogenación está catalizada por enzimas hidroxíácido deshidrogenasas (HA-DH) dependientes de NAD(H). Las enzimas HA-DHs, en

general, admiten una amplia variedad de sustratos y se encuentran en dos formas estereoespecíficas, D- y L-, aunque la forma L- es la más inusual. Entre las diferentes HA-DHs estudiadas, una de las mejor conocidas es la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), cuya especificidad de sustrato está fundamentalmente limitada al piruvato, al que reduce a ácido láctico (Garvie, 1980; Taguchi y Ohta, 1991; Llanos *et al.*, 1992; Delcour *et al.*, 1993; Bhowmik *et al.*, 1994; Savijoki y Palva, 1997). Otras enzimas HA-DHs han sido denominadas genéricamente hidroxiiisocaproato deshidrogenasas (Hic-DH), ya que el α -cetoisocaproato (KIC) es su sustrato preferente. Las enzimas Hic-DH son generalmente homodímeros con un tamaño de subunidad entre 30.000 y 38.000 Da y, aunque son activas frente a distintos sustratos como los α -cetoácidos alifáticos de cadena sencilla, los α -cetoácidos derivados de BCAA, fenilpiruvato y también frente al KMBA derivado de la metionina, su sustrato preferente es el KIC derivado de la leucina (Yvon y Rijnen, 2001).

En BAL, las HA-DHs desempeñan un papel importante en el mantenimiento del balance redox intracelular a través de la conversión del NADH generado durante la glicólisis (Smit *et al.*, 2005b). El análisis de los genomas de *L. lactis* IL1403 y MG1363 (Bolotin *et al.*, 2001; Wegmann *et al.*, 2007) mostraron que *L. lactis* poseía varias HA-DHs, presentando homología con otras HA-DHs de otras bacterias lácticas. Sin embargo, se demostró experimentalmente que ninguna de estas presuntas enzimas tenía actividad HA-DH (Chambellon *et al.*, 2009). De hecho, esta actividad fue identificada, mediante mutagénesis aleatoria, en el producto codificado por el gen *panE*, que había recibido dicha anotación por su homología con ketopantoato reductasas. Además, se comprobó que la enzima codificada por *panE* era la única responsable de la reducción de los α -cetoácidos de cadena ramificada a α -hidroxiácidos en *L. lactis* (Chambellon *et al.*, 2009).

La hidrogenación de los α -cetoácidos se trata, por tanto, de una reacción estereoespecífica y reversible, que se encuentra ampliamente distribuida en BAL, y que afecta negativamente al flujo de las reacciones dirigidas hacia la formación de compuestos volátiles mediante la disminución de la concentración de α -cetoácidos.

1.3.1.4. Actividad cetoácido deshidrogenasa

Los α -cetoácidos resultantes de la transaminación de aminoácidos pueden dar lugar a ácidos carboxílicos sin formación transitoria de aldehído vía descarboxilación oxidativa (Fig. 1.6 [4]) (Yvon y Rijnen, 2001). Esta conversión la

cataliza el complejo cetoácido deshidrogenasa, que está formado por tres componentes catalíticos: una α -cetoácido deshidrogenasa (E1), que a su vez se compone de las subunidades α y β , una dihidrolipoil transacilasa (E2) y una lipoamida deshidrogenasa (E3) (Reed, 1974; Yvon y Rijnen, 2001). El primer paso de la reacción supone la conversión del α -cetoácido en su acil-coenzima A que posteriormente será transformado en el ácido orgánico correspondiente.

Aunque el complejo cetoácido deshidrogenasa no se ha caracterizado todavía en BAL, sí se ha detectado dicha actividad en *L. lactis* (Gao *et al.*, 1997; Yvon *et al.*, 1998) y en propionibacterias (Thierry *et al.*, 2002), donde actúa fundamentalmente a pH 5,5 y se inhibe por arsénico trivalente. La desaminación oxidativa de α -cetoácidos por este complejo tiene también un papel relevante en la formación de aroma en queso, ya que los ácidos carboxílicos como por ejemplo el isovalérico (derivado de BCAA) o el indolacético y el hidroxifenilacético (derivados de aminoácidos aromáticos) son potentes compuestos volátiles. Además, estos ácidos carboxílicos son a su vez precursores de otros compuestos aromáticos como ésteres, tioésteres o tioles, el cresol y el escatol.

1.3.1.5. Actividad cetoácido descarboxilasa

La descarboxilación no oxidativa de los α -cetoácidos derivados de aminoácidos aromáticos, de cadena ramificada y de la metionina conduce a la formación de los aldehídos correspondientes (Fig. 1.6 [5]). Entre los aldehídos formados, han acaparado gran parte de la atención en los últimos años aquellos formados a partir de BCAAs, como 2-metilpropanal y 2- y 3-metilbutanal, por intervenir de forma importante en el desarrollo del aroma de algunos quesos (Barbieri *et al.*, 1994). Estos aldehídos aportan un aroma asociado a malta o chocolate y tienen bajos umbrales de detección (Sheldon *et al.*, 1971). Además, debido 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 estudios realizados hasta ahora indican que en BAL, la habilidad para producir concentraciones notables de aldehídos a partir de α -cetoácidos es muy poco frecuente y dependiente de cepa (Smit *et al.*, 2004b; Fernández de Palencia *et al.*, 2006; Yvon, 2006; Liu *et al.*, 2008). La actividad α -cetoácido descarboxilasa ha sido descrita sólo en algunas especies de bacterias lácticas (Hickey *et al.*, 1983; Ayad *et al.* 1999; De la Plaza *et al.*, 2004 y 2006; Helinck *et al.*, 2004; Smit *et al.*,

2004a; Liu *et al.*, 2008), encontrándose que en *L. lactis* se relaciona en mayor medida con cepas que no tienen un origen lácteo (Tucker y Morgan, 1967; Smit *et al.*, 2004b). La enzima α -cetoácido descarboxilasa, codificada por el gen *kivD* o *kdcA*, fue purificada y caracterizada por primera vez en *L. lactis* por De la Plaza *et al.* (2004) y posteriormente por Smit *et al.* (2005a). De los genomas de *L. lactis* publicados en la actualidad (Bolotin *et al.*, 2001; Makarova *et al.*, 2006; Wegmann *et al.*, 2007; Linares *et al.*, 2010; Siezen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011), se puede observar la presencia del gen *kivD* en *L. lactis* CV56; *L. lactis* KF147 y en *L. lactis* IL1403. En el caso de *L. lactis* IL1403, el gen *kivD* es idéntico en un 74% al anotado como *ipd* en el genoma de *L. lactis* IL1403, que presuntamente codifica una indolpiruvato descarboxilasa y está interrumpido por la inserción de un elemento IS983, responsable de la pérdida de actividad de la enzima.

El estudio de De la Plaza *et al.* (2004) mostró que el gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 presenta un tamaño de 1647 pb y codifica para una proteína de 61 kDa. La proteína KivD es una enzima α -cetoácido descarboxilasa no oxidativa, dependiente de tiamina difosfato, incluida dentro del grupo de enzimas piruvato descarboxilasas. Para llevar a cabo la descarboxilación del α -cetoácido necesita la presencia de Mg^{2+} , aunque también se activa ante otros cationes bivalentes como Ca^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} , así como con Na^+ (De la Plaza *et al.*, 2004). KivD presenta una alta especificidad frente al ácido α -cetoisovalérico, metabolito intermediario de la síntesis de leucina y valina, aunque también tiene actividad descarboxilasa sobre cetoácidos derivados de la metionina y de la fenilalanina (Amárta *et al.*, 2001; De la Plaza *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2005a).

La enzima KivD (denominada así por su máxima especificidad frente al α -cetoisovalerato) es considerada clave para la formación de aldehídos procedentes de BCAAs (De la Plaza *et al.*, 2004 y 2009; Smit *et al.*, 2005a; Yvon, 2006). Estos aldehídos pueden oxidarse por una enzima aldehído deshidrogenasa a los correspondientes ácidos orgánicos. Dado que estos ácidos también pueden formarse directamente por descarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos, es probable que las bacterias utilicen preferentemente esta vía que economiza energía, no habiéndose encontrado actividad α -cetoácido descarboxilasa en bacterias lácticas de forma generalizada (Smit *et al.*, 2005b; Fernández de Palencia *et al.*, 2006).

1.3.1.6. Actividades alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa

Las enzimas alcohol deshidrogenasa (AlcDH) y aldehído deshidrogenasa (AldDH) catalizan la reducción de aldehídos a alcoholes y la oxidación de los mismos a ácidos carboxílicos, respectivamente (Fig. 1.6 [6 y 7]). Estas actividades han sido relativamente poco estudiadas en BAL pero de ellas se sabe que en el caso de la enzima AlcDH, el equilibrio de la reacción suele estar desplazado hacia la formación de alcohol y, que la enzima AldDH emplea NAD^+ como aceptor de hidrógeno y el equilibrio de la reacción suele estar desplazado hacia el ácido orgánico (Nosova *et al.*, 2000; Smit *et al.*, 2005b).

Recientemente, el estudio de comparación de genomas de varias bacterias lácticas realizado por Liu *et al.* (2008) evidencia la presencia de varias enzimas con actividad AlcDH y una bifuncional con actividad AldDH/AlcDH en *L. lactis*.

1.3.1.7. Actividad esterasa

El catabolismo de aminoácidos puede dar lugar a la formación de ésteres como etilbutirato, etilisovalerato y feniletacetato, que suelen ser los responsables del aroma frutal y floral de ciertos quesos como Cheddar y Camembert (Bills *et al.*, 1965; Roger *et al.*, 1988; Fox y Wallace, 1997; Kubickova y Grosch, 1997).

Los ésteres se forman por la reacción entre ácidos carboxílicos y alcoholes (Fig. 1.6 [8]). Fernández *et al.* (2000a) demostraron mediante la inactivación del gen *estA*, que codifica una esterasa que cataliza la biosíntesis de ésteres derivados de ácidos grasos de cadena corta, que en *L. lactis* la actividad esterasa quedaba anulada al mutar dicho gen. Posteriormente, se demostró que efectivamente, en *L. lactis*, *estA* codifica la única enzima responsable de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta *in vitro* (Nardi *et al.*, 2002). A pesar de ello, la extrapolación de esos resultados al queso es realmente difícil, ya que el equilibrio de la reacción de esterificación depende de diversos factores, como la actividad de agua (Smit *et al.*, 2005b).

1.3.2. Catabolismo de aminoácidos iniciado por reacciones de eliminación

La degradación de aminoácidos a compuestos volátiles puede seguir, además de la vía catabólica de transaminación, la ruta de degradación por enzimas liasas. En levaduras, micrococos y *Brevibacterium linens*, se han detectado las actividades tirosina-fenol liasa y triptófano-indol liasa, responsables de la β -eliminación de tirosina y triptófano, que dan lugar a fenol e indol, respectivamente (Fig. 1.5). Sin embargo, estas actividades no han sido detectadas en BAL (Parliment *et al.*, 1982; Jollivet *et al.*, 1992; Gummala y Broadbent, 1999; Liu *et al.*, 2008), lo que hace suponer que en lactococos la conversión de estos aminoácidos se realice por la ruta iniciada por una aminotransferasa (Gao *et al.*, 1997).

Los compuestos volátiles azufrados como metanotiol (MTL), dimetilsulfuro (DMS), dimetildisulfuro (DMDS) y dimetiltrisulfuro (DMTS), tienen un gran impacto en el perfil sensorial de quesos (Weimer *et al.*, 1999; McSweeney y Sousa, 2000). Estos compuestos derivan normalmente de metionina y cisteína (Fig. 1.8), los cuales se encuentran generalmente en cantidades limitadas en los entornos lácteos (Pieniazek *et al.*, 1975; Rutherford y Moughan, 1998). En microorganismos utilizados en la producción de queso, la actividad liasa constituye la principal vía de degradación de metionina (Yvon y Rijnen, 2001). Las enzimas liasas catalizan una reacción de eliminación, utilizando como sustratos frecuentes los aminoácidos azufrados, y en menor medida los aromáticos. Se trata en general de rutas cortas ya que el tipo de degradación del sustrato lleva directamente a la formación de compuestos de menor tamaño y volátiles. Tal y como se muestra en la Fig. 1.8, la demetilación de metionina conduce a la formación de MTL, α -cetobutirato y amonio gracias a la acción de las C-S liasas (cistationina β -liasa [CBL], cistationina γ -liasa [CGL] y metionina γ -liasa [MGL]) (Alting *et al.*, 1995; Bruinenberg *et al.*, 1997; Smacchi and Gobbetti, 1998a; Dobrick *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2000b, Liu *et al.*, 2008).

En lactococos, la producción de compuestos volátiles azufrados es limitada (Dias y Weimer, 1998a), y las reacciones están catalizadas principalmente por las actividades CBL y CGL. La función principal de estas enzimas es la eliminación α - β y una eliminación α - γ , respectivamente, que convierte la cistationina en homocisteína o cisteína (Fig. 1.8). Ambas enzimas son dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP) y su pH óptimo de actividad está próximo a un valor 8, aunque siguen siendo activas a la concentración de sal y al pH encontrados durante la maduración en

queso (Yvon y Rijnen, 2001). Ambas actividades, CBL y CGL, han sido detectadas en diversas BAL como *L. lactis* (Alting et al., 1995), *Lb. fermentum* (Smacchi y Gobbetti, 1998a), *Lb. casei*, *Lb. helveticus* y algunas cepas de *B. linens* (Dias y Weimer, 1998a), pero solo se han purificado las enzimas de *L. lactis* y *Lb. fermentum*. La enzima CBL ha sido purificada en *L. lactis* B78, y también se ha identificado el gen que codifica dicha enzima (*metC*) (Alting et al., 1995; Fernández et al., 2000b). Se han purificado dos enzimas con actividad CGL, una en *L. lactis* SK11 (Bruinenberg et al., 1997) y otra en *Lb. fermentum* (Smacchi y Gobbetti, 1998a), y el gen *cgl* de *L. lactis* MG1363 fue caracterizado experimentalmente (Dobric et al., 2000). El análisis de especificidad de sustrato de las enzimas sugiere una función solapada entre CBL y CGL. Por ejemplo, se ha observado que la CBL es capaz de catalizar una α,γ -eliminación en *L. lactis* B78 y MG1363 al igual que lo haría la CGL (Alting et al., 1995; Dobric et al., 2000).

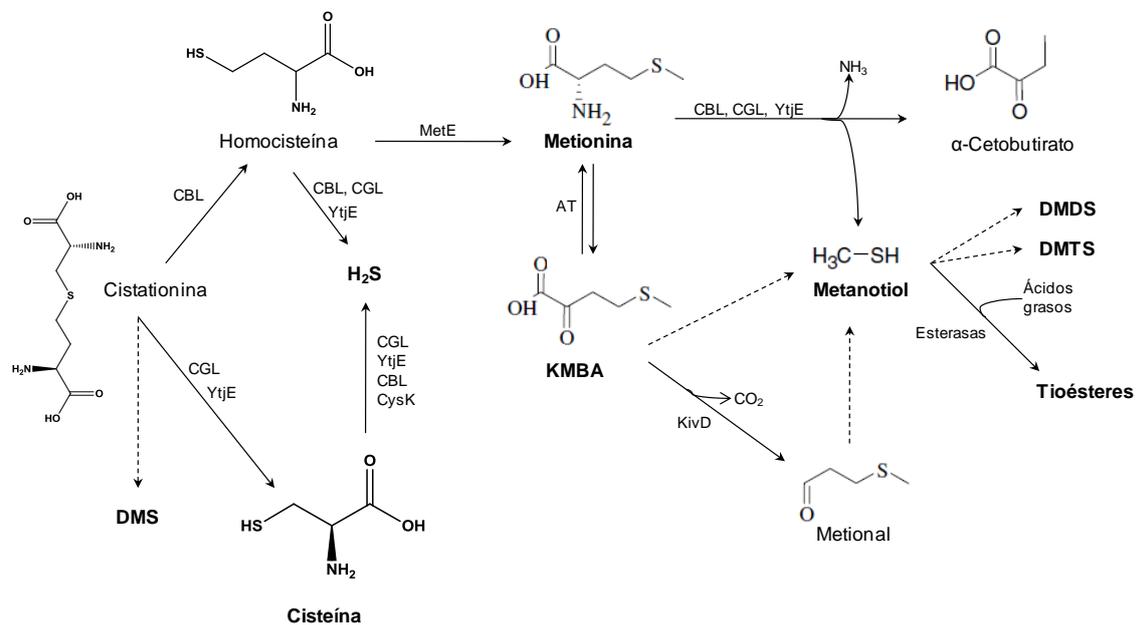


Figura 1.8. Conversión de la metionina en compuestos azufrados volátiles en *L. lactis*. En esta ruta aparecen las enzimas: MetE, metionina sintasa; AT, aminotransferasa; KivD, α -cetoisovalerato descarboxilasa; esterazas y las enzimas C-S liasas (CBL, cistationina α,β -liasa; CGL, cistationina α,γ -liasa; YtjE, cistationina α,γ -liasa; CysK, cisteína sintasa). H₂S, sulfuro de hidrógeno; KMBA, α -cetometiltiobutirato; DMS, dimetilsulfuro; DMSD, Dimetildisulfuro; DMTS, dimetiltrisulfuro. Las líneas de puntos indican degradaciones químicas. Adaptado de Smit et al. (2005b) y Liu et al. (2008).

Dentro de este grupo de C-S liasas se encuentra la enzima YtjE, caracterizada en nuestro laboratorio (Martínez-Cuesta *et al.*, 2006), y que posee una actividad de α,γ -eliminación que degrada la metionina en MTL (Fig. 1.8). Para la caracterización de dicha actividad, se clonó el gen *ytjE* de *L. lactis* IL1403 en *Escherichia coli*, se sobreexpresó y purificó como proteína recombinante. YtjE mostró actividad C-S liasa, compartiendo homología con la familia de enzimas MalY/PatC implicadas en la degradación de L-cisteína, L-cistina y L-cistationina. Igualmente, se observó una actividad α,γ -liasa sobre L-metionina. Además, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se comprobó que la actividad YtjE daba lugar a la formación de H₂S, a través de cisteína, y de metanotiol y sus productos derivados, DMDS y DMTS, a través de metionina (Martínez-Cuesta *et al.*, 2006). Por tanto, YtjE compartiría con otras liasas (CBL y CGL) la propiedad de degradar aminoácidos azufrados para producir compuestos aromáticos de interés.

La actividad metionina γ -liasa (MGL) cataliza la α,γ -eliminación de la metionina y se ha detectado principalmente en brevibacterias y corinebacterias, siendo *B. linens* la primera cepa en la que se detectó dicha actividad (Ferchichi *et al.*, 1985). La enzima fue posteriormente purificada y caracterizada por Dias y Weimer (1998b). Recientemente, estudios en los que se ha mutado el gen *mgl* que codifica para esta enzima (Arfi *et al.*, 2003; Amárita *et al.*, 2004; Bonnarme *et al.*, 2004), demostraron la pérdida total de producción de compuestos volátiles azufrados por la cepa mutante, confirmando así la importancia de esta enzima en la producción de compuestos azufrados en *B. linens*. Sin embargo, según el estudio de Liu *et al.* (2008) ninguno de los genomas de bacterias lácticas estudiados parece tener el gen *mgl*.

1.3.3. Catabolismo no enzimático de aminoácidos

Aunque la mayor parte de los compuestos aromáticos en queso se producen a partir de reacciones enzimáticas ocurridas durante la maduración, también pueden obtenerse compuestos volátiles como consecuencia de reacciones químicas (Figs. 1.5 y 1.8). Tal es el caso de compuestos como el benzaldehído y el metiltioacetaldéhid, que se pueden formar a partir de conversiones químicas de los α -cetoácidos derivados de la fenilalanina y metionina (ácido fenilpirúvico y KMBA, respectivamente) (Villablanca *et al.*, 1987; Nierop Groot y De Bont, 1998; Gao *et al.*, 1997; Bonnarme *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2004c). En estudios en los

que se simulaban condiciones de queso, también se ha observado la degradación espontánea de hidroxifenilpiruvato a hidroxibenzaldehído (Kieronczyk *et al.*, 2004), y en quesos semicurados se encontraron cantidades significativas tanto de benzaldehído como de hidroxifenilbenzaldehído (Yvon *et al.*, 1998).

La conversión química de α -cetoácidos, especialmente del α -cetoisocaproato que deriva de la leucina, ha sido estudiada con gran detalle y se ha observado que, al igual que en el caso del hidroxifenilpiruvato, puede ocurrir en condiciones de maduración de queso (Smit *et al.*, 2009). Por tanto, el aldehído 2-metilpropanal puede formarse a partir de una conversión enzimática derivada de la valina y a partir de una conversión no enzimática procedente de la leucina. La conversión química se basa en una oxidación con gran dependencia de la disponibilidad de sustrato (α -cetoácido y oxígeno), de manganeso y del pH (Smit *et al.*, 2004c; Kieronczyk *et al.*, 2006).

Otra degradación química observada es la llamada degradación de Strecker, un paso importante en la reacción de Maillard y que generalmente se define como la reacción que ocurre entre el grupo amino de un aminoácido con un grupo α -dicarbonilo de un azúcar reductor (Hofmann y Schieberle, 2000; Martins *et al.*, 2000). En el caso de la leucina, su grupo amino puede reaccionar con el grupo dicarbonilo de un azúcar reductor, produciéndose una deaminación seguida de una decarboxilación y derivando en la formación de 3-metilbutanal (Rizzi, 1998; Smit *et al.*, 2009).

1.3.4. Regulación del metabolismo de aminoácidos

En BAL, el metabolismo de aminoácidos 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 (Guédon *et al.*, 2005). La biosíntesis de aminoácidos está altamente regulada y, por lo tanto, las condiciones de crecimiento de los cultivos iniciadores podrían afectar también a su capacidad de formación de compuestos volátiles (Smit *et al.*, 2005b). Por ejemplo, la biosíntesis de los aminoácidos de la familia del glutamato (Glu, Gln, Arg y Pro) depende de la propia biosíntesis de glutamato que a su vez se ve afectada por la concentración del ion amonio en el medio (van Kranenburg *et al.*, 2002). En *L. lactis*, por ejemplo, el gen que codifica para una cistationina β -liasa (*cbl* o *metC*) se transcribe junto al gen *cysK*, que codifica para una cisteína sintasa (Fernández *et*

al., 2000b). La expresión del grupo *metC-cysK* está influenciada por la cantidad de metionina y cisteína existente en el medio de crecimiento (Fernández *et al.*, 2002), por lo que altas concentraciones de estos aminoácidos reducirían la transcripción y la actividad β -liala se vería afectada, comprometiendo la formación de compuestos volátiles azufrados (Smit *et al.*, 2005b).

En general, las bacterias controlan el uso de los nutrientes mediante reguladores globales de la transcripción, tales como CcpA y CodY, vinculando la expresión de genes al cúmulo intracelular de determinados metabolitos (Sonenshein, 2007). Además de esos reguladores existen otra serie de factores que actúan a nivel de operón o gen, afectando a enzimas implicadas tanto en la biosíntesis como en la degradación de aminoácidos (Guédon *et al.*, 2001a; Smit *et al.*, 2005b; Liu *et al.*, 2008).

1.3.4.1. Regulación general del metabolismo del nitrógeno por CodY

El regulador transcripcional CodY se encuentra en una gran variedad de bacterias Gram-positivas con bajo contenido en G+C, aunque la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en *Bacillus subtilis* y *L. lactis* (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001). Este regulador controla la mayor parte de los genes implicados en la asimilación de péptidos, incluyendo su transporte y la degradación por peptidasas (Guédon *et al.*, 2001c), y además controla la expresión de algunos transportadores de aminoácidos. Asimismo, reprime la expresión *de novo* de la mayoría de los genes implicados en la rutas de biosíntesis de aminoácidos, tales como BCAAs, glutamato-glutamina, histidina, serina, treonina, lisina y asparagina.

Tanto en *L. lactis* como en *B. subtilis*, los BCAAs son los efectores intracelulares que activan la represión por CodY (Guédon *et al.*, 2001c; Petranovic *et al.*, 2004; Shivers y Sonenshein, 2004; Sonenshein, 2007), por ello, en ambas especies, CodY ejerce un control *feedback* sobre la ruta de biosíntesis de sus efectores directos. Diversos estudios han confirmado que la isoleucina (Ile) es el efector más importante de entre todos los BCAAs para activar a CodY (Shivers y Sonenshein, 2004; Guédon *et al.*, 2005; den Hengst *et al.*, 2005a). Un exceso de Ile provocaría una inhibición del crecimiento, ya que se bloquearían las rutas de biosíntesis de aminoácidos en dependencia de la unión CodY-Ile (Goupil-Feuillerat *et al.*, 1997). Este efecto ha sido observado en varios estudios en *L. lactis* en los que se empleaban medios químicamente definidos ("chemically defined media",

CDM) (Guédon *et al.*, 2005), así como en medios complejos como leche (Chambellon e Yvon, 2003).

Según los estudios de Guédon *et al.* (2005) y Den Hengst *et al.* (2005b), los genes que son potencialmente regulables por CodY presentan en posición -35 de la región promotora una secuencia palindrómica de 15 nucleótidos (AATTTTCNGAAAATT) que actúa como una región de alta afinidad para CodY. Se ha demostrado que la presencia de la denominada caja CodY es suficiente para provocar una regulación mediada por CodY *in vivo*. Además, se ha identificado esta secuencia palindrómica en la región promotora del propio gen *codY*, indicando que CodY regula su propia síntesis y requiere de una caja CodY y BCAAs para interactuar con su promotor (Den Hengst *et al.*, 2005b).

1.3.4.2. Regulación del sistema proteolítico

Ante carencias en la disponibilidad del nitrógeno, las BAL regulan la actividad del sistema proteolítico para asegurarse el balance de nitrógeno adecuado para la célula (Savijoki *et al.*, 2006). Los primeros estudios sugerían que ciertos residuos aminoácidos hidrofóbicos y di/tripéptidos actuaban como moléculas efectoras para regular la transcripción del sistema de transporte de oligopéptidos, *Opp*, en *L. lactis* (Kunji *et al.*, 1996; Detmers *et al.*, 1998). Posteriormente, se comprobó mediante técnicas de proteómica, que en *L. lactis* la expresión de ciertas proteínas del sistema proteolítico (*Opp*, *PepO1*, *PepN*, *PepC*, *PepF* y *OptS*) era inducida cuando se crecía al microorganismo en un medio carente de algunos aminoácidos y péptidos (Gitton *et al.*, 2005). En la actualidad, se ha demostrado que el sistema proteolítico queda reprimido por CodY cuando *L. lactis* crece en un medio rico en nitrógeno, y la expresión de los genes implicados solo se reestablece en condiciones limitantes de BCAAs (Guédon *et al.*, 2005; Den Hengst *et al.*, 2005b).

Asimismo, se han detallado mecanismos regulatorios independientes de CodY, como los observados para las peptidasas *PepF* (Gitton *et al.*, 2005), *PepO1* y *PepC* (Vido *et al.*, 2004). Se han descrito otros dos reguladores más para controlar la actividad proteolítica de lactococos, como *CtsR* y *TrmA* que regulan a proteasas del grupo *Clp* (Frees *et al.*, 2001; Varmanen *et al.*, 2000). También se ha observado que la fuente de carbono afecta a la expresión del gen *pepP* en *L. lactis* sugiriendo una regulación a través de *CcpA* (Guédon *et al.*, 2001b).

1.3.4.3. Regulación del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada

La mayor parte de los lactococos son auxotróficos para algunos aminoácidos como los BCAAs (Andersen y Elliker, 1953; Reiter y Oram, 1962). Por ello, *L. lactis* utiliza a los BCAAs como señales moleculares directas para activar al represor CodY, asegurándose a su vez el propio suministro de estos aminoácidos (Godon *et al.*, 1993). El papel clave de los BCAAs en la regulación mediada por CodY se refleja en el hecho de que el operón *ilv* (implicado en la biosíntesis de BCAAs) es uno de los más reprimidos, especialmente cuando la isoleucina interviene en la regulación (Godon *et al.*, 1992; Goupil-Feuillerat *et al.*, 1997 y 2000; Den Hengst *et al.*, 2005a).

La expresión de enzimas que participan en el catabolismo de los BCAAs también se ha visto que está afectada por la actividad de CodY. Por ejemplo, los genes *bcaT* y *araT* en *L. lactis* NCD0763 fueron reprimidos en CDM suplementado con casitona, observándose que el principal efector de CodY era el contenido en isoleucina (Chambellon e Yvon, 2003). En el trabajo realizado por De la Plaza *et al.* (2009) se observó, al igual que en el caso de *araT* y *bcaT*, la represión del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 por CodY. En ese trabajo se sugiere que el papel del α -cetoisovalerato (KIV) como metabolito intermedio en la biosíntesis de valina y leucina podría influir en la ausencia del efecto represor de CodY mediado por esos aminoácidos en la expresión de *kivD*. Además, la deficiencia de leucina o valina indicaría a la célula que el flujo metabólico controlado por KivD debería ser dirigido desde KIV hasta la síntesis de leucina y valina y no hacia la ruta catabólica (De la Plaza *et al.*, 2009).

1.3.4.4. Regulación del metabolismo de aminoácidos azufrados

Existe una gran diversidad en relación a los mecanismos de regulación genética de las enzimas implicadas en el metabolismo de la metionina y la cisteína en BAL y otras bacterias Gram-positivas (Liu *et al.*, 2008), por lo que son numerosos los estudios que abordan su regulación (Sperandio *et al.*, 2005 y 2007; Hullo *et al.*, 2007). Se han descrito diversos mecanismos de regulación, dos sistemas de regulación a nivel de RNA y al menos tres sistemas a nivel de DNA (Rodionov *et al.*, 2004).

En *L. lactis*, la mayor parte de los genes implicados en las rutas biosintéticas de metionina y cisteína, así como aquellos relacionados con la interconversión y

transporte de estos aminoácidos, están controlados por un único regulador, Fhur (CmbR) (Fernández *et al.* 2002). Fhur (CmbR) es un regulador que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales de LysR y activa directamente la expresión de estos genes empleando como co-efector el primer intermediario en la síntesis de cisteína, el *O*-acetil-L-serina (OAS). Se ha demostrado que la unión de CmbR a los promotores de genes como *cysD*, *cysM*, *metB2*, *cysK*, *metA*, *metB1*, *ytjE*, entre otros (Sperandio *et al.*, 2005), está estimulada por bajas concentraciones de metionina, cisteína y OAS, por lo que la enzima CysE, implicada en la síntesis de OAS, controlaría la actuación de CmbR (Fernández *et al.*, 2002; Golic *et al.*, 2005; Sperandio *et al.*, 2005).

1.3.4.5. Regulación del metabolismo de otros aminoácidos

En la regulación del metabolismo de la arginina pueden actuar factores transcripcionales específicos y globales (Guédon *et al.*, 2001b). En *L. lactis* se han identificado dos factores transcripcionales homólogos, ArgR y AhrC, implicados tanto en la represión de la biosíntesis de arginina, como en la activación de su ruta catabólica (Larsen *et al.*, 2004). También se ha observado la existencia de una conexión entre el metabolismo de la arginina con la respuesta al estrés generado por la ausencia de azúcar (Chou *et al.*, 2001), sugiriéndose la implicación del regulador del metabolismo del carbono CcpA en la regulación de esas rutas (Kunji *et al.*, 1993; Gaudu *et al.*, 2003)

La enzima glutamina sintetasa (GS) es la responsable de la asimilación de iones amonio para producir glutamina, un donador de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, bases y vitaminas (Reitzer, 1996). En *L. lactis*, el gen *glnA* (que codifica para GS) se sitúa en posición *downstream* al gen *glnR* formando el operón *glnRA*, y el regulador GlnR reprime la transcripción del operón *glnRA* en respuesta al contenido extracelular de glutamina y amonio (Larsen *et al.*, 2006).

En *L. lactis* se ha caracterizado la regulación de la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis del triptófano. Los estudios de Raya *et al.* (1998) demostraron que la expresión del operón *trp* aumentaba en 3-4 veces cuando algún aminoácido faltaba al crecer al microorganismo en CDM. Asimismo, la transcripción del operón *his* (implicado en la biosíntesis de histidina) fue reprimido en presencia de histidina, sugiriendo la existencia de un represor (Delorme *et al.*, 1999).

1.4. Intensificación y diversificación del aroma en queso mediante el control del catabolismo de aminoácidos.

Como ya se ha descrito en apartados anteriores, en la conversión de aminoácidos hacia compuestos aromáticos se encuentran implicadas numerosas reacciones tanto enzimáticas como químicas, aunque solo unas pocas han sido estudiadas en profundidad (Yvon, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Durante los últimos años, los estudios realizados sobre el metabolismo de aminoácidos en los microorganismos que participan en la maduración del queso han aportado una visión nueva acerca de la formación de compuestos volátiles, por lo que el control del catabolismo de aminoácidos de estos microorganismos puede ser una vía prometedora para dirigir, intensificar y diversificar el aroma final del queso.

1.4.1. Compuestos asociados al aroma en queso

La percepción sensorial del queso determina en gran medida la calidad del mismo. Esta percepción sensorial es un proceso muy complejo en el que intervienen multitud de factores como son los compuestos aromáticos, la textura y el aspecto (Laing y Jinks, 1996).

El aroma del queso es tan complejo que en ocasiones se le ha otorgado a un tipo de queso un aroma único. Esto no coincide con la realidad, ya que existe un amplio rango de compuestos volátiles específicos, que están presentes en cantidades variables y que son los que en conjunto conforman el aroma típico en cada variedad de queso. Diferentes estudios acerca del aroma en el queso no han conseguido encontrar un compuesto único que, de manera aislada contribuya al aroma característico de cada tipo de queso (Manning, 1979a y b; Bosset y Gauch, 1993; Engels y Visser, 1994; Urbach, 1995). Se considera, sin embargo, que el aroma en cada tipo de queso viene dado por un delicado equilibrio existente entre la multitud de compuestos que lo forman (Mülder, 1952; Fox y Wallace, 1997).

En el queso se puede encontrar una amplia gama de compuestos aromáticos de diferentes clases, que en su mayoría han sido originados a partir del metabolismo bacteriano, bien de forma directa como productos de rutas metabólicas (por ejemplo aldehídos y ácidos grasos) o bien, como resultado de combinaciones químicas de diferentes productos (por ejemplo S-metil-tioésteres)

(Cuer *et al.*, 1979; Lamberet *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Weimer y Dias, 2005). Entre las clases de compuestos con mayor contribución al aroma en queso se encuentran los ácidos grasos, aldehídos, aminoácidos, alcoholes, cetonas, ésteres, péptidos y compuestos volátiles azufrados (Urbach, 1993). Estos compuestos se generan a partir de los sustratos disponibles durante la maduración del queso, resultantes del metabolismo de los azúcares, proteínas y lípidos (Urbach, 1995; Gallardo-Escamilla *et al.*, 2005).

Tabla 1.4. Ejemplos de compuestos aromáticos importantes en cuatro tipos de quesos y el metabolismo de los sustratos de los que se originan. Adaptado de Smit *et al.* (2005b).

Metabolismo	Gouda	Cheddar	Camembert	Suizo y Masdam
Aminoácidos	3-Metilbutanal	3-Metilbutanal		Metional
	3-Metilbutanol	Ácido isovalérico	3-Metilbutanal	3-Metilbutanal
	Metanotiol	Metional	Metional	Escatol
	Dimetilsulfuro (DMS)	Dimetildisulfuro (DMDS)		
	2-Metilpropanol	DMTS		
	Dimetiltrisulfuro (DMTS)			
Azúcar	Diacetilo	Ácido propionico	2,3-Butanediona	Ácido propionico
		Diacetilo		Diacetilo
Lípidos	Ácido butírico	Ácido butírico		
	Butanon	Ácido acético		
	Hexanal	1-Octan-3-ona		
	Pentanal	Butanona		
Rutas combinadas	Etilbutirato	Etilbutirato		Etilbutirato
	Limonene	Etilhexanoato		Etilhexanoato Etil-3-metilbutanoato Feniletacetato

En la Tabla 1.4 se muestran algunos de los compuestos aromáticos con mayor impacto en diferentes quesos y el origen de los mismos. De acuerdo con Dacremont y Vickers (1994), el metional, con una nota de aroma similar a patata cocida, tiene una contribución importante en el aroma de quesos como el Cheddar. Otros compuestos azufrados como metanotiol, dimetildisulfuro (DMDS) y dimetiltrisulfuro (DMTS), que aportan notas de aroma similar a ajo y azufrado, tienen importancia en la mayoría de quesos (Kubickova y Grosch, 1997; Curioni y Bosset, 2002). El 3-metilbutanal o isovaleraldehído es un potente compuesto

aromático derivado del metabolismo de la leucina que, en bajas concentraciones, aporta un aroma afrutado muy apreciado en algunos quesos como el Camembert. Del metabolismo de la leucina también deriva el ácido isovalérico que confiere un aroma entre rancio y pútrido y que contribuye al aroma característico de los quesos muy curados (Smit, 2004). Entre los compuestos derivados del metabolismo de los ácidos grasos, destaca el ácido butírico que confiere un potente aroma entre dulce y agrio muy característico. Este tipo de aroma también viene dado en ocasiones por la presencia del ácido carboxílico derivado de la valina, el ácido isobutírico (Arctander, 1994; Curioni y Bosset, 2002). A los compuestos derivados de aminoácidos aromáticos, como fenilacetaldehído y 2-feniletanol, se les otorgan notas florales muy apreciadas (Kubickova y Grosch, 1997; Carunchia-Whetstine *et al.*, 2005), aunque la fenilalanina también puede dar lugar a compuestos como p-cresol, indol o escatol, que pueden no ser deseados en algunos quesos (Yvon *et al.*, 2000).

Como se ha mencionado con anterioridad, en cada tipo de queso no solo es importante la composición cuantitativa de los compuestos volátiles presentes, si no que tiene que existir un equilibrio adecuado entre ellos para que el aroma y el sabor percibido por el consumidor sea el deseado. Los estudios centrados en la identificación de compuestos aromáticos clave en diferentes variedades de quesos muestran que la degradación de aminoácidos es uno de los procesos principales en la formación de aroma. Por ello, el control del catabolismo de aminoácidos durante la maduración se postula como una de las vías para dirigir la formación del aroma de un queso.

1.4.2. Control de la formación de aroma a nivel de la transaminación de aminoácidos

Dado que la transaminación es una reacción clave en la formación de aroma, el control a este nivel puede alcanzarse desde dos estrategias. La primera de ellas consistiría en un incremento del aroma a partir del incremento global de la reacción de transaminación. Diversos estudios han demostrado que la adición exógena de α -cetoglutarato (factor limitante de la reacción), supone el incremento de las conversiones de aminoácidos aromáticos, BCAAs y metionina, en compuestos aromáticos potentes que intensificaban el aroma del queso (Rijnen *et al.*, 1999b; Yvon *et al.*, 1998; Banks *et al.*, 2001). La segunda estrategia consistiría en la potenciación de un determinado aroma mediante el control de las reacciones

enzimáticas que dan lugar a los compuestos que lo originan. Por ejemplo, dirigir la transaminación hacia compuestos derivados de BCAAs mediante el empleo de microorganismos con la maquinaria enzimática necesaria, obtenida bien por ingeniería metabólica, o bien tras la selección de las cepas silvestres adecuadas. En base a esta segunda opción, los estudios de Rijnen *et al.* (2000) ya demostraron que la expresión del gen que codifica la enzima GDH en *L. lactis* producía una mayor concentración de ácidos carboxílicos, que son potentes compuestos aromáticos.

1.4.3. Control de la formación de aroma a nivel de la reacción de eliminación a partir de metionina

En ciertos tipos de queso como el Cheddar o los de bajo contenido en grasa se ha intentado incrementar la formación de compuestos aromáticos azufrados mediante la intensificación de la degradación de la metionina a metanotiol. La mayor parte de los estudios realizados en este campo se han centrado en la selección de cepas o el empleo combinado de diferentes cepas con las actividades enzimáticas de interés (Weimer *et al.*, 1997; Bonnarme *et al.*, 2001; Arfi *et al.*, 2006; Kakgli *et al.*, 2006). Dias y Weimer (1999) demostraron que la adición de *B. linens* o metionina δ -liasa pura a pastas de queso con *L. lactis* daba lugar a un incremento en la formación de compuestos azufrados volátiles en queso Cheddar de bajo contenido en sal. Estudios más recientes como los de Hanniffy *et al.* (2009) han demostrado que existe una gran variabilidad inter e intraespecífica para producir compuestos azufrados en BAL aisladas de leche cruda, siendo los lactococos los que mayor actividad C-S liasa presentaban y en algunos casos llegaban a producir mayor concentración de compuestos azufrados volátiles que *B. linens*, conocida por su eficiencia en la producción de metanotiol.

1.4.4. Potencial de las bacterias lácticas para formar compuestos volátiles

Dentro de las BAL existe una gran diversidad, no solo a nivel de especie si no también a nivel de cepa, en su capacidad para formar compuestos volátiles (van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007; Tan-a-Ram *et al.*, 2011). Esta gran diversidad viene dada por tres mecanismos principalmente:

- (i) Los genes que codifican las enzimas clave para la formación de compuestos volátiles solo son expresados por algunas cepas de ciertas especies tal y como se ha visto en el caso de la enzima KivD en *L. lactis*, relacionada con la producción de 3-metilbutanal (De la Plaza *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2004a; Smit *et al.*, 2005b).
- (ii) Se pueden dar variaciones en las enzimas de una misma especie por pequeñas diferencias en su secuencia aminoacídica que pueden resultar en una actividad catalítica alterada. Por ejemplo, la cistationina β -liasa de dos cepas de *L. lactis* que presentaban una homología superior al 90% tenían una actividad muy diferente (van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007).
- (iii) La expresión de muchas enzimas relacionadas con la producción de compuestos volátiles está fuertemente regulada genéticamente, como el sistema proteolítico de *L. lactis* (Chambellon e Yvon, 2003; den Hengst *et al.*, 2005a; den Hengst *et al.*, 2006).

La diversidad observada en la capacidad de formación de compuestos volátiles por BAL también ha sido observada al comparar cepas silvestres con cepas de laboratorio. Se ha demostrado que algunas estirpes silvestres de *L. lactis* aisladas de nichos naturales son capaces de producir más compuestos volátiles que las cepas industriales. Esto se ha relacionado con una mayor capacidad de biosíntesis de aminoácidos y, por tanto, con una mayor actividad enzimática relacionada con su metabolismo (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995; Ayad *et al.*, 1999; Ayad *et al.*, 2000; Mauriello *et al.*, 2001; Tavaría *et al.*, 2002). Los lactococos empleados en la industria láctea poseen una capacidad limitada para la síntesis de aminoácidos debido a la ausencia de algunas rutas enzimáticas. Esto puede ser consecuencia de su adaptación a la leche, ya que aquí se encuentran la mayoría de aminoácidos disponibles a través de las caseínas. Sin embargo, las cepas silvestres no están asociadas a ambientes ricos como la leche, lo que las hace más

dependientes de su propia biosíntesis de aminoácidos. En algunos casos, los aromas producidos por estas cepas silvestres se definen como achocolatados, afrutados o “de quesería” y se deben a la producción de aldehídos y alcoholes derivados de BCAAs, que en cantidades altas pueden conferir olores anormales al queso (Morales *et al.*, 2003). No obstante, si estos compuestos se encuentran en el balance adecuado pueden contribuir positivamente al aroma de quesos duros de maduración prolongada como el Parmesano (Barbieri *et al.*, 1994).

Aunque se ha avanzado en el conocimiento de las enzimas de BAL implicadas en el metabolismo de aminoácidos, todavía quedan rutas del catabolismo de aminoácidos que es necesario caracterizar en cepas silvestres. El estudio de actividades directamente implicadas en la degradación de α -cetoácidos y la determinación de su capacidad para producir compuestos volátiles, podría dar lugar a la selección de cepas silvestres con determinadas actividades enzimáticas que aceleren, intensifiquen o diversifiquen la formación de aromas en queso, evitando tener que recurrir a la ingeniería metabólica y por tanto a los organismos modificados, a la hora de buscar productos con un determinado perfil aromático (Kleerebezem *et al.* 2003; Smit *et al.*, 2005b; Liu *et al.*, 2008; Tan-a-ram *et al.*, 2011).

1.5. Factores físicos implicados en la formación de aroma durante la maduración del queso

El control del desarrollo de la producción de aroma en el queso depende de la retención, adición o desarrollo de los agentes de maduración en la leche y del control de su actividad en el tiempo. Gran parte de los compuestos implicados en el aroma del queso están directamente relacionados con los microorganismos presentes y su metabolismo. Aún así, es importante tener en cuenta que estos microorganismos a su vez están en gran medida condicionados por los factores físico-químicos que se dan durante el procesado de la leche, las condiciones de maduración, el transporte y el almacenaje del queso. Además, los factores físico-químicos contribuyen a la prevención del crecimiento de microorganismos no deseados en el queso (Russel y Gould, 1991).

El proceso de maduración hace de la matriz del queso un ambiente dinámico formado a modo de red por proteínas, lípidos, minerales y agua, siendo la caseína (fundamentalmente α_s -caseínas) el principal componente estructural. Además, la etapa de maduración se caracteriza por: (1) la falta de carbohidratos disponibles (alcanzando los niveles de lactosa valores próximos a cero ya en la primera semana de maduración, en el caso de quesos prensados), provocando que los microorganismos alcancen la fase estacionaria de crecimiento; (2) un descenso del pH de hasta un 4,7%; y (3) un contenido en sal en torno al 4% (Crow *et al.*, 1993). Estas condiciones hacen que las BAL se enfrenten a la falta de nutrientes y al estado de estrés, provocando la activación de mecanismos de respuesta relacionados con su metabolismo de supervivencia, algunos asociados a la regulación de la expresión de enzimas relacionadas con la producción de aromas (Rallu *et al.*, 1996). En el caso de *L. lactis*, ante la falta de sustratos que aporten la energía requerida, redirige su metabolismo hacia el consumo de los aminoácidos generados en la proteólisis (Rallu *et al.*, 1996).

1.5.1. Influencia de la sal

La sal juega un papel importante en la textura, la vida útil del queso y en su aroma, debido al impacto que ejerce sobre el crecimiento microbiano, la actividad de agua y las actividades enzimáticas. Además, contribuye a la formación de la corteza, al sabor y a completar el desuerado (Guinee y Fox, 2004). El salado del queso puede realizarse por inmersión en salmuera (como en quesos tipo Emmental y Manchego) o añadiendo sal a la cuajada molida antes al final del proceso de fabricación (por ejemplo en queso Cheddar y Cottage). La cantidad de sal que incorpora el queso durante el salado depende de varios factores como la concentración salina, el contenido en humedad, la duración y la temperatura del proceso, el tipo de matriz proteica, la cantidad de materia grasa y la relación superficie/volumen del queso (Mistry, 2007). En general, el contenido en sal de un queso dependerá de la variedad del mismo, aunque normalmente se encuentra comprendida en un rango variable entre 0,5% y 5% (Kosikowski y Mistry, 1999).

La concentración de sal tiene importantes efectos sobre los procesos proteolíticos ocurridos durante la maduración del queso. En las primeras fases de la maduración, la proteólisis primaria supone la degradación de α_{s1} - y β -caseínas a péptidos de menor tamaño por las enzimas residuales de la coagulación de la leche. Esta actividad se ve afectada por la concentración de sal, de tal forma que, en

general, la proteólisis se ve inhibida en presencia de niveles elevados de sal (5,7%), mientras que se ve favorecida a niveles bajos (Guinee y Fox, 2004). Sin embargo, algunos estudios han observado que las β -caseínas son especialmente sensibles al contenido en sal (Thomas y Pearce, 1981; Kelly *et al.*, 1996). El bajo contenido en sal de algunos quesos, como por ejemplo el Emmental, puede provocar cambios conformacionales en las β -caseínas inhibiendo su proteólisis. Por lo tanto, quesos con escaso o nulo contenido en sal tenderán a desarrollar un exceso de acidez y amargor debida a la acción de las proteinasas de las BAL (Thomas y Pearce, 1981; Kelly *et al.*, 1996; Guinee y Fox, 2004). O'Connor (1971) ya demostró que existe una correlación entre la formación de aroma y el sabor del queso y los parámetros físico-químicos pH y salinidad. Estudios más recientes, (Curtin *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2002; De Angelis *et al.*, 2010), mediante el empleo de cultivos secundarios, han demostrado el efecto que tienen las condiciones físico-químicas propias de la maduración sobre enzimas relevantes en la formación de aromas, como las aminotransferasas o la GDH.

1.5.2. Influencia del pH

El pH del queso es uno de los factores físicos que más afecta a su estructura, a nivel de la matriz de las micelas de caseínas y sus propiedades funcionales, como por ejemplo la dureza. Además, tiene un papel crítico en el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos del queso, tanto si son patógenos o no, al estar íntimamente relacionado con el catabolismo del ácido láctico y la producción de amonio (Hill *et al.*, 2007). El valor de pH alcanzado en un queso durante el proceso de elaboración y de maduración es característico de cada variedad, aunque pueden distinguirse tres grupos: (i) quesos frescos, con poca acidez y valores de pH 5,8 – 6,5; (ii) variedades de maduración suave con valores de pH por debajo de 5,0; (iii) variedades con pH por encima de 5 (Hill *et al.*, 2007). Las primeras fases de fabricación del queso son las que determinan la velocidad de producción de la acidez, alcanzándose el pH propio de cada variedad de queso. Posteriormente, durante la maduración se elevan los niveles de pH, registrándose los valores máximos cuando la actividad proteolítica de las BAL es elevada.

La sensibilidad de las enzimas frente a condiciones de maduración en queso depende no solo de cada enzima, sino también del sustrato que empleen y del microorganismo que las posea (Gobbetti *et al.*, 1999a y b). De forma que, por ejemplo, las enzimas cistationina liasas, implicadas en el metabolismo de la

metionina, de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 son más tolerantes y se mantienen activas frente a valores bajos de pH y temperatura, mientras que las de *B. linens* se ven inhibidas en esas mismas condiciones (Curtin *et al.*, 2001). Otros estudios han determinado que las aminotransferasas de los lactococos se mantenían estables a valores de pH 5 – 5,5, indicando que podrían mantener su actividad en condiciones de maduración y así contribuir a la formación de compuestos aromáticos en queso (Engels, 1997; Yvon *et al.* 1997; Gao y Steele, 1998).

1.5.3. La temperatura de maduración

La maduración de quesos industriales tiene lugar en cámaras donde la temperatura y la humedad están controladas. La temperatura de maduración característica de cada variedad está condicionada, en ocasiones, por los requerimientos de los cultivos secundarios. Varía de 22-24 °C para el queso Parmesano, de 12-20 °C para quesos madurados por mohos, de 6-8 °C para Cheddar, etc. Estas temperaturas máximas se mantienen un periodo de tiempo determinado y luego se reducen a unos 4 °C. La duración del periodo de maduración puede abarcar desde 7 a 14 días en el caso de los quesos tiernos hasta más de 2 años en quesos tipo Parmesano (Fox, 1993). Una de las maneras más eficientes de acelerar la maduración del queso es mediante el aumento de la temperatura del proceso. Este aumento supone una aceleración en los procesos de proteólisis (Folkertsma *et al.*, 1996), lipólisis (Folkertsma *et al.*, 1996; O'Mahoney *et al.*, 2006), además de la influencia que ejerce sobre las bacterias del queso. Pero también conlleva cambios en la textura y el aroma del queso que suelen ser perjudiciales (Folkertsma *et al.*, 1996). Sin embargo, estudios recientes como los de Ong *et al.* (2009) aseguran que a 8 °C, durante la maduración de queso Cheddar con *Lb. casei*, se generan productos derivados de la proteólisis y ácidos orgánicos que contribuyen al aroma del queso. Autores como De Angelis *et al.* (2010) han comprobado como variaciones en la temperatura pueden afectar negativamente a la actividad GDH en diferentes cepas de lactobacilos. El efecto que puede tener la temperatura en condiciones de maduración sobre la actividad metabólica de los microorganismos del queso está íntimamente ligada a otros factores como el pH. Ummadi y Weimer (2001) estudiaron el catabolismo del triptófano en *B. linens* en condiciones óptimas para la bacteria (pH 6,5; 25 °C) y de maduración de queso (pH 5,2; 15 °C), y pudieron observar que *B. linens* solo catabolizaba el triptófano cuando se encontraba en condiciones óptimas de temperatura y pH, y no en las condiciones del queso. Algunos autores han

observado que en cepas de *Lactobacillus paracasei* y *L. lactis*, existe una actividad residual de aminotransferasas a 10 °C que podría contribuir a la regeneración de aminoácidos en condiciones de maduración en queso (Yvon *et al.*, 1997; Yvon *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002).

5.1.4. La actividad de agua

La humedad de un queso está determinada principalmente por la composición del mismo, el pH, el contenido en sal y la temperatura a la que ha sido sometido durante su producción y maduración. El porcentaje de humedad encontrado en los distintos tipos de queso es muy variable y abarca desde valores superiores al 80% en algunos quesos frescos hasta valores inferiores al 30% en algunos quesos duros (Hill *et al.*, 2007). La actividad de agua (a_w), junto con el pH, es uno de los factores físicos que más limitan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos del queso. El contenido en sal del queso determina en gran parte el valor mínimo aproximado de a_w que permite el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos, que son 0,92, 0,83 y 0,75, respectivamente (Fox *et al.*, 2000). Durante la maduración del queso, la a_w disminuye a valores de 0,94 – 0,98 aproximadamente, debido a la acumulación de solutos de bajo peso molecular resultantes del metabolismo de proteínas y lípidos, así como por la disminución del agua empleado en reacciones de hidrólisis (Beresford *et al.*, 2001). Este nivel de a_w dista considerablemente del óptimo requerido por los microorganismos del cultivo iniciador, por lo que controlar el nivel de a_w directa o indirectamente (mediante el control de salinidad y del pH) es importante para dirigir el crecimiento y actividad metabólica de las LAB (Beresford *et al.*, 2001; Guinee y Fox, 2004).

CAPÍTULO II

Objetivo y Plan de Trabajo

CAPÍTULO II

Objetivo y plan de trabajo

Lactococcus lactis es uno de los componentes principales de los cultivos iniciadores empleados en la fabricación de queso, contribuyendo entre otras propiedades a la textura y al desarrollo del aroma y sabor del queso. La selección y aplicación de cepas silvestres como cultivos iniciadores o como adjuntos constituye una aproximación interesante para la modificación de determinadas características del producto, como puede ser la percepción aromática asociada a un tipo determinado de queso.

En este sentido, el catabolismo de aminoácidos resulta clave para la formación de compuestos volátiles durante el proceso de maduración de un queso, existiendo varias rutas catabólicas en las que pueden participar diferentes clases de enzimas como aminotransferasas, decarboxilasas, liasas y deshidrogenasas, entre otras. La ruta de degradación de los aminoácidos se inicia por una reacción de transaminación que conduce a la formación de α -cetoácidos, los cuales son limitantes en la formación de aroma. Una de las vías para conseguir una eficiente conversión de α -cetoácidos hasta aldehídos y ácidos carboxílicos podría consistir en el aumento de la disponibilidad de α -cetoglutarato a través de la actividad glutamato deshidrogenasa. Otra posibilidad adicional podría abordarse mediante el bloqueo de la ruta de la hidroxiaácido deshidrogenasa que convierte los α -cetoácidos en sus correspondientes hidroxiaácidos, los cuales no participan en la formación de compuestos del aroma.

Durante la maduración del queso, los microorganismos se ven sometidos a situaciones de estrés como la falta de nutrientes, cambios drásticos en el pH, en la osmolaridad o en la temperatura, y que pueden determinar diferencias en la expresión génica. De hecho, las cepas de *L. lactis* empleadas durante la fabricación del queso rara vez se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento, por lo que su capacidad de adaptación a las situaciones de estrés y el efecto que dicha adaptación pudiera tener sobre su capacidad metabólica para la formación de aroma son muy importantes desde el punto de vista industrial. La capacidad de adaptación de *L. lactis* a las diferentes condiciones del medio está íntimamente relacionada con la elevada regulación génica a la que están sometidas las enzimas

que participan en el catabolismo de aminoácidos, siendo posible que su expresión esté sometida a los mismos factores reguladores globales del metabolismo de azúcares y de nitrógeno.

Teniendo en cuenta los aspectos mencionados, la presente investigación se planteó como una oportunidad excelente de continuar y completar los conocimientos teórico-prácticos sobre el metabolismo de *L. lactis*, necesarios para el diseño de cultivos iniciadores específicamente formadores de aroma.

Por ello, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido la utilización de estrategias enzimáticas encaminadas al control de la formación de compuestos volátiles por *L. lactis*. Para la consecución de este objetivo se ha llevado a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Identificar y caracterizar la presencia de la enzima glutamato deshidrogenasa, enzima clave en el catabolismo de aminoácidos, en estirpes silvestres de *L. lactis*.
2. Controlar el flujo metabólico de formación y degradación de α -cetoácidos procedentes de la transaminación de aminoácidos, mediante la inactivación del gen *panE*, que codifica la actividad hidroxilácido deshidrogenasa, en estirpes de *L. lactis* con actividad glutamato deshidrogenasa.
3. Estudiar la regulación de la expresión de enzimas del catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* y evaluar la formación de compuestos volátiles en condiciones de maduración de queso. Estudio de la influencia de la mutación del gen *panE* en *L. lactis*.

CAPÍTULO III

Identificación y Caracterización de la
Actividad Glutamato Deshidrogenasa en
Estirpes Silvestres de *Lactococcus lactis*

CAPÍTULO III

Identificación y caracterización de la actividad glutamato deshidrogenasa en estirpes silvestres de *Lactococcus lactis*

3.1. INTRODUCCIÓN

Lactococcus lactis se caracteriza por disponer de diferentes actividades enzimáticas que actúan durante la producción de queso y que afectan a las propiedades organolépticas, tanto en relación a la textura como en el desarrollo del aroma y sabor (Kunji *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 2005b). Los aminoácidos son los precursores de una larga variedad de compuestos volátiles y, por ello, diversas enzimas son consideradas clave para su transformación, como aminotransferasas, deshidrogenasas, liasas y decarboxilasas, entre otras (Ganesan y Weimer, 2007).

En bacterias lácticas (BAL), para que las reacciones de transaminación se produzcan se requiere obligatoriamente la presencia de un aceptor de grupos aminos. Los α -cetoácidos empleados para la transaminación son, por tanto, un factor limitante en el proceso de formación de aromas, tal y como se ha demostrado en el caso de lactococos (Yvon *et al.*, 1997; Gao y Steele, 1998), lactobacilos mesófilos (Gummalla y Broadbent, 1996; Tamman *et al.*, 2000; Kieronczysk *et al.*, 2001) y BAL termófilas (Gummalla y Broadbent, 1999; Helinck *et al.*, 2004). Ensayos realizados en pastas de queso demostraron que al añadir exógenamente α -cetoglutarato, se observaba un aumento significativo de la cantidad de compuestos aromáticos producto del catabolismo de los aminoácidos (Yvon *et al.*, 1998; Banks *et al.*, 2001, Shakeel-Ur-Rehman y Fox, 2002). Otros estudios en los que se pone de manifiesto el papel clave que juega la presencia de α -cetoácidos en la formación de aromas, son aquellos en los que tras sobreexpresar enzimas catabólicas como la α -cetoácido decarboxilasa, no se ha observado un aumento de compuestos volátiles debido a la limitación de la presencia del cetoácido (Smit *et al.*, 2005a), o en estudios de inducción de lisis bacteriana que han puesto de manifiesto la importancia de la transaminación en las reacciones de catabolismo de aminoácidos (Martínez-Cuesta *et al.*, 2006).

En *L. lactis*, el α -cetoglutarato puede producirse teóricamente por tres rutas metabólicas, vía glutamato deshidrogenasa (GDH), que lo forma a partir de ácido glutámico, y por otras dos rutas relacionadas con el ciclo del citrato (Tanous *et al.*, 2005b) (Fig. 3.1).

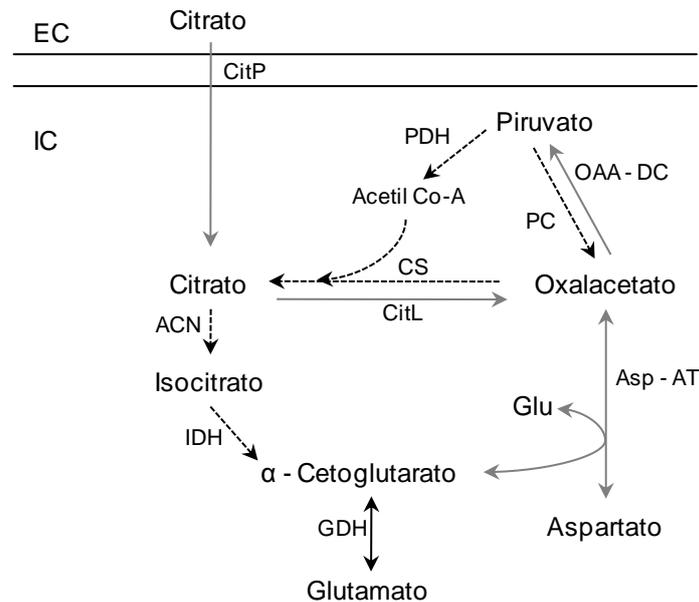


Figura 3.1. Posibles rutas para la formación de α -cetoglutarato en BAL. EC e IC se corresponden con medio extracelular e intracelular, respectivamente. Ruta directa de GDH (glutamato deshidrogenasa), flecha en negro; CitP (citrato permeasa), CitL (citrato liasa), OAA-DC (oxalacetato descarboxilasa) y Asp-AT (aspartato aminotransferasa) de la ruta del citrato-oxalacetato (flechas en gris); PDH (piruvato deshidrogenasa), CS (citrato sintetasa), PC (piruvato carboxilasa), ACN (aconitasa), IDH (Isocitrato deshidrogenasa) de la ruta citrato-isocitrato (flechas punteadas negras). Adaptado de Tanous *et al.* (2005b).

En la ruta citrato-oxalacetato se requiere la presencia de citrato permeasa y de citrato liasa, encontrándose estas enzimas solo en cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Hugenholtz, 1993). La formación de α -cetoglutarato a través de la ruta citrato-isocitrato requiere la participación de la vía oxidativa del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que lleva a la formación de piruvato o citrato. En relación

con la actividad de estas enzimas, varios estudios demuestran que en muchas ocasiones la vía oxidativa del ciclo de los ácidos tricarbóxicos no es funcional en *L. lactis* (Morishita y Yajima, 1995; Lapujade *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000).

La enzima GDH cataliza la reacción reversible de desaminación oxidativa del glutamato en α -cetoglutarato y amonio empleando NAD^+ , NADP^+ o ambos como cofactores de la reacción. En el caso de las enzimas GDH dependientes de NAD^+ (E.C. 1.4.1.2), su actividad se relaciona con un papel fundamentalmente catabólico, mientras que la dependencia del cofactor NADP^+ (E.C. 1.4.1.3) supone una implicación de la enzima en la asimilación de amonio y, por tanto, en la síntesis de ácido glutámico (Smith *et al.*, 1975). A través de un estudio de comparación de genomas de BAL se ha observado la presencia del gen *gdh* en *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* y *Streptococcus thermophilus* (Liu *et al.*, 2008). Asimismo se ha descrito la actividad GDH en estirpes silvestres de BAL tanto de origen vegetal como lácteo (Tanous *et al.*, 2002; Fernández de Palencia *et al.*, 2006; Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008). Hasta los estudios llevados a cabo por Tanous *et al.* (2002) no se había detectado la presencia del gen *gdh*, ausente en estirpes de *L. lactis* empleadas en la producción de queso y en el genoma de todas las cepas de *L. lactis* secuenciadas hasta el momento, sugiriendo la posibilidad de que el gen solo exista en algunas cepas de la especie.

El gen que codifica la actividad GDH en *L. lactis* NCDO1867 (cepa de origen vegetal) es un gen monocistrónico que codifica para una proteína de 448 aminoácidos (GDH), implicada mayoritariamente en la biosíntesis de glutamato, y que se localiza en un plásmido, pGdh442 (NCBI Ref. Sequence: NC_009435.1), formando parte de un transposón de la familia Tn3 (Tanous *et al.*, 2005a). El análisis de la secuencia del plásmido pGdh442 ha revelado que se trata de un plásmido de gran tamaño (68 kb) que puede ser transmitido de forma natural vía movilización conjugativa, aunque podría no ser compatible con otros plásmidos de lactococos (Tanous *et al.*, 2007).

A pesar de los numerosos trabajos centrados en el estudio de la degradación de aminoácidos y de su papel en la formación del aroma durante los procesos de elaboración y maduración de queso, todavía no está clara la prevalencia de la enzima GDH en estirpes silvestres de *L. lactis* de origen lácteo. Además, debido también a que la actividad GDH es una de las actividades clave en la formación de compuestos aromáticos a partir de aminoácidos, en el presente trabajo nos hemos centrado en la determinación génica de la presencia del gen *gdh* y la caracterización de la actividad GDH en estirpes de *L. lactis* procedentes de quesos

elaborados de forma artesanal con leche cruda (Fontecha *et al.*, 1990; Cogan *et al.*, 1997).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Durante este estudio se emplearon 39 estirpes silvestres de la especie *L. lactis*, todas ellas pertenecientes a la colección del Departamento de Biotecnología y Microbiología de los Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL). También se emplearon la cepa *L. lactis* IL1403 (NCBI Ref. Seq.: NC_002662) (Bolotin *et al.*, 2001) como control negativo de GDH, y la estirpe *L. lactis* TIL504, cedida por la Dra. M. Yvon (INRA, Jouy en Josas), como control positivo en los distintos ensayos.

Los microorganismos empleados se cultivaron en caldo M-17 (Pronadisa) suplementado con 0,5% (p/v) de glucosa (G-M17). Los inóculos a partir del stock se realizaron al 1% (v/v) y la incubaciones se realizaron durante 18 – 24 h a 30 °C en condiciones de aerobiosis.

3.2.2. Técnicas para la detección de la actividad enzimática GDH

La actividad GDH fue evaluada en las distintas cepas de *L. lactis* a partir de extractos intracelulares mediante ensayos enzimáticos colorimétricos.

3.2.2.1. Obtención de los extractos intracelulares

Los extractos libres de células ("cell free extracts", CFEs) se obtuvieron a partir de cultivos de las cepas de *L. lactis* durante la etapa de crecimiento exponencial (DO a 660 nm entre 0,6 – 0,8). A partir de un cultivo de 50 ml, se centrifugaron las células a 8.000 × *g* durante 15 min, a 4 °C. El sedimento celular obtenido se lavó varias veces con tampón fosfato 50 mM a pH 6,5 intercalando

entre los lavados centrifugaciones a $8.000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Tras los lavados, se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 6,5) y se mezcló con 1 g de bolas de vidrio (diámetro $\leq 106\text{ }\mu\text{m}$, Sigma-Aldrich) para romper las células de forma mecánica. Para ello, se empleó el equipo FastPrep (Savant) con tres ciclos de agitación durante 45 s a 5,5 m/s alternados con sendos períodos de reposo en hielo. El extracto obtenido se centrifugó a $21.000 \times g$ durante 10 min, para desechar las bolas de vidrio y los restos celulares. Tras la centrifugación, los sobrenadantes obtenidos se emplearon como CFEs en los sucesivos ensayos enzimáticos.

La concentración de proteína en los CFEs se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976), empleando albúmina sérica bovina como estándar.

Todas las centrifugaciones necesarias durante el proceso de obtención de los CFEs fueron realizadas en la centrífuga Universal 16R Hettich Zentrifugen (Génesis).

3.2.2.2. Determinación de la actividad enzimática GDH

La actividad GDH en los CFEs se determinó empleando el método colorimétrico comercial L-Glutamic Acid Test (Boehringer Mannheim, R-Biopharm) con algunas modificaciones (Kieronczyk *et al.*, 2003). Este test de análisis enzimático evalúa la capacidad reductora presente en la reacción (Fig. 3.2a), como consecuencia de la desaminación oxidativa del ácido glutámico en presencia de la enzima GDH. Posteriormente, en una segunda reacción consecutiva catalizada por la enzima diaforasa (Fig. 3.2b), se produce la conversión del cloruro de iodonitrotetrazolio (INT) en formazán, que es detectable en su máximo de absorbancia mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 492 nm (A_{492}).

El kit comercial L-Glutamic Acid Test tiene como finalidad determinar la concentración de ácido glutámico en las muestras de ensayo, por lo que para poder evaluar la actividad GDH se modificaron las mezclas de reacción tal y como se detalla a continuación.

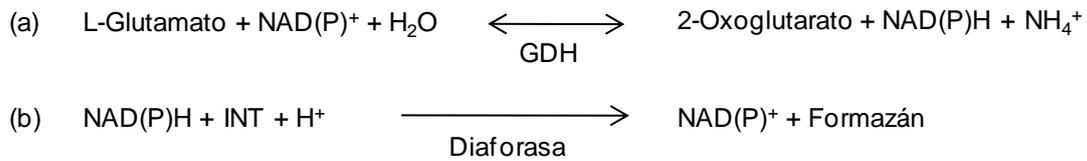


Figura 3.2. Reacciones consecutivas del test colorimétrico L-Glutamic Acid. INT, cloruro de iodinitrotetrazolio.

Para cada muestra, la mezcla de reacción consistió en 40 μl de tampón (50 mM fosfato potásico, 50 mM trietanol amina [TEA, pH 9,0], 1% de Triton X-100 [Panreac]), 20 μl de ácido L-glutámico 100 mM, 20 μl de INT 2 mM (Sigma-Aldrich), 20 μl de diaforasa (1,76 U/ml), 20 μl de NADP⁺ 13,8 mM (Sigma-Aldrich) o NAD⁺ 17,33 mM (Sigma-Aldrich), 30 μl de CFE, y se completó con agua hasta un volumen final de 300 μl . La reacción colorimétrica se inició en el momento en que se añadieron los CFEs a las distintas mezclas de reacción. Se evaluó la actividad GDH en cada estirpe de *L. lactis* en las siguientes condiciones de reacción:

- 1) En presencia de sustrato (ácido glutámico) y NAD⁺ como cofactor.
- 2) Sin ácido glutámico pero con NAD⁺ como poder reductor.
- 3) En presencia de ácido glutámico y NADP⁺ como cofactor.
- 4) Sin ácido glutámico pero con NADP⁺ como poder reductor.

Cada cepa de *L. lactis* se analizó por triplicado, en tres ensayos distintos y empleando los cuatro tipos de reacción. Las muestras que no contenían ácido glutámico se emplearon como controles para sustraer las actividades dependientes de NAD(P)⁺ presentes en el CFE que no utilizan glutamato como sustrato. Se dejaron transcurrir las reacciones a 37 °C durante un tiempo total de 150 min, realizándose medidas puntuales de A₄₉₂ en distintos tiempos. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en microplacas transparentes de 96 pocillos con fondo plano (Sarstedt). Las medidas de espectrofotometría se realizaron empleando el

equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific). Los resultados se expresaron en nmol de NAD(P)H formado por minuto y por mg de proteína del CFE.

3.2.3. Técnicas de biología molecular

La presencia del gen *gdh* en las diferentes cepas de *L. lactis* se analizó mediante PCR e hibridación Southern.

3.2.3.1. Obtención de ADN plasmídico

Las cepas de *L. lactis* seleccionadas para la extracción de ADN plasmídico se crecieron en G-M17 hasta alcanzar una DO a 660 nm entre 0,6 – 0,8. Las células se obtuvieron tras centrifugar un volumen de 20 ml de cultivo a $19.000 \times g$ durante 5 min y se lavaron con solución salina al 0,85%. La reacción de lisis celular se llevo a cabo empleando 200 μ l de Solución I (20% sacarosa, Tris 10 mM, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 10 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0) a la que se le añadió 30 mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich) y 0,1 mg/ml de RNasa A (Fermentas). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 h para que se completara la lisis celular. A continuación se añadieron 400 μ l de Solución II (dodecilsulfato sódico [SDS] al 1%, NaOH 0,2 N). La reacción se mezcló por inversión y las muestras fueron incubadas a 0 °C durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 300 μ l de acetato potásico 5 M, pH 4,8 (conservado en frío), se mezcló por inversión y las muestras se mantuvieron durante diez minutos a 0 °C. Tras centrifugar las muestras a $19.000 \times g$ durante 15 min (4 °C), se recogieron los sobrenadantes y se procedió a la precipitación del ADN en suspensión. Para ello, se añadió un volumen equivalente de isopropanol (conservado en frío) y se centrifugaron las muestras a $19.000 \times g$ durante 15 min (4 °C). El sedimento resultante se lavó con 350 μ l de agua MilliQ® (Millipore) y se le añadieron 200 μ l de acetato amónico 7,5 M y 350 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich). Se mezclaron bien ambas fases y se centrifugaron las muestras a $19.000 \times g$ durante 5 min a temperatura ambiente. Se recogieron los sobrenadantes, añadiéndoles agua MilliQ® (Millipore) y cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) en proporción 1:1 (v/v). A continuación se repitió el proceso de centrifugación, tal y como se ha descrito anteriormente. El ADN se recogió de la fase acuosa superior, precipitándolo con etanol absoluto y se limpió con sucesivos lavados con etanol al 70%. Finalmente, con la ayuda de un concentrador centrífugo

a vacío (Speed Vac, Savant), se retiró todo el etanol de las muestras y se resuspendió el pellet en un volumen apropiado de tampón Tris-EDTA (TE).

Durante el proceso de extracción de ADN plasmídico todas las centrifugaciones fueron realizadas en la centrífuga Universal 16R Hettich Zentrifugen.

Una vez finalizado el protocolo de extracción se procedió a la comprobación de la cantidad y calidad del material genético obtenido mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. Las medidas de absorbancia se realizaron a 260 nm y 280 nm, empleando para ello un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601. Para el proceso de electroforesis se emplearon geles con un contenido en agarosa del 0,8% teñidos con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) y aplicando un voltaje constante de 80 V (fuente de alimentación BioRad). Los resultados de las electroforesis se visualizaron en una cámara oscura (Gel Station, Gel Printer Plus TDI).

3.2.3.2. Obtención de ADN genómico

Las cepas de *L. lactis* empleadas en el estudio se crecieron en el medio G-M17 hasta alcanzar una DO a 660 nm entre 0,6 – 0,8. Las células se obtuvieron tras centrifugar un volumen de 20 ml de cultivo a 19.000 × *g* durante 5 min.

El ADN genómico se obtuvo empleando el protocolo "Purification of total DNA of Gram positive bacteria" del kit comercial DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen). Las células se rompieron mediante lisis mecánica previamente a la utilización del kit para facilitar y mejorar el rendimiento del proceso de extracción de ADN, añadiendo a la suspensión celular bolas de vidrio (diámetro ≤ 106 µm) para la rotura mecánica de las células utilizando el equipo FastPrep, tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.2.1.

Al igual que en el caso del ADN plasmídico, tras finalizar el proceso de extracción, se procedió a la comprobación de la cantidad y calidad del material genético obtenido mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.

3.2.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La determinación de la presencia o ausencia del gen *gdh* en las muestras tanto de ADN plasmídico como genómico de las cepas de *L. lactis*, se llevó a cabo mediante amplificación por PCR.

En base a la secuencia publicada del gen *gdh* (NCBI GeneID: 5077352) localizado en el plásmido pGdh442 (Tanous *et al.*, 2005a; 2007), se amplificaron tres regiones diferentes. Una región de 724 pb comprendida entre las posiciones 241 y 964 del gen *gdh*, una región de 236 pb comprendida entre las posiciones 369 y 604 de dicho gen y una región de 1406 pb correspondientes a la secuencia completa del gen. Los oligonucleótidos *gdh13/gdh18*, empleados para la amplificación de la secuencia específica de 724 pb, fueron descritos por Yvon *et al.*, 2006. Las parejas de cebadores *gdhFw/gdhRv* y *gdh32/gdh37*, empleados para la amplificación de la región de 236 pb y de la región de 1406 pb respectivamente, se diseñaron a partir de la secuencia publicada del gen *gdh* (NCBI GeneID: 5077352) empleando el software DNASTAR®. Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen y aparecen listados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Cebadores y condiciones de PCR empleados para la amplificación del gen *gdh*.

Cebadores empleados	Secuencia 5' → 3'	Condiciones de PCR		Amplicón generado
		Hibridación	Elongación a 72 °C	
<i>gdh13</i> <i>gdh18</i>	TAAAGGCGGTAGTGATTT AGCTGGACCGTACAATAA	30 Ciclos:45 °C, 60 s	60 s	724 pb
<i>gdhFw</i> <i>gdhRv</i>	GATTCAAAAAGCGACTGAC TTTCATTTTGTGTTGCACAT	30 Ciclos:52 °C, 60 s	60 s	236 pb
<i>gdh32</i> <i>gdh37</i>	TTCTTACAAGTCAAAAGC ATCAGCTAATGTGCAATAGGA	35 Ciclos:45 °C, 60 s	60 s	1406 pb

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc.), empleando la enzima *Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase* (Finnzymes) para obtener copias

fidedignas de los fragmentos originales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada reacción de PCR incluyó una desnaturalización inicial (98 °C, 30 s) y varios ciclos de amplificación con una desnaturalización a 98 °C (10 s) y unas condiciones de hibridación y elongación a 72 °C dependientes del fragmento de ADN amplificado (Tabla 3.1). Las muestras de ADN amplificado por PCR fueron purificadas con el kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). Aquellas muestras de ADN cuyas secuencias nucleotídicas debían ser verificadas, fueron purificadas y enviadas, junto con los cebadores *gdh32* y *gdh37* (Tabla 3.1) al servicio de secuenciación proporcionado por Secugen S.L.

3.2.3.4. Hibridación Southern

Los estudios de hibridación Southern se realizaron con muestras de ADN plasmídico total y ADN plasmídico digerido de diferentes cepas de *L. lactis*. La digestión de ADN plasmídico se realizó con la enzima de restricción *EcoRI* (5' - G[^]AATTC - 3') (Fermentas). Previamente a la digestión del ADN plasmídico de las muestras, se hizo un estudio de las dianas de restricción *EcoRI* existentes en la secuencia nucleotídica del plásmido pGdh442 (NCBI Ref. Sequence: NC_009435.1). Para evaluar el mapa de restricción del plásmido pGdh442 se empleó el software Clone Manager Professional v.6 (Sci - Ed Software).

El ADN separado electroforéticamente en gel de agarosa se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Applied). Previamente, el gel de agarosa sufrió un proceso de despurinización mediante lavados con ácido clorhídrico 250 mM, y el ADN se desnaturalizó mediante lavados en solución alcalina (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M). La transferencia de ADN a la membrana de nylon se realizó por capilaridad, siguiendo las instrucciones detalladas en el manual de laboratorio Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 2001). Una vez finalizada la transferencia, se procedió al lavado de la membrana con una solución de neutralización (Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1M pH 7,2) y se fijó el ADN a la membrana mediante irradiación UV con una longitud de onda de 254 nm (Crosslinker UVP-CL100 Ultraviolet).

Los productos de amplificación de las muestras obtenidas con las parejas de oligonucleótidos *gdh13/gdh18* y *gdhFw/gdhRv* (Tabla 3.1) sirvieron para generar dos sondas diferentes (sonda *gdh13/18* y sonda *gdhFw/Rv*, respectivamente) empleando el kit comercial DIG High Prime Labelling and Detection Starter Kit I (Roche Applied). Las sondas se marcaron empleando la forma alcalina de

digoxigenina, DIG-11-dUTP, tal y como se detalla en el protocolo proporcionado por el kit comercial. Se trata de un marcaje no radiactivo en el que se emplea el esteroide digoxigenina acoplado a dUTP mediante un enlace alcalino, posibilitando que la detección sea por aparición de color o luminiscencia.

Con el objeto de facilitar el proceso de hibridación, previamente se incubó la membrana de nylon con el ADN fijado pero sin sonda en una solución de pre-hibridación compuesta por 5× SSC (3 M NaCl, 300 mM citrato sódico, pH 7,0), 0.1% N-lauroylsarcosine (p/v) (Sigma-Aldrich), 0,02% SDS (p/v) (SDS) y 1/10 Blocking Solution 10× (suministrada en el kit). Estos mismos componentes junto con la sonda de ADN marcada conforman la solución de hibridación. Ambas incubaciones (pre-hibridación e hibridación) fueron realizadas en las mismas condiciones.

Para llevar a cabo la pre-hibridación e hibridación del ADN con las distintas sondas, se siguieron las instrucciones detalladas en el kit comercial DIG High Prime Labelling and Detection Starter Kit I (Roche Applied). La temperatura óptima de hibridación fue seleccionada teniendo en cuenta el porcentaje de homología entre la sonda empleada y la secuencia a detectar, así como la temperatura de fusión de la sonda. Tal y como se indica en las instrucciones del kit comercial, la temperatura de hibridación se estableció siguiendo la fórmula: $T_{opt} = T_m - 20$ hasta 25 °C, donde T_{opt} es la temperatura óptima de hibridación y T_m es la temperatura de fusión de la sonda. Este último parámetro fue calculado en función del contenido en GC de la sonda y de su tamaño en pares de bases, sirviéndonos para ello del software de análisis de biología molecular DNASTAR®. La reacción de hibridación se dejó transcurrir durante 16 h en constante agitación a 68 °C (T_{opt} de hibridación). Los híbridos $ADN_{muestra} - ADN_{sonda}$ fueron detectados mediante un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina que al entrar en contacto con el sustrato proporcionado en el kit, NBT-BCIP Colour-Substrate (18,75 mg/ml de cloruro de tetrazolio nitroazul y 9,4 mg/ml de 5 bromo-4 cloro-3 indol fosfato en 67% [v/v] DMSO), da lugar a un precipitado de color oscuro apreciable a simple vista.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Evaluación de la actividad GDH en *L. lactis*

Las estirpes silvestres de *L. lactis* utilizadas en este estudio se analizaron mediante ensayos enzimáticos para cuantificar la actividad GDH y determinar su especificidad con los cofactores NAD^+ y NADP^+ . Se evaluó la actividad GDH en presencia/ausencia de ácido glutámico y en presencia de NAD^+ y NADP^+ . El interés en poder diferenciar la preferencia de la enzima por un cofactor u otro radica en que, en general, la participación de NADP^+ -GDH está relacionada con el ciclo anabólico o de biosíntesis del glutamato, mientras que la intervención de NAD^+ como poder reductor de la reacción se asocia al catabolismo del ácido glutámico (Smith *et al.*, 1975). La Tabla 3.2 muestra los resultados de actividad GDH obtenidos en las distintas cepas de *L. lactis* estudiadas. La actividad GDH de las cepas de *L. lactis* se consideró positiva cuando los resultados eran superiores a 1 nmol NAD(P)H formado por minuto y por mg de proteína. Las cepas con valor inferior aparecen con el símbolo negativo (-) en la Tabla 3.2.

De todas las cepas analizadas, solamente el 24% (10 de 41) mostraron actividad GDH. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Tanous *et al.* (2002), donde muy pocas cepas salvajes de *L. lactis* presentaban la actividad. Esto sugiere la existencia de una gran variabilidad entre cepas, además de la gran variabilidad intraespecífica descrita para esta actividad enzimática (De la Plaza *et al.* 2006; Fernández de Palencia *et al.* 2006). La baja prevalencia de la actividad GDH no sólo ha sido descrita para cepas de *L. lactis* sino para BAL en general, tal y como demostraron los estudios de genómica comparativa realizados por Liu *et al.* (2008).

Los resultados mostrados en la Tabla 3.2 sobre actividad GDH indican una cierta preferencia de NAD^+ como cofactor en *L. lactis*. En el conjunto de cepas evaluadas se destaca la preferencia por NAD^+ en las cepas Til504 (control positivo), IFPL20, IFPL69, IFPL137, IFPL359 e IFPL369. El empleo de NAD^+ como cofactor por parte de la enzima GDH se relaciona con el catabolismo del ácido glutámico (Smith *et al.*, 1975), contribuyendo a la formación de α -cetoglutarato y favoreciendo, por tanto, la producción de compuestos volátiles. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Gutiérrez-Méndez *et al.* (2008), según el cual, las cepas silvestres de origen lácteo presentaban una actividad GDH NAD^+ -dependiente,

mientras que en aquellas de origen vegetal se detectaba una mayor dependencia por el cofactor NADP⁺.

Los datos mostrados en la Tabla 3.2 también indican que en algunas estirpes como IFPL105, IFPL142, IFPL361 e IFPL368 no está clara la preferencia por el cofactor en la actividad GDH. En el caso de las cepas IFPL105, IFPL142 e IFPL953 se detectó un ligero aumento de la actividad GDH en presencia de NAD⁺ como cofactor. Sólo en las cepas IFPL361 e IFPL368 se obtuvieron valores de actividad ligeramente superiores en presencia del cofactor NADP⁺ frente a la actividad detectada con NAD⁺. En estos casos, la enzima GDH tendría un papel fundamentalmente anabólico o de biosíntesis de ácido glutámico.

Tabla 3.2. Actividad GDH (nmol NAD(P)H/min/mg proteína) y detección por PCR del gen *gdh* en *L. lactis*.

Cepa <i>L. lactis</i>	Actividad GDH ^a		PCR ^b ADN plasmídico
	NAD ⁺	NADP ⁺	
IL1403	-	-	-
Til504	1,31 (0,10)	-	+
IFPL8	-	-	-
IFPL11	-	-	-
IFPL20	1,19 (0,25)	-	+
IFPL22	-	-	-
IFPL47	-	-	-
IFPL55	-	-	+
IFPL56	-	-	-
IFPL68	-	-	-
IFPL69	1,45 (0,82)	-	+
IFPL93	-	-	-
IFPL94	-	-	-
IFPL98	-	-	-
IFPL99	-	-	-
IFPL105	1,41 (0,36)	1,05 (0,15)	+
IFPL106	-	-	+
IFPL108	-	-	-
IFPL112	-	-	-
IFPL113	-	-	-
IFPL115	-	-	+
IFPL117	-	-	-
IFPL136	-	-	-
IFPL137	1,70 (0,77)	-	+
IFPL138	-	-	-
IFPL140	-	-	-
IFPL142	2,76 (0,64)	1,90 (0,36)	+
IFPL238	-	-	-
IFPL266	-	-	-
IFPL273	-	-	-
IFPL324	-	-	-
IFPL326	-	-	-
IFPL355	-	-	-
IFPL359	1,36 (0,70)	-	+
IFPL361	1,44 (0,56)	1,95 (0,53)	+
IFPL363	-	-	+
IFPL366	-	-	+
IFPL368	1,46 (0,11)	1,70 (0,23)	+
IFPL369	1,45 (0,89)	-	+
IFPL730	-	-	-
IFPL953	2,91 (0,71)	1,84 (0,19)	+

^aLos valores mostrados en la tabla representan el promedio y la desviación estándar (entre paréntesis) procedente de tres repeticiones biológicas realizadas por triplicado para cada muestra (n=9).

^bSe indica la amplificación positiva o negativa a partir de ADN plasmídico.

De todas las cepas estudiadas, *L. lactis* IFPL953, además de mostrar preferencia por NAD⁺ como cofactor, fue la cepa con mayor actividad GDH. Esta estirpe resulta especialmente interesante puesto que también se ha descrito que posee una elevada actividad α -cetoisovalerato descarboxilasa (Kivd) (De la Plaza *et al.*, 2006). En esta cepa, por tanto, la formación de compuestos aromáticos a partir de la degradación de aminoácidos estaría favorecida en dos puntos clave de la ruta catabólica: a nivel de transaminación, al aumentar la presencia de α -cetoglutarato debido a la actividad GDH; y de descarboxilación de α -cetoácidos por la actividad Kivd, al aumentar la producción de aldehídos (Smit *et al.* 2004a, Smit *et al.* 2005a).

L. lactis, al igual que otras bacterias lácticas, posee el equipamiento enzimático necesario para la transformación de aminoácidos en compuestos aromáticos. Esta transformación se encuentra limitada generalmente por una baja producción por parte de estas bacterias de α -cetoglutarato, cuya presencia es esencial para que tenga lugar la reacción de transaminación, que es la primera reacción de la transformación de aminoácidos (Tanous *et al.*, 2002; Yvon y Rijnen, 2001; Banks *et al.*, 2001). En el presente trabajo se han detectado estirpes silvestres de *L. lactis* con actividad GDH-NAD⁺, con capacidad para producir α -cetoglutarato y de especial interés para su selección como cepas silvestres productoras de aroma en queso.

3.3.2. Detección de *gdh* por PCR

La PCR fue la técnica empleada para verificar, a nivel genético, la presencia del gen *gdh* en las cepas de *L. lactis* y establecer la relación pertinente con los resultados obtenidos en los estudios enzimáticos de actividad GDH.

Se analizó la presencia del gen *gdh* a partir de ADN plasmídico y genómico de cada una de las distintas cepas de *L. lactis* mediante PCR con las parejas de cebadores *gdh13/gdh18* y *gdhFw/gdhRv* (Tabla 3.1). En ninguna de las cepas ensayadas se detectó amplificación por PCR cuando se empleó el ADN genómico como molde. Por otro lado, la amplificación a partir del ADN plasmídico dio lugar a los dos fragmentos esperados de 724 pb y 236 pb en las cepas que mostraron actividad GDH (Tabla 3.2). También se pudo observar que algunas de las cepas en las que no se había detectado la actividad GDH, sí resultaron positivas para la amplificación del gen mediante PCR. A la vista de estos resultados, se decidió confirmar la identidad del gen *gdh*, tanto en cepas con actividad GDH como en las

cepas sin actividad pero que habían resultado positivas en la amplificación de *gdh* por PCR. Para abarcar el gen completo, se amplificó el ADN plásmidico con la pareja de cebadores *gdh32* y *gdh37* y posteriormente se analizó la secuencia nucleotídica completa de los amplicones de 1406 pb obtenidos. Para este estudio, se seleccionaron las cepas *L. lactis* IFPL69 e IFPL953, como representantes de presencia de *gdh* y con actividad GDH, y las cepas IFPL55 e IFPL115 en las que se detectó presencia de *gdh* pero no mostraron actividad GDH.

Todos los productos de PCR secuenciados, incluidos los de aquellas cepas que no presentaban actividad GDH, mostraron una homología del 100% con la secuencia nucleotídica del gen *gdh* localizado en el plásmido pGdh442 (No. Acceso GenBank AY849557). El plásmido pGdh442 es originario de la cepa *L. lactis* NCDO 1867, aislada de guisantes, y se ha descrito que puede transmitirse de forma natural a otras cepas de *L. lactis* mediante movilización por elementos conjugativos (Tanous *et al.*, 2005a; 2007). La falta de actividad GDH en las cepas IFPL55 e IFPL115, a pesar de contener el gen *gdh* completo, podría ser la consecuencia evolutiva de una adaptación genética de estas cepas hacia su entorno, mediante la inactivación de la expresión del gen o por reorganizaciones en el genoma tras procesos de transferencia genética (van Hylckama Vlieg *et al.*, 2006; Bachmann *et al.*, 2009). Por otro lado, el fenotipo GDH⁻ observado en algunas estirpes *gdh*⁺ podría deberse a una reducción de la expresión del gen a niveles inferiores al límite mínimo cuantificable de actividad establecido en el estudio (1 nmol NAD(P)H/min/mg). Estos resultados confirmaron que a pesar de la elevada similitud genotípica entre cepas de *L. lactis*, al igual que se había descrito previamente para la actividad Kivd (De la Plaza *et al.*, 2006), existe una variabilidad fenotípica considerable en la actividad GDH entre cepas de *L. lactis* con la misma procedencia (Tabla 3.2).

El gen *gdh* que codifica para la actividad GDH en *L. lactis*, solo había sido caracterizado hasta ahora en la cepa *L. lactis* NCDO 1867, de origen vegetal, encontrándose integrado en el plásmido pGdh442 de 68 kb (Tanous *et al.*, 2006; 2007). La presencia y abundancia de plásmidos en estirpes de *L. lactis* de origen lácteo es una característica distintiva de las mismas (Requena y McKay, 1993; Bounaix *et al.*, 1996; van Hylckama Vlieg *et al.*, 2006). Estos plásmidos codifican funciones que generalmente reflejan su adaptación al medio en que habitan y que, con frecuencia, representan caracteres de interés tecnológico, como son funciones relacionadas con la fermentación de la lactosa, actividades proteínica y endopeptidasas, respuestas de estrés, aprovechamiento del citrato, transporte de

oligopéptidos, resistencia a bacteriófagos, síntesis de polisacáridos, resistencia frente a antibióticos y metales pesados, entre otros (Siezen *et al.* 2005).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el gen *gdh* que codifica para la actividad GDH en estirpes silvestres de *L. lactis* aisladas de queso artesanal elaborado con leche cruda tiene una localización plasmídica. Una vez evaluada la incidencia de la actividad GDH entre las cepas silvestres de nuestra colección de lactococos, decidimos seleccionar algunas de ellas como representativas para estudiar diferencias en la localización plasmídica del gen *gdh*.

3.3.3. Localización plasmídica del gen *gdh* en *L. lactis*

A partir de los resultados obtenidos de la actividad GDH y de la presencia/ausencia del gen que codifica para dicha actividad en cepas silvestres de *L. lactis*, se seleccionaron algunas cepas para continuar con la determinación de la localización del gen *gdh* en *L. lactis* mediante hibridación Southern. Las cepas seleccionadas representaban las tres combinaciones fenotipo/genotipo posibles, es decir, se seleccionaron cepas *gdh*⁺/GDH⁺, *gdh*⁺/GDH⁻ y por último *gdh*⁻/GDH⁻.

Los ensayos de localización del gen *gdh* mediante hibridación Southern se iniciaron empleando los plásmidos sin digerir de las cepas de *L. lactis* seleccionadas. En estos primeros ensayos, se empleó como sonda el producto de amplificación del gen *gdh* generado con los cebadores *gdh*13 y *gdh*18 y marcado con digoxigenina (sonda *gdh*13/18, 724 pb). En la Fig. 3.3 se muestran los resultados de hibridación del ADN plasmídico de las cepas de *L. lactis* seleccionadas. Se observó hibridación únicamente con las cepas en las que se había detectado la presencia del gen *gdh* por PCR (Tabla 3.2). En estas cepas, tanto con fenotipo GDH⁺ como GDH⁻, se observaron resultados positivos de hibridación aunque no fue posible establecer la diferente localización plasmídica del gen *gdh* entre las cepas estudiadas debido al elevado número de bandas que hibridaron con la sonda *gdh*13/18. Para tratar de evitar posibles hibridaciones inespecíficas, se empleó la sonda *gdh*Fw/Rv de 236 pb (obtenida por amplificación del gen *gdh* con los cebadores *gdh*Fw y *gdh*Rv) para la hibridación del ADN plasmídico, manteniendo 68 °C como temperatura óptima de hibridación (Protocolo DIG High Prime Labelling and Detection Starter Kit I) (Sambrook y Russell, 2001). Sin embargo, con los resultados obtenidos tampoco se pudo establecer una localización plasmídica precisa del gen *gdh* en las cepas estudiadas (resultados no mostrados).

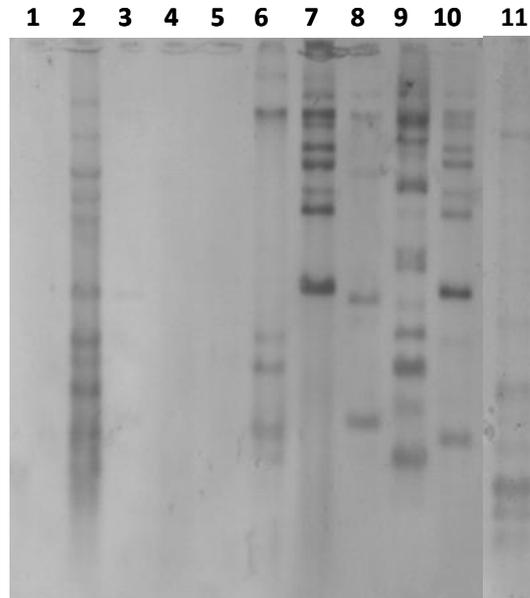


Figura 3.3. Análisis de hibridación Southern de ADN plasmídico de cepas de *L. lactis* con la sonda *gdh13/18*. Carriles: 1, IL1403; 2, TIL 504; 3, IFPL730; 4, IFPL363; 5, IFPL238; 6, IFPL55; 7, IFPL369; 8, IFPL361; 9, IFPL20; 10, IFPL953; 11, IFPL366.

Con el fin de obtener información adicional sobre posibles diferencias en la organización genética de la región que contiene el gen *gdh* en los plásmidos de las cepas seleccionadas, se realizaron digestiones de su ADN plasmídico con la enzima de restricción *EcoRI*. Previamente a la digestión de las muestras con la enzima *EcoRI*, se estudió el mapa de restricción del plásmido pGdh442 de *L. lactis* NCDO1867 (NCBI Ref. Sequence: NC_009435.1), comprobándose que existían múltiples dianas de restricción para la enzima en cuestión (Tabla 3.3). Teniendo en cuenta que el gen *gdh* que se encuentra codificado en pGdh442 está localizado entre los nucleótidos 36870 y 38216, sería esperable que a partir del ADN plasmídico digerido con *EcoRI* de *L. lactis* Til504 se obtuviera una banda de hibridación de 6 kb. En la Fig. 3.4 se muestran los resultados de hibridación obtenidos con la sonda *gdh13/18* de digeridos plasmídicos de las cepas de *L. lactis* en las que se obtuvo dicho fragmento de hibridación de 6 kb. En todos los casos,

incluso para *L. lactis* Til504, aparecieron bandas secundarias de hibridación de diferentes tamaños. De nuevo, en las cepas negativas tanto para la amplificación de *gdh* por PCR como para la actividad GDH, gdh^-/GDH^- , no se obtuvieron bandas de hibridación (resultados no mostrados).

Tabla 3.3. Fragmentos obtenidos tras la digestión simulada del plásmido pGdh442. Mapa de restricción obtenido mediante el software Clone Manager Professional v.6 (Sci - Ed Software).

Framentos	Coordenadas de restricción	Tamaño en kb
1	12813 - 25986	13,2
2	42650 - 53987	11,3
3	1497 - 10580	9,1
4	32357 - 38357	6,0
5	26244 - 30613	4,4
6	38358 - 42649	4,3
7	62028 - 66294	4,2
8	54857 - 58655	3,8
9	66265 - 1496	3,6
10	58656 - 61127	2,5
11	30611 - 32356	1,7
12	11618 - 12812	1,2
13	10581 - 11617	1,0
14	61128 - 62027	0,9
15	53988 - 54856	0,9
16	25987 - 26243	0,3

En la Fig. 3.4 puede observarse que la cepa IFPL369 presenta múltiples bandas de hibridación entre las que se encuentran aquellas coincidentes con el perfil de hibridación de la cepa control Til504. El perfil de hibridación del ADN plasmídico digerido con *EcoRI* de la cepa IFPL953 fue el más similar al de la cepa Til504 de todas las cepas de *L. lactis* estudiadas. Este resultado indicaría que la organización del gen *gdh* en su localización plasmídica de las dos cepas *L. lactis*, IFPL953 y Til504, es equivalente. Sería de gran interés profundizar en el estudio del plásmido que contiene el gen *gdh* en la cepa IFPL953 y comprobar si se trata del plásmido pGdh442 o de un plásmido diferente, pero con una organización similar de la región genética que contiene el gen *gdh*. Según los trabajos de Tanous *et al.* (2006; 2007), el plásmido pGdh442 es incompatible con otros plásmidos de tipo pSK08 (Gasson, 1983) que contienen los genes que codifican la utilización de la lactosa y las caseínas. Sin embargo, tal y como se describe en el Cap. 4 de esta

Tesis, *L. lactis* IFPL953 es capaz de crecer en leche, utilizando la lactosa y las caseínas como fuente de crecimiento.

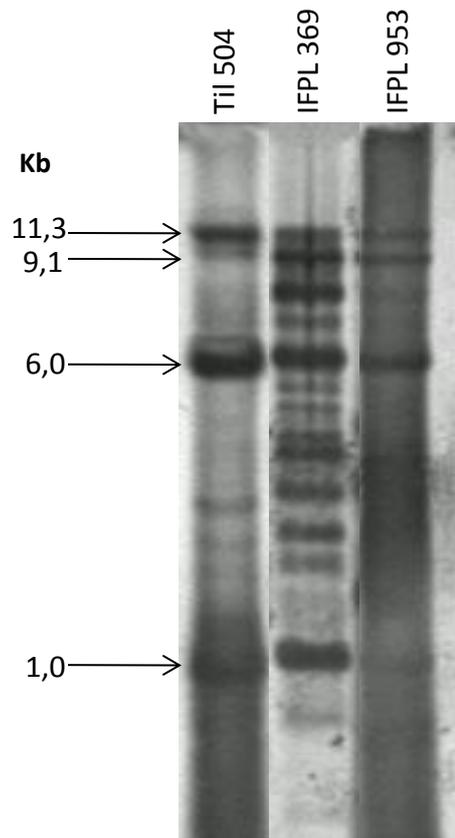


Figura 3.4. Análisis de hibridación Southern de digeridos *EcoRI* de ADN plasmídico de cepas de *L. lactis* con la sonda *gdhFw/Rv*. Cepas TII504 (control positivo), IFPL369 e IFPL953.

En el presente trabajo se demuestra que la cepa silvestre IFPL953 posee una elevada actividad GDH codificada por el gen *gdh*, que se encuentra formando parte de un plásmido y que presenta una localización genética equivalente a la del gen *gdh* en el plásmido pGdh442.

3.4. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO

El empleo de técnicas moleculares combinado con la evaluación fenotípica de la actividad GDH, nos ha permitido determinar la prevalencia de esta actividad en estirpes silvestres de *L. lactis*. Entre las cepas estudiadas, se ha observado una gran diversidad, equivalente a la encontrada en otras actividades enzimáticas relacionadas con el catabolismo de aminoácidos en BAL silvestres.

En el presente trabajo, se ha podido confirmar la presencia de la actividad GDH en estirpes silvestres de *L. lactis*, siendo esta actividad poco frecuente, ya que sólo se ha encontrado en 10 cepas de las 41 estudiadas. En ellas, se pudo observar una preferencia por el empleo de NAD⁺ como cofactor en la reacción, indicando un papel fundamentalmente catabólico de la actividad GDH.

En todas las cepas con actividad GDH el gen *gdh* se localiza en el ADN plasmídico. Se destaca del estudio la cepa *L. lactis* IFPL953 por presentar una organización genética del gen *gdh* equivalente a la de *L. lactis* T11504, cepa empleada en este estudio como referencia de actividad GDH.

Por último, es importante destacar la elevada actividad GDH de *L. lactis* IFPL953, con preferencia para la formación de α -cetoglutarato. Este resultado, junto al hecho de que esta cepa dispone de otras enzimas clave en la formación de compuestos volátiles a partir de aminoácidos, nos ha permitido seleccionar a *L. lactis* IFPL953 como una cepa candidata para aumentar la formación de aroma en queso.

CAPÍTULO IV

Control del flujo metabólico de formación y degradación de α -cetoácidos mediante la inactivación del gen *panE* en estirpes de *Lactococcus lactis* con actividad GDH

CAPÍTULO IV

Control del flujo metabólico de formación y degradación de α -cetoácidos mediante la inactivación del gen *panE* en estirpes de *Lactococcus lactis* con actividad GDH.

4.1. INTRODUCCIÓN

La reducción de α -cetoácidos a α -cetohidroxiácidos a partir de aminoácidos aromáticos, aminoácidos de cadena ramificada y metionina, ha sido descrita en lactococos (Gao *et al.*, 1998; Roudot-Algaron y Yvon, 1998) y en diferentes especies de lactobacilos (Schütte *et al.*, 1984; Hummel *et al.*, 1985 y 1988; Yamazaki *et al.*, 1986; Bernard *et al.*, 1994; Gummalla y Broadbent, 1999), así como en quesos semiduros elaborados con *Lactococcus lactis* (Yvon *et al.*, 1998). Las enzimas hidroxiaácido deshidrogenasas (HA-DH) son oxidorreductasas dependientes de NAD(H), afines ante un amplio rango de sustratos, que han suscitado gran interés en diversas áreas de estudio. En primer lugar, catalizan la síntesis estereoespecífica de isómeros de α -hidroxiaácidos, los cuales poseen múltiples aplicaciones en industrias farmacéuticas, químicas, agrícolas y alimentarias (Kallwass, 1992; Fujiwara, 2002; Panke *et al.*, 2004). En segundo lugar, las HA-DHs están negativamente relacionadas con la formación de compuestos aromáticos debido a que compiten por los α -cetoácidos que son los precursores de compuestos volátiles (Yvon y Rijnen, 2001). Además, según algunos estudios, determinadas HA-DHs están implicadas en las propiedades bioprotectoras de las BAL, ya que algunos α -hidroxiaácidos poseen actividades antifúngicas y antilisterianas (Dieuleveux y Gueguen, 1998; Lavermicocca *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2005).

La principal actividad HA-DH de *L. lactis*, la actividad hidroxiiocaproato deshidrogenasa (Hic-DH), ha sido recientemente identificada mediante mutagénesis aleatoria en el producto codificado por el gen *panE* (Chambellon *et al.*, 2009). La sobreexpresión de la enzima Hic-DH de *Lactobacillus casei*, seguida de la aplicación de esta estirpe como adjunto durante la preparación de queso Cheddar, supuso una disminución en la producción de compuestos aromáticos derivados de α -cetoácidos y el consiguiente retardo en la aparición de aroma del queso (Broadbent *et al.*, 2004). Este aspecto, en conjunto con el hecho de que la enzima incorrectamente

anotada como PanE es la única responsable en *L. lactis* de la reducción de los α -cetoácidos derivados de aminoácidos ramificados (Chambellon *et al.*, 2009), pone de manifiesto la probable interferencia de esta enzima en la formación de aroma en queso.

La mutación del gen *panE*, responsable de la actividad Hic-DH, en estirpes de *L. lactis* poseedoras de actividades relacionadas con la síntesis de α -cetoácidos, como la GDH, se postula como una estrategia para incrementar la formación de compuestos volátiles derivados de α -cetoácidos (Fig. 4.1). Con este objetivo, durante este trabajo se procedió a la mutación del gen *panE* en la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953 mediante mutagénesis por doble sobrecruzamiento y se evaluó la capacidad de la estirpe mutante obtenida para formar compuestos volátiles.

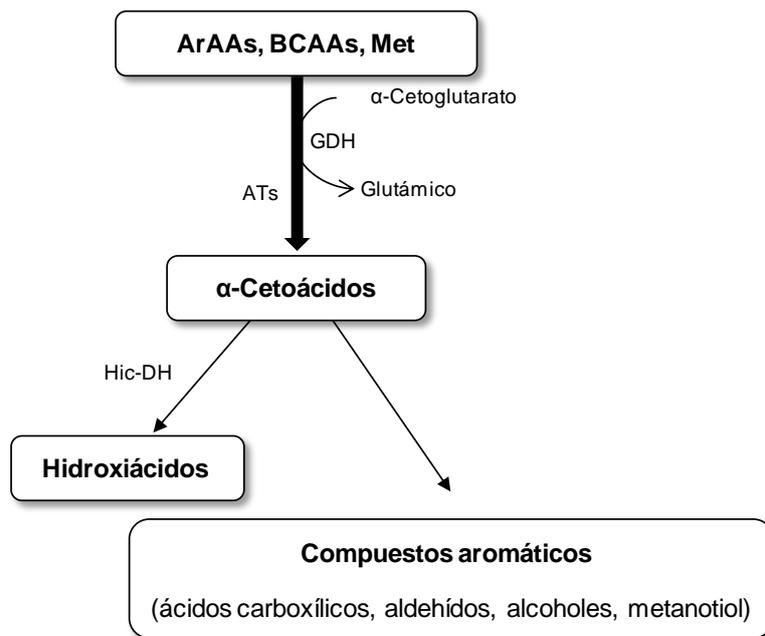


Figura 4.1. Esquema simplificado del catabolismo de aminoácidos a partir de aminoácidos aromáticos (ArAAs, "aromatic amino acids"), de cadena ramificada (BCAAs, "branched chain amino acids") y metionina (Met). ATs, aminotransferasas; GDH, glutamato deshidrogenasa; Hic-DH, hidroxisocaproato deshidrogenasa.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Los microorganismos, construcciones y plásmidos empleados en este estudio se encuentran listados en la Tabla 4.1. El cultivo de las cepas de *L. lactis* se realizó a 30 °C en el medio M17 (Difco) suplementado con 0,5% (p/v) de glucosa (G-M17), en condiciones de aerobiosis. Las cepas de *Escherichia coli* empleadas fueron crecidas a 37 °C y con agitación vigorosa en el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001). Los medios de cultivo sólidos para el crecimiento de los microorganismos en placa, se prepararon añadiendo agar (Difco) al medio líquido a una concentración final de 1,5% (p/v). En caso de ser necesario, el antibiótico eritromicina (Em) (Sigma-Aldrich) se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 5 µg/ml para *L. lactis* y 150 µg/ml para *E. coli*.

Para evaluar la producción de compuestos volátiles a partir del crecimiento de las cepas *L. lactis* IFPL953 y *L. lactis* IFPL953 Δ panE (Tabla 4.1), se emplearon un medio químicamente definido (CDM) y leche. Para ello, se inocularon las cepas al 1% (v/v) en caldo G-M17 y se incubaron durante 15 h a 30 °C. Tras la incubación, las células se sedimentaron por centrifugación (4.000 × g, 15 min, 4 °C), se lavaron dos veces en las mismas condiciones y finalmente se resuspendieron en solución salina, para después realizar los inóculos en CDM y leche desnatada al 1% (v/v). La leche desnatada se reconstituyó a partir de leche en polvo (Scharlau) al 10% (p/v), y fue esterilizada a 110 °C durante 10 min. El CDM empleado se basó en medios químicamente definidos descritos con anterioridad (Otto *et al.*, 1983; Poolman y Konings, 1988) y cuya composición se resume en la Tabla 4.2.

Tabla 4.1. Microorganismos y plásmidos empleados en este estudio.

Microorganismos y Plásmidos Características Relevantes		Origen
Microorganismos		
<i>E. coli</i> TII206 (TG1-RepA ⁺)	Contiene el gen <i>repA</i> para replicarse en <i>L. lactis</i>	Renault <i>et al.</i> (1996)
<i>E. coli</i> TII287	Contiene el plásmido pG ⁺ host9	Garault <i>et al.</i> (2002)
<i>L. lactis</i> TII46	Posee actividad Hic-DH. Usada como control positivo en este estudio	Chambellon <i>et al.</i> (2009)
<i>L. lactis</i> IFPL953	Cepa silvestre con actividad GDH	De la Plaza <i>et al.</i> (2006)
<i>L. lactis</i> IFPL953Δ <i>panE</i>	Cepa mutante en <i>panE</i> derivada de <i>L. lactis</i> IFPL953	Este estudio
Plásmidos		
pG ⁺ host9	Plásmido con replicón termosensible; Em ^R	Maguin <i>et al.</i> (1996)
pG ⁺ 9::Δ <i>panE</i>	pG ⁺ host9 con el gen <i>panE</i> mutado	Este estudio

Tabla 4.2. Composición del medio químicamente definido.

Compuesto	Concentración (g/l)	Compuesto	Concentración (g/l)
Aminoácidos		Vitaminas y bases	
Alanina	0,24	Ác. fólico	0,001
Arginina	0,12	Ác. lipoico	0,0025
Asparragina	0,35	Ác. nicotínico	0,01
Cisteína	0,17	Ác. orótico	0,005
Fenilalanina	0,28	Ác. p-aminobenzoico	0,01
Glicina	0,17	Biotina	0,01
Glutamato	0,03	Cianocobalamina (B12)	0,001
Glutamina	0,51	Inosina	0,005
Histidina	0,11	Pantotenato de calcio	0,001
Isoleucina	0,20	Piridoxina (B6)	0,002
Leucina	0,47	Piridoxiamina	0,005
Lisina	0,35	Riboflavina (B2)	0,001
Metionina	0,12	Tiamina	0,001
Prolina	0,68	Timidina	0,005
Serina	0,34	Adenina	0,01
Tirosina	0,29	Guanina	0,01
Treonina	0,23	Uracilo	0,01
Triptófano	0,05	Xantina	0,01
Valina	0,33		
Sales minerales		Azúcar	
Acetato sódico	1	Glucosa	5
Citrato amónico	0,6		
KH ₂ PO ₄	9		
K ₂ HPO ₄	7,5		
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,2		
FeCl ₂ , 4H ₂ O	0,011		
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,05		
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,005		
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,0025		

4.2.2. Determinación del crecimiento bacteriano

Para el análisis de la formación de compuestos volátiles durante el crecimiento bacteriano, se emplearon cultivos de un volumen de 100 ml de *L. lactis* IFPL953 y *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* en CDM y leche. La evolución del crecimiento durante 24 h e incubación a 30 °C se siguió mediante medidas de densidad óptica a 480 nm (DO₄₈₀) y de pH. La variación de DO₄₈₀ durante el crecimiento en CDM se midió en continuo a intervalos de 60 min usando un lector de microplacas automático (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific). El pH del CDM fue ajustado inicialmente a 7,2 con ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico (MOPS) 0,19 M. La curva de crecimiento a 30 °C en leche se realizó tomando medidas de DO₄₈₀ y de pH a diferentes intervalos durante 12 h, empleando el equipo espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 acoplado a un controlador termostático CPS - 240A (Shimadzu). La medida de DO₄₈₀ en leche se realizó tras la clarificación de la leche con ácido etilendiaminotetraacético 5 mM, pH 12 (EDTA, Sigma-Aldrich) (Thomas y Turner, 1977). Los datos de DO₄₈₀ sirvieron para calcular la tasa máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) mediante la fórmula $\mu = \Delta \ln DO_{480} / \Delta t$, donde Δt representa el incremento de tiempo (expresado en horas) entre dos medidas de DO₄₈₀. La $\mu_{\text{máx}}$ se obtuvo empleando el programa informático DMfit v.2.1. (Barayni y Roberts, 1994).

4.2.3. Inactivación del gen *panE* en *L. lactis* IFPL953

En *L. lactis* IFPL953, al igual que en el caso de la cepa *L. lactis* IL1403 (NCBI Ref.Seq.: NC_002662), el gen *panE* codifica en la hebra complementaria del ADN cromosómico. La inactivación del gen *panE* en la cepa *L. lactis* IFPL953 se realizó mediante mutación por doble sobrecruzamiento empleando para ello el vector pG⁺host9 (Biswas *et al.*, 1993) (Tabla 4.1), al que se le introdujo el gen *panE* de *L. lactis* IFPL953 con una delección de 407 pb. Este vector pertenece a la serie pG⁺host, que se caracterizan de por ser termosensibles y porque se pueden emplear en un amplio rango de hospedadores (Maguin *et al.*, 1992).

La secuencia del gen *panE* y su homología con el de la cepa *L. lactis* IL1403 fue comprobado mediante PCR y secuenciación con los cebadores panE7 y panE8 (Chambellon *et al.*, 2009) (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Cebadores empleados en este estudio y productos amplificados.

Cebadores	Secuencia nucleotídica ^a (5' → 3')	Región a amplificar	Descripción de los Productos de Amplificación
panE7 ^b	TTCCATATGAGAATCACAATTGCCGGT	Gen <i>panE</i>	938 pb; Gen <i>panE</i> en <i>L. lactis</i> IFPL953
panE8 ^b	CCGCTCGAGTTATTATTTGCCTTTAA		
Pg91 ^c	TGGCGAAAG GGGATGTGCT	Región en pG ⁺ host9	a) 200 pb; Fragmento del plásmido pG ⁺ host9 b) 1967 pb; Gen $\Delta panE$ en pG ⁺ 9:: $\Delta panE$
Pg92 ^c	ACTGACAGCTTCCAAGGA		
sbcD-IL	CGGGGTACCCCTTAGCATAACTTAGTCT	Fragmento F1	670 pb; Fragmento anterior a la zona de delección en <i>panE</i> en <i>L. lactis</i> IFPL953
1R-panE-IL	CCGCTCGAGCCTTGATATTGCTGAAGTA		
2F-panE-IL	CCGCTCGAGCTTGGTATGCTCGTCAA	Fragmento F2	688 pb; Fragmento posterior a la zona de delección en <i>panE</i> en <i>L. lactis</i> IFPL953
ynfG-IL	CCCCGGGTCACTCTAAATTCATTGT		
Fw-Int	TCTTATTATTGAACTGACTTT	ADN genómico IFPL953	a) 1645 pb; Integración del gen $\Delta panE$ correcta b) 2053 pb; Genotipo silvestre
Rv-Int	AACAGAACTGGAGTAGA		
Fw-Int / Pg92	-	Integración pG ⁺ 9:: $\Delta panE$ en <i>L. lactis</i> IFPL 953	a) 1662 pb; Recombinación por F1 b) 2070 pb; Recombinación por F2

^aAparecen subrayadas las enzimas de restricción *KpnI* (GGTAC[▼]C), *XhoI* (C[▼]TCGAG) y *XmaI* (C[▼]CCGGG).

^bCebadores panE7/panE8 (Chambellon *et al.*, 2009)

^cCebadores Pg91/Pg92 (Maguin *et al.*, 1996)

4.2.3.1. Manipulación del ADN

El ADN plasmídico de las cepas empleadas en este estudio fue purificado usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las cepas de *L. lactis* se añadió un paso inicial de lisis enzimática con lisozima (50 mg/ml) (Sigma-Aldrich). El ADN genómico de las cepas de *L. lactis* se obtuvo empleando el protocolo "Purification of total DNA of Gram positive bacteria" del kit comercial DNeasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen), con lisis enzimática con lisozima (50 mg/ml). Las enzimas de restricción de ADN y la enzima empleada en la ligación de fragmentos de ADN (ADN ligasa del bacteriofago T4) fueron adquiridas de las casas comerciales New England Biolabs y Fermentas, respectivamente, y usadas según lo recomendado por el fabricante.

Los oligonucleótidos usados como cebadores en la reacciones de PCR fueron diseñados en el laboratorio mediante el software DNASTAR[®] y encargados para su síntesis a Eurgentec, y se encuentran listados en la Tabla 4.3. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo empleando la enzima Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase (Finnzymes) para obtener copias fidedignas de los fragmentos originales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada reacción de PCR incluyó una desnaturalización inicial (98 °C, 30 s) y varios ciclos de amplificación con una desnaturalización a 98 °C (10 s), hibridación a 50 °C (30 s) y elongación a 72°C (60 s). Tanto las muestras de ADN amplificado por PCR como las que procedían de la digestión con enzimas de restricción fueron purificadas con el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Aquellas muestras de ADN cuyas secuencias nucleotídicas debían ser verificadas, fueron purificadas y preparadas siguiendo las instrucciones del kit PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), y las secuencias fueron determinadas empleando el secuenciador ABI PRISM 310 Automatic DNA Sequencer (Applied Biosystems).

La obtención de células termocompetentes de *E. coli* TIL206 y su posterior transformación se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Hanahan (1985). La transferencia de ADN plasmídico se realizó mediante choque térmico a 42 °C durante 45 s, seguido de 2 min en hielo. La transformación de *L. lactis* se realizó empleando células electrocompetentes obtenidas de acuerdo al método de Holo y Nes (1989), modificado mediante el crecimiento de las bacterias en presencia de treonina 100 mM y ajustando los parámetros del electroporador (BioRad) a un voltaje de 2,5 kV, una capacitancia de 25 µF y una resistencia de 200 Ω. Tras la transformación con ADN plasmídico, las células fueron incubadas en los medios de

cultivo apropiados para cada especie durante 90 min y se sembraron en placas de medio sólido adicionado de Em.

4.2.3.2. Construcción del plásmido recombinante pG⁺9::Δ*panE*

A partir del ADN genómico purificado de *L. lactis* IFPL953, se amplificó por PCR un fragmento (F1) de 670 pb anterior a la región a deletear del gen *panE*. Para ello, se empleó la pareja de cebadores *sbcD*-IL/1R-*panE*-IL, incorporando en los extremos 5' y 3' del amplicón los sitios de restricción de las enzimas *Kpn*I y *Xho*I, respectivamente (Tabla 4.3). A continuación, se amplificó la región posterior a la deleción (F2) empleando la pareja de cebadores 2F-*panE*-IL/*ynfG*-IL, incluyendo las enzimas *Xho*I y *Xma*I en los extremos 5' y 3', respectivamente (Tabla 4.3). Tal y como se muestra en la Fig. 4.2, el fragmento F1 de 670 pb se corresponde con parte de la región 5' del gen *sbcD* y con parte de la región 3' del gen *panE* de IFPL953, ya que estos genes se codifican en la hebra complementaria del ADN cromosómico de IFPL953. Del mismo modo, el fragmento F2 abarca las regiones 5' de *panE* y 3' del gen *ynfG* de IPL953, y tiene un tamaño de 688 pb. Los cebadores utilizados para amplificar ambos fragmentos fueron diseñados a partir de la secuencia de *L. lactis* IL1403 (NCBI Ref. Seq.: NC_002662).

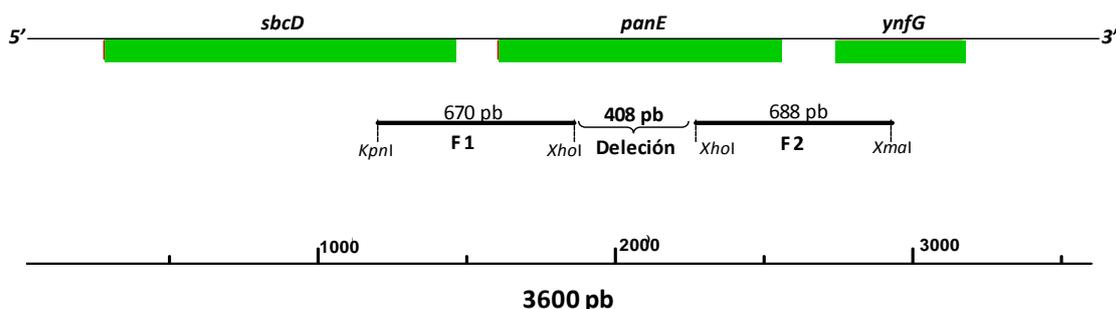


Figura 4.2. Entorno génico de *panE* en *L. lactis* IFPL953. F1 y F2 se corresponden con los fragmentos anterior y posterior a la región deletcionada de *panE*.

Una vez obtenidos los fragmentos F1 y F2, se procedió a su purificación y clonación en el plásmido pG⁺host9 (Maguin *et al.*, 1996), obtenido a partir de la cepa *E. coli* TIL287 (Tabla 4.1). El vector pG⁺host9, con un tamaño de 3,8 kb,

posee un replicón termosensible, una región de clonaje múltiple y el gen que le confiere resistencia a eritromicina (Em^R). El vector fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*, presentes en la región de clonaje múltiple, y una vez linearizado y purificado se procedió a su ligación con el fragmento F1. Posteriormente, se purificó la construcción $pG^+host9::F1$ con el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) una vez que se separó en un gel de agarosa al 0,7%. Esta construcción fue digerida posteriormente con las enzimas *XhoI* y *XmaI*, y se ligó con el fragmento F2. La construcción resultante, $pG^+9::\Delta panE$, posee la región F1-F2 (1358 pb) que contiene una delección de 408 pb en el gen *panE* ($\Delta panE$, 530 pb) procedente de la cepa silvestre IFPL953. La correcta secuencia nucleotídica de la región F1-F2 insertada en pG^+host9 fue verificada por secuenciación del plásmido empleando los cebadores Pg91 y Pg92 (Maguin *et al.*, 1996) (Tabla 4.3).

4.2.3.3. Mutación por doble sobrecruzamiento del gen *panE* en *L. lactis* IFPL953

Para la mutación del gen *panE* en *L. lactis* IFPL953, se siguió la estrategia descrita por Biswas *et al.* (1993), adaptándola a las necesidades de nuestro estudio. El vector $pG^+9::\Delta panE$ fue establecido por transformación en *E. coli* TIL206 (Tabla 4.1) y los clones transformantes fueron seleccionados en agar LB con Em. La cepa *E. coli* TIL206 posee el gen *repA* integrado en su cromosoma, posibilitando la replicación de plásmidos de *L. lactis* en ella (Renault *et al.*, 1996). Posteriormente, el plásmido $pG^+9::\Delta panE$ producido en elevado número de copias en *E. coli* TIL206, se empleó para la transformación de células electrocompetentes de *L. lactis* IFPL953. Los clones transformantes fueron seleccionados en placas de agar G-M17 con Em. La secuencia nucleotídica correcta de la región F1-F2 del vector $pG^+9::\Delta panE$ electroporado en la cepa silvestre IFPL953 fue verificada por secuenciación del plásmido empleando la pareja de cebadores Pg91/Pg92 (Tabla 4.3).

Con el fin de favorecer la replicación de $pG^+9::\Delta panE$ en IFPL953, se preparó un cultivo en caldo G-M17 con Em a partir de los clones transformantes y se incubó a 28 °C durante 16 h. Posteriormente, a partir del cultivo de los transformantes, se preparó una dilución 10^{-2} en caldo G-M17 sin antibiótico y se incubó durante 150 min a 28 °C para mantener la replicación del plásmido. A continuación se procedió a la integración de $pG^+9::\Delta panE$ en el ADN cromosómico de IFPL953 (esquemático en la Fig. 4.3). Para ello, transcurrido el tiempo de incubación a 28 °C, *L. lactis* IFPL953($pG^+9::\Delta panE$) se incubó durante 150 min a 37

°C para provocar la integración del vector en el ADN cromosómico de IFPL953. La integración del vector supone un primer sobrecruzamiento por recombinación homóloga entre una de las regiones (3' o 5') del entorno del gen *panE* en IFPL953, con su región homóloga F1 o F2 en pG⁺9::Δ*panE* (Fig. 4.3). Posteriormente, se sembraron diluciones seriadas de las muestras en placas de agar G-M17 con Em y se incubaron a 37 °C para seleccionar colonias donde ha tenido lugar la integración del plásmido. La frecuencia de integración de pG⁺9::Δ*panE* por célula (FI) se estimó como el ratio del células (unidades formadoras de colonias, UFC) crecidas en presencia de Em respecto al número de UFC crecidas en ausencia de Em. Se seleccionaron algunos clones Em^R y la integración correcta de pG⁺9::Δ*panE* en IFPL953 se verificó mediante PCR con la pareja de cebadores Fw-Int/Pg92 (Tabla 4.3). Una vez verificada la integración, se prolongó la incubación a 37 °C de los clones seleccionados, transfiriéndolos a caldo G-M17 con Em. A partir del crecimiento durante 16 h, se realizó una dilución 10⁻⁶ en G-M17 (sin Em), y se incubó a 28 °C (18 h). Esta incubación a 28 °C fue realizada con el fin de provocar la escisión del plásmido pG⁺9::Δ*panE* mediante un segundo sobrecruzamiento entre el vector y el cromosoma de IFPL953. El segundo sobrecruzamiento tiene lugar entre las regiones homólogas de *panE* en IFPL953 y en pG⁺9::Δ*panE* contrarias a las protagonistas del primer sobrecruzamiento (Fig. 4.3). Posteriormente, se sembraron placas de agar G-M17 para permitir la pérdida completa del vector, y se incubaron a 30 °C durante 16 h. Los clones resultantes se transfirieron a placas de agar G-M17 con y sin Em y se incubaron a 30 °C. Tras la incubación, aquellos clones en los que la escisión del plásmido del cromosoma de IFPL3593 fue correcta, resultaron ser fenotípicamente sensibles al antibiótico. La verificación de los clones mutados, ahora *L. lactis* IFPL953Δ*panE*, se realizó por PCR y secuenciación con la pareja de cebadores Fw-Int/Rv-Int (Tabla 4.3).

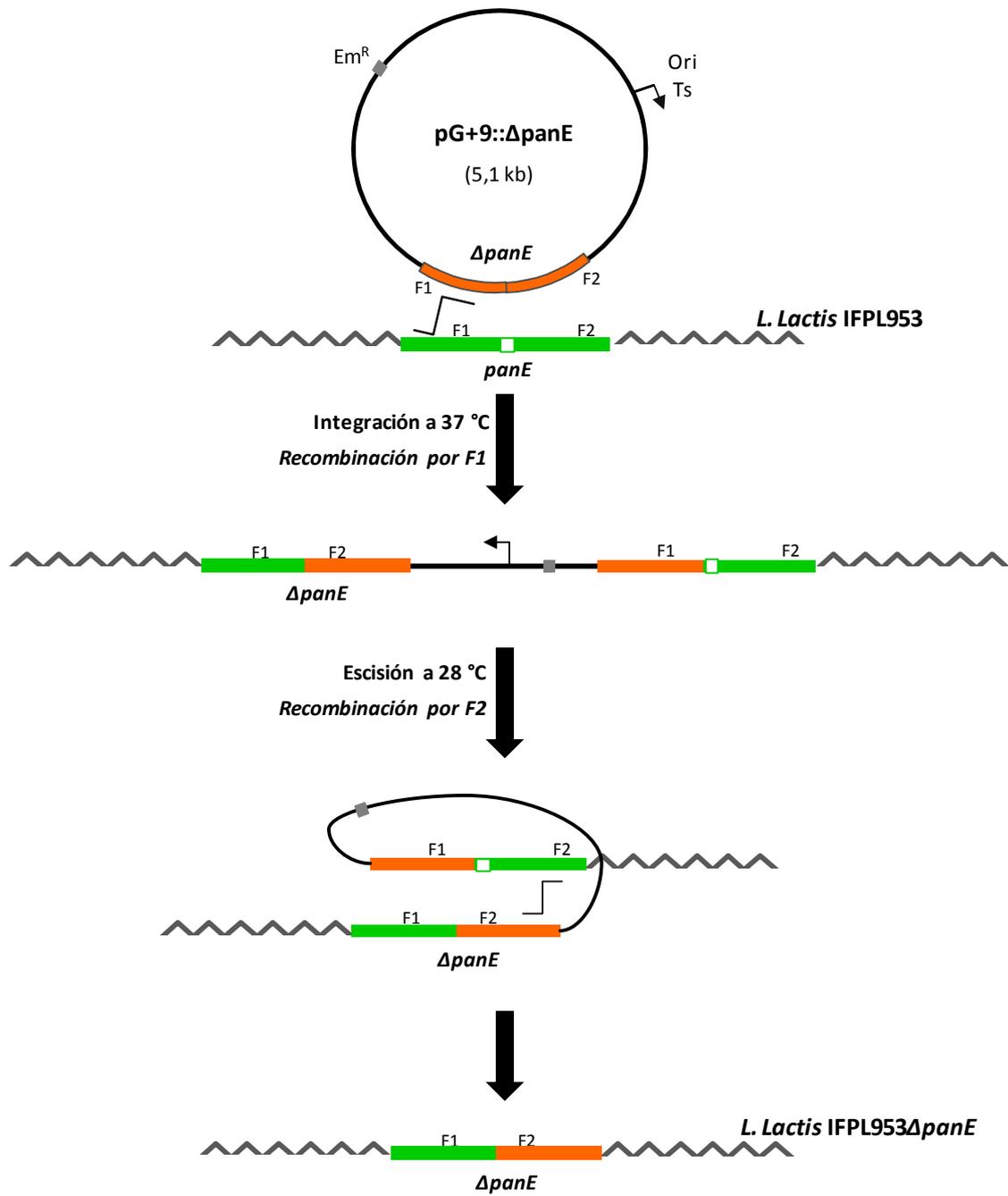


Figura 4.3. Estrategia general para la mutación del gen *panE* por doble sobrecruzamiento en *L. lactis* IFPL953.

4.2.4. Determinación de la actividad hidroxiácido deshidrogenasa

Se evaluó la actividad hidroxiácido deshidrogenasa (Hic-DH) en la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953, la cepa mutante *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* y la cepa *L. lactis* TIL46 (Tabla 4.1). *L. lactis* TIL46 es la cepa en que se realizó la caracterización de Hic-DH por primera vez en *L. lactis* (Chambellon *et al.*, 2009), por lo que se empleó como control positivo en este estudio. La actividad Hic-DH se midió a partir de extractos intracelulares de *L. lactis*.

4.2.4.1. Obtención de los extractos intracelulares

Los extractos intracelulares libres de células (CFEs) de las cepas de *L. lactis* se obtuvieron a partir de cultivos que hubieran alcanzado la fase estacionaria de crecimiento, siguiendo el protocolo de Chambellon *et al.* (2009). Brevemente, a partir de un cultivo de 100 ml de G-M17, con DO a 480 nm (DO₄₈₀) superior a 2, se centrifugaron las células a 4.100 \times *g* durante 10 min, a 4 °C, y posteriormente se lavaron dos veces con 10 ml de tampón de trietanolamina (TEA) 50 mM, pH 7 (Sigma-Aldrich). Las muestras se centrifugaron a 4.100 \times *g* durante 10 min, a 4 °C, y el sedimento celular se resuspendió en 5 ml de TEA suplementado con 1,6 mg/ml de lisozima y 0,2 g/ml de sacarosa. Esta suspensión se incubó durante 2 h a 30 °C para favorecer la formación de esferoplastos. El sedimento de esferoplastos se centrifugó a 4.100 \times *g* durante 10 min (4 °C) y se resuspendió en tampón TEA para provocar la lisis celular completa. El extracto intracelular obtenido se centrifugó a 21.000 \times *g* durante 20 min, para desechar los restos celulares. La concentración de proteína en los CFEs se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976), empleando albúmina sérica bovina como estándar.

4.2.4.2. Medida de la actividad Hic-DH

La actividad Hic-DH de *L. lactis* IFPL953, *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* y *L. lactis* TIL46, se evaluó midiendo la reducción del α -cetoisocaproato (KIC) a hidroxiisocaproato. El medio de reacción consistió en 900 μ l de tampón TEA 50 mM (pH 7), que contenía NADH 0,2 mM y KIC 100 mM. La reacción transcurrió a 37 °C y se inició en el momento en que se añadieron 100 μ l de CFEs (diluidos en tampón TEA 50 mM a partir de los CFEs puros) al medio de reacción. También se

prepararon mezclas de reacción que no contenían KIC que sirvieron como control negativo de actividad Hic-DH.

Cada cepa de *L. lactis* se analizó por triplicado y a partir de dos crecimientos distintos. La medida de desaparición de NADH en la reacción se realizó a 340 nm (A_{340}) durante 5 min, tomándose medidas puntuales de A_{340} cada 3 s. Las medidas de espectrofotometría se realizaron a 37 °C empleando el equipo espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 acoplado a un controlador termostático CPS - 240A (Shimadzu). Los resultados se expresaron en μmol de NADH ($\epsilon=6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por minuto y por mg de proteína del CFE puro.

4.2.5. Producción de compuestos volátiles por *L. lactis* IFPL953 Δ panE

Los compuestos volátiles producidos por las cepas IFPL953 e IFPL953 Δ panE, tras 30 h de incubación (fase estacionaria tardía) en CDMs y leche desnatada fueron analizados mediante microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS). Para ello, se utilizaron los sobrenadantes de cada cultivo y se dispusieron 10 ml en viales, añadiéndoles 4-metil-2-pentanol (concentración final de 4 mg/l) como control interno (CI) y, en el caso de las muestras de leche, también se añadió 1 g de NaCl (Amárita *et al.*, 2006). Las muestras fueron acondicionadas durante 15 min a 60 °C y el espacio de cabeza se expuso durante 10 min a una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilxiloxano (DVB/CAR/PDMS), previamente acondicionada durante 3 min a 270 °C (Supelco). Para la desorción de los compuestos volátiles, la fibra fue insertada en el GC (Agilent) durante 5 min, sobre una columna Hp-INNOWAX 236 de 60 m x 0,25 mm x 0,50 μm (Agilent), y se aplicó un flujo de helio de 54 ml/min. La temperatura del horno fue mantenida a 40 °C durante 2 min y programada para aumentar en 4 °C/min hasta 240 °C, manteniéndose a esta temperatura durante 15 min. El detector de masas escaneó en el rango 33-500 m/z a una velocidad de 1,1 scans/s. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros con los contenidos en la base de datos NIST98 del soporte informático Chem-Station Software (Agilent). Los resultados fueron expresados como abundancia relativa respecto del CI (porcentaje del área de pico del compuesto analizado en relación a la del CI). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

4.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 15.0. El análisis de la varianza (ANOVA) y el método test de Tukey fueron usados para localizar diferencias significativas, estableciendo un intervalo de confianza del 95% ($P < 0,05$).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Inactivación del gen *panE* y su efecto sobre la actividad hidroxiaácido deshidrogenasa en *L. lactis* IFPL953

El plásmido pG⁺9::ΔpanE fue obtenido con éxito tras la clonación del gen mutado ΔpanE, con una deleción de 408 pb en medio del gen silvestre, y su entorno génico en el vector pG⁺host9. La posterior transformación de la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953 con el plásmido dio lugar al clon transformante *L. lactis* IFPL953 (pG⁺9::ΔpanE), seleccionado por presentar resistencia a la eritromicina (Em^R). En *L. lactis*, la replicación de pG⁺host9 está determinada por la temperatura, de tal forma que a 28 °C se replica y, por el contrario, a partir de 37 °C no puede replicarse. Basándonos en esta propiedad, se sometió el clon IFPL953 (pG⁺9::ΔpanE) primero a una incubación a 28 °C para favorecer la replicación del plásmido, y a una segunda incubación, realizada a 37 °C para provocar la integración del plásmido en el ADN genómico de IFPL953 (Fig. 4.3). La FI obtenida tras la integración de pG⁺9::ΔpanE en IFPL953 fue de $2,38 \pm 0,8 \times 10^{-3}$, valor adecuado para el tamaño y homología del inserto según lo descrito por Biswas *et al.* (1993). La amplificación del ADN total del clon IFPL953 (pG⁺9::ΔpanE) con los cebadores Fw-Int y Pg92 verificó que la primera recombinación ocurrió por el fragmento F1, dando lugar a un amplicón de 1662 pb (Tabla 4.3). También se detectaron algunos clones en los que la integración de pG⁺9::ΔpanE había ocurrido por F2, (los amplicones generados por PCR fueron de 2070 pb), pero al ser minoritarios no se continuó con ellos. El reemplazamiento del gen *panE* por el gen ΔpanE en el cromosoma de IFPL953 (pG⁺9::ΔpanE), se produjo al favorecer la escisión del plásmido al incubar de nuevo a 28 °C para promover su propia replicación, y estimular así la recombinación por la región F2 (Fig. 4.3). La escisión

del replicón da lugar a la aparición de los dos genotipos posibles, el parental o silvestre y el mutante formado por doble sobrecruzamiento. Tras un crecimiento prolongado de los clones a 30 °C, se seleccionaron clones de fenotipo sensible a la Em. La secuencia nucleotídica correcta del mutante IFPL953 Δ *panE* se verificó al obtener productos de 1645 pb (Tabla 4.3) mediante amplificación por PCR con los cebadores Fw-Int y Rv-Int, y su posterior secuenciación.

Con objeto de evaluar el efecto de la integración del gen Δ *panE* en el ADN genómico de IFPL953 sobre la actividad hidroxisocaproato deshidrogenasa (Hic-DH), se midió la oxidación de NADH a 340 nm (A_{340}) empleando α -cetoisocaproato (KIC), α -cetoácido derivado del metabolismo de la leucina, como sustrato. Se realizaron medidas de actividad con CFEs obtenidos a partir de las cepas IFPL953, IFPL953 Δ *panE* y *L. lactis* TIL46.

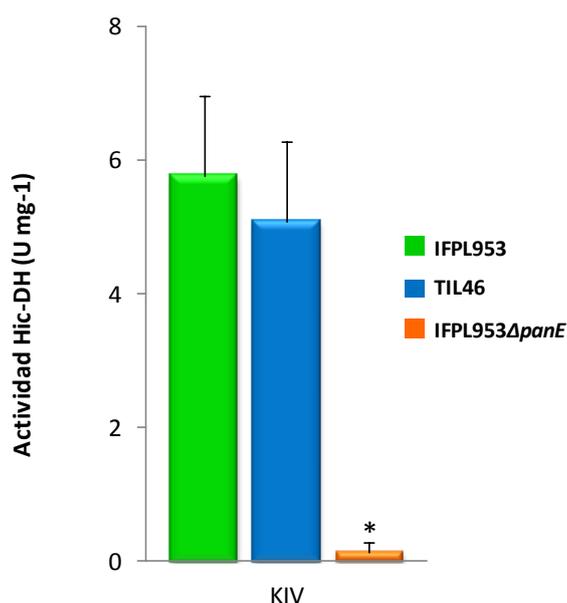


Figura 4.4. Actividad Hic-DH de las cepas *L. lactis* IFPL953 (silvestre), *L. lactis* TIL46 (control positivo) y *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* (mutante) frente a α -cetoisocaproato (KIV). Los datos se corresponden al valor medio \pm desviación estándar de seis réplicas independientes. *, $P < 0,05$.

En la Fig. 4.4 se muestran los resultados obtenidos para cada cepa, donde 1 unidad de actividad Hic-DH se definió como la cantidad de enzima que cataliza la

oxidación de 1 μmol de NADH por min y por mg de proteína en el CFE (U mg^{-1}) a 37 °C. Para las cepas IFPL953 y TIL46 se obtuvieron valores medios de actividad de 5,78 y 5,09 U mg^{-1} , respectivamente. Por el contrario, en la cepa mutante IFPL953 ΔpanE el valor medio de actividad obtenido fue significativamente inferior (0,14 U mg^{-1}) al encontrado en la cepa silvestre (Fig. 4.4), siendo equivalente a cero en algunas réplicas. Por tanto, la cepa *L. lactis* IFPL953 ΔpanE presenta una pérdida total de actividad Hic-DH a consecuencia del reemplazamiento del gen *panE* por el gen mutado ΔpanE .

4.3.2. Crecimiento de *L. lactis* IFPL953 ΔpanE

El efecto de la mutación del gen *panE* sobre el crecimiento de *L. lactis* IFPL953 ΔpanE se estudió en cultivos en CDM y leche, en comparación con la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953. Tal y como puede observarse en la Fig. 4.5, la mutación del gen *panE* no tuvo repercusión en el crecimiento de la cepa IFPL953 ΔpanE . La densidad celular máxima de los cultivos no varió en función de la cepa ya que en CDM los valores fueron de 1,82 y 1,75 para IFPL953 e IFPL953 ΔpanE , y en leche fueron de 4,5 y 4,3, respectivamente (Fig. 4.5). Las diferencias observadas en el crecimiento estuvieron asociadas con el medio de cultivo, siendo la leche el medio en el que se alcanzaron los valores más elevados. De forma análoga, la tasa de crecimiento máxima (μ_{max} [h^{-1}]) no mostró diferencias entre las cepas mutante y silvestre, siendo de nuevo los valores mayores cuando las cepas crecieron en leche (Tabla 4.4). En la Fig. 4.5 también puede observarse que el periodo de latencia fue ligeramente superior en CDM (≈ 3 h) que en leche (≈ 2 h), no existiendo diferencias entre las cepas mutante y salvaje. Aunque, en general, las diferencias de crecimiento entre las dos cepas, silvestre y mutante, no fueron significativas, sí se pudo observar un ligero retardo en el crecimiento en ambos medios (CDM tamponado y leche no tamponada) de la cepa IFPL953 ΔpanE con respecto a la cepa IFPL953. Del mismo modo, pudimos observar cierto retardo en la capacidad acidificante de la cepa mutante con respecto a la silvestre (Fig 4.5B).

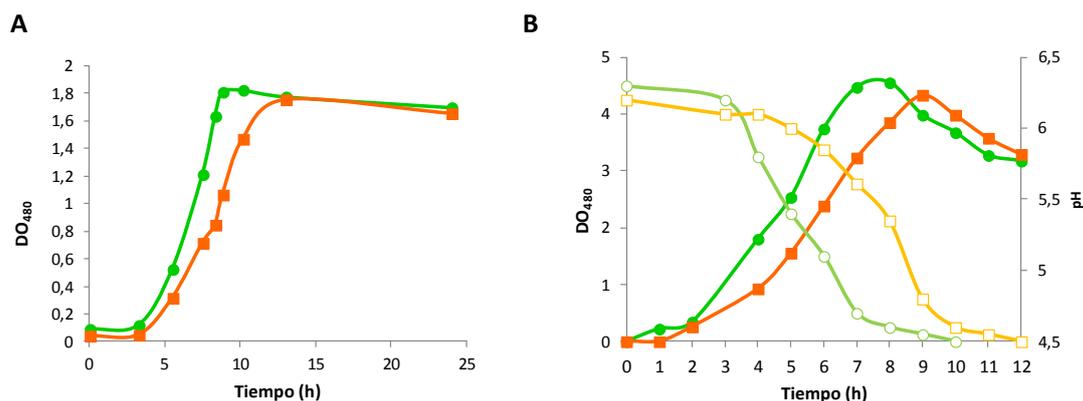


Figura 4.5. Curvas de crecimiento (símbolos rellenos) y de acidificación (símbolos vacíos) de *L. lactis* IFPL953 (color verde) e IFPL953ΔpanE (color naranja). Incubaciones realizadas a 30 °C. Curvas obtenidas mediante la lectura de DO₄₈₀ a partir de 3 repeticiones biológicas con cada medio. (A) Crecimiento en medio CDM durante 24 h. (B) Crecimiento en leche y acidificación del pH durante 12 h.

Tabla 4.4. Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$ [h⁻¹]) calculada a partir de los datos de DO₄₈₀ obtenidos durante el crecimiento de *L. lactis* en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	<i>L. lactis</i>	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)
CDM	IFPL953	0,53 ± 0,10
	IFPL953ΔpanE	0,35 ± 0,09
Leche	IFPL953	1,11 ± 0,12
	IFPL953ΔpanE	0,89 ± 0,12

4.3.3. Cambios en la producción de compuestos volátiles en *L. lactis* por la mutación del gen panE

El análisis por SPME-GC-MS permitió la identificación de un amplio rango de compuestos volátiles (aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, azufrados e hidrocarburos) generados durante 30 h de crecimiento de *L. lactis* IFPL953 (IFPL953) y *L. lactis* IFPL953ΔpanE en dos medios de cultivo (CDM y leche). En la Tabla 4.5 se muestran algunos de los compuestos más relevantes dentro de la diversidad encontrada para los distintos grupos. Las diferencias en el

crecimiento de las cepas en los dos medios se vieron reflejadas en el número de compuestos detectados. En este sentido, ambas cepas produjeron un mayor número de compuestos volátiles cuando fueron crecidas en leche frente a los producidos cuando crecieron en CDM (Tabla 4.5).

Tras el crecimiento en CDM, los grupos de compuestos mayoritarios encontrados fueron los ácidos, alcoholes y aldehídos. Tal y como se observa en la Tabla 4.5, la cepa silvestre IFPL953 dio lugar a un menor número de compuestos orgánicos volátiles (COV) que la cepa mutante IFPL953 Δ panE, aunque solo se detectaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las dos cepas en algunos compuestos. Entre estos compuestos, cabe destacar la formación de los ácidos α -cetoisocaproico (KIC) y α -cetopropiónico (piruvato) que fue superior en la cepa IFPL953 Δ panE. La acumulación en el medio de cultivo de la cepa mutante de KIC, α -cetoácido formado por transaminación de la leucina, se corresponde con la ausencia de actividad Hic-DH en dicha cepa mutante. Los aldehídos 2-metilbutanal, procedente de la isoleucina, y 3-hidroxiobutanal solo se detectaron en el cultivo en CDM de la cepa silvestre IFPL953. En cambio, la abundancia del aldehído 3-metilbutanal durante el crecimiento en CDM de la cepa mutante IFPL953 Δ panE fue superior a la de la cepa silvestre ($35,25 \pm 7,32$ frente a $23,4 \pm 4,04$). El 3-metilbutanal deriva de la descarboxilación del KIC, indicando los resultados un incremento en la cepa mutante IFPL953 Δ panE del flujo catabólico de la leucina hacia la formación del aldehído correspondiente en ausencia de la enzima Hic-DH. En relación a los demás aldehídos identificados, en la cepa silvestre IFPL953 se detectó la formación de 2-metilbutanal, procedente del catabolismo de la leucina, pero este compuesto no se detectó en la cepa mutante. En lo referente a la formación de alcoholes, en el cultivo en CDM de la cepa IFPL953 Δ panE se detectó una mayor producción de 3-metilbutanol, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Este resultado se corresponde con la mayor formación de 3-metilbutanal por IFPL953 Δ panE en ausencia de actividad Hic-DH y su posterior reducción al alcohol correspondiente en presencia de glucosa. Referente a las cetonas detectadas, se detectó una mayor abundancia relativa de la acetona en el cultivo en CDM de la cepa silvestre IFPL953 ($P < 0,05$) que en la cepa mutante. Por el contrario, la 4-metil-2-pentanona y la 4, 6-dimetil-2-heptanona solo se detectaron en la cepa mutante. Otras cetonas detectadas, aunque en niveles bajos, fueron: la acetoína, de la que la cepa silvestre produjo trazas ($0,37 \pm 0,03$); la 4, 6-dimetil-2-heptanona y la 4-metil-2-heptanona, cuyas abundancias relativas fueron superiores en la cepa mutante.

En lo referente a la formación de compuestos volátiles durante el crecimiento de las cepas silvestre y mutante en leche, el número de COVs detectados fue similar (Tabla 4.5). Entre los ácidos, se detectaron acético, butanoico y hexanoico, todos ellos potentes contribuidores al aroma en queso. La abundancia del ácido acético fue significativamente superior en la leche donde creció la cepa mutante ($14,30 \pm 1,06$ frente a $9,88 \pm 1,16$ de la cepa silvestre). Por otro lado, el ácido butanoico presentó unos niveles de abundancia relativa significativamente superiores a los de la cepa silvestre (Tabla 4.5). A diferencia del crecimiento en CDM, no se detectó la presencia de α -cetoácidos, en concreto de KIC, en el cultivo de IFPL953 Δ panE en leche. Sin embargo, se encontraron en el cultivo de la cepa mutante cantidades superiores ($P < 0,05$) de 3-metilbutanal (procedente del KIC derivado de la leucina) y 2-metilbutanal (procedente del α -cetoácido derivado de la isoleucina) que en la cepa silvestre, indicando una mayor conversión de α -cetoácidos ramificados a aldehídos por IFPL953 Δ panE debido a la ausencia de actividad Hic-DH. De igual manera, el contenido en 3-metilbutanol fue significativamente superior ($P < 0,05$) en la cepa mutante que en la cepa silvestre. En los crecimientos en leche se detectó mayor variedad de cetonas que tras el crecimiento de las cepas en CDM (Tabla 4.5). En la mayoría de los casos, las abundancias relativas de cetonas fueron superiores en el cultivo en leche de la cepa mutante que de la silvestre. Se detectaron 3 metilcetonas diferentes: 2-metil-4-heptanona, 4-metil-2-heptanona y la 4-metil-2-pentanona. Este grupo de cetonas suele ser abundante en quesos y se forman a partir de ácidos grasos libres por rutas alternativas a la β -oxidación (McSweeney y Sousa, 2000). Destaca la abundancia relativa detectada para la 4-metil-2-heptanona, que además de ser significativamente superior en la cepa mutante frente a la silvestre, también fue la cetona detectada en mayor cantidad ($12,32 \pm 0,01$). Otras cetonas detectadas en mayor proporción ($P < 0,05$) en la leche de la cepa mutante, fueron el diacetilo (2,3-butanodiona) y la 2-heptanona. Ambos son COVs importantes por su contribución al aroma en quesos tipo Camembert, Cheddar y Emmental en el caso del diacetilo y en Emmental y Gorgonzola en el caso de la 2-heptanona. También se detectó en cantidades similares en ambas cepas la formación de 2-nonanona, aunque su abundancia relativa fue baja en comparación con los valores observados para el resto de las cetonas detectadas.

Tabla 4.5. Principales compuestos volátiles detectados en el espacio de cabeza tras 30 horas de crecimiento de *L. lactis* IFPL953 (silvestre) y *L. lactis* IFPL953 Δ panE (mutante) en medio químicamente definido (CDM) y leche.

Compuesto ¹	CDM		Leche	
	IFPL953	IFPL953 Δ panE	IFPL953	IFPL953 Δ panE
<i>Ácidos</i>				
Ácido acético	-	0,97 ± 0,10	9,88 ± 1,16	14,30 ± 1,06*
Ácido butanoico	9,44 ± 2,54	7,31 ± 1,11	9,72 ± 0,62*	5,98 ± 1,10
Ácido hexanoico	3,56 ± 0,64	3,38 ± 0,70	3,73 ± 0,67	3,38 ± 0,70
Ácido α -cetoisocaproico	-	7,23 ± 3,33*	-	-
Ácido α -cetopropiónico	0,12 ± 0,03	3,63 ± 0,61*	-	-
<i>Alcoholes</i>				
2-Hexanol	19,40 ± 4,32	17,79 ± 2,14	-	-
2-Metil-2-octanol	0,56 ± 0,03	0,67 ± 0,05	-	-
2-Metilpropanol	-	-	0,68 ± 0,08	0,76 ± 0,23
3-Metilbutanol	19,80 ± 2,90	36,46 ± 14,13	3,86 ± 0,37	5,21 ± 0,49*
<i>Aldehídos</i>				
Benzaldehído	0,46 ± 0,03	1,18 ± 0,43	1,23 ± 0,46	1,86 ± 0,57
2-Metilbutanal	5,67 ± 1,15*	-	1,25 ± 0,08	1,79 ± 0,15*
3-Hidroxibutanol	7,99 ± 0,31*	-	-	-
3-Metilbutanal	23,00 ± 4,04	35,25 ± 7,32	2,85 ± 0,66	5,11 ± 0,35*
Succinaldehído	5,02 ± 0,13	2,89 ± 0,66	-	-
<i>Cetonas</i>				
Acetoína	0,37 ± 0,03	-	5,10 ± 0,70	6,13 ± 0,17
Acetona	9,58 ± 3,62*	4,84 ± 0,85	1,12 ± 0,09	0,97 ± 0,07
Diacetilo	-	-	2,76 ± 0,51	4,39 ± 0,45*
2-Heptanona	-	-	1,10 ± 0,14	2,30 ± 0,66*
2-Metil-4-heptanona	-	-	5,86 ± 0,24	12,32 ± 0,01*
2-Nonanona	-	-	0,63 ± 0,17	0,76 ± 0,10
2-Pentanona	-	-	0,25 ± 0,22	-
4,6-Dimetil-2-heptanona	0,56 ± 0,10	0,70 ± 0,03	-	-
4-Metil-2-heptanona	-	0,99 ± 0,17	1,11 ± 0,19	1,66 ± 0,36
4-Metil-2-pentanona	-	3,21 ± 0,41	2,90 ± 0,21	3,34 ± 0,59
<i>Compuestos azufrados</i>				
Dimetildisulfuro	-	-	1,83 ± 0,30	3,67 ± 1,12*
Dimetiltrisulfuro	-	-	0,36 ± 0,13	-
<i>Ésteres</i>				
Etilacetato	-	-	-	1,56 ± 0,49
<i>Hidrocarburos</i>				
Octano	-	-	1,68 ± 0,41	1,64 ± 0,52
2,4-Dimetilhexano	-	-	2,29 ± 0,63	3,09 ± 0,31
2,6-Dimetilnonano	-	-	3,54 ± 2,22	3,26 ± 0,60
4-Metilheptano	-	-	0,60 ± 0,19	1,07 ± 0,10

¹Los valores representan la abundancia relativa (%) respecto del control interno (4-metil-2-pentanol) procedentes de 3 repeticiones biológicas (media \pm desviación estándar).

*, Diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los compuestos producidos por IFPL953 e IFPL953 Δ panE.

-, No detectado.

El dimetildisulfuro (DMDS) y el dimetiltrisulfuro (DMTS) solo fueron detectados tras el crecimiento de las cepas en leche, ambos compuestos azufrados derivan del catabolismo de la metionina. Del DMTS solo se detectaron trazas en la cepa silvestre ($0,36 \pm 0,13$), sin embargo la abundancia relativa del DMDS fue significativamente superior en la cepa mutante ($3,67 \pm 1,12$). El éster de cadena sencilla etilacetato, relacionado con notas afrutadas en queso, solo fue detectado en la cepa mutante. Se detectaron 4 compuestos pertenecientes al grupo de los hidrocarburos tras el crecimiento de las dos cepas en leche (Tabla 4.5). De ellos, el 2,4-dimetilhexano y el 4-metilheptano presentaron abundancias relativas superiores en el cultivo en leche de IFPL953 Δ panE y el octano y el 2,6-dimetilnonano fueron levemente superiores en la cepa IFPL953. En ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas.

4.4. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que *L. lactis* produce α -hidroxiácidos a partir de los α -cetoácidos derivados de los aminoácidos no sólo *in vitro* (Gao *et al.*, 1998; Roudot-Algaron e Yvon, 1998) sino también en queso (Yvon *et al.*, 1998; Yvon y Rijnen, 2001). Sin embargo, estos compuestos no contribuyen al aroma ni al sabor del queso (Yvon y Rijnen, 2001). El gen *panE* codifica la actividad hidroxiiisocaproato deshidrogenasa en *L. lactis* (Hic-DH) (Chambellon *et al.*, 2009). En este trabajo, se ha procedido a la mutación del gen *panE* en la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953 con el fin de observar el efecto de la inactivación de esta actividad en la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs). La cepa IFPL953 se caracteriza por presentar la actividad GDH (Capítulo 3 de esta tesis), además de actividades clave relacionadas con el catabolismo de aminoácidos, como aminotransferasas y cetoácido descarboxilasa (De la Plaza *et al.*, 2006).

La mutación por delección del gen *panE* en *L. lactis* IFPL953 se ha realizado por doble sobrecruzamiento, dando lugar a la cepa mutante *L. lactis* IFPL953 Δ panE, que perdió en su totalidad la actividad Hic-DH frente a su sustrato preferente, el α -cetoisocaproato (KIC). Este resultado confirma el hecho de que PanE es la única enzima responsable de la reducción de los α -cetoácidos de cadena ramificada en *L. lactis* (Chambellon *et al.*, 2009). La mutación del gen *panE* no afectó al crecimiento

de la cepa IFPL953 Δ *panE*, tanto en CDM como en leche, en comparación con la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953 (Fig. 4.5). Aunque la tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de IFPL953 Δ *panE* se redujo al crecer en CDM, en comparación con el crecimiento en leche, ambas cepas mostraron un crecimiento óptimo en los dos medios. Los resultados demuestran que la mutación del gen *panE* en *L. lactis* empleando vectores termosensibles es un método eficaz para provocar la pérdida de una función concreta (Biswas *et al.*, 1993; Maguin *et al.*, 1996; Atilés *et al.*, 2000; Chambellon *et al.*, 2009).

Además de verificar la pérdida de actividad Hic-DH en IFPL953 Δ *panE*, en este trabajo se ha evaluado el efecto de esta inactivación en la formación de COVs mediante SPME y GC-MS. Esta técnica ha sido ampliamente usada en la caracterización del aroma de quesos y leche fermentada (Conrad *et al.*, 2004; Verzera *et al.*, 2004; Chammas *et al.*, 2006). En general, la inactivación de *panE* se correspondió con un incremento en el medio de cultivo de KIC y una mayor conversión del α -cetoácido en 3-metilbutanal y 3-metilbutanol, compuestos procedentes del catabolismo de la leucina debido a la presencia de las actividades BcaT, GDH y KivD en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*. La mayor formación de KIC por la cepa mutante se observó en el medio tamponado CDM (Tabla 4.5). La enzima BcaT al igual que otras aminotransferasas de *L. lactis*, tiene un pH óptimo próximo a 7 (Yvon *et al.*, 1997; Engels *et al.*, 2000; Dudley y Steele, 2001), por lo que posiblemente el KIC pudo detectarse en CDM y no en leche. El aldehído 3-metilbutanal es un potente componente del aroma en quesos tipo Camembert, Cheddar, Emmental y Gruyère (Rychlik y Bosset, 2001). Este aldehído fue detectado en los crecimientos de ambas cepas en CDM y leche, aunque en ambos medios se observó mayor producción por la cepa mutante. Este resultado enlaza con el mayor contenido en 3-metilbutanol, originado por reducción del 3-metilbutanal por deshidrogenasas, en el cultivo de la cepa *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*. El 3-metilbutanol está asociado con un aroma fuerte en queso Cheddar (Dunn y Lindsay, 1985), pero también ha sido relacionado positivamente con un aroma fresco en queso Mozzarella (Moio *et al.*, 1993) y un aroma de caramelo en un estudio que se llevó a cabo sobre diez variedades de queso europeo (Lawlor *et al.*, 2001). Otros aldehídos detectados fueron el 2-metilbutanal y el benzaldehído. El 2-metilbutanal se forma a partir de la isoleucina y está considerado un potente aromatizante de quesos como el Emmental y el Grùyere (Curioni y Bosset, 2002).

La formación del ácido α -cetopropiónico (piruvato) también fue mayor en el cultivo de *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* en CDM que en el de la cepa silvestre. El piruvato en *L. lactis* puede producirse a partir de la glucólisis ocurrida durante la

fermentación de azúcares, pero también es el α -cetoácido resultante del catabolismo del aspartato (Asp) y la alanina (Ala). No se conoce bien el catabolismo de la Ala en *L. lactis* ni se ha detectado ninguna alanina aminotransferasa en lactococos (Fernández y Zúñiga, 2006; Liu *et al.*, 2008). En cambio, *L. lactis* sí posee las dos enzimas necesarias para la conversión del Asp en piruvato, la aspartato aminotransferasa y la oxalacetato descarboxilasa (Starrenburg y Hugenholtz, 1991; Dudley y Steele, 2001). Tal y como se describe en el estudio de Le Bars e Yvon (2008), la formación de piruvato por transaminación del Asp depende en primer lugar del pH del medio, que debe estar en torno a 7. Posiblemente sea la razón por la que solo se detectara en este estudio tras el crecimiento de las cepas en CDM tamponado. La mayor producción de piruvato por la cepa IFPL953 Δ *panE* podría deberse a la inactivación de PanE, aunque se ha descrito una baja afinidad de la enzima por este sustrato (Chambellon *et al.*, 2009). El piruvato puede posteriormente dar lugar a compuestos como el diacetilo y la acetoína durante el crecimiento bacteriano. Estos compuestos tienen un impacto positivo en el aroma de quesos tipo Cheddar y Gouda (Banks *et al.*, 1992), aunque para su producción en *L. lactis* es necesario un pH en torno a 5 (Le Bars e Yvon, 2008). Esto se ve confirmado en este estudio al detectarse ambos compuestos solo tras el crecimiento de ambas cepas en leche no tamponada. Al igual que en el caso del piruvato, la cepa mutante IFPL953 Δ *panE* fue capaz de formar mayor cantidad de estos compuestos que la silvestre.

Además de la formación de piruvato y KIC, también se detectaron otros ácidos en los cultivos de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* como acético, butanoico y hexanoico. El ácido acético, procedente del metabolismo de la lactosa, se detectó principalmente en leche y fue mayor el contenido en el cultivo de la cepa mutante que en el de la silvestre (Tabla 4.5). Los ácidos butanoico y hexanoico son potentes compuestos volátiles que dan olores fuertes, con notas de tipo rancio, y que son apreciados en ciertos quesos como el Cheddar pero que en exceso pueden no ser deseados (Curioni y Bosset, 2002).

El benzaldehído, procedente del catabolismo de la fenilalanina, fue detectado en los dos medios de crecimiento y, en general, se observó una ligera mayor producción por la cepa mutante (Tabla 4.5). La conversión de la fenilalanina se inicia por la acción de una aminotransferasa específica de aminoácidos aromáticos (AraT) (Rijnen *et al.*, 1999a, 2003), mientras que la enzima Hic-DH codificada por *panE* posee baja afinidad por el fenilpiruvato, en comparación con los α -cetoácidos de cadena ramificada (Chambellon *et al.*, 2009).

Las cetonas se detectaron especialmente tras el crecimiento de las cepas en leche, siendo su contenido ligeramente superior en el cultivo de la cepa IFPL953 Δ *panE*. Estos compuestos se producen generalmente por la oxidación de los ácidos grasos o por rutas de descarboxilación en los microorganismos (Moio *et al.*, 2000). Las cetonas son constituyentes comunes de los productos lácteos y se les atribuyen olores característicos a niveles bajos de percepción. La cetona 2-heptanona, es un compuesto volátil importante para el aroma del queso Emmental y Gorgonzola. Entre las cetonas, se detectaron también metilcetonas como la 2-metil-4-heptanona, 4-metil-2-heptanona y la 4-metil-2-pentanona. Estas cetonas derivan de la β -oxidación de los ácidos grasos en queso (McSweeney y Sousa, 2000), y son consideradas responsables del aroma característico de los quesos Roquefort, Camembert y Gorgonzola (Molimard y Spinnler, 1996; Curioni y Bosset 2002).

Los compuestos azufrados volátiles contribuyen en gran medida al aroma de queso (Weimer *et al.*, 1999; McSweeney y Sousa, 2000). El dimetiltrisulfuro (DMTS) solo fue detectado en niveles muy bajos en la cepa silvestre, pero el dimetildisulfuro (DMDS) se detectó en ambas cepas, aunque la cepa mutante produjo casi el doble. La metionina puede ser transaminada a α -cetometiltiobutirato (KMBA) que por acción de la enzima KivD puede dar lugar a metional y, ambos compuestos, por degradación química a metanotiol y sus derivados DMDS y DMTS. La enzima PanE posee cierta afinidad por KMBA (Chambellon *et al.*, 2009), por lo que su inactivación explicaría un cierto incremento de volátiles azufrados a partir del catabolismo de KMBA en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, que no podría ser catabolizado hacia su correspondiente hidroxiaácido, el ácido 2-hidroxi-4metiltiobutírico (Gao *et al.*, 1998; Fernández y Zúñiga, 2006).

Tras el crecimiento en leche de las cepas IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* también se detectaron algunos hidrocarburos. Estos compuestos son productos secundarios de la autooxidación lipídica (Barbieri *et al.*, 1994) y se han encontrado en distintos tipos de queso como el Pecorino Crotonese o el Roncal (Izco *et al.*, 2000; Ortigosa *et al.*, 2001; Randazzo *et al.*, 2010) que aunque por sí mismos no contribuyan al aroma del queso, pueden ser precursores de otros compuestos aromáticos (Ortigosa *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2003).

4.5. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO

Los resultados obtenidos proporcionan información sobre el efecto de la inactivación en *L. lactis* IFPL953 del gen *panE*, que codifica para la actividad Hic-DH, en la expresión de genes relacionados con el catabolismo de aminoácidos y en la formación de compuestos volátiles durante el crecimiento en un medio químicamente definido y en leche.

En este trabajo, se ha demostrado que el gen *panE* es el único responsable de la actividad Hic-DH en *L. lactis* IFPL953. La mutación del gen *panE* no dificulta el crecimiento de *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* en leche.

La supresión de la ruta que desvía la conversión de α -cetoácidos hasta hidroxiácidos en una cepa de *L. lactis* con actividades GDH, AraT, BcaT y KivD, da lugar a la acumulación de α -cetoisocaproato y favorece su posterior conversión hacia 3-metilbutanal y 3-metilbutanol. *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* es más eficiente que la cepa parental en la formación de compuestos volátiles relacionados con el aroma del queso.

Capítulo V

Estudio de la expresión de enzimas del catabolismo de aminoácidos en *Lactococcus lactis* y evaluación de la formación de compuestos volátiles en condiciones de maduración de queso

CAPÍTULO V

Estudio de la expresión de enzimas del catabolismo de aminoácidos en *Lactococcus lactis* y evaluación de la formación de compuestos volátiles en condiciones de maduración de queso.

5.1. INTRODUCCIÓN

Se han identificado más de 600 compuestos volátiles en queso, la mayoría de ellos son productos resultantes del catabolismo de las proteínas, azúcares y lípidos de la leche que llevan a cabo las bacterias lácticas (BAL) (Maarse y Visscher, 1989; Curioni y Bosset, 2002). Entre las BAL, las rutas metabólicas que más se han estudiado han sido las del género *Lactococcus*.

Lactococcus lactis se caracteriza por disponer de diferentes actividades enzimáticas que actúan durante la producción de queso y que afectan a las propiedades organolépticas del mismo, tanto en relación a la textura como en el desarrollo del aroma y sabor (Kunji *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 2005b). Los aminoácidos son los precursores de una larga variedad de compuestos volátiles y, por ello, diversas enzimas son consideradas clave para su formación, como aminotransferasas, deshidrogenasas, liasas y decarboxilasas, entre otras (Ganesan y Weimer, 2007) (Fig.5.1). La expresión de estas enzimas puede verse afectada por los sistemas de regulación que actúan a nivel transcripcional, la disponibilidad de sustratos y las condiciones ambientales (Smit *et al.*, 2005b). Un ejemplo de regulador transcripcional lo constituye CodY, que reprime genes que participan en el metabolismo del nitrógeno en respuesta al cúmulo de péptidos o aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en el medio de crecimiento (Guédon *et al.*, 2001b; Guédon *et al.*, 2005; Den Hengst *et al.*, 2005b). Del mismo modo, la falta de nutrientes, cambios drásticos en el pH, en la osmolaridad, o en la temperatura pueden determinar diferencias en la expresión génica (Dressaire *et al.*, 2008). De hecho, las cepas de *L. lactis* que participan en la elaboración de queso rara vez se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento (Sanders *et al.*, 1999). Desde el punto de vista industrial es muy importante la selección de cepas en función de sus

capacidades metabólicas y de su capacidad de adaptación a las situaciones de estrés ocurridas durante la fabricación del queso.

En este sentido, se ha demostrado que las estirpes de *L. lactis* aisladas de nichos naturales presentan con frecuencia una mayor capacidad de adaptación a la carencia de aminoácidos y ante distintas situaciones de estrés en comparación a las cepas de uso industrial. Esta característica se relaciona con una mayor capacidad de biosíntesis de aminoácidos y, por tanto, con una mayor actividad enzimática relacionada con el metabolismo de estos compuestos. En consecuencia, estas cepas silvestres no sólo presentan un mayor potencial enzimático sino que también podrían dar lugar a diferentes perfiles aromáticos (Ayad *et al.*, 1999; Mauriello *et al.*, 2001; Tavaría *et al.*, 2002; Ayad, 2008; Smit *et al.*, 2009). En algunos casos, los aromas producidos por estas cepas se definen como achocolatados, afrutados o a “quesería” y se deben a la producción de aldehídos y alcoholes derivados de BCAAs. Estos compuestos generalmente forman parte de la fracción volátil de quesos como el Parmesano y contribuyen positivamente a su aroma si se encuentran en un balance adecuado (Barbieri *et al.*, 1994; Engels *et al.*, 1997).

Basados en la capacidad que presentan las estirpes silvestres de *L. lactis* para crecer con bajos requerimientos nutricionales y en su potencial para producir compuestos volátiles, hemos estudiado en *L. lactis* IFPL953 y en su mutante IFPL953 Δ *panE* (sin actividad Hic-DH) el efecto del contenido en BCAAs en el medio de crecimiento y de las condiciones propias del proceso de maduración, sobre la expresión de genes que están relacionados con el catabolismo de aminoácidos y la formación de compuestos del aroma en queso.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

En este estudio se emplearon la cepa *L. lactis* IFPL953, una cepa silvestre aislada de quesos de leche cruda de cabra (Fontecha *et al.*, 1990), y la cepa mutante *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, derivada de la anterior pero con el gen *panE* inactivado (Cap. 4 de esta Tesis). Ambas cepas fueron crecidas en caldo M-17

(Pronadisa) suplementado con 0,5% (p/v) de glucosa (G-M17) durante 18-24 h a 30 °C en condiciones de aerobiosis.

Para estudiar la influencia del contenido de BCAAs en el medio de cultivo, se realizaron crecimientos en un medio químicamente definido (CDM, "chemically defined media") donde se varió la concentración de estos aminoácidos. Para ello, se inocularon las cepas *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ panE al 1% (v/v) en G-M17 y se incubaron a 30 °C durante 15 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se sedimentaron por centrifugación (4.000 x g, 15 min, 4 °C), se lavaron dos veces en las mismas condiciones y finalmente se resuspendieron en solución salina (0,85% NaCl), para después realizar los inóculos en CDM al 1% (v/v). El CDM empleado está basado en los medios químicamente definidos descritos en la bibliografía (Otto *et al.*, 1983; Poolman y Konings, 1988) y su composición se resume en la Tabla 4.2 (Cap. 4 de esta Tesis). Las diferencias respecto al contenido en BCAAs fueron las siguientes: CDM basal, contenía todos los aminoácidos; CDM-Ile, no contenía isoleucina; CDM-Val, contenía la décima parte del contenido normal de valina (0,033 g/l); y CDM-Leu, contenía la centésima parte del contenido normal de leucina (0,0047 g/l).

Con el fin de evaluar el efecto de la fuente de carbono y de las condiciones equivalentes a la maduración en queso en la expresión génica y la formación de compuestos volátiles, se realizaron crecimientos de las cepas de *L. lactis* en medio CDM donde se varió la fuente de carbono (sin azúcar y con lactosa al 0,2% [p/v]), la concentración de sal (4,5% [p/v]), el pH (5,5) y se redujo la temperatura de incubación a 12 °C. Las variaciones en las condiciones de cultivo se evaluaron tanto de forma independiente para cada variable (fuente de carbono, salinidad, pH y temperatura), como en conjunto. Los CDMs empleados en esta fase del estudio fueron los siguientes: CDM basal, con glucosa al 0,5% y pH 7; CDM-SinAz, no contenía azúcar; CDM-Lac, contenía lactosa al 0,2% en lugar de glucosa; CDM-NaCl, contenía sal al 4,5%; CDM-pH, con pH ajustado a 5,5; CDM-T, incubado a 12 °C; CDM-Mad(L), contenía lactosa al 0,2%, pH 5,5, NaCl al 4,5% y se incubó a 12 °C; CDM-Mad, sin azúcar, pH 5,5, NaCl al 4,5% y se incubó a 12 °C. El ajuste de pH a 5,5 de los CDMs en que fue necesario, se realizó con ácido 2-(N-morfolino) ethanesulfónico sal hemisodio (MES), 0,19 M.

5.2.2. Determinación del crecimiento bacteriano en medios con diferente contenido aminoácidos ramificados. Condiciones empleadas en la incubación de *L. lactis* en medios de maduración

El crecimiento de las cepas *L. lactis* IFPL953 y *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* para estudiar la influencia del contenido BCAAs en el medio de cultivo, se determinó midiendo la densidad óptica a 480 nm (DO_{480}) en microplacas estériles de 96 pocillos con tapa (Sarstedt). La variación de DO_{480} durante el crecimiento en CDM se midió en continuo a intervalos de 60 min usando un lector de microplacas automático (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific). Los cultivos se realizaron en 300 μ l de medio (CDM, CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu) inoculado al 1% (v/v). Los datos de DO_{480} sirvieron para calcular la tasa máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) mediante la fórmula $\mu = \Delta \ln DO_{480} / \Delta t$, donde Δt representa el incremento de tiempo (expresado en horas) entre dos medidas de DO_{480} . Los valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ se obtuvieron empleando el programa informático DMfit v.2.1. (Barayni y Roberts, 1994). Para el estudio de expresión génica y el análisis de compuestos volátiles, se emplearon cultivos de un volumen de 300 ml de las cepas silvestre y mutante de *L. lactis* en los CDM con diferente contenido en BCCAs. Los recuentos en placa y las medidas de pH se realizaron a partir de muestras de estos cultivos tomadas a diferentes etapas de la curva de crecimiento. Para los recuentos de IFPL953 e IFPL953 Δ *panE*, se tomó 1 ml de cultivo, se diluyó en solución salina (0,85%) y se sembró en agar G-M17 (medio G-M17 al que se le añadió agar bacteriológico al 1,5%). El tiempo de incubación a 30 °C se extendió a 48 h. Con el fin de evitar variaciones de pH que pudieran afectar a la expresión génica, el pH de los CDMs fue ajustado a 7,2 con ácido 3-(N-morfolino) propanesulfónico (MOPS) 0,19 M. No obstante, se llevaron a cabo diferentes medidas de pH a partir de 3 ml de muestra de los cultivos a lo largo del crecimiento.

Para el estudio del efecto de las condiciones similares a las de maduración en queso, se partió de un cultivo de las cepas IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* en 15 ml de CDM inoculado al 1% y crecido hasta una DO_{480} de 1,5. Una vez alcanzada la DO_{480} deseada, se transfirieron los sedimentos celulares lavados a 15 ml del medio de cultivo diseñado para simular las condiciones de maduración en queso (CDM-SinAz, CDM-Lac, CDM-NaCl, CDM-pH, CDM-T, CDM-Mad[L] y CDM-Mad), y a 15 ml de CDM basal que sirvió como control. Para evaluar la respuesta de las cepas silvestre y mutante ante las distintas condiciones del medio, los distintos CDMs (cada uno acompañado del CDM basal) se incubaron durante diferentes tiempos (Tabla 5.1),

basándonos en lo descrito por Sanders *et al.* (1999) y con modificaciones adaptadas a las necesidades de nuestro estudio.

Para la evaluación de la expresión génica y el análisis de compuestos volátiles, relativos a las condiciones de maduración, los cultivos (15 ml) en CDM de las cepas silvestre y mutante tras las incubaciones correspondientes (Tabla 5.1) se centrifugaron (4.000 x *g*, 15 min, 4 °C) para obtener el sobrenadante y el sedimento celular necesarios para los ensayos posteriores.

Tabla 5.1. Medios y condiciones de incubación de los cultivos de *L. lactis* empleados en la evaluación del efecto de las condiciones de maduración en queso en la expresión génica y la formación de compuestos volátiles.

Medio ¹	Condiciones de incubación
CDM-SinAz	3 h, 30 °C
CDM-Lac	3 h, 30 °C
CDM-NaCl	1 h, 30 °C
CDM-pH	1 h, 30 °C
CDM-T	16 h, 12 °C
CDM-Mad(L)	16 h, 12 °C y 7 d, 12 °C
CDM-Mad	16 h, 12 °C y 7 d, 12 °C

¹CDM-SinAz, sin azúcar; CDM-Lac, con lactosa al 0,2% (p/v); CDM-NaCl, con NaCl al 4,5% (p/v); CDM-pH, ajustado a pH 5,5; CDM-T, misma composición que el CDM basal pero incubado a 12 °C; CDM-Mad(L), contiene lactosa al 0,2%, NaCl al 4,5%, pH 5,5; CDM-Mad, sin azúcar, NaCl al 4,5% y pH 5,5.

5.2.3. Extracción de ARN y transcripción inversa

El ARN total de los cultivos de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* crecidos en los CDMs con diferente contenido en BCAAs fue extraído a diferentes tiempos durante la curva de crecimiento: (1) al inicio de la fase exponencial; (2) al final de la fase exponencial; (3) en la fase estacionaria tardía. Para los cultivos obtenidos en CDM (DO₄₈₀ de 1,5) e incubados en condiciones equivalentes a las de la maduración de queso, el ARN total fue extraído en los cultivos tras las incubaciones señaladas en la Tabla 5.1.

El ARN fue purificado utilizando el kit *RNeasy* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y modificando el protocolo para insertar un paso inicial

de lisis enzimática con lisozima (50 mg/ml) y mutanolisina (200 U/ml). Con el fin de proteger y estabilizar el ARN, se trataron previamente las células con *RNA protect bacteria reagent* (Qiagen) y a continuación se sedimentaron por centrifugación (10.000 x *g*, 10 min). La concentración de ARN fue calculada midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) usando el espectrofotómetro SmartSpec Plus (Bio-Rad). Se realizó también una medida de A_{280} para establecer la pureza del ARN extraído mediante el cociente $A_{260/280}$, que indica el contenido residual de proteínas. En el estudio se incluyeron aquellas muestras de ARN con un cociente $A_{260/280}$ entre 1,8-2,0. Para finalizar, el ARN fue tratado con *ADNasa (DNase Treatment and Removal Reagents, Ambion)* para eliminar los posibles restos de ADN en las muestras.

La transcripción inversa del ARN y síntesis del ADN complementario (ADNc) fue realizada mediante el sistema ThermoScript RT-PCR (Invitrogen). La mezcla de reacción (20 μ l) contenía 1 μ g de ARN, 50 ng/ μ l de cebadores *random hexamers*, 10 mM de la mezcla de dNTPs, tampón de síntesis al 5 \times , Ditioneitol (DTT) 0,1 M, 40 U de *ARNasa OUT*, 15 U de polimerasa ThermoScript RT y se completó con agua DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato). El protocolo térmico empleado fue el siguiente: desnaturalización a 65 °C durante 5 min; estabilización a 25 °C, 5 min; retrotranscripción a 50 °C durante 50 min e inactivación de la transcriptasa inversa a 85 °C, 5 min.

5.2.4. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

5.2.4.1. Diseño de cebadores y evaluación de su eficiencia

Los cebadores utilizados en este estudio (Tabla 5.2) se diseñaron a partir de la secuencia del genoma de *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403 (NCBI Ref. Seq.: NC_002662; Bolotin *et al.*, 2001), del gen *gdh* (NCBI GeneID: 5077352) del plásmido pGdh442 (NCBI Ref. Seq.: NC_009435.1) y del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 (NCBI GenBank: AJ746364.1). Los cebadores fueron diseñados, empleando la herramienta *Primer-Blast* (NCBI), para amplificar secciones definidas y específicas de seis genes que participan en el catabolismo de aminoácidos (Fig. 5.1) y del gen *tuf*, usado como gen de referencia y que codifica para el factor de elongación Tu en *L. lactis*. Los cebadores cuentan con una longitud de entre 17-23

pb y con una T_m de 50-52 °C. Los amplicones generados oscilaron entre 148-236 pb.

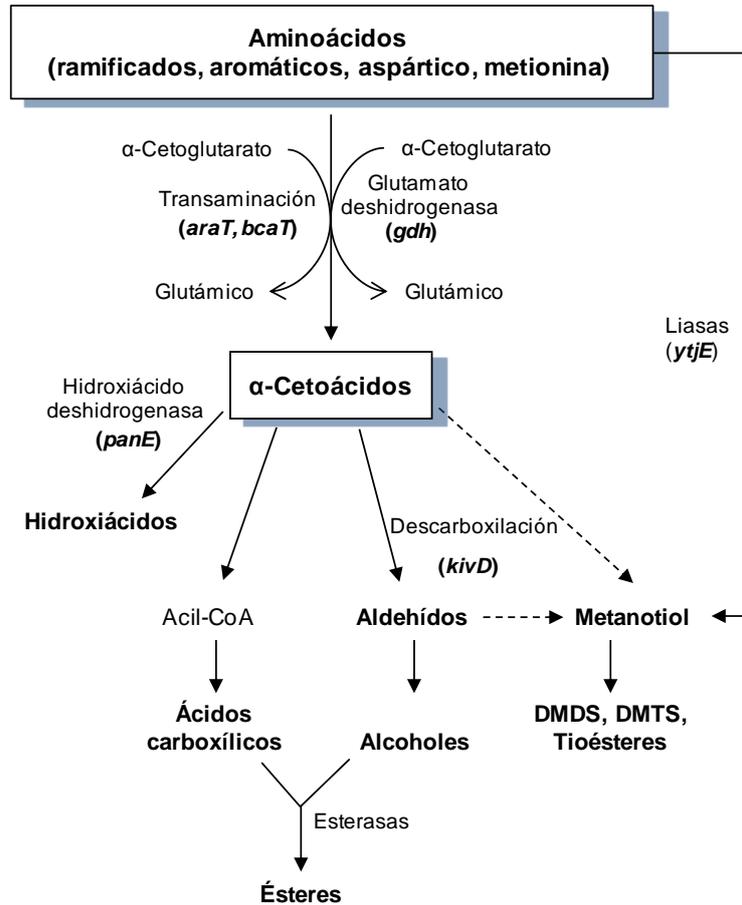


Figura 5.1. Esquema general del catabolismo de aminoácidos en *L. lactis*. Los genes de interés en este estudio se representan en negrita y en cursiva. DMDS, dimetildisulfuro; DMTS, dimetiltrisulfuro. (Adaptado de Requena y Peláez, 2007).

Para comprobar la presencia de estos genes de interés en *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE*, así como la especificidad de los cebadores, se llevó a cabo una amplificación por PCR con ADN genómico. El ADN genómico de las cepas se obtuvo empleando el protocolo "Purification of total DNA of Gram positive bacteria" del kit comercial DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen), incluyendo una lisis enzimática previa con lisozima (50 mg/ml). La reacción de PCR (50 μ l) contenía 200 μ M de cada deoxinucleósido trifosfato (dNTP), 0,4 μ M de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂,

tampón de reacción al 1×, 2,5 U de enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen) y 500 ng de ADN genómico de cada una de las cepas. El programa de amplificación fue el siguiente: 94 °C durante 3 min; 30 ciclos de 94 °C (30 s), 52 °C (20 s) y 72 °C (20 s); y una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los productos generados (Tabla 5.2) fueron analizados en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Se determinó para cada pareja de cebadores la eficiencia de reacción (E), es decir, la capacidad para duplicar el número de amplicones obtenidos en cada ciclo de amplificación por PCR a tiempo real (qRT-PCR, "quantitative reverse transcription PCR") (Tabla 5.2). A partir de diluciones seriadas con ADNc procedente del ARN extraído de un cultivo puro de la cepa *L. lactis* IFPL953 se realizaron curvas estándares por qRT-PCR para cada pareja de cebadores. La E de cada pareja de cebadores se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E = 10^{(-1/pendiente)-1}$$

Tabla 5.2. Cebadores empleados en este estudio.

Gen	Cebadores	Secuencias 5'→3'	Amplicón (pb)
<i>araT</i>	aratfor	GTTTGACCAACAGGTTTCAT	220
	aratrev	AATTCATCTTCTGCTGCAT	
<i>bcaT</i>	bcatfor	TTCCGTCCTGACCAAAATG	187
	bcatrev	GCACCCGTTCCGTAAGG	
<i>gdh</i>	gdhF2	GATTCAAAAAGCGACTGAAC	236
	gdhR2	TTTCATTTTGTGTTGCACAT	
<i>kivD</i>	kivdfor	AAGCCAAATTGCAGATAAAG	174
	kivdrev	CTTTGATTTGGCCCATGAAT	
<i>ytjE</i>	ytjefor	CCATTCACTTCCATTTTCAT	176
	ytjerev	TATCTTCTGCCACCAAAAGT	
<i>panE</i>	panefor	AATTATTTGGTGATGGTTGG	233
	panerev	CATATCATGTGCTGGTTTTG	
<i>tuf</i>	tuffor	GCGTTCTGGAGTTGGGATGT	148
	tufrev	CCTCTTGAGCGAATACGATT	

5.2.4.2. Reacción de qRT-PCR y análisis de los resultados obtenidos mediante esta técnica

En la reacción de qRT-PCR se utilizaron 1 µl del ADNc, 0,3 µl de cada uno de los cebadores específicos (20 µM) y 12,5 µl de la mezcla maestra *IQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), completando el volumen de reacción hasta 25 µl con agua milliQ estéril. La reacción se llevó a cabo en un equipo *iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System Cyclor* (Bio-Rad) y cada ADNc fue amplificado con los cebadores específicos que aparecen en la Tabla 5.2. En cada análisis se incluyeron dos controles negativos, uno contenía ARN tratado con ADNasa y el otro, la mezcla de reacción sin el ADNc. Se siguió el protocolo térmico detallado a continuación: desnaturalización previa a 98 °C durante 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C (10 s), de hibridación a 52 °C (30 s) y elongación a 72 °C durante 60 s. Las medidas de fluorescencia se realizaron en el paso de elongación de cada ciclo. Para detectar posibles productos inespecíficos y/o la aparición de dímeros de cebadores se programó al final de cada reacción de qRT-PCR una curva de *melting* entre 50 y 95 °C a razón de 0,5 °C/s.

Cada reacción de qRT-PCR va asociada a un ciclo umbral (Ct), definido como el ciclo en el que se empieza a detectar un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base (Heid *et al.*, 1996). En este estudio, la señal de base que se estableció como óptima fue la generada automáticamente por el software del equipo de PCR cuantitativa (*iQTM5*, Bio-Rad). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el método descrito por Pfaffl (2001), donde se tienen en cuenta las eficiencias de reacción de los cebadores empleados para amplificar tanto los genes en estudio como los genes de referencia. El nivel de expresión relativa o ratio fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Ratio = (E_{muestra})^{\Delta Ct_{muestra (control-muestra)}} / (E_{ref})^{\Delta Ct_{ref (control-muestra)}}$$

En esta ecuación: $E_{muestra}$ representa la eficiencia de reacción de los cebadores empleados para amplificar el transcrito del gen en estudio (gen diana); E_{ref} representa la eficiencia de reacción de los cebadores empleados para amplificar el transcrito del gen de referencia; $\Delta Ct_{muestra}$ es la diferencia entre el Ct del transcrito del gen diana expresado en las condiciones control menos el del gen expresado en las condiciones de ensayo; y ΔCt_{ref} es la diferencia entre el Ct del gen de referencia en las condiciones control menos en las condiciones de ensayo. En este estudio, la condición control se corresponde con los crecimientos en CDM

basal, y las condiciones de la muestra, con los crecimientos en CDM-Ile, CDM-Val, CDM-Leu, CDM-SinAz, CDM-Lac, CDM-NaCl, CDM-pH, CDM-T, CDM-Mad(L) y CDM-Mad.

Las eficiencias para cada pareja de cebadores se calcularon de acuerdo con lo indicado en el apartado 5.2.4.1. La expresión génica se consideró inducida o reprimida cuando el ratio fue superior o inferior a 1, respectivamente. El gen de referencia utilizado en este estudio para la normalización de los datos fue el gen *tuf* de *L. lactis* que codifica para el factor de elongación Tu. Para confirmar la aptitud de *tuf* como gen referencia se determinó su expresión a distintos tiempos a lo largo de la curva de crecimiento de *L. lactis* en diferentes CDMs. Todos los ΔC_t entre dos muestras fueron igual o inferior a 1, validando al gen *tuf* como control interno (resultados no mostrados).

Los ensayos fueron llevados a cabo sobre muestras de ADNc sintetizado del ARN procedente de 3 cultivos independientes de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 $\Delta panE$ crecidos en los diferentes CDMs. Las reacciones de qRT-PCR se realizaron por triplicado para cada gen.

5.2.5. Análisis de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles producidos por las cepas *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 $\Delta panE$ en las diferentes condiciones de incubación, se analizaron mediante microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases (GS) y espectrometría de masas (MS).

Los compuestos volátiles producidos por las cepas en los CDMs con variaciones en el contenido de BCAAs (CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu) se analizaron tras 30 h de incubación (fase estacionaria tardía). En cambio, los compuestos volátiles producidos en los CDMs con los que se simularon las condiciones de maduración en queso (CDM-SinAz, CDM-Lac, CDM-NaCl, CDM-pH, CDM-T, CDM-Mad(L) y CDM-Mad) se analizaron tras las incubaciones descritas en la Tabla 5.1.

En todos los casos, se analizaron los sobrenadantes de cada cultivo y se dispusieron 10 ml en viales, añadiéndoles 4-metil-2-pentanol (concentración final de 4 mg/L) como control interno (CI). Las muestras fueron acondicionadas durante 15 min a 60 °C y expuestas durante 10 min a una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilxiloxano (DVB/CAR/PDMS; Supelco), previamente acondicionada (3 min a 270 °C). La fibra fue insertada en el inyector

del GC (Agilent) durante 5 min para la desorción de la muestra sobre una columna Hp-INNOWAX 236 de 60 m x 0,25 mm x 0,50 μ m (Agilent) y con un flujo de helio de 54 ml/min. La temperatura del horno fue mantenida a 40 °C durante 2 min y programada para aumentar en 4 °C/min hasta 240 °C, manteniéndose en esta última temperatura durante 15 min. El detector de masas escaneó en el rango 33-500 m/z a una velocidad de 1,1 scans/s. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros con los contenidos en la base de datos NIST98 del soporte informático Chem-Station Software (Agilent). Los resultados fueron expresados como abundancia relativa respecto del CI (porcentaje del área de pico del compuesto sobre la del CI). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

5.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 15.0. Se emplearon el análisis de la varianza (ANOVA) y el método test de Tukey para localizar diferencias significativas, estableciendo un intervalo de confianza del 95% ($P < 0,05$).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Crecimientos de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ panE en medios con diferente contenido en aminoácidos de cadena ramificada

La curva de crecimiento de la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953 y la de su mutante IFPL953 Δ panE en CDM con diferentes contenidos en BCAAs nos sirvieron para comparar la influencia de la inactivación del gen *panE* en el crecimiento de *L. lactis* en condiciones limitantes de BCAAs (Fig. 5.2). Estudios previos en nuestro laboratorio con las cepas de *L. lactis* nos indicaron una auxotrofia generalizada para valina y leucina, incluidas tanto la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953 como la cepa mutante *L. lactis* IFPL953 Δ panE (resultados no mostrados). Por ello, para la

realización de los experimentos se utilizaron CDMs con un contenido mínimo de estos aminoácidos que permitían el crecimiento de las cepas (0,033 g/l de valina y 0,0047 g/l de leucina en CDM-Val y CDM-Leu, respectivamente).

La ausencia de isoleucina y el contenido mínimo de valina o leucina repercutió en el crecimiento de *L. lactis*, como puede observarse al comparar los valores de DO_{480} en estas condiciones con los obtenidos en el CDM que contenía todos los aminoácidos (Fig. 5.2). De hecho, tanto en el crecimiento de la cepa silvestre (Fig. 5.2A) como en el de la cepa mutante (Fig. 5.2B), pudo observarse que el periodo de latencia en CDM control (≈ 3 h) fue marcadamente menor que en el resto de CDMs (≈ 6 h), evidenciándose la necesidad de adaptación de las cepas a cada una de las limitaciones de BCCAs encontradas. La densidad celular máxima de los cultivos también varió en función del medio de crecimiento y de la cepa: en el caso de la cepa silvestre osciló entre una DO_{480} de 1,9 para CDM-Leu y una DO_{480} de 2,6 para CDM control; y en la cepa mutante, varió entre una DO_{480} de 1,8 para CDM-Leu y de 2,1 para CDM. De forma análoga, la tasa de crecimiento máxima para las dos cepas fue obtenida con CDM control y la mínima con CDM-Leu, siendo prácticamente idéntica para CDM-Ile y CDM-Val (Tabla 5.3). En ambas cepas, los crecimientos en CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu provocaron un descenso significativo de la μ_{\max} con respecto al CDM completo.

Tabla 5.3. Tasa de crecimiento máxima [μ_{\max} (h^{-1})] calculada a partir de los datos de DO_{480} obtenidos durante el crecimiento de las cepas de *L. lactis* en diferentes medios de cultivo.

Cepa	Medio de cultivo	μ_{\max} (h^{-1})
<i>L. lactis</i> IFPL953	CDM (medio basal)	1,00 \pm 0,10
	CDM-Ile (sin isoleucina)	0,81 \pm 0,07
	CDM-Val (con contenido mínimo de valina)	0,83 \pm 0,10
	CDM-Leu (con contenido mínimo de leucina)	0,68 \pm 0,12
<i>L. lactis</i> IFPL953 Δ panE	CDM (medio basal)	0,86 \pm 0,10
	CDM-Ile (sin isoleucina)	0,65 \pm 0,10
	CDM-Val (con contenido mínimo de valina)	0,60 \pm 0,14
	CDM-Leu (con contenido mínimo de leucina)	0,47 \pm 0,11

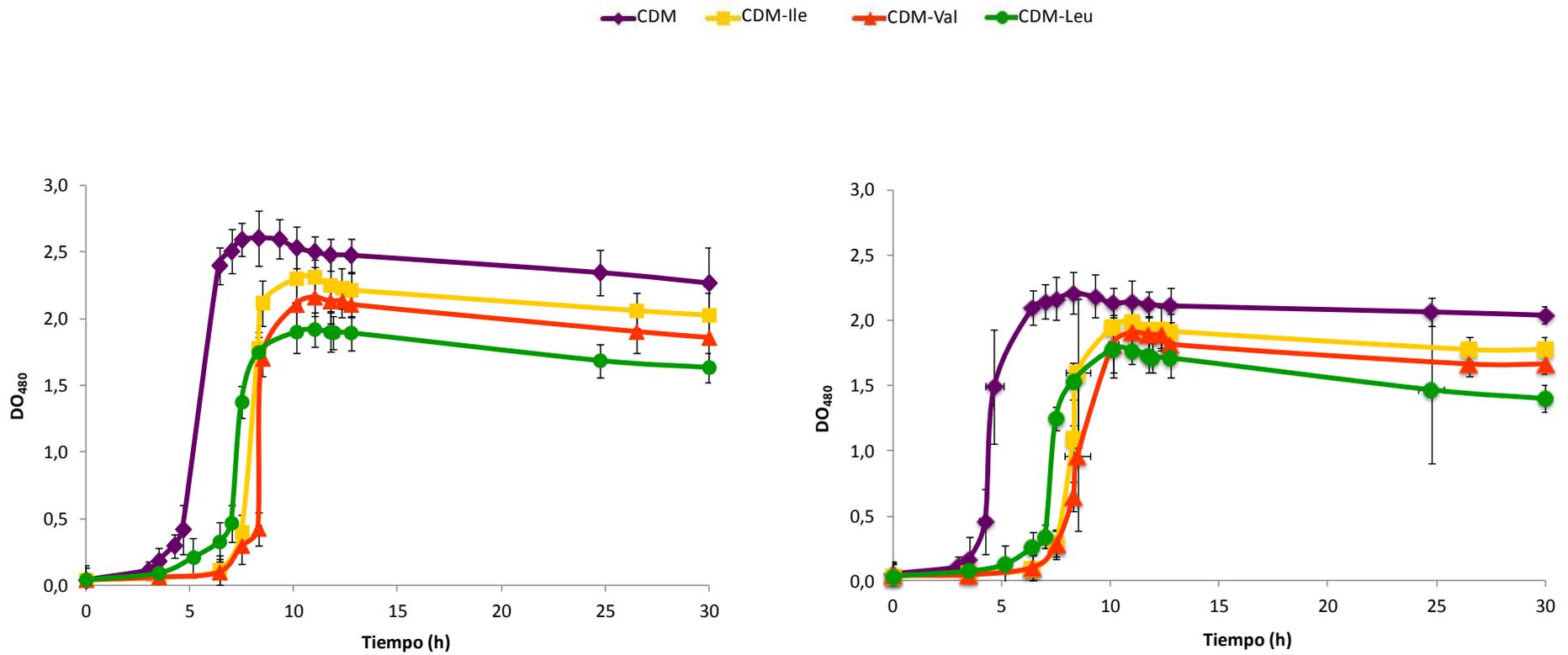


Figura 5.2. Curvas de crecimiento de *L. lactis* IFPL953 (A) e IFPL953 Δ panE (B) en diferentes medios químicamente definidos (CDM) basados en el contenido en aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs): CDM, todos los BCAA están presentes; CDM-Ile, la isoleucina está ausente; CDM-Val, el contenido de valina está reducido a un 10% del contenido basal; CDM-Leu, el contenido en leucina está reducido a un 1% del contenido basal. Las curvas fueron obtenidas a partir de 3 repeticiones biológicas.

De manera complementaria, se llevaron a cabo recuentos en placa para la determinación de viables durante el crecimiento de las cepas a diferentes tiempos de incubación (Tabla 5.4), que se correspondieron con aquellos en los que se realizaron los estudios de expresión génica. Es decir, inicio de la fase exponencial (Tiempo 1), final de la fase exponencial (Tiempo 2) y fase estacionaria tardía (Tiempo 3), e incluyendo los valores correspondientes al inicio del experimento (Tiempo 0). Los valores de los recuentos obtenidos fueron muy similares para todas las condiciones de crecimiento estudiadas, así como entre las dos cepas (Tabla 5.4). Por otro lado, los valores de pH de los cultivos se mantuvieron estables gracias a la utilización en los CDMs de tampón MOPS, siendo la variación máxima de los valores de pH durante todo el crecimiento de 0,5 (resultados no mostrados). Esta variación de pH se considera que no afectaría a los valores de expresión de los genes de interés.

Tabla 5.4. Recuentos en placa en varias etapas del crecimiento de las cepas de *L. lactis* en diferentes medios de cultivo.

Cepa	Recuentos en placa ^a (log UFC/mL)	TIEMPO ^b 0	TIEMPO 1	TIEMPO 2	TIEMPO 3
<i>L. lactis</i> IFPL953	CDM ^c	7,18 ± 0,02	8,37 ± 0,02	9,44 ± 0,04	9,66 ± 0,04
	CDM-Ile	7,26 ± 0,13	8,54 ± 0,08	9,29 ± 0,07	9,38 ± 0,10
	CDM-Val	7,27 ± 0,09	8,51 ± 0,10	9,48 ± 0,07	9,59 ± 0,07
	CDM-Leu	7,35 ± 0,13	8,62 ± 0,03	9,03 ± 0,21	9,21 ± 0,03
<i>L. lactis</i> IFPL953ΔpanE	CDM	7,16 ± 0,04	8,31 ± 0,01	9,41 ± 0,06	9,61 ± 0,04
	CDM-Ile	7,15 ± 0,12	8,43 ± 0,10	9,16 ± 0,09	9,37 ± 0,11
	CDM-Val	7,24 ± 0,08	8,38 ± 0,10	9,27 ± 0,07	9,37 ± 0,07
	CDM-Leu	7,33 ± 0,13	8,60 ± 0,06	9,09 ± 0,31	9,13 ± 0,03

^a Los valores representan el promedio ± desviación estándar procedente de 3 repeticiones biológicas.

^b Etapas del crecimiento: Tiempo 0, inicio del experimento; Tiempo 1, inicio fase exponencial; Tiempo 2, final fase exponencial; Tiempo 3, fase estacionaria.

^c Medios de cultivo: CDM, todos los BCAA están presentes; CDM-Ile, sin isoleucina; CDM-Val, contenido mínimo de valina (10%); CDM-Leu, contenido mínimo de leucina (1%).

5.3.2. Expresión relativa de los genes que codifican enzimas clave implicadas en el catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* IFPL953 e IFPL953Δ*panE*

5.3.2.1. Especificidad y eficiencia de los cebadores empleados en las reacciones qRT-PCR

Antes de iniciar el análisis de expresión de los genes *araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *ytjE* y *panE*, se llevó a cabo el estudio de especificidad y eficiencia de los cebadores diseñados para la amplificación de los transcritos de estos genes en las reacciones de qRT-PCR (Tabla 5.5). Mediante un gel de agarosa se confirmó que la longitud de los amplicones generados por PCR con cada pareja de cebadores a partir de ADNc de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953Δ*panE* presentaban los tamaños esperados (resultados no mostrados). Además, el análisis de las curvas de *melting* obtenidas por qRT-PCR para cada pareja de cebadores no reveló la formación de ningún fragmento inespecífico que interfiriera durante la lectura de fluorescencia.

Por otra parte, el análisis por qRT-PCR de diluciones decimales del ADNc procedente de una cantidad conocida de células a partir de un cultivo de *L. lactis* IFPL953 crecido en CDM generó rectas de calibrado para cada pareja de cebadores con valores de eficiencia en un rango de 1,78 a 1,96 (Tabla 5.5). Dadas las diferencias existentes entre los valores de eficiencia de los cebadores, para la evaluación de la expresión génica se empleó el método Pfaffl (Pfaffl, 2001). Este es el método de elección cuando las eficiencias de los cebadores empleados son diferentes a 2.

Tabla 5.5. Eficiencias obtenidas para las parejas de cebadores empleadas en qRT-PCR a partir del ARN de *L. lactis* IFPL953

Gen diana	Parejas de cebadores	Eficiencia de qRT-PCR ¹
<i>araT</i>	aratfor / aratrev	1,85
<i>bcaT</i>	bcatfor / bcatrev	1,96
<i>gdh</i>	gdhF2 / gdhR2	1,87
<i>kivD</i>	kivdfor / kivdrev	1,89
<i>panE</i>	panefor / panerev	1,87
<i>ytjE</i>	ytjefor / ytjerev	1,87
<i>tuf</i>	tuffor / tufrev	1,78

¹ Un valor de 2 equivale a una eficiencia del 100%.

5.3.2.2. Expresión relativa de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos durante el crecimiento de *L. lactis* en medios de cultivo con variaciones en la concentración de aminoácidos ramificados

El estudio del efecto de la variación en el contenido de BCAAs en el medio de crecimiento sobre la expresión de los genes *araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *ytjE* y *panE*, que codifican a las enzimas implicadas en el catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* (Fig. 5.1), se llevó a cabo mediante análisis de expresión génica por qRT-PCR.

Los resultados de expresión génica obtenidos durante el crecimiento de *L. lactis* IFPL953 y de *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* en los medios de cultivo con diversas carencias de BCAAs (CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu) fueron comparados con los del crecimiento en CDM con todos los aminoácidos (Fig. 5.3). Se analizaron muestras procedentes de diferentes etapas de crecimiento para estudiar la evolución de la expresión génica a través del tiempo: inicio de la fase exponencial (Tiempo 1), final de la fase exponencial (Tiempo 2) y fase estacionaria (Tiempo 3). En este sentido, se observó que la expresión relativa de todos los genes en estudio aumentó de forma generalizada en las dos cepas crecidas en CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu durante las etapas de crecimiento correspondientes a los Tiempos 2 y 3 (a partir del final de la fase exponencial), en comparación con los obtenidos en la primera etapa (Tiempo 1). Como era de esperar, no se detectó expresión del gen *panE* en la cepa mutante en ninguna etapa del crecimiento.

Durante el inicio de la fase exponencial, las diferencias de expresión de los genes encontradas entre el crecimiento en los CDMs con diferencias en el contenido en BCAAs y el CDM basal en las dos cepas fueron mínimas, salvo para los genes *bcaT*, *ytjE* y *gdh* de la cepa silvestre (Fig. 5.3A). Los valores de expresión relativa obtenidos para los genes *bcaT* y *ytjE* de la cepa silvestre al inicio de la fase logarítmica de crecimiento en CDM-Ile fueron significativamente superiores a los obtenidos en CDM-Val y CDM-Leu. Sin embargo, el gen *gdh* de la cepa silvestre fue el que presentó los ratios de expresión más elevados en esta fase de crecimiento, tanto ante concentraciones mínimas de valina como de leucina (Fig. 5.3A).

Al final de la fase exponencial de crecimiento (Fig. 5.3B), la expresión de los genes en estudio varió en función del medio de cultivo y de la cepa. Para los genes *araT* y *bcaT*, las dos cepas se comportaron de manera similar ante los distintos medios. Los valores de expresión relativa obtenidos para el gen *gdh* en CDM-Val y CDM-Leu fueron significativamente diferentes a los obtenidos en CDM-Ile en las dos cepas. En el caso de la cepa silvestre los ratios de expresión obtenidos para este gen fueron ligeramente superiores a los obtenidos en la cepa mutante, aunque

estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Al final de la fase exponencial de crecimiento, el gen *kivD* en la cepa mutante presentó valores de expresión superiores a los obtenidos con la cepa silvestre. En ambos casos se obtuvieron ratios de expresión significativamente mayores en las condiciones CDM-Ile y CDM-Val con respecto a la condición CDM-Leu. (Fig. 5.3B). Al comparar los ratios de expresión de *ytjE* pudimos observar que en la cepa silvestre no existieron diferencias entre los medios, sin embargo, la cepa IFPL953 Δ *panE* presentó niveles de expresión superiores a los de la cepa silvestre en todas las condiciones, siendo significativamente diferentes en CDM-Val ($2,77 \pm 0,90$ en la cepa mutante frente $0,78 \pm 0,63$ en la cepa silvestre) y CDM-Leu ($3,95 \pm 0,85$ en el mutante frente $0,38 \pm 0,40$ en la cepa silvestre).

Durante la fase estacionaria de crecimiento (Tiempo 3) se observó, en general, una mayor expresión relativa de los genes *kivD*, *ytjE* y *gdh* en la cepa mutante frente a la cepa silvestre (Fig. 5.3C), aunque se dieron algunas excepciones en determinados medios de crecimiento. El gen *gdh* en la cepa mutante fue el que presentó los ratios de expresión más elevados en esta fase de crecimiento, tanto en CDM-Ile como en CDM-Val, alcanzando valores de $21,87 \pm 1,78$ y $32,05 \pm 14,19$, respectivamente, e indicando una clara inducción del gen en ausencia o carencia de estos aminoácidos en el medio de crecimiento. La expresión del gen *gdh* en la cepa silvestre tuvo un comportamiento similar, aunque los ratios de expresión alcanzados fueron significativamente menores que en la cepa mutante (Fig. 5.3C). La expresión de los genes *araT* y *bcaT* en ambas cepas fue muy similar durante esta fase de crecimiento (Fig. 5.3C). Al comparar los ratios de expresión de estos genes obtenidos durante el crecimiento en CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu, solo se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de la cepa silvestre en CDM-Ile. Por el contrario, en CDM-Val y CDM-Leu, la cepa mutante presentó niveles de expresión mayores que los de la cepa silvestre, tanto de *araT* como de *bcaT*, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ante la carencia de leucina en el medio. Tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante, en la fase estacionaria de crecimiento se alcanzaron los mayores niveles de expresión del gen *kivD* en los tres medios (CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu). Los ratios de expresión relativa de *kivD* en esta fase de crecimiento tendieron a ser superiores en la cepa IFPL953 Δ *panE* que en la cepa silvestre (Fig. 5.3C).

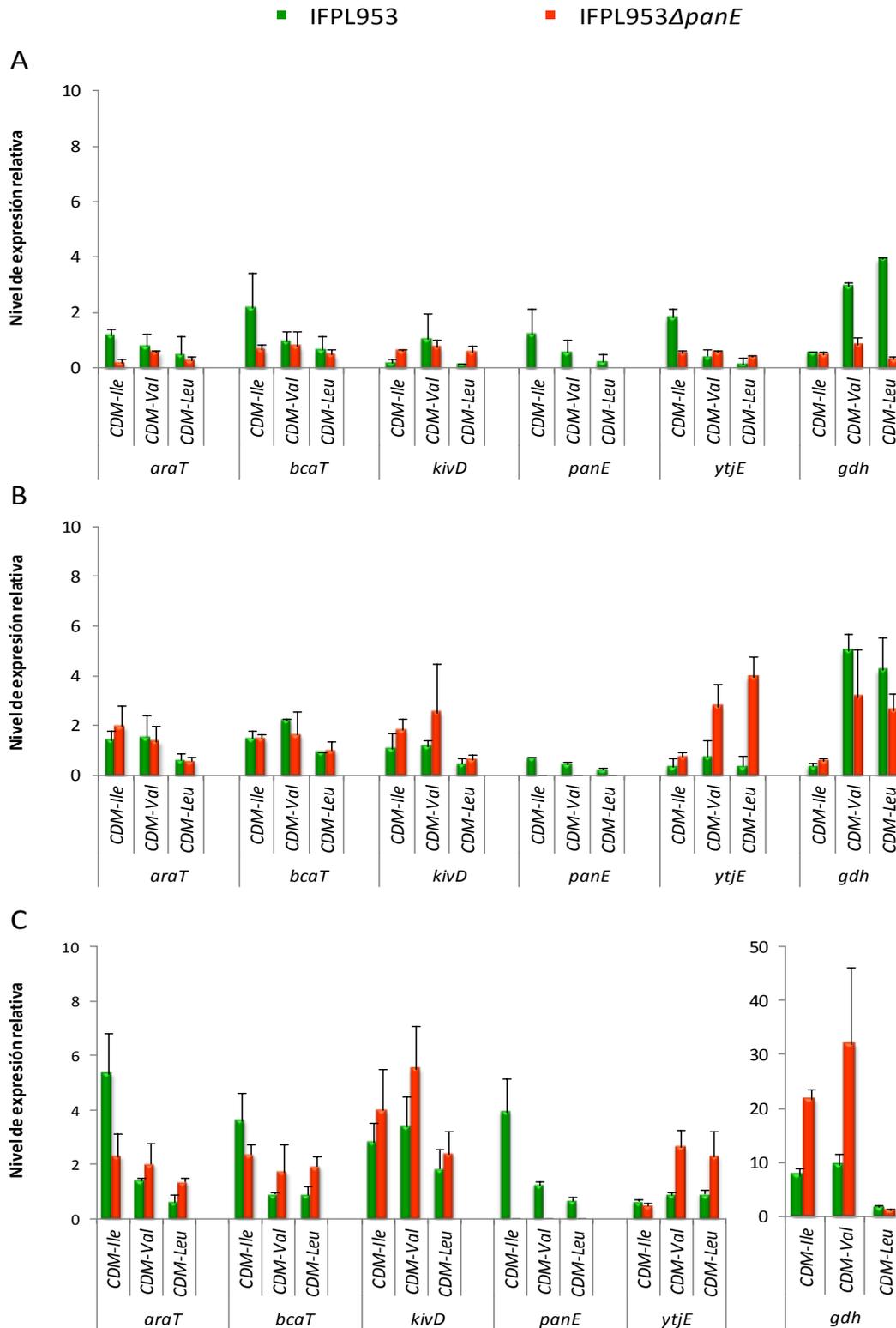


Figura 5.3. Comparación de los niveles de expresión relativa de varios genes en *L. lactis* IFPL953 (silvestre) y *L. lactis* IFPL953ΔpanE (mutante) crecidos en un medio químicamente definido (CDM) con diferencias en el contenido de aminoácidos ramificados (CDM-Ile, ausencia de isoleucina; CDM-Val, mínimo contenido de valina [10%]; CDM-Leu, mínimo contenido de leucina [1%]) y en distintas etapas de la curva de crecimiento: (A) Tiempo 1, inicio de fase logarítmica; (B) Tiempo 2, final de la fase logarítmica; (C) Tiempo 3, fase estacionaria. La condición de crecimiento en CDM basal fue definida como control para calcular los ratios. Los resultados obtenidos proceden de 3 repeticiones biológicas.

Los ratios de expresión relativa del gen *ytjE* en la fase estacionaria de crecimiento fueron equivalentes a los obtenidos al final de la fase logarítmica, observándose una inducción significativa del gen en el crecimiento de *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* en los medios CDM-Val y CDM-Leu (Fig. 5.3C).

Durante la fase estacionaria se pudo observar una clara inducción del gen *panE* en *L. lactis* IFPL953 en los tres medios con respecto a lo encontrado en las otras dos fases del crecimiento. Destaca el aumento de la expresión relativa del gen en CDM-Ile, donde se obtuvo un ratio de $3,93 \pm 1,2$.

5.3.2.3. Expresión relativa de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* en condiciones de incubación equivalentes a las de maduración del queso

Los resultados del efecto de la incubación de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* en condiciones similares a las de maduración del queso sobre la expresión de los genes *araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *ytjE* y *panE* se muestran en la Fig. 5.4. La expresión relativa de los genes se analizó comparando la incubación de las cepas en los medios con alguna de las variables características del proceso de maduración en queso (CDM-SinAz, CDM-Lac, CDM-NaCl, CDM-pH y CDM-T) con la incubación en condiciones óptimas. Como era de esperar, no se detectó expresión del gen *panE* en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* bajo ninguna de las condiciones estudiadas.

Tras el análisis del efecto en la expresión génica de cada una de las variables de forma independiente (ausencia de azúcar, 0,2% de lactosa como fuente de carbono, salinidad al 4,5%, pH 5,4 y 12 °C de T de incubación), se pudo observar que la condición que provocó un mayor aumento en la expresión relativa de los genes estudiados fue la ausencia de azúcar en el medio de incubación (Fig. 5.4). En este sentido, *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* presentó generalmente valores de expresión génica mayores que *L. lactis* IFPL953, encontrándose la mayor diferencia en la expresión de *gdh* ($9,80 \pm 3,21$ frente a $4,11 \pm 0,15$). Por otro lado, los ratios de expresión de *gdh* tras la incubación de las cepas de *L. lactis* en CDM-NaCl y CDM-pH indicaron que en la cepa mutante el gen se encontraba reprimido, observándose cierta inducción del mismo en CDM-T además de lo ya comentado para CDM-SinAz (Fig. 5.4).

De los resultados obtenidos de expresión génica en condiciones de maduración del queso, se destacan también los elevados valores de expresión relativa del gen *kivD* tras la incubación de las cepas en CDM-SinAz ($8,92 \pm 4,93$ en

la cepa mutante y $7,79 \pm 0,23$ en la cepa silvestre). También se observó cierta expresión de *kivD* tras la incubación en CDM-NaCl y en CDM-pH (Fig. 5.4.).

La expresión del gen *ytjE* también fue superior en condiciones de ausencia de azúcar en el medio de incubación, encontrándose valores algo superiores de expresión relativa en la cepa silvestre en comparación con la cepa mutante. También se observó mayor expresión de *ytjE* en CDM-NaCl en la cepa silvestre en comparación al detectado en la cepa mutante (Fig. 5.4).

La evaluación del efecto en conjunto de las condiciones de maduración del queso en la expresión de genes relacionados con el catabolismo de aminoácidos en *L. lactis*, se realizó tras la incubación a 12 °C durante 24 h y 7 días de las cepas silvestre y mutante en CDM-Mad(L) y CDM-Mad. Las muestras se compararon con las obtenidas tras la incubación de las cepas durante los mismos tiempos a 30 °C en CDM basal. En términos generales, transcurridos los 7 días de incubación se pudo observar una disminución de la expresión relativa de los genes (Fig. 5.5). A las 24 h de incubación, los genes *araT*, *bcaT*, *gdh* y *kivD* en la cepa silvestre estaban inducidos en CDM-Mad (Fig. 5.5A), y en el caso de la cepa mutante pudimos observar que *araT*, *gdh* y *kivD* estaban inducidos tanto en CDM-Mad(L) como en CDM-Mad (Fig. 5.5B). Los mayores niveles de expresión en condiciones de maduración de queso se obtuvieron para los genes *kivD* en las dos cepas y *gdh* en la cepa mutante (Fig. 5.5). De hecho, la expresión de *gdh* en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* aumentó durante la incubación, siendo significativamente superior a la de la cepa silvestre. En general, se obtuvieron mayores valores de expresión de los genes en ausencia de azúcar en el medio de incubación que con 0,2% de lactosa.

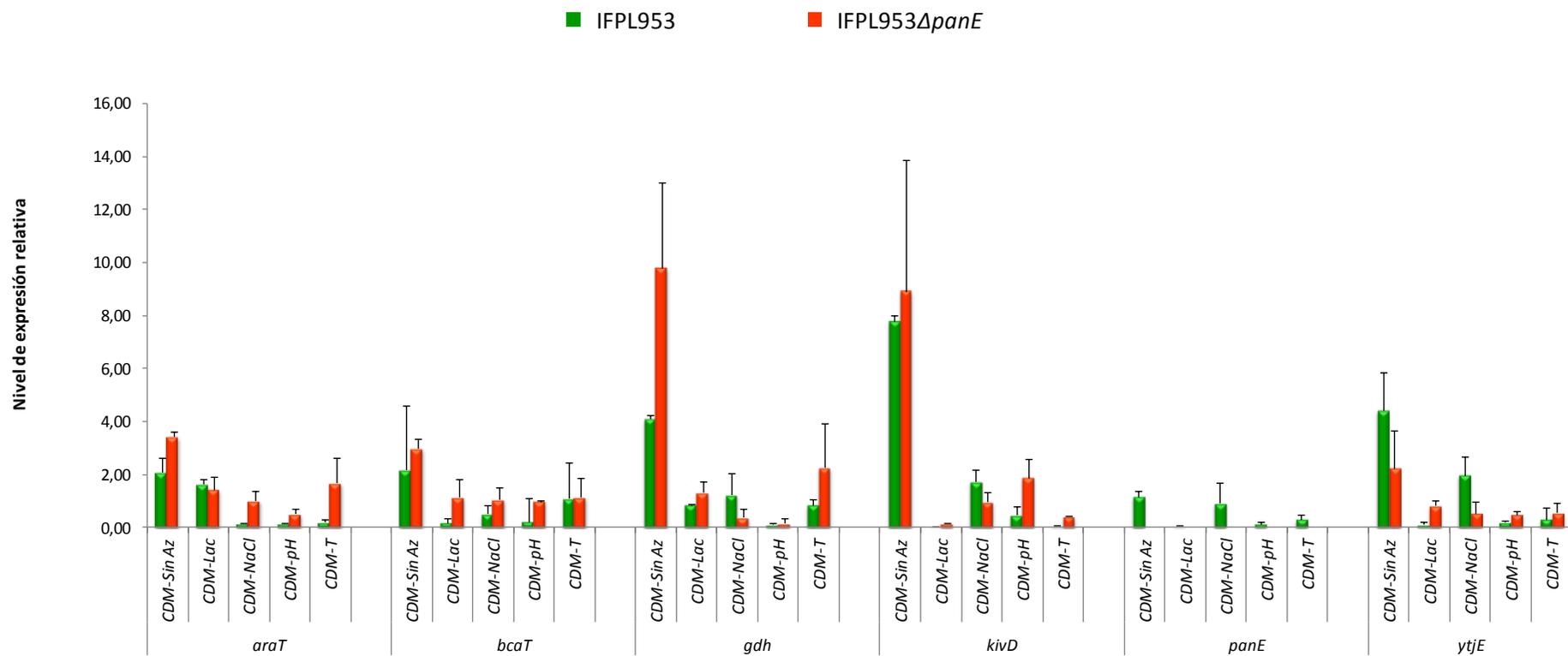


Figura 5.4. Comparación de los niveles de expresión relativa de varios genes en *L. lactis* IFPL953 (silvestre) y *L. lactis* IFPL953ΔpanE (mutante) incubados en un medio químicamente definido (CDM) con condiciones presentes en la maduración del queso: CDM-SinAz, sin azúcar; CDM-Lac, con 0,2% de lactosa; CDM-NaCl, suplementado con 4,5% (p/v) de NaCl; CDM-pH, valor de pH 5,4 y CDM-T, incubación a 12 °C. La condición de crecimiento en CDM fue definida como control para calcular los ratios. Los resultados obtenidos proceden de tres incubaciones independientes.

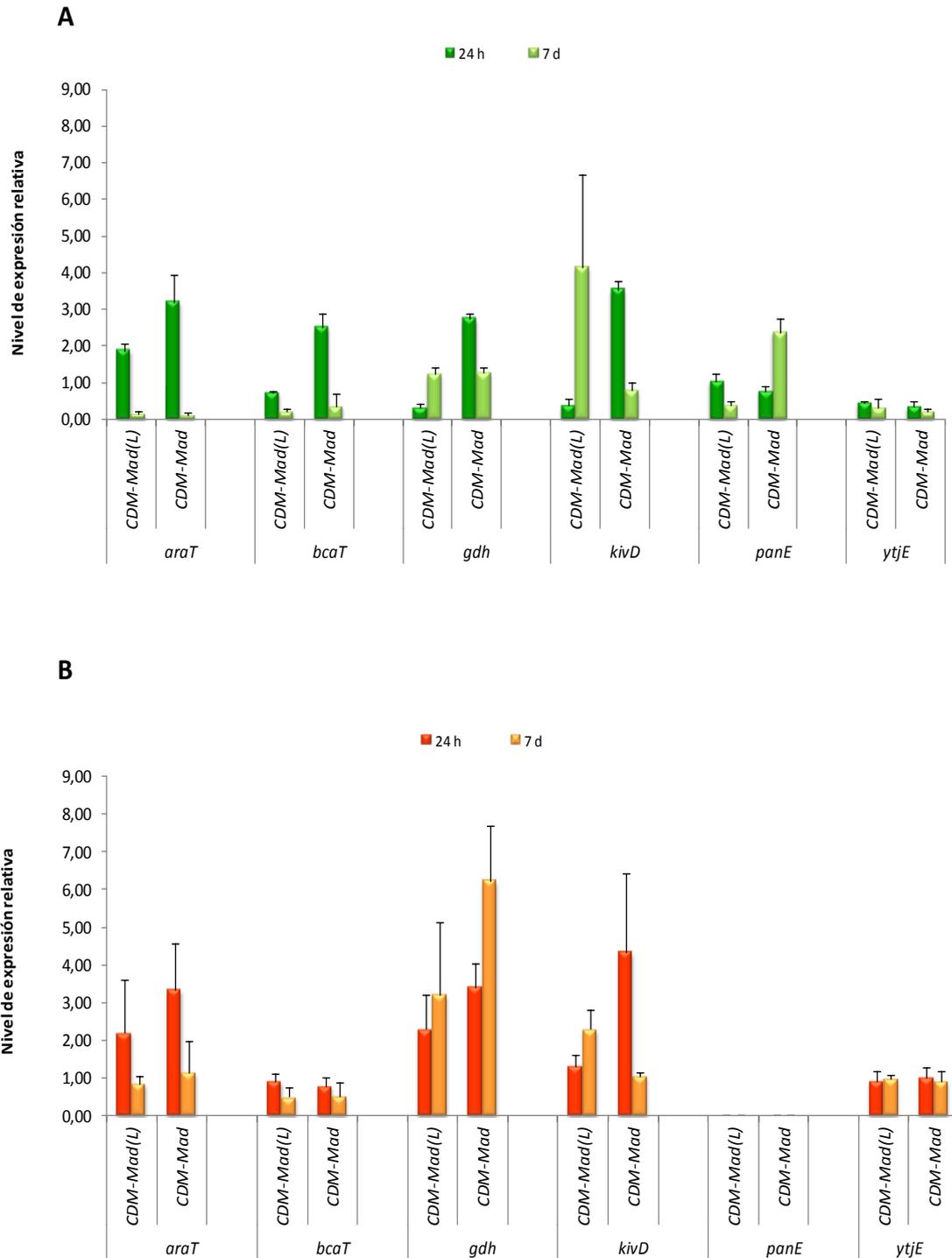


Figura 5.5. Comparación de los niveles de expresión relativa de varios genes en *L. lactis* IFPL953 (A) y *L. lactis* IFPL953 Δ panE (B) incubados a 12 °C durante 24 h y 7 d en un medio químicamente definido (CDM) en condiciones que simulan la maduración del queso. CDM-Mad(L), CDM a pH 5,4, suplementado con 4,5% de NaCl, con 0,2% de lactosa; CDM-Mad, iguales condiciones pero con ausencia de azúcar. La condición de incubación a 30 °C en CDM basal fue definida como control para calcular los ratios. Los resultados obtenidos proceden de tres incubaciones independientes.

5.3.3. Análisis de compuestos volátiles producidos por *L. lactis* en diferentes condiciones de incubación

5.3.3.1. Comparación de los compuestos volátiles producidos por *L. lactis* IFPL953 frente a los producidos por IFPL953 Δ panE en medios de cultivo con variaciones en la concentración de aminoácidos ramificados

El análisis por SPME-GC-MS permitió la identificación de compuestos orgánicos volátiles (COV) generados durante 30 h de crecimiento (fase estacionaria, Tiempo 3) de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ panE en diferentes medios de cultivo (CDM basal, CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu). En la Tabla 5.6 se muestran algunos de los compuestos más relevantes dentro de la diversidad encontrada para los distintos grupos. El crecimiento en las diferentes condiciones se vio reflejado con cambios en los compuestos detectados. En este sentido, el número de COVs producidos por *L. lactis* en los diferentes CDMs fue variable, dependiendo de la cepa y del medio de cultivo. En términos generales, la cepa mutante IFPL953 Δ panE dio lugar a un mayor número de COVs que la cepa silvestre IFPL953. El ácido α -cetoisocaproato (KIC), resultante de la transaminación de la leucina y sustrato preferente de la Hid-DH, solo se detectó en la cepa mutante en los medios CDM basal, CDM-Ile y CDM-Val, siendo los valores ligeramente superiores en CDM-Ile. Ambas cepas produjeron ácido α -cetopropiónico (piruvato), aunque la cepa mutante produjo cantidades significativamente superiores en el medio CDM basal. También se detectaron otros ácidos como el propanoico y el succínico, siendo las abundancias relativas del primero de ellos significativamente superiores en todos los medios crecidos con la cepa mutante, salvo en CDM-Leu donde la producción de la cepa silvestre fue significativamente superior. En cuanto al ácido succínico, solo se detectó tras el crecimiento de la cepa mutante, siendo muy superior su producción en CDM-Val.

El aldehído 2-metilbutanal, que proviene de la isoleucina, sólo fue identificado en los cultivos en CDM basal y CDM-Leu, y en ambos casos las abundancias relativas obtenidas tras el crecimiento de la cepa mutante fueron significativamente superiores a las obtenidas con la cepa silvestre, sobre todo en CDM-Leu ($20,10 \pm 4,14$ frente a $8,67 \pm 1,94$). Por otra parte, el compuesto 3-metilbutanal, que proviene de la leucina, fue producido abundantemente por las dos cepas de *L. lactis* en todos los CDMs, excepto en CDM-Leu, donde no fue detectado. En todos los casos, se detectó la mayor cantidad de 3-metilbutanal tras

el crecimiento de la cepa mutante, sobre todo durante el crecimiento en CDM-Val, donde la abundancia de este compuesto durante el crecimiento de IFPL953 Δ panE fue alrededor del doble de la obtenida con la cepa silvestre ($60,76 \pm 8,08$ frente a $29,74 \pm 1,41$). Otros aldehídos detectados fueron el benzaldehído y el palmitaldehído, este último solo detectado tras el crecimiento de la cepa silvestre en CDM basal (Tabla 5.6). El benzaldehído deriva del aminoácido aromático fenilalanina, y fue generado durante el cultivo de ambas cepas en todos los CDMs. Su abundancia relativa fue significativamente superior tras el crecimiento de la cepa mutante en CDM y en CDM-Val, y por el contrario, en CDM-Ile la cepa silvestre produjo una mayor cantidad de benzaldehído (Tabla 5.6).

Entre los alcoholes que se detectaron en los cultivos de *L. lactis* en los diferentes CDMs, cabe destacar la formación del 2-metilbutanol y el 3-metilbutanol, generados tras la reducción del 2-metilbutanal y 3-metilbutanal, respectivamente (Tabla 5.6). La cepa silvestre IFPL953 solo produjo 2-metilbutanol en CDM-Leu, y con una abundancia relativa muy inferior a la detectada en ese medio con la cepa mutante. El cultivo de la cepa IFPL953 Δ panE en CDM y CDM-Val también dio lugar a la formación del 2-metilbutanol pero con unas abundancias inferiores a las detectadas en CDM-Leu. El 3-metilbutanol se detectó en todos los cultivos excepto en CDM-Leu; al igual que ocurría con su correspondiente aldehído, el 3-metilbutanal, la abundancia del 3-metilbutanol durante el crecimiento de la cepa mutante fue más alta que la obtenida tras el crecimiento de la cepa silvestre. En este caso, la mayor cantidad de 3-metilbutanol se detectó en CDM-Ile ($32,58 \pm 5,60$), aunque del mismo modo que con el 3-metilbutanal, las diferencias de producción de estos compuestos entre el crecimiento de IFPL953 Δ panE en CDM-Ile y CDM-Val no fueron estadísticamente significativas. Otros de los alcoholes detectados fueron el 2-etil-1-hexanol, el 1-nonanol y el 2-hexanol, este último detectado en gran abundancia tras el crecimiento de la cepa mutante en CDM basal (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Principales compuestos volátiles detectados mediante SPME-GC-MS tras 30 horas de crecimiento de *L. lactis* IFPL953 (silvestre) e IFPL953 Δ panE (mutante) crecidos en un medio químicamente definido (CDM) con diferencias en el contenido de aminoácidos (CDM-Ile, en ausencia de isoleucina; CDM-Val, mínimo contenido de valina [10%]; CDM-Leu, mínimo contenido de leucina [1%]).

Compuesto	CDM		CDM-Ile		CDM-Val		CDM-Leu	
	IFPL953	IFPL953 Δ panE						
<i>Ácidos</i>								
α -Cetopropiónico	5,81 \pm 1,30	12,49 \pm 2,15*	0,48 \pm 0,18	1,33 \pm 0,39*	-	1,89 \pm 0,26*	-	-
Propanoico	2,45 \pm 1,01	8,78 \pm 0,96*	1,24 \pm 0,26	5,54 \pm 1,42*	-	4,21 \pm 201*	27,80 \pm 3,60*	20,48 \pm 2,40
α -Cetoisocaproato	-	38,08 \pm 7,12*	-	45,63 \pm 5,38*	-	42,62 \pm 6,31*	-	-
Succínico	-	13,15 \pm 1,73*	-	12,59 \pm 2,78*	-	35,52 \pm 2,87*	-	10,46 \pm 1,65*
<i>Aldehídos</i>								
Benzaldehído	10,38 \pm 3,11	21,18 \pm 3,41*	15,56 \pm 5,23*	1,46 \pm 0,65	30,62 \pm 7,19	52,59 \pm 6,45*	27,51 \pm 5,18	31,32 \pm 5,73
2-Metilbutanal	5,28 \pm 1,05	10,10 \pm 2,15*	-	-	-	-	1,67 \pm 0,94	20,10 \pm 4,14*
3-Metilbutanal	23,43 \pm 1,74	30,13 \pm 5,02	46,38 \pm 6,34	54,12 \pm 8,62	29,74 \pm 1,41	60,76 \pm 8,08*	-	-
Palmitaldehído	10,31 \pm 1,44*	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcoholes</i>								
2-Etil-1-hexanol	2,27 \pm 0,77	12,24 \pm 1,73*	-	-	-	-	-	-
2-Metilbutanol	-	10,52 \pm 1,74*	-	-	-	3,22 \pm 0,31*	6,73 \pm 1,67	17,74 \pm 2,51*
3-Metilbutanol	10,49 \pm 2,15	17,94 \pm 1,17*	15,24 \pm 1,32	32,58 \pm 5,60*	18,35 \pm 2,07	29,10 \pm 3,81*	-	-
2-Hexanol	5,24 \pm 1,58	50,07 \pm 5,38*	-	-	-	-	-	-
1-Nonanol	10,11 \pm 3,15	9,78 \pm 0,87	-	-	-	13,17 \pm 1,86*	-	12,92 \pm 1,30*
<i>Ésteres</i>								
Vinilacetato	-	-	-	-	-	-	-	6,17 \pm 1,23*
<i>Cetonas</i>								
Acetona	13,29 \pm 2,52	17,86 \pm 2,63	22,91 \pm 1,61	31,61 \pm 3,10*	14,40 1,43	21,53 \pm 2,63*	12,13 \pm 1,84	16,08 \pm 2,27*
2-Butanona	30,18 \pm 0,52	45,52 \pm 2,87*	-	10,32 \pm 1,60*	2,61 \pm 0,38	14,54 \pm 1,78*	2,71 \pm 0,19	10,24 \pm 1,09*
Diacetilo	2,60 \pm 0,46	3,00 \pm 0,57	-	-	2,78 \pm 0,44	4,04 \pm 0,43*	2,89 \pm 0,71	6,39 \pm 1,90*
4, 6-Dimetilheptanona	24,21 \pm 7,00	28,35 \pm 3,10	-	35,73 \pm 1,90*	25,12 \pm 5,71	28,55 \pm 5,82	20,09 \pm 6,13	20,16 \pm 2,14
2-Heptanona	-	12,16 \pm 1,72*	-	17,45 \pm 2,47*	-	-	-	-
2-Metil-5-hexanona	21,98 \pm 4,60	26,54 \pm 1,78	16,51 \pm 2,72	17,78 \pm 1,50	15,19 \pm 1,03	14,20 \pm 1,58	-	-
4-Metil-2-pentanona	18,99 \pm 1,40	26,49 \pm 2,61	10,56 \pm 2,62	12,15 \pm 4,60	18,43 \pm 2,36	28,49 \pm 3,70*	11,43 \pm 1,33	20,64 \pm 2,41
4-Metil-2-hepatnona	8,44 \pm 5,13	10,89 \pm 2,95	15,20 \pm 3,28	18,38 \pm 2,60	10,17 \pm 2,24	15,94 \pm 2,25	16,15 \pm 3,21	13,74 \pm 1,94
2-Pentanona	-	21,34 \pm 1,89*	-	21,66 \pm 1,78*	-	19,19 \pm 1,98*	-	14,79 \pm 1,35*
2,3-Pentanediona	-	20,28 \pm 1,87*	-	-	-	-	-	12,31 \pm 1,43*
2-Nonanona	10,35 \pm 1,14	15,54 \pm 3,05	-	22,21 \pm 3,14*	-	-	-	-
<i>Otros</i>								
Aminobenceno	-	31,96 \pm 4,52*	22,67 \pm 0,95	25,04 \pm 3,54	11,16 \pm 2,32*	-	12,22 \pm 0,31*	-
Tolueno	2,28 \pm 0,93*	-	1,11 \pm 0,71*	-	-	-	-	-

¹Los valores representan la abundancia relativa (%) respecto al control interno (4-metil-2-pentanol) procedentes de 3 repeticiones biológicas (media \pm desviación típica). -, No detectado. *, Diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el contenido de los compuestos producidos por IFPL953 y el de IFPL953 Δ panE.

En relación a las cetonas detectadas tras el crecimiento de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* en CDMs, es destacable que fue el grupo de COVs mayoritario producido por las dos cepas (Tabla 5.6). En general, la formación de cetonas fue superior por la cepa mutante que por la silvestre y en algunos compuestos, como la 2-heptanona, la 2-nonanona y la 2,3-pentanediona, solo se detectaron tras el crecimiento de la cepa mutante. La 2,3-pentanediona deriva del α -aceto- α -hidroxibutirato (un intermediario de la biosíntesis de isoleucina), y mostró una abundancia significativamente mayor en CDM que en CDM-Leu (Tabla 5.6).

Otros compuestos detectados fueron el aminobenceno y el tolueno. El tolueno es un compuesto fenólico relacionado con aromas almendrados en quesos tipo Cheddar, y apareció de forma aislada en los cultivos de CDM y CDM-Ile de IFPL953 (Tabla 5.6).

5.3.3.2. Análisis de compuestos volátiles producidos durante la incubación de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* en condiciones de incubación que simulan la maduración del queso

La incubación de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* variando condiciones relacionadas con el proceso de maduración del queso (CDM-pH, CDM-NaCl, CDM-T, CDM-Lac y CDM-SinAz) dio lugar a la formación de un amplio rango de COVs que se analizaron mediante SPME-GS-MS (Tabla 5.7). Al igual que ocurría en el análisis de la expresión de las enzimas del catabolismo de aminoácidos, en estas condiciones ambas cepas tuvieron comportamientos similares y la falta de azúcar en el medio fue la condición que dio lugar a cantidades superiores de COVs. Aún así, en términos generales, la cepa mutante IFPL953 Δ *panE* dio lugar a un mayor contenido de COVs que la cepa silvestre IFPL953.

Tras la incubación de ambas cepas en los distintos CDMs, los aldehídos que se detectaron en mayor abundancia fueron benzaldehído, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal (Tabla 5.7). El 2-metilbutanal fue detectado solamente en los medios CDM-NaCl y CDM-SinAz, siendo significativamente superior la abundancia relativa encontrada tras la incubación de la cepa mutante en CDM-SinAz. En lo referente al 3-metilbutanal, su abundancia relativa en CDM-SinAz fue muy superior ($P < 0,05$) a la obtenida en los otros medios. Cabe destacar que la cepa mutante produjo una cantidad superior de este compuesto ($52,32 \pm 3,57$) frente al valor obtenido con la cepa silvestre ($37,48 \pm 0,39$). El benzaldehído, relacionado con notas florales en el aroma del queso, fue uno de los compuestos más abundantes entre los producidos

por las dos cepas (Tabla 5.7). La producción de hexanal o caproaldehído, relacionado con olores herbáceos, sólo se detectó tras la incubación de la cepa mutante en CDM-pH y CDM-NaCl y puede resultar de la β -oxidación de ácidos grasos (Collomb y Spahni, 1996).

La incubación de *L. lactis* en los diferentes medios dio lugar a la producción de los alcoholes 2-metilpropanol, 2-metilbutanol y 3-metilbutanol (Tabla 5.7), derivados del catabolismo de valina, isoleucina y leucina, respectivamente. En CDM-SinAz se obtuvieron las mayores abundancias relativas de 2-metilpropanol y 2-metilbutanol con ambas cepas. En ambos compuestos, se obtuvieron cantidades superiores con IFPL953 Δ panE que con la cepa silvestre (Tabla 5.7). El 3-metilbutanol fue detectado mayoritariamente en el medio CDM-Lac, siendo superior la producción de este compuesto por la cepa mutante (72,12 \pm 2,14) frente al producido por IFPL953 (60,69 \pm 4,29). Tal y como puede observarse en la Tabla 5.7, también se detectaron otros alcoholes, algunos con un comportamiento similar en ambas cepas, como el 2-metil-2-octanol, y otros como el 1-nonanol que solo apareció tras la incubación con IFPL953 Δ panE.

Además del 3-metilbutanal y el 3-metilbutanol, se detectó otro compuesto derivado del catabolismo de la leucina, el éster 3-metilbutil acetato. Al igual que se observó con el 3-metilbutanol, la mayor producción de este compuesto por *L. lactis* se detectó en CDM-Lac y fue superior en la cepa mutante que en la silvestre (Tabla 5.7).

En el grupo de las cetonas, se destacan la 3-hidroxi-2-butanona (acetoina) y la 4, 6-dimetilheptanona por presentar niveles de abundancia relativa elevados, sobre todo en CDM-pH y CDM-SinAz (Tabla 5.7.). La formación de diacetilo fue superior ($P < 0,05$) en CDM-pH, mientras que otras cetonas se produjeron en mayor cantidad en CDM-SinAz. La producción de cetonas en general fue superior en IFPL953 Δ panE, dando lugar también a una mayor diversidad de estos compuestos.

Tabla 5.7. Principales compuestos volátiles detectados mediante SPME-GC-MS tras la incubación de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ panE en medio químicamente definido (CDM), ajustado a pH 5,5 (CDM-pH), con NaCl al 4,5% (CDM-NaCl), incubado a 12 °C (CDM-T), con lactosa al 0,2% (v/v) (CDM-Lac) y sin fuente de carbono (CDM-SinAz).

Compuesto ¹	IFPL953						IFPL953 Δ panE					
	CDM	CDM-SinAz	CDM-Lac	CDM-NaCl	CDM-pH	CDM-T	CDM	CDM-SinAz	CDM-Lac	CDM-NaCl	CDM-pH	CDM-T
Benzaldehído	47,87 ± 5,44	84,34 ± 1,54 ^a	21,85 ± 0,61	66,17 ± 8,30	15,75 ± 0,90	25,56 ± 0,33	34,23 ± 1,88	103,72 ± 10,23 ^{a,b}	29,12 ± 0,21	46,69 ± 3,00	22,12 ± 0,92	24,22 ± 0,81
Hexanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,86 ± 0,94	8,43 ± 0,50	-
2-Metilbutanal	-	4,25 ± 0,64 ^a	-	1,10 ± 0,25	-	-	-	6,46 ± 0,97 ^{a,b}	-	1,54 ± 0,38	-	-
3-Metilbutanal	6,65 ± 0,86	37,48 ± 0,39 ^a	4,31 ± 0,57	3,26 ± 0,91	2,28 ± 0,75	-	20,27 ± 1,10	52,32 ± 3,57 ^{a,b}	-	20,39 ± 1,87	31,28 ± 2,10	20,01 ± 3,13
1,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	1,02 ± 0,58	-	-	-
1-Hexanol	1,20 ± 0,27	-	4,47 ± 0,69	4,51 ± 0,56	-	4,36 ± 0,78	20,25 ± 2,29	-	-	-	35,14 ± 2,76 ^b	28,82 ± 2,01
2, 4-Dimetilpentanol	0,77 ± 0,17	10,20 ± 1,21	-	11,63 ± 0,98	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Metilbutanol	-	14,76 ± 5,31	-	9,69 ± 1,56	3,49 ± 0,29	-	-	23,35 ± 3,94 ^a	-	2,99 ± 0,68	4,96 ± 0,59	-
2-Metilpropanol	-	30,90 ± 1,79 ^a	7,83 ± 1,02	4,19 ± 0,98	4,56 ± 0,87	19,69 ± 0,42	1,01 ± 0,57	32,23 ± 1,05 ^a	17,54 ± 1,04	1,10 ± 0,61	1,15 ± 0,46	16,42 ± 1,06
3-Metilbutanol	-	-	60,69 ± 4,29 ^a	34,89 ± 0,92	16,01 ± 2,42	20,35 ± 0,78	16,24 ± 1,76	-	72,12 ± 2,14 ^{a,b}	35,12 ± 1,45	40,59 ± 2,41	21,79 ± 2,30
3-Metoxibutanol	-	-	1,28 ± 0,51	2,88 ± 0,30	12,34 ± 1,20 ^{a,b}	-	-	-	-	-	-	-
2-Metil-2-octanol	11,25 ± 0,58	67,31 ± 1,64 ^a	18,80 ± 1,08	10,21 ± 1,02	43,38 ± 3,86	17,23 ± 0,85	10,74 ± 1,54	70,83 ± 3,00 ^a	54,20 ± 2,75	16,93 ± 1,87	26,78 ± 2,92	15,78 ± 1,31
1-Nonanol	-	-	-	-	-	-	4,56 ± 0,64	-	11,48 ± 1,32 ^{a,b}	8,86 ± 0,90	7,44 ± 1,02	5,97 ± 1,03
4-Metil-2-pentil acetato	-	-	9,25 ± 1,25 ^{a,b}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Metilbutil acetato	1,56 ± 0,31	-	9,25 ± 1,98 ^a	-	-	-	3,39 ± 0,48	-	12,67 ± 1,46 ^a	-	-	-
Acetona	-	-	-	-	-	-	15,20 ± 0,90	14,84 ± 0,57	15,43 ± 0,41	17,70 ± 0,38 ^b	12,82 ± 0,10	15,66 ± 0,84
Acetoína	12,64 ± 0,75	-	26,89 ± 1,36	5,91 ± 0,58	120,56 ± 5,13 ^a	19,38 ± 0,75	9,95 ± 0,31	-	31,20 ± 1,06	8,62 ± 1,23	190,63 ± 9,40 ^{a,b}	18,93 ± 1,32
2-Butanona	-	-	-	-	-	-	1,82 ± 0,97	1,79 ± 0,84	2,51 ± 1,02 ^b	2,49 ± 0,98	-	-
Diacetilo	9,13 ± 0,33	-	12,54 ± 1,08	3,57 ± 0,9	50,75 ± 1,15 ^a	7,41 ± 0,14	4,54 ± 1,55	-	-	3,70 ± 0,22	70,12 ± 1,13 ^{a,b}	6,22 ± 0,39
4-Butoxi-2-butanona	-	19,06 ± 1,48	-	-	18,75 ± 1,52	-	-	22,15 ± 1,06 ^b	-	-	21,15 ± 1,20	-
2-Hexanona	-	27,75 ± 0,40 ^{a,b}	3,23 ± 0,96	-	20,78 ± 0,98	-	-	-	-	-	21,52 ± 0,21 ^a	-
2-Heptanona	1,79 ± 0,21	-	-	-	-	3,15 ± 0,50 ^a	3,35 ± 0,98	3,48 ± 0,76	-	-	2,81 ± 0,57	2,09 ± 0,32
2-Pentanona	3,42 ± 0,26	51,74 ± 9,69	6,55 ± 0,48	3,94 ± 0,24	55,82 ± 5,47	5,56 ± 0,8	40,33 ± 1,56	40,43 ± 1,27	50,44 ± 1,19	40,59 ± 2,18	50,55 ± 3,57	50,20 ± 2,44
2,3-Pentanediona	-	50,95 ± 6,89	54,78 ± 5,74	-	-	-	-	86,72 ± 3,98 ^b	85,22 ± 3,06	-	-	-
4,6- Dimetilheptanona	8,75 ± 0,37	129,99 ± 2,41 ^a	13,49 ± 0,31	7,99 ± 0,32	86,08 ± 1,60	10,36 ± 0,54	9,45 ± 0,29	129,12 ± 3,94 ^a	11,76 ± 0,31	12,14 ± 0,27	86,01 ± 0,75	9,25 ± 0,40
4-Metil-2-heptanona	-	44,76 ± 1,41 ^a	16,74 ± 1,41	26,85 ± 4,32	19,14 ± 2,54	30,90 ± 2,68	19,26 ± 2,72	78,26 ± 1,14 ^{a,b}	29,26 ± 3,29	24,70 ± 1,10	33,13 ± 1,40	-
4-Metil-2-hexanona	-	-	-	-	-	-	3,31 ± 0,30	-	-	-	2,13 ± 0,87	9,82 ± 2,47 ^{a,b}
4-Metil-2-pentanona	-	-	-	-	-	-	45,83 ± 4,47	50,66 ± 4,87	50,34 ± 4,80	51,66 ± 4,44	42,52 ± 3,44	53,22 ± 4,68 ^b
4-Metil-3-penten-2-ona	-	-	-	-	-	-	-	11,56 ± 1,03 ^{a,b}	7,54 ± 0,87	3,58 ± 0,54	-	-
2-Nonanona	8,22 ± 1,08	37,41 ± 2,31 ^a	23,71 ± 1,61	22,54 ± 1,23	24,14 ± 1,56	5,23 ± 0,87	25,31 ± 1,88	59,64 ± 1,28 ^{a,b}	31,63 ± 1,06	40,34 ± 2,59	48,10 ± 1,32	32,58 ± 1,15
Tolueno	-	-	4,15 ± 0,78	-	32,66 ± 5,98 ^a	-	-	-	-	-	45,84 ± 5,69 ^{a,b}	-

¹Los valores representan la abundancia relativa (%) respecto al control interno (4-metil-2-pentanol) procedentes de 3 repeticiones biológicas (media ± desviación típica). -, No detectado; ^adiferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de los compuestos producidos por cada cepa entre los distintos medios; ^bdiferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de los compuestos producidos por IFPL953 frente a los producidos por IFPL953 Δ panE en los distintos medios.

Durante este estudio, también se comprobó la producción de COVs por las cepas de *L. lactis* cuando se combinaron las condiciones de maduración del queso, es decir, tras la incubación a 12 °C durante 24 h y 7 días de las cepas silvestre y mutante en CDM-Mad(L) y CDM-Mad (Tabla 5.8). La producción de COVs por parte de ambas cepas sufrió, en términos generales, un descenso tras la incubación de 7 d frente a la incubación realizada durante 24 h. Los resultados descritos en la Tabla 5.8 muestran los diferentes perfiles de volátiles obtenidos para cada una de las cepas en los distintos medios de incubación.

Ambas cepas dieron lugar a la producción de KIC, aunque la acumulación de este compuesto fue muy superior en la cepa mutante. Tanto la cepa silvestre como la cepa mutante fueron capaces de producir cantidades significativamente superiores de este compuesto en CDM-Mad(L), frente a la producción en ausencia de azúcar en el medio de incubación. La formación de KIC por la cepa mutante fue superior al producido por la cepa silvestre y se detectó en todas las condiciones (Tabla 5.8). La formación de KIC pudo relacionarse directamente con los niveles obtenidos en las dos cepas de 3-metilbutanal y 3-metilbutanol. La formación del éster 3-metilbutil acetato se incrementó durante la incubación prolongada de IFPL953, mientras que en la cepa mutante se detectaron valores elevados tras 24 h de incubación, sobre todo en CDM-Mad(L).

También se detectaron otros aldehídos relacionados con el catabolismo de aminoácidos ramificados como 2-metilbutanal y 2-metilpropanal (Tabla 5.8). *L. lactis* produjo 2-metilbutanal en mayor abundancia en medio CDM-Mad, siendo la cantidad detectada muy superior tras la incubación de la cepa mutante frente a la producida por IFPL953. De igual manera, la formación del alcohol derivado, el 2-metilbutanol, fue superior en CDM-Mad. El 2-metilpropanal solo fue detectado tras incubar IFPL953 Δ *panE* en CDM-Mad durante 24 h. Sin embargo, el 2-metilpropanol sí fue detectado tras la incubación de ambas cepas, siendo muy superior ($P < 0,05$) la producción de este compuesto por la cepa mutante y en las condiciones de CDM-Mad. Al igual que en otras ocasiones, también se detectó benzaldehído en abundancia, siendo la producción superior en condiciones de incubación en CDM-Mad (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Principales compuestos volátiles detectados en el espacio de cabeza tras la incubación de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ panE en medio químicamente definido (CDM), en condiciones de maduración con lactosa al 0,2% (v/v) (CDM-Mad[L]) y en condiciones de maduración sin fuente de carbono (CDM-Mad).

Compuesto ¹	IFPL953						IFPL953 Δ panE					
	24 h			7 d			24 h			7 d		
	CDM	CDM-Mad(L)	CDM-Mad	CDM	CDM-Mad(L)	CDM-Mad	CDM	CDM-Mad(L)	CDM-Mad	CDM	CDM-Mad(L)	CDM-Mad
Ácido α -cetoisocaproato	-	15,54 \pm 2,40 ^a	7,56 \pm 0,89	-	5,78 \pm 0,94	-	15,93 \pm 0,16	60,86 \pm 2,47 ^{a,b}	23,89 \pm 0,76	10,23 \pm 1,70	15,93 \pm 0,68 ^c	10,89 \pm 0,74
Benzaldehído	10,12 \pm 0,79	21,00 \pm 0,50	39,33 \pm 1,30 ^a	12,37 \pm 0,49	12,14 \pm 0,60	20,15 \pm 0,27	28,23 \pm 1,79	21,91 \pm 0,16	43,49 \pm 1,89 ^{a,b}	11,00 \pm 1,56	15,54 \pm 1,41	20,59 \pm 0,55
Hexanal	-	4,43 \pm 0,14	6,59 \pm 0,51 ^a	-	-	2,10 \pm 0,30	-	5,16 \pm 0,31	12,97 \pm 0,56 ^{a,b}	-	2,44 \pm 0,34	3,67 \pm 0,52 ^c
2-Metilbutanal	0,50 \pm 0,08	-	3,15 \pm 0,43 ^a	-	0,28 \pm 0,04	1,81 \pm 0,50	-	-	15,03 \pm 0,98 ^{a,b}	-	-	3,59 \pm 0,51 ^c
3-Metilbutanal	1,79 \pm 0,10	3,15 \pm 0,19	5,78 \pm 0,32	2,71 \pm 0,22	6,24 \pm 0,26	2,18 \pm 0,18	1,31 \pm 0,51	20,95 \pm 2,21 ^{a,b}	10,50 \pm 0,59	1,40 \pm 0,36	5,49 \pm 0,63	-
2-Metilpropanal	-	-	-	-	-	-	-	-	10,10 \pm 1,76 ^{a,b,c}	-	-	-
2-Etilhexanol	18,04 \pm 0,86 ^{a,b}	4,05 \pm 0,57	-	5,00 \pm 1,03	11,37 \pm 1,61 ^c	5,21 \pm 0,80	-	-	-	-	-	-
1-Hexanol	5,99 \pm 0,73	2,13 \pm 0,30	11,29 \pm 1,60 ^a	-	-	-	4,05 \pm 1,06	-	10,06 \pm 0,98 ^a	-	-	-
2-Metilpropanol	-	2,45 \pm 0,40	3,37 \pm 0,23	-	0,54 \pm 0,08	-	1,01 \pm 0,87	2,11 \pm 0,94	25,90 \pm 1,46 ^{a,b}	-	1,85 \pm 0,40	1,90 \pm 0,33 ^c
2-Metilbutanol	-	-	4,57 \pm 0,76 ^a	-	-	-	-	-	15,43 \pm 1,03 ^{a,b}	-	-	-
3-Metilbutanol	4,15 \pm 0,75	2,50 \pm 0,22	7,77 \pm 0,32	4,75 \pm 0,98	12,01 \pm 0,94 ^{a,c}	2,92 \pm 0,13	3,44 \pm 0,86	25,65 \pm 0,66 ^{a,b}	13,56 \pm 0,33	1,64 \pm 0,46	5,27 \pm 1,03	-
3-Metoxibutanol	-	-	-	-	-	-	-	2,44 \pm 0,87 ^{a,b}	-	-	-	-
2-Metil-2-octanol	7,51 \pm 0,21	7,69 \pm 0,32	8,00 \pm 0,46	10,49 \pm 1,48 ^a	5,68 \pm 0,80	7,53 \pm 0,80	9,11 \pm 1,16	7,44 \pm 0,56	9,89 \pm 0,46 ^b	15,88 \pm 1,02 ^c	6,48 \pm 0,49	6,06 \pm 0,43
1-Nonanol	15,77 \pm 3,13 ^{a,b}	5,39 \pm 0,47	7,95 \pm 1,03	8,74 \pm 1,03 ^c	4,82 \pm 0,68	8,11 \pm 1,57	-	-	-	-	-	-
3-Metilbutil acetato	-	-	-	6,62 \pm 0,98	12,30 \pm 1,52 ^a	9,07 \pm 1,29	9,78 \pm 0,56	27,30 \pm 1,16 ^{a,b}	10,60 \pm 0,87	16,30 \pm 1,02	15,43 \pm 1,12 ^c	-
Acetona	9,76 \pm 0,40	2,09 \pm 0,80	2,12 \pm 0,40	12,48 \pm 1,02 ^a	10,45 \pm 0,93	5,44 \pm 0,11	9,72 \pm 0,57	1,76 \pm 0,76	7,20 \pm 0,55	2,60 \pm 0,27	11,16 \pm 1,56 ^a	6,25 \pm 0,54
Acetoína	-	20,27 \pm 0,52 ^a	-	-	7,10 \pm 1,00	2,33 \pm 0,34	1,09 \pm 0,14	27,47 \pm 0,43 ^{a,b}	-	2,79 \pm 0,39	-	10,88 \pm 1,03 ^c
Diacetilo	0,93 \pm 0,09	9,76 \pm 0,32	1,01 \pm 0,10	-	5,33 \pm 0,45	1,17 \pm 0,16	0,58 \pm 0,08	12,01 \pm 0,95 ^{a,b}	10,08 \pm 0,13	5,58 \pm 0,98	7,06 \pm 0,64 ^c	-
4-Butoxi-2-butanona	-	7,98 \pm 1,03	9,98 \pm 1,05	-	2,30 \pm 0,33 ^c	-	-	7,85 \pm 0,93	12,53 \pm 1,13 ^{a,b}	-	-	-
2-Hexanona	-	3,74 \pm 0,48	4,49 \pm 0,87	-	1,42 \pm 0,20 ^c	-	-	3,04 \pm 0,51	5,03 \pm 0,94	-	-	-
2-Heptanona	3,00 \pm 0,79	23,91 \pm 3,38 ^{a,b}	-	4,50 \pm 1,12	2,14 \pm 0,30	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentanona	4,50 \pm 0,21 ^{a,b}	2,18 \pm 0,31	2,26 \pm 0,11	3,74 \pm 0,64	3,84 \pm 0,18	2,55 \pm 0,35	2,50 \pm 0,73	1,84 \pm 0,16	2,45 \pm 0,29	4,19 \pm 0,98 ^a	2,75 \pm 1,00	0,98 \pm 0,14
4-Metil-2-pentanona	6,95 \pm 0,16 ^{a,b}	2,04 \pm 0,18	2,40 \pm 0,23	5,00 \pm 1,12	6,55 \pm 0,78	3,30 \pm 0,41	-	3,30 \pm 0,11	3,15 \pm 0,40	5,58 \pm 1,13	6,69 \pm 0,42	11,42 \pm 2,93 ^{a,c}
4-Metil-2-heptanona	61,88 \pm 5,12	55,89 \pm 8,7	43,29 \pm 7,2	60,37 \pm 7,6 ^c	36,70 \pm 5,19	24,63 \pm 3,48	54,60 \pm 1,28 ^a	48,98 \pm 1,48	44,43 \pm 1,17	28,46 \pm 1,54	27,81 \pm 1,40	21,96 \pm 0,95
4-Metil-2-hexanona	-	-	-	-	-	-	3,04 \pm 0,89	8,56 \pm 1,04 ^{a,b}	1,94 \pm 0,67	-	-	-
4, 6-dimetilheptanona	10,46 \pm 0,81 ^b	6,59 \pm 0,14	7,06 \pm 0,7	7,49 \pm 0,89	9,11 \pm 0,72	7,13 \pm 0,12	8,60 \pm 0,22	6,55 \pm 0,11	8,25 \pm 0,78	15,62 \pm 1,34 ^{a,c}	6,29 \pm 0,20	8,37 \pm 1,12
2-Nonanona	13,84 \pm 1,45	19,13 \pm 1,36	14,61 \pm 0,86	17,48 \pm 1,10	16,88 \pm 0,54	15,09 \pm 0,51	35,22 \pm 2,18 ^{a,b}	20,43 \pm 1,26	25,59 \pm 1,20	-	13,38 \pm 0,47	26,58 \pm 1,06 ^c

¹Los valores representan la abundancia relativa (%) respecto al control interno (4-metil-2-pentanol) procedentes de 3 repeticiones biológicas (media \pm desviación típica). -, No detectado; ^adiferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de los compuestos producidos por cada cepa entre los distintos medios; ^bdiferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de los compuestos producidos por IFPL953 frente a los producidos por IFPL953 Δ panE en los distintos medios a las 24 h de incubación; ^cdiferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de los compuestos producidos por IFPL953 frente a los producidos por IFPL953 Δ panE en los distintos medios a los 7 d de incubación.

Tal y como puede apreciarse en la Tabla 5.8, durante el estudio se detectaron un elevado número de cetonas producidas por ambas cepas, salvo en el caso de la 2-heptanona (solo detectada en la cepa silvestre) y la 4-metil-2-hexanona (presente solo en la cepa mutante). En general, la mayor formación de acetoína y diacetilo, COVs importantes por su contribución al aroma del queso, se obtuvo tras la incubación de las cepas en CDM-Mad(L).

5.4. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado la expresión de genes que codifican enzimas del catabolismo de aminoácidos durante el crecimiento de la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953 y de su mutante en actividad hidroxiiisocaproato deshidrogenasa (Hic-DH), *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, en medios de cultivo con diferencias en el contenido en BCAAs y tras la incubación de las cepas en condiciones que simulaban la maduración del queso. Simultáneamente al estudio de expresión génica, se ha evaluado la formación de compuestos orgánicos volátiles (COVs) en las diferentes condiciones de incubación. Los genes estudiados han sido *araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *ytjE* y *panE* (Fig. 5.1) y los cambios de expresión génica se han analizado mediante qRT-PCR. La formación de COVs se ha evaluado mediante SPME y GC-MS, técnica ampliamente usada en la caracterización del aroma de productos lácteos como quesos y leche fermentada (Conrad *et al.*, 2004; Chammas *et al.*, 2006).

La selección para este estudio de los seis genes mencionados se realizó debido a que codifican para enzimas relevantes en el catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* (Yvon y Rijnen, 2001; Smit *et al.*, 2005b; Yvon, 2006; Fernández y Zúñiga, 2006; Requena y Peláez, 2007). El gen *tuf* fue utilizado como gen de referencia para la normalización de los datos de expresión. Este gen codifica para el factor de elongación TU y ha sido satisfactoriamente empleado en otros estudios de expresión génica en *L. lactis* (Guédon *et al.*, 2005; Sperandio *et al.*, 2005). Los genes *araT* y *bcaT* codifican para dos aminotransferasas específicas de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada, respectivamente. Estas aminotransferasas catalizan la conversión de aminoácidos a los correspondientes α -cetoácidos. El gen *gdh* codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) que cataliza la desaminación oxidativa del glutamato, aumentando así la disponibilidad de α -

cetoglutarato como aceptor de grupos amino en las reacciones de transaminación (Tanous *et al.*, 2002; Yvon, 2006). Los α -cetoácidos obtenidos por transaminación constituyen los metabolitos centrales de bifurcación entre las rutas biosintéticas y catabólicas y son limitantes en la formación de aroma (Yvon *et al.*, 1997; Yvon *et al.*, 2000). La actividad Hic-DH, codificada por el gen *panE*, origina los correspondientes hidroxiaácidos (Chambellon *et al.*, 2009); y la α -cetoácido decarboxilasa (gen *kivD*), cataliza la decarboxilación de α -cetoácidos a aldehídos (De la Plaza *et al.*, 2004). Por último, el gen *ytjE* codifica para una C-S liasa con actividad sobre aminoácidos azufrados produciendo compuestos volátiles que aportan aromas intensos durante la maduración del queso (Martínez-Cuesta *et al.*, 2006b).

5.4.1. Caracterización de la expresión génica de *L. lactis* en medios con diferente contenido en aminoácidos ramificados

Algunas cepas de *L. lactis* pueden crecer sin excesiva dificultad en un medio que presente una cierta limitación en el contenido de aminoácidos, dado que estas bacterias dependen mayoritariamente de su propia capacidad de biosíntesis (Gitton *et al.*, 2005), aunque se han detectado numerosas auxotrofías para este microorganismo (Delorme *et al.*, 1993; Godon *et al.*, 1993; Cocaign-Busquet *et al.*, 1995). Estudios previos en nuestro laboratorio con la cepa *L. lactis* IFPL730, cepa con el mismo origen que *L. lactis* IFPL953 (Fontecha *et al.*, 1990), demostraron que la cepa es auxotrofa para valina y leucina pero que es capaz de crecer en ausencia de isoleucina (De la Plaza *et al.*, 2009). Por ello, en este trabajo nos planteamos estudiar el efecto de los contenidos mínimos de BCAAs sobre el crecimiento de *L. lactis*.

Aunque la tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de las cepas de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* se redujo al ser crecidas en medios con carencia de BCAAs en comparación con el medio completo, ambas cepas mostraron un crecimiento óptimo en todos los medios (Fig. 5.2). Algunos autores han encontrado que la inactivación de determinadas enzimas del catabolismo de aminoácidos, como GDH, afectaba negativamente al crecimiento de los mutantes (Siragusa *et al.*, 2011). En este sentido, la inactivación de la actividad Hic-DH en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* aparentemente no afecta a la capacidad de la cepa para reajustar sus rutas metabólicas para hacer frente a la carencia de BCAAs.

Al estudiar el efecto del contenido mínimo de BCAAs sobre la expresión relativa de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos, observamos que el gen *gdh* presentó los niveles de expresión relativa más elevados durante todo el crecimiento en función de los BCAAs del medio (Fig. 5.3). Los estudios de Dressaire *et al.* (2011) demostraron que la ausencia de isoleucina durante el crecimiento de *L. lactis* da lugar a una inducción de los genes relacionados con el metabolismo del glutamato, como una vía de biosíntesis de BCAAs. Según estos autores, en cepas de *L. lactis* con actividad GDH, como IFPL953 e IFPL953 Δ *panE*, bastaría con inducir la expresión de GDH para poder obtener glutamato directamente desde el α -cetoglutarato. En nuestro estudio se observa que ante la ausencia de isoleucina y carencia de valina existe un incremento de la expresión de *gdh*, especialmente significativo en la fase estacionaria de crecimiento de *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*.

Al igual que ocurre con *gdh*, el gen *kivD* también vio incrementada su expresión relativa ante la ausencia de isoleucina y el mínimo contenido de valina en el medio de crecimiento (Fig. 5.3). Estos resultados sugieren que ambos genes podrían estar sujetos a la regulación ejercida por el regulador global del metabolismo del nitrógeno CodY, cuya actividad represora dejaría de funcionar ante la falta de BCAAs en el medio de crecimiento (Guédon *et al.*, 2001a). Los estudios realizados con *L. lactis* IFPL730 en nuestro laboratorio indicaron que, en estas condiciones de crecimiento, CodY estaría induciendo la expresión de *kivD* (De la Plaza *et al.*, 2009; Garcia-Cayuela, 2011). Este hecho, unido al cúmulo del cetoácido KIC por la ausencia de la actividad Hic-DH en IFPL953 Δ *panE*, podría estar induciendo la expresión de *kivD* en la cepa mutante frente a la silvestre, con el consiguiente incremento en la formación de 3-metilbutanal y 3-metilbutanol en CDM-Ile (Tabla 5.6).

La ausencia de BCAAs en el medio de crecimiento también incrementó la expresión de los genes *araT*, *bcaT*, *ytjE* y *panE*, principalmente inducida por la ausencia de isoleucina y en menor medida por las carencias de valina y leucina. Estos resultados estarían de acuerdo con lo descrito por Guédon *et al.* (2005), quienes afirman que el principal efector de CodY es la isoleucina. También se ha demostrado que la expresión de las enzimas AraT y BcaT en *L. lactis* NCDO763 está regulada por CodY ante la presencia de isoleucina, y no por el contenido de valina y leucina (Chambellon e Yvon, 2003). En nuestro estudio se observa que los contenidos mínimos de valina y leucina también provocaron, aunque en menor medida, cierta inducción en la expresión de *araT* y *bcaT*, tal y como se ha observado en *Bacillus subtilis* (Villapakkam *et al.*, 2009) y *L. lactis* IFPL730 (De la Plaza *et al.*, 2009; Garcia-Cayuela, 2011).

El contenido en BCAAs en el medio de crecimiento también determinó cambios en los compuestos volátiles generados por *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE*, en parte, por consecuencia directa de los cambios ocurridos en la expresión génica. El aumento de expresión de los genes *bcaT*, *gdh* y *kivD* en CDM-Ile en las dos cepas se reflejó en las abundancias obtenidas para los compuestos 3-metilbutanal y 3-metilbutanol (Tabla 5.6). Este aumento de expresión fue aún más evidente tras el crecimiento de la cepa mutante, en la que quedó patente la inactivación de PanE al detectarse cantidades elevadas de KIC, producto directo de la transaminación de la leucina y precursor del 3-metilbutanal y 3-metilbutanol. Estos resultados muestran un claro incremento del flujo catabólico de la leucina tras el crecimiento de la cepa sin actividad Hic-DH frente a la silvestre. El 3-metilbutanal ha sido identificado como un potente compuesto del aroma en quesos tipo Camembert, Cheddar, Emmental y Gruyere (Rychlik y Bosset, 2001) y el 3-metilbutanol ha sido relacionado positivamente con un aroma fresco en Mozzarella (Moio *et al.*, 1993) y a caramelo en algunas variedades de queso europeo (Lawlor *et al.*, 2001). La cepa mutante además produjo otros cetoácidos y aldehídos derivados de su mayor expresión de enzimas relacionadas con el catabolismo de aminoácidos. Tal fue el caso del benzaldehído, relacionado con el aumento de expresión de *araT* en CDM-Val (Tabla 5.6). También se observó mayor contenido de piruvato por IFPL953 Δ *panE*, posiblemente por la inactivación de PanE, aunque se ha descrito baja afinidad de la enzima por este sustrato (Bernard *et al.*, 1994; Chambellon *et al.*, 2009); y el 2-metilbutanal, que deriva de la isoleucina y da lugar al 2-metilbutanol.

Oku y Kaneda (1988) postularon la posible existencia de una ruta de síntesis de ácidos grasos de cadena ramificada a partir de α -cetoácidos procedentes del catabolismo de BCAAs en *B. subtilis*, por lo que el cúmulo de α -cetoácidos potenciaría la producción de ácidos grasos y su posterior degradación. Esta conexión entre rutas metabólicas explicaría la abundancia encontrada de estas cetonas en la cepa mutante (Tabla 5.6), donde la inactivación de PanE estaría aumentando la disponibilidad de cetoácidos. Una de las cetonas que solo fue detectada tras el crecimiento de IFPL953 Δ *panE* fue la 2,3-pentanediona, que deriva del α -aceto- α -hidroxibutirato (un intermediario de la biosíntesis de isoleucina). Este compuesto ha sido detectado en quesos y se ha asociado a la actividad metabólica de *Lactobacillus helveticus* (Imhof *et al.*, 1995; Garde *et al.*, 2006).

5.4.2. Estudio de la expresión de enzimas del catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* y evaluación de la formación de compuestos volátiles en condiciones de maduración de queso

L. lactis es una de las especies más empleadas para la producción de quesos debido en parte a sus cualidades tecnológicas. Las distintas etapas de la fabricación del queso, como la coagulación, la acidificación, el calentamiento, el salado y la maduración provocan alteraciones en el crecimiento y comportamiento de las cepas. La respuesta génica de cada cepa ante las situaciones de estrés como el descenso del pH, cambios en la osmoralidad o en la temperatura durante la maduración del queso, va a influir no solo en la fermentación sino también en la producción del aroma del queso (Xie *et al.*, 2004). Por ello, la selección apropiada de las cepas que formen parte del cultivo iniciador va a ser fundamental a la hora de obtener el tipo de queso deseado (van Hylckama Vlieg *et al.*, 2006). A pesar del impacto que pueden tener las condiciones de maduración sobre las principales actividades enzimáticas del metabolismo de aminoácidos, y por tanto sobre la formación de aroma en queso, existen muy pocos estudios al respecto (Curtin *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2002; De Angelis *et al.*, 2010). Por ello, en este trabajo nos planteamos el estudio del efecto de limitaciones de la fuente de carbono, el pH ácido, la salinidad y la baja temperatura en medios definidos sobre la expresión de los genes *araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *ytjE* y *panE*, y poder estimar la potencialidad de las estirpes silvestre y mutante para la generación de COVs cuando se encuentran sometidas a las condiciones que tienen lugar durante la maduración de queso.

En experimentos realizados con las enzimas AraT y BcaT purificadas, se ha observado que aún manteniéndose la actividad, ésta disminuye considerablemente cuando las condiciones de pH, salinidad y temperatura se alejaban de las óptimas (Yvon *et al.*, 1997, 2000; Gao y Steele, 1998; Engels *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002). En este sentido, la mayoría de las condiciones de maduración empleadas no provocó la inducción de la expresión de los genes estudiados, pero sí lo hizo la falta de azúcar en el medio (Fig. 5.4). Ante condiciones de estrés, como la falta de nutrientes, las células se ven forzadas a ajustar sus actividades metabólicas para evitar posibles pérdidas de energía, asegurándose así la supervivencia (Rallu *et al.*, 1996). A la vista de nuestros resultados, parece que *L. lactis* ante un agotamiento total de la fuente de carbono incrementaría la expresión sobre todo de las actividades GDH, KivD y YtjE a favor de procesos biosintéticos para asegurarse un suministro de aminoácidos ya que los aminoácidos constituyen las principales fuentes de nitrógeno, están implicados en la producción de energía, el control del

pH intracelular y la regeneración de cofactores (Ardö, 2006; Fernández y Zuñiga, 2006; Ganesan *et al.*, 2007).

Los trabajos de De Angelis *et al.* (2010) y Siragusa *et al.* (2011) destacan el papel de la enzima GDH-NADP⁺ sobre el crecimiento y supervivencia de *Lactobacillus plantarum* en situaciones de estrés. En nuestros experimentos, la expresión relativa de *gdh* en condiciones de ausencia de azúcar en el medio se incrementaba en gran medida, sobre todo en la cepa mutante en actividad Hic-DH. En estas condiciones, la actividad GDH podría estar dirigida hacia procesos anabólicos, generando así el poder reductor NAD⁺ necesario para la célula. Además, se estaría favoreciendo la actividad de enzimas como KivD, que requieren estar en entornos oxidativos para un funcionamiento óptimo (Kieronczyk *et al.*, 2006). La expresión de *kivD* también fue muy elevada en condiciones de falta de azúcar en el medio (Fig. 5.4). En *L. lactis* IFPL953 el aporte de poder reductor también podría proceder de la actividad Hic-DH, aunque el nivel de expresión relativa de *panE* fue bajo en estas condiciones.

Las variaciones en el medio de incubación de la fuente de carbono, los valores bajos de pH y temperatura o la elevada osmolaridad, determinaron cambios en los compuestos volátiles generados por *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE*. Durante su incubación en los distintos medios, ambas cepas fueron capaces de producir un amplio rango de COVs, siendo la cepa mutante la que presentó los mayores valores de abundancia relativa (Tabla 5.7). La mayor expresión de los genes *gdh* y *kivD* tras la incubación de las cepas en el medio CDM-SinAz se vio reflejada en una mayor producción de 2- y 3-metilbutanal y de 2-metilbutanol y 2-metilpropanol en comparación con el resto de los medios. Sin embargo, en el caso del 3-metilbutanol se detectó una mayor abundancia en el medio CDM-Lac y lo mismo ocurrió con el éster 3-metilbutilacetato, indicando que la variación en la fuente de carbono tiene un efecto positivo en la formación de volátiles a partir de la leucina (Ganesan *et al.*, 2006).

Durante la incubación de *L. lactis* en CDM-pH pudimos detectar valores de abundancia relativa elevados de acetoína y diacetilo. Su formación podría estar relacionada con una inducción del metabolismo del citrato a pH ácido (García-Quintans *et al.*, 1998; García-Quintans *et al.*, 2008). Estos resultados estarían de acuerdo con otros estudios en los que se afirma que para que estos compuestos se produzcan en *L. lactis*, son necesarios valores de pH en torno a 5 (Le Bars e Yvon, 2008).

Cuando se combinaron todas las condiciones de maduración de queso en la incubación de las cepas durante 24 h y 7 d, también encontramos que la expresión relativa de la mayoría de los genes se indujo sobre todo ante la falta de fuente de carbono en el medio (Fig. 5.5). Los genes *kivD* y *gdh* volvieron a destacar por presentar un patrón de expresión ligeramente diferente al resto de los genes. El aumento de la expresión relativa del gen *kivD* de la IFPL953 en CDM-Mad(L) tras 7 d de incubación, podría ser el resultado de uno de los mecanismos de resistencia a un posible, al igual que los procesos de desaminación de la arginina, y la descarboxilación del glutamato, aspartato y citrato, descritos por otros autores (García-Quintans *et al.*, 1998; García-Quintans *et al.*, 2008; Yvon *et al.*, 2011). Este incremento en la expresión de *kivD* en la cepa silvestre, se vio también reflejado en una capacidad superior para producir 3-metilbutanal tras 7 d de incubación en condiciones de maduración con lactosa como fuente de carbono. Tras la incubación en condiciones de maduración de queso de la cepa mutante, los mayores valores de expresión relativa se observaron para el gen *gdh* que incluso aumentó al alargar el tiempo de incubación. Estos resultados estarían en consonancia con los encontrados por Yvon *et al.* (2011) que mediante ensayos con pastas de quesos, observaron que la actividad GDH se mantenía con niveles elevados incluso a los 7 d de maduración. Tras la incubación de IFPL953 Δ *panE* en condiciones de maduración también pudimos detectar la presencia del 2-metilpropanal, aldehído derivado de la valina, que ante una acumulación de KIC puede formarse por oxidación química a partir de este cetoácido (Smit *et al.*, 2009).

Durante la incubación en condiciones de maduración con lactosa residual, también pudimos observar una elevada acumulación de KIC con la cepa mutante IFPL953 Δ *panE*, que derivó posteriormente en elevados niveles de 3-metilbutanal, 3-metilbutanol y 3-metilbutil acetato.

Al igual que en los otros experimentos realizados durante este trabajo, también se detectaron un número considerable de cetonas. Destaca el aumento de acetoína y diacetilo a las 24 h de incubación en condiciones de maduración con lactosa como fuente de carbono. La acetoína ha sido identificada como un importante indicador químico de la maduración en queso (Banks *et al.*, 1992) y en general, son compuestos, relacionados con olores a mantequilla y leche (Curioni y Bosset, 2002) que tienen un impacto positivo en el aroma de quesos tipo Cheddar y Gouda (Banks *et al.*, 1992).

5.5. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO

La combinación de los análisis de expresión génica con el estudio de la producción de compuestos volátiles, ha permitido describir la respuesta en el catabolismo de aminoácidos de *L. lactis* ante la variación en el contenido de BCAAs en el medio y tras la incubación en condiciones similares a las de maduración del queso.

La ausencia o carencia de BCAAs en el medio de crecimiento de *L. lactis* IFPL953 provoca un incremento en la expresión de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos, indicando que dicha expresión está regulada por CodY. La mayor inducción de expresión génica se observa en el gen *gdh* y ante la ausencia de isoleucina y la carencia de valina. La incubación de *L. lactis* en condiciones de maduración del queso que implican ausencia de azúcar provoca un incremento de expresión de los genes *kivD* y *gdh*. En todas las condiciones, la inactivación del gen *panE* provoca un incremento significativo de la expresión del gen *gdh*.

El incremento de expresión de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos se ve reflejado en un aumento en la formación de compuestos volátiles. Los resultados obtenidos con *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* indican que la ausencia de actividad Hic-DH en combinación con actividades elevadas de GDH y KivD dan lugar a un incremento en la formación de metabolitos procedentes de los BCAAs, como 2- y 3-metilbutanal y sus correspondientes alcoholes.

CAPÍTULO VI

Discusión General

CAPÍTULO VI

Discusión general

La presente Tesis Doctoral se ha centrado en el empleo de estrategias enzimáticas dirigidas al control de la formación de compuestos volátiles a partir de aminoácidos por *Lactococcus lactis*.

Los cultivos iniciadores empleados en la producción de quesos blandos y semi-duros están formados mayoritariamente por cepas de *L. lactis* (Beresford *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2001). El uso generalizado de cultivos industriales vendidos por un número relativamente reducido de productores, ha contribuido a una cierta restricción en las cepas de uso industrial y, por tanto, ha reducido la diversidad aromática del queso. Se ha demostrado que en comparación con las cepas industriales, las cepas silvestres de lactococos son capaces de producir mayor variedad de compuestos volátiles, gracias principalmente a su maquinaria enzimática (Ayad *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 2003; Randazzo *et al.*, 2008). Por lo que en la última década se ha empezado a enfatizar sobre la necesidad de detectar y seleccionar cepas con actividades enzimáticas que permitan controlar la biosíntesis de compuestos volátiles y diversificar así el aroma en los quesos (Williams *et al.*, 2002; Smit *et al.*, 2004; Amárta *et al.*, 2006; Fernández de Palencia *et al.*, 2006; Kieronczyk *et al.*, 2006; Brandsma *et al.*, 2008).

En *L. lactis*, la primera reacción de la degradación de los aminoácidos hacia compuestos volátiles es la transaminación, reacción que requiere obligatoriamente la presencia de un aceptor de grupos amino (preferentemente α -cetoglutarato) (Tanous *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008). Por ello, en esta investigación nos planteamos la identificación de la actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) en cepas silvestres de *L. lactis* como una vía para aumentar el aporte de α -cetoácido a las reacciones de transaminación y favorecer la formación de compuestos volátiles derivados del catabolismo de aminoácidos. Nuestros resultados muestran que, al igual que en el caso de otras actividades enzimáticas (Fernández de Palencia *et al.*, 2006), existe una elevada variabilidad para la actividad GDH entre cepas silvestres. Coincidiendo con los estudios de Tanous *et al.* (2002), observamos la baja prevalencia de la actividad en lactococos ya que de las 40 cepas empleadas, solo encontramos 10 que presentaran actividad GDH. En estas cepas, se pudo observar

cierta preferencia por el cofactor NAD⁺, asociado principalmente al catabolismo del ácido glutámico (Smith *et al.*, 1975). Esta preferencia por el cofactor NAD⁺ en cepas de *L. lactis* de origen lácteo ha sido observada también por otros autores (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008) y podría deberse a que la leche y el queso constituyen ambientes en los que el aporte de ácido glutámico es elevado en comparación con el nivel de otros aminoácidos (Ganesan y Weimer, 2007). Por el contrario, la mayor afinidad por el cofactor NADH⁺ (relacionado con la biosíntesis de glutamato) está asociada a cepas de *L. lactis* de origen vegetal, donde suele haber niveles elevados de amonio y escasos de ácido glutámico, otorgando a las cepas una cierta ventaja para su supervivencia en esos entornos (Tanous *et al.*, 2005a). La variabilidad observada entre las cepas en cuanto a la presencia de la actividad GDH podría estar relacionada con el hecho de que en *L. lactis* el gen *gdh* sólo se haya identificado en un plásmido (pGdh442), que tiene capacidad para autotransferirse (Tanous *et al.*, 2006 y 2007). En todas las cepas con actividad GDH, el gen *gdh* fue localizado solamente en el ADN plasmídico. Se destacó del estudio la cepa *L. lactis* IFPL953, por poseer el mayor nivel de actividad GDH-NAD⁺ y por presentar una organización genética del gen *gdh* equivalente a la de *L. lactis* Til504, poseedora del plásmido pGdh442 (Tanous *et al.*, 2007). *L. lactis* IFPL953 fue seleccionada como cepa candidata con el objetivo de aumentar la formación de aroma en queso, al ser la cepa con mayor actividad GDH entre las estudiadas y por poseer además otras enzimas clave para el catabolismo de aminoácidos como aminotransferasas y cetoácido descarboxilasa (KivD) (De la plaza *et al.*, 2006).

Tal vez una de las técnicas más eficaces para controlar y mejorar el desarrollo del aroma de un queso sea la ingeniería metabólica de las principales rutas que conducen a la formación de compuestos volátiles a partir del catabolismo de aminoácidos. Los estudios de Yvon *et al.* (1998) realizados en pastas de queso señalaban que la transaminación podía favorecerse mediante el aumento del contenido de α -cetoglutarato en el medio, resultando en un incremento en la acumulación de ácido α -cetoisocaproico (KIC) y de ácido α -hidroxiisocaproico. De estos compuestos, se ha descrito que los hidroxiaácidos no contribuyen al aroma del queso (Gao *et al.*, 1998; Roudot-Algaron *et al.*, 1998; Yvon *et al.*, 1998; Yvon y Rijnen, 2001). En este sentido, y con el fin de asegurar el flujo metabólico de los α -cetoácidos hacia la formación de compuestos del aroma, en este trabajo se ha bloqueado en *L. lactis* la ruta de formación de hidroxiaácidos a partir de los correspondientes α -cetoácidos. Procedimos, por tanto, a la inactivación del gen *panE* en *L. lactis* IFPL953 mediante mutagénesis por doble sobrecruzamiento siguiendo la estrategia descrita por Biswass *et al.* (1993). La ausencia de *panE* en

el mutante *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* confirmó que, tal y como habían descrito Chambellon *et al.* (2009), PanE es la única enzima responsable de la actividad hidroxiiisocaproato deshidrogenasa (Hic-DH) en *L. lactis*. Mediante este estudio, también pudimos comprobar que la ausencia de actividad Hic-DH en *L. lactis* tuvo como consecuencia directa la acumulación de KIC en el medio y una mayor conversión del cetoácido en 3-metilbutanal y 3-metilbutanol, compuestos derivados del metabolismo de la leucina y con un elevado impacto en el aroma de algunas variedades de queso (Moio *et al.*, 1993; Rychlick y Bosset, 2001; Lawlor *et al.*, 2001). Según Kieronczyk *et al.* (2006), el aumento de la disponibilidad de KIC favorecería la expresión de KivD, que entraría en competición por el sustrato con la actividad Hic-DH (Smit *et al.*, 2004a). En IFPL953 Δ *panE*, en ausencia de dicha competición por sustrato al carecer de Hic-DH, se favorece específicamente la formación de 3-metilbutanal a partir de KIC. La enzima KivD, codificada por el gen *kivD*, fue purificada y caracterizada por primera vez en *L. lactis* en nuestro grupo de investigación (De la Plaza *et al.*, 2004). Los estudios realizados hasta ahora indican que en bacterias lácticas, la habilidad para producir concentraciones notables de aldehídos a partir de α -cetoácidos por la actividad KivD es muy poco frecuente y dependiente de cepa (Smit *et al.*, 2004b; Fernández de Palencia *et al.*, 2006; Yvon, 2006; Liu *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en el presente trabajo han demostrado que la supresión de la ruta que desvía la conversión de cetoácidos hacia hidroxiiácidos en *L. lactis*, en combinación con actividades clave para el catabolismo de aminoácidos como la GDH, favorecen la producción de compuestos volátiles relevantes para el aroma en queso.

Con el fin de profundizar en las ventajas de la mutación del gen *panE* en *L. lactis* para la formación de compuestos volátiles a partir de aminoácidos, procedimos a estudiar el efecto del contenido en aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en el medio de crecimiento de *L. lactis* IFPL953 y *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* y tras la incubación en condiciones que simulan el proceso de maduración del queso en la expresión de los genes que codifican enzimas clave del catabolismo de aminoácidos (*araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *ytjE* y *panE*). También se llevó a cabo en estas condiciones el estudio de formación de compuestos volátiles que tienen influencia en la formación del aroma en queso. Estudios previos en nuestro laboratorio con *L. lactis* IFPL730, cepa con el mismo origen que *L. lactis* IFPL953 (Fontecha *et al.*, 1990), demostraron que la cepa es auxotrofa para valina y leucina pero que es capaz de crecer en ausencia de isoleucina (De la Plaza *et al.*, 2009). Se ha descrito que la inactivación de determinadas enzimas implicadas en el catabolismo de aminoácidos puede afectar negativamente al crecimiento de los mutantes (Siragusa

et al., 2011). En este sentido, la inactivación de la actividad Hic-DH en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* aparentemente no afecta a la capacidad de la cepa para reajustar sus rutas metabólicas para hacer frente a la carencia de BCAAs, ya que se observaron en estas condiciones pautas de crecimiento equivalentes a las de la cepa silvestre. Al estudiar el efecto del contenido mínimo de BCAAs en el medio de cultivo sobre la expresión relativa de los genes del catabolismo de aminoácidos, destacaron los elevados niveles de expresión relativa observados para los genes *gdh* y *kivD* ante la ausencia de isoleucina y la carencia de valina. Los estudios de Dressaire *et al.* (2011) demostraron que la ausencia de isoleucina durante el crecimiento de *L. lactis* da lugar a una inducción de los genes relacionados con el metabolismo del glutamato, como una vía de biosíntesis de BCAAs. Por tanto, en *L. lactis* IFPL953 bajo esas condiciones se induciría la expresión de GDH para poder obtener glutamato directamente desde el α -cetoglutarato. El efecto de inducción de *gdh* fue superior en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, posiblemente favorecido por la mayor disponibilidad de α -cetácidos de cadena ramificada. Nuestros resultados sugieren además que *gdh* estaría sujeto a la regulación ejercida por el regulador global del metabolismo del nitrógeno CodY en ausencia de BCAAs en el medio de crecimiento (Guédon *et al.*, 2001a), al igual que se ha demostrado la regulación por CodY de la expresión de *kivD* en *L. lactis* IFPL730 (De la Plaza *et al.*, 2009; García-Cayuela, 2011). La acumulación de KIC, en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* por la ausencia de la actividad Hic-DH, podría estar a su vez induciendo la expresión de *kivD* (Smit *et al.*, 2009), con el consiguiente incremento en la formación de 3-metilbutanal y 3-metilbutanol. La limitación del contenido de BCAAs en el medio de crecimiento de *L. lactis* también dio lugar al aumento de expresión de los genes *araT*, *bcaT*, *ytjE* y *panE*, principalmente en ausencia de isoleucina, coincidiendo con la noción de que el principal efector de CodY es la isoleucina (Guédon *et al.*, 2005; Chambellon e Yvon, 2003).

Las condiciones de agotamiento de azúcar, salinidad y pH ácido del queso, junto con el empleo de bajas temperaturas, influyen en los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración y que contribuyen a las características del aroma y del sabor del queso (Fox *et al.*, 2000). En experimentos realizados con las enzimas AraT y BcaT purificadas, se ha observado que aún manteniéndose la actividad, ésta disminuye considerablemente cuando las condiciones de pH, salinidad y temperatura se alejaban de las óptimas (Yvon *et al.*, 1997, 2000; Gao y Steele, 1998; Engels *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha observado que la actividad de la enzima KivD pura aumentaba en presencia de NaCl (De la Plaza *et al.*, 2004) En este sentido, la mayoría de las condiciones de

maduración empleadas en nuestra investigación no provocaron la inducción de la expresión de los genes estudiados, pero sí lo hizo la falta de azúcar en el medio. A la vista de nuestros resultados, parece que *L. lactis* ante el agotamiento de la fuente de carbono incrementaría la expresión de los genes *gdh*, *kivD* y *ytjE*. Se ha descrito la relevancia de la actividad GDH sobre el crecimiento y supervivencia de *Lactobacillus plantarum* en situaciones de estrés (De Angelis *et al.*, 2010; Siragusa *et al.*, 2011). También los trabajos de Tanous *et al.* (2006) sugieren que la expresión del gen *gdh* podría estar regulada por efectores nutricionales ya que el crecimiento de *L. lactis* en distintos medios de crecimiento afectó considerablemente a la actividad GDH. En nuestros experimentos, la expresión relativa de *gdh* ante la ausencia de azúcar en el medio de incubación se incrementó sobre todo en la cepa *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*. Bajo estas condiciones, se podría estar generando un entorno no oxidativo que estaría favoreciendo a la actividad KivD, tal y como se deduce de su elevada expresión relativa (Kieronczyk *et al.*, 2006). La mayor expresión relativa de los genes *gdh* y *kivD* tras la incubación de *L. lactis* en un medio sin azúcar, se vio reflejada en una mayor producción de 2- y 3-metilbutanal, de 2-metilbutanol y de 2-metilpropanol en comparación con el resto de los medios. La mayor abundancia de 3-metilbutanol y de 3-metilbutilacetato cuando la lactosa se encontraba en el medio de incubación, indican que la variación en la fuente de carbono tiene un efecto positivo en la formación de volátiles a partir de la leucina (Ganesan *et al.*, 2006). Al combinar todas las condiciones de maduración de queso en la incubación de las cepas durante 24 h y 7 d, los genes *kivD* y *gdh* volvieron a destacar por presentar un patrón de expresión ligeramente superior al resto de los genes. El efecto inductor de la expresión de *gdh* en condiciones de maduración de queso fue superior en la cepa mutante IFPL953 Δ *panE*. Estos resultados estarían en consonancia con los encontrados por Yvon *et al.* (2011) que, mediante ensayos con pastas de quesos, observaron que la actividad GDH se mantenía con niveles elevados incluso a los 7 d de maduración. Durante la incubación en condiciones de maduración con lactosa residual, también pudimos observar una elevada acumulación de KIC en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, que derivó posteriormente en elevados niveles de 3-metilbutanal, 3-metilbutanol y 3-metilbutil acetato.

En los distintos análisis de formación de compuestos volátiles realizados durante este trabajo, hemos podido detectar la presencia de distintos grupos como ácidos, aldehídos, alcoholes y cetonas, la mayoría de ellos relacionados con el aroma del queso. Los distintos perfiles aromáticos obtenidos con *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* demuestran que, en una cepa poseedora de las actividades KivD y

GDH, se produce un incremento del flujo catabólico de la leucina ante la ausencia de PanE, incluso en condiciones de maduración de queso.

A pesar del papel relevante que juegan los coagulantes, las enzimas de la leche (por ejemplo la plasmina y la lipoproteína lipasa) y las catepsinas, la contribución de los microorganismos a los eventos bioquímicos que caracterizan el aroma del queso pueden ser considerados indispensables (Gobbetti *et al.*, 2007). Los resultados de esta Tesis Doctoral contribuyen al conocimiento sobre las enzimas implicadas en el catabolismo de aminoácidos, para ser consideradas como una forma importante de selección de cepas destinadas a ser empleadas en la producción de quesos con el aroma deseado. En el presente trabajo de investigación se ha demostrado que en *L. lactis* con actividades aminotransferasas, GDH y KivD, el flujo catabólico de aminoácidos se dirige hacia la formación de compuestos representativos del aroma en queso al suprimirse la ruta que desvía la conversión de cetoácidos hacia la formación de hidroxiaácidos.

CAPÍTULO VII

Conclusiones

CHAPTER VII

Conclusions

CAPÍTULO VI

Conclusiones

PRIMERA. La actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) es poco frecuente en *Lactococcus lactis*, siendo la localización del gen *gdh* exclusivamente plasmídica. La actividad GDH de cepas silvestres de *L. lactis* se caracteriza por el empleo preferente de NAD⁺ como cofactor, indicando un papel fundamentalmente catabólico de la enzima.

SEGUNDA. El gen *panE* es el único responsable de la actividad hidroxiiisocaproato deshidrogenasa (Hic-DH) en *L. lactis* IFPL953. La mutación del gen *panE* no dificulta el crecimiento de *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, aunque provoca cierto retraso de su capacidad acidificante en leche.

TERCERA. La supresión de la actividad Hic-DH en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* provoca una acumulación de α -cetoisocaproato y favorece su posterior conversión hacia 3-metilbutanal y 3-metilbutanol. *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* es más eficiente que su cepa parental en la formación de compuestos volátiles.

CUARTA. La limitación de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en el medio de crecimiento de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* provoca un incremento en la expresión de los genes clave en el catabolismo de aminoácidos *araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *ytjE* y *panE*, que probablemente está asociado a la regulación por CodY. La mayor inducción se observa en el gen *gdh* y ante la ausencia de isoleucina y la carencia de valina en el medio de crecimiento.

QUINTA. La incubación de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE* en condiciones de maduración del queso que implican ausencia de azúcar provoca un incremento de expresión de los genes *kivD* y *gdh*. La inactivación del gen *panE* provoca un aumento de la expresión del gen *gdh*.

SEXTA. El aumento de la expresión de los genes *kivD* y *gdh* en condiciones que simulan la maduración del queso, unido a la ausencia de actividad Hic-DH en *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, incrementa la formación de metabolitos procedentes de los BCAAs, como 2- y 3-metilbutanal y 2- y 3-metilbutanol.

CHAPTER VII

Conclusions

FIRST. Glutamate dehydrogenase activity (GDH) is rarely found in *Lactococcus lactis*, being the *gdh* gene only located in plasmid DNA. GDH activity in wild *L. lactis* strains has a preference in the use of NAD⁺ as co-factor in the reaction, which is mainly associated with a glutamate catabolic role of the enzyme.

SECOND. In *L. lactis* IFPL953 the *panE* gene is the sole responsible for hydroxyisocaproate dehydrogenase activity (Hic-DH). Mutation of *panE* had no negative effect over *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* growth, although it has a slight delay effect on its acidifying capacity in milk.

THIRD. Suppression of Hic-DH activity in *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* causes an accumulation of α -ketoisocaproate and favours its later conversion to 3-methylbutanal and 3-methylbutanol. *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* is more efficient producing volatile compounds than its parental strain.

FOURTH. Limited content of branched chain amino acids in the growing culture of *L. lactis* IFPL953 and IFPL953 Δ *panE* led to an increase in the relative expression of *araT*, *bcaT*, *gdh*, *kivD*, *ytjE* and *panE*, key genes for amino acid catabolism. This fact may probably be associated with regulation mechanisms modulated by CodY. Major induction was observed for *gdh* gene when there was no isoleucine or a minimum content of valine in the growing medium.

FIFTH. Incubation of *L. lactis* IFPL953 and IFPL953 Δ *panE* under cheese ripening conditions, which implies the absence of sugar in the medium, leads to an increase of *kivD* and *gdh* genes expression. The inactivation of *panE* gene causes an enhancement of *gdh* gene expression.

SIXTH. The increase in the expression of *kivD* and *gdh* genes under conditions simulating cheese ripening, combined with the lack of Hic-DH activity in *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, enhances the formation of volatile metabolites, like 2- and 3-methylbutanal and 2- and 3- methylbutanol, derived from BCAAs.

BIBLIOGRAFÍA

- Alting, A. C., Engels, W. M., Schalkwijk, S. and Exterkate, F.A. (1995) Purification and characterisation of cystathionine β -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and its possible role in flavour development in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4037-4042.
- Amárita, F., Fernández-Esplá, D., Requena, T., Peláez, C. (2001) Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 189–195.
- Amárita, F., Yvon, M., Nardi, M., Chambellon, E., Delettre, J., Bonnarme, P. (2004) Identification and functional analysis of the gene encoding methionine-gamma-lyase in *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7348–7354.
- Amárita, F., De la Plaza, M., Fernández de Palencia, P., Requena, T., Peláez, C. (2006) Cooperation between wild lactococcal strains for cheese aroma formation. *Food Chem.* 94: 240-246.
- Andersen, A.W., Elliker, P.R. (1953) The nutritional requirements of lactic streptococci isolated from starter cultures. I. Growth in a synthetic medium. *J. Dairy Sci.* 36: 161–167.
- Andersson, J.O., Andrew, J.R. (2003) Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes. *BMC Evol. Biol.* 3: 14.
- Arctander, S. (1994). *Perfume and flavour chemicals (aroma chemicals)*. Carol Stream, IL, USA: Allured Publishing Cooperation.
- Ardö, Y. (2006) Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnol. Adv.* 24: 238-242.
- Arfi, K., Amarita, F., Spinnler, H.E., Bonnarme, P. (2003) Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. *J. Biotechnol.* 105: 245–253.
- Arfi, K., Landaud, S., Bonnarme, P. (2006) Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2155-2162.

- Atilas, M.W., Dudley, E.G., Steele, J.L. (2000) Gene cloning, sequencing, and inactivation of the branched-chain aminotransferase of *Lactococcus lactis* LM0230. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2325-2329.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J.T., Smit, G. (1999) Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int. Dairy J.* 9, 725–735.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2000) Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *Int. Dairy J.* 10: 169–179.
- Ayad, E.H.E. (2008) Biodiversity of lactococci in flavour formation for dairy products innovation. *Alex. J. Food Sci. Technol. Special volume conference*, pp.: 31-43.
- Bachmann, H., Starrenburg, M.J.C., Dijkstra, A., Molenaar, D., Kleerebezem, M., Rademaker, J.L.W., van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2009) Regulatory phenotyping reveals important diversity within the species *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5687-5694.
- Banks, J.M., Brechany, E.Y., Christie, W.W., Hunter, E.A., Muir, D.D. (1992) Volatile components in steam distillates of Cheddar cheese as indicator indices of cheese maturity, flavour and odour. *Food Res. Int.* 25: 365–373.
- Banks, J.M., Yvon, M., Gripon, J.C., De la Fuente, M.A., Brechany, E.Y., Williams, A.G., Muir, Donald, D. (2001) Enhancement of amino acid catabolism in Cheddar cheese using α -ketoglutarate: Amino acid degradation in relation to volatile compounds and aroma character. *Int. Dairy J.* 11: 235-243.
- Barayni, J., Roberts, T.A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 277–294.
- Barbieri, G., Bolzoni, I., Careri, M., Parolari, G., Spagnoli, S., Virgili, R. (1994) Study of the volatile fraction of Parmesan cheese. *J. Agr. Food Chem.* 42: 1170–1176.
- Beresford, T., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. (2001) Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11: 259-274.

- Beresford, T., Williams, A. (2004) The microbiology of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.) Elsevier, London. Vol 1: General Aspects, 3rd edn., pp.: 287–318.
- Bernard, N., Johnson, K., Ferain, T., Garmyn, D., Hols, P., Holbrook, J.J., Delcour, J. (1994) NAD⁺-dependant D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase of *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus*. Gene cloning and enzyme characterization. *Eur. J. Biochem.* 224: 439–446.
- Bhowmik, T., Steele, J.L. (1994) Cloning, characterization and insertional inactivation of the *Lactobacillus helveticus* D(-) lactate dehydrogenase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 432–439.
- Bills, D.D., Morgan, M.E., Libbey, L.M., Day, E.A. (1965) Identification of compounds responsible for fruity flavor defect of experimental Cheddar cheeses. *J. Dairy Sci.* 48: 1168–1173.
- Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S.D., Maguin, E. (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 175: 3628–3635.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malmgren, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731–753.
- Bonnarme, P., Lapadatescu, C., Yvon, M., Spinnler, H.E. (2001) L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *J. Dairy Res.* 68: 663–674.
- Bonnarme, P., Amárita, F., Chambellon, E., Semon, E., Spinnler, H.E., Yvon, M. (2004) Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from L-methionine by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 236: 85–90.
- Bosset, J.O., Gauch, R. (1993) Comparison of the volatile flavour compounds of six European-AOC-cheeses by using a new dynamic headspace GC–MS method. *Int. Dairy J.* 3: 359–377.
- Bounaix, S., Benachour, A., Novel, G. (1996) Presence of lactose genes and insertion sequences in plasmids of minor species of the genus *Lactococcus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1112–1115.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brandsma, J.B., Floris, E., Dijkstra, A.R.D., Rijnen, L., Wouters, J.A., Meijer, W.C. (2008) Natural diversity of aminotransferases and dehydrogenase activity in a large collection of *Lactococcus lactis* strains. *Int. Dairy J.* 18: 1103-1108.
- Broadbent, J.R.S., Gummalla, J.E., Hughes, M.E., Johnson, S.A., Rankin, Drake, M.A. (2004) Overexpression of *Lactobacillus casei* D-hydroxyisocaproic acid dehydrogenase in cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4814-4820.
- Bruinenberg, P.G., De Roo, G., Limsowtin, G. (1997) Purification and Characterization of Cystathionine γ -Lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: Possible Role in Flavor Compound Formation during Cheese Maturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 561-566.
- Brunhuber, N.M.W., Blanchard, J.S. (1994) The biochemistry and enzymology of amino acid dehydrogenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29: 415-467.
- Carunchia-Whetstine, M.E., Croissant, A.E., Drake, M.A. (2005) Characterization of dried whey protein concentrate and isolate flavour. *J. Dairy Sci.* 88: 3826-3839.
- Chambellon, E., Yvon, M. (2003) CodY-regulated aminotransferases AraT and BcaT play a major role in the growth of *Lactococcus lactis* in milk by regulating the intracellular pool of amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3061-3068.
- Chambellon, E., Rijnen, L., Lorquet, F., Gitton, C., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Wouters, J. A., Yvon, M. (2009) The D-2-hydroxyacid dehydrogenase incorrectly annotated PanE is the sole reduction system for branched-chain 2-keto acids in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 191: 873-881.
- Chammas, G.I., Saliba, R., Corrieu, G., Béal, C. (2006) Characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *Int. J. Food Microbiol.* 110: 52-61.
- Christensen, J.E., Johnson, M.E., Steel, J.L. (1995) Production of Cheddar cheese using a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. *Int. Dairy J.* 5: 367-379.

- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 217-246.
- Chopin, A. (1993) Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12: 21-38.
- Chou, L.S., Weimer, B.C., Cutler, R. (2001) Relationship of arginine and lactose utilization by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ML3. *Int. Dairy J.* 11: 253-258.
- Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Novak, L., Lindley, N.D., Loubiere, P. (1995) Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 108-116.
- Cogan, T.M. (1987) Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: Effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 551-558.
- Cogan, T.M., Daly, C. (1987) Cheese starter cultures. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F. (ed.) Chapman & Hall, London. Vol. 1, 2nd edn.
- Cogan, T.M., Hill, C. (1993) Cheese starter cultures. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F. (ed.) Chapman & Hall, London. Vol 1: General Aspects, 2nd edn., pp.: 193-256.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gómez, J., Gómez, R., Kalantzopoulos, G.H., Ledda, A.I., Medina, M.F., Rea, M.C.A, Rodriguez, E. (1997) Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64: 409-421.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13: 841-866.
- Collomb, M., Spahni, M. (1996) Revue des méthodes de dosage des produits d'oxydation des lipides, principalement des lipides des produits laitiers. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung*, 25: 3-24.
- Conrad F.D., Owen, C.M., Patterson, J. (2004) Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensm. Wiss. Technol.* 37: 139-154.

- Creamer, L.K., Lawrence, R.C., Gilles, J. (1985) Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 20: 185–203.
- Crow, V.L., Coolbear, T., Holland, R., Pritchard, G.G., Martley, F.G. (1993) Starters as finishers: Starter properties relevant to cheese ripening. *Int. Dairy J.* 3: 423–460.
- Cuer, A., Dauphin, G., Kergomard, A. (1979) Production of S-methylthioacetate by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 332–334.
- Curioni, P.M.G., Bosset, J.O. (2002) Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy J.* 12: 959–984.
- Curtin, A.C., De Angelis, M., Cipriani, M., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Gobbetti, M. (2001) Amino acid catabolism in cheese-related bacteria: selection and study of the effects of pH, temperature and NaCl by quadratic response surface methodology. *J. Appl. Microbiol.* 91: 312–321.
- Curtin, A.C., McSweeney, P.L.H. (2004) Catabolism of amino acids in cheese during ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.) Elsevier Academic Press, London, UK. Vol 1: General Aspects, 3rd edn., pp.: 435–454.
- Dacremont, C., Vickers, A. (1994) Concept matching technique for assessing importance of volatile compounds for Cheddar cheese aroma. *J. Food Sci.* 59: 981–985.
- De Angelis, M., Calasso, M., Di Cagno, R., Siragusa, S., Minervini, F., Gobbetti, M. (2010) NADP-glutamate dehydrogenase activity in nonstarter lactic acid bacteria: Effects of temperature, pH and NaCl on enzyme activity and expression. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1763–1774.
- De la Plaza, M., Fernández de Palencia, P., Peláez, C., Requena, T. (2004) Molecular characterization of α -ketoisovalerate decarboxylase, an enzyme involved in the formation of aldehydes from amino acids by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 367–374.
- De la Plaza, M., Rodríguez, A., Fernández De Palencia, P., Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C., Requena, T. (2006) Discrepancies between the phenotypic and genotypic characterization of *Lactococcus lactis* cheese isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 637–644.

- De la Plaza, M., Peláez, C., Requena, T. (2009) Regulation of α -ketoisovalerate decarboxylase expression in *Lactococcus lactis* IFPL730. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 17: 96-100.
- Delcour, J., Bernard, N., Garmyn, D., Ferain, T., Hols, P. (1993) Génétique moléculaire des lactate-déshydrogénases des bactéries lactiques. Lait, 73: 127–131.
- Delorme, C., Ehrlich, S.D., Renault, P. (1999) Regulation of expression of the *Lactococcus lactis* histidine operon. J. Bacteriol. 181: 2026–2037.
- den Hengst, C.D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O.P., Kok, J. (2005a) Probing direct interactions between CodY and the *oppD* promoter of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 187: 512–521.
- den Hengst, C.D., van Hijum, S.A.F.T., Geurts, J.M.W., Nauta, A., Kok, J., Kuipers, O.P. (2005b) The *Lactococcus lactis* CodY regulon: identification of a conserved *cis*-regulatory element. J. Biol. Chem. 280: 34332–34342.
- den Hengst, C. D., Groeneveld, M., Kuipers, O. P., Kok, J. (2006). Identification and functional characterization of the *Lactococcus lactis* CodY-regulated branched-chain amino acid permease BcaP (CtrA). J. Bacteriol. 188: 3280–3289.
- Detmers, F.J., Kunji, E.R., Lanfermeijer, F.C., Poolman, B., Konings, W.N. (1998) Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. Biochemistry, 37: 16671–16679.
- De Vos, W.M., Simons, G.F.M. (1994) Gene cloning and expression systems in Lactococci. In Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Gasson, M.J., De Vos, W.M. (ed.) Blackie Academic & Professional; Glasgow, UK. pp.: 52–105.
- Dias, B., Weimer, B.C. (1998a) Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacilli, and brevibacteria. Appl Environ Microbiol. 64: 3320–3326.
- Dias, B., Weimer, B.C. (1998b) Purification and characterization of L-methionine γ -lyase from *Brevibacterium linens* BL2. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3327–3331.
- Dias, B., Weimer, B.C. (1999) Production of volatile sulfur compounds in Cheddar cheese slurries. Int. Dairy J. 9: 605-611.
- Dieuleveux, V., Gueguen, M. (1998) Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese. J. Food Prot. 61: 1281–1285.

- Dobric, N., Limsowtin, G.K., Hillier, A.J., Dudman, N.P., Davidson, B.E. (2000) Identification and characterization of a cystathionine β/γ -lyase from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363. FEMS Microbiol. Lett. 182: 249-254.
- Doeven, M.K, Kok, J., Poolman, B. (2005) Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. Mol. Microbiol. 57: 640–649.
- Dressaire, C., Redon, E., Milhem, H., Besse, P., Loubière, P., Cocaigh-Bousquet, M. (2008) Growth rate regulated genes and their wide involvement in the *Lactococcus lactis* stress responses. BMC Genomics, 9: 343-356.
- Dressaire, C., Redon, E., Gitton, C., Loubière, P., Monnet, V., Cocaigh-Boousquet, M. (2011) Investigation of the adaptation of *Lactococcus lactis* to isoleucine starvation integrating dynamic transcriptome and proteome information. Microb. Cell Fact. 10: S18-29.
- Dudley, E., Steele, J. (2001) *Lactococcus lactis* LM0230 contains a single aminotransferase involved in aspartate biosynthesis, which is essential for growth in milk. Microbiology, 147: 215-224.
- Dunn, H.C., Lindsay, R.C. (1985) Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 68: 2859–2874.
- Engels, W.J.M., Visser, S. (1994) Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavour of different types of cheese. Neth. Milk Dairy J. 48: 127–140.
- Engels, W.J.M. (1997) Volatile and non volatile compounds in ripened cheese: their formation and their contribution to flavour. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- Engels, W.J.M., Alting, A.C., Arntz, M.M.T.G., Gruppen, H., Voragen, A.G.J., Smit, G., Visser, S. (2000) Partial purification and characterization of two aminotransferases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 involved in the catabolism of methionine and branched-chain amino acids. Int. Dairy J. 10: 443–452.
- Ferchichi, M., Hemme, D., Nardi, M., Pamboukgjian, N. (1985) Production of methanethiol from methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. J. Gen. Microbiol. 131: 715–723.

- Fernández, L., Beerthuyzen, M.M., Brown, J., Siezen, R.J., Coolbear, T., Holland, R., Kuipers, O.P. (2000a) Cloning, characterization, controlled overexpression, and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1360-1368.
- Fernández, M., van Doesburg, W., Rutten, G.A., Marugg, J.D., Alting, A.C., van Kranenburg, R., Kuipers, O.P. (2000b) Molecular and functional analyses of the *metC* gene of *Lactococcus lactis*, encoding cystathionine β -lyase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 42-48.
- Fernández, M., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., Siezen, R.J. and van Kranenburg, R. (2002) Regulation of the *metC-cysK* operon, involved in sulfur metabolism in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 184: 82-90.
- Fernández, M., Zúñiga, M. (2006) Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology.* 32: 155-183.
- Fernández de Palencia, P., De la Plaza, M., Amárta, F., Requena, T., Peláez, C. (2006) Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 88-93.
- Fernández-Esplá, M.D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F. (2000) *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4772-4778.
- Fontecha, J., Peláez, C., Juárez, M., Requena, T, Gómez, C., Ramos, M. (1990) Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J. Dairy Sci.* 73: 1150-1157.
- Folkertsma, B., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (1996) Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *Int. Dairy J.* 6: 1117-1134.
- Fox, P.F. (1989) Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72: 1379-1400.
- Fox, P.F., Lucey, J.A., Cogan, T.M. (1990) Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29: 237-253.
- Fox, P.F. (1993) Cheese: an overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F. (ed.) Vol. 1, Chapman & Hall, London.

- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (1996) Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev. Int.* 12: 457-509.
- Fox, P.F., Wallace, J.M., Morgan, S., Lynch, C.M., Niland, E.J., Tobin, J. (1996) Acceleration of cheese ripening. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 271–297.
- Fox, P.F., Wallace, J.M. (1997) Formation of flavour compounds in cheese. *Adv. Appl. Microbiol.* 45: 17-85.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2000) *Fundamentals of Cheese Science*. AN Aspen Publishers Inc., USA.
- Frees, D., Varmanen, P., Ingmer, H. (2001) Inactivation of a gene that is highly conserved in gram-positive bacteria stimulates degradation of non-native proteins and concomitantly increases stress tolerance in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 41: 93–103.
- Fujiwara, S. (2002) Extremophiles: developments of their special functions and potential resources. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 518–525.
- Gallardo-Escamilla, F.J., Kelly, A.L., Delahunty, C.M. (2005) Influence of starter culture on flavour and headspace volatile profiles of fermented whey and whey produced from fermented milk. *J. Dairy Sci.* 88: 3745-53.
- Ganesan, B., Seefeldt, K., Koka, R.C., Dias, B., Weimer, B.C. (2004a) Monocarboxylic acid production by lactococci and lactobacilli. *Int Dairy J.* 14:237–246.
- Ganesan, B., Seefeldt, K., Weimer, B.C. (2004b) Fatty acid production from amino acids and alpha-keto acids by *Brevibacterium linens* BL2. *Appl Environ Microbiol.* 70: 6385–6393.
- Ganesan, B., Weimer, B.C. (2007) Amino acid metabolism in relationship to cheese flavor development. In *Improving the flavour of cheese*. Weimer, B.C. (ed.) Woodhead Publishing & CRC Press, USA. pp: 70-101.
- Gao, Y., Lu, Y., Teng, K.L., Chen, M.L., Zheng, H.J, Zhu, Y.Q., Zhong, J. (2011) Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women. *J. Bacteriol.* 193: 2886-2887.
- Gao, S., Oh, D.H., Broadbent, J.R., Johnson, M.E., Weimer, B.C., Steele, J.L. (1997) Aromatic amino acid catabolism by lactococci. *Lait*, 77: 371–381.

- Gao, S., Mooberry, E.S., Steele, J.L. (1998) Use of ^{13}C nuclear magnetic resonance and gas chromatography to examine methionine catabolism by lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4670–4675.
- Gao, S., Steele, J.L. (1998) Purification and characterization of oligomeric species of an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3. *J. Food Biochem.* 22: 197–211.
- Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., Monnet, V. (2002) Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 277: 32–39.
- García-Cayuela, T. (2011) Estudio de la expresión de enzimas del metabolismo de aminoácidos en *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España.
- García-Quintáns, N., Magni, C., de Mendoza, D., López, P. (1998) The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis is induced by acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:850–857.
- García-Quintáns, N., Repizo, G., Martín, M., Magni, C., López, P. (2008) Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1988–1996.
- Garde, S., Ávila, M., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M. (2006) Proteolysis of Hispanico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 639. *J. Dairy Sci.* 89: 840–849.
- Garvie, E.I. (1980) Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* 44: 106–139.
- Gasson, M.J. (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1–9.
- Gaudu, P., Lamberet, G., Poncet, S., Gruss, A. (2003) CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 50: 183–92.
- Gitton, C., Meyrand, M., Wang, J., Caron, C., Trubuil, A., Guillot, A., Mistou, M.Y. (2005) Proteomic signature of *Lactococcus lactis* NCDO763 cultivated in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7152–7163.

- Gobbetti, M., Lanciotti, R., De Angelis, M., Corbo, M.R., Massini, R., Fox, P.F. (1999a) Study of the effects of temperature, pH, NaCl and a_w on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 795-809.
- Gobbetti, M., Lanciotti, R., De Angelis, M., Corbo, M.R., Massini, R., Fox, P.F. (1999b) Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. *Int. Dairy J.* 9: 865-875.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizello, G. (2007) The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese. In *Improving the flavour of cheese*. Weimer, B. C. (ed) Woohed Publishing & CRC Press, USA. pp.: 121-156.
- Godon, J.J., Chopin, M.C., Ehrlich, S.D. (1992) Branched-chain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.* 174: 6580-6589.
- Godon, J.J., Delorme, C., Bardowski, J., Chopin, M.C., Ehrlich, S.D., Renault, P. (1993) Gene inactivation in *Lactococcus lactis* branched-chain amino acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 4383-4390.
- Golic, N., Schliekelmann, M., Fernández, M., Kleerebezem, M., van Kranenburg, R. (2005) Molecular characterization of the CmbR activator-binding site in the metC-cysK promoter region in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 151: 439-446.
- González-Crespo, J., Mas, M. (1993) Use of wild strain starter cultures in manufacture of pressed curd goat cheese from pasteurized milk. *Alimentaria*, 243:51-3.
- Goupil-Feuillerat, N., Coccagn-Bousquet, M., Godon, J.J., Ehrlich, S.D., Renault, P. (1997) Dual role of alpha-acetolactate decarboxylase in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.* 179: 6285-6293.
- Goupil-Feuillerat, N., Corthier, G., Godon, J.J., Ehrlich, S.D., Renault, P. (2000) Transcriptional and translational regulation of alpha-acetolactate decarboxylase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.* 182: 5399-5408.
- Guédon, E., Jamet, E., Renault, P. (2001a) Gene regulation in *Lactococcus lactis*: the gap between predicted and characterized regulators. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 93-112.

- Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, D., Delorme, C. (2001b) Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J. Bacteriol.* 183: 3614–3622.
- Guédon, E., Serror, P., Ehrlich S.D., Renault, P., Delorme, C. (2001c) Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol.* 40: 1227-1239.
- Guédon, E., Sperandio, B.C., Pons, M., Ehrlich, S.D., Renault, P. (2005) Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiology.* 151: 3895–3909.
- Guinee, T.P., Fox, P.F. (2004) Salt in cheese: Physical, chemical and biological aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.) Elsevier Academic Press, London, UK. Vol. 1: General Aspects, 3rd edn., pp.: 207–259.
- Gummalla, S., Broadbent, J.R. (1996) Indole production by *Lactobacillus spp.* in cheese: a possible role for tryptophanase. *J. Dairy Sci.* 79: 101.
- Gummalla, S., Broadbent, J.R. (1999) Tryptophan catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* cheese flavor adjuncts. *J. Dairy Sci.* 82: 2070-2077.
- Gutiérrez-Méndez, N., Valenzuela-Soto, E., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B. (2008) α -Ketoglutarate biosynthesis in wild and industrial strains of *Lactococcus lactis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 202-207.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA cloning: a practical approach*. D. M. Glover (ed.) IRL Press, Oxford. Vol. 1, pp.: 109-135.
- Hanniffy, S.B., Peláez, C., Martínez-Bartolomé, M.A., Requena, T., Martínez-Cuesta, M.C. (2009) Key enzymes involved in methionine catabolism by cheese lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 223-230.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996) Quantitative Real Time PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.
- Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D., Yvon, M. (2004) Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3855-3861.

- Hemme, D., Bouillane, C., Metro, E., Desmazeaud, M.J. (1982) Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sci. Aliments*, 2: 113-123.
- Hickey, M.W., Hillier, A.J., Jago, G.R. (1983) Enzymic activities associated with lactobacilli in dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.* 38: 154–157.
- Hill, A.R. (2007) Physical factors affecting flavour of cheese. In *Improving the flavour of cheese*. Weimer, B.C. (ed.) Woohed Publishing & CRC Press, USA. pp.: 252-283.
- Hofmann, T., Schieberle, P. (2000) Formation of aromaactive Strecker-aldehydes by a direct oxidative degradation of Amadori compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4301–4305.
- Holo, H., Nes, I.F. (1989) High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3119–3123.
- Hughenoltz, J. (1993) Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 165-178.
- Hughenoltz, J., van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2007) Monitoring cheese ripening: new developments. In *Improving the flavor of cheese*. Weimer, B. C. (ed.) Woohed Publishing & CRC Press, USA. pp.: 352-369.
- Hullo M.F., Auger, S., Soutourina, O., Barzu, O., Yvon, M., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. (2007) Conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation. *J. Bacteriol.* 189: 187-197.
- Hummel, W., Schütte, H., Kula, M.H. (1985) D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. A new enzyme suitable for stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 7–15.
- Hummel, W., Schütte, H., Kula, M.H. (1988) D-(-)-mandelic acid dehydrogenase from *Lactobacillus curvatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 433–439.
- Imhof, R., Glaettli, H., Bosset, J.O. (1995) Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures. *Lebens. Wiss. Tech.* 28: 78–86.
- Irlinger, F., Mounier, J. (2009) Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 142-148.

- Izco, J. M., Torre, P. (2000) Characterization of Roncal cheese volatile flavour compounds extracted by the purge and trap method and analysed by GC-MS. *Food Chem.* 70: 409–417.
- Jollivet, N., Blezenger, M.C., Vayssier, Y., Belin, J.M. (1992) Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 790–794.
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E.R.S., Jeronimus-Stratingh, C.M., Bruins, A.P., Konings, W.N. (1995) The extracellular P₁-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.* 177: 3472-3478.
- Kagkli, D.M., Bonnarme, P., Neuvéglise, C., Cogan, T.M., Casaregola, S. (2006) L-Methionine degradation pathway in *Kluyveromyces lactis*: identification and functional analysis of the genes encoding L-methionine aminotransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3330-3335.
- Kallwass, H.K.W. (1992) Potential of R-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* for stereospecific reductions. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 28–35.
- Kaminogawa, S., Yamauchi, K., Miyazawa, S., Koga, Y. (1980) Degradation of casein components by acid protease of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 63: 701–704.
- Kelly, M., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (1996) Effect of salt-in-moisture on proteolysis in Cheddar-type cheese. *Milchwissenschaft*, 51: 498-501.
- Kelly, W.J., Ward, L.J.H., Leahy, S.C. (2010) Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biol. Evol.* 2: 729–744.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Olsen, K., Langsrud, T. (2001) Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavour development in cheese. *Int. Dairy J.* 11: 217-224.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Yvon, M. (2003) Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 734-739.

- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Le-Bars, D., Yvon, M. (2004) The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *Int. Dairy J.* 14: 227–235.
- Kieronczyk, A., Cachon, R., Feron, G., Yvon, M. (2006) Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 101: 1114–1122.
- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. (2003) Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 232–237.
- Kosikowski, F.V., Mistry, V.V. (1999) Cheese and fermented milk foods. In *Origins and principles*. Kosikowski, F.V (ed.) Vol. 1, 3rd (edn.) LLC, Great Falls, VA.
- Kubickova, J., Grosch, W. (1997) Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *Int. Dairy J.* 7: 65–70.
- Kunji, E.R.S., Ubbink, T., Matin, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1993) Physiological responses of *Lactococcus lactis* ML3 to alternating conditions of growth and starvation. *Arch. Microbiol.* 159: 372–379.
- Kunji, E.R., Mierau, S., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1996) The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 187–221.
- Laing, D., Jinks, A. (1996) Flavour perception mechanisms. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 387–389.
- Lamberet, G., Auberger, B., Bergère, J.L. (1997) Aptitude of cheese bacteria for volatile *S*-methyl thioester synthesis I. Effect of substrates and pH on their formation by *Brevibacterium linens* GC171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 279–283.
- Lapujade, P., Coccagn-Bousquet, M., Loubière, P. (1998) Glutamate biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2485–2489.
- Larsen, R., Buist, G., Kuipers, O.P., Kok, J. (2004) ArgR and AhrC are both required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 186: 1147–1157.

- Larsen, R., Kloosterman, T.G., Kok, J., Kuipers, O.P. (2006) GlnR-mediated regulation of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 188: 4978-4982.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Visconti, A. (2003) Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Appl. Environ. Microbiol. 69: 634-640.
- Law, B.A., Mulholland, F. (1995) Enzymology of lactococci in relation to flavor development from milk proteins. Int. Dairy J. 5: 833-854.
- Law, B.A. (2001) Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. Int. Dairy J. 11: 383-398.
- Law, J., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Fox, P.F., Farkye, N.Y. (1992) Proteolysis and flavor development in Cheddar cheese made with the single starter strains *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* UC317 or *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP. J Dairy Sci. 75: 1173-1185.
- Law, J., Haandrikman, A. (1997) Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 7: 1-11.
- Lawlor, J.B., Delahunty, C.M., Wilkinson, M.G., Sheehan, J. (2001) Relationships between the sensory characteristics, neutral volatile composition and gross composition of ten cheese varieties. Lait, 81: 487-507.
- Le Bars, D., Yvon, M. (2008) Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. J. Appl. Microbiol. 104: 171-177.
- Lee, Y.L., Chen, J.C., Shaw, J.F. (1997) The thioesterase I of *Escherichia coli* has arylesterase activity and shows stereospecificity for protease substrates. Biochem. Biophys. Res. Commun. 231: 452-456.
- Linares, D., Kok, J., Poolman, B. (2010) Genome sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. J. Bacteriol. 192: 5806-5812.
- Lister, J. (1878) On the lactic fermentation and its bearing to pathology. Transactions of the Pathological Society of London. 29: 425-467.
- Liu, M., Siezen, R.J. (2006) Comparative genomics of flavour-forming pathways in lactic acid bacteria. Aust. J. Dairy Technol. 61: 61-68.

- Liu, M., Nauta, A., Francke, C., Siezen, R.J. (2008) Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4590-4600.
- Llanos, R.M., Hillier, A.J., Davidson, B.E. (1992) Cloning, nucleotide sequence, expression, and chromosomal location of *ldh*, the gene encoding L-(+)-lactate dehydrogenase, from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 174: 6956–6964.
- Maarse, H., Visscher, C.A. (1989) Volatile compounds in food. Qualitative and quantitative data (6th ed.). Central Institute for Nutrition and Food Research TNO-CIVO, Zeist, The Netherlands.
- Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, S.D., Gruss, A. (1992) New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 17: 5633–5638.
- Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, S.D., Gruss, A. (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 931–935.
- Mailloux, R.J., Singh, R., Brewer, G., Auger, C., Lemire, J., Appanna, V.D. (2009) α -Ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant α -ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 191: 3804-3810
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 15611-15616.
- Makarova, K. S., Koonin, E. V. (2007) Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 189: 1199–1208.
- Manning, D.J. (1979a) Cheddar cheese flavour studies. II. Relative flavour contributions of individual volatile components. *J. Dairy Res.* 46: 253-259.

- Manning, D.J. (1979b) Chemical production of essential Cheddar flavour compounds. *J. Dairy Res.* 46: 531-537.
- Marilley, L., Casey, M.G. (2004) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 139-159.
- Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C., Eagles, J., Gasson, M.J., Requena, T., Hanniffy, S. (2006) YtjE from *Lactococcus lactis* IL1403 is a C-S lyase with α,γ -elimination activity toward methionine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4878-4884.
- Martins, S.I.F.S., Jongen, W.M.F., Boekel, M.J.A.S. (2000) A review of maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 364-373.
- Mauriello, G., Moio, L., Moschetti, G., Piombino, P., Addeo, F., Coppola, S. (2001) Characterization of lactic acid bacteria strains on the basis of neutral volatile compounds produced in whey. *J. Appl. Microbiol.* 90: 928-942.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Olson, N.F. (1995) Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: preliminary observations and comparison with chymosin. *Int. Dairy J.* 5: 321-336.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (1997) Methods used to assess proteolysis in cheese. *Lait*, 77: 41-76.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *Le Lait*, 80: 293-324.
- Mendia, C., Ibáñez, F.J., Torre, P., Barcina, Y. (2000) Effect of pasteurization and use of a native starter culture on proteolysis in a ewe's milk cheese. *Food Control*, 11: 195-200.
- Mistry, V.V. (2007) The effects of milk, its ingredients and salt on cheese flavour. In *Improving the flavour of cheese*. Weimer, B.C. (ed.) Woodhead Publishing & CRC Press, USA. pp.: 70-101.
- Miñambres, B., Olivera, E.R., Jensen, R.A., Luengo, J.M. (2000) A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biol. Chem.* 275: 39529-39542.

- Moio, L., Dekimpe, J., Etievant, P.X., Addeo, F. (1993) Volatile flavour compounds of water buffalo Mozzarella cheese. *Ital. J. Food Sci.* 5: 57–68.
- Moio, L., Piombino, P., Addeo, F. (2000) Odour-impact compounds in Gorgonzola cheese. *J. Dairy Res.* 67: 273–285.
- Molimard, P., Spinnler, H.E. (1996) Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: Origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79: 169–184.
- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P.M. (2003) Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe's milk cheese. *Int. Dairy J.* 13: 201–209.
- Morishita, T., Yajima, M. (1995) Incomplete operation of biosynthetic and bioenergetic functions of the citric acid cycle in multiple auxotrophic lactobacilli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 251–255.
- Mülder H. (1952) Taste and flavour-forming substances in cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 6: 157–167.
- Muñoz, N., Ortigosa, M., Torre, P., Izco, J.M. (2003) Free amino acids and volatile compounds in ewe's milk cheese as affected by seasonal and cheese-making plant variations. *Food Chem.* 83: 329–338.
- Nardi, M., Fiez Vandal, C., Tailliez, P., Monnet, V. (2002) The EstA esterase is responsible for the main capacity of *Lactococcus lactis* to synthesize short chain fatty acid esters in vitro. *J. Appl. Microbiol.* 93: 994–1002.
- Nierop Groot, M.N., De Bont, J.A.M. (1998) Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3009–3013.
- Nosova, T., Jousimies Somer, H., Jokelainen, K., Heine, R., Salaspuro, M. (2000) Acetaldehyde production and metabolism by human indigenous and probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Alcohol Alcoholism*, 35: 561–568.
- Nuñez, M., Medina, M., Gaya, P. (1989) Ewes' milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *J. Dairy Res.* 56: 303–21.
- O'Connor, C.B. (1971) Composition and quality of some commercialized Cheddar cheese. *Irish Agric. Creamery Rev.* 24: 5-6.

- Oku, H., Kaneda, T. (1988) Biosynthesis of Branched-chain Fatty Acids in *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 264: 18386-18396.
- O'Mahony, J.A., Sheehan, E.M., Delahunty, C.M., McSweeney, P.L.H. (2006) Lipolysis and sensory characteristics of Cheddar cheeses ripened using different temperature-time treatments. Lait, 86: 59-72.
- Ong, L., Shah, N.P. (2009) Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperatures on proteolysis and sensory characteristics of cheddar cheeses. J. Food Sci. 74: 182-191.
- Ortigosa, M., Torre, P., Izco, J.M. (2001) Effect of pasteurization of ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of Roncal cheese. J. Dairy Sci. 84: 1320-1330.
- Otto, R., ten Brink, V., Veldkamp, H., Koenings, W.N. (1983) The relationship between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. FEMS Microbiol. Lett. 18: 69-74.
- Panke, S., Held, M., Wubbolts, M. (2004) Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. Curr. Opin. Biotechnol. 15: 272-279.
- Parente, E, Cogan, T.M. (2004) Starter cultures: general aspects. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Fox, P.F, McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.) Elsevier Academic Press, London, UK. Vol 1: General Aspects, 3rd edn., pp.: 123-148.
- Parliment, T.H., Kolor, M.G., Rizzo, D.J. (1982) Volatile components of Limburger cheese. J. Agr. Food Chem. 30: 1006-1008.
- Pavlidou, S., Bozoudi, D., Hatzikamari, M., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. (2011) Differentiation of lactococci from 2 greek cheeses with protected designation of origin by phenotypic criteria and RAPD-PCR. J. Food Sci. 76: M175-M183.
- Pedersen, M.B., Iversen, S.L., Sorensen, K.I., Johansen, E. (2005) The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 29: 611-624.
- Peláez, C., Requena, T. (2005) Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. Int. Dairy J. 15: 831-844.

- Petranovic, D., Guédon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D., Renault, P. (2004) Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol. Microbiol.* 53: 613–621.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2002-2007.
- Pieniazek, D., Grabarek, Z., Rakowska, M. (1975) Quantitative determination of the content of available methionine and cysteine in food proteins. *Nutr. Metab.* 18: 16–22.
- Poolman, B., Konings, W.N. (1988) Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to amino acid transport. *J. Bacteriol.* 170: 700-707.
- Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., Schleifer, K.H. (1994) Taxonomy of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Vuyst, L., Vandamme, E.J. (ed.) Blackie Academic & Professional, New York. pp.: 13-89.
- Rallu, F., Gruss, A., Maguin, E. (1996) *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 243-251.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K. W., Sonenshein, A. L. (2001) *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev.* 15: 1093–1103.
- Randazzo, C.L., Pitino, I., De Luca, S., Scifò, G.O., Caggia, C. (2008) Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 269-278.
- Randazzo, C.L., Pitino, I., Ribbera, A., Caggia, C. (2010) Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiol.* 27: 363-374.
- Raya, R., Bardowski, J., Andersen, P.S., Ehrlich, S.D., Chopin, A. (1998) Multiple transcriptional control of the *Lactococcus lactis* *trp* operon. *J. Bacteriol.* 180: 3174–3180.
- Reed, L.J. (1974) Multienzyme complexes. *Acc. Chem. Res.* 7: 40–46.
- Rehn, U., Vogensen, F.K., Persson, S.E., Hallin Saedén, K., Nilsson, B.F., Ardö, Y. (2011) Influence of microflora on texture and contents of amino acids, organic acids, and volatiles in semi-hard cheese made with DL-starter and propionibacteria. *J. Dairy Sci.* 94: 1098-1111.

- Reiter, B., Oram, J.D. (1962) Nutritional studies on cheese starters. *J. Dairy Res.* 29: 63–77.
- Reitzer, L.J. (1996) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C. (ed.), ASM Press, Washington, DC. Vol. 1, 2nd edn., pp.: 391–407.
- Renault, P., Corthier, G., Goupil, N., Delorme, C., Ehrlich, S.D. (1996) Plasmid vectors for Gram-positive bacteria switching from high to low copy number. *Gene*, 183: 175–182.
- Requena, T., McKay, L.L. (1993) Plasmid profiles and relationship to lactose utilization/proteinase activity in a lactococcal strain isolated from semi-hard natural cheese. *Milchwissenschaft*, 48: 264–268.
- Requena, T., Peláez, C. (2007) Influencia en el aroma de queso del catabolismo de aminoácidos por *Lactococcus lactis*. *SEM*. 44: 18-23.
- Rijnen, L., Bonneau, S., Yvon, M. (1999a) Genetic characterization of the major lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4873–4880.
- Rijnen, L., Delacroix Buchet, A., Demaizieres, D., Le Quere, J.L., Gripon, J.C., Yvon, M. (1999b) Inactivation of lactococcal aromatic aminotransferase prevents the formation of floral aroma compounds from aromatic amino acids in semihard cheese. *Int. Dairy J.* 9: 877–885.
- Rijnen, L., Courtin, P., Gripon, J.C., Yvon M. (2000) Expression of a heterologous glutamate dehydrogenase gene in *Lactococcus lactis* highly improves the conversion of amino acids to aroma compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1354-1359.
- Rijnen, L., Yvon, M., van Kranenburg, R., Courtin, P., Verheul, A., Chambellon, E., Smit, G. (2003) Lactococcal aminotransferases AraT and BcaT are key enzymes for the formation of aroma compounds from amino acids in cheese. *Int. Dairy J.* 13: 805–812.
- Rizzi, G.P. (1998) The Strecker degradation and its contribution to food flavor. In *Flavor chemistry: 30 years of progress*. Teranishi, R., Wick, E.L., Hornstein, I. (eds.) Springer. pp: 335-445.

- Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., Gelfand, M.S. (2004) Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems. *Nucleic Acids Res.* 32: 3340-3353.
- Roger, S., Degas, C., Gripon, J.C. (1988) Production of phenyl ethyl alcohol and its esters during ripening of traditional Camembert. *Food Chem.* 28: 1-12.
- Rollan, G.C., Manca de Nadra, M.C., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G. (1989) Aspartate metabolism in *Lactobacillus helveticus* CRL581. I - Aspartate aminotransferase. *Microbiol. Alim. Nutr.* 7: 101-106.
- Roudot-Algaron, F., Yvon, M. (1998) Aromatic and branched chain amino acids catabolism in *Lactococcus lactis*. *Lait*, 78:23-30.
- Russell, N.J., Gould, G.W. (1991) Food Preservatives. Russell, N.J., Gould, G.W. (eds.) Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Rutherford, S.M., Moughan, P.J. (1998) The digestible amino acid composition of several milk proteins: application of a new bioassay. *J. Dairy Sci.* 81: 909-917.
- Rychlik, M., Bosset, J.O. (2001) Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Evaluation of potent odorants. *Int. Dairy J.* 11: 895-901.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanders, J.W., Venema, G., Kok, J. (1999) Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 483-501.
- Sandine, W.E. (1979) Lactis starter culture technology. In Pfizer Cheese Monographs. Vol. VI, Pfizer Inc. New York.
- Savijoki, K., Palva, A. (1997) Molecular genetic characterization of the L-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) of *Lactobacillus helveticus* and biochemical characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2850-2856.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 71: 394-406.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M.D., Fisher, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 183-195.

- Schütte, H., Hummel, W., Kula, M.H. (1984) L-2-Hydroxyisocaproate dehydrogenase-a new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 167-176.
- Seefeldt, K., Weimer, B.C. (2000) Diversity of sulphur compounds in lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 83: 2740-2746.
- Shakeel-Ur-Rehman, Fox, P.F. (2002) Effect of added α - ketoglutaric acid, pyruvic acid or pyridoxal phosphate on proteolysis and quality of Cheddar cheese. Food Chem. 76: 21-26.
- Sheldon, R.M., Lindsay, R.C., Libbey, L.M., Morgan, ME. (1971) Chemical nature of malty flavour and aroma produced by *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*. Appl. Microbiol. 22: 263-266.
- Shivers, R.P., Sonenshein, A.L. (2004) Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. Mol. Microbiol. 53: 599-611.
- Siezen, R.J. (1999) Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 76:139-155.
- Siezen, R.J., Kok, J., Abee, T., Schaafsma, G. (2002) Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. Antonie Van Leeuwenhoek, 82: 1-4.
- Siezen, R.J., Renckens, B., van Swam, I., Peters, S., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., De Vos, W.M. (2005) Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. Appl. Environ. Microbiol. 71: 8371-8382.
- Siezen, R.J., Bayjanov, J., Renckens, B., Wels, M., van Hijum, S.A., Molenaar, D., van Hylckama Vlieg, J.E. (2010) Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium. J. Bacteriol. 192: 2649-2650.
- Siragusa, S., Fontana, C., Cappa, F., Caputo, L., Cocconcelli, P.S., Gobbetti, M., De Angelis, M. (2011) Disruption of the gene encoding glutamate dehydrogenase affects growth, amino acids catabolism and survival of *Lactobacillus plantarum* UC1001. Int. Dairy J. 21: 59-68.

- Smacchi, E., Gobbetti, M. (1998a) Purification and characterization of cystathionine- γ -lyase from *Lactobacillus fermentum* DT41. FEMS Microbiol. Lett. 166: 197-202
- Smacchi, E., Gobbetti, M. (1998b) Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. Enzyme Microbial Technol. 22: 687-694.
- Smit, B.A. (2004) Formation of amino acid derived cheese flavour compounds. PhD. Thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Smit, B.A., Engels, W.J., Wouters, J.T., Smit, G. (2004a) Diversity of L-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations, and identification of the rate-controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methylbutanal. Appl. Environ. Microbiol. 64: 396-402.
- Smit, B.A., Engels, W.J.M., Bruinsma, J., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2004b) Development of a high throughput-screening method to test flavour-forming capability of anaerobic microorganisms. J. Appl. Microbiol. 97: 306-313.
- Smit, B.A., Engels, W.J., Alewijn, M., Lommerse, G.T., Kippersluijs, E.A., Wouters, J.T., Smit, G. (2004c) Chemical conversion of α -keto acids in relation to flavour formation in fermented foods. J. Agric. Food Chem. 52: 1263-1268.
- Smit, B.A., Vlieg, J.E.T.V., Engels, W.J.M., Meijer, L., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2005a) Identification, cloning, and characterization of a *Lactococcus lactis* branched-chain alpha-keto acid decarboxylase involved in flavour formation. Appl. Environ. Microbiol. 71: 303-311.
- Smit, B.A., Engels, W.J.M., Smit, G. (2009) Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. App. Microbiol. Biotechnol. 81: 987-999.
- Smit, G., Verheul, A., van Kranenburg, R., Ayad, E., Siezen, R., Engels, W. (2000) Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. Food Res. Int. 33: 153-160.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. (2005b) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS. Microbiol. Rev. 29: 591-610.

- Smith, E.L., Austen, B.M., Bluementhal, K.M., Nyk, J.F. (1975) Glutamate dehydrogenases. In *The enzymes*. Boyer, P.D. (ed.) New York, Academic Press, pp.: 293-367.
- Sperandio, B., Polard, P., Ehrlich, D.S., Renault, P. and Guédon, E. (2005) Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* 187: 3762-3778.
- Sperandio, B., Gautier, C., McGovern, S., Ehrlich, D.S., Renault, P., Martin-Verstraete, I., Guédon, E. (2007) Control of methionine synthesis and uptake by MetR and homocysteine in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 189: 7032-7044.
- Sonenshein, A.L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 203-207.
- Sonenshein, A.L. (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 917-927.
- Starrenburg, M.J.C., Hugenholtz, J. (1991) Citrate Fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3535-3540.
- Taguchi, H., Ohta, T. (1991) D-Lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* 266: 12588-12594.
- Tammam, J.D., Williams, A.G., Noble, J., Lloyd, D. (2000) Amino acid fermentation in non-starter *Lactobacillus* spp. isolated from cheddar cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 370-374.
- Tan-A-Ram, P., Cardoso, T., Daveran-Mingot, M., Kanchanatawee, S., Loubière, P., Girbal, L., Coccagn-Bousquet, M. (2011) Assessment of the diversity of dairy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates by an integrated approach combining phenotypic, genomic, and transcriptomic analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 739-748.
- Tanous, C., Kieronczyk, A., Helinck, S., Chambellon, E., Yvon, M. (2002) Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 271-278.

- Tanous, C., Chambellon, E., Sepulchre, A., Yvon, M. (2005a) The gene encoding the glutamate dehydrogenase in *Lactococcus lactis* is part of a remnant Tn3 transposon carried by a large plasmid. J. Bacteriol. 187: 5019-5022.
- Tanous, C., Gori, A., Rijnen, L., Chambellon, E., Yvon, M. (2005b) Pathways for alpha-ketoglutarate formation by *Lactococcus lactis* and their role in amino acid catabolism. Int. Dairy J. 15: 759-770.
- Tanous, C., Chambellon, E., Le Bars, D., Delespaul, G., Yvon, M. (2006) Glutamate dehydrogenase activity can be transmitted naturally to *Lactococcus lactis* strains to stimulate amino acid conversion to aroma compounds. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1402-1409.
- Tanous, C., Chambellon, E., Yvon, M. (2007) Sequence analysis of the mobilizable lactococcal plasmid pGdh442 encoding glutamate dehydrogenase activity. Microbiology, 153: 1664-1675.
- Tavaria, F.K., Dahl, S., Carballo, F.J., Malcata, F.X. (2002) Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 85: 2462-2470.
- Teuber, M., Geis, A., Neve, H. (1992) The genus *Lactococcus*. In The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification. Balows, A. (ed.) Springer-Verlag, New York. Applications, 2nd edn., pp.:1482-1501.
- Thierry, A., Maillard, M.B., Yvon, M. (2002) Conversion of L-leucine to isovaleric acid by *Propionibacterium freudenreichii* TL 34 and ITGP23. Appl. Environ. Microbiol. 68: 608-615.
- Thomas, T.D., Turner, K.W. (1977) Preparation of skim milk to allow harvesting of starter cells from milk cultures. NZJ. Dairy Sci. Technol. 12: 15-21.
- Thomas, T.D., Pearce, K.N. (1981) Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese. NZJ. Dairy Sci. Technol. 16: 253-259.
- Thykaer, J., Rueksomtawin, K., Noorman, H., Nielsen, J. (2008) NADPH-dependent glutamate dehydrogenase in *Penicillium chrysogenum* is involved in regulation of β -lactam production. Microbiology, 154: 1242-1250.
- Tucker, J.S., Morgan, M.E. (1967) Decarboxylation of α -keto acids by *Streptococcus lactis* var *maltigenes*. Appl. Microbiol. 15: 694-700.

- Ummadi, M., Weimer, B.C. (2001) Tryptophan catabolism in *Brevibacterium linens* as a potential cheese flavor adjunct. *J. Dairy Sci.* 84: 1173-1182.
- Urbach, G. (1993) Relations between cheese flavor and chemical composition, *Int. Dairy J.* 3: 389-422.
- Urbach, G. (1995) Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Int. Dairy J.* 5: 877-903.
- van Hylckama Vlieg, J.E.T., Rademaker, J.L., Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W.J., Siezen, R.J. (2006) Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 183-190.
- van Hylckama Vlieg, J.E.T., Hugenholtz, J. (2007) Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *Int. Dairy J.* 17: 1290-1297.
- van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Ursing, B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G. and Siezen, R.J. (2002) Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: Predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J.* 12: 111-121.
- Varmanen, P., Ingmer, H., Vogensen, F.K. (2000) *ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiology*, 146: 1447-1455.
- Verzera, A., Ziino, M., Condurso, C., Romeo, V., Zappalà, M. (2004) Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for rapid characterization of semi-hard cheeses. *Anal. Bioanal. Chem.* 380: 930-936.
- Vido, K., Le Bars, D., Mistou, M.Y., Anglade, P., Gruss, A., Gaudu, P. (2004) Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system. *J. Bacteriol.* 186: 1648-1657.
- Villablanca, M., Cilento, G. (1987) Oxidation of phenylpyruvic acid. *Acta Biochim. Biophys.* 926: 224-230.
- Villapakkam, A.C., Handke, L.D., Belitsky, B.R., Levnikov, V.M., Wilkinson, A.J., Sonenshein, A.L. (2009) Genetic and biochemical analysis of the interaction of *Bacillus subtilis* CodY with branched-chain amino acids. *J. Bacteriol.* 191: 6865-6876.
- Visser, S. (1993) Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J. Dairy Sci.* 76: 329-350.

- Wallace, J.M., Fox, P.F. (1997) Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *Int. Dairy J.* 7: 157-167.
- Wang, H., Baldwin, K.A., O'Sullivan, D.J., McKay, L.L. (2000) Identification of a gene cluster encoding Krebs cycle oxidative enzymes linked to the pyruvate carboxylase gene in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2. *J. Dairy Sci.* 83: 1912-1918.
- Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M.J., Kuipers, O. P., van Sinderen, D., Kok, J. (2007) Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* 189: 3256-3270.
- Weimer, B.C., Dias, B., Ummadi, M., Broadbent, J., Brennand, C., Jaegi, J., Johnson, M., Milani, F., Steele, J., Sisson, D. V. (1997) Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that influence Cheddar cheese ripening. *Le Lait*, 77: 383-398.
- Weimer, B.C., Seefeldt, K., Dias, B. (1999) Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 247-261.
- Weimer, B.C., Dias, B. (2005) Volatile Sulfur detection in fermented foods. In *Microbial Processes and Products*. Barredo, J. L. (ed.) Humana Press, Totowa, NJ, pp.: 397-404.
- Weinstein, M.J., Doolittle, R.F. (1972) Differential specificities of thrombin, plasmin and trypsin with regard to synthetic and natural substrates and inhibitors. *Acta Biochim. Biophys.* 258: 577-590.
- Williams, A.G., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D., Banks, J.M. (2002) Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 12: 841-852.
- Wilson, A.R., Sigee, D., Epton, H.A. (2005) Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1516-1522.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12: 91-109.

- Xie, Y., Chou, L., Cutler, A., Weimer, B. (2004) DNA macroarray profiling of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 gene expression during environmental stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6738-6747.
- Yamazaki, Y., Maeda, H. (1986) Enzymatic synthesis of optically pure (R)-(-)-mandelic acid and other 2-hydroxycarboxylic acids: Screening for the enzyme, and its purification, characterization and use. *Agr. Biol. Chem.* 50: 2621-2631.
- Yvon, M., Thirouin, R., Rijnen, L., Fromentier, D., Gripon, J.C. (1997) An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavour compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 414-419.
- Yvon, M., Berthelot, S., Gripon, J.C. (1998) Adding α -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *Int. Dairy J.* 8: 889-898.
- Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A., Roudot Algaron, F. (2000) Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 571-577.
- Yvon, M., Rijnen, L. (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* 11: 185-201.
- Yvon, M. (2006) Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* 61: 88-96.
- Yvon, M., Gitton, C., Chambellon, E., Bergot, G., Monnet, V. (2011) The initial efficiency of the proteolytic system of *Lactococcus lactis* strains determines their responses to a cheese environment. *Int. Dairy J.* 21: 335-345.

APÉNDICE

LISTADO DE TABLAS

Capítulo I.

Tabla 1.1. Microorganismos empleados en fermentaciones lácticas.....	15
Tabla 1.2. Compuestos del aroma derivados del catabolismo de aminoácidos.....	31
Tabla 1.3. Nombre y naturaleza química de los principales compuestos derivados del catabolismo de aminoácidos a través de la ruta iniciada por una aminotransferasa.....	32
Tabla 1.4. Ejemplos de compuestos aromáticos importantes en cuatro tipos de quesos y el metabolismo de los sustratos de los que se originan.....	50

Capítulo III.

Tabla 3.1. Cebadores y condiciones de PCR empleados para la amplificación del gen <i>gdh</i>	73
Tabla 3.2. Actividad GDH (nmol NAD(P)H/min/mg proteína) y detección por PCR del gen <i>gdh</i> en <i>L. lactis</i>	78
Tabla 3.3. Fragmentos obtenidos tras la digestión simulada del plásmido pGdh442.....	83

Capítulo IV.

Tabla 4.1. Microorganismos y plásmidos empleados en este estudio.....	92
Tabla 4.2. Composición del medio químicamente definido.....	92
Tabla 4.3. Cebadores empleados en este estudio y productos amplificados....	94
Tabla 4.4. Tasa de crecimiento máxima (μ_{\max} [h ⁻¹]) calculada a partir de los datos de DO ₄₈₀ obtenidos durante el crecimiento de <i>L. lactis</i> en diferentes medios de cultivo.....	105
Tabla 4.5. Principales compuestos volátiles detectados en el espacio de cabeza tras 30 horas de crecimiento de <i>L. lactis</i> IFPL953 (silvestre) y <i>L. lactis</i> IFPL953 Δ <i>panE</i> (mutante) en medio químicamente definido (CDM) y leche.....	108

Capítulo V.

Tabla 5.1. Medios y condiciones de incubación de los cultivos de <i>L. lactis</i> empleados en la evaluación del efecto de las condiciones de maduración en queso en la expresión génica y la formación de compuestos volátiles.....	121
Tabla 5.2. Cebadores empleados en este estudio.....	124
Tabla 5.3. Tasa de crecimiento máxima [μ_{\max} (h^{-1})] calculada a partir de los datos de DO_{480} obtenidos durante el crecimiento de las cepas de <i>L. lactis</i> en diferentes medios de cultivo.....	128
Tabla 5.4. Recuentos en placa en varias etapas del crecimiento de las cepas de <i>L. lactis</i> en diferentes medios de cultivo.....	130
Tabla 5.5. Eficiencias obtenidas para las parejas de cebadores empleadas en qRT-PCR a partir del ARN de <i>L. lactis</i> IFPL953.....	131
Tabla 5.6. Principales compuestos volátiles detectados mediante SPME-GC-MS tras 30 horas de crecimiento de <i>L. lactis</i> IFPL953 (silvestre) e IFPL953 Δ <i>panE</i> (mutante) crecidos en un medio químicamente definido (CDM) con diferencias en el contenido de aminoácidos.....	141
Tabla 5.7. Principales compuestos volátiles detectados mediante SPME-GC-MS tras la incubación de <i>L. lactis</i> IFPL953 e IFPL953 Δ <i>panE</i> en medio químicamente definido (CDM), ajustado a pH 5,5 (CDM-pH), con NaCl al 4,5% (CDM-NaCl), incubado a 12 °C (CDM-T), con lactosa al 0,2% (v/v) (CDM-Lac) y sin fuente de carbono (CDM-SinAz).....	144
Tabla 5.8. Principales compuestos volátiles detectados en el espacio de cabeza tras la incubación de <i>L. lactis</i> IFPL953 e IFPL953 Δ <i>panE</i> en medio químicamente definido (CDM), en condiciones de maduración con lactosa al 0,2% (v/v) (CDM-Mad[L]) y en condiciones de maduración sin fuente de carbono (CDM-Mad).....	146

LISTADO DE FIGURAS

Capítulo I.

Figura 1.1. Árbol filogenético de las BAL elaborado en base a alineamientos concatenados de cuatro subunidades (α , β , β' , δ) de la DNA-dependiente ARN polimerasa.....	18
Figura 1.2. Rutas bioquímicas generales para la transformación de los constituyentes mayoritarios de la leche en compuestos aromáticos.....	20
Figura 1.3. Esquema general de las rutas de degradación de proteínas hasta compuestos aromáticos en BAL.....	24
Figura 1.4. Resumen del sistema proteolítico de lactococos tras la hidrólisis de las caseínas. PC, M y C se corresponden con pared celular, membrana y citoplasma, respectivamente.....	26
Figura 1.5. Esquema general de las principales rutas catabólicas que participan en la conversión de aminoácidos durante la maduración del queso.	29
Figura 1.6. Esquema de la ruta de degradación de los α -cetoácidos.....	32
Figura 1.7. Conversión de los aminoácidos (AA) en α -cetoácidos por la acción de enzimas aminotransferasas.....	33
Figura 1.8. Conversión de la metionina en compuestos azufrados volátiles en <i>L. lactis</i>	42

Capítulo III.

Figura 3.1. Posibles rutas para la formación de α -cetoglutarato en BAL.....	66
Figura 3.2. Reacciones consecutivas del test colorimétrico L-Glutamic Acid....	70
Figura 3.3. Análisis de hibridación Southern de ADN plasmídico de cepas de <i>L. lactis</i> con la sonda gdh13/18.....	82
Figura 3.4. Análisis de hibridación Southern de digeridos <i>EcoRI</i> de ADN plasmídico de cepas de <i>L. lactis</i> con la sonda gdhFw/Rv.....	84

Capítulo IV.

Figura 4.1. Esquema simplificado del catabolismo de aminoácidos a partir de aminoácidos aromáticos (ArAAs, "aromatic amino acids"), de cadena ramificada (BCAAs, "branched chain amino acids") y metionina (Met).....	90
Figura 4.2. Entorno génico de <i>panE</i> en <i>L. lactis</i> IFPL953.....	96

Figura 4.3. Estrategia general para la mutación del gen <i>panE</i> por doble sobrecruzamiento en <i>L. lactis</i> IFPL953.....	99
Figura 4.4. Actividad Hic-DH de las cepas <i>L. lactis</i> IFPL953 (silvestre), <i>L. lactis</i> TIL46 (control positivo) y <i>L. lactis</i> IFPL953 Δ <i>panE</i> (mutante) frente a α -cetoisocaproato (KIV).....	103
Figura 4.5. Curvas de crecimiento y de acidificación de <i>L. lactis</i> IFPL953 e IFPL953 Δ <i>panE</i>	105

Capítulo V.

Figura 5.1. Esquema general del catabolismo de aminoácidos en <i>L. lactis</i>	123
Figura 5.2. Curvas de crecimiento de <i>L. lactis</i> IFPL953 e IFPL953 Δ <i>panE</i> en diferentes medios químicamente definidos (CDM) basados en el contenido en aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs).....	129
Figura 5.3. Comparación de los niveles de expresión relativa de varios genes en <i>L. lactis</i> IFPL953 (silvestre) y <i>L. lactis</i> IFPL953 Δ <i>panE</i> (mutante) crecidos en un medio químicamente definido (CDM) con diferencias en el contenido de aminoácidos ramificados y en distintas etapas de la curva de crecimiento.....	134
Figura 5.4. Comparación de los niveles de expresión relativa de varios genes en <i>L. lactis</i> IFPL953 (silvestre) y <i>L. lactis</i> IFPL953 Δ <i>panE</i> (mutante) incubados en un medio químicamente definido (CDM) con condiciones presentes en la maduración del queso.....	137
Figura 5.5. Comparación de los niveles de expresión relativa de varios genes en <i>L. lactis</i> IFPL953 y <i>L. lactis</i> IFPL953 Δ <i>panE</i> incubados a 12 °C durante 24 h y 7 d en un medio químicamente definido (CDM) en condiciones que simulan la maduración del queso.....	138

