

# FORMACIÓN DE AROMA EN QUESO POR BACTERIAS LÁCTICAS. PRINCIPALES RUTAS METABÓLICAS

Martínez-Cuesta\*, M.C., Peláez, C. y Requena, T.

Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera, 9, Campus Universidad Autónoma, Madrid.

\* e-mail: [carmen.martinez@csic.es](mailto:carmen.martinez@csic.es)

## 1. INTRODUCCIÓN

La aceleración y diversificación del aroma en quesos es de gran importancia económica, pues el desarrollo del mismo es un proceso costoso y relativamente lento a la vez que determina en última instancia la elección del consumidor por un producto u otro. De ahí que el Sector Quesero, tanto por razones económicas como para adaptarse a las actuales demandas del mercado, esté cada vez más interesado en el control de la formación y el desarrollo de nuevos aromas.

La formación de aroma en el queso resulta de la hidrólisis de los principales componentes de la leche – carbohidratos (glicólisis), triglicéridos (lipólisis) y proteínas (proteólisis)- por los microorganismos asociados a este ecosistema, principalmente bacterias del ácido láctico (BAL). Durante la glicólisis, la hidrólisis de la lactosa contribuye al aroma del queso al producirse mayoritariamente ácido láctico, junto con algunos ácidos volátiles, etanol y pequeñas cantidades de otros compuestos, precursores de aroma. En algunas variedades de queso, en las que se añaden bacterias propiónicas junto al cultivo iniciador, tiene lugar una fermentación secundaria del ácido láctico con producción de ácidos propiónico y acético, así como CO<sub>2</sub> responsable de la formación de ojos en la pasta del queso. Algunas BAL como *Leuconostoc* spp. y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* pueden asimismo metabolizar el citrato originando ácido acético, acetaldehído, acetoína y diacetilo, compuestos que intervienen directamente en el aroma. Por su parte, la lipólisis supone la conversión de los triglicéridos de la leche en ácidos grasos libres, mono y diglicéridos, algunos de los cuales son volátiles y contribuyen en gran medida a la formación del aroma; además, son precursores de otros compuestos -alcoholes, ésteres, aldehídos, metilcetonas y lactonas- que contribuyen al aroma. La lipólisis, sin embargo, no es un fenómeno que predomine durante el proceso de maduración del queso, a excepción de los quesos azules, algunas variedades españolas como Majorero e Idiazabal y quesos italianos elaborados con pastas de cuajo. Aunque las BAL son débilmente lipolíticas, los niveles y especificidades de las actividades

esterasas descritas varían ampliamente entre las especies y cepas estudiadas. La proteólisis, proceso mediante el cual la caseína de la leche es hidrolizada a péptidos de menor tamaño molecular y finalmente a aminoácidos, es uno de los fenómenos más importantes en muchas de las variedades queseras. La importancia de los aminoácidos radica en que son precursores de otros compuestos responsables del aroma (Fox y Wallace, 1997) (Tabla 1) y por tanto, suponen un factor limitante en el desarrollo del mismo. En este contexto, durante las dos últimas décadas, el catabolismo de los aminoácidos ha sido extensamente estudiado por diferentes grupos de investigación dando lugar a la identificación de las principales rutas metabólicas y enzimas implicadas en la formación del aroma (Figura 1).

## 2. CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS. PRINCIPALES RUTAS METABÓLICAS

### 2.1. TRANSAMINACIÓN

#### ***Actividad Aminotransferasa***

El catabolismo de aminoácidos en BAL (Fig. 1) es iniciado por una reacción de transaminación, etapa clave en la formación de compuestos volátiles. En esta reacción, catalizada por aminotransferasas, el aminoácido es transformado en el  $\alpha$ -cetoácido correspondiente por transferencia del grupo amino a un  $\alpha$ -cetoácido aceptor, por lo general  $\alpha$ -cetoglutarato que a su vez se transforma en ácido glutámico. Piruvato y oxalacetato también pueden actuar como aceptores del grupo amino aunque exhiben menor afinidad. En BAL, y en concreto en *L. lactis*, se han descrito y caracterizado dos actividades aminotransferasa principales, AraT (específica de aminoácidos aromáticos) y BcaT (específica de aminoácidos de cadena ramificada) (Yvon y cols., 1997 y 2000). Estas enzimas se solapan en su actividad frente a leucina y metionina, no habiéndose identificado hasta el momento una aminotransferasa específica para este último aminoácido. La transaminación de metionina conduce a la formación de ácido  $\alpha$ -cetometil-tio-butirato (KMBA), posteriormente convertido tanto química como enzimáticamente en metanotiol (MTL), y finalmente en sus productos de oxidación dimetildisulfuro (DMDS) y dimetiltrisulfuro (DMTS).

La actividad aminotransferasa también ha sido descrita en otras BAL tanto mesófilas –*Lactobacillus casei*, *Lb. casei* subsp. *paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. rhamnosus*- como termófilas –*Streptococcus thermophilus*, *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii*- (Gummalla y Broadbent, 1999; Helinck y cols., 2004) observándose que en BAL esta actividad enzimática depende en gran medida de la cepa (Fernández de Palencia y cols., 2006).

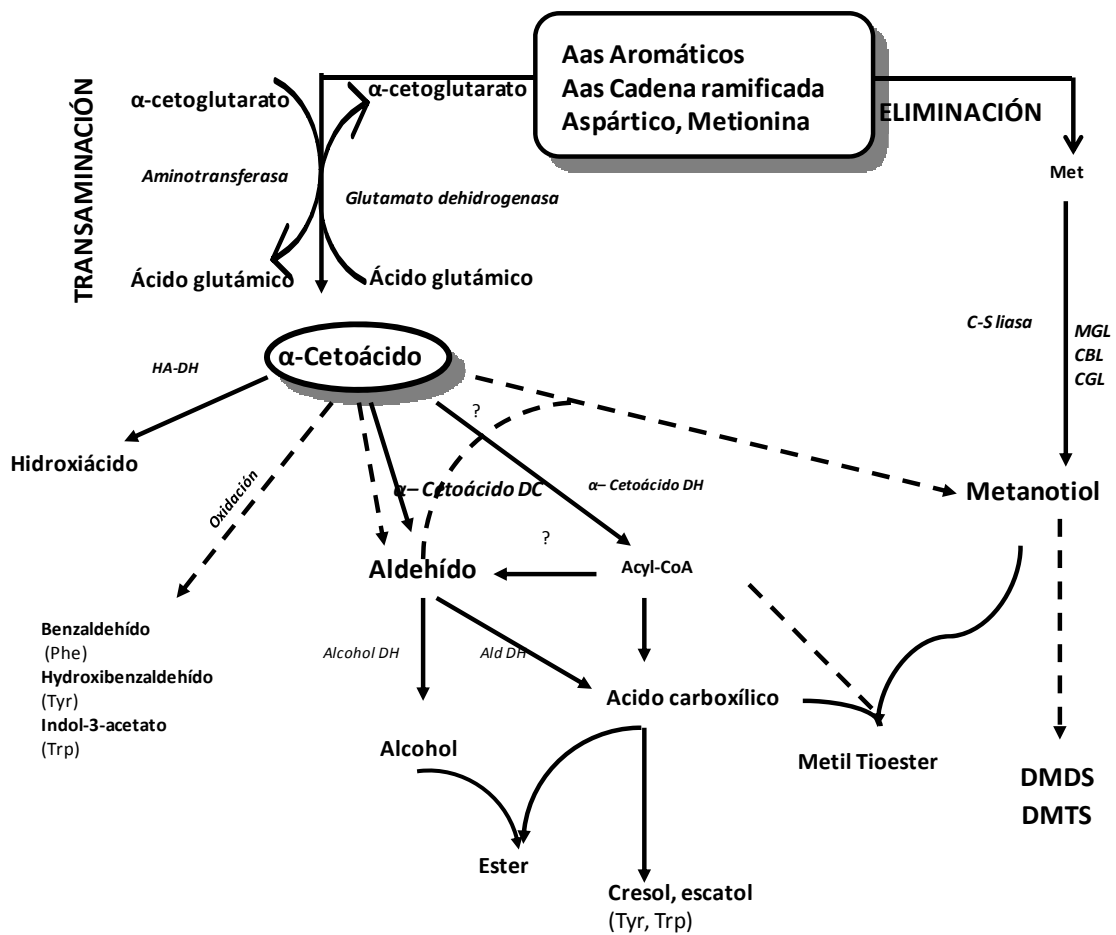
**Tabla 1.** Compuestos responsables del aroma derivados del catabolismo de aminoácidos

AMINOÁCIDO	METABOLITO	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
Tirosina	Ácido feniletilacético	Floral, pasto
	Ácido hidroxifenilacético	
	p-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
	Dimetilsulfido	Col, ajo, azufre
Ácido metiltioacético		
Ácido aspártico	Diacetilo (2,3-butanodiona)	Mantequilla, nuez
	Acetoína (3-hidroxi-2-butanona)	Mantequilla, leche ácida
	Ácido acético	Vinagre, agrio, ácido

### **Actividad Glutamato Dehidrogenasa**

La transaminación de aminoácidos a compuestos responsables del aroma está limitada por la presencia de un  $\alpha$ -cetoácido aceptor del grupo amino y que preferentemente es el  $\alpha$ -cetoglutarato. En *L. lactis* este compuesto puede producirse mediante la actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) a partir del ácido glutámico o bien mediante la ruta del citrato-oxalacetato que requiere la acción sucesiva de las enzimas citrato permeasa (CitP), citrato liasa (CitL) y aspartato aminotransferasa (AspT) así como de la disponibilidad de citrato. En este contexto, y con el fin de favorecer el catabolismo de los aminoácidos se han seguido distintas estrategias tales como la adición de  $\alpha$ -cetoglutarato a la cuajada en el proceso de elaboración del queso o bien el empleo de una cepa capaz de producirlo. En esta última línea, Rijnen y cols. (2000) demostraron, tanto en ensayos *in vitro* como en un sistema modelo de

queso, que la producción heteróloga de la actividad GDH en *L. lactis* conducía a un aumento de la capacidad de conversión de los aminoácidos en compuestos responsables del aroma. El gen responsable de la actividad GDH se identificó y caracterizó en una estirpe silvestre de *L. lactis* aislada de una fuente vegetal observándose que se encuentra en un plásmido de unas 70 Kb y formando parte de un transposón que codifica también la resistencia a cadmio (Tanous y cols., 2005). Estudios posteriores de inactivación y sobreexpresión de este gen confirmaron el papel de la actividad GDH en la conversión de los aminoácidos a compuestos responsables del aroma. Además, este plásmido puede ser transferido de forma natural entre cepas de *L. lactis* aunque se ha constatado incompatibilidad con el plásmido que codifica la actividad proteinasa y de utilización de la lactosa (pLP712) (Tanous y cols, 2006).



Abreviaciones: AAs, aminoácidos; Phe, Fenilalanina; Tyr, tirosina; Trp, triptófano; Met, metionina; DMDS, dimetildisulfuro; DMTS, dimetiltrisulfuro; C-S liasa, cistationina liasa; MGL, metionina-γ-liasa; CBL, cistationina-β-liasa;

CGL, cistationina- $\gamma$ -liasa; HA-DH, hidroxiaácido deshidrogenasa; Alcohol DH, alcohol deshidrogenasa; Ald DH, aldehído deshidrogenasa;  $\alpha$ -cetoácido DH,  $\alpha$ -cetóácido deshidrogenasa;  $\alpha$ -cetoácido DC,  $\alpha$ -cetóácido descarboxilasa.

**Fig.1. Principales rutas del catabolismo de los aminoácidos durante el proceso de maduración (Adaptado de Yvon y Rijnen, 2001).**

### **Actividad hidroxiaácido deshidrogenasa**

Los  $\alpha$ -cetoácidos producidos por transaminación pueden ser reducidos a los correspondientes  $\alpha$ -hidroxiaácidos por acción de las enzimas hidroxiaácido deshidrogenasas (HA-DHs). El hecho de que estos  $\alpha$ -hidroxiaácidos no sean compuestos aromáticos ni precursores del aroma, hace que estas enzimas incidan negativamente en la formación del mismo al competir por la disponibilidad de los  $\alpha$ -cetoácidos con otras enzimas que sí estarían implicadas en la formación de los compuestos responsables del aroma.

La actividad hidroxiaácido deshidrogenasa, dependiente de NADH y denominada genéricamente hidroxiiisocaproato deshidrogenasa, en función de su sustrato preferente, está ampliamente distribuida entre las BAL. No obstante, ninguna de las enzimas presuntamente señaladas como HA-DHs, una vez analizados los genomas de *L. lactis* IL1403 y MG1363, resultó poseer esta actividad (Bolotin y cols., 2001 y Wegmann y cols., 2007). 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 las enzimas cetopantoato reductasas. En *L. lactis*, la actividad PanE es la responsable única de la reducción de los  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada a  $\alpha$ -hidroxiaácidos (Chambellan y cols., 2009).

### **Actividad $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa**

Los  $\alpha$ -cetoácidos, aparte de ser reducidos a los correspondientes  $\alpha$ -hidroxiaácidos, pueden ser transformados enzimáticamente por descarboxilación no oxidativa en aldehídos, compuestos que sí contribuyen al aroma; en algunas ocasiones también se ha constatado que la transformación de los  $\alpha$ -cetoácidos en aldehídos puede ser llevada a cabo químicamente.

La actividad  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa (KDC) responsable de esta transformación, se ha constatado que es infrecuente y altamente dependiente de cepa entre las BAL. El gen *kivd* ha sido identificado por nuestro grupo de investigación utilizando la secuencia N-terminal de una proteína parcialmente purificada de *L. lactis* IFPL730. La enzima resultante, de 61 KDa y dependiente de difosfato de tiamina, exhibe la mayor especificidad de sustrato frente a los  $\alpha$ -cetoácidos de cadena

ramificada y en concreto el  $\alpha$ -cetoisovalérico, aunque también es activa frente a los  $\alpha$ -cetoácidos de la metionina y fenilalanina. Además se observó cómo la actividad de la enzima se incrementa en presencia de NaCl y a pH 5.4, lo que subraya el potencial papel de esta actividad en la formación de aldehídos durante la maduración del queso (de la Plaza y cols., 2004). Paralelamente, Smit y cols., (2005) empleando una estrategia de mutagénesis aleatoria identificaron y caracterizaron el gen que codifica esta actividad (*kdcA*) en *L. lactis* B1157. Ambos genes (*kivd* y *kdcA*) resultaron ser idénticos en un 80% al anotado como *ipd* en el genoma de *L. lactis* IL1403, que presuntamente codifica la enzima indolpiruvato descarboxilasa, el cual está interrumpido por la inserción de un elemento IS983, responsable de la pérdida de actividad de la enzima.

Siguiendo con las rutas posteriores del catabolismo, los aldehídos pueden ser reducidos a los correspondientes alcoholes por acción de una alcohol deshidrogenasa, o bien oxidados por acción de una aldehído deshidrogenasa a los correspondientes ácidos carboxílicos. Dado que estos ácidos también pueden formarse directamente por descarboxilación oxidativa de los  $\alpha$ -cetoácidos, es probable que las bacterias utilicen preferentemente esta vía que economiza energía, no habiéndose encontrado actividad  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa en bacterias lácticas de forma generalizada.

## 2.2. ELIMINACIÓN

### **Actividad C-S liasa**

El catabolismo de la metionina ha suscitado una especial atención en los últimos años, pues este aminoácido es el precursor de numerosos compuestos volátiles azufrados de gran impacto en el desarrollo del aroma en queso. Estos compuestos derivan de la transformación de metionina en metanotiol que posteriormente da lugar a la formación de otros volátiles como dimetil di- y tri-sulfuro y S-metiltioésteres (Fig. 2).

Las rutas metabólicas del catabolismo de la metionina varían entre la microbiota del queso. Los mecanismos implicados y las cantidades producidas durante la maduración también varían. En BAL, este catabolismo puede ser llevado a cabo tanto por una reacción de transaminación (anteriormente descrita) como por una reacción de eliminación, catalizada por la actividad C-S liasa, cistationina  $\beta$  o  $\gamma$ - liasa (CBL o CGL). Ambas enzimas requieren fosfato de piridoxal como cofactor y aunque su principal función fisiológica es la producción de homocisteína y cisteína a partir de cistationina, respectivamente, también pueden catalizar la desaminación y demetiltiolación de metionina en metanotiol (por una reacción  $\alpha,\gamma$ - de eliminación). No obstante, la especificidad de estas enzimas frente a la metionina es relativamente baja. Por el

contrario en *Brevibacterium linens*, parte importante de la microbiota de los quesos madurados en superficie “smear cheese”, la actividad C-S liasa es catalizada por la enzima metionina- $\gamma$ -liasa (MGL) responsable de la alta producción de compuestos volátiles azufrados por esta bacteria (Amárita y cols., 2004).

En nuestro laboratorio, el gen *ytjE* de *L. lactis* IL1403 ha sido clonado y sobreexpresado en *Escherichia coli*. La proteína recombinante purificada (YtjE) no exhibe actividad aminotransferasa específica de metionina, en contra de lo anotado en el genoma de *L. lactis* IL1403 (Bolotin y cols., 2001). Por el contrario, YtjE exhibe actividad C-S frente a un amplio número de sustratos, en concreto metionina dando lugar a la formación de metanotiol y sus productos de oxidación di- y tri-disulfuro, y cisteína dando lugar a la aparición de hidrógeno de sulfuro. Dada la importancia de los compuestos volátiles azufrados en el aroma del queso, la sobreexpresión de la actividad YtjE podría representar una estrategia a seguir en el desarrollo de cultivos iniciadores con óptimas propiedades aromáticas. No obstante, y considerando la mayor especificidad frente a metionina mostrada por la enzima MGL de *B. linens*, otra de las estrategias seguidas en nuestro laboratorio ha sido la producción heteróloga de esta proteína en *L. lactis* (Hanniffy y cols., 2009a). En esta línea de acción, el gen *mgI* con uso de codones adaptado para su expresión óptima en *L. lactis* fue clonado y expresado en esta bacteria bajo el control de un promotor inducido por nisina. La proteína recombinante MGL purificada mostró ser activa no sólo frente a metionina sino también frente a cisteína, cistationina y cistina. Además se ha verificado que la producción heteróloga de esta enzima en *L. lactis* incrementa la formación de compuestos volátiles azufrados tanto en condiciones de laboratorio como en las condiciones de maduración de queso.

## **2. ESTRATEGIAS EN EL CONTROL Y/O DIVERSIFICACIÓN DEL AROMA EN QUESOS**

Diferentes estrategias se han seguido en los últimos años con el fin de controlar y/o diversificar la formación del aroma en quesos; entre todas ellas cabe destacar aquellas que se han centrado en la selección de cepas de BAL con actividades enzimáticas importantes implicadas en catabolismo de aminoácidos o bien en la combinación de cepas con actividades enzimáticas complementarias que dan lugar a la formación de aromas característicos.

### **Selección de cepas silvestres**

El potencial enzimático de las BAL juega un papel relevante en la formación de los compuestos volátiles y no volátiles, por lo que el desarrollo, diversificación y

diferencias en el aroma del mismo depende en gran medida de la selección del cultivo iniciador. Distintos trabajos de investigación se han dirigido a la selección de cepas de BAL de nichos ecológicos naturales con el fin de aumentar la diversidad de aromas y restaurar las características aromáticas encontradas en las elaboraciones tradicionales. En este contexto, estirpes silvestres de *L. lactis* aisladas de nichos naturales poseen mayor capacidad de producción de compuestos volátiles con respecto a las cepas industriales. En algunos casos, los aromas producidos por estas cepas se definen como achocolatados, afrutados o “de quesería” y se deben a la producción de aldehídos y alcoholes derivados de aminoácidos de cadena ramificada, que generalmente contribuyen positivamente en la formación de aroma si se encuentran en un balance adecuado (Ayad y cols., 2001; Morales y cols., 2003). En un estudio reciente en nuestro laboratorio con cepas de BAL aisladas de quesos artesanales elaborados con leche de cabra, se ha constatado una amplia biodiversidad y variabilidad tanto inter- como intra –especie en relación al potencial enzimático responsable del catabolismo de aminoácidos en estas bacterias. Entre los resultados obtenidos destaca la alta actividad C-S liasa mostrada por las cepas de lactococos, muy superior a la observada en los lactobacilos y leuconostocs estudiados, dando lugar en algunos casos a una mayor formación de compuestos volátiles azufrados en relación a *B. linens*, microorganismo altamente productor de compuestos volátiles azufrados (Hanniffy y cols., 2009b)

### **Complementación de rutas metabólicas**

La combinación de cepas con actividades enzimáticas complementarias que dan lugar a la formación de compuestos responsables del aroma es una herramienta interesante para conseguir un balance adecuado de compuestos volátiles en el queso. Así, cabe desatacar ciertos trabajos en los que se ha descrito cómo la combinación de cepas de lactococos con elevada actividad aminotransferasa y actividad  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa (muy infrecuente en BAL y responsable de la formación de aldehídos) intensifica el aroma final del queso tipo Proosdij (Ayad y cols., 2003). Por otra parte, la cooperación entre cepas de lactobacilos con actividad GDH y cepas de lactococos que no presentan esta actividad incrementa la producción de ácidos carboxílicos. En este modelo, los lactobacilos iniciarían la transaminación de los aminoácidos en  $\alpha$ -cetoácidos, sin tener como factor limitante la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato y, los lactococos completarían la transformación de estos  $\alpha$ -cetoácidos hasta ácidos carboxílicos intensificando el aroma (Kieronczyk y cols., 2003).



El queso es un complejo ecosistema en el que una gran diversidad de microorganismos, entre los que se encuentran las BAL, puede coexistir. De ahí que las interacciones que se puedan establecer entre los distintos componentes de esta microbiota influyan no sólo sobre su crecimiento sino también sobre la formación de compuestos responsables del aroma y finalmente en la percepción global del mismo. Se ha estudiado el impacto que sobre el aroma presentan distintas asociaciones de levaduras y bacterias y en este sentido se ha destacado el papel de las BAL al aumentar la formación de compuestos volátiles azufrados (Arfi y cols., 2005).

## **CONCLUSIONES**

El conocimiento en profundidad de las rutas metabólicas y enzimas implicadas en el catabolismo de los aminoácidos en BAL, permite la identificación y selección de cepas con propiedades aromáticas interesantes, y por lo tanto, el control de la formación de aroma en queso. En los últimos años, el número de genomas de distintas BAL total o parcialmente secuenciados ha aumentado considerablemente, lo que abre nuevas oportunidades para la determinación del potencial de estas bacterias en la formación de aromas. El análisis comparativo de las secuencias genéticas de las enzimas implicadas, así como los estudios de genómica funcional, proteómica y metabolómica, son herramientas importantes a emplear en el discernimiento de las rutas metabólicas y mecanismos que conducen a la formación del aroma en las distintas BAL. Todos estos enfoques genómicos permitirían la predicción de las capacidades formadoras de aroma de estas bacterias y, dado que esta capacidad es altamente dependiente de cepa, la selección de éstas. No obstante, no se debe olvidar la necesidad de determinar la correlación entre los fenotipos y genotipos de las cepas.

En resumen, la identificación de las enzimas clave en la formación de aroma, el estudio del impacto que sobre el aroma puedan tener las interacciones entre la microbiota del queso, la predicción de la capacidad de formación de aromas de las distintas BAL, y la selección y/o bioingeniería de aquellas cepas que presenten propiedades aromáticas óptimas, son aspectos importantes a considerar en el control y diversificación del aroma final del queso.

## Referencias

- Amárta, F., Yvon, M., Nardi, M., Chambellon, E., Delettre, J. y Bonnarme, P. (2004). Identification and functional analysis of the gene encoding methionine-gamma-lyase in *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7348-7354.
- Arfi, K., Leclercq-Perlat, M.N., Spinnler, H.E. and Bonnarme, P. (2005). Importance of curd-neutralising yeasts on the aromatic potential of *Brevibacterium linens* during cheese ripening. *Int. Dairy J.* **15**: 883-891.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Bruinenberg, P., Wouters, J.T.M. y Smit, G. (2003). Starter culture development for improving the flavour of Proosdij-type cheese. *Int. Dairy J.* **13**: 159-168.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J.T.M. y 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.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mager, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. y Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**: 731-753.
- Chambellon, E., Rijnen, L., Lorquet, F., Gitton, C., van Hylckama Vlieg, J.E., Wouters, J.A. y 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.
- De la Plaza, M., Rodríguez, A., Fernández de Palencia, P., Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C. y Requena, T. (2006). Discrepancies between the phenotypic and genotypic characterization of *Lactococcus lactis* cheese isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 637-644.
- Fernández de Palencia, P., de la Plaza, M., Amarita, F., Requena, T. y Peláez, C. (2006). Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enzyme Microbial Technol.* **38**: 88-93.
- Gummalla, S. Y Broadbent, J.R. (1999). Tryptophan catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* cheese flavour adjuncts. *J. Dairy Sci.* **82**: 2070-2077.
- Hanniffy S.B., Philo, M., Peláez, C., Gasson, M.J, Requena, T. y Martínez-Cuesta, M.C. (2009a). Heterologous production of methionine- $\gamma$ -lyase from *Brevibacterium linens* in *Lactococcus lactis* and formation of volatile sulphur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2326-2332.

- Hanniffy, S.B., Peláez, C., Martínez-Bartolomé, M.A., Requena, T. y Martínez-Cuesta, M.C. (2009b). Key enzymes involved in methionine catabolism by cheese lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **135**: 223-230.
- Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D. y Yvon, M. (2004). Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3855-3861.
- Kieronczyk, K., Skeie, S., Langsrud, T. y 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.
- Martínez-Cuesta, M. C., Peláez, C., Eagles, J., Gasson, M.J., Requena, T. y Hanniffy, S. (2006). YtjE from *Lactococcus lactis* is a C-S lyase with  $\alpha,\gamma$ -elimination activity that degrades L-methionine. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4878-4884.
- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P. y Núñez, M. (2003) Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe's milk cheese. *Int. Dairy J.* **13**: 201-209.
- Rijnen, L., Courtin, P., Gripon, J.C. y 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.
- Smit, B.A., van Hylcklama Vlieg, J.E., Engels, W.J., Meijer, L., Wouters, J.T. y Smit, G. (2005). Identification, cloning and characterization of a *Lactococcus lactis* branched-chain  $\alpha$ -ketoacid decarboxylase involved in flavour formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 301-311.
- Tanous, C., Chambellon, E., Le bars, D., Delespaul, G. y 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., Sepulchre, A.M. y Yvon, M. (2005). The gene encoding the glutamate dehydrogenase in *Lactococcus lactis* is part of a remnant Tn3 transposon carried by a large plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **187**: 5019-5022.
- 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., y Kok, J. (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* **189**: 3256-3270.
- Yvon, M. y Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* **11**: 185-201.
- Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A., y 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., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D. y Gripon, J.C. (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavour compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 414-419.