

**REGULACION EN BACTERIAS LACTICAS
DE LA SINTESIS DE LOS ENZIMAS DEL CATABOLISMO
DEL DIACETILO POR REDUCCION: (III)
*LEUCONOSTOC CITROVORUM***

*Por: R. Martín Sarmiento
S. Monroy
J. Burgos*

INTRODUCCION

La síntesis de, al menos, algunos de los enzimas que intervienen en el catabolismo del diacetilo por reducción en *Lactobacillus casei* y otros microorganismos puede ser inducida por diversos compuestos, como el piruvato y el citrato^{3, 4, 9, 15}. Las experiencias descritas en este artículo tuvieron por objeto estudiar en *Leuconostoc citrovorum* los efectos de los metabolitos citados y los de los productos de reducción del diacetilo sobre tales enzimas, lo que podría permitir un mejor control de su actividad —y, en consecuencia, de la acumulación de su sustrato— en los alimentos sometidos a procesos madurativos utilizando *L. citrovorum* como starter.

MATERIAL Y METODOS

Se empleó la cepa NCIB 3739 de *L. citrovorum*, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo; fue propagada en caldo Elliker. Los experimentos se llevaron a cabo como en trabajos previos¹², excepto en lo que se refiere a la temperatura de cultivo (20° C) y a la composición del medio mínimo, que fue la siguiente: extracto de levadura, 0,125 %; glucosa, 0,025 %; ClNa, 0,55 %; ácido ascórbico, 0,0125 %; efector, 0,25 %.

El diacetilo se mostró extraordinariamente tóxico para *L. citrovorum*, impidiendo su crecimiento incluso en proporciones mil veces inferiores a las habitualmente utilizadas, por lo que no se encontró conveniente tratar de estudiar su acción a la vista de que sólo era posible hacerlo a concentraciones bajísimas.

RESULTADOS

La tabla I recoge los resultados de las experiencias de inducción de los enzimas que catalizan la reducción de diacetilo. Puede observarse que la actividad NADH-dependiente es reprimida por el citrato e inducida por el piruvato y que la dependiente del NADPH muestra un comportamiento frente a los compuestos ensayados como efectores muy similar: es inducida por el butilenglicol además de por el piruvato, pero con un coeficiente bajo, incluso menor que el observado en el caso anterior. Sin embargo, se apreciaron grandes diferencias cuantitativas entre la actividad diacetilo reductasa basal con uno y otro coenzima, que es más de 15 veces superior si se determina con NADH que si se emplea NADPH.

Algo semejante ocurre con la reacción butilenglicol deshidrogenasa (tabla II). La actividad NADH-dependiente constitutiva es más de 25 veces mayor que la ligada al NADPH. La primera es inducida por el piruvato y, tal vez, reprimida por el citrato, puesto que en las experiencias efectuadas con células cultivadas en presencia de éste se obtuvo una actividad media casi 1/3 menor que la basal, aunque la gran variabilidad de los datos obtenidos en este experimento pone en duda el valor de las diferencias observadas por cuanto determina una probabilidad importante ($p < 0,4$) de que sean debidas al azar. La segunda se induce muy fuertemente por el piruvato y, en menor grado, por el butilenglicol y la acetoina; cabe suponer que también es reprimida por el citrato, con un coeficiente de 0,55, si bien el valor estadístico de los datos recogidos no es del todo satisfactorio ($p < 0,1$).

DISCUSION

Del examen de las tablas I y II se deduce que existe cierto paralelismo en la respuesta de las cuatro actividades enzimáticas a los efectores estudiados, de lo que cabría concluir que son debidas a un solo enzima, má concretamente, a la L-glicol deshidrogenasa, que es el único conocido que acepta NADH y NADPH y puede reducir tanto el diacetilo como la acetoina^{2,13}. No obstante, el hecho de que las determinaciones efectuadas empleando como donador de hidrógeno NADH dieran valores mucho más altos que las llevadas a cabo con NADPH resta firmeza a esta hipótesis, puesto que todos los isoenzimas de la glicol deshidrogenasa conocidos operan más eficazmente con éste que con aquél, o al menos tanto². Como alternativa más probable, se propone que sólo es debida a ese enzima la actividad dependiente del NADPH y una fracción menor de la que se observa con NADH, correspondiendo la mayor parte de esta última a la diacetilo(acetoina) reductasa⁴ que, como en *S. liquefaciens*⁵, es inducida por el piruvato. No se descarta tampoco la intervención de algún otro enzima.

Es de destacar que en *L. citrovorum* el citrato reprime la reducción del diacetilo, en abierto contraste con lo observado por otros autores en *L. casei*⁹ y *Aerobacter*

TABLA I
Inducción de la actividad diacetilo reductasa en *L. citrovorum*

EFECTOR	NADH-dependiente		NADPH-dependiente	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**
Piruvato	1,198 ± 199 (p. 0,05)	4,76	36,5 ± 2,2 (p. 0,001)	2,03
Citrato	98 ± 15 (p. 0,05)	0,39	15,6 ± 0,6 (p. 0,05)	0,88
Butilenglicol	381 ± 55 (p. 0,10)	1,52	25,0 ± 1,6 (p. 0,01)	1,39
Acetoina	310 ± 15 (p. 0,30)	1,23	14,9 ± 4,0 (p. 0,70)	0,88
Act. basal	251 ± 69	—	17,9 ± 0,9	—

* Media de tres experimentos ± S.D.; la cifra entre paréntesis expresa la probabilidad máxima de que la diferencia entre ese resultado y la actividad basal sea debida al azar.

** Cociente entre la actividad específica con el correspondiente efector y la actividad específica basal.

TABLA II
Inducción de la actividad butilenglicol deshidrogenasa en *L. citrovorum*

EFECTOR	NADH-dependiente		NADPH-dependiente	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**
Piruvato	747,8 ± 110,2 (p. 0,001)	9,01	40,6 ± 2,1 (p. 0,001)	13,3
Citrato	56,7 ± 18,1 (p. 0,40)	0,68	1,7 ± 1,0 (p. 0,10)	0,55
Butilenglicol	63,4 ± 21,9 (p. 0,50)	0,76	9,2 ± 1,5 (p. 0,01)	3,03
Acetoina	124,3 ± 28,6 (p. 0,30)	1,5	10,2 ± 2,4 (p. 0,01)	3,35
Act. basal	83,0 ± 37,3	—	3,0 ± 0,6	—

* Media de tres experimentos ± S.D.; la cifra entre paréntesis expresa la probabilidad máxima de que la diferencia entre ese resultado y la actividad basal sea debida al azar.

** Cociente entre la actividad específica con el correspondiente efector y la actividad específica basal.

*aerogenes*¹⁵ y por nosotros mismos en las demás bacterias acidolácticas estudiadas^{5,12}; sólo en *Lactobacillus plantarum* se apreció una ligera represión de la actividad diacetilo reductasa por el citado metabolito, pero afectaba exclusivamente a la dependiente del NADPH y se veía compensada por un fuerte incremento de la acoplada al NADH. Esta aparente anomalía puede contribuir a explicar por qué el citrato, que es un precursor del diacetilo más lejano que el piruvato, es más eficaz que éste para incrementar la acumulación de diacetilo por los *Leuconostoc* utilizados como starters en la elaboración de mantequilla (véase, p. e., ref. 1). Se ha venido suponiendo que ello se debe a que estos microorganismos carecen de sistemas enzimáticos que permitan el transporte activo del piruvato al interior de la célula, pero, a juzgar por su eficacia en inducir en este microorganismo todas las actividades determinadas, no parece que tenga grandes dificultades en atravesar la pared celular.

Al margen de estas consideraciones, puede concluirse de los estudios realizados sobre el control de la síntesis de los enzimas del catabolismo reductor del diacetilo

que existen posibilidades reales y múltiples de llevarlo a cabo, aunque su aplicación práctica requeriría un manejo mucho más cuidadoso que una simple operación rutinaria. Todos los compuestos probados como efectores han sido eficaces hasta niveles estadísticamente significativos en un porcentaje elevado de los casos, lo que pone de manifiesto que la síntesis de estas deshidrogenasas es fácilmente manipulable. Sin embargo, las diferencias interespecíficas en cuanto a dotación de enzimas de este tipo son tan acusadas y las respuestas de ellos a los efectores tan distintas, que el aprovechamiento a escala industrial de esta posibilidad plantea ciertas dificultades:

L. casei y *L. plantarum* disponen de una diacetilo reductasa específica para el NADH¹⁷, otra dependiente del NADPH¹⁶, una butilenglicol deshidrogenasa que opera sólo con NADPH y otra que lo hace con NADH, esta última diferente en los dos microorganismos, posiblemente la L-deshidrogenasa en uno de ellos y la D-deshidrogenasa en el otro^{17, 18}. *Streptococcus diacetilactis* cuenta con la diacetilo reductasa NAD(P)H-dependiente⁶ y, en nuestra opinión, con otro enzima no conocido hasta ahora que cataliza la reacción butilenglicol deshidrogenasa aceptando NADH y NADPH. *S. liquefaciens* opera con la diacetilo(aceoína) reductasa⁴ y la diacetilo reductasa específica para el NADPH. Finalmente, proponemos que en *L. citrovorum* actúan la diacetilo(aceoína) reductasa y la L-glicol dehidrogenasa.

Por otra parte, el comportamiento de estas enzimas frente a los efectores probados es muy diverso. La diacetilo reductasa NADH-dependiente es inducida por el piruvato, la aceoína y, aunque no siempre de forma tan clara, por el citrato, el butilenglicol y el diacetilo, confirmando, en lo que hace referencia a los dos ácidos orgánicos, los resultados obtenidos por otros autores^{3, 9}, sobre los que podrían existir dudas por la insuficiencia de datos de especificidad para clasificar correctamente los enzimas implicados. La dependiente del NAD(P)H no ha podido ser inducida y es, además, fuertemente reprimida por el diacetilo, lo que la diferencia claramente de la anterior en contra de su inclusión en la Lista de Enzimas de la I.U.B. con una entrada común para ambas⁸. La diacetilo reductasa específica para el NADPH no se ha visto inducida por ninguno de los compuestos utilizados; en *L. plantarum* fue reprimida por el citrato, pero muy ligeramente. La glicol deshidrogenasa, de ser éste el enzima que cataliza las dos reacciones NADPH-dependientes en *L. citrovorum*, se induce por el piruvato, el butilenglicol y, tal vez, por la aceoína y es reprimida por el citrato. El diacetilo induce una de las dos butilenglicol deshidrogenasas específicas para el NADH y el piruvato la reprime; la otra no se ve modificada por ninguno de los efectores. La butilenglicol deshidrogenasa dependiente del NADPH es inducida por el citrato, el butilenglicol, la aceoína, el diacetilo y, al menos en *L. plantarum*, por el piruvato, y la que acepta también el NADH parece ser afectada sólo por el citrato, que la reprime. Finalmente, nuestros resultados confirman que la diacetilo(aceoína) reductasa es inducida ligeramente por el piruvato^{4, 15} y ponen también de manifiesto que el diacetilo, si bien en escasa cuantía, provoca su represión. Es bastante inesperado que el mismo compuesto ejerza en unos casos acciones contra-

rias a las que produce en otros, puesto que, en principio todos estos enzimas deberían cumplir el mismo papel biológico, pero, aun no disponiendo de explicación para este fenómeno, los datos obtenidos son, en muchos casos, concluyentes.

Resulta evidente que en medio de esta situación tan compleja no cabe proponer normas de actuación concretas para controlar el catabolismo del diacetilo por este camino; en cada caso deben efectuarse las experiencias previas oportunas para conocer el comportamiento de la cepa que va a ser empleada. Si es posible, en cambio, efectuar algunas recomendaciones de carácter general: Si se pretende retrasar la eliminación de diacetilo, los más aconsejables, entre los efectores ensayados, para llevar a cabo las necesarias pruebas piloto son el citrato, que reprime tres de los enzimas implicados en su reducción (la butilenglicol deshidrogenasa NAD(P)H-dependiente, la diacetilo reductasa ligada al NADPH y la glicol deshidrogenasa), y el diacetilo, que lo hace con dos de ellos [la diacetilo(aceoína) reductasa y la diacetilo reductasa inespecífica para el coenzima]; tanto uno como el otro compuesto puede inducir la síntesis de varias de las demás deshidrogenasas de esta ruta, por lo que su adición a los medios de cultivo para reforzar la acción de los stárteres será en algunos casos contraproducente. Si se trata de acelerar la desaparición del diacetilo del medio, conviene intentar la inducción con piruvato, butilenglicol o aceoína. Los dos últimos son los únicos entre los compuestos probados que no han ejercido efectos represores en ninguno de los casos, aunque, naturalmente, no resultaron siempre eficaces. La acción inductora de estos compuestos sobre la butilenglicol deshidrogenasa específica para el NADPH, la diacetilo reductasa NADH-dependiente y la glicol deshidrogenasa podría tener relación con la posible participación de estos enzimas en el aprovechamiento del butilenglicol del medio como fuente de carbono por ciertos microorganismos, que requiere su oxidación previa a aceoína y diacetilo^{7, 10, 11, 14}.

RESUMEN

L. citrovorum dispone de actividades basales diacetilo reductasa y butilenglicol deshidrogenasa, especialmente altas en presencia de NADH, que pueden ser inducidas por el piruvato y, menos claramente, por el butilenglicol y la aceoína y se ven reprimidas por el citrato. Se propone que la capacidad de este microorganismo de reducir el diacetilo a butilenglicol es debida a la diacetilo(aceoína) reductasa y a la L-glicol deshidrogenasa.

INDUCTION AND REPRESSION OF THE ENZYMES WHICH CATALYZE THE REDUCTIVE CATABOLISM OF DIACETYL IN LACTIC BACTERIA: (III) *LEUCONOSTOC CITROVORUM*

SUMMARY

High constitutive diacetyl reductase and butyleneglycol dehydrogenase activities, specially strong when measured in the presence of NADH, have been detected in

L. citrovorum; they can be induced by pyruvate and, in a lower degree, by butyleneglycol and acetoin, and they are repressed by citrate. It is proposed that the ability of this organism to reduce diacetyl to butyleneglycol is due to L-glycol dehydrogenase and diacetyl(acetoin) reductase.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALAIS, CH. (1981).—“*Ciencia de la Leche*”, C.E.C.S.A., Méjico, p. 463.
- 2) BERNARDO, A.; BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1981).—Purification and some properties of L-glycol dehydrogenase from hen's muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **659**, 189-198.
- 3) BRANEN, A. L. y KEENAN, T. W. (1970).—Diacetyl reductase of *Lactobacillus casei*. *Can. J. Microbiol.*, **16**, 947-951.
- 4) BRYN, K.; HETLAND, O. y STØRMER, F. C. (1971).—The reduction of diacetyl and acetoin in *Aerobacter aerogenes*. *Eur. J. Biochem.*, **18**, 116-119.
- 5) BURGOS, J.; MARTÍN SARMIENTO, R. y MONROY, S. (1981).—Regulación en bacterias lácticas de la síntesis de los enzimas del catabolismo del diacetilo por reducción: (II) *Streptococcus diacetilactis* y *S. citrovorum*. *An. Fac. Vet. León*, en este volumen.
- 6) DÍEZ, V.; BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1974).—Pigeon liver diacetyl reductase: purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 253-262.
- 7) HAINES, J. R. y ALEXANDER, M. (1975).—Microbial degradation of polyethylene glycols. *Appl. Microbiol.*, **29**, 621-625.
- 8) INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (1979).—“*Enzyme nomenclature, 1978*”. Academic Press, New York, p. 28.
- 9) KEENAN, T. W. y LINDSAY, R. C. (1968).—Diacetyl production and utilization by *Lactobacillus* species. *J. Dairy Sci.*, **51**, 188-191.
- 10) LÓPEZ, J. y FORTNAGEL, P. (1972).—The regulation of the butanediol cycle in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **279**, 554-560.
- 11) LÓPEZ, J.; THOMS, B. y REHBEIN, H. (1975).—Acetoin degradation in *Bacillus subtilis* by direct oxidative cleavage. *Eur. J. Biochem.*, **57**, 425-430.
- 12) MONROY, S.; BURGOS, J. y MARTÍN SARMIENTO, R. (1981).—Regulación en bacterias lácticas de la síntesis de los enzimas del catabolismo del diacetilo por reducción: (I) *Lactobacillus casei* y *L. platarum*. *An. Fac. Vet. León*, en este volumen.
- 13) ROBLA, F.; BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1972).—Purificación de una actividad butilenglicol deshidrogenasa NADP-dependiente a partir de tejido muscular de gallina. *An. Fac. Vet. León*, **18** (2): 743-750.
- 14) SEBEK, D. K. y RANDLESS, C. I. (1952).—The oxidation of the stereoisomeric 2,3-butanediols by *Pseudomonas*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 373-380.
- 15) SHIMIZU, H.; HANAICHI, Y.; OKADA, A. y TOMOYEDA, M. (1977).—Formation and some properties of diacetyl reductase from *Klebsiella pneumoniae*. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 527-532.
- 16) SILBER, P.; CHUNG, H.; GARGIULO, P. y SCULTZ, H. (1974).—Purification and properties of diacetyl reductase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **118**, 919-927.
- 17) STRECKER, H. J. y HARARY, I. (1954).—Bacterial butylene glycol dehydrogenase and diacetyl reductase. *J. Biol. Chem.*, **211**, 263-270.
- 18) TAYLOR, M. B. y JUNI, E. (1960).—Stereoisomeric specificities of 2,3-butanediol dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 448-457.

EXTRACTOS DE TRABAJOS PUBLICADOS EN OTRAS REVISTAS

«Interacciones de cefalosporinas y penicilinas con fases estacionarias no polares de octadecil-silica». (Interactions of cephalosporins and penicillins with nonpolar octadecylsilyl stationary phase.)

F. SALTO, J. G. PRIETO y M. T. ALEMANY. Cátedra de química. Departamento Interfacultativo de Bioquímica. Facultades de Biología y Veterinaria.

Journal of Pharmaceutical Sciences 69/5, 501-506 (1980).

RESUMEN

Se han determinado los factores de capacidad de varias penicilinas y cefalosporinas, así como de los ácidos 7-aminocefalosporánico, 7-aminodesacetoxicefalosporánicos y 6-aminopenicilánico; a pH variable entre 2,5 y 7,5 y con diferentes contenidos en metanol de la fase móvil. También hemos estudiado la influencia de la fuerza iónica sobre los factores de capacidad. Se han deducido ecuaciones teóricas para describir cuantitativamente la influencia del pH de la fase móvil sobre la retención de penicilinas y cefalosporinas sobre la fase estacionaria de actadecilsilica. El ajuste de los datos experimentales se ha hecho mediante mínimos cuadrados no lineales, habiéndose determinado los factores de capacidad de las formas aniónicas, catiónicas, zwitterión e indisociadas de las diferentes sustancias estudiadas.

SUMMARY

The capacity factors of several penicillins and cephalosporins, as well as those of 7-aminocephalosporanic acid, 6-aminopenicillanic acid, and 7-aminodesacetoxycephalosporanic acid, were determined at pH 2.5-7.5 with different methanol concentrations in the mobile phase. The influence of ionic strength on activity factors also was studied. Some theoretical equations providing a quantitative description of the influence of the mobile phase pH on the retention of penicillins and cephalosporins by an octadecylsilyl stationary phase were established. The analysis of experimental data by a nonlinear least-squares fit to theoretically deduced equations permitted determination of the capacity factors of anionic, cationic, zwitterion, and undissociated forms of the substances studied.