

- 27) PIOTROWSKA, E. y JOZEFczyk, Z. (1976).—Toxin-forming potency of clinical strains of *S. aureus*. En *Staphylococcus and Staphylococcal Diseases*, J. JELIASZEWICZ (editor). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 577-582.
- 28) REID, W. B. y WILSON, J. B. (1959).—A study of the staphylococci associated with the bovine udders. *Am. J. Vet. Res.*, **20**, 825-831.
- 29) SAINT GEORGE, C.; RUSSELL, K. B. y WILSON, J. B. (1962).—Characteristics of staphylococci from bovine milk. *J. Infect. Dis.*, **110**, 75-79.
- 30) ZEMELMAN, R. y LONGERI, L. (1965).—Characterization of staphylococci isolated from raw milk. *Appl. Microbiol.*, **13**, 167-170.

**REGULACION EN BACTERIAS LACTICAS
DE LA SINTESIS DE LOS ENZIMAS DEL CATABOLISMO
DEL DIACETILO POR REDUCCION: (I) LACTOBACILLUS
CASEI Y L. PLANTARUM**

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

INTRODUCCION

El diacetilo juega un importante papel, a veces favorable y otras desfavorable, en el aroma de gran número de productos alimenticios, especialmente en los derivados lácteos. Se sintetiza por reacciones de condensación del acetaldehído activado^{9 14 17} y se consume, en los sistemas biológicos, principalmente vía su reducción a acetoína y la de ésta a butilenglicol, en dos reacciones (diacetilo reductasa y butilenglicol deshidrogenasa) catalizadas por enzimas dependientes de los piridín nucleótidos^{1 3 5 16 18}.

Para regular su metabolismo, la industria alimentaria ha venido recurriendo a medidas con frecuencia insuficientemente eficaces y no siempre aplicables, como el control del pH, la temperatura y el grado de aireación del medio, una adecuada selección de los microorganismos utilizados como starters y, cuando se pretende potenciar su producción, a la adición de sustancias precursoras del mismo. La observación de que el citrato y el piruvato inducen la biosíntesis de algunas de las deshidrogenasas del catabolismo del diacetilo^{2 3 10 15} parece abrir una nueva posibilidad de regular el acúmulo de este metabolito en los sistemas biológicos.

Los autores han intentado explorar esta posibilidad en diversas bacterias acidolácticas, los gérmes más frecuentemente implicados en la producción de diacetilo en los alimentos, utilizando como efectores, además de los ya citados, el propio diacetilo y sus productos de reducción. En este artículo se da cuenta de los estudios efectuados con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*.

MATERIAL Y METODOS

La acetoína (BDH) fue purificada por lavado con éter etílico²⁰ y el diacetilo (BDH) por destilación fraccionada, recogiendo la fracción que destila a 88-89° C a 760 mm Hg.

Las cepas de *L. casei* (ATCC 11979) y *L. plantarum* (ATCC 8014) empleadas fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo.

Las pruebas de inducción/represión se llevaron a cabo por cultivo en medios mínimos en presencia del efector y determinación de las actividades específicas diacetilo reductasa y butilenglicol deshidrogenasa de las células así obtenidas. Los microorganismos, que se propagaron en caldo MRS, fueron adaptados al medio mínimo mediante siete resiembras sucesivas. Tras la última, se sembraron 27 ml. de inóculo, previamente ajustado a pH 6,8, en 2,7 litros del medio mínimo, distribuidos a partes iguales en nueve erlenmeyers de dos litros de capacidad. El cultivo, estático, se efectuó a 32° C, recogiendo las células, a la mitad de la fase logarítmica, mediante centrifugación a 1.000 × g durante 10 min. Los microorganismos fueron suspendidos en tampón fosfato 0,1 M de pH 7 y centrifugados de nuevo, repitiéndose esta operación dos veces más. Las células se recogieron en 5 ml del mismo tampón y fueron sometidas a tratamiento ultrasónico a 0-4° C, utilizando un desintegrador MSE de 60 vatios a una frecuencia de 20 Kc, durante el tiempo necesario para conseguir la ruptura del 80-90% de las mismas (unos treinta minutos). La composición del medio mínimo utilizado fue: extracto de levadura, 0,5%; ácido ascórbico, 0,05%; ClNa, 0,55%; glucosa, 0,1%; efector, 0,25%; pH, 6,8. La acetoína se esterilizó por separado, disolviéndola en agua y filtrando la disolución por un filtro Millipore HAWP 04700; el diacetilo se añadió también tras el tratamiento térmico, sin esterilización previa.

Las determinaciones de actividad diacetilo reductasa se efectuaron a 25° C, midiendo los cambios en extinción a 340 nm producidos por la oxidación del coenzima en el siguiente sistema: cubeta de «referencia», 1,5 ml de tampón fosfato Na-K 0,2 M de pH 6, 0,6 μmoles de NADH o NADPH, 30 μmoles de diacetilo, extracto celular y agua destilada hasta 3 ml; cubeta de «muestra», igual que la anterior, sustituyendo el diacetilo por agua. Las de butilenglicol deshidrogenasa se realizaron por el mismo procedimiento, utilizando como sustrato acetoína en lugar de diacetilo. Las unidades de actividad enzimática referidas en este trabajo corresponden a la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 nmol de NAD (P) H por minuto en el citado sistema.

Las determinaciones de proteína se llevaron a cabo por el método del biuret⁷.

RESULTADOS

La reducción de diacetilo a acetoína y la de ésta a butilenglicol pueden tener lugar utilizando como coenzima NADH o NADPH. Se ha descrito un enzima, la L-glicol deshidrogenasa, que es capaz de catalizar las dos reacciones aceptando indistintamente uno u otro piridín nucleótido^{1 13}, pero otras deshidrogenasas del catabolismo del diacetilo intervienen sólo en una de las dos etapas de reducción o son específicas para el coenzima, por lo que no basta con medir una de las reacciones para obtener una imagen de la influencia del efector sobre el funcionamiento global de la vía. Ha

sido preciso, por tanto, determinar las acciones ejercidas por los compuestos probados sobre las dos reacciones de reducción (butilenglicol deshidrogenasa y diacetilo reductasa) y medir cada una de ellas con NADH y NADPH.

Como puede comprobarse en la tabla I, *L. casei* carece de actividad diacetilo reductasa NADH-dependiente constitutiva, pero ésta es inducida por el piruvato, el diacetilo, la acetoína y el butilenglicol. El citrato, en cambio, no la induce, en contraste con los resultados de otros autores utilizando este mismo germen¹⁰. Esta discrepancia podría ser debida a diferencias en el comportamiento de las cepas usadas o al empleo de condiciones experimentales distintas, si bien es igualmente posible que en nuestro caso se haya inducido una actividad insuficiente para resultar detectada por el sistema de análisis empleado, puesto que el efecto parece ser menos marcado cuanto más alejado se encuentra metabólicamente el inductor del butilenglicol, y el citrato es el precursor menos próximo a éste de todos los compuestos ensayados.

Frente a lo que sucede con *L. casei*, nuestra cepa de *L. plantarum* posee una estimable capacidad constitutiva de reducción de diacetilo en presencia de NADH. El análisis estadístico de los datos indica, con un alto nivel de probabilidad, que el piruvato, el citrato y la acetoína actúan como inductores y es posible que lo haga también el butilenglicol, aunque las diferencias entre la actividad basal y la medida en las células cultivadas en presencia del mismo no son demasiado significativas ($p < 0,1$).

Los estudios de inducción de los enzimas responsables de la actividad diacetilo reductasa dependiente del NADPH se resumen en la tabla II. *L. casei* presentó una clara, aunque no muy abundante, actividad basal, que no se vio sensiblemente afectada por ninguno de los compuestos probados excepto, tal vez, por el diacetilo, que parece reprimir la actividad ($p < 0,1$). En *L. plantarum* es el citrato quien actúa como represor; el coeficiente de inducción es, en este caso, menos marcado que el

TABLA I
Inducción de la actividad diacetilo reductasa NADH-dependiente en *L. casei* y *L. plantarum*

EFECTOR	<i>L. casei</i>		<i>L. plantarum</i>	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**
Piruvato	0,96 ± 0,18 (p. 0,01)	∞	37,24 ± 1,79 (p. 0,001)	2,64
Citrato	0 — —	—	44,53 ± 1,34 (p. 0,001)	3,15
Butilenglicol	5,37 ± 1,52 (p. 0,01)	∞	18,59 ± 2,68 (p. 0,1)	1,31
Diacetilo	2,27 ± 0,55 (p. 0,01)	∞	10,85 ± 1,47 (p. 0,1)	0,78
Acetoína	4,19 ± 0,14 (p. 0,001)	∞	24,03 ± 2,77 (p. 0,01)	1,70
Act. basal	0 — —	—	14,12 ± 1,44 —	—

* 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 diacetilo reductasa dependiente del NADPH en *L. casei* y *L. plantarum*

EFECTOR	<i>L. casei</i>		<i>L. plantarum</i>	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coficiente**
Piruvato	10,04 ± 2,13 (p. 0,40)	1,28	13,72 ± 0,84 (p. 0,20)	0,84
Citrato	8,69 ± 1,59 (p. 0,70)	1,1	12,37 ± 0,61 (p. 0,01)	0,76
Butilenglicol	8,76 ± 0,94 (p. 0,70)	1,11	18,74 ± 1,15 (p. 0,10)	1,15
Diacetilo	3,06 ± 1,63 (p. 0,10)	0,39	13,9 ± 3,59 (p. 0,40)	0,85
Acetoína	6,86 ± 2,64 (p. 0,70)	0,87	17,1 ± 0,4 (p. 0,70)	1,05
Act. basal	7,86 ± 2,7	—	16,31 ± 0,96	—

* 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.

obtenido para la influencia del diacetilo en *L. casei*, pero la fiabilidad de esta conclusión es mayor en virtud de la menor dispersión de los datos recogidos; los demás compuestos ejercen poca o ninguna influencia.

En la tabla III figuran los resultados de las experiencias de regulación de la síntesis de los enzimas que catalizan la reducción de la acetoína acoplada a la oxidación de NADH. En *L. casei*, la actividad enzimática es inducida por el diacetilo y reprimida por el piruvato; el citrato, el butilenglicol y la acetoína carecen de efecto. En *L. plantarum* ninguno de los compuestos probados resultó ser eficaz; aunque con el citrato se obtuvo un coeficiente de inducción relativamente elevado, su valor estadístico ($p < 0,4$) es muy pobre.

La cepa de *L. casei* utilizada carecía también de actividad basal butilenglicol

TABLA III
Inducción de la actividad butilenglicol deshidrogenasa ligada al NADH en *L. casei* y *L. plantarum*

EFECTOR	<i>L. casei</i>		<i>L. plantarum</i>	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coficiente**
Piruvato	0,57 ± 0,16 (p. 0,05)	0,35	2,03 ± 0,79 (p. 0,60)	0,85
Citrato	1,78 ± 1,06 (p. 0,90)	1,09	4,01 ± 2,67 (p. 0,40)	1,67
Butilenglicol	2,02 ± 1,22 (p. 0,70)	1,24	3,06 ± 0,99 (p. 0,40)	1,27
Diacetilo	2,91 ± 0,46 (p. 0,05)	1,78	2,03 ± 1,06 (p. 0,70)	0,85
Acetoína	1,9 ± 1,73 (p. 0,90)	1,16	1,88 ± 0,79 (p. 0,40)	0,78
Act. basal	1,63 ± 0,63	—	2,4 ± 0,53	—

* 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.

deshidrogenasa dependiente del NADPH (tabla IV), pero pudo ser inducida con citrato y butilenglicol. La de *L. plantarum* disponía constitutivamente de cierta capacidad reductora de la acetoína NADPH-dependiente, aunque muy baja. Todos los efectores probados indujeron un fuerte aumento de la misma, si bien los datos para el diacetilo no son estadísticamente muy significativos.

DISCUSION

Se han descrito por lo menos siete deshidrogenasas distintas capaces de intervenir en las dos reacciones que conducen a la reducción del diacetilo a butilenglicol: A) Una que reduce el diacetilo y no la acetoína, al parecer aceptando como coenzima únicamente NADH (diacetilo reductasa NADH-dependiente¹⁸). B) Otra que cataliza la misma reacción utilizando NADH o NADPH (diacetilo reductasa NAD(P)H-dependiente^{4 5 6 12}); la última edición de la Lista de Enzimas de la International Union of Biochemistry⁸ considera a este enzima idéntico al anterior en base a uno de los trabajos de nuestro grupo⁵, pero esta interpretación nos parece incorrecta a la luz de las Normas para la Clasificación de Enzimas de la propia I.U.B.⁸. C) Una tercera diacetilo reductasa, específica para el NADPH, que, como las anteriores, no acepta la acetoína¹⁶. D) Otra que utiliza exclusivamente NADH como donador de hidrógeno, pero capaz de reducir tanto el diacetilo como la acetoína, que ha sido denominada diacetilo (acetoína) reductasa^{3 11}. E) Dos enzimas estereoespecíficas y dependientes del NADH, que catalizan la reducción de la acetoína a butilenglicol (D y L-butilenglicol deshidrogenasa^{18 19}). F) Finalmente, la L-glicol deshidrogenasa ya mencionada, que reduce tanto el diacetilo a acetoína como ésta a butilenglicol aceptando NADH o NADPH.

Cada especie microbiana puede disponer de varios de estos enzimas, lo que evidencia las dificultades de interpretación de nuestros resultados en medio de la

TABLA IV
Inducción de la actividad butilenglicol deshidrogenasa NADPH-dependiente en *L. casei* y *L. plantarum*

EFECTOR	<i>L. casei</i>		<i>L. plantarum</i>	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coficiente**
Piruvato	0	—	2,1 ± 0,16 (p. 0,001)	3,21
Citrato	0,79 ± 0,03 (p. 0,001)	∞	2,92 ± 0,81 (p. 0,01)	3,35
Butilenglicol	0,47 ± 0,04 (p. 0,001)	∞	1,89 ± 0,61 (p. 0,05)	2,89
Diacetilo	0,14 ± 0,25 (p. 0,40)	∞	1,27 ± 0,47 (p. 0,10)	1,94
Acetoína	0,13 ± 0,23 (p. 0,40)	∞	1,69 ± 0,44 (p. 0,05)	2,59
Act. basal	0	—	0,65 ± 0,02	—

* 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.

maraña de combinaciones posibles. No obstante, *L. casei* carece de actividades basales diacetilo reductasa dependiente del NADH y butilenglicol deshidrogenasa ligada al NADPH, lo que pone de manifiesto que sus dos actividades constitutivas sólo pueden ser debidas a la diacetilo reductasa NADPH-dependiente y a una de las dos butilenglicol deshidrogenasas que operan con NADH; la primera de ellas no se ve afectada significativamente por ninguno de los compuestos probados, mientras que la segunda es inducida por el diacetilo y reprimida por el piruvato. Por otra parte, el patrón de inducción de la actividad diacetilo reductasa medida con NADH es claramente diferente del de la determinada con NADPH, lo que descarta que aquélla sea debida a la glicol deshidrogenasa o a la diacetilo reductasa que utiliza NADH y NADPH, y del de la butilenglicol deshidrogenasa ligada al NADH, descartando también la intervención de la diacetilo (acetoína) reductasa y dejando como única posibilidad que el enzima responsable de la actividad sea la diacetilo reductasa específica para el NADH. En cuanto a la actividad butilenglicol deshidrogenasa NADPH-dependiente, ha de ser debida a un enzima específico que no utilice el diacetilo ni el NADH, en vista de su comportamiento frente a los efectores ensayados; no se ha descrito hasta el momento ninguna deshidrogenasa de estas características, aunque la Lista de Enzimas de la I.U.B.⁸ incluye algunos que es posible sean capaces de cumplir esta función. Es inducida por el citrato, el diacetilo, la acetoína y el butilenglicol.

Por el mismo tipo de argumentación, se concluye que el catabolismo del diacetilo por reducción está también catalizado en *L. plantarum* por cuatro enzimas específicos, una diacetilo reductasa ligada al NADH, otra al NADPH y dos butilenglicol deshidrogenasas, cada una de las cuales acepta solamente uno de los coenzimas. Estas deshidrogenasas se comportan frente a los compuestos probados de un modo bastante semejante a las de *L. casei* excepto la butilenglicol deshidrogenasa NADH-dependiente, que no respondió a ninguno de los efectores, probablemente por tratarse del otro de los dos enzimas estereoespecíficos capaces de catalizar esta reacción.

RESUMEN

Se ha estudiado la influencia del piruvato, el citrato, el diacetilo, la acetoína y el butilenglicol sobre la síntesis en *L. casei* y *L. plantarum* de los enzimas del catabolismo del diacetilo por reducción. De los resultados obtenidos se ha concluido que estos microorganismos disponen de: a) una diacetilo reductasa NADH-dependiente y una butilenglicol deshidrogenasa específica para el NADPH, que pueden ser inducidas por cualquiera de los efectores probados; b) una diacetilo reductasa dependiente del NADPH, que reprime ligeramente el citrato; c) una butilenglicol deshidrogenasa específica para el NADH diferente para cada lactobacilo, la de *L. casei* inducida por el diacetilo y reprimida por el piruvato y la de *L. plantarum* no afectada por ninguno de los compuestos cuyo efecto se ha estudiado.

INDUCTION AND REPRESSION OF THE ENZYMES WITH CATALYZE THE REDUCTIVE CATABOLISM OF DIACETYL IN LACTIC BACTERIA: (I) *LACTOBACILLUS CASEI* AND *L. PLANTARUM*

SUMMARY

The effect of pyruvate, citrate, diacetyl, acetoin and butyleneglycol on the synthesis by *L. casei* and *L. plantarum* of the enzymes involved in the catabolism of diacetyl by reduction to butyleneglycol has been studied. Both organisms have the following dehydrogenases implied in this pathway: 1) a diacetyl reductase NADH-dependent and a butyleneglycol dehydrogenase NADPH-linked which can be induced by all the above named effectors; 2) a diacetyl reductase NADPH-dependent, the synthesis of which is slightly repressed by citrate; and 3) a butyleneglycol dehydrogenase NADH-linked which in *L. casei* is induced by diacetyl and repressed by pyruvate and in *L. plantarum* is not affected by any of the compounds tried.

BIBLIOGRAFIA

- 1) 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.
- 2) BRANEN, A. L. y KEENAN, T. W. (1970).—Diacetyl reductase of *Lactobacillus casei*. *Can. J. Microbiol.*, **16**, 947-951.
- 3) BRYN, K.; HETLAND, O. y STØRMER, F. C. (1971).—The reduction of diacetyl and acetoin in *Aerobacter aerogenes*. *Eur. J. Biochem.*, **18**, 116-119.
- 4) BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1972).—Purification and some properties of diacetyl reductase from beef liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 261-270.
- 5) DÍEZ, V.; BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1974).—Pigeon liver diacetyl reductase: purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 253-262.
- 6) GABRIEL, M. A., JABARA, H. y AL-KHALIDI, U. A. S. (1971).—Metabolism of Acetoin in mammalian liver slices and extracts. *Biochem. J.*, **124**, 793-800.
- 7) GORNALL, A. G.; BARDWILL, CH. J. y DAVID, M. A. (1949).—Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766.
- 8) INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (1979).—*Enzyme Nomenclature*, 1978. Academic Press, New York, pp. 6-26, 28 y 38.
- 9) JUNI, E. (1952).—Mechanisms of formation of acetoin by bacteria. *J. Biol. Chem.*, **195**, 715-726.
- 10) KEENAN, T. W. y LINDSAY, R. C. (1968).—Diacetyl production and utilization by *Lactobacillus* species. *J. Dairy Sci.*, **51**, 188-191.
- 11) LARSEN, S. H.; JOHANSEN, L.; STØRMER, F. C. y STORESUND, H. J. (1973).—Formation of 2,3-pentanediol from 2,3-pentanedione and acetyethylcarbinol by diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*. A possible new pathway. *FEBS Lett.*, **31**, 39-41.
- 12) LÓPEZ LORENZO, P.; MARTÍN, R.; HERRERO, L. y BURGOS, J. (1975).—Especificidad para el coenzima de la diacetilo reductasa de hígado de bóvido. *An. Fac. Vet. León*, **21**: 391-398.
- 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) SEITZ, E. W.; SANDINE, W. E.; ELLIKER, P. R. y DAY, E. A. (1963).—Studies on diacetyl biosynthesis by *Streptococcus diacetylactis*. *Can. J. Microbiol.*, **9**, 431-441.
- 15) SHIMIZU, H.; HANAICHI, Y.; OKODA, 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 SCHULTZ, H. (1974).—Purification and properties of diacetyl reductase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **118**, 919-927.
- 17) SPECKMAN, R. A. y COLLINS, E. B. (1968).—Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bacteriol.*, **95**, 174-180.
- 18) STRECKER, H. J. y HARARY, I. (1954).—Bacterial butylene glycol dehydrogenase and diacetyl reductase. *J. Biol. Chem.*, **211**, 263-270.
- 19) TAYLOR, M. B. y JUNI, E. (1960).—Stereoisomeric specificities of 2,3-butanediol dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 448-457.
- 20) WESTERFELD, W. W. (1945).—A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.*, **161**, 495-502.

**REGULACION EN BACTERIAS LACTICAS
DE LA SINTESIS DE LOS ENZIMAS DEL CATABOLISMO
DEL DIACETILO POR REDUCCION: (II) *STREPTOCOCCUS
DIACETILACTIS* Y *S. LIQUEFACIENS***

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

INTRODUCCION

Keenan y colaboradores^{2 10} y, más recientemente, otros autores^{3 17}, han comprobado que el piruvato y el citrato actúan en *Lactobacillus casei* y *Aerobacter aerogenes* como inductores de algunos de los enzimas NADH-dependientes capaces de reducir el diacetilo, lo que ofrece la posibilidad de controlar la acumulación de este compuesto en los alimentos a través de la regulación de la síntesis de las deshidrogenasas de su catabolismo por los microorganismos que lo producen. En este trabajo se informa de las experiencias efectuadas para explorar esta posibilidad en *Streptococcus diacetilactis* y *Streptococcus liquefaciens*.

MATERIAL Y METODOS

Las cepas de *S. diacetilactis* (ATCC 15346) y *S. liquefaciens* (NCIB 8256) utilizadas fueron proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo; para su propagación se empleó caldo Elliker. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el planteamiento y la metodología utilizados en los estudios efectuados con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*¹⁶, excepto que la ruptura de las células de *S. diacetilactis* requirió un tratamiento ultrasónico más prolongado, en torno a una hora; asimismo, el medio mínimo para el crecimiento de este microorganismo fue algo más rico en extracto de levadura (2% en lugar de 0,5%).

RESULTADOS

Los estudios realizados ponen de manifiesto que los dos estreptococos disponen de actividad diacetilo reductasa NADH-dependiente constitutiva, que, en el caso de