

- 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.

CATEDRA DE BIOQUIMICA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

(Prof. J. BURGOS)

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

S. liquefaciens, alcanza cifras de cierta consideración (Tabla I). Ninguno de los compuestos ensayados como efectores provoca un aumento significativo de la actividad basal. Por el contrario, el diacetilo la reprime claramente en ambos microorganismos, con coeficientes de inducción de 0,29 y 0,47 y una fiabilidad estadística satisfactoria ($p < 0,05$).

Algo semejante ocurre también con la capacidad de reducir diacetilo en presencia de NADPH (tabla II): los dos gérmenes disponen de una estimable actividad basal, que en *S. diacetilactis* se ve fuertemente reprimida por el diacetilo (coeficiente, 0,18; $p < 0,01$) y en *S. liquefaciens* no resulta afectada por ninguno de los metabolitos utilizados; el butilenglicol parece provocar un ligero aumento de la actividad enzimática en este microorganismo, pero el coeficiente de inducción ni siquiera alcanza 1,5 y la probabilidad de que las diferencias con respecto a la constitutiva sean

TABLA I
Inducción de la actividad diacetilo reductasa ligado al NADH en *S. diacetilactis* y *S. liquefaciens*

EFECTOR	<i>S. diacetilactis</i>		<i>S. liquefaciens</i>	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**
Piruvato	3,27 ± 1,18 (p. 0,90)	0,95	44,2 ± 13,3 (p. 0,70)	1,12
Citrato	2,87 ± 1,45 (p. 0,70)	0,84	32,1 ± 3,5 (p. 0,30)	0,81
Butilenglicol	4,33 ± 2,16 (p. 0,60)	1,26	34,3 ± 7,3 (p. 0,50)	0,87
Diacetilo	1,0 ± 0,38 (p. 0,05)	0,29	18,7 ± 1,8 (p. 0,05)	0,47
Acetoína	2,92 ± 0,55 (p. 0,60)	0,85	38,3 ± 2,5 (p. 0,90)	0,97
Act. basal	3,42 ± 1,17	—	39,5 ± 8,6	—

* 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.

TABLA II
Inducción de la actividad diacetilo reductasa NADPH-dependiente en *S. diacetilactis* y *S. liquefaciens*

EFECTOR	<i>S. diacetilactis</i>		<i>S. liquefaciens</i>	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**
Piruvato	10,91 ± 2,0 (p. 0,70)	1,11	9,92 ± 3,38 (p. 0,30)	0,81
Citrato	9,62 ± 2,47 (p. 0,90)	0,98	11,38 ± 3,57 (p. 0,80)	0,93
Butilenglicol	10,69 ± 1,39 (p. 0,70)	1,09	17,94 ± 4,97 (p. 0,20)	1,47
Diacetilo	1,80 ± 0,42 (p. 0,01)	0,18	15,33 ± 6,73 (p. 0,50)	1,25
Acetoína	11,23 ± 0,43 (p. 0,50)	1,14	9,59 ± 3,32 (p. 0,30)	0,78
Act. basal	9,28 ± 2,89	—	12,21 ± 0,47	—

* 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.

debidas al azar es alta ($p < 0,2$). La principal divergencia entre ambos estreptococos radica en el comportamiento frente al diacetilo, que en *S. liquefaciens* no sólo no reprime la síntesis de los enzimas responsables de esta reacción, sino que produce un coeficiente de inducción algo superior a la unidad, si bien con poco o nulo apoyo estadístico.

S. diacetilactis dispone de cierta actividad basal butilenglicol deshidrogenasa ligada al NADH, que no resulta claramente inducida ni reprimida por los compuestos probados (tabla III); si bien en las experiencias con citrato como efector se obtuvo un coeficiente de 0,58, la probabilidad máxima de que la diferencia entre la actividad de las células cultivadas en presencia de aquél y la de las crecidas en el medio mínimo sea debida al azar es bastante alta ($< 0,2$). *S. liquefaciens*, en cambio, dispone de una fuerte actividad constitutiva que no es reprimida por el citrato, aunque tal vez sí por el diacetilo ($p < 0,1$), y se induce ligeramente por el piruvato, con un coeficiente muy bajo (1,24) pero un valor de $p < 0,001$. Todo ello pone de manifiesto que las deshidrogenasas responsables de esta reacción son distintas en los dos microorganismos.

Por último, nuestra cepa de *S. liquefaciens* no dispone de enzimas capaces de reducir la acetoína a butilenglicol utilizando NADPH como donador de hidrógeno (tabla IV), ni pueden ser inducidos por el piruvato, el citrato, la acetoína ni tampoco, probablemente, por el butilenglicol y el diacetilo, a pesar de que en uno de los experimentos pareció observarse cierta actividad, apenas mensurable. La de *S. diacetilactis* presenta actividad constitutiva butilenglicol deshidrogenasa NADPH-dependiente, pero muy baja; no es inducida por ninguno de los productos ensayados y es reprimida fuertemente por el citrato.

DISCUSION

El paralelismo existente en el comportamiento de las dos actividades reductoras de diacetilo de *S. diacetilactis* frente a los distintos compuestos cuya acción efectora

TABLA III
Inducción de la actividad butilenglicol deshidrogenasa dependiente del NADH en *S. diacetilactis* y *S. liquefaciens*

EFECTOR	<i>S. diacetilactis</i>		<i>S. liquefaciens</i>	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**
Piruvato	1,45 ± 1,18 (p. 0,60)	1,46	79,8 ± 1,2 (p. 0,001)	1,24
Citrato	0,57 ± 0,06 (p. 0,20)	0,58	61,0 ± 2,6 (p. 0,30)	0,95
Butilenglicol	0,64 ± 0,19 (p. 0,30)	0,65	71,7 ± 12,0 (p. 0,40)	1,12
Diacetilo	1,26 ± 0,52 (p. 0,60)	1,27	40,4 ± 16,8 (p. 0,10)	0,63
Acetoína	0,96 ± 0,45 (p. 0,90)	0,97	63,2 ± 2,1 (p. 0,70)	0,98
Act. basal	0,99 ± 0,45	—	64,2 ± 2,9	—

* 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 IV
Inducción de la actividad butilenglicol deshidrogenasa NADPH-dependiente en *S. diacetilactis* y *S. liquefaciens*

EFECTOR	<i>S. diacetilactis</i>		<i>S. liquefaciens</i>	
	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**	Actividad específica* (unidades/mg proteína)	Coeficiente**
Piruvato	0,38 ± 0,13 (p. 0,20)	0,68	0	—
Citrato	0,09 ± 0,14 (p. 0,05)	0,16	0	—
Butilenglicol	0,54 ± 0,17 (p. 0,90)	0,96	0,17 ± 0,30 (p. 0,40)	—
Diacetilo	0,48 ± 0,45 (p. 0,80)	0,86	0,41 ± 0,71 (p. 0,40)	—
Acetoína	0,37 ± 0,14 (p. 0,20)	0,66	0	—
Act. basal	0,56 ± 0,14	—	0	—

* 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.

se ha estudiado, permite sugerir que ambas se encuentran catalizadas en este microorganismo por la misma deshidrogenasa, presumiblemente la diacetilo reductasa NAD(P)H-dependiente^{4 5 6 13}. Existe otro enzima al que podría ser debido el citado efecto, la L-glicol deshidrogenasa, pero ésta reduce también la acetoína a butilenglicol¹, por lo que debería repetirse el mismo patrón de inducción en las cuatro reacciones medidas y no únicamente en las de reducción del diacetilo, máxime teniendo en cuenta que las actividades constitutivas butilenglicol deshidrogenasa fueron muy bajas y no es probable, por ello, que la acción inductora se viese enmascarada por la presencia de otros enzimas de comportamiento distinto. La diacetilo reductasa dependiente del NAP (P) H solamente ha sido estudiada en tejidos animales^{4 5 6 13 14}, pero es perfectamente posible que opere también en microorganismos.

Decidir qué enzimas intervienen en la reducción de la acetoína resulta más complicado. Dada la baja actividad basal obtenida, la precisión de los datos en términos relativos es escasa. No obstante, puede admitirse un cierto parecido entre el patrón de inducción de la actividad con NADH y con NADPH, por lo que cabe postular que las dos reacciones son debidas al mismo enzima, una butilenglicol deshidrogenasa NAD-(P)H-dependiente; la glicol deshidrogenasa podría desempeñar estas funciones, pero queda descartada por los argumentos ya usados para rechazar su intervención en la reducción de diacetilo. También es posible que operen dos enzimas distintos, uno específico para el NADH, probablemente la butilenglicol deshidrogenasa no inductible observada en *L. plantarum*¹⁶, y otro para el NADPH, que habría de ser distinto del que aparece en las especies del género *Lactobacillus* ya estudiadas¹⁶ por cuanto lo es claramente su patrón de inducción.

En *S. liquefaciens*, los datos para la reducción de diacetilo medida con NADH se

asemejan muy poco a los correspondientes a la determinada con NADPH y son, en cambio, bastante coincidentes con los obtenidos para la reacción butilenglicol deshidrogenasa NADH-dependiente. Se deduce, pues, que debe tratarse de un enzima específico para este piridín-nucleótido, pero capaz de aceptar tanto diacetilo como acetoína. Por lo que se sabe hasta el momento, sólo cumple esta condición la denominada diacetilo(acetoína) reductasa, purificada y estudiada por Storer y colaboradores a partir de extractos de *Aerobacter aerogenes*^{3 11}, cuya existencia en los microorganismos está, por tanto, sólidamente establecida. En consecuencia, la actividad reductora del diacetilo con NADPH ha de ser debida a un enzima específico, con toda probabilidad la diacetilo reductasa NADPH-dependiente¹⁸, que también cataliza esta reacción en *L. casei* y *L. plantarum* y que, como aquí, no se ve inducida ni reprimida por ninguno de los compuestos probados como efectores¹⁶.

Nuestros datos ponen de manifiesto que la síntesis de la diacetilo reductasa NAD (P) H-dependiente en *S. diacetilactis* y la de la diacetilo(acetoína) reductasa en *S. liquefaciens* se encuentra reprimida por el diacetilo, lo que puede parecer sorprendente porque no es muy frecuente que la acumulación de un sustrato conduzca al bloqueo de la producción de los enzimas encargados de consumirlo. No obstante, el catabolismo del diacetilo tiene lugar de un modo un tanto peculiar, que podría dar explicación a este fenómeno: su reducción a acetoína es casi irreversible, con una Keq del orden de 400, mientras que el equilibrio de la reacción butilenglicol deshidrogenasa se encuentra mucho menos desplazado en favor del sentido reductasa^{12 15}. Esto determina que cuando en el medio aparecen concentraciones elevadas de diacetilo, las de acetoína han de ser mucho mayores y las de butilenglicol algo más elevadas aún (salvo desplazamientos muy grandes del equilibrio NAD(P)/NAD(P)H en favor de las formas oxidadas). El butilenglicol resulta muy poco tóxico para los microorganismos, pero la acetoína probablemente lo es mucho más⁷. Una acumulación excesiva de diacetilo podría conducir, por tanto, a que la acetoína alcanzase niveles peligrosos, en cuyo caso tendría sentido que se bloquease la producción de los enzimas que lo reducen para dirigir su catabolismo hacia otras vías alternativas, v.g., a su conversión en acetato^{8 9}.

RESUMEN

El diacetilo reprime la síntesis de los enzimas que lo reducen en *S. diacetilactis* y la actividad diacetilo reductasa NADH-dependiente de *S. liquefaciens*, el piruvato induce ligeramente la butilenglicol deshidrogenasa ligada al NADH de este microorganismo y el citrato reprime la dependiente del NADPH en aquél. Se postula que *S. liquefaciens* opera con la diacetilo(acetoína) reductasa y la diacetilo reductasa específica para el NADPH y que *S. diacetilactis* lo hace con la diacetilo reductasa NAD(P)H-dependiente y, probablemente, con otro enzima no conocido que cataliza la reacción butilenglicol deshidrogenasa aceptando NADH y NADPH.

**INDUCTION AND REPRESSION OF THE ENZYMES
WHICH CATALYZE THE REDUCTIVE CATABOLISM OF DIACETYL
IN LACTIC BACTERIA: (II) *STREPTOCOCCUS DIACETILACTIS*
AND *LIQUEFACIENS***

SUMMARY

Diacetyl represses in *S. diacetilactis* the synthesis of the enzymes involved in its reduction and the NADH-linked diacetyl reductase activity in *S. liquefaciens*; pyruvate slightly induces the NADH-dependent butyleneglycol dehydrogenase in this organism and citrate represses the NADPH-linked butyleneglycol dehydrogenase in *S. diacetilactis*. It is suggested that the reductive catabolism of diacetyl is catalyzed in *S. liquefaciens* by diacetyl (acetoin) reductase and the diacetyl reductase specific for NADH and by the NAD(P)H-dependent diacetyl reductase in *S. diacetilactis*, in which another enzyme, likely a butyleneglycol dehydrogenase able to accept NADH and NADPH, operates too.

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) GAUNT, I. F.; BRANTOM, P. G.; KISS, I. S.; GRASSO, P. y GANGOLLI, S. D. (1972).—Short-term toxicity of acetoin (acetylmethylcarbinol) in rats. *Fd Cosmet. Toxicol.*, **10**, 131-141.
- 8) GREEN, D. E.; STUMPF, P. K. y ZARUDNAYA, K. (1947).—Diacetyl mutase. *J. Biol. Chem.*, **167**, 811-816.
- 9) JUNI, E. y HEYM, G. (1956).—A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethyl carbinol and diacetyl: (II) the synthesis of diacetylmethylcarbinol from diacetyl, a new diphosphothiamin catalyzed reaction. *J. Bacteriol.*, **72**, 746-753.
- 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 acetylmethylcarbinol by diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*. A possible new pathway. *FEBS Lett.*, **31**, 39-41.
- 12) LARSEN, S. H. y STØRMER, F. C. (1973).—Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*: kinetic mechanism and regulation by acetate of the reversible reduction of acetoin to 2,3-butanediol. *Eur. J. Biochem.*, **34**, 100-106.
- 13) LÓPEZ LORENZO, P.; MARTÍN, R.; HERRERO, L. y BURGOS, J. (1975).—Especificidad para el coenzima de la diacetilo reductasa de hígado de b6vido. *An. Fac. Vet. León*, **21**, 391-398.
- 14) MARTÍN, R. y BURGOS, J. (1970).—Diacetyl reductase in animal tissues and its intracellular distribution. *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 356-358.
- 15) MARTÍN, R.; DÍEZ, V. y BURGOS, J. (1976).—Pigeon liver diacetyl reductase: effects of pH on the kinetic parameters of the reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 293-300.

- 16) 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. plantarum*. *An. Fac. Vet. León*, en este volumen.
- 17) 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.
- 18) SILBER, P.; CHUNG, H.; GARGIULO, P. y SCHULTZ, H. (1974).—Purification and properties of diacetyl reductase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **118**: 919-927.