

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

Tomás García-Cayuela¹, Luz P. Gómez de Cadiñanos¹, Mireille Yvon², Carmen Peláez¹ y Teresa Requena^{1*}¹Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos (CSIC-UAM), Madrid, Spain. *Email: t.requena@csic.es²INRA, UR 477 Biochimie Bactérienne, F-78350 Jouy-en-Josas, Francia




 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

INTRODUCCIÓN

Las enzimas hidroxiaácido deshidrogenasas (HA-DH) son oxidorreductasas dependientes de NAD(H) que catalizan la síntesis estereoespecífica de α -hidroxiaácidos. Además, están negativamente relacionadas con la formación de aroma debido a que compiten por los α -cetoácidos, que son los precursores de compuestos volátiles.

La principal actividad HA-DH de *Lactococcus lactis*, la actividad hidroxisocaproato deshidrogenasa (Hic-DH), ha sido identificada mediante mutagénesis en el producto codificado por el gen *panE*.

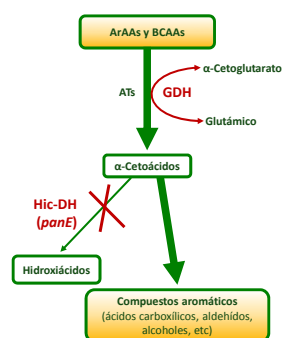
La enzima GDH, poco frecuente en *L. lactis*, cataliza la reacción reversible de desaminación oxidativa del glutamato en α -cetoglutarato y amonio.

La cepa *L. lactis* IFPL953 se caracteriza por presentar actividad GDH, además de actividades clave relacionadas con el catabolismo de aminoácidos, como aminotransferasa (AraT y BcaT) y cetoácido descarboxilasa (KivD).

El control del flujo metabólico de α -cetoácidos para su conversión eficiente hasta compuestos volátiles podría conseguirse:

Bloqueando la ruta de conversión de α -cetoácidos a los correspondientes hidroxiaácidos mediante la inactivación del gen *panE*

Aumentando la disponibilidad de α -cetoglutarato como aceptor de grupos amino en la reacción de transaminación a través de la actividad GDH



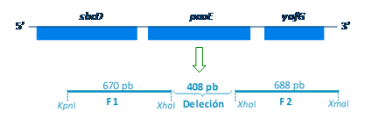
Esquema simplificado del catabolismo de aminoácidos a partir de aminoácidos aromáticos (AraAAs) y de cadena ramificada (BCAAs). ATs, aminotransferasas; GDH, glutamato deshidrogenasa; Hic-DH, hidroxisocaproato deshidrogenasa.



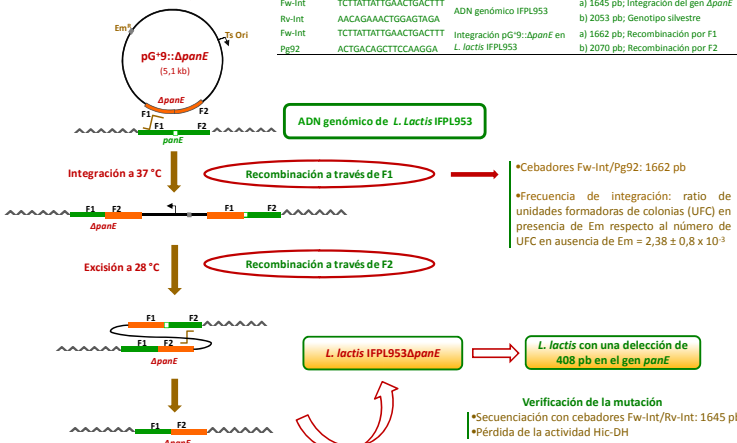
Se procedió a la mutación del gen *panE* en la cepa silvestre *L. lactis* IFPL953 y se evaluó la capacidad de la estirpe mutante obtenida para formar compuestos volátiles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se inactivó el gen *panE* en *L. lactis* IFPL953 mediante mutagénesis por doble sobrecruzamiento.



Cebadores	Secuencia (5'→3')	Región a amplificar	Descripción de los productos de amplificación
Fw-Int	TCTTATTGAACTGACTCTT	ADN genómico IFPL953	a) 1645 pb; Integración del gen <i>ΔpanE</i>
Rv-Int	AACGAAGACTGGAGTAGA	ADN genómico IFPL953	b) 2053 pb; Genotipo silvestre
Fw-Int	TCTTATTGAACTGACTCTT	Integración pG ⁺ - <i>ΔpanE</i> en <i>L. lactis</i> IFPL953	a) 1662 pb; Recombinación por F1
Pg92	ACTGACAGCTCCAAAGA	<i>L. lactis</i> IFPL953	b) 2070 pb; Recombinación por F2



Se evaluó la actividad Hic-DH midiendo la reducción del α -cetisocaproato (cetoácido de la leucina; KIC) a α -hidroxisocaproato en las cepas *L. lactis* IFPL953, *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* y *L. lactis* TIL46 (control positivo).

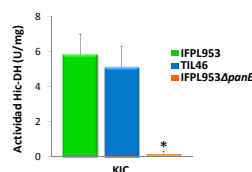
Se investigó la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) a partir del crecimiento de las cepas *L. lactis* IFPL953 y *L. lactis* IFPL953 Δ *panE*, empleando un medio químicamente definido (CDM) y leche.

La evolución del crecimiento durante 24 h e incubación a 30 °C se siguió mediante medidas de densidad óptica a 480 nm (DO₄₈₀) y pH.

Los COVs producidos por las cepas IFPL953 e IFPL953 Δ *panE*, tras 30 h de incubación (fase estacionaria tardía) en CDM y leche fueron analizados en el espacio de cabeza mediante microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pérdida de la actividad hidroxisocaproato deshidrogenasa por inactivación del gen *panE*

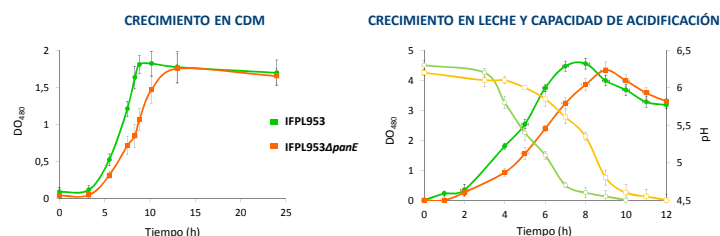


La cepa *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* presenta una pérdida total de actividad Hic-DH a consecuencia del reemplazamiento del gen *panE* por el gen mutado *ΔpanE*.

Este resultado confirmó el hecho de que PanE es la única enzima responsable de la reducción de los α -cetoácidos de cadena ramificada en *L. lactis*.

Actividad Hic-DH del contenido intracelular (CFE) frente a α -cetisocaproato (KIC). Una unidad (U) de actividad Hic-DH se definió como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μ mol de NADH por min y por mg de proteína en el CFE (U/mg) a 37 °C. Los datos se corresponden al valor medio \pm desviación estándar de seis réplicas independientes. *, P<0,05.

Efecto de la mutación del gen *panE* sobre el crecimiento y la capacidad de acidificación

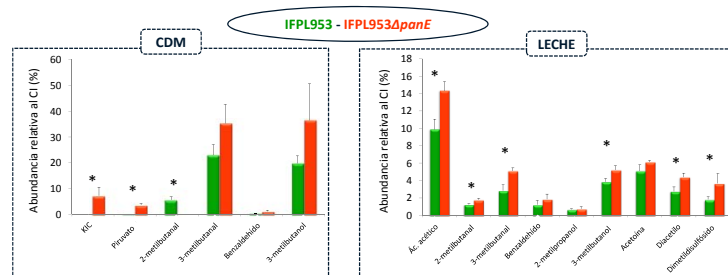


Curvas de crecimiento (símbolos rellenos) y de acidificación (símbolos vacíos) de *L. lactis* IFPL953 e IFPL953 Δ *panE*. Incubaciones realizadas a 30 °C. Curvas obtenidas mediante la lectura de DO₄₈₀ a partir de 3 repeticiones biológicas con cada medio. Crecimiento en medio químicamente definido (CDM) durante 24 h (izquierda) y crecimiento en leche y acidificación del pH durante 12 h (derecha).

Las diferencias de crecimiento entre las dos cepas, silvestre y mutante, no fueron significativas, aunque sí se pudo observar un ligero retraso en el crecimiento en ambos medios (CDM tamponado y leche no tamponada) de la cepa IFPL953 Δ *panE* con respecto a la cepa IFPL953. Del mismo modo, pudimos observar un retraso en la capacidad acidificante de la cepa mutante en leche con respecto a la silvestre.

Los resultados confirmaron que la mutación del gen *panE* no tuvo una repercusión significativa en el crecimiento y la capacidad de acidificación de la cepa IFPL953 Δ *panE*.

Efecto de la mutación del gen *panE* sobre la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs)



Compuestos volátiles más representativos producidos por *L. lactis* IFPL953 y *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* tras 30 h de cultivo a 30 °C en medio químicamente definido (CDM) y en leche. Los datos representan las abundancias relativas (%) respecto del 4-metil-2-pentanol (control interno, CI) procedentes de 3 repeticiones biológicas. Las diferencias significativas (P<0,05) son representadas con un asterisco (*).

El análisis por SPME-GC-MS permitió la identificación de un amplio rango de COVs, generando ambas cepas un mayor número cuando fueron crecidas en leche frente a los producidos cuando crecieron en CDM.

La cepa silvestre IFPL953 dio lugar a un menor número de COVs que la cepa mutante IFPL953 Δ *panE*, aunque solo se detectaron diferencias significativas (P<0,05) entre las dos cepas en algunos compuestos.

Se encontraron en el cultivo en leche de la cepa mutante cantidades superiores (P<0,05) de 3-metilbutanal (derivado de la leucina) y 2-metilbutanal (derivado de la isoleucina) a las encontradas en el de 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.

CONCLUSIONES

La mutación del gen *panE* no dificulta el crecimiento de *L. lactis* IFPL953 Δ *panE* en medio de cultivo y en leche.

La supresión de la actividad Hic-DH en una cepa de *L. lactis* con actividades GDH, AraT, BcaT y KivD da lugar a la acumulación de α -cetisocaproato y favorece su posterior conversión hacia compuestos volátiles.

L. lactis IFPL953 Δ *panE* es más eficiente que su cepa parental en la formación de compuestos volátiles relacionados con el aroma del queso.