

# PRODUCTES FINALS DE FERMENTACIÓ I ESTAT D'OXIDACIÓ-REDUCCIÓ DEL SUBSTRAT

per MARIA-TERESA PERDIGÓ

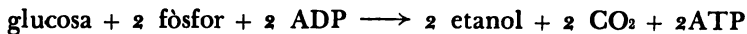
Departament de Microbiologia. Facultat de Ciències  
(Universitat de Barcelona)

## INTRODUCCIÓ

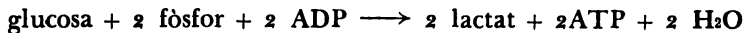
El metabolisme fermentatiu dels diferents tipus bacterians és caracteritzat fonamentalment per la natura i proporció dels productes finals diversos.

Aquests productes finals serveixen per a identificar uns patrons o vies de fermentació característics en nombre reduït, i en molts casos fins i tot ajuden a fer divisions taxonòmiques entre els bacteris. Un exemple d'això que acabem de dir es troba en les següents reaccions globals que caracteritzen una sèrie de tipus bacterians fermentatius<sup>7, 17</sup>:

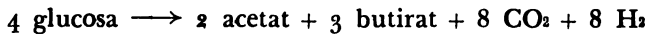
Fermentació alcohòlica:



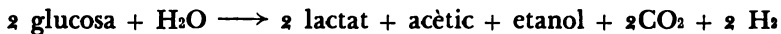
Fermentació homolàctica:



Fermentació butírica:



Fermentació àcido-mixta:



Fermentació 2,3 butilneglicòlica:

de la glucosa: acètic, làctic, etanol, acetoïna, 2,3 butilneglicol, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>

La producció d'etanol és la característica de la fermentació alcohòlica, la d'àcid làctic és la característica de la fermentació làctica, el butíric de la butírica. El descens del pH fins a un nivell suficientment baix que doni positiva la prova del vermell de metil és característica de la fermentació àcido-mixta, i, quant a la fermentació 2,3 butilneglicòlica, és característica la producció d'acetoïna i de 2,3 butilneglicol a pH inferior a 6. L'acetoïna és el producte responsable de la reacció de VOGES PROSKAUER, prova molt corrent en bacteriologia, en la qual en medi alcalí reacciona l'acetoïna amb un grup guanidina i produeix un color vermell que s'incrementa encara amb l'addició de creatina i  $\alpha$ -naftol.

Tot això es refereix, tanmateix, a la fermentació de la glucosa. En realitat, la composició i les quantitats relatives de productes finals de la fermentació d'altres substrats, fins i tot molt relacionats amb la glucosa, poden variar, i varien, de fet, en el mateix bacteri. L'única cosa que es verifica és que cada bacteri té unes possibilitats determinades derivades del seu equip d'enzims, i els productes finals que hom n'obté en cada cas depenen dels mecanismes més eficaços per a regenerar els coenzims i els acceptors d'electrons com el NAD.

El sistema general està lligat a les reaccions d'oxidació-reducció que poden mantenir una relació ATP/ADP definida. El canvi de mecanisme que porta en si el canvi de substrat està relacionat amb dues necessitats:

- a) Equilibrar el balanç  $\text{NAD}_2\text{H}/\text{NAD}^+$ .
- b) Assolir una màxima producció d'energia.

L'ajust òptim de la producció d'ATP, en les condicions que permet el balanç d'oxidació i reducció, constitueix la capacitat adaptativa del bacteri.

L'estat d'oxidació i reducció inicial del substrat té importància quant a les reaccions que tindran lloc per a la seva fermentació. Els substrats més oxidats o més reduïts que la glucosa han de donar unes proporcions diferents de productes finals i poden donar fins i tot productes finals diferents.

L'objecte de la present comunicació és mostrar com, en el gènere *Enterobacter*, un dels productes finals característics, la producció d'acetoïna, cessa quan el substrat passa d'ésser glucosa a ésser glicerina (substrat més reduït), i això malgrat que l'acetoïna també és un producte reduït i que el patró de fermentació per a ambdós substrats és el mateix.

En efecte, la glicerina, que és un substrat fàcilment utilitzable per molts bacteris, s'incorpora a la via d'EMBDEN MEYERHOFF, que és la que utilitza *Enterobacter* per a fermentar la glucosa, en forma de fosfat de

di-hidroxi-cetona, amb una fosforilació i una oxidació prèvies. És a dir que, a partir d'aquest punt, la utilització catabòlica de la glicerina sembla que seria la mateixa que la de la glucosa <sup>7, 17</sup>.

#### CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES

Han estat realitzades una sèrie de proves metabòliques <sup>3</sup> que han permès de classificar, entre d'altres, el bacteri estudiat com a *Enterobacter aerogenes* var. *indologenes* CCB <sup>4</sup>. Aquesta soca és molt activament fermentadora de la glicerina amb producció abundant d'àcid i gas.

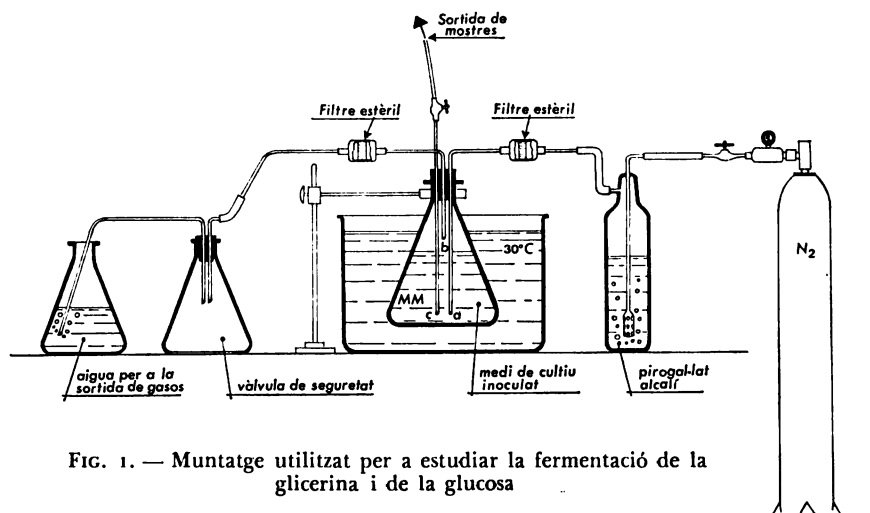


FIG. 1. — Muntatge utilitzat per a estudiar la fermentació de la glicerina i de la glucosa

Per a calcular els gasos despresos en la fermentació, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>, ha estat emprat el mètode de BARCROFT WARBURG amb les cèl·lules suspeses en un medi mineral a pH 6 o 5'4.

Ha estat estudiada metabòlicament la producció d'acetoïna i 2,3 butilenglicol en glucosa i comparativament en glicerina en condicions anaeròbiques. Per a això hom ha utilitzat un muntatge que, alhora que mantenia l'anaerobiosi, permetia l'extracció de mostres a mesura que prosseguia el creixement (vegeu fig. 1).

El creixement fou mesurat valorant l'absorbància a 400 m $\mu$ . La glicerina fou valorada pel mètode d'EGGSTEIN i KREUTZ <sup>4</sup>, la glucosa pel de WERNER, REY i WIELINGER <sup>15</sup>; hom valorà l'etanol pel mètode de BUCHNER i REDENTZKI <sup>1</sup>, i el 2,3 butilenglicol i el trimetilenglicol per cromato-

grafia de gasos; l'acetoïna pel mètode de WESTERFELD, que és una tècnica basada en la reacció de VOGES PROSKAUER per mitjà de la qual pot ésser valorada l'acetoïna d'una manera quantitativa espectro-fotomètrica-ment <sup>16</sup>.

La concentració del substrat per a aquests experiments fou calculada d'acord amb les idees de MONOD<sup>11</sup>, cercant experimentalment que fos la quantitat de substrat allò que en limités el creixement de manera que el cultiu prosseguís en una clara fase exponencial fins a l'esgotament del substrat sense acumular productes tòxics. La concentració final escollida fou d'1 g de glicerina o de 500 mg de glucosa (quantitats equimolars en mols de triosa) per un litre de medi de cultiu exclusivament mineral. Aquesta quantitat de substrat és suficient perquè la corba sigui típica i amb producció considerable d'acetoïna en el medi amb glucosa.

El pH del medi té una gran importància en la formació d'acetoïna en el gènere *Enterobacter*<sup>8</sup>. En efecte, l'acetoïna no apareix si el pH és superior a 6, com hem comprovat experimentalment. Per aquest motiu el pH inicial del medi fou fixat a 5,4, i aquest tot valorat al llarg del creixement sense afegir-hi sosa ni cap altra substància per prevenir l'acidificació. Hom comprovà també que el descens del pH que proporciona la quantitat de substrat indicada en el medi tamponat no és incompatible amb la continuació del creixement i és favorable a la producció d'acetoïna. La temperatura fou fixada a 30° C, que és la temperatura òptima de creixement d'aquesta soca.

L'inòcul de 10 ml del mateix medi amb el mateix substrat que hom assaja, amb creixement bacterià de la soca que hom vol estudiar, és utilitzat sempre a la fi de la fase exponencial <sup>11</sup>.

Hi havia la possibilitat que la glicerina inhibís o reprimís la producció d'acetoïna o que la glucosa, per mitjà de la repressió catabòlica, inhibís la producció d'algun altre metabolit típic de la fermentació de la glicerina. Per això hom féu estudis metabòlics de creixement anaeròbic i anàlisi d'acetoïna en presència d'ambdós substrats. Ensem amb hom volia apreciar el possible creixement bifàsic o diàuxia, és a dir, que *Enterobacter* emprés tots dos substrats d'una manera seqüencial, primer la glucosa i després, un cop acabada la glucosa, la glicerina <sup>11, 12</sup>. Per a aquest estudi hom utilitzà el mateix muntatge ja indicat.

#### EXPERIÈNCIES I RESULTATS

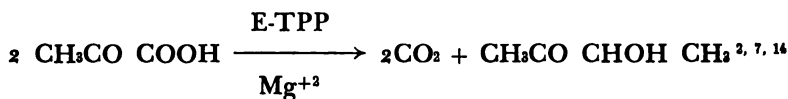
En dur a terme la prova de VOGES PROSKAUER utilitzant la glicerina en lloc de la glucosa, hom trobà que la prova resultava negativa. Aquest resultat fou assajat en 50 soques, i hom comprovà que totes les que eren

VOGES PROSKAUER positives en glucosa esdevien negatives si hom hi posava com a substrat la glicerina en lloc de la glucosa <sup>6</sup>.

Amb les 12 soques més actives hom comprovà que, afegint acetat o piruvat a la glicerina, aquests acceptors d'electrons modificaven el catabolisme d'alguna manera, i el resultat era que la reacció de VOGES PROSKAUER tornava a ésser positiva.

A més hom comprovà que la glicerina no inhibia la reacció de VOGES PROSKAUER perquè, en fermentar juntament amb la glucosa, no en modificava el resultat. El que semblava era només que, en presència de glicerina com a únic substrat, deixava de formar-se el 2,3 butileneglicol i l'acetoïna.

Per comprovar la no producció d'acetoïna en glicerina, hom decidí d'estudiar el quocient CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> de gasos despresos en la fermentació comparativament en glucosa i en glicerina. En efecte, la producció d'acetoïna requereix dues descarboxilacions, com podem veure en la reacció global



que representa el conjunt de reaccions complicades que condueixen a la formació d'acetoïna.

Quan fermenta la glucosa a pH àcid, *Enterobacter*, com a conseqüència d'aquestes descarboxilacions, produeix un quocient de gasos despresos CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> compès entre 2 i 3; per contra, els bacteris del mateix grup que no produeixen acetoïna, com és ara *Escherichia* o *Citrobacter* o també *Enterobacter* a pH 7, com que no produeixen aquelles descarboxilacions, donen aproximadament igual quantitat de CO<sub>2</sub> que d'H<sub>2</sub> <sup>13</sup>.

Els resultats obtinguts ens indiquen que *Enterobacter aerogenes* CCB 4, la soca estudiada, en un medi mineral amb glicerina a pH àcid desprèn CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub> en la proporció 1/1, la qual cosa correspon a una producció d'acetoïna nul·la. Això ens confirma la negativitat de la reacció de VOGES PROSKAUER en glicerina. En glucosa, el quocient CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> és al voltant de 3, com era d'esperar. La quantitat absoluta d'hidrogen correspon a una mitjana de 74,5 microlitres per a la fermentació de la glicerina, i 56,5 microlitres per a la de la glucosa. L'increment de la producció d'hidrogen en la fermentació de la glicerina respecte a la de la glucosa és, doncs, d'un 29 %.

Volguérem estudiar llavors si era possible que aquesta no producció d'acetoïna restés d'alguna manera compensada per la producció d'un altre metabolit reduït, com és ara el trimetileneglicol (1-3 propano-diol). Aquest producte, la formula del qual és CH<sub>2</sub>OH CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OH, és conegut

perquè alguns bacteris el produeixen a partir de la glicerina, reduint-la encara més. Han estat descrites experiències en les quals, en determinades condicions especials, hom ha obtingut fins el 40% de trimetilenglicol de la glicerina fermentada <sup>9, 10</sup>.

Nosaltres no trobàrem trimetilenglicol que fos produït per *Enterobacter aerogenes* en condicions d'esgotament de substrat.

Hom féu llavors un estudi dinàmic de la fermentació comparada de la glucosa i de la glicerina, valorant ensems el creixement bacterià, l'es-

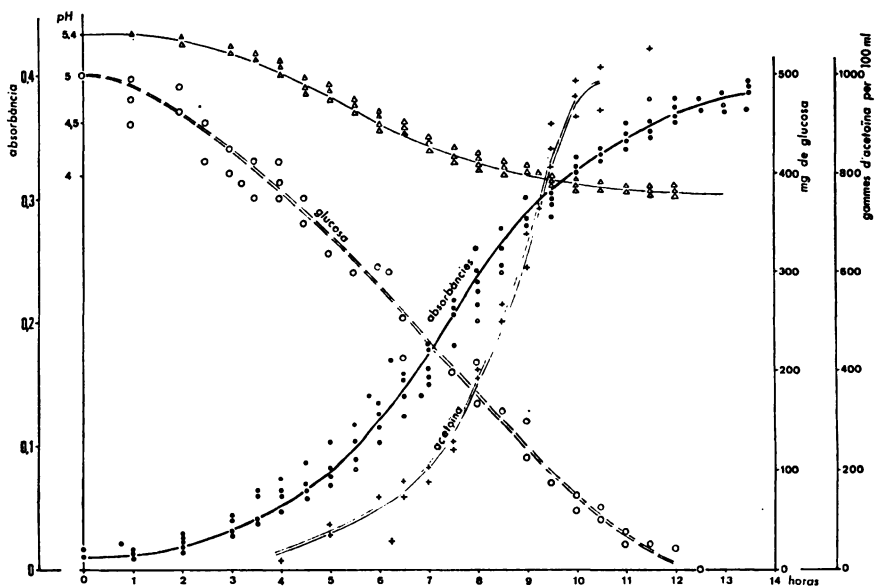


FIG. 2. — Creixement en glucosa

gotament del substrat i el descens del pH, i també els productes finals reduïts en un medi exclusivament mineral.

Cal tenir en compte que el creixement en tub és semiaeròbic; tanmateix, la presència d'oxigen que això representa és suficient per a activar la utilització de la glicerina, que, en tub, és duta a terme completament en 12 o 14 hores. Per contra, en condicions rigorosament anaeròbiques, a les 12 o 14 hores el cultiu és encara en fase de latència, com pot ésser comprovat en les figures 2 a 6. En glucosa hom no observa aquesta diferència que, en glicerina, és important.

Els resultats obtinguts en el creixement en glucosa són expressats en la fig. 2; veiem en aquesta corba que la glucosa s'esgota en 12 o 13

hores. En el mateix gràfic podem veure el creixement de la massa cel·lular en coordenades lineals, la variació del pH del medi i l'acetoïna formada en curs de cultiu.

A la fig. 3 podem veure els resultats obtinguts en el creixement en glicerina. Aquí veiem l'esgotament de la glicerina, molt lent quan l'inòcul utilitzat procedeix d'un creixement en tub i en glicerina (condicions semiaeròbiques). Això és degut, en una part bastant gran, a l'adaptació al creixement anaeròbic. Hom hi veu el creixement de la massa cel·lular

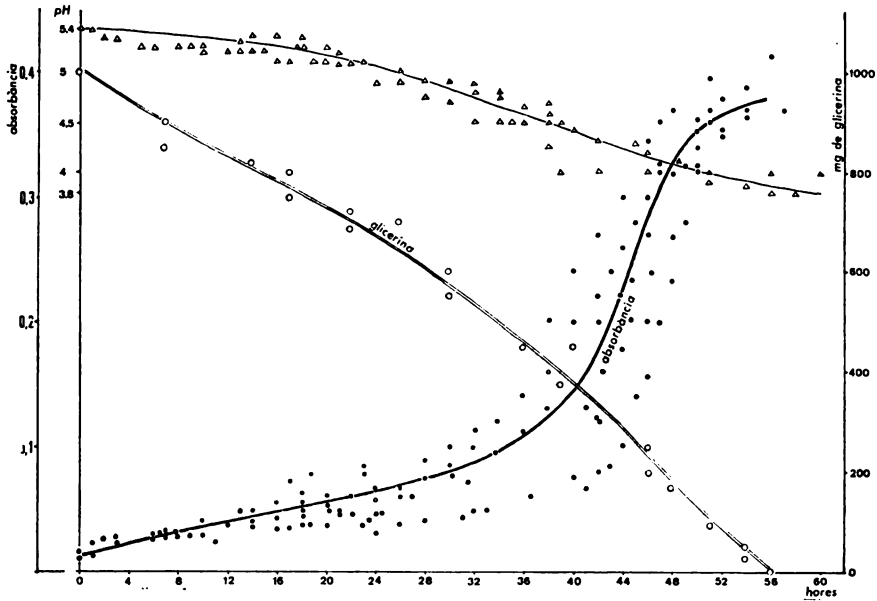


FIG. 3. — Creixement en glicerina. Inòcul en tub

en coordenades lineals i la variació del pH del medi. Els resultats finals obtinguts en ambdues magnituds són sensiblement els mateixos que en glucosa. Aquí no hi ha producció d'acetoïna.

A la fig. 4 podem veure els resultats obtinguts en idèntiques condicions que a la fig. 3, però amb un inòcul de 10 ml de cultiu ja adaptat a creixement en matràs anaeròbic. Com era d'esperar, com que l'inòcul està ja adaptat, el creixement es fa molt més ràpid. Tampoc no es produeix gens d'acetoïna. El creixement final i el pH són iguals que abans.

Ha estat analitzada la producció de 2,3 butilenglicol en les fermentacions corresponents a les corbes de glicerina en les quals hom no havia trobat producció d'acetoïna, i tampoc no hi ha estat trobada producció

de 2,3 butilenglicol, és a dir, aquesta via catabòlica no havia funcionat.

Entre els productes reduïts que havíem anomenat com a resultat del catabolisme d'*Enterobacter*, teníem també l'etanol, que és un dels productes que s'acumulen en quantitat relativament important en la fermentació 2,3 butilenglicòlica de la glucosa<sup>17</sup>.

Ja hem dit que la glicerina és més reduïda que la glucosa; per tant, era previsible que, en substituir la glucosa per la glicerina, augmentés la quantitat de productes finals reduïts. Com que no es produeix ni

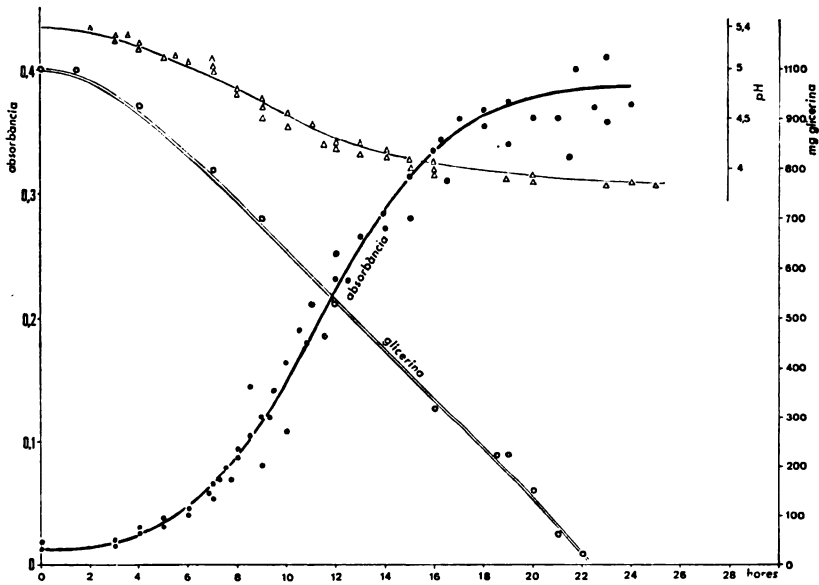


FIG. 4. — Creixement en glicerina. Inòcul de creixement anaeròbic

trimetilenglicol, ni 2,3 butilenglicol ni acetoïna, i, per contra, la producció d'hidrogen augmenta, hom va creure que era possible que augmentés igualment la quantitat d'etanol, tenint en compte que, alhora que es desprèn hidrogen, l'acetil-CoA que prové de la reacció «clàstica» del piruvat actua d'acceptor d'electrons i es forma etanol via acetaldehid<sup>7</sup>.

Els resultats de la producció d'etanol són:

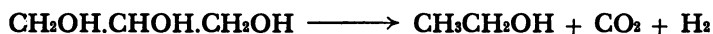
Glucosa: 0,67 mM d'etanol per 1 mM de glucosa fermentada.

Glicerina: 0,86 mM d'etanol per 1 mM de glicerina fermentada.

Increment de la producció d'etanol de la fermentació de la glicerina respecte a la de la glucosa: 28 %.



La quantitat d'etanol trobada, doncs, en la fermentació de la glicerina per *Enterobacter aerogenes* CCB<sub>4</sub> constitueix el 86 % en mols de la glicerina utilitzada, la qual cosa indica que la fermentació glicèrica en aquestes condicions és, pràcticament:



és a dir, una fermentació alcohòlica amb formació equimolecular de CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>. Probablement la quantitat que hom hi troba en forma d'àcids acètic o làctic no arriba ni al 14 %, però ha estat comprovat que és suficient per a produir el descens del pH observat, que és el mateix en glucosa i en glicerina, com ja havíem dit.

L'increment d'etanol obtingut en la fermentació glicèrica respecte a la de la glucosa és de 28 %, semblant a l'increment obtingut en la producció d'hidrogen (29 %). Aquest fet ens indica que es corresponen les dues produccions per a una mateixa quantitat de piruvat que ha estat catabolitzat i que es produeix etanol d'acord amb les reaccions que hem assenyalat abans. Amb glucosa, aquesta diferència es troba en 2,3 butilene-glicol i acetoïna.

Veiem, doncs, que la diferència característica entre les fermentacions de la glucosa i de la glicerina per *Enterobacter aerogenes* CCB 4 és la producció de 2,3 butilene-glicol i acetoïna. En les condicions esmentades, la soca estudiada dona lloc, en fermentar glicerina, a una fermentació alcohòlica particular que ja hem descrit. Amb substrat en excés, es formen uns altres productes finals a través d'un procés molt complex. En la fermentació de la glucosa per *Enterobacter aerogenes* pot acumular-se fins i tot glicerina. En la fermentació de la glicerina es pot acumular trimetilene-glicol, que en condicions d'esgotament de substrat no apareix.

Passarem llavors a fer un estudi metabòlic de creixement en presència dels dos substrats, glucosa i glicerina, en les proporcions següents en mols de triosa: 1/3, 2/2 i 3/1, amb els resultats que es veuen en la figura 5.

Els dos substrats fermenten seqüencialment. En cada una de les corbes corresponent a cada una de les proporcions de substrats indicades, hom pot veure una primera fase de creixement ràpid corresponent a la fermentació de la glucosa, com ha estat demostrat amb diferents valoracions de l'esgotament dels substrats. Després ve una fase de latència deguda a l'adaptació a la fermentació del nou substrat amb els canvis químics que això comporta i la inducció d'enzims necessària. Finalment hom observa una fase de creixement lent corresponent a la fermentació de la glicerina. La longitud de cada una de les dues parts de cada corba i de la fase de repòs depenen de les quantitats relatives de substrat disponibles <sup>11</sup>

Si comparem els temps de fermentació de la glicerina en les corbes de diàuxia amb el de fermentació de la glicerina sola, en soca no adaptada, veurem que la utilització anaeròbica de la glicerina és molt més ràpida quan hi ha en el medi, a més de la glicerina, una certa quantitat de glucosa, i això amb independència de la repressió catabòlica.

A la fig. 6 es veu la producció d'acetoïna durant el creixement diàuxic. La quantitat d'aquest metabolit augmenta ràpidament mentre dura

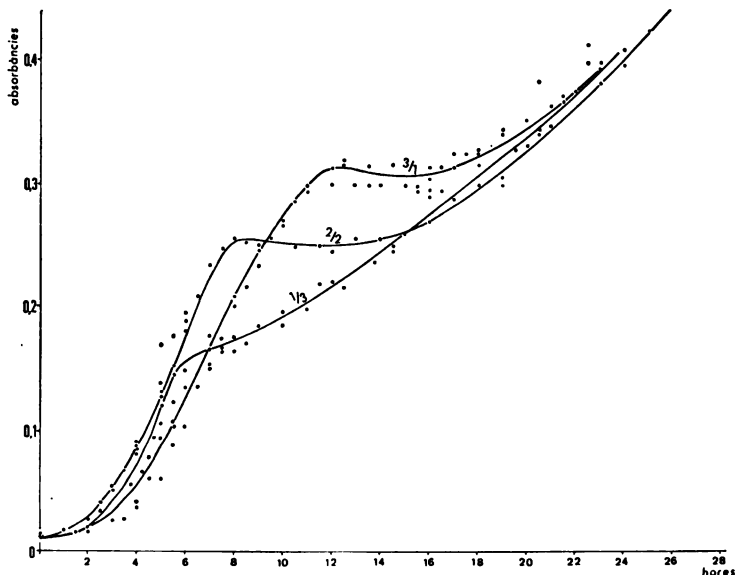


FIG. 5. — Creixement diàuxic en barreges de glucosa i glicerina

la primera fase del creixement. Després, durant la fase de repòs diàuxic, l'acetoïna disminueix. El creixement subsegüent sobre glicerina torna a augmentar el nivell d'acetoïna del medi, el qual arriba fins i tot a passar la quantitat aconseguida en el creixement en glucosa.

Aquest estudi dinàmic de la producció d'acetoïna ens fa veure que hem obtingut unes condicions en les quals podem arribar a produir acetoïna mentre es fermenta glicerina. Creiem que això és degut al fet que l'addició prèvia de glucosa proporciona un flux extra de piruvat o d'algun altre intermediari o acceptor d'electrons que, en fermentar la glicerina a continuació, encara no ha desaparegut del medi i permet la producció d'acetoïna en la fermentació de la glicerina. Aquest intermediari o ha d'ésser el piruvat o algun dels seus derivats altament reactius, com

és ara l'hidroxiètil-TPP o l'acil-TPP o l'acetat. Aquests productes, quan fermenta la glicerina sola, tant si és d'una manera ràpida (soca adaptada) com lenta, van a parar sempre a etanol, probablement perquè la producció d'aquest metabolit és compatible amb la màxima oxidació del  $\text{NAD}_2\text{H}$ . La disminució de la quantitat d'acetoïna que hom observa en les corbes de diàuxia és deguda a la seva reducció a 2,3 butilene-glicol per acció bacteriana.

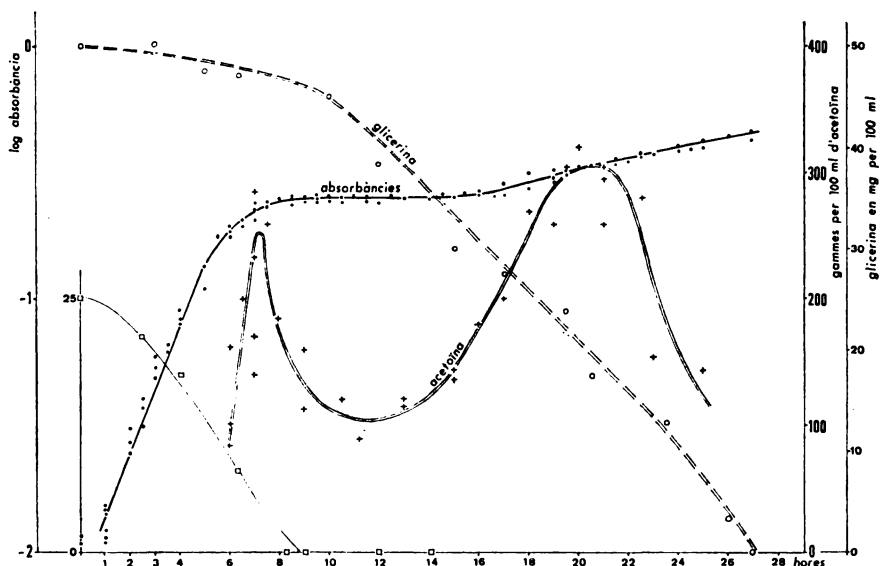


FIG. 6. — Creixement diàuxic en coordenades logarítmiques i corbes d'esgotament del substrat. Corba de producció d'acetoïna. Proporció de substrats 2/2

Fou estudiada en detall, a continuació, la formació d'acetoïna en la fermentació de la glicerina a la qual hom havia afegit piruvat o acetat com a acceptors d'electrons.

El resultat obtingut en la fermentació i en la producció d'acetoïna amb quantitats equimolars de piruvat (producte oxidat) i de glicerina (producte reduït) és sensiblement igual a l'obtingut amb una quantitat equivalent de glucosa. No hi ha diàuxia ni fase de repòs intermèdia, i els dos substrats es consumeixen alhora.

Quant a l'acetat, tot sol, no és metabolitzable per *Enterobacter aerogenes* CCB<sub>4</sub> en medi mineral però, si ensems fermenta glicerina, la presència d'acetat es tradueix en una producció d'acetoïna considerable<sup>5</sup>. L'acetat en quantitat de 250 a 500 mg per litre activa el creixe-

ment sobre glicerina, però no augmenta la quantitat absoluta d'*Enterobacter*. La producció d'acetoïna sí que depèn de la quantitat d'acetat disponible. Això ens fa pensar que l'acetat en les quantitats indicades actua només d'acceptor d'electrons, i en augmentar les disponibilitats del  $\text{NAD}^+$  (oxidat), l'acetyl-Co A formada de la glicerina pot formar acetoïna a través del diacetyl.

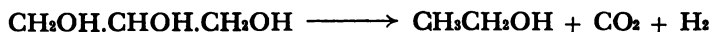
#### DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Veiem, doncs, que a un pH de 5,4 o de 6, *Enterobacter aerogenes* CCB 4, que en fermentar la glucosa produeix abundantment acetoïna, no forma aquest producte quan fermenta glicerina. Hem demostrat que els pH a què hem treballat són favorables a la producció d'acetoïna. No pot ésser, doncs, la no formació d'acetoïna en glicerina una qüestió de pH.

L'estudi de la formació d'acetoïna en barreges de glucosa i glicerina, i també la producció d'acetoïna en barreges de piruvat i glicerina i acetat i glicerina, ens indica que les diferències observades en els productes finals de les fermentacions de la glucosa i la glicerina per *Enterobacter aerogenes* CCB 4 només poden ésser degudes a l'acumulació del  $\text{NAD}_2\text{H}$  que es produeix en la fermentació de la glicerina sola, i això degut al fet que la glicerina és un producte més reduït que la glucosa i que per a entrar en la via de fermentació requereix una oxidació prèvia amb una reducció del  $\text{NAD}^+$ .

La fase de latència tan llarga que es produeix en la fermentació de la glicerina en la soca no adaptada no és deguda exclusivament al temps necessari per a la formació dels nous enzims induïts necessaris per a incorporar la glicerina a la via d'EMBDEN MEYERHOFF, sinó que és també conseqüència del mateix lent metabolisme que determina l'acumulació del  $\text{NAD}_2\text{H}$  i el flux tan lent de reoxidació d'aquest per la via de l'etanol. Tanmateix hi ha d'haver un fenomen d'inducció sense el qual no s'explicarien els fenòmens de diàuxia descrits.

El 86 % de la utilització de la glicerina en condicions anaeròbiques per *E. aerogenes* CCB 4 correspon a una estequiometria



Quan la glucosa fermenta, el nivell menor d'etanol i d'hidrogen que hem trobat correspon a una estequiometria:



Estudiant les reaccions d'oxidació i reducció de NAD que tenen lloc conjuntament amb aquestes transformacions químiques, veiem que aquestes reaccions proporcionen un balanç equilibrat del NAD oxidat i del reduït. Les dades experimentals que hem obtingut quant a gasos i a l'etanol concorden també amb aquestes reaccions. En ambdós casos, a més d'aquests productes, hi ha una producció d'àcids de 0,15 mols per mol de substrat fermentat, igual en glicerina que en glucosa.

Per tant, podem concloure que, per a aconseguir un balanç equilibrat de NAD oxidat i reduït, *Enterobacter aerogenes* CCB 4 no pot produir ni 2,3 butilenglicol ni acetoïna quan fermenta la glicerina. En aquest mateix cas aconsegueix l'equilibri de  $\text{NAD}^+/\text{NAD}_2\text{H}$  amb l'increment de la producció d'hidrogen molecular i d'etanol i amb una producció d'àcids pràcticament igual a la que hom obté en glucosa. El nivell necessari de  $\text{NAD}^+$  (oxidat) per a la reacció de la formació d'acetoïna en *Enterobacter aerogenes* no s'arriba a abastar mitjançant la fermentació de la glicerina. Per contra, sí que s'arriba al nivell adequat si amb la glicerina hi afegim algun acceptor d'electrons, com es ara el piruvat o l'acetat. Per aquest motiu, en la fermentació de la glicerina a la qual ha estat afegit un d'aquests acceptors d'electrons es produeix acetoïna igual que en la fermentació de la glucosa.

L'exemple que hem estudiat posa de manifest que els models fermentatius són un esquema, però no representen unes vies úniques per on poden circular els fluxos de matèria des de substrats fins a productes finals. En totes aquestes vies, hi ha implicats molts mecanismes de regulació. Genèticament, sembla que les possibles alternatives de productes finals estan molt estabilitzades i mantenen, en els bacteris, una capacitat adaptativa molt gran, de la qual hem donat una petita mostra en aquest treball.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BUCHNER, TH. i REDETZKI, H.: *Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege*, «Klin. Wschr.», 29, 615 (1951).
2. CHUANG, L. F. i COLLINS, E. B.: *Biosynthesis of Diacetyl in Bacteria and Yeast*, J. Bacteriol, 95, 6-2083-2089, (1968).
3. COLLINS, C. H.: *Microbiological methods*, segona edició. Butterworths, London (1967).
4. EGGSTEIN, M. V. i KREUTZ, F. H.: *Eine neue Bestimmung der neutralethete in Blutserum und Gewebe*, «Klin. Wschr.», 44, 262 (1966)
5. HIGGINS, T. E. i JOHNSON, M. J.: *Pathways of anaerobic acetate utilization in E. coli and A. cloacae*, «J. Bacteriol.», 101, 885-891 (1970).

6. MAGASANIK, B., BROOKE, M. S. i KARIBIAN, D.: *Metabolic pathways of glycerol dissimilation. A comparative study of two strains of A. aerogenes*, «J. Bacteriol.», 66, 611-619 (1953).
7. MAHLER, H. R. i CORDES, E. H.: *Biological chemistry*, tercera edició. Harper International Edition (1967).
8. MICKELSON, M. N. i WERKMAN, C. H.: *Influence of pH on the dissimilation of glucose by Aerobacter indologenes*. «J. Bacteriol.», 36, 67 (1938).
9. MICKELSON, M. N. i WERKMAN, C. H.: *Formation of trimethylene glycol from glycerol by Aerobacter*. «Enzymologia», 8, 252-256 (1940).
10. MICKELSON, M. N. i WERKMAN, C. H.: *The dissimilation of glycerol by coli-aerogenes intermediates*. «J. Bacteriol.», 39, 709-715 (1940).
11. MONOD, J.: *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, segona edició. Thèse de 1942. Hermann, París (1942).
12. PAIGEN, K. i WILLIAMS, B.: *Catabolite repression and other control mechanisms in carbohydrate utilization. Advances in Microbial Physiology*. Ed. per A. ROSE i J. F. WILKINSON, Vol. 4, 251-324. Academic Press, Londres i Nova York (1970).
13. SILVERMAN, M. i WERKMAN, C. H.: *H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ratios of Escherichia-Aerobacter*. «J. Bacteriol.», 36, 659 (1938).
14. SPECKMAN, R. A. i COLLINS, E. B.: *Diacetyl biosynthesis in Streptococcus diacetylactis and Leuconostoc citrovorus*. «J. Bacteriol.», 95, 174-180 (1968).
15. WERNER, W., REY, H. G. i WIELINGER, H.: «Z. analyt. Chem.», 252, 224-228 (1970).
16. WESTERFELD, W. W.: *A colorimetric determination of blood aceoin*. «J. Biol. Chem.», 161, 495-502 (1945).
17. WOOD, W. A.: *Fermentation of carbohydrates. The Bacteria*. Ed. per I. C. GUNSA-LUS i R. Y. STANIER, Vol. II, 59-149, Academic Press, Nova York i Londres (1961).