

**ESPECIFICIDAD Y AFINIDAD POR LOS SUSTRATOS DE LA
BUTILENGLICOL DESHIDROGENASA DE MUSCULO DE
GALLINA**

*Por J. Burgos,
R. Martín y
A. Bernardo*

INTRODUCCION

La clasificación de los enzimas que intervienen en el metabolismo del diacetilo por reducción a acetona y de ésta a butilénglico es todavía hoy un problema complejo, a pesar de que los primeros estudios al respecto fueron realizados hace ya un cuarto de siglo¹. Se han descrito por lo menos cuatro enzimas capaces de catalizar la reacción diacetilo reductasa: uno específico para el NADH¹, otro para el NADPH², un tercero que acepta NADH y NADPH^{3,4,5,6} y otro más que utiliza sólo NADH pero puede usar como sustrato tanto diacetilo como acetona⁷. De ellos, sólo el primero se encuentra incluido en la Clasificación de Enzimas de la International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry⁸ que lo clasifica como diacetilo reductasa (con el número EC 1.1.1.5), sin demasiada justificación puesto que no se han efectuado estudios de especificidad sobre este enzima; el segundo es en realidad una α -dicarbonilo reductasa y el cuarto una α -(hidroxi)-carbonilo reductasa, mientras que para el tercero no se conoce otro sustrato que el diacetilo.

El problema es aún más complicado en lo que se refiere a las butilénglico deshidrogenasas. La Clasificación Internacional de Enzimas incluye dos, la D(-) butanodiol: NAD óxido reductasa (EC 1.1.1.4) y la L(+) butanodiol: NAD óxido reductasa (EC 1.1.1.76), pero, por los datos disponibles hasta el momento, deberían ser retirados de la lista puesto que ninguno de los enzimas hasta ahora aislados capaces de utilizar la acetona lo hacen específicamente: todos ellos aceptan también el diacetilo, incluso mejor que la acetona misma, por lo que, en rigor, no pueden ser clasificados como butilénglico deshidroge-

nasas. Por otra parte, intentar clasificar estos enzimas resulta prematuro puesto que no se dispone de estudios de especificidad completos sobre los mismos. En el laboratorio de los autores se ha purificado recientemente, a partir del músculo de muslo de gallina, un enzima que cataliza la reacción butilénglicol deshidrogenasa⁹, del que se han aislado tres formas distinguibles por su pI, 7,2 el de la más abundante y 6,2 y 4,8 el de las restantes¹⁰. Como los demás enzimas de este tipo, acepta también el diacetilo, pero se diferencia de ellos en que utiliza como coenzima el NADPH además del NADH¹⁰; se trata pues, de acuerdo con la norma 17 de la Nomenclatura de Enzimas de la I.U.P.A.C.-I.U.B.⁸, de un enzima distinto de las butilénglicol deshidrogenasas hasta ahora descritas.

El presente artículo da cuenta de las experiencias realizadas para aclarar su especificidad, al objeto de poder clasificarlo. Incluye también un estudio previo de la afinidad por los sustratos, que se llevó a cabo para completar los estudios de especificidad con datos que proporcionen información acerca del nivel de eficacia con que el enzima utiliza «in vivo» los sustratos que acepta «in vitro».

MATERIAL Y METODOS

El diacetilo (BDH) fue purificado por destilación fraccionada a presión ambiente, recogiendo la fracción que destila a 88-89°C, y la acetoína (BDH) por lavado con éter etílico deshidratado y libre de peróxidos. El hidroxibutirato y el 2,3-pantanodiol, fueron cedidos por el doctor Störmer (Universidad de Oslo, Blindern, Noruega) y el diacetil-metil-carbinol por el doctor López (Universidad de Bochum, Alemania). El acetil-etil-carbinol fue sintetizado a partir de hidroxibutirato por el procedimiento recomendado por LARSEN y col.¹¹. El NAD, el NADP, el NADPH y el β-NADH fueron suministrados por Boehringer y el α-NADH por Sigma.

El NADH y el NADPH se determinaron por su extinción a 340 mμ, y el diacetilo, la acetoína y el butilénglicol por el procedimiento descrito por FUERTES y col.¹². La rotación óptica específica de las muestras se midió en un electropolarímetro Perkin Elmer 241 utilizando la banda del sodio y cubetas de 1 dm de paso de luz y 5 ml de capacidad.

La obtención y purificación de las distintas especies enzimáticas utilizadas se llevó a cabo según se describe en¹⁰. Las actividades enzimáticas se midieron siguiendo los cambios de la absorbancia a 340 mμ correspondientes a la oxidación (o reducción, en su caso) del coenzima en la siguiente mezcla de reacción, salvo indicación en contrario: tampón fosfato bisódico monopotásico 0,3 M de pH 7, 1 ml; sustrato, 11,35 μmoles; coenzima, 0,6 μmoles; preparación enzimática y agua, hasta 3 ml. Las medidas se efectuaron en un Hitachi Perkin Elmer 200 o en un Beckman DBGT, con las cubetas termostatadas a

25°C. Como unidad se considera la cantidad de enzima que reduce 1 nmol de acetoína/min en las citadas condiciones de análisis.

RESULTADOS

Especificidad de sustrato y coenzima

En la Tabla I, se resumen los resultados de los ensayos de reducción por

TABLA I
Especificidad de sustrato y coenzima de las formas enzimáticas que catalizan la reacción butilénglicol deshidrogenasa en el músculo de gallina

SUSTRATO	Especie de pI 7,2			Especie de pI 6,2			Especie de pI 4,8		
	ACTIVIDAD*			ACTIVIDAD*			ACTIVIDAD*		
	NADPH	β-NADH	α-NADH	NADPH	β-NADH	α-NADH	NADPH	β-NADH	α-NADH
<i>Aldehídos:</i>									
acetaldehido	tr.	tr.	0	tr.	0	0	tr.	0	0
glioal	27,4	4,4	0	45,83	tr.	0	38,9	13,1	0
metilglioal	89,5	15,7	0	56	tr.	0	10,3	tr.	0
<i>Monocetonas:</i>									
acetona	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-butanona	0	0	0	0	0	0	tr.	tr.	0
pentano-3-ona	0	0	0	0	0	0	tr.	tr.	0
<i>Cetoácidos:</i>									
piruvato sódico	0	tr.	0	0	0	0	0	0	0
oxalacetato	7,6	tr.	0	0	0	0	0	0	0
α-cetoglutarato	0	0	0	0	0	0	tr.	0	0
<i>Dicetonas no vecinales</i>									
pentano-2,4-diona	0	0	0	0	0	0	tr.	tr.	0
hexano-2,5-diona	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Esteres de cetoácidos</i>									
piruvato de etilo	83,7	53,1	8,05	56,2	4,4	0	62,8	16,8	0
piruvato de metilo	66,9	30,3	0	23,6	0	0	41,7	11,9	0
acetoacetato de etilo	59,6	16,8	0	24,6	0	0	23,1	6,5	0
<i>Dicetonas vecinales</i>									
diacetilo	93,5	46,7	0	80,7	5	0	73,1	20,1	0
pentano-2,3-diona	100	52,2	0	100	5,4	0	85	23	0
<i>Carbinoles</i>									
acetoína	46	34,2	tr.	15	1,8	0	16,1	4,7	0
acetil-etil-carbinol	47,5	36,7	tr.	29,8	2	0	36,3	10,62	0
diacetil-metil-carbinol	46,6	29,2	0	30,1	2	0	38,9	9,06	0
glicolaldehido	16,2	3,3	0	7,6	tr.	0	15,9	7,4	0
glicerolaldehido	88,1	50,6	5,4	82,4	6	tr.	100	30,2	0

* Los resultados se expresan en términos de % de la actividad obtenida con el sustrato y coenzima mejor utilizado por cada forma enzimática en nuestras condiciones experimentales.

las tres formas del enzima de diversos sustratos potenciales con β -NADPH, β -NADH y α -NADH como donadores de hidrógeno. Puede observarse que la especificidad de las tres especies enzimáticas estudiadas es cualitativamente idéntica: todas ellas utilizan los dos β -piridín-nucleóticos y no el α -NADH, aunque el isoenzima de pl 7,2 muestra en presencia del piruvato de etilo y gliceraldehido una pequeña actividad, probablemente debida a la presencia de impurezas de β -NADH en la preparación del coenzima que, a pesar de ser de la mejor calidad existente en el mercado, representan hacia un 3 % según el catálogo del fabricante. Asimismo, las tres especies enzimáticas resultaron ser claramente más activas en presencia de β -NADPH que de β -NADH, especialmente en el caso de la de pl 6,2 que, en nuestras condiciones experimentales, utilizó el primero hacia diez veces más rápidamente que el segundo.

Los tres isoenzimas se comportan también del mismo modo frente a los distintos compuestos ensayados como sustrato acceptor de hidrógeno, reduciendo los compuestos de cadena lineal o ramificada que cumplen las condiciones de: a) poseer dos grupos carbonilo no cargados o un carbonilo no cargado y un hidroxi-carbonilo y b) hallarse estos en posiciones vecinas. A estas reglas sólo hace excepción, entre los sustratos probados, el acetoacetato de etilo, con el que las tres formas enzimáticas muestran cierta actividad a pesar de encontrarse sus dos grupos carbonilos separados por un CH_2 . Este hecho podría ser debido a que la configuración molecular del acetoacetato de etilo dejase a los citados grupos carbonilo a una distancia similar a la que tienen en los dicarbonilos vecinales, ya que parece ser éste un requisito indispensable en vista de que la introducción de un CH_2 entre los dos grupos cetónicos de la 2,3-pantanodiona, el mejor de los sustratos probados, la convierte en inaceptable por el enzima. La forma de pl 7,2 presenta también cierta actividad, aunque escasa, frente al oxalacetato con NADPH como coenzima, que se considera debida a una pequeña contaminación de las preparaciones enzimáticas con alguna de las numerosas y abundantes malato deshidrogenasas de las que disponen los tejidos animales.

En la Tabla II se recogen los resultados obtenidos en experiencias similares, en las que se determinó la actividad del enzima en la oxidación de diversos sustratos utilizando NADP como acceptor de hidrógeno. Con todos los compuestos empleados la actividad fue muy inferior a la medida en el sentido reductasa, a pesar de que se usaron concentraciones de sustrato 16 veces mayores y de coenzima cinco veces superiores. Los resultados son nuevamente semejantes para los tres isoenzimas, con escasas diferencias cualitativas que probablemente son debidas sobre todo a las dificultades de cuantificar actividades enzimáticas tan pobres como las que se obtuvieron en estos ensayos. A pesar de ello, se ha detectado una clara actividad deshidrogenasa por lo menos con pentano-2,3-diol, butilénglico y glicolaldehido y, con las preparaciones de las especies de pl 6,2 y 7,2, más activas, con lactato de etilo y

TABLA II
Reversibilidad de la reacción catalizadora por las distintas formas enzimáticas*

SUSTRATO REDUCTOR	F. de pl 7,2	Actividad relativa** F. de pl 6,2	F. de pl 4,8
Glicerol	NC (40)	—	NC (20)
Glicerol	3,25 (116)	NC (200)	NC (140)
Butilénglico	11 (23)	31 (6)	38 (6)
Pentano-2,3-diol	100 (3)	100 (4)	100 (5)
Acetoína	NC (230)	25 (40)	NC (100)
Acetil-etil-carbinol	NC (247)	6 (200)	NC (120)
Glicolaldehido	2,75 (55)	7,5 (75)	27 (20)
Lactato de etilo	2,80 (167)	9 (75)	NC (90)

* Se utilizaron los sustratos reductores indicados a la concentración de 0,18 mM y como coenzima NADP 0,003 mM.

** Expresada como porcentaje de la obtenida con el sustrato mejor utilizado por cada forma enzimática. Las cifras entre paréntesis indican la relación aproximada entre la actividad en sentido directo (reductasa) e inverso (deshidrogenasa). NC= actividad no cuantificable en las condiciones experimentales usadas.

glicerol. A destacar que con la especie enzimática de pl 6,2 se obtuvo una fuerte actividad con acetil-etil-carbinol y, sobre todo, con acetoína, que no son usados por las otras dos ni, aparentemente, por ninguna de las preparaciones enzimáticas de cualquier origen hasta ahora obtenidas.

Estereoespecificidad

Dado que alguno de los productos y sustratos de estas reacciones presentan estereoisómeros, se estudió la estereoespecificidad del enzima midiendo la rotación óptica de la acetoína producida a través de la reducción del diacetilo. A tal fin se utilizó una mezcla de reacción con un amplio exceso de diacetilo con respecto al NADPH, tratando de evitar en lo posible la reducción de la acetoína formada a butilénglico con el NADPH no consumido. Los resultados obtenidos (Fig. 1) ponen claramente de manifiesto que en todos los casos se produce L(+)-acetoína, con una rotación óptica específica de +226,4° (s.d. \pm 20,5).

Afinidad por el coenzima

La afinidad hacia el coenzima se midió calculando, a pH 7 y 25°C, la K_m aparente para el NADPH y el NADH a una concentración fija de acetoína próxima a la saturación (hacia 5 veces la constante de Michaelis para este sustrato). Las representaciones de la actividad inicial (v) en función del cociente entre la citada actividad y la concentración de sustrato a que fue obtenida (v/s), dieron los siguientes valores (Fig. 2): Especie enzimática de pl 7,2, $K_m^{\text{NADPH}} = 3,5$ (s.d. $\pm 0,12$) μM ; $K_m^{\text{NADH}} = 167$ (s.d. ± 17) μM . Especie de pl 6,2, $K_m^{\text{NADPH}} = 5,4$ (s.d. $\pm 0,16$) μM ; $K_m^{\text{NADH}} = 168$ (s.d. $\pm 5,1$) μM . Especie de pl 4,8, $K_m^{\text{NADPH}} = 3,8$ (s.d. $\pm 0,13$) μM .

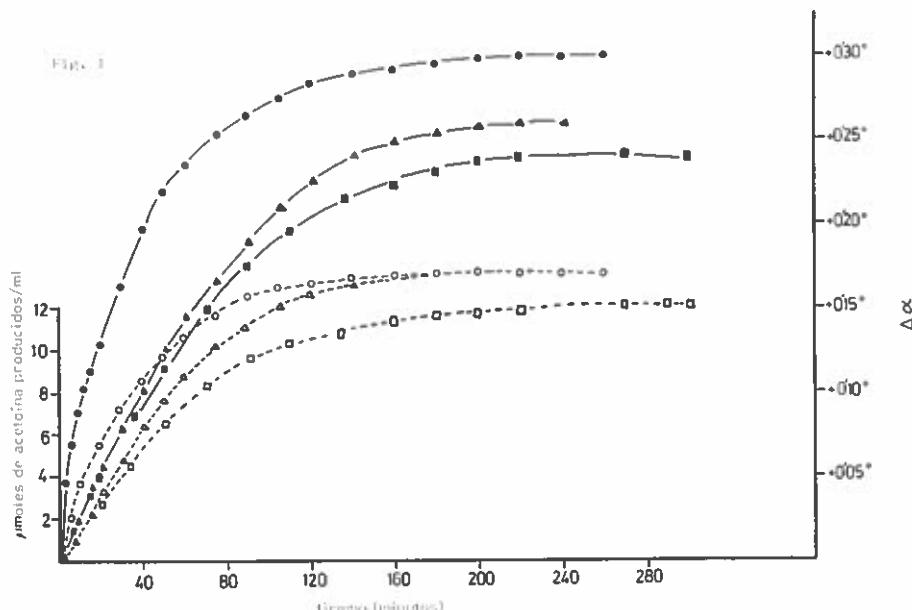


Fig. 1.—Evolución de la rotación óptica ($\Delta\alpha$) y del contenido en acetoina formada por reducción del diacetilo. Condiciones iniciales de incubación: Expto. A: NADPH, 103,5 μ moles; diacetilo: 550 μ moles, preparación enzimática de pl 7,2, aproximadamente 350 unidades; tampón fosfato bísódico monopotásico, 0,2 M de pH 7, hasta 8 ml. Expto. B: como el anterior excepto en que se utilizaron 120 μ moles de NADPH y la preparación enzimática fue de la forma de pl 6,2. Expto. C: Id, excepto NADPH, 115 μ moles y preparación enzimática de la forma de pl 4,8.

Los símbolos negros representan los cambios en rotación óptica y los blancos las variaciones del contenido en acetoina. (—○—), Expto. A; (—□—), Expto. B; (—△—), Expto. C;

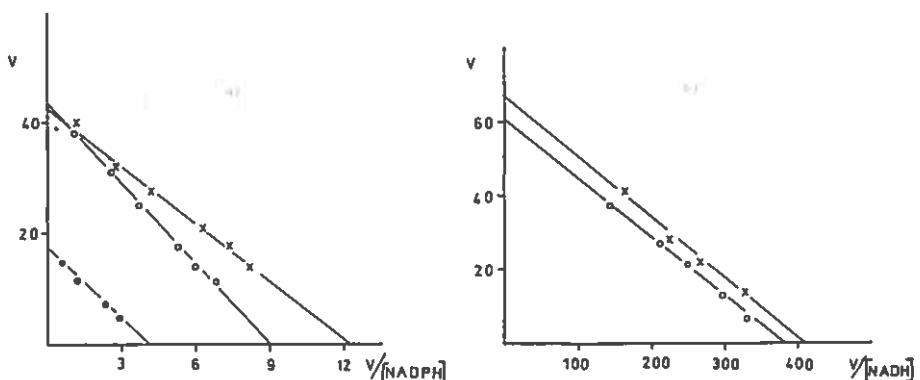


Fig. 2.—Representación de Woolf para el cálculo de la K_m _{NADPH}(a) y k_m _{NADH}(b) a pH 7 y 25°C; (x-x), forma enzimática de pl 7,2; (o-o), forma enzimática de pl 6,2; (●-●), forma enzimática de pl 4,8.

Afinidad por los sustratos

La Tabla III resume los estudios de afinidad a pH 7 y 25°C de temperatura efectuados con sustratos que pudieran ser utilizados por el enzima en los sistemas biológicos. Como coenzima se utilizó el NADPH a concentración saturante (0,2 mM). Puede observarse que existen diferencias de afinidad muy acusadas entre los distintos sustratos probados y bastante notables también entre las tres formas enzimáticas. Por ejemplo, la de pl 6,2 muestra mayor afinidad por el glioal y el diacetilo que las otras dos y la de pl 4,8 da valores de K_m para la pentano-2,3-diona y el gliceraldehído comparativamente muy altos. Esta es una situación frecuente entre las distintas formas de un mismo enzima y generalmente obedece a razones funcionales.

TABLA III
Afinidad por los sustratos. K_m ^{aparente} obtenidas a pH 7 y 25°C y concentración saturante de NADPH*

Sustrato variable	Forma de pl 7,2 K_m (μM)	Forma de pl 6,2 K_m (μM)	Forma de pl 4,8 K_m (μM)
Pentano-2,3 diona	60 (\pm 1,2)	97 (\pm 2,9)	675 (\pm 53)
Gliceraldehido	26 (\pm 1,6)	29 (\pm 4,3)	566 (\pm 39)
Metilglioal	102 (\pm 5,4)	98 (\pm 3,4)	—
Glioal	522 (\pm 49)	53 (\pm 3,8)	411 (\pm 19)
Acetoina	2.590 (\pm 186)	2.013 (\pm 77)	164 (\pm 167)
Diacetilo	109 (\pm 2,5)	38 (\pm 2,6)	—

* Se utilizó una concentración de NADPH 0,2 mM.

DISCUSION

Los resultados obtenidos dejan pocas dudas acerca de la especificidad del enzima estudiado. Las tres formas aisladas catalizan la reducción reversible de grupos carbonilos a L(+)-hidroxi-carbonilos, aceptando como sustratos a reducir α -dicarbonilos, a los que transforman en α -hidroxi-carbonilos, o los propios α -hidroxi-carbonilos, que convierten en L(+) glicoles, y como coenzima NADPH o NADH. En las experiencias efectuadas el NADPH se mostró más eficaz que el NADH; sin embargo, los estudios de afinidad pusieron de manifiesto que las concentraciones de coenzima usadas fueron saturantes para el NADPH y sólo semisaturantes para el NADH, por lo que la actividad con éste en condiciones de saturación debe ser muy poco inferior a la observada con aquél.

De acuerdo con las normas 16 y 17 para la Clasificación y Nomenclatura de Enzimas de la International Union of Pure and Applied Chemistry y la International Union of Biochemistry⁸, las tres formas estudiadas han de ser clasificadas como un mismo enzima. No existe en la Clasificación de Enzimas de la I.U.P.A.C.-I.U.B.⁸, ni (en lo que alcanza el conocimiento de los autores)

se ha descrito, ninguno de las características del aquí estudiado. Se trata pues de uno nuevo al que, según las citadas normas, corresponde el nombre sistemático de L(+)-glicol: NAD(P) óxido-reductasa y la inclusión en la clase 1, subclase 1, sub-subclase 1; como nombre recomendado, dado que ha podido ser demostrado el funcionamiento de la reacción en el sentido recogido en el nombre sistemático, se propone el de L-glicol deshidrogenasa.

Los estudios de afinidad hacia el coenzima ponen de manifiesto que, en el músculo de gallina, este enzima opera casi exclusivamente con NADPH. En efecto, considerando que las concentraciones de uno y otro piridín-nucleótico en el músculo deben ser del orden de 0,05-0,1 mM¹³, se deduce que se encuentra prácticamente saturado de NADPH, cuya molaridad vendrá a situarse hacia 10-30 veces su K_m^{aparente} , y escasamente a un 30 % de saturación con NADH. Esta situación determina una gran desproporción entre el número de moléculas de enzima que operan con uno u otro coenzima; de la ecuación IV.70¹⁴, aplicable cuando los dos sustratos que un enzima utiliza se encuentran en el medio a la misma concentración, como sucede aproximadamente en este caso, se deduce que

$$\frac{(E - \text{NADPH})}{(E - \text{NADH})} = \frac{K_m^{\text{NADH}}}{K_m^{\text{NADPH}}}$$

donde $(E - \text{NADPH})/(E - \text{NADH})$ representa la proporción entre las moléculas de enzima ligadas al NADPH y al NADH. Sustituyendo en esta ecuación los valores calculados para las constantes de Michaelis con NADH y NADPH, se obtiene que de cada 100 moléculas de enzima hacia 97 operan ligadas al segundo y sólo 3 al primero. Estas cifras son sólo indicativas, puesto que la ecuación en que se basan corresponde a reacciones monosustrato y no puede aplicarse directamente a una bisustrato como ésta, pero suministran una información en líneas generales válida.

Las K_m^{aparente} calculadas para los sustratos se han obtenido en condiciones de saturación con el coenzima y deben corresponder, por tanto, a las constantes de Michaelis reales. En general, cabe decir que los sustratos que presentan mayor afinidad por el enzima son el gliceraldehído, la pentano-2,3-diona y el diacetilo, los mismos que fueron utilizados con mayor actividad en los ensayos a concentración fija de sustratos. Para el gliceraldehído, las formas de pI 7,2 y 6,2 dan valores de K_m en torno a 0,03 mM y para la 2,3-pantanodiona de 0,06 - 0,09 mM, que ponen de manifiesto que la afinidad del enzima por estos sustratos es muy alta. Para el diacetilo, la especie de pI 6,2 da una K_m de 0,038 mM aproximadamente igual a la calculada por MARTÍN y BURGOS¹⁵ para la diacetilo reductasa de hígado de ternera, que era el enzima de mayor afinidad por este sustrato descrito hasta el momento; la de pI 7,2 presenta una $K_m^{\text{diacetilo}}$ = 0,1 mM, todavía notablemente inferior al valor, superior a 1 mM,

que se obtiene normalmente con las diacetilo reductasas de otros orígenes (3,16-18). Aunque los autores no disponen de datos ciertos sobre concentraciones de diacetilo, gliceraldehído y 2,3-pantanodiona en el tejido muscular de las aves, parece muy probable que no sea inferior a 5 μM (véase 3,15 y 19) lo que daría una relación concentración fisiológica/ K_m muy razonable, indicativa de que estos enzimas reducen eficazmente los citados sustratos «in vivo».

El glicoxal y el metilglicoxal muestran también una alta afinidad por el enzima, con valores de K_m por lo general entre 0,1 y 0,5 mM. La acetoína, en cambio, resulta un mal sustrato, situándose su K_m en torno a 2-2,5 mM, cifras que, si bien son semejantes²⁰ y aún inferiores³ a las obtenidas por otros autores para esta reacción, quedan más de 200 veces por encima de las concentraciones de acetoína esperables en tejidos animales^{21,22}; es evidente que una diferencia tan considerable entre K_m y concentración fisiológica del sustrato en enzimas como éstos, por los que compiten gran número de compuestos, debe llevar a que su eficacia en el músculo como acetoína reductasa sea despreciable.

RESUMEN

El enzima responsable de la actividad butiléneglicol deshidrogenasa en el músculo de gallina cataliza la reducción reversible de los α-carbonilos a α-hidroxycarbonilos y de éstos a los correspondientes L(+)-glicoles, aceptando como coenzima NADH ó NADPH. Se trata de un nuevo enzima al que, de acuerdo con las normas de la I.U.P.A.C.-I.U.B., corresponde el nombre sistemático de L(+)-glicol: NAD(P) óxido-reductasa y para el que se propone el nombre recomendado de L-glicol deshidrogenasa. Este enzima muestra una gran afinidad por el NADPH, el diacetilo, la 2,3-pantanodiona y el gliceraldehído, sustratos éstos con los que parece operar «in vivo».

SPECIFICITY AND AFFINITY FOR SUBSTRATES OF HEN MUSCLE BUTYLENEGLYCOL DEHYDROGENASE

SUMMARY

A NAD(P)H-dependent enzyme which catalyzes the butyleneglycol dehydrogenase reaction in hen's muscle reversibly reduces α-dicarboniles to α-hidroxycarboniles and these to L(+)-glycols. Therefore, it is a new enzyme for which the systematic name of L(+)-glicol: NAD(P) oxidoreductase and the recommended name of L-glycol dehydrogenase are proposed. The enzyme shows a large affinity for NADPH, diacetyl, 2,3-pantanedione and glyceraldehyde.

BIBLIOGRAFIA

- 1) STRECKER, H. J. y HARARY, I. (1954).-Bacterial butylene glycol dehydrogenase and diacetyl reductase. *J. Biol. Chem.*, **211**: 263-270.
- 2) SILBER, P., CHUNG, H., GARGIULO, P. y SCHULZ, H. (1974).-Purification and properties of diacetyl reductase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **118**: 919-927.
- 3) GABRIEL, M. A., JABARA, H. y AL-KHALIDI, U.A.S. (1971).-Metabolism of acetooin in mammalian liver slices and extracts, interconversion with butane-2,3-diol and diacetyl. *Biochem. J.*, **124**: 793-800.
- 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) 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.
- 7) BRYN, K., HETLAND, O. y STORMER, F. C. (1971).-The reduction of diacetyl and acetooin in *Aerobacter aerogenes*. *Eur. J. Biochem.*, **18**: 116-119.
- 8) Commission of Biochemical Nomenclature de la I.U.P.A.C./I.U.B. (1973).-*Enzyme Nomenclature*. Elsevier, Amsterdam.
- 9) ROBLA, F., BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1972).-Purificación de una actividad butilénglico deshidrogenasa NADP-dependiente, a partir de tejido muscular de gallina. *Anal. Fac. Vet. León*, **18**: 743-750.
- 10) BERNARDO, A., ROBLA, F., BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1979).-«Purification and some properties of hen's muscle butyleneglycol dehydrogenase» *An. Fac. Vet. León*. En este volumen.
- 11) LARSEN, H., JOHANSEN, L., STØMER, F. y STORESUND, J. (1973).-Formation of 2,3-pentanodiol from 2,3 pentanodiome and acetylethylcarbinol by diacetyl (acetooin) reductase from *Aerobacter Aerogenes*: a possible new pathway. *Fefs Letters*, **31**: 39-41.
- 12) FUERTES, J., BERNARDO, A., BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1977).-Determinación colorimétrica de acetoina y 2,3-butilénglico en muestras biológicas. *An. Fac. Vet. León*, **23**: 127-134.
- 13) GLOCK y Mc LEAN (1955).-En DIXON, M. y WEBB, M. A. *Enzymes*, Longmans, Green y Co LTD, London, 368-369.
- 14) DIXON, M. y WEBB, M. A. *Enzymes*, Longmans, Green y Co LTD, London, 85.
- 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) BRANEN, A. L. y KEFAN, T. W. (1970).-Diacetyl reductase of *Lactobacillus casei*. *Can. J. Microbiol.*, **16**: 947-951.
- 17) JOHANSEN, L., LARSEN, S. H. y STØRMER, F. C. (1973).-Diacetyl (acetooin) reductase from *Aerobacter aerogenes*: kinetic studies of the reduction of diacetyl to acetooin. *Eur. J. Biochem.*, **34**: 97-99.
- 18) BURGOS, J., MARTÍN, R. y DÍEZ, V. (1974).-Pigeon liver diacetyl reductase: kinetic and thermodynamic studies with NADH as coenzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **364**: 9-16.
- 20) LARSEN, H. y STØRMER, F. C. (1973).-Kinetic mechanism and regulation by acetate of the reversible reduction of acetooin to 2,3-butanodiol. *Eur. J. Biochem.*, **34**: 100-106.
- 21) WESTERFIELD, W. (1945).-Citado por Martín, R. Tesis doctoral. (1971). *Fact. Vet. León*.
- 22) LEDINGHAM, G. A., NEISH, A. C., en UNDERKOFLER, L. A. y HICKEY, R. J. (1954).-*Industrial Fermentations*, Vol. II, Chemical Publishing Co., New York, 27.