

- 9) MOSSEL, D.A.A.; MENGERINK, W.H.I. y SCHOLTS, H.H. (1962). Use of a modified McConkey agar medium for the selective growth and enumeration of *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.*, 84, 381.
- 10) NUÑEZ, M. (1976). Flora microbiana de quesos manchegos elaborados a partir de leche pasteurizada. Composición de un starter para queso Manchego. *Anales del I.N.I.A.*, 4, 113-121.
- 11) NUÑEZ, M. y MARTINEZ-MORENO, J.L. (1976). Flora microbiana del queso Manchego. I. Evolución de la flora microbiana de quesos manchegos artesanales. *Anales del I.N.I.A.*, 4, 15-31.
- 12) NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J.A.; MEDINA, A.L.; GARCIA ASER, G. y RODRIGUEZ-MARIN, M.A. (1981). Contribución al estudio de la flora psicrotrofa del queso Manchego. *Anales del I.N.I.A.*, 12, 53-64.
- 13) ORDOÑEZ, J.A.; BARNETO, R. y RAMOS, M. (1978). Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft*, 33, 609-613.
- 14) ORDOÑEZ, J.A.; MASSO, J.A.; MARMOL, M.P. y RAMOS, M. (1980). Contribution a l'étude du fromage "Roncal". *Le lait*, LX, 283-294.
- 15) ROGOSA, M. y SHARPE, M.E. (1959). An approach of the classification of the lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 22, 329-340.
- 16) TERZAGHI, B.E. y SANDINE, W.E. (1978). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29, 807-813.
- 17) SCOTT, R. (1981). *Cheesemaking practice*, pgs. 335-461. Applied Sciences Publishers. England.

CINETICA DE LA REDUCCION DE LOS PIRUVATOS DE ETILO Y DE METILO POR LA L-GLICOL DESHIDROGENADA (NAD⁺) DE *Enterobacter aerogenes***

(KINETIC STUDIES OF ETHYL AND METHYL PYRUVATE REDUCTION BY L-GLYCOL DEHYDROGENASE (NAD⁺) FROM *Enterobacter aerogenes*)

Por J. Carballo *
J. González Prieto *
A. Bernardo *
y R. Martín Sarmiento *

Key words: Enzyme kinetics, L-glycol dehydrogenase (NAD⁺).
Palabras clave: Cinética enzimática, L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺).

SUMMARY

The shape of the primary Hanes' plots and the inhibition pattern by products and by a substrate analogue prove that ethyl pyruvate reduction by L-glycol dehydrogenase from *Enterobacter aerogenes* proceeds through an Ordered Bi-Bi mechanism with the coenzyme as the "leading" substrate and that of methyl pyruvate by this same mechanism or by the Theorell-Chance's one.

RESUMEN

La forma de las gráficas obtenidas al representar por el método de Hanes los resultados de los análisis de actividad en ausencia de inhibidores y los patrones de

* Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.

** Este trabajo fué financiado con una ayuda de la Excm. Diputación Provincial de León.

An. Fac. Vet. León. 1988, 34, 127-140

inhibición por los productos y por un análogo estructural del sustrato carbonilo (la acetona) permiten concluir que la reducción del piruvato de etilo por la L-glicol deshidrogenasa de *Enterobacter aerogenes* tiene lugar por un mecanismo Ordenado Bi-Bi en el que el NADH es el primer compuesto en fijarse a la enzima, y la del piruvato de metilo por este mismo mecanismo o por el Theorell-Chance.

INTRODUCCION

La existencia de una enzima capaz de reducir la acetoina y el diacetilo fue comprobada ya en 1971, a partir de extractos de *Enterobacter aerogenes*⁴. Desde entonces han aparecido en la bibliografía diversos artículos sobre esta oxido-reductasa^{8, 11, 12, 13, 14, 15, 16}, pero sólo recientemente se han llevado a cabo los estudios necesarios para proceder a su clasificación². Tales estudios han permitido descubrir nuevos sustratos de la enzima y demostrar que se trata de una deshidrogenasa no incluida aún en la lista de la I.U.B., para la que se ha propuesto el nombre de L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺)².

El presente trabajo trata de la cinética de la reducción de los piruvatos de etilo y metilo, dos de los nuevos sustratos descubiertos. Ambas reacciones son, a efectos prácticos, irreversibles, por lo que no han podido ser estudiadas en el sentido inverso.

MATERIAL Y METODOS

El NADH, el NAD y los piruvatos de etilo y de metilo fueron suministrados por Sigma. La acetona (Merck) fue purificada siguiendo el método de Vogel¹⁹.

Las preparaciones enzimáticas fueron obtenidas del siguiente modo: se obtuvieron 12 gr. de células de *Enterobacter aerogenes*, cepa ATCC 15038, por el procedimiento descrito en la referencia 1 y se suspendieron en 60 ml. de tampón fosfato bisódico-monopotásico 10 mM de pH 7. La suspensión se sonicó en un aparato BRAUN modelo Labsonic 1510 a 200 watos durante dos minutos y quince segundos (en períodos de quince segundos) y se centrifugó a 40.000 x g. durante treinta minutos, recogiendo el sobrenadante y cromatografiándolo en una columna de DEAE-52 (Whatman) de 2,5 x 42 cm., equilibrada y eluida con tampón fosfato bisódico-monopotásico 10 mM y de pH 7 (la L-glicol deshidrogenasa no queda retenida y aparece en las primeras fracciones). Las muestras así obtenidas tienen una actividad específica en torno a 25 U.I./mg, con una pureza de aproximadamente un 50%, y carecen de actividades enzimáticas que pudieran interferir en los ensayos.

La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente siguiendo el cambio de la absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH, a la temperatura de 25 °C y pH 7 en tampón fosfato bisódico-monopotásico 50 mM.

Los resultados se representaron gráficamente por el método de Hanes que se prefirió al de Lineweaver-Burk por ser más exacto¹. Las Ks fueron calculadas como la proyección en el eje de las abscisas del punto de confluencia de las rectas generadas cuando se representa [sustrato] / v frente a [sustrato]. Las Km se obtuvieron determinando el punto de intersección con el eje de abscisas de la recta generada al representar frente a 1/ [sustrato] las pendientes de las rectas obtenidas para cada concentración de sustrato en la representación primaria.

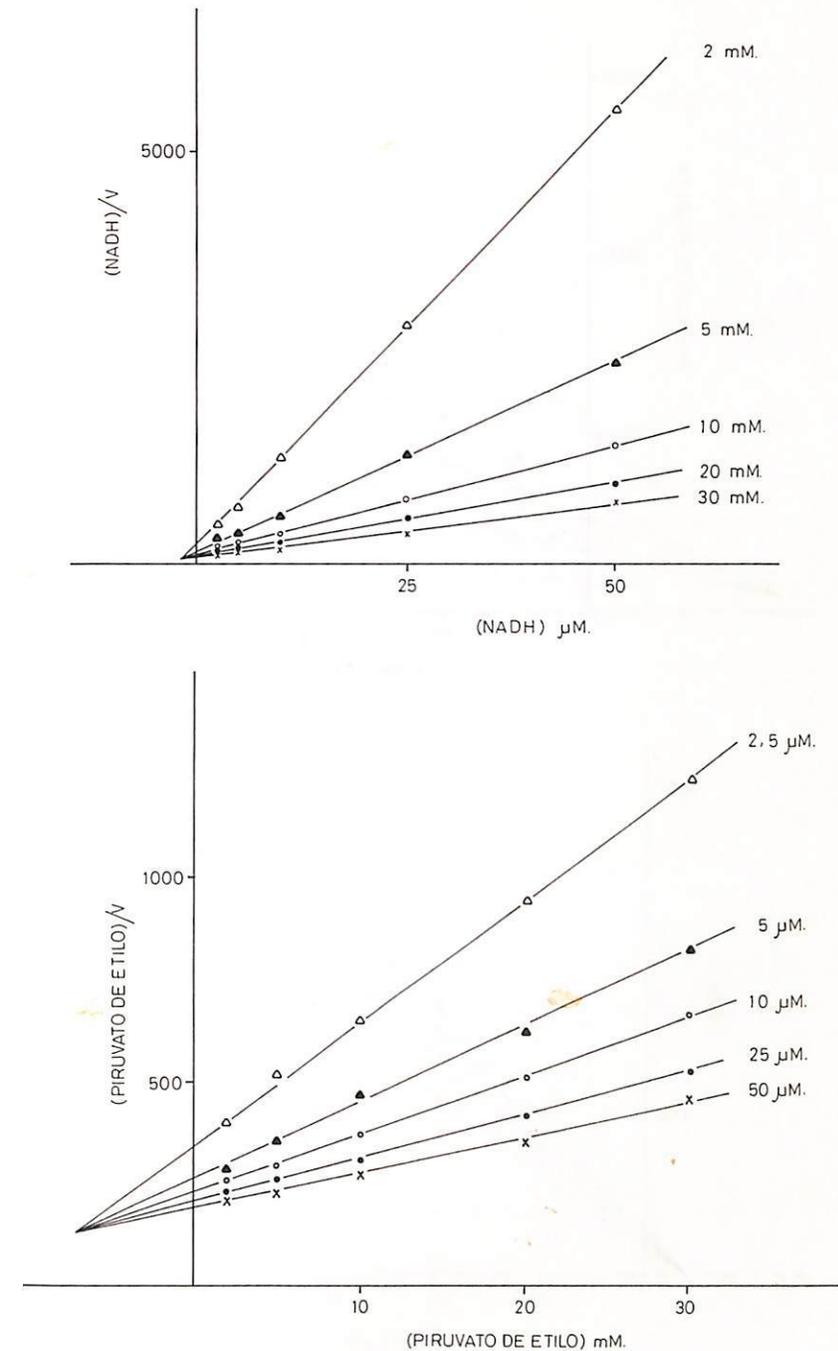


Fig. 1.- Reacción piruvato de etilo reductasa: Gráficas primarias para el cálculo de Ks por el método de Hanes. a) Representación de [NADH] / v en función de [NADH]. b) Representación de [piruvato de etilo] / v en función de [piruvato de etilo]. Las cifras en el interior de las gráficas se refieren a concentraciones de sustrato fijo-variable.

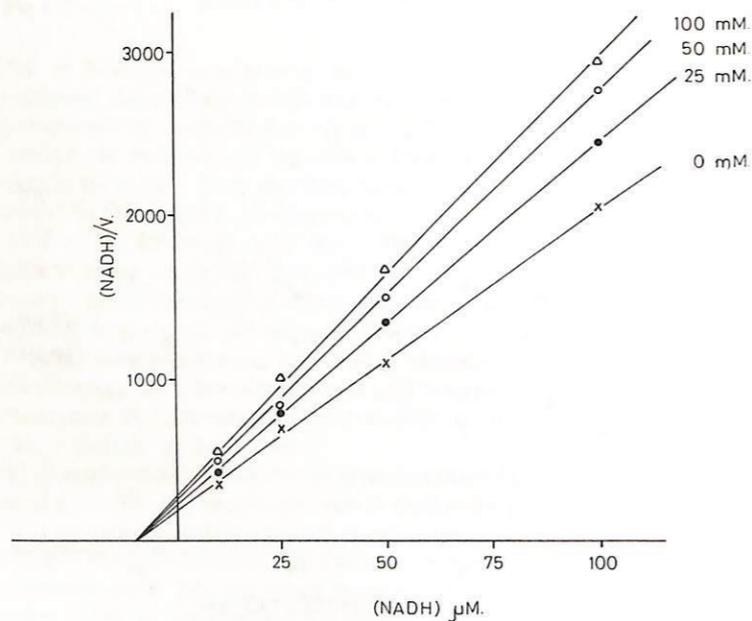
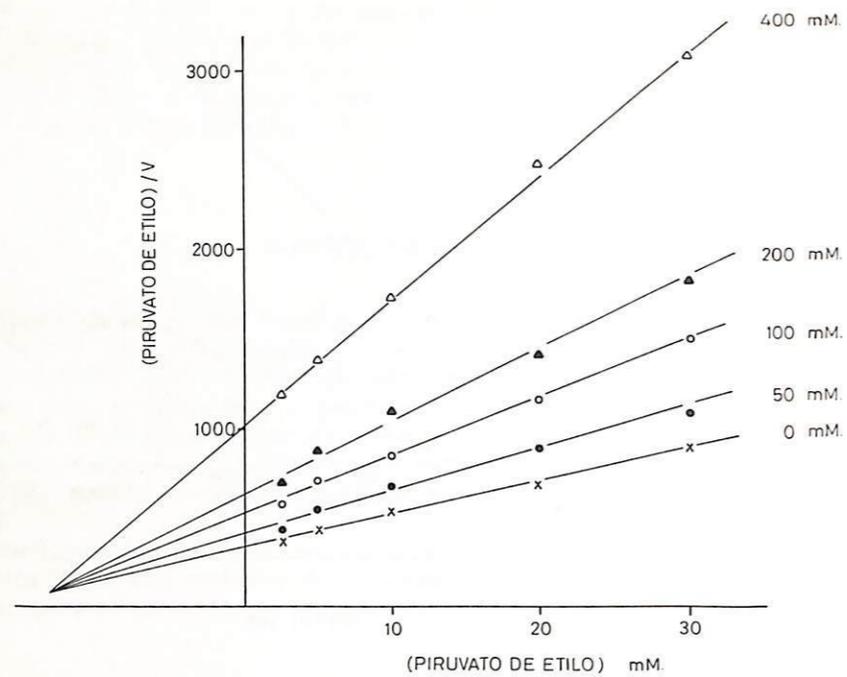


Fig. 2.- *Reacción piruvato de etilo reductasa: Inhibición por el lactato de etilo.* a) frente al piruvato de etilo; concentración de NADH, $10 \mu\text{M}$. b) frente al NADH; concentración de piruvato de etilo, 20mM . Las cifras en el interior de las gráficas representan concentraciones de inhibidor.

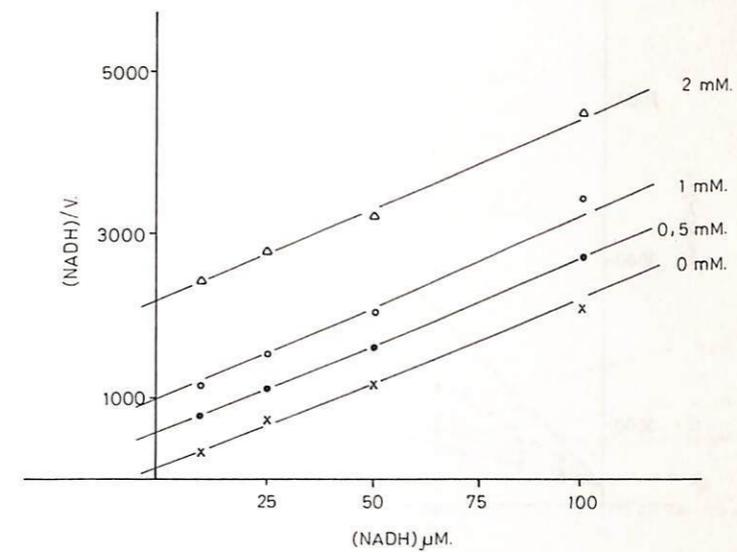
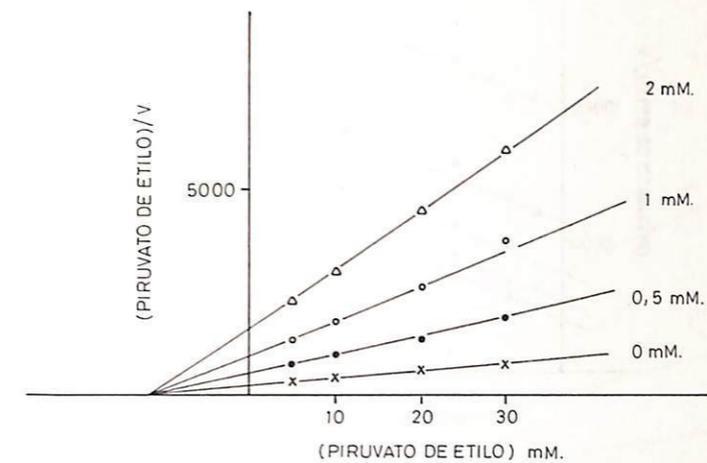


Fig. 3.- *Reacción piruvato de etilo reductasa: Inhibición por el NAD.* a) frente al piruvato de etilo, concentración de NADH, $10 \mu\text{M}$. b) frente al NADH; concentración de piruvato de etilo, 20mM . Las cifras en el interior de las gráficas representan concentraciones de inhibidor.

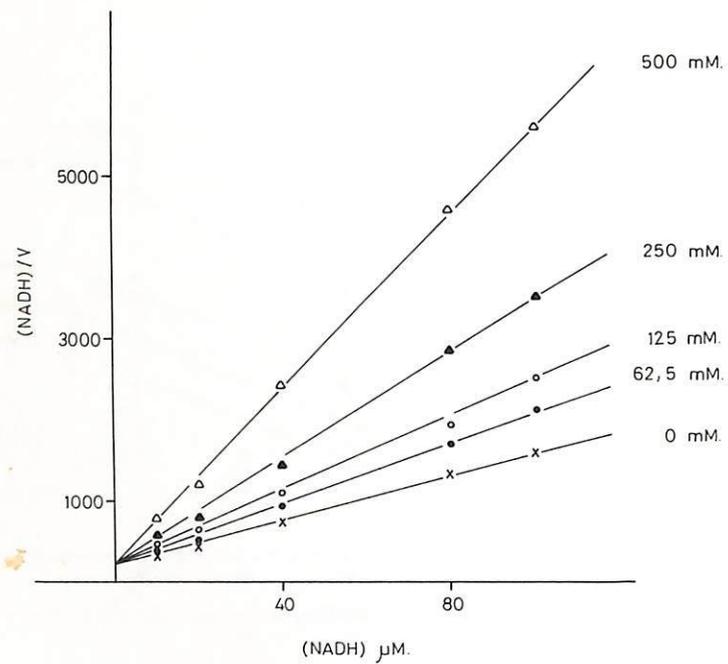
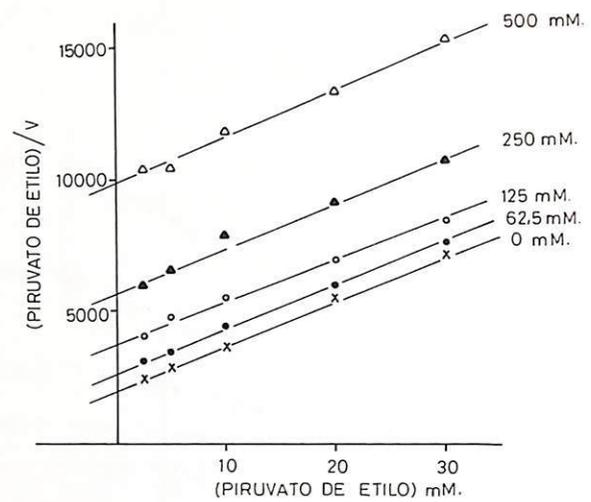


Fig. 4.- *Reacción piruvato de etilo reductasa: Inhibición por la acetona.* a) frente al piruvato de etilo, concentración de NADH, $10 \mu\text{M}$. b) frente al NADH, concentración de piruvato de etilo, 20mM . Las cifras en el interior de las gráficas representan concentraciones de inhibidor.

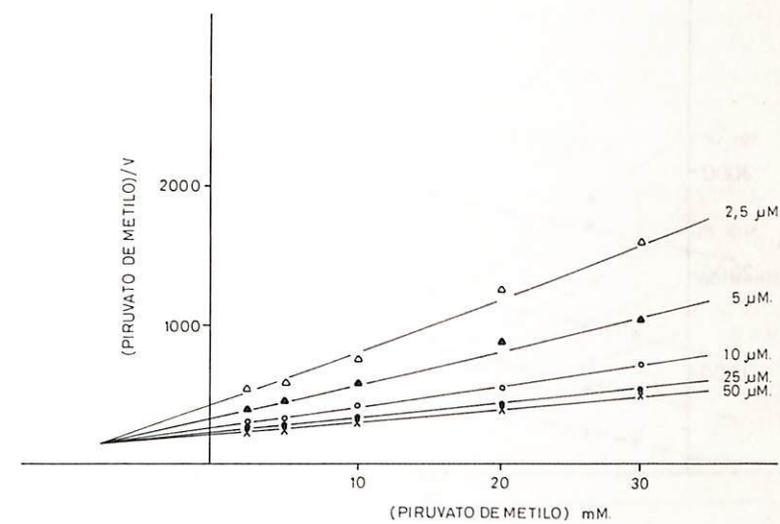
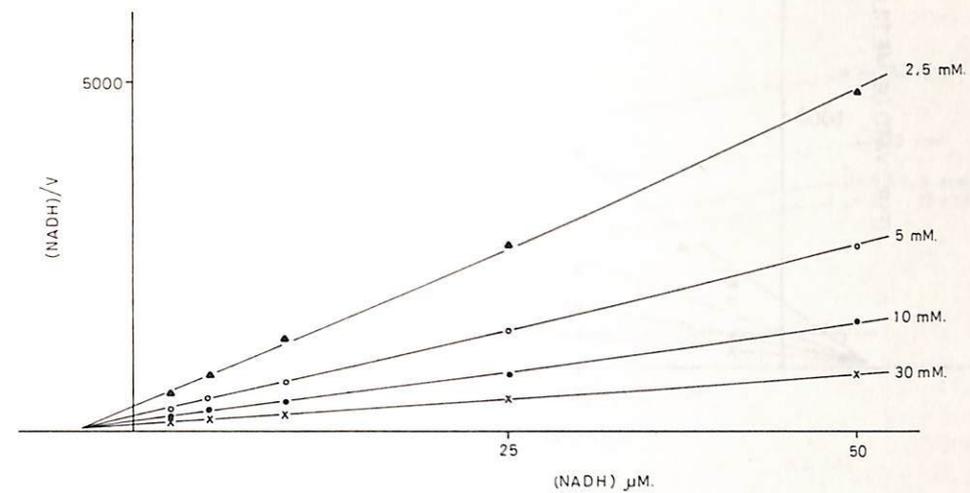


Fig. 5.- *Reacción piruvato de metilo reductasa: Gráficas primarias para el cálculo de K_s por el método de Hanes.* a) Representación de $[\text{NADH}]/v$ en función de $[\text{NADH}]$. b) Representación de $[\text{piruvato de metilo}]/v$ en función de $[\text{piruvato de metilo}]$. Las cifras en el interior de las gráficas representan concentraciones de sustrato fijo-variable.

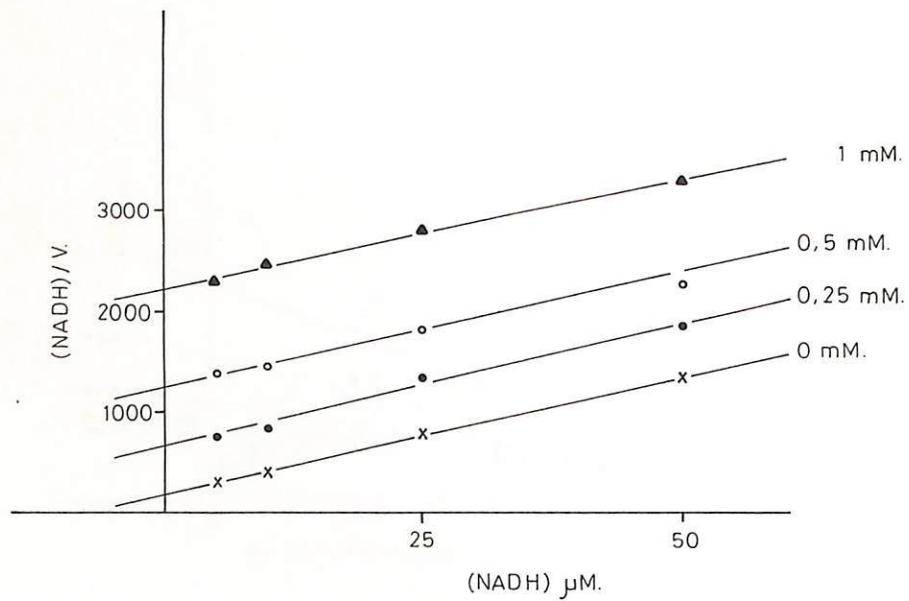
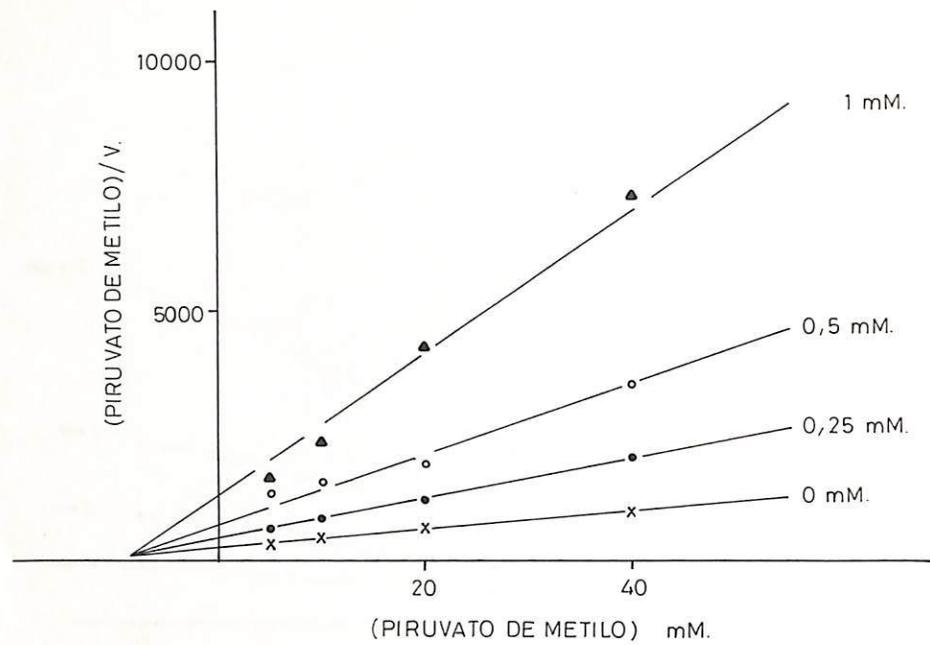


Fig. 6.- *Reacción piruvato de metilo reductasa: Inhibición por el NAD.* a) frente al piruvato de metilo; concentración de NADH, $10 \mu\text{M}$. b) frente al NADH; concentración de piruvato de metilo, 20 mM. Las cifras en el interior de las gráficas representan concentraciones de inhibidor.

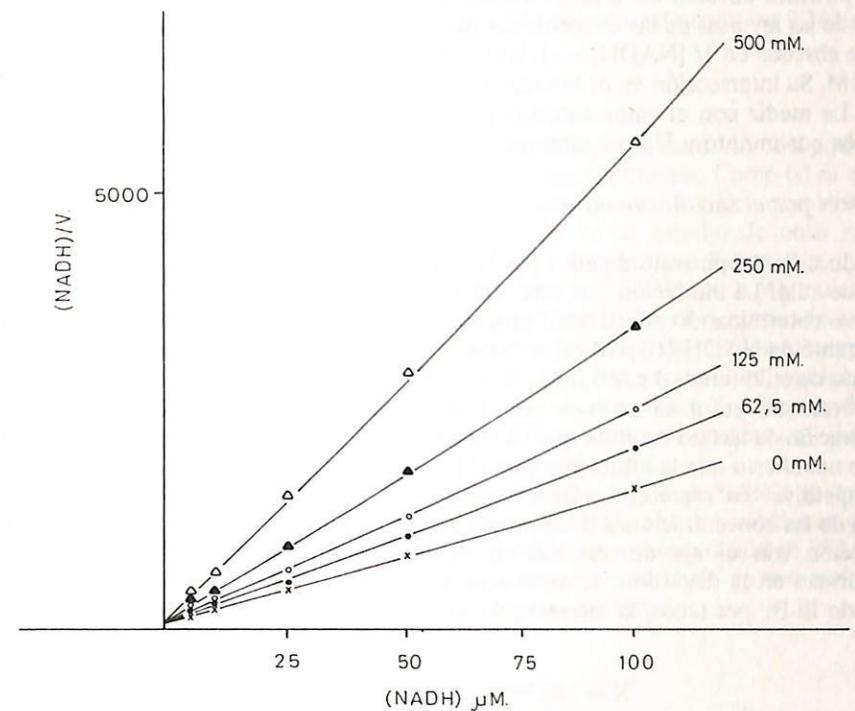
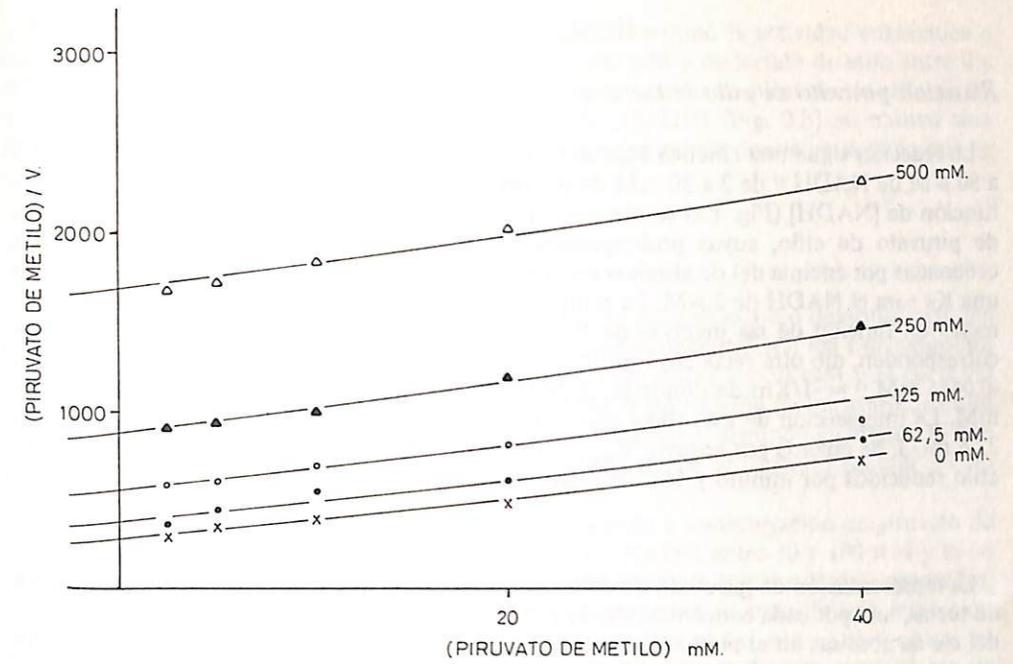


Fig. 7.- *Reacción piruvato de metilo reductasa: Inhibición por la acetona.* a) frente al piruvato de metilo; concentración de NADH, $10 \mu\text{M}$. b) frente al NADH; concentración de piruvato de metilo, 20 mM. Las cifras en el interior de las gráficas representan concentraciones de inhibidor.

RESULTADOS

Reaccion piruvato de etilo reductasa

La reacción sigue una cinética Michaeliana en los márgenes de concentración de 2,5 a 50 μM de NADH y de 2 a 30 mM de piruvato de etilo. Al representar $[\text{NADH}]/v$ en función de $[\text{NADH}]$ (Fig. 1.a) se obtuvieron varias rectas, una por cada concentración de piruvato de etilo, cuyas prolongaciones coincidieron a la izquierda del eje de ordenadas por encima del de abscisas en el punto $[\text{NADH}] \mu\text{M} = -2$, que corresponde a una K_s para el NADH de 2 μM . La representación secundaria de las pendientes de las rectas en función de las inversas de las concentraciones de piruvato de etilo a que corresponden, dio otra recta cuya prolongación cortó el eje horizontal en el punto $x = -0,0455 \text{ mM}^{-1} = -1/\text{Km}$ de donde se deduce que K_m para el piruvato de etilo vale 22 mM. La intersección de esta recta cortó al eje vertical en 8,4; dado que se utilizaron 22,6 mU.I. de enzima por ensayo, $V_{\text{max}} = (1/8,4)/0,0226 = 5,27 \mu\text{ moles de piruvato de etilo reducidos por minuto y U.I. de enzima.}$

La representación de $[\text{piruvato de etilo}]/V$ frente a $[\text{piruvato de etilo}]$ dio una familia de rectas, una por cada concentración de NADH (Fig. 1.b), que se cortaron por encima del eje de abscisas en el punto (piruvato de etilo) = -7 mM, correspondiendo a una K_s para el piruvato de etilo de 7 mM. Representando las pendientes de estas rectas en función de las inversas de las concentraciones de NADH se obtuvo una recta que cortó al eje de abscisas en $1/[\text{NADH}] = -1/\text{Km} = -0,16 \mu\text{M}^{-1}$, de donde K_m para el NADH vale 6 μM . Su intersección en ordenadas fue de 8,5 y, por tanto, $V_{\text{máx}} = (1/8,5)/0,0226 = 5,21$. La media con el valor anterior resultó ser 5,24 $\mu\text{ moles de piruvato de etilo reducidos por minuto y U.I. de enzima.}$

Inhibición por el lactato de etilo

La reducción del piruvato de etilo por la L-glicol deshidrogenasa (NAD^+) da lugar a lactato de etilo. La inhibición por este compuesto frente al carbonilo del que procede se obtuvo determinando la actividad piruvato de etilo reductasa a concentración fija y no saturante de NADH (10 μM) y variable de piruvato de etilo (entre 2,5 y 30 mM) y de lactato de etilo (entre 0 y 400 mM). Representando $[\text{piruvato de etilo}]/v$ en función de $[\text{piruvato de etilo}]$ se obtuvo una familia de rectas (Fig. 2.a), una por cada concentración de lactato de etilo, que se cortan a la izquierda del eje de abscisas, lo que pone de manifiesto que la inhibición por el lactato de etilo frente al piruvato de etilo es no competitiva. La representación secundaria de las pendientes de estas rectas en función de las concentraciones de lactato de etilo dio lugar a una recta cuyo punto de intersección con el eje de abscisas se estimó en 200 mM. Como se verá con posterioridad en la discusión, el mecanismo por el que transcurre la reacción es un Ordenado Bi-Bi; por tanto, la intersección en abscisas de la recta vale:

$$X = -K_i \text{ lactato de etilo } \left(1 + \frac{K_m^{\text{NADH}}}{[\text{NADH}]} \right)$$

Puesto que la concentración utilizada de NADH fue no saturante, el valor obtenido ha de ser corregido según esta ecuación. Se obtuvo así un valor para K_i de 125 mM.

Para estudiar la inhibición frente al NADH se determinó la actividad enzimática a concentraciones variables de NADH entre 10 y 100 μM y de lactato de etilo entre 0 y 400 mM, manteniendo fija y no saturante la concentración de piruvato de etilo en 20 mM. Representando $[\text{NADH}]/v$ en función de $[\text{NADH}]$ (Fig. 2.b) se obtuvo una familia de rectas que se cortan en el segundo cuadrante, de donde se deduce que la inhibición frente al NADH es no competitiva.

Inhibición por el NAD

La inhibición por el NAD respecto al piruvato de etilo se estudió determinando los efectos del NAD sobre la velocidad de reacción a una concentración fija y no saturante de NADH (10 μM), variando la de piruvato de etilo entre 5 y 30 mM y la de NAD entre 0 y 2 mM. Representando $[\text{piruvato de etilo}]/v$ en función de $[\text{piruvato de etilo}]$ se obtiene una serie de rectas (Fig. 3.a) que se cortan en el segundo cuadrante lo que pone de manifiesto que la inhibición por el NAD frente al piruvato de etilo es no competitiva.

La inhibición frente al NADH se estudió trabajando a concentración de piruvato de etilo fija y no saturante de 20 mM, variando la de NADH entre 10 y 100 μM y la de NAD entre 0 y 2 mM. En la Fig. 3.b se representan los resultados obtenidos, apareciendo una serie de líneas paralelas que demuestran se trata de una inhibición competitiva. Al representar las intersecciones de dichas rectas con el eje vertical en función de las concentraciones de NAD, se obtuvo otra recta que cortó al eje de abscisas en -0,187 mM, de donde K_i para el NAD vale en esta reacción 0,187 mM.

Inhibición por la acetona

Para completar el diagnóstico del mecanismo cinético de la reducción del piruvato de etilo, se decidió recurrir al empleo de un inhibidor de vía muerta. Como tal se eligió la acetona, un carbonilo no aceptado como sustrato por la L-glicol deshidrogenasa (NAD^+) que ya había sido utilizado con este fin en el estudio de otras enzimas similares^{3, 10, 17}. El tipo de inhibición producido por la acetona frente al piruvato de etilo se estudió a concentración fija y no saturante de NADH (10 μM), variando las concentraciones de piruvato de etilo entre 2,5 y 30 mM y las de acetona entre 0 y 500 mM. Representando $[\text{piruvato de etilo}]/v$ frente a $[\text{piruvato de etilo}]$ se obtienen una serie de rectas paralelas (Fig. 4.a) que ponen de manifiesto se trata de una inhibición competitiva. La representación secundaria de las intersecciones en abscisas de estas rectas en función de la concentración de inhibidor cortó el eje horizontal en -125 mM, de donde K_i para la acetona vale en esta reacción 125 mM.

Del mismo modo, para estudiar el efecto inhibidor frente al NADH se trabajó a concentración fija y no saturante de piruvato de etilo (20 mM) y variables de NADH (entre 10 y 100 μM) y de acetona (entre 0 y 500 mM). La representación de $[\text{NADH}]/v$ frente a $[\text{NADH}]$ dio una familia de rectas que se cortan en el eje de ordenadas (Fig. 4.b) como corresponde a una inhibición de tipo acompetitivo.

Reaccion piruvato de metilo reductasa

La reacción sigue la cinética habitual en el rango de 10 a 100 μM de NADH y entre 0,625 y 40 mM de piruvato de metilo. A concentraciones superiores a 50 mM se observó inhibición por exceso de sustrato. La K_i correspondiente se estimó, por el método gráfico de Dixon, en 60 mM.

En el intervalo en que la reacción no está sometida a inhibición por exceso de sustrato, las representaciones primarias de [sustrato] /v frente a [sustrato] generan una familia de rectas que se cortan a la izquierda del eje de ordenadas (Fig. 5.a y b). De estas gráficas y de la representación de las pendientes de las rectas en función de 1/[sustrato fijo-variable], se obtuvieron las siguientes constantes cinéticas: $K_m^{NADH} = 8 \mu M$; $K_s^{NADH} = 3,2 \mu M$; $K_m^{\text{metilpiruvato}} = 20 \text{ mM}$; $K_s^{\text{metilpiruvato}} = 7,25 \text{ mM}$; $V_{\max} = 3,92 \mu \text{ moles de piruvato de metilo reducidos por minuto y U.I. de enzima.}$

Inhibición por el NAD

Con NADH fijo y no saturante ($10 \mu M$) y concentraciones de piruvato de metilo entre 5 y 40 mM y de NAD entre 0 y 1 mM, las rectas obtenidas en la representación de Hanes se cortaron en el segundo cuadrante (Fig. 6.a), mostrando que la inhibición por el NAD frente al piruvato de metilo es no competitiva. Cuando el sustrato variable fue el NADH (entre 5 y 50 μM), siendo fija y no saturante la concentración de piruvato de metilo (20 mM), la representación primaria habitual de [NADH] /v frente a [NADH] dio una serie de rectas, una por cada concentración de NAD, paralelas (Fig. 6.b), que ponen de manifiesto que la inhibición por el NAD frente al NADH es competitiva. La K_i para el NAD se obtuvo representando los puntos de corte con el eje de ordenadas de estas rectas frente a las concentraciones de inhibidor. Su valor resultó ser de 0,125 mM.

El estudio de la inhibición por el producto de reducción del piruvato de metilo, el lactato del metilo, no pudo efectuarse por no existir en el mercado preparaciones de buena calidad de este compuesto.

Inhibición por acetona

El estudio de la inhibición frente al piruvato de metilo se realizó utilizando concentraciones de inhibidor entre 0 y 500 mM, utilizando NADH como sustrato fijo a concentración no saturante ($10 \mu M$) y piruvato de metilo variable entre 2,5 y 40 mM. Representando los resultados obtenidos como [piruvato de metilo] /v en función de [piruvato de metilo] se obtuvo una serie de rectas paralelas (Fig. 7.a) que determinan una inhibición de tipo competitivo. De la representación de las intersecciones en ordenadas de estas rectas en función de las concentraciones de inhibidor se obtuvo un valor de K_i para la acetona de 62,5 mM.

La inhibición frente al NADH se determinó utilizando el sustrato carbonilo a concentración fija y no saturante (20 mM) y el NADH variable entre 5 y 100 μM , variando la concentración de acetona entre 0 y 500 mM. La representación de los resultados por el mismo sistema generó una familia de rectas que se cortan en el eje de ordenadas (Fig. 7.b), lo que pone de manifiesto que se trata de una inhibición acompetitiva.

DISCUSION

Mecanismo de las reacciones

La reducción de los piruvatos de etilo y de metilo por la L-glicol deshidrogenasa (NAD^+) de *Enterobacter aerogenes* sigue un mecanismo cinético secuencial, como

demuestra la convergencia de las rectas de las figuras 1 y 5. La aplicación de las normas de Cleland para inhibidores de vía muerta⁷ pone de manifiesto que el patrón de inhibición producido por la acetona, que actúa en estas reacciones como análogo estructural del sustrato carbonilo^{10, 18}, no es compatible con los mecanismos secuenciados al azar y sí lo es con cualquier tipo de sistema secuencial ordenado siempre que se cumpla la condición de que el NADH se fije al enzima antes de que lo haga el piruvato de etilo o de metilo. La discusión queda, pues, limitada al mecanismo Ordenado Bi-Bi, al de Theorell-Chance y a sus variantes "Iso", siendo en todos los casos el NADH el sustrato "conductor". Además la inhibición por el NAD (competitiva frente al NADH y no competitiva frente al sustrato carbonilo), obliga a descartar los dos esquemas "Iso" y deja como únicos posibles los dos primeros (véase la referencia 6).

El lactato de etilo inhibe la reacción piruvato de etilo reductasa no competitivamente para los dos sustratos, un patrón incompatible con el sistema de Theorell-Chance. Se concluye por tanto que la reducción del piruvato de etilo tiene lugar por un mecanismo Ordenado Bi-Bi en que el NADH es el primer sustrato en fijarse a la enzima. Este mismo mecanismo sigue la reacción piruvato de etilo reductasa bajo la catálisis de otras enzimas similares^{9, 18} y la reducción del diacetilo y la acetoina por la estudiada aquí^{13, 15}.

La inhibición de la reducción del piruvato de metilo por el lactato de metilo no pudo ser estudiada, por lo que en este caso no es posible decidir si sigue el mismo esquema o el de Theorell-Chance. Dado que se trata de dos mecanismos de características muy similares, no es imposible que una misma enzima pueda seguir uno u otro según el sustrato sobre el que esté operando (véase, p.e., las referencias 3 y 5).

Afinidad por los sustratos

Las constantes de afinidad obtenidas para el NADH y el NAD son del mismo orden que las descritas en la bibliografía^{13, 14, 15} respecto a otras reacciones de reducción en las que interviene la L-glicol deshidrogenasa (NAD^+). La afinidad por los compuestos carbonilo estudiados es, en cambio, sensiblemente más baja que la que presenta la enzima hacia otros sustratos alternativos¹⁴, aunque mayor que la de otra oxidoreductasa metabólicamente emparentada con ésta, la diacetilo reductasa de *Staphylococcus aureus*¹⁸.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ATKINS, G.L. y NIMNO, I.A. (1975). A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem. J.*, 149, 775-777.
- 2) BERNARDO, A.; MARTIN SARMIENTO, R.; CARBALLO, J. y GONZALEZ PRIETO, J. (1988). Caracterización de la Diacetilo (acetoina) reductasa de *Aerobacter aerogenes* como una L-glicol deshidrogenasa (NAD^+). III Congreso Luso-Español de Bioquímica. Comunicación 5-74. Santiago de Compostela.
- 3) BERNARDO, A.; MARTIN SARMIENTO, R.; VIDAL, I. y GONZALEZ PRIETO, J. (1985). Kinetics and thermodynamics of diacetyl reduction with NADPH by α -dicarbonyl reductase from pigeon liver. *Int. J. Biochem.*, 17, 265-269.
- 4) BRYN, K.; HETLAND, O. y STORMER, F.C. (1971). The Reduction of Diacetyl and Acetoin in *Aerobacter aerogenes*. Evidence for One Enzyme Catalyzing Both Reactions. *Eur. J. Biochem.*, 18, 116-119.

- 5) BURGOS, J.; MARTIN SARMIENTO, R. y DIEZ, V. (1974). Pigeon liver diacetyl reductase. Kinetic and thermodynamic studies with NADH as coenzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 364, 9-16.
- 6) CLELAND, W.W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: (I) nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 104-137.
- 7) CLELAND, W.W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: (III) predictions of initial velocities and inhibition patterns by inspection. *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 188-196.
- 8) GALZY, P.; RATOMAHENINA, R. y LOUIS-EUGENE, S. (1983). Etude de la diacétyle réductase et de l'acétoïne réductase chez une souche de *Saccharomyces uvarum*. *EBC Congress*, pgs. 505-510.
- 9) GONZALEZ PRIETO, J.; BERNARDO, A.; MARTIN SARMIENTO, R. y VIDAL, I. (1983). α -dicarbonilo reductasa de hígado de paloma: 1) Cinética de la reducción del piruvato de etilo con NADPH como coenzima. *An. Fac. Vet. León.*, 29, 343-353.
- 10) GONZALEZ PRIETO, J.; MARTIN SARMIENTO, R. y BURGOS, J. (1983). Kinetic of α -dicarbonyls reduction by L-glycol dehydrogenase from hen muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 224, 372-377.
- 11) HETLAND, O.; BRYN, H. y STORMER, F.C. (1971). Diacetyl (Acetoin) Reductase from *Aerobacter aerogenes*. Evidence for Multiple Forms of the Enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 20, 206-208.
- 12) HETLAND, O.; OLSEN, B.R.; CHRISTENSEN, T.B. y STORMER, F.C. (1971). Diacetyl (Acetoin) Reductase from *Aerobacter aerogenes*. Structural properties. *Eur. J. Biochem.*, 20, 200-205.
- 13) JOHANSEN, L.; LARSEN, S.H. y STORMER, F.C. (1973). Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*. Kinetic studies of the reduction of diacetyl to acetoin. *Eur. J. Biochem.*, 34, 97-99.
- 14) LARSEN, S.H.; JOHANSEN, L.; STORMER, 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 LETTERS.*, 31, 39-41.
- 15) LARSEN, S.H. y STORMER, 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.
- 16) LOUIS-EUGENE, S.; RATOMAHENINA, R. y GALZY, P. (1984). Reduction enzymatique du diacétyle et de l'acétoïne par une souche de *Saccharomyces uvarum*. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie Bd.*, 24, 151-159.
- 17) MARTIN SARMIENTO, R.; GONZALEZ PRIETO, J. y BURGOS, J. (1983). L-glycol dehydrogenase from hen muscle. Kinetic studies of α -hydroxycarbonyls reduction. *Int. J. Biochem.*, 15, 403-407.
- 18) MARTIN SARMIENTO, R.; VIDAL, I.; GONZALEZ PRIETO, J. y BERNARDO, A. (1986). Mecanismo cinético de la reducción del piruvato de etilo por la diacetilo reductasa de *Staphylococcus aureus*. *An. Fac. Vet. León.*, 32, 45-53.
- 19) VOGEL, A. (1964). *Practical Organic Chemistry*. 3.^a Ed. pgs. 171-172. Longmans, London.

EXTRACTOS DE TRABAJOS PUBLICADOS EN OTRAS REVISTAS ESPECIALIZADAS

Epidemiology of saprolegniosis in salmonid fish. (Epidemiología de la saprolegniosis en los salmónidos).

J.M. ALLER GANCEDO. Departamento de Patología Animal, Sanidad Animal.
En Torres Rodríguez, J.M. *Proceedings of the X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*. J.R. Prous Science Pbl., Barcelona, 318-322 (1988).

SUMMARY

The epidemiology of saprolegniosis in salmonid fish was studied with reference to distribution, transmission and factors related to the pathogen, host and environment.

RESUMEN

Se estudia la epidemiología de la saprolegniosis en los salmónidos, haciéndose referencia a la distribución, transmisión y a factores relacionados con el agente patógeno, hospedador y medio ambiente.

Saprolegniosis: especial referencia a los salmónidos. (Saprolegniosis, with special reference to salmonid fish).

J.M. ALLER GANCEDO. Departamento de Patología Animal, Sanidad Animal.
Unidad de Enfermedades Infecciosas.
Pro Veterinario, 8 (3), 9-10, 1988.