

CINETICA DE LA REDUCCION DE LA ACETOINA POR  
LA L-GLICOL DESHIDROGENASA (NAD<sup>+</sup>)  
DE *ENTEROBACTER AEROGENES*

(KINETICS OF THE ACETOIN REDUCTION BY  
L-GLYCOL DEHYDROGENASE (NAD<sup>+</sup>)  
FROM *ENTEROBACTER AEROGENES*)\*\*\*

Por J. Carballo, \*  
I. Vidal, \*\*  
R. Martín Sarmiento, \*  
A. Bernardo, \*  
y J. González Prieto \*

Palabras clave: L-glicol deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>), Acetoína, 2,3-Butanodiol.  
Key words: L-glycol dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>), Acetoin, 2,3 Butanediol.

RESUMEN

Se estudia la cinética de la reducción reversible de la acetoína a 2,3-butanodiol por la L-glicol deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>) de *Enterobacter aerogenes*. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las reacciones tienen lugar por un mecanismo Ordenado Bi-Bi en el que el coenzima opera como sustrato "conductor". La enzima presenta una alta afinidad por el NADH y la acetoína y menor por el NAD y el 2,3-butanodiol.

SUMMARY

Kinetics of the reversible reduction of acetoin to 2,3-butanediol by L-glycol dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) from *Enterobacter aerogenes* was studied. Results obtained prove that

\* Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos.

\*\* Dpto. de Física, Química y Expresión Gráfica.

\*\*\* Este trabajo ha sido financiado con una ayuda concedida por la Excm. Diputación Provincial de León.

An. Fac. Vet. León. 1989, 35, 43-54

the reaction proceeds *via* an Ordered Bi-Bi mechanism with the coenzyme as the "leading" substrate. This enzyme shows a high affinity by NADH and acetoin and a lower one by NAD and 2,3-butanediol.

## INTRODUCCION

La L-glicol deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>) de *Enterobacter aerogenes*, denominada anteriormente diacetilo (acetoína) reductasa<sup>3</sup>, cataliza la reducción de los  $\alpha$ -dicarbonilos no cargados a los correspondientes L- $\alpha$ -hidroxicarbonilos y de éstos a L-glicoles utilizando como donador de hidrógeno el NADH, para cuya forma  $\beta$  (la más habitual) es muy específica<sup>5</sup>.

Su sustrato prioritario es la acetoína (2-butanona-3-hidroxi)<sup>5</sup> que convierte reversiblemente en 2,3-butanodiol. El presente artículo resume los estudios realizados para determinar las constantes cinéticas de esta reacción y el mecanismo cinético por el que tienen lugar.

## MATERIAL Y METODOS

El NAD y el NADH fueron suministrados por Sigma y el 2,3 butanodiol por Fluka. La acetoína (Fluka) fue purificada, para eliminar las impurezas de diacetilo, siguiendo la técnica descrita por Martín y Burgos<sup>18</sup> y la acetona (Panreac) por el método recomendado por Vogel<sup>27</sup>. Las preparaciones enzimáticas fueron obtenidas como describen Carballo y colaboradores<sup>6</sup>.

Los ensayos de actividad fueron realizados, a 25°C y pH 7,0 en tampón fosfato bisódico-monopotásico 50 mM, siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm<sup>6</sup>. Como unidad enzimática se tomó la cantidad de enzima capaz de oxidar un  $\mu$ mol de reaccionante por minuto empleando como sustrato 2,3 butanodiol a la concentración de 13 mM y como coenzima NAD 0,1 mM.

Para el cálculo de las constantes cinéticas se utilizó el método gráfico de Hanes y Wolf<sup>9</sup>, que se prefirió al tradicional de Lineweaver-Burk porque proporciona resultados más fiables<sup>1, 19</sup>.

## RESULTADOS

### *Influencia de la concentración de reaccionantes sobre la actividad enzimática*

La velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de enzima al menos entre 0 y 250 m U.I./ml. En el sentido reductasa, las representaciones de la actividad en función de la concentración de NADH, entre 2,5 y 100  $\mu$ M, dan la típica hipérbola equilátera, pero las de  $v$  frente a [acetoína] muestran la existencia de inhibición por exceso de sustrato a concentraciones superiores a 10-20 mM, con una  $K_i^{acetoína} = 65$  mM. En el sentido deshidrogenasa no se observó inhibición por el NAD ni por el 2,3 butanodiol en el rango estudiado (0,012-1 mM y 0,62-100 mM, respectivamente).

A las concentraciones de sustratos en las que la reacción sigue una cinética michaeliana, las representaciones primarias de [sustrato carbonilo]/ $v$  en función de la molaridad

del carbonilo que actúa como sustrato, dan una familia de rectas, una por cada concentración de coenzima, que se cortan a la izquierda del eje de ordenadas (Fig. 1a y 1b). La proyección de este punto de corte sobre el eje de abscisas nos dio el valor de  $-K_s^{NADH}$ . Lo mismo ocurre al representar [NADH]/ $v$  frente a [NADH] o, en el sentido deshidrogenasa, [NAD]/ $v$  frente a [NAD] (Fig. 1c y 1d). Por otra parte, las representaciones secundarias de las pendientes de las rectas primarias en función de la concentración del sustrato fijo-variable dan también líneas rectas (Fig. 2).

De las gráficas de las figuras 1 y 2, se obtuvieron los siguientes valores para las constantes cinéticas de la reacción: en el sentido reductasa,  $K_s^{NADH} = 2,25$   $\mu$ M,  $K_s^{acetoína} = 0,22$  mM,  $K_m^{NADH} = 4$   $\mu$ M,  $K_m^{acetoína} = 0,41$  mM,  $V_{max} = 2,7$   $\mu$ moles de sustrato transformados por minuto y U.I. En el sentido deshidrogenasa,  $K_s^{NAD} = 0,1$  mM,  $K_s^{2,3butanodiol} = 1,6$  mM,  $K_m^{NAD} = 0,17$  mM,  $K_m^{2,3butanodiol} = 2,7$  mM,  $V_{max} = 2,04$   $\mu$ moles de sustrato transformados / minuto y U.I.

### *Inhibición por el producto carbonilo*

Las gráficas de las figuras 3.a y 3.b ponen de manifiesto que, a concentración no saturante del sustrato fijo, el producto de la reducción de la acetoína, el 2,3 butanodiol, inhibe la reacción no-competitivamente frente al NADH y que la inhibición es también no competitiva frente a la acetoína.

Al representar las pendientes de las rectas de la figura 3.b en función de las concentraciones de 2,3 butanodiol a que corresponden, se obtuvo una recta que cortó el eje de abscisas en  $-6,5$  mM. Dado que se trata de una inhibición no competitiva y que se utilizaron concentraciones no saturantes de sustrato fijo, este valor no corresponde a  $-k_i$  sino, en un mecanismo Ordenado Bi-Bi como el que sigue esta reacción (véase discusión), a

$$X = - (K_i \times (1 + \frac{K_m^{\text{sustrato fijo}}}{[\text{sustrato fijo}]})$$

teniendo en cuenta que el sustrato fijo fue en este caso NADH a la concentración de 10  $\mu$ M y que  $K_m^{NADH} = 4$   $\mu$ M, se deduce un valor para  $K_i^{2,3 butanodiol}$  de 4,6 mM.

El mismo patrón, no competitivo respecto al 2,3 butanodiol y al NAD, se observó al estudiar la inhibición de la oxidación del 2,3 butanodiol por la acetoína (Fig. 3.c y 3.d). La representación de las pendientes de las rectas de la Fig. 3.d frente a [inhibidor] para la obtención de la constante de inhibición para la acetoína, dio un valor aparente de 0,5 mM que, corregido como en el caso anterior para tener en cuenta la no saturación por el sustrato fijo, permitió estimar  $K_i^{acetoína}$  en 0,27 mM.

### *Inhibición por el coenzima producto*

A concentración no saturante del sustrato fijo, el NAD inhibe la reducción de la acetoína competitivamente respecto al NADH y no competitivamente frente a la acetoína (Fig. 4.a y 4.b.) La  $K_i^{NAD}$  se estimó en 0,3 mM representando los puntos de corte en ordenadas de las rectas de la Fig. 4.a en función de la concentración de inhibidor.

La inhibición por el NADH de la reacción en sentido deshidrogenasa resultó ser competitiva para el NAD y no competitiva para el 2,3 butanodiol (Fig. 4.c y 4.d). El valor de  $K_i^{NADH}$  obtenido al representar los puntos de corte en el eje vertical de las rectas de la Fig. 4.c frente a [NADH] fue de 2,25  $\mu$ M.

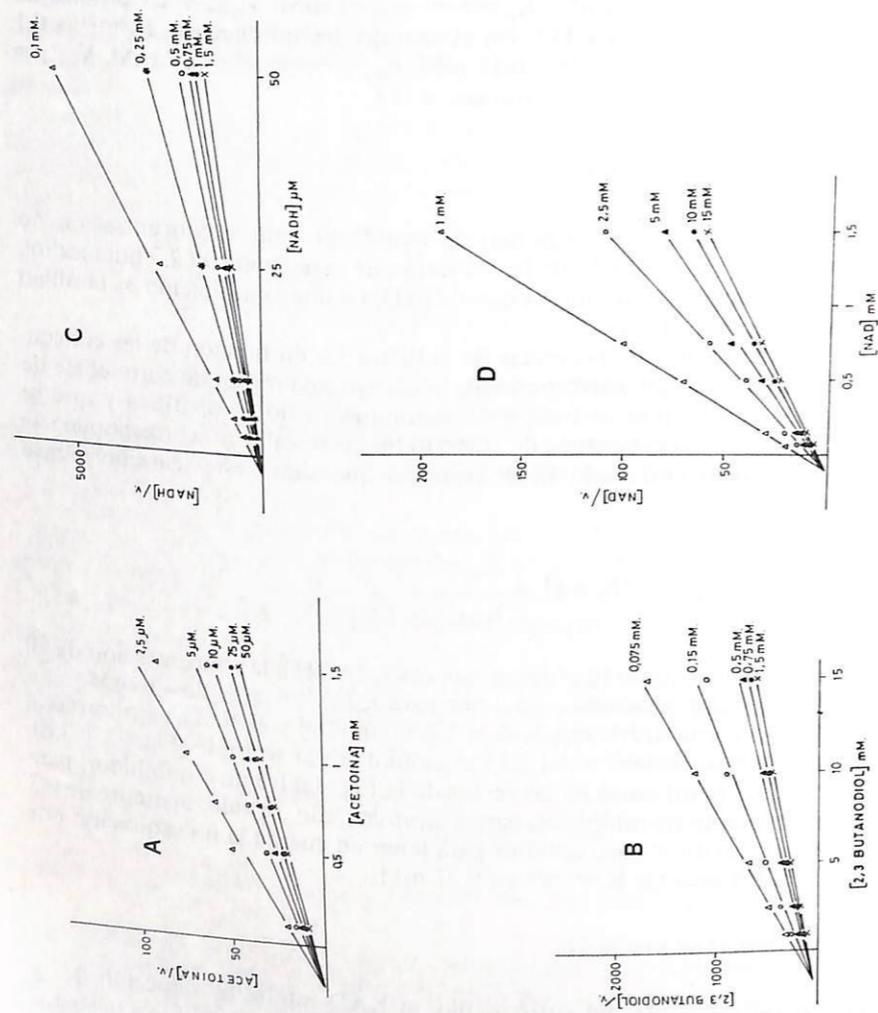


Fig. 1.- *Representaciones primarias*. A) Reacción acetoina reductasa; sustrato variable: acetoina. B) Reacción 2,3-butanodiol deshidrogenasa; sustrato variable: 2,3-butanodiol. C) Reacción acetoina reductasa; sustrato variable: NADH. D) Reacción 2,3-butanodiol deshidrogenasa; sustrato variable: NAD.  
Las concentraciones expresadas al lado de las rectas corresponden al sustrato fijo-variable.

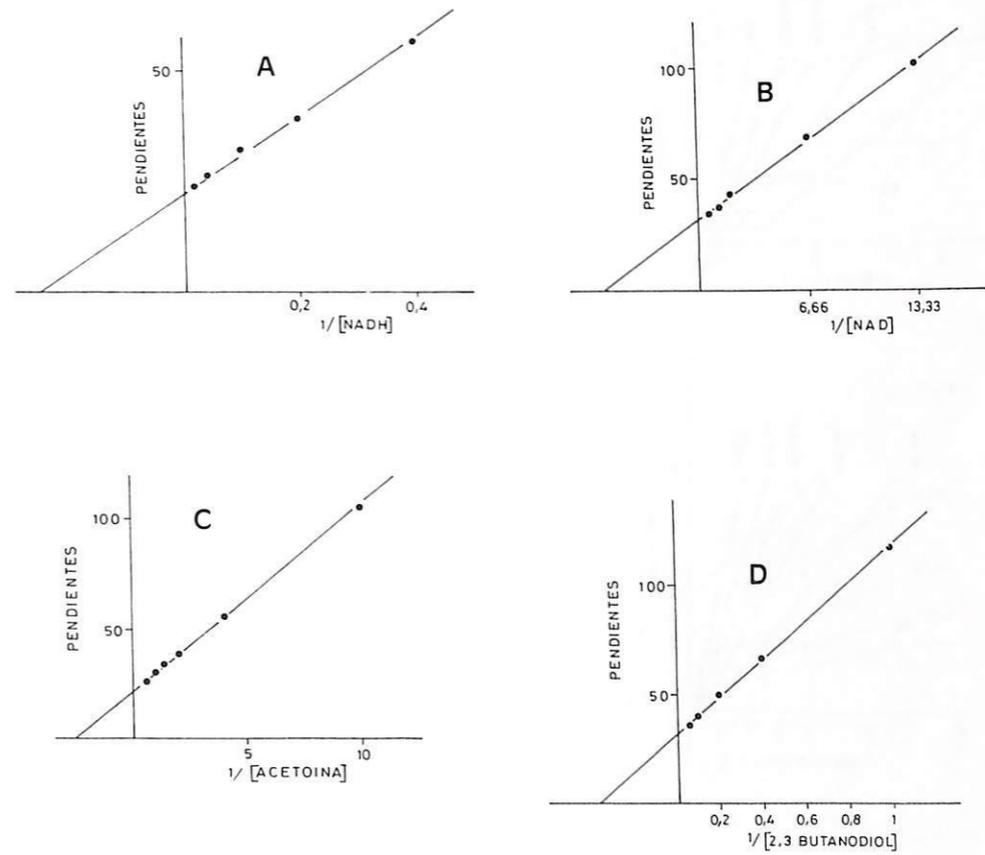


Fig. 2.- *Representaciones secundarias* de las pendientes de las rectas de la Fig. 1 en función de la concentración del sustrato fijo-variable a que corresponden.

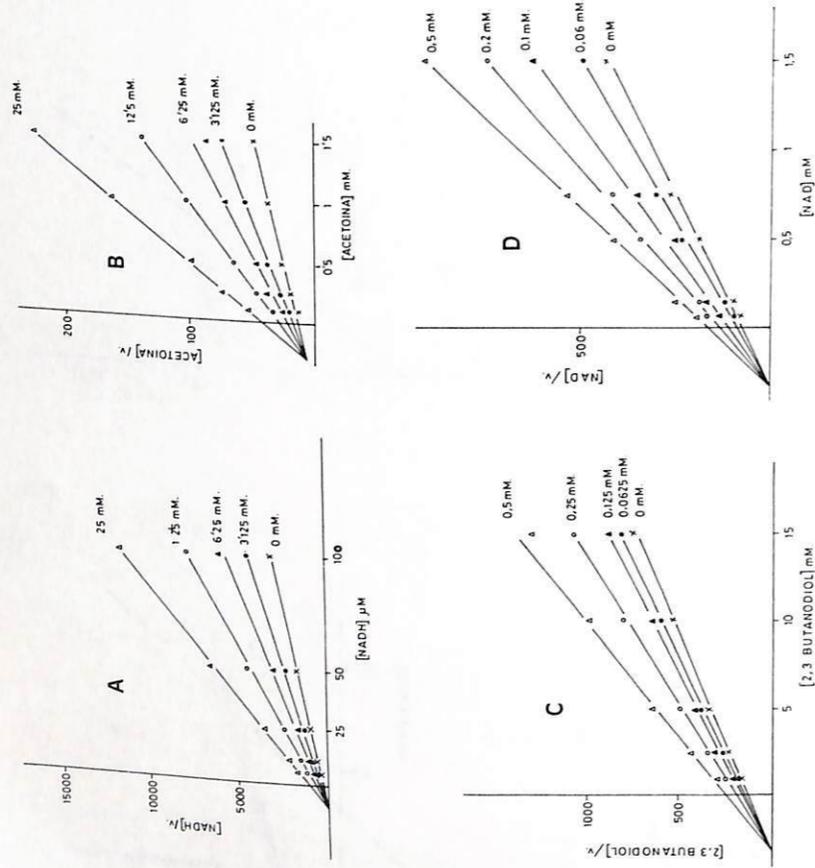


Fig. 3.- Patrón de inhibición por el producto carbonilo. A) Reacción acetoina reductasa, inhibición por el 2,3-butanodiol frente al NADH; sustrato fijo: acetoina 1 mM. B) Reacción acetoina reductasa, inhibición por el 2,3-butanodiol frente a la acetoina; sustrato fijo: NADH 10  $\mu$ M. C) Reacción 2,3-butanodiol deshidrogenasa, inhibición por la acetoina frente al 2,3-butanodiol; sustrato fijo: NAD 0,2 mM. D) Reacción 2,3-butanodiol deshidrogenasa, inhibición por la acetoina frente al NAD; sustrato fijo: 2,3-butanodiol 3 mM. Las cifras a la derecha de las rectas representan concentraciones de inhibidor.

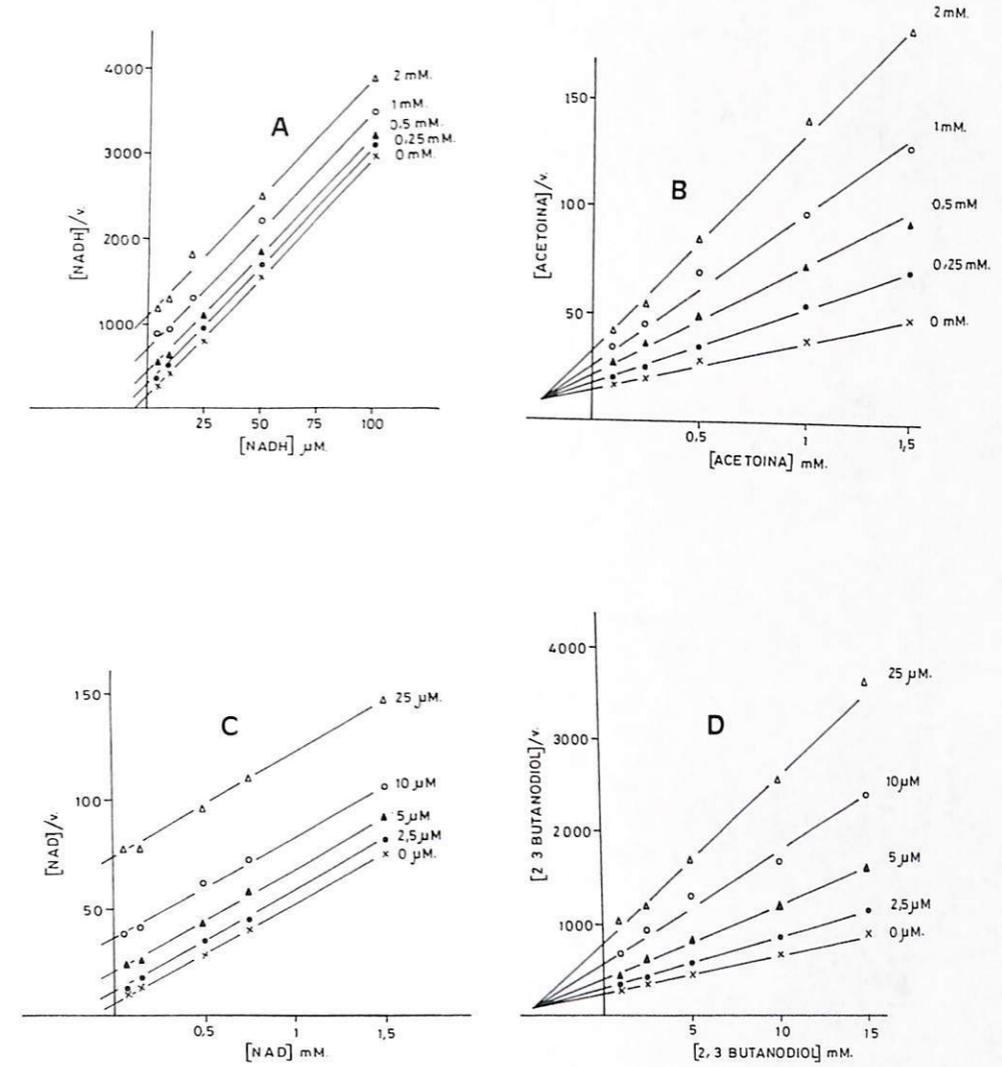


Fig. 4.- Patrón de inhibición por el coenzima producto. A) Reacción acetoina reductasa, inhibición por el NAD frente al NADH; sustrato fijo; acetoina 1 mM. B) Reacción acetoina reductasa, inhibición por el NAD frente a la acetoina; sustrato fijo: NADH 10  $\mu$ M. C) Reacción 2,3-butanodiol deshidrogenasa, inhibición por el NADH frente al NAD; sustrato fijo: 2,3-butanodiol 3 mM. D) Reacción 2,3-butanodiol deshidrogenasa, inhibición por el NADH frente al 2,3-butanodiol; sustrato fijo: NAD 0,2 mM. Los valores a la derecha de las rectas corresponden a concentraciones de inhibidor.

### Inhibición por análogos estructurales de los sustratos

La acetona, un carbonilo que no es aceptado como sustrato por la L-glicol deshidrogenasa de *E. aerogenes*<sup>5</sup>, inhibe la reacción acetoina reductasa acompetitivamente frente al NADH y competitivamente frente a la acetoina (Fig. 5.a y 5.b).  $K_i$  acetona, de la representación de los puntos de corte en ordenadas de las rectas de la Fig. 5.b frente a [inhibidor], resultó ser 170 mM.

Para la inhibición de la oxidación del 2,3 butanodiol se empleó 1,3 butanodiol, compuesto que, a pesar de sus semejanzas estructurales con el sustrato, no es oxidado por la enzima. Como en los casos anteriores, se operó a concentraciones no saturantes del sustrato fijo. La inhibición fué competitiva frente al NAD y no competitiva frente al 2,3 butanodiol (Fig. 5.c y 5.d). Para  $K_i$  1,3 butanodiol se obtuvo un valor de 440 mM, representando las pendientes de las rectas de la Fig. 5.c en función de la concentración de 1,3 butanodiol.

### DISCUSION

#### Mecanismo cinético de la reacción

La forma de las gráficas de la Fig. 1 demuestra que la reacción obedece a la ecuación de velocidad

$$V = \frac{V_{\max.}}{\left(1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} + \frac{K_s^A \times K_m^B}{[A] \times [B]}\right)}$$

lo que descarta los mecanismos tipo ping-pong (para detalles sobre la nomenclatura véase Cleland<sup>7</sup>) y los que transcurren al azar y no alcanzan rápidamente el equilibrio. La discusión se centra, por tanto, en los sistemas al azar de equilibrio rápido y en los de orden obligatorio (Ordenado Bi-Bi y Theorell-Chance) con sus variantes "Iso".

En el sentido deshidrogenasa, la reacción es inhibida por el producto carbonilo, la acetoina, no competitivamente tanto frente al NAD como respecto al 2,3 butanodiol. Las reglas de Cleland para la inhibición por los productos<sup>8</sup> demuestran que este patrón es incompatible con dos de los mecanismos en discusión, el de Theorell-Chance y el que transcurre al azar con equilibrio rápido. Del mismo modo, en la dirección reductasa el 2,3 butanodiol opera como inhibidor no competitivo del NADH y de la acetoina. La L-glicol deshidrogenasa de *E. aerogenes* produce a partir de la acetoina dos de los isómeros del 2,3 butanodiol, el L(+), de la L-acetoina y el meso, de la acetoina-D, pero no D(-)-butanodiol. En consecuencia, hubiera sido deseable realizar los estudios de inhibición con butanodiol L o meso. Dado que no nos ha sido posible encontrar preparaciones de L o meso-butanol en el comercio ni método alguno en la bibliografía que permita obtenerlos con el grado de pureza necesario, nos hemos visto obligados a emplear una mezcla racémica de este producto. Sin embargo tal circunstancia no resta valor a los resultados obtenidos en lo que respecta a su aplicación al estudio del mecanismo cinético de la reacción por cuanto la inhibición resultó ser lineal (véanse Fig. 3.a y 3.b). Por tanto, o no se fija a la enzima -es decir, no la inhibe- o reacciona con ella del mismo modo que los activos. Tanto en el primer caso como en el

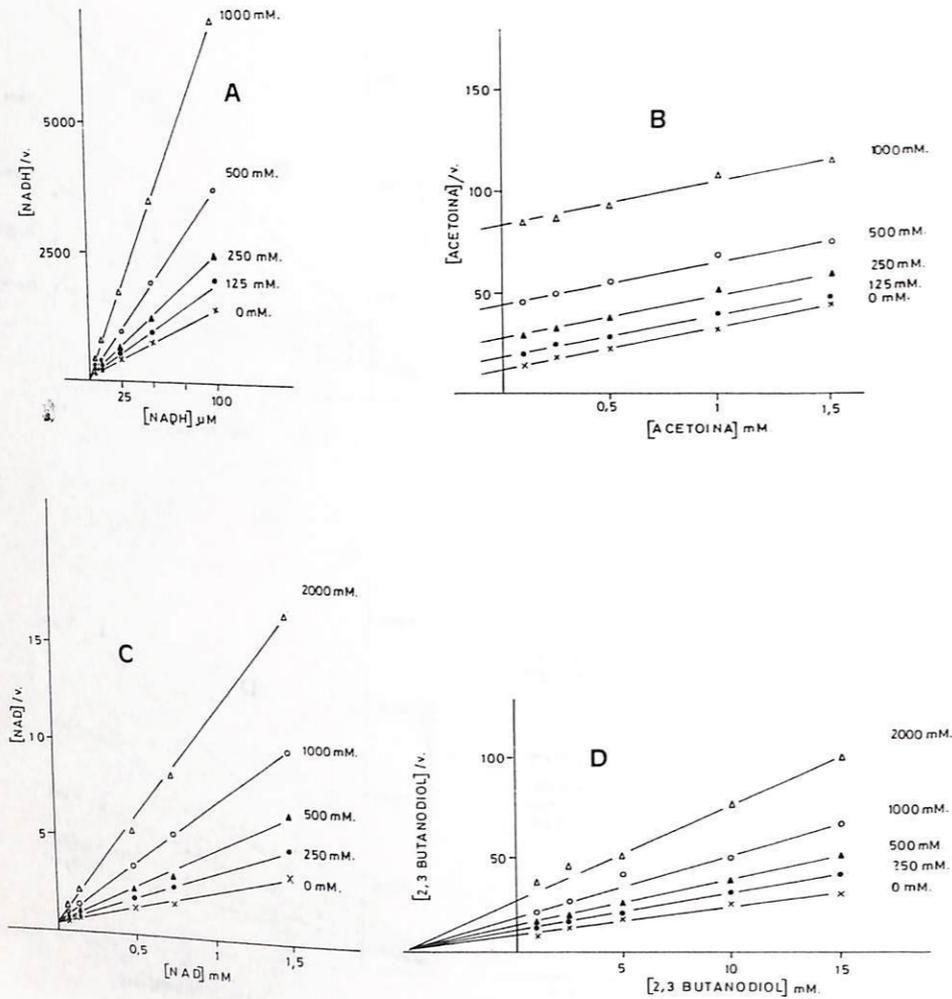


Fig. 5.-Patrón de inhibición por carbonilos no sustratos. A) Reacción acetoina reductasa, inhibición por la acetona frente al NADH; sustrato fijo: acetoina 1 mM. B) Reacción acetoina reductasa, inhibición por la acetona frente a la acetoina; sustrato fijo: NADH 10 μM. C) Reacción 2,3-butanodiol deshidrogenasa, inhibición por el 1,3-butanodiol frente al NAD; sustrato fijo: 2,3-butanodiol 3 mM. D) Reacción 2,3-butanodiol deshidrogenasa, inhibición por el 1,3-butanodiol frente al 2,3 butanodiol; sustrato fijo: NAD 0,2 mM. Concentraciones de inhibidor las expresadas a la derecha de las rectas.

segundo, el patrón de inhibición observado por nosotros no se vería modificado. Si el D-butanodiol hubiese reaccionado de otro modo, alterando el tipo de inhibición generado por las formas meso y L, las gráficas 3.a y 3.b no serían lineales, sino parabólicas<sup>8</sup>.

El coenzima producto (en el sentido reductasa, NAD; en la reacción deshidrogenasa, NADH) inhibe competitivamente para el coenzima de procedencia y no competitivamente frente al sustrato carbonilo, lo que descarta el esquema Iso-Ordenado Bi-Bi y centra la discusión en dos aún posibles: un mecanismo "Iso Theorell-Chance" en el que el carbonilo se fija a la enzima antes que el piridín-nucleótido o uno Ordenado Bi-Bi con el coenzima como primer compuesto en reaccionar con ella.

Para distinguir entre estos mecanismos se estudió el efecto inhibitorio de la acetona sobre la reducción de la acetoína y el del 1,3 butanodiol sobre la reacción de oxidación del 2,3 butanodiol. La acetona provoca una inhibición competitiva respecto a la acetoína y acompetitiva para el NADH. La aplicación de las normas de Cleland para inhibidores de vía muerta<sup>8</sup> pone de manifiesto que este patrón sólo es posible si el NADH se fija a la enzima antes que la acetoína. Esto mismo demuestra el patrón de inhibición por el 1,3 butanodiol, no competitivo para el 2,3 butanodiol y acompetitivo para el NAD, que no es compatible con un sistema ordenado en el que el sustrato alcohol sea el primero en reaccionar con el enzima, pero sí lo es con uno en el cual es el coenzima el que reacciona primero, aceptando que el inhibidor se fija a E-NAD y E-NADH<sup>8</sup>. Así pues, las características de las inhibiciones por estos compuestos descartan el sistema Iso Theorell-Chance y dejan como único posible uno Ordenado Bi-Bi en el que el coenzima actúa como sustrato "conductor".

Larsen y Stormer<sup>15</sup> habían sugerido ya este mecanismo cinético para la reducción de la acetoína y la oxidación del 2,3 butanodiol por la enzima aquí estudiada, pero sin ofrecer una evidencia completa: los citados autores no investigaron la inhibición por análogos estructurales de los sustratos, por lo que sus datos no permiten descartar que la reacción tenga lugar vía un sistema Iso-Theorell-Chance. La mayor parte de las enzimas capaces de reducir el diacetilo, la acetoína y compuestos análogos operan también por el sistema Ordenado Bi-Bi<sup>14, 11, 21, 2, 22, 12</sup>, con pocas excepciones<sup>18, 4</sup>.

#### Constantes cinéticas

Los valores obtenidos en las experiencias que se describen en este artículo se asemejan mucho a los obtenidos por Larsen y Stormer<sup>15</sup> con preparaciones obtenidas por el método de Bryn y colaboradores<sup>3</sup>. Todos los datos hasta ahora recogidos apuntan a que la enzima estudiada por nosotros es básicamente idéntica a la investigada por el grupo del Profesor Sotormer, excepto en que la nuestra es un dímero<sup>5</sup> y la empleada por ellos un tetrámero<sup>13</sup>. No obstante, es evidente que las diferencias en el grado de polimerización no determinan, en este caso, un comportamiento cinético muy distinto.

El aspecto más relevante de las propiedades cinéticas de la L-glicol deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>) de *Enterobacter aerogenes* es su elevada afinidad por el NADH ( $K_s = 2,25 \mu M$ ;  $K_m = 4 \mu M$ ), sensiblemente mayor de lo habitual entre las enzimas capaces de reducir el diacetilo y la acetoína empleando este nucleótido como donador de hidrógeno que dan valores de  $K_m^{NADH}$  situadas entre  $31 \mu M$  para la  $\alpha$ -dicetona reductasa (NAD<sup>+</sup>) de *Staphylococcus aureus*<sup>12</sup> y  $200 \mu M$  para la  $\alpha$ -dicetona reductasa de hígado de bóvido<sup>23</sup>.

La afinidad por el NAD es mucho más baja ( $K_s = 0,1 mM$ ;  $K_m = 0,17 mM$ ), aunque también mayor que la de las demás óxido-reductasas del catabolismo del diacetilo y la acetoína<sup>18, 20, 26, 12</sup>. Aunque las normas de la I.U.B. para la clasificación de óxido-reductasas obligan a darle el nombre de deshidrogenasa, la enzima estudiada aquí opera mejor en el sentido acetoína  $\rightarrow$  2,3 butanodiol. Nuestros resultados ponen de manifiesto que ello se debe principalmente a su mayor afinidad por la forma reducida

del piridín-nucleótido que por la oxidada y sólo en menor medida a las diferencias en  $V_{max}$  (como reductasa, 2,7  $\mu$ moles de sustrato transformados por minuto y U.I.; como deshidrogenasa 2,04), y entre su afinidad por la acetoína ( $K_s = 0,22 mM$ ;  $K_m = 0,41 mM$ ) y el 2,3 butanodiol ( $K_s = 1,6 mM$ ;  $K_m = 2,7 mM$ ).

Debe de destacarse también el valor de  $K_m$  obtenido para la acetoína (0,41 mM), sensiblemente más bajo que el de las demás enzimas capaces de catalizar su reducción a 2,3-butanodiol: 2,5 mM para la que reduce este compuesto en el músculo aviar<sup>21</sup>, 7,4 mM para la que opera en el hígado de hamster<sup>25</sup>, 30 mM para la de *Saccharomyces uvarum*<sup>17</sup> y 50 mM para la de hígado de rata<sup>10</sup>.

La comparación entre el cociente  $V_{max}/K_m^{sustrato}$  obtenido en los experimentos realizados por nosotros sobre la reacción acetoína reductasa con los observados por Carballo<sup>5</sup> respecto a la reducción de diversos otros compuestos aceptados también por la enzima, confirma que, a juzgar por este criterio, la acetoína es el mejor sustrato conocido de la L-glicol deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>) de *E. aerogenes*<sup>5</sup>. Si bien es cierto que el empleo del referido cociente para decidir con qué sustancias opera una enzima "in vivo" tiene mucho de arbitrario, tal conclusión debe de ser cierta en el presente caso, dado que la acetoína es también mucho más abundante en los sistemas biológicos que los demás sustratos alternativos<sup>16, 24</sup>.

#### 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.; VIDAL, I. y GONZALEZ PRIETO, J. (1985). Kinetics and thermodynamics of diacetyl reduction with NADPH by  $\alpha$ -dicarbonyl reductase from pigeon liver. *Int. J. Biochem.*, 17, 265-269.
- 3) 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.
- 4) BURGOS, J.; MARTIN, R. y DIEZ, V. (1974). Pigeon liver diacetyl reductase: kinetic and thermodynamic studies with NADH as coenzyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, 364, 9-16.
- 5) CARBALLO, J. (1989). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.
- 6) CARBALLO, J.; GONZALEZ PRIETO, J.; BERNARDO, A. y MARTIN SARMIENTO, R. (1988). Cinética de la reducción de los piruvatos de etilo y metilo por la L-glicol deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>) de *Enterobacter aerogenes*. *An. Fac. Vet. León.*, 34, 127-140.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) DIXON, M. y WEBB, E.C. (1964). En "Enzymes", Longmans, London, págs. 69 y 329.
- 10) GABRIEL, M.A.; JABARA, H. y AL-KHALIDI, U.A.S. (1971). Metabolism of acetoin in mammalian liver slices and extracts: interconversión with butane-2,3-diol and diacetyl. *Biochem. J.*, 124, 793-800.
- 11) GONZALEZ PRIETO, J.; MARTIN SARMIENTO, R. y BURGOS, J. (1983). Kinetic of  $\alpha$ -dicarbonyls reduction by L-glycol dehydrogenase from hen muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 224, 372-377.
- 12) GONZALEZ PRIETO, J.; VIDAL, I.; BERNARDO, A. y MARTIN, R. (1988). Kinetics of the diacetyl and 2,3 pentanedione reduction by diacetyl reductase ( $\alpha$ -diketone reductase (NAD<sup>+</sup>)) from *Staphylococcus aureus*. *Biochimie*. 70, 1791-1797.

- 13) 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.
- 14) 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.
- 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) LEDINGHAM, G.A. y NEISH, A.C. (1954). En "Industrie Fermentations" (Underkofler, L.A. y Kickey, R.J., Edits.) Vol. II, Chemical Publishing Company, New York.
- 17) LOUIS-EUGENE, S.; RATOMAHENINA, R. y GALZY, P. (1984). Reduction enzymatique du diacétyle et de l'acétoine par une souche de *Saccharomyces uvarum*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* Bd., 24, 151-159.
- 18) MARTIN, R. y BURGOS, J. (1972). Kinetic studies of beef liver diacetyl reductase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 289, 13-18.
- 19) MARTIN, R. y BURGOS, J. (1979). A new method for determining kinetic constants. *An. Fac. Vet. León.*, 25, 295-307.
- 20) MARTIN, R.; DIEZ, 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.
- 21) MARTIN SARMIENTO, R.; GONZALEZ PRIETO, J. y BURGOS, J. (1983). L-glycol dehydrogenase from hen muscle. Kinetic studies of  $\alpha$ -hydroxycarbonyls reduction. *Int. J. Biochem.*, 15, 403-407.
- 22) MARTIN SARMIENTO, R.; VIDAL, I.; GONZALEZ PRIETO, J. y BERNARDO, A. (1986). Mecanismo cinético de la reducción del piruvato de etilo por la diacelilo reductasa de *Staphylococcus aureus*. *An. Fac. Vet. León.*, 32, 45-53.
- 23) PROVECHO, F.; BURGOS, J. y MARTIN SARMIENTO, R. (1984). Further purification and characterization of diacetyl reducing enzymes from beef liver. *Int. J. Biochem.*, 16, 423-427.
- 24) SATO, J.; WANG, Y. y VAN EYS, J. (1980). Methylglyoxal formation in rat liver cells *J. Biol. Chem.*, 255, 2046-2050.
- 25) SAWADA, H.; HARA, A.; NAKAYAMA, T. y SEIRIKI, K. (1985). Kinetic and structural properties of diacetyl reductase from hamster liver. *J. Biochem.*, 98, 1349-1357.
- 26) VIDAL, I. (1986). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Valladolid.
- 27) VOGEL, A.I. (1964). En "Practical Organic Chemistry", Longmans, London, 3.<sup>a</sup> Ed., pág. 171.

## EFECTO DE LA COMPOSICION BOTANICA DE LOS HENOS Y DEL NIVEL DE INGESTION SOBRE SU DIGESTIBILIDAD Y RITMO DE PASO A TRAVES DEL TRACTO DIGESTIVO

### (THE EFFECT OF THE BOTANICAL COMPOSITION OF HAYS AND LEVEL OF INTAKE ON DIGESTIBILITY AND RATE OF PASSAGE OF DIGESTA)

Por M.D. Carro, \*  
S. López, \*  
J.S. González \*  
y F.J. Ovejero \*

Palabras clave: heno, nivel de ingestión, ritmo de paso.  
Key words: hay, level of intake, rate of passage.

#### ABSTRACT

Sixteen mature ewes were used to investigate the effects of type of hay and level of intake on digestibility and rate of passage. Two levels of intake -maintenance (NB) and 90% of the "ad libitum" intake (NA)- and two hays -alfalfa hay (HA) and grass hay (HG)- were compared. Chromium-mordanted hay (ground through a 2 mm. screen) was used as marker.

Apparent digestibility coefficients for organic matter (DMO) and neutral (DFND) and acid detergent fibre (DFAD) were not affected ( $P > 0.05$ ) by level of intake.

DFND and DFAD were higher ( $P < 0.05$ ) for sheep fed grass hay than for those fed alfalfa hay. Digestibility of crude protein (DPB) was greater ( $P < 0.05$ ) for sheep fed alfalfa hay than for those fed grass hay.

The retention time of marker in the reticulo-rumen was lower ( $P < 0.05$ ) for the higher level of intake (NA), but the retention time in the post-ruminal tract was essentially identical for both levels (NA and NB). A tendency ( $P < 0.10$ ) for a greater total

\* Dpto. Producción Animal. Universidad de León.

*An. Fac. Vet. León.* 1989, 35, 55-62