

# MECANISMO CINETICO DE LA REDUCCION DEL PIRUVATO DE ETILO POR LA DIACETILO REDUCTASA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Por R. Martín Sarmiento (1)  
I. Vidal (2)  
J. González Prieto (1)  
A. Bernardo (1)

## INTRODUCCION

La diacetilo reductasa de *Staphylococcus aureus* (acetoína: NAD<sup>+</sup> óxido-reductasa, EC. 1.1.1.5.)<sup>6</sup> fue la primera de las enzimas del catabolismo reductor del diacetilo en ser descrita (Strecker y Harary, 1954)<sup>4</sup>. Hasta muy recientemente no se le conocía otro sustrato que el diacetilo, pero se ha comprobado en nuestro laboratorio que acepta también todo tipo de  $\alpha$ -dicarbonilos no cargados de más de tres átomos de carbono y los transforma, irreversiblemente en la práctica, en los correspondientes hidroxycarbonilos<sup>15</sup>. En rigor, no es pues, una diacetilo reductasa sino una nueva  $\alpha$ -dicarbonilo reductasa, que se diferencia de las estudiadas hasta ahora<sup>2,13</sup> por ser específica para el coenzima y aceptar como tal únicamente el NADH.

En este artículo se estudia el mecanismo cinético de la reducción por esta enzima de uno de sus sustratos, el piruvato de etilo, que *in vitro* resultó ser el más eficaz tras la 2,3-pentanodiona y el propio diacetilo<sup>15</sup>. Se discute también el significado de las constantes de afinidad para esta reacción obtenidas durante la realización del trabajo.

## MATERIAL Y METODOS

El piruvato de etilo fue suministrado por Sigma, el lactato de etilo por Merck y el NAD<sup>+</sup> por Boehringer. La acetona (Panreac) fue purificada siguiendo el método descrito por Vogel<sup>16</sup>.

Las preparaciones de la enzima se obtuvieron según el procedimiento de purificación descrito por Vidal<sup>15</sup>. La actividad enzimática se determinó espectrofotométrica-

(1) Dpto. de Higiene y Teconología de los Alimentos y Toxicología.  
(2) Dpto. de Física, Química y Expresión Gráfica.

### Inhibición por la acetona

La acetona inhibe la reacción en forma no competitiva para el sustrato carbonilo a concentración no saturante de NADH (0.2 mM). La representación por el método de Hanes de los resultados de los estudios de inhibición respecto al NADH con piruvato de etilo fijo y no saturante (30 mM) dio, en cambio, un conjunto de rectas convergentes sobre el eje de ordenadas (figura 5), demostrando que la citada inhibición es de tipo acompetitivo. La  $K_i$  para la acetona (320 mM) se obtuvo representando las pendientes de las rectas de la gráfica de la figura 5 en función de la concentración del inhibidor a que corresponden.

## DISCUSION

### Mecanismo de reacción

La forma de las gráficas de las figuras 2a y 2b demuestra que la reacción obedece a la ecuación de velocidad

$$V = \frac{V_{max}}{1 + (K_m^A / (A)) + (K_m^B / (B)) + K_s^A K_m^B / (A) (B)}$$

La discusión queda pues, centrada en los sistemas que generan ecuaciones de este tipo, es decir, los secuenciales «al azar» de equilibrio rápido, los de orden obligatorio, Ordenado Bi-Bi o Theorell-Chance, y sus respectivos Iso-mecanismos<sup>4</sup>.

El patrón de inhibición por el lactato de etilo, no competitivo para los dos sustratos, es incompatible con los sistemas «al azar» y con el de Theorell-Chance<sup>4</sup>, pero deja aún como posibles tres esquemas, el Ordenado Bi-Bi, el Iso-Theorell-Chance y el Iso-ordenado. Este último queda también descartado por el patrón de inhibición por el otro producto de la reacción, el  $NAD^+$  competitivo para el NADH y no competitivo para el piruvato de etilo. Por tanto, restan sólo en discusión dos mecanismos, el Ordenado Bi-Bi y el Iso-Theorell-Chance.

Estos dos mecanismos generan patrones de inhibición muy semejantes. En el primero, todas las inhibiciones por los productos son no competitivas excepto la del último en ser liberado respecto al primer sustrato en fijarse a la enzima, que es competitiva; en el segundo, es competitiva la del primer producto respecto al último sustrato y no competitivas todas las demás<sup>4</sup>. Como, en nuestro caso, la inhibición competitiva ha resultado ser la del  $NAD^+$  frente al NADH las posibilidades a considerar son: a) que el NADH sea el primer sustrato en incorporarse al enzima (y por tanto el  $NAD^+$  el último producto en abandonarlo, dada la simetría de este tipo de reacciones), en cuyo caso se trataría de un mecanismo Ordenado Bi-Bi; y b) que el sustrato inicial o «conductor» fuese el piruvato de etilo, lo que llevaría a un sistema Iso-Theorell-Chance. Para distinguir entre ambos mecanismos, bastaría pues, comprobar cuál de los dos sustratos, el NADH o el piruvato de etilo, actúa como conductor.

La acetona, un análogo estructural del piruvato de etilo que no es aceptado como sustrato, inhibe la reducción de este compuesto por la enzima aquí estudiada acompe-

mente siguiendo el cambio en la absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH a la temperatura de 25°C. y a pH 7.0 en tampón fosfato bisódico/monopotásico 50 mM.

Para la representación gráfica de los resultados se utilizó el método de Hanes en lugar del habitual de Lineweaver/Burck, por ser más exacto<sup>1</sup>. Los valores de  $K_m$  y  $K_s$  se calcularon según se describe en la ref. 7.

## RESULTADOS

### Influencia de la concentración de sustratos sobre la velocidad de reacción

La reacción sigue una cinética michaeliana en el rango de 10 a 300  $\mu$ M de NADH y entre 0.6 y 80 mM de piruvato de etilo. A concentraciones más altas de este último se observó inhibición por exceso de sustrato. La correspondiente  $K_i$  se calculó en 150 mM a partir de la gráfica de la figura 1.

En la zona en que la reacción no está sujeta a inhibición por el sustrato, las representaciones primarias de (S)/V en función de (S) dan una familia de rectas que convergen a la izquierda del eje de ordenadas (figura 2a y 2b). Se obtienen también rectas al representar las pendientes de las líneas de las figuras 2a y b en función de las concentraciones de sustrato fijo-variable a que corresponden. Las constantes de afinidad para el sustrato y el coenzima han sido estimadas, a partir de estas gráficas<sup>7</sup>, en: para el NADH,  $K_s = 35 \mu$ M y  $K_m = 160 \mu$ M; para el piruvato de etilo,  $K_s = 8$  mM y  $K_m = 36$  mM.

### Inhibición por el lactato de etilo

A concentración fija y no saturante de NADH (0.2 mM) y variable del sustrato carbonilo, al inhibir la reacción con lactato de etilo se obtuvo una serie de rectas convergentes en el segundo cuadrante (figura 3), lo que pone de manifiesto se trata de una inhibición no competitiva. Igual resultado se obtuvo cuando el sustrato fijo fue el piruvato de etilo a concentración no saturante (30 mM) y el variable NADH. La  $K_i$  para el lactato de etilo se determinó representando las pendientes de las rectas de la figura 3 en función de las concentraciones de inhibidor a que corresponden, de lo que resultó un valor de 55 mM; al no estar el sistema saturado del sustrato fijo, este dato corresponde en realidad a  $K_i + (K_i K_m^{NADH} / (NADH))$ , de donde se deduce que el valor real de la constante de inhibición para el lactato de etilo es 30 mM.

### Inhibición por el $NAD^+$

La inhibición por el  $NAD^+$  fijo y no saturante (0.2 mM) y el piruvato de etilo variable, se mostró también no competitiva. En cambio, cuando el sustrato variable fue el NADH (concentración de piruvato de etilo, 50 mM), la representación de Hanes dio una familia de rectas paralelas (figura 4), mostrando que el  $NAD^+$  inhibe la reacción competitivamente respecto al coenzima reducido.  $K_i$  para el  $NAD^+$  se obtuvo representando las intersecciones en ordenadas de las rectas de la figura 4 en función de las concentraciones de inhibidor correspondientes; el valor así calculado fue de 1 mM.

titivamente respecto al piruvato de etilo y no competitivamente para el NADH. Las normas de Cleland para inhibiciones de vía muerta<sup>5</sup> demuestran que este comportamiento sólo puede darse, en sistemas secuenciales ordenados como los que se discuten, si el NADH se fija a la enzima antes de que lo haga el sustrato carbonilo, lo que, a su vez, prueba que la reacción obedece a un mecanismo Ordenado Bi-Bi. Este mismo esquema sigue también la reducción del piruvato de etilo con NADPH catalizada por la -dicarbonilo reductasa de hígado de paloma<sup>8</sup>. Se trata de un mecanismo muy frecuente en reacciones de oxidorreducción con participación de piridín-nucleótidos<sup>12</sup>, por el que operan la mayor parte de las enzimas emparentadas metabólicamente con la que se estudia en este trabajo<sup>3, 7, 9, 10</sup>.

#### Afinidad por los sustratos

Cuando actúa sobre el piruvato de etilo, la diacetilo reductasa de *S. aureus* muestra una baja afinidad por el sustrato y por el coenzima, tanto si se la compara con la de otros sustratos alternativos (v.g.,  $K_m$  para el NADH y para el dicarbonilo es unas 3-5 veces más alta que en la reducción del diacetilo o de la 2,3-pentanodiona<sup>15</sup>) como con la obtenida en reacciones similares con otras enzimas<sup>3,8-11</sup>. Todos estos datos indican claramente que el piruvato de etilo no es un buen sustrato para la reductasa a que se refiere este artículo.

La enzima se ve inhibida por el etil-piruvato en exceso. Del mismo modo se comporta también la -dicarbonilo reductasa de hígado de paloma<sup>8</sup>. Dadas las características cinéticas de estas deshidrogenasas, no parece que este hecho tenga significado fisiológico alguno.

#### 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 inhibición por los productos y por un análogo estructural del sustrato carbonilo, demuestran que la reducción del piruvato de etilo por la diacetilo reductasa de *S. aureus* transcurre por un mecanismo Ordenado Bi-Bi, en el que el coenzima es el primer compuesto en fijarse a la enzima.

### KINETIC MECHANISM OF ETHYL PYRUVATE REDUCTION BY DIACETYL REDUCTASE FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

#### SUMMARY

The convergence of the primary Hanes' plots and the inhibition pattern by products and by substrate analogue prove that ethyl pyruvate reduction by diacetyl reductase from *S. aureus* proceeds via an Ordered Bi-Bi mechanism the coenzyme being the first compound in reacting with the enzyme.

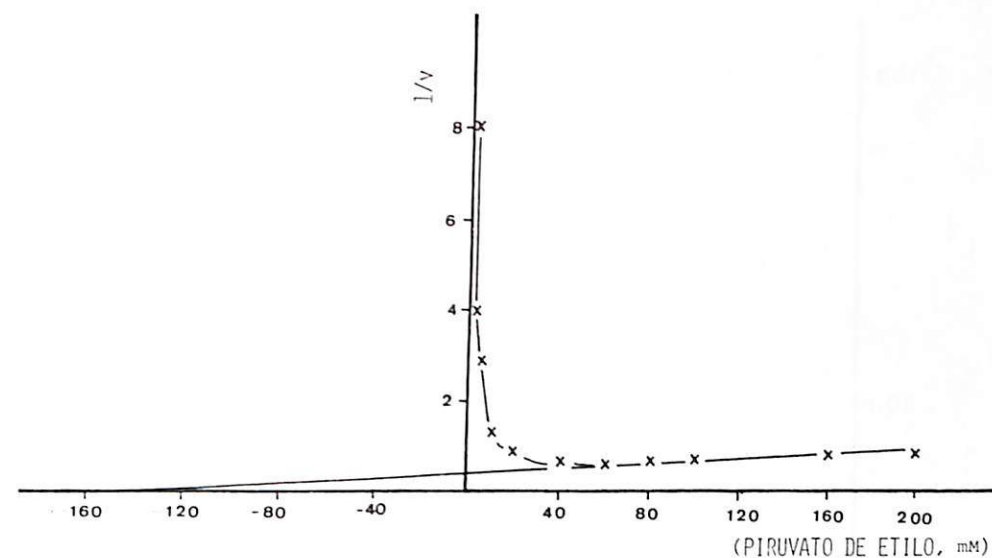


Fig. 1.- Cálculo de la constante de inhibición por exceso de sustrato mediante el método de Dixon. Concentración de NADH, 0,2 mM.

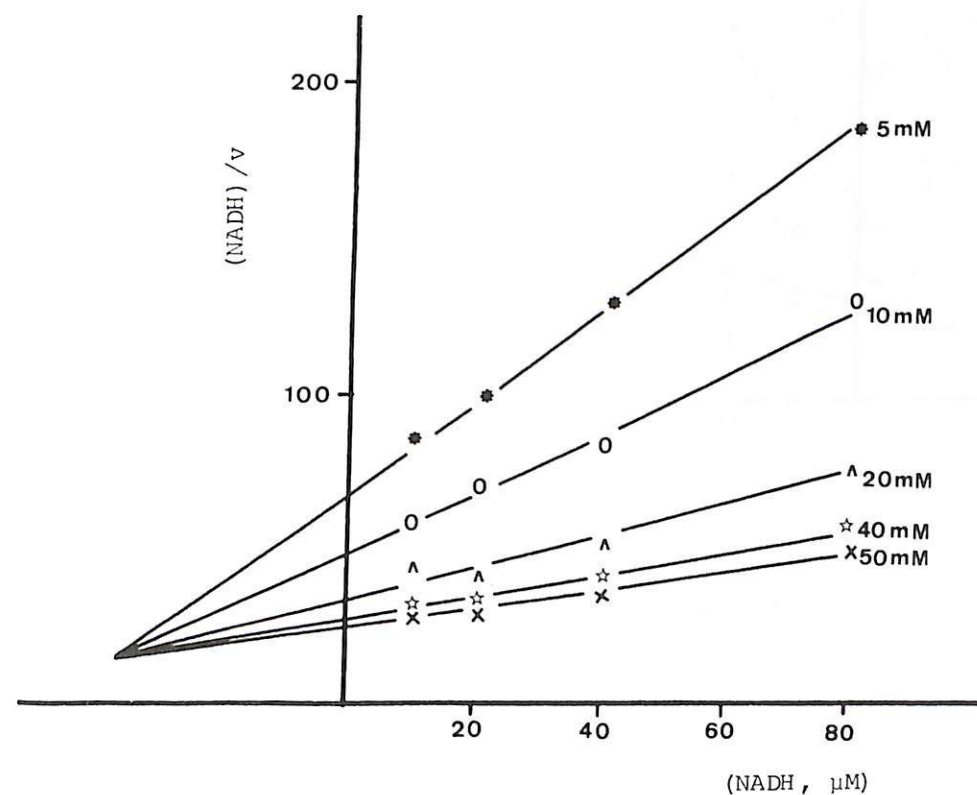


Fig. 2.- Influencia de la concentración de sustratos sobre la velocidad de reacción: representaciones primarias por el método de Hanes. Las cifras en el interior de las gráficas corresponden a la concentración de piruvato de etilo (en «a») y de NADH (en «b»).

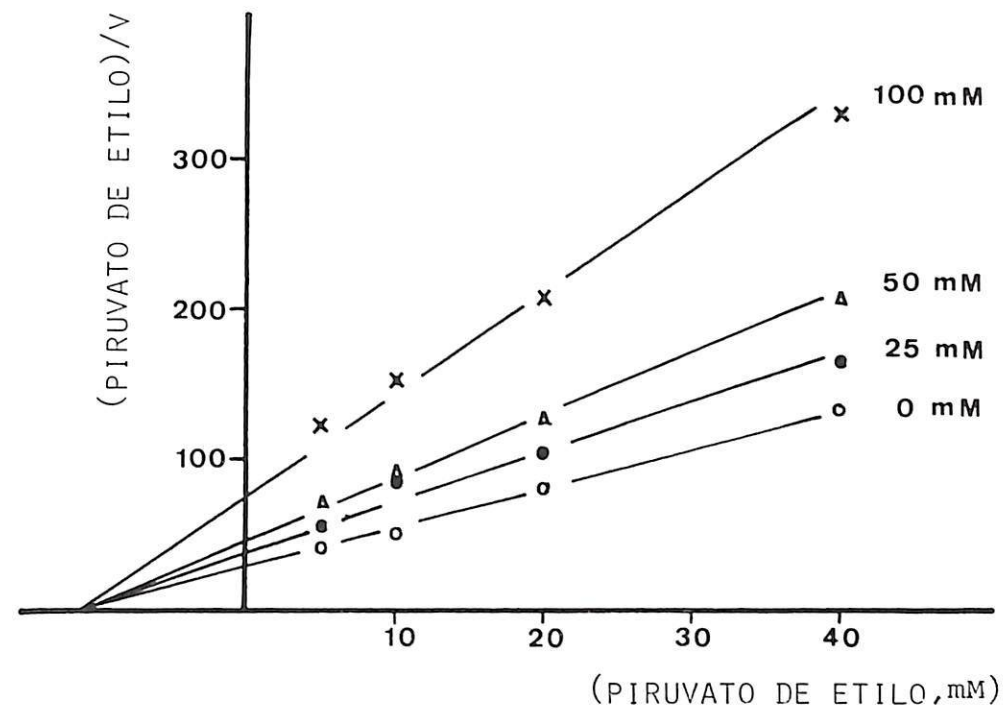
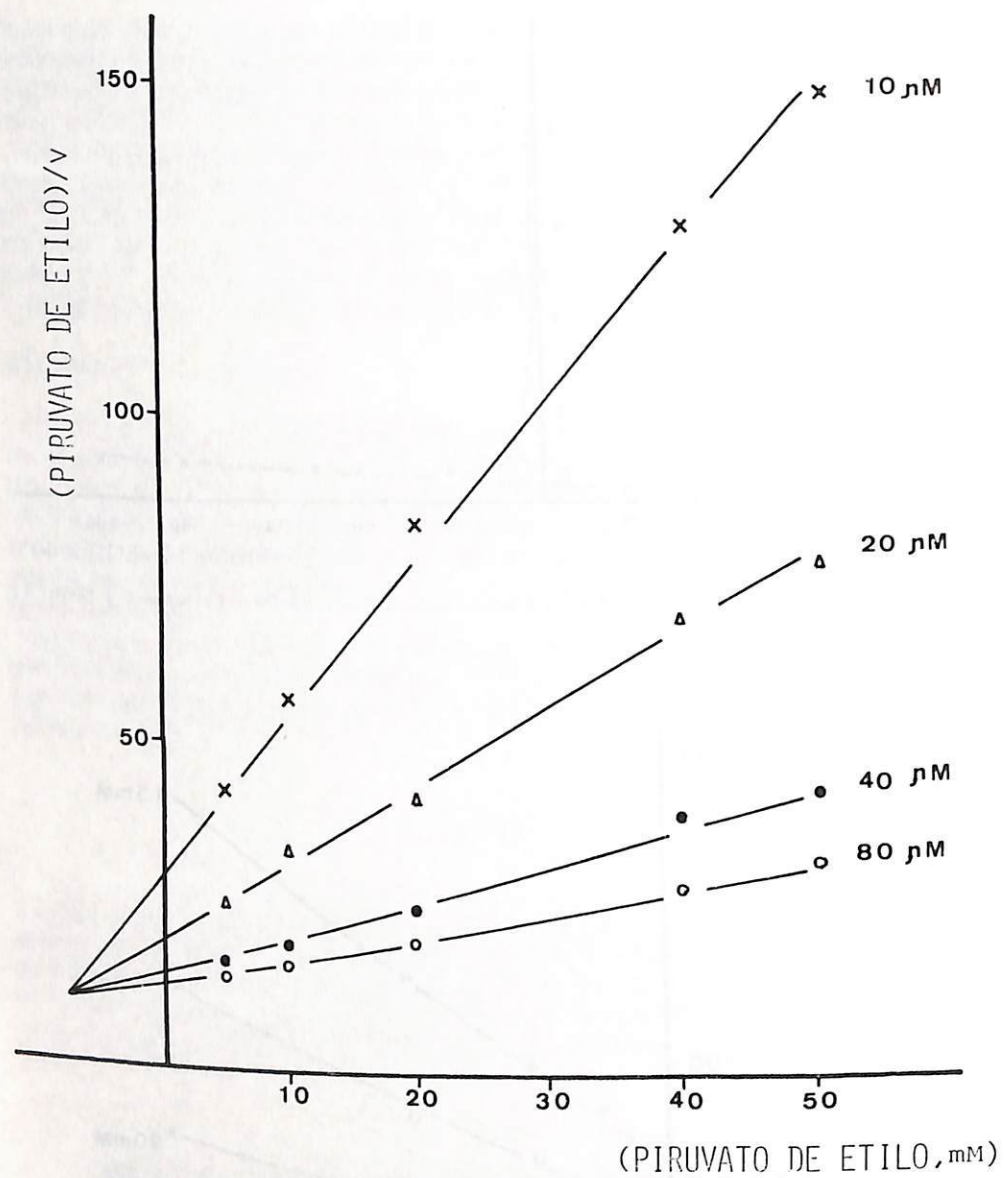


Fig. 3.- Inhibición por el lactato de etilo respecto al piruvato de etilo. Concentraciones de inhibidor, las indicadas en la gráfica; concentración de NADH, 0.2 mM.

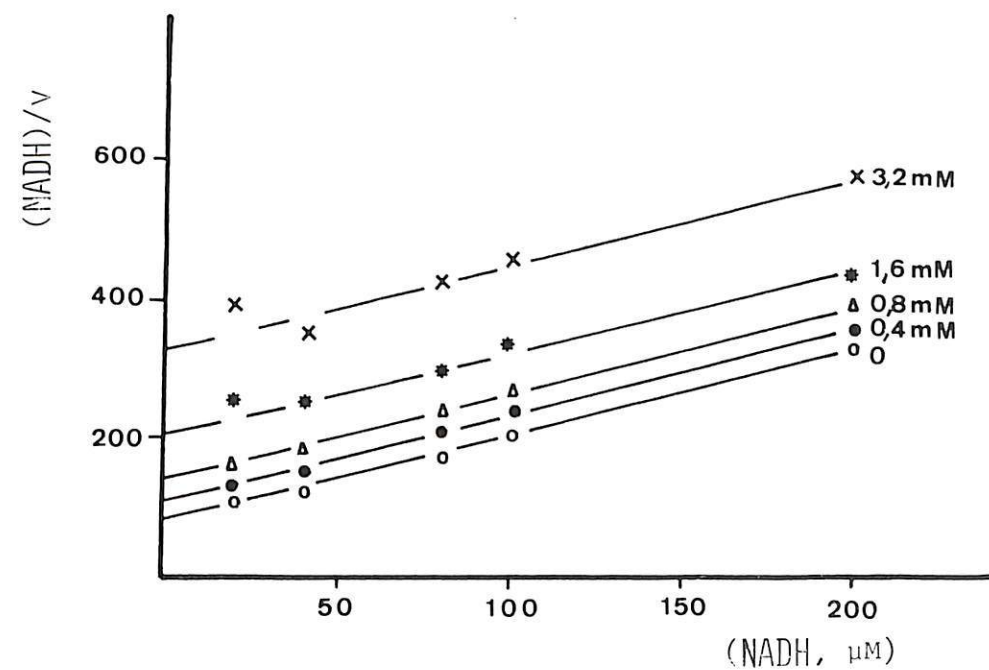


Fig. 4.- Inhibición por el NAD<sup>+</sup> respecto al NADH. Concentración de piruvato de etilo, 50 mM; las concentraciones de inhibidor se expresan en la gráfica.

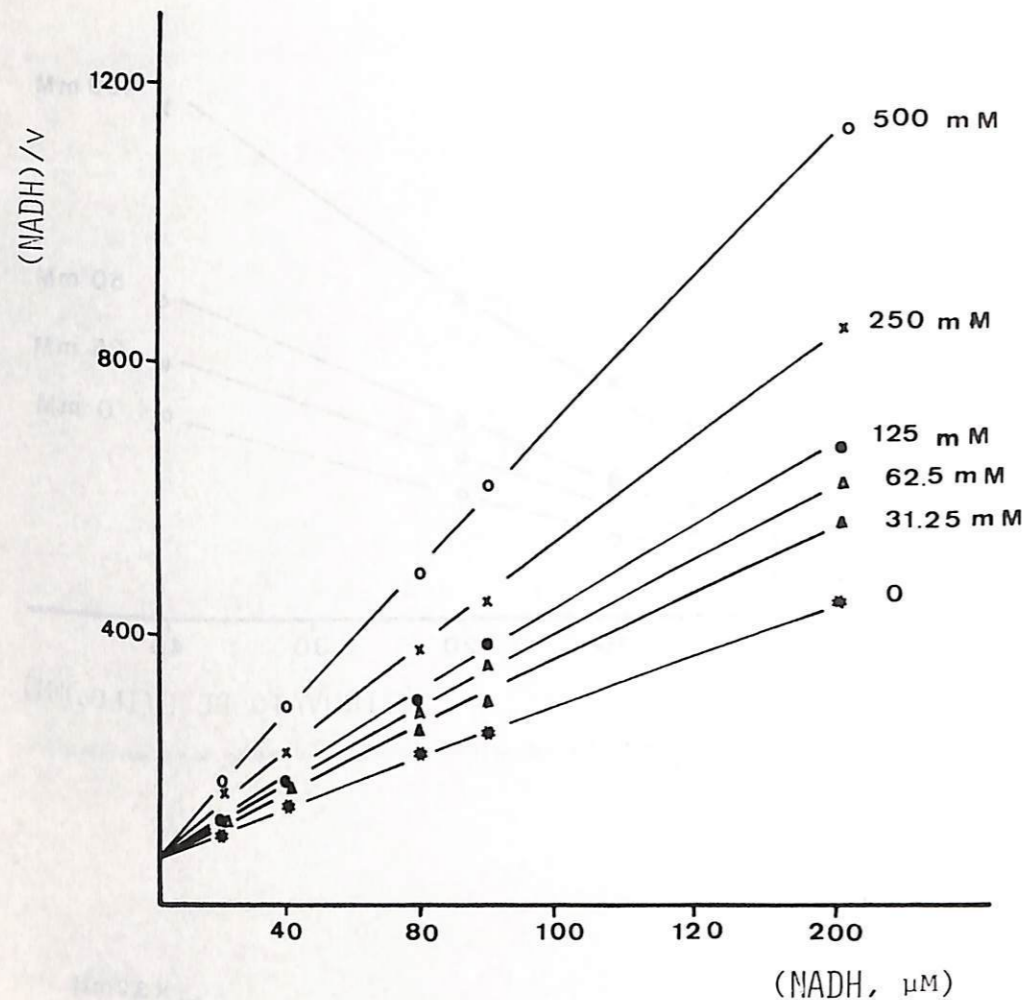


Fig. 5.- Inhibición por la acetona frente al NADH. Concentración de piruvato de etilo, 30 mM; las del inhibidor se indican en la gráfica.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) ATKINS, G.L.; NIMNO, I.A. (1975). A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem J.*, 149, 775-777.
- 2) BERNARDO, A.; GONZALEZ PRIETO, J. y MARTIN SARMIENTO, R. (1984). Further purification and characterization of diacetyl reductase from pigeon liver. *Int. J. Biochem.*, 16, 1.065-1.070.
- 3) 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.
- 4) CLELAND, W.W. (1963a). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: (I) nomenclature and rate equations. *Biochem. Biophys. Acta.*, 67, 104-137.
- 5) CLELAND, W.W. (1963b). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: (III) predictions of initial velocities and inhibition patterns by inspection. *Biochem. Biophys. Acta.*, 67, 188-196.
- 6) COMITE DE NOMENCLATURA DE LA I.U.B. (1984). *Enzyme Nomenclature, 1984*; p. 21. Academic Press, London.
- 7) GONZALEZ PRIETO, J.; MARTIN SARMIENTO, R. y BURGOS, J. (1983). Kinetics of  $\alpha$ -dicarbonyls reduction by L-glycol dehydrogenase from hen muscle. *Archs. Biochim. Biophys.*, 224, 372-377.
- 8) GONZALEZ PRIETO, J.; BERNARDO, A.; MARTIN SARMIENTO, R. y VIDAL, I. (1983).  $\alpha$ -dicarbonyl 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.
- 9) 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.
- 10) LARSEN, S.H. y STORMER, F.C. (1973). Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*. Kinetic mechanism and regulation by acetate of reversible reduction of acetoin to 2,3-butanediol. *Eur. J. Biochem.*, 34, 100-106.
- 11) LARSEN, S.H.; JOHANSEN, L. y STORMER, F.C. (1973). Formation of 2,3-pentanediol from 2,3-pentanedione and acetyllethylcarbinol by diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*, a possible new pathway. *FEBS Lett.*, 31, 39-41.
- 12) MAHLER, H.R. y CORDES, E.H. (1973). *Química biológica*, pp. 255-257. Ed. Omega, Barcelona.
- 13) 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.
- 14) STRECKER, H.J. y HARARY, I. (1954). Bacterial butyleneglycol dehydrogenase and diacetyl reductase. *J. Biol. Chem.*, 211, 263-270.
- 15) VIDAL, I. (1986). Enzimas reductoras de diacetilo en *Staphylococcus aureus*: Purificación, caracterización y estudios cinéticos. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid.
- 16) VOGEL, A. (1964). *Practical organic chemistry*, 3.<sup>a</sup> Ed. pp. 171-172. Longmans, London.