

## INHIBICION POR EL ETANOL DE LA ACTIVIDAD DIACETILO REDUCTASA CATALIZADA POR EL ENZIMA DE HIGADO DE TERNERA

*Por L. Herrero\*,  
R. Martín,  
J. Burgos,  
P. López Lorenzo\**

### INTRODUCCION

En investigaciones anteriores realizadas en el Laboratorio de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de León, se ha demostrado que la diacetilo reductasa de hígado de ternera cataliza la reducción del diacetilo a acetoína siguiendo un mecanismo cinético secuencial que obedece a la ecuación general de velocidad para reacciones bisubstrato de este tipo y, de entre los que cumplen estas condiciones, el patrón de inhibición por los productos deja como únicos posibles dos esquemas: El de Theorell-Chance y un sistema al azar de equilibrio rápido con dos complejos ternarios abortivos, enzima-NAD-diacetilo y enzima-NADH-acetoína (MARTÍN y BURGOS, 1972). Este último mecanismo es poco probable debido a los requisitos muy restrictivos que impone, pero existe siempre cierto grado de incertidumbre que conviene resolver al objeto de facilitar la interpretación de los datos obtenidos en experiencias tales como las de efectos del pH o la temperatura sobre la catálisis.

Para distinguir entre estos dos sistemas suele recurrirse a estudios de diálisis de equilibrio, intercambio isotópico o inhibición por compuestos que, sin ser aceptados como sustratos por el enzima, se parezcan lo bastante a éstos para interactuar específicamente con alguna de las formas enzimáticas participantes en la reacción. Los autores han preferido seguir el tercero de estos procedimientos por razones derivadas fundamentalmente de la disponibilidad de medios técnicos y preparaciones del grado de pureza necesario. Se han probado como inhibidores diversos alcoholes y cetonas, de los que sólo el etanol ha resultado lo bastante específico para ser útil en la diferenciación entre los mecanismos a discutir.

## MATERIALES Y METODOS

Las disoluciones de los reactivos se hicieron en agua bidestilada y desionizada. El diacetilo se obtuvo de la B. D. H., el NADH de Boehringer y el etanol, el fosfato bisódico y el monopotásico de Merck.

Como preparaciones enzimáticas se utilizaron liofilizados de la fracción que precipita entre 0,9 y 1,5 volúmenes de acetona, exentos de actividades butilénglicol deshidrogenasa y NADH oxidasa inespecífica; fueron obtenidos siguiendo el procedimiento descrito por BURGOS y MARTÍN (1972).

Las determinaciones de actividad inicial se llevaron a cabo a 25°C y pH óptimo (6,1), midiendo los cambios en la absorbancia a 340 nm. en un espectrofotómetro Beckman DBG7 provisto de registrador automático. Los análisis se efectuaron en cubetas de 1 cm. de paso de luz, siendo la mezcla de reacción (salvo indicación en sentido contrario): Preparación enzimática (conteniendo alrededor de 0,5 mgrs. de proteína), 0,5 mls.; tampón fosfato bisódico monopotásico de pH 6,1, 0,15 mmoles; diacetilo, 12  $\mu$  moles; NADH, 0,6  $\mu$  moles; volumen total, 3 mls.

## RESULTADOS

### *Incubación en presencia de etanol.*

A una preparación enzimática en solución acuosa, se añadió etanol hasta una concentración final de 0,35 M. La muestra fue incubada a 0-2°C durante 30 minutos, retirando periódicamente alícuotas para la determinación de actividad diacetilo reductasa. Los datos, expresados en términos de actividad por ml., se compararon con los de los ensayos de una preparación testigo idénticamente tratada excepto en lo que se refiere a la adición del inhibidor. Esta experiencia fue repetida con una concentración de etanol de 1 M. Los resultados obtenidos (Tabla 1) muestran que el efecto inhibitor es constante a lo largo del tiempo, dentro del error experimental.

TABLA 1

Efectos de la incubación en presencia de etanol sobre la actividad diacetilo reductasa

Tiempo de incubación (min.)	% sobre la actividad de los testigos	
	Expto. A*	Expto. B**
1	91,8	81,6
3	91,0	81,6
5	89,2	83,1
7	82,0	81,4
10	86,3	76,7
30	91,6	80,8

\* Incubación en etanol 0,35 M.

\*\* Incubación en etanol 1 M.

### *Experiencias de dilución.*

Se incubó una disolución de la preparación enzimática en etanol 0,35 M. durante 60 minutos a 0,2°C. Tras este período se analizó la actividad diacetilo reductasa en alícuotas de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 ml., con los resultados que se representan en la Fig. 1 (A). La Fig. 1 (B) recoge los datos obtenidos tras la incubación en etanol 1 M. En ninguno de los dos casos existe una relación lineal entre actividad y concentración de enzima, observándose mayor desviación de la linealidad cuanto mayor es el volumen de muestra utilizado.

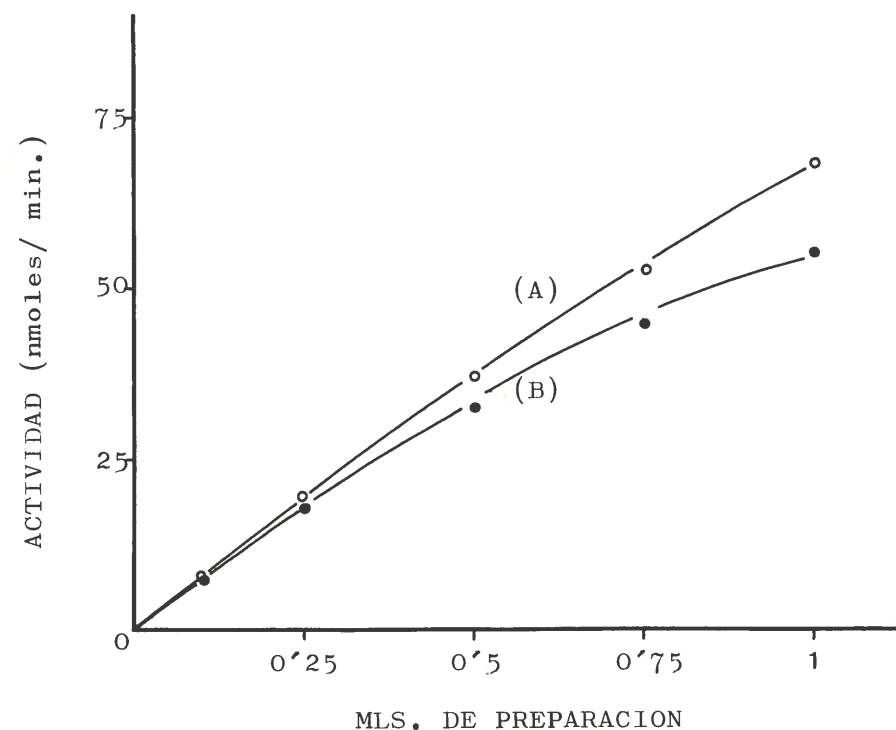


Fig. 1.—Efectos de la dilución sobre la inhibición de la actividad diacetilo reductasa por el etanol. (A): muestras incubadas en etanol 0,35 M. (B): muestras incubadas en etanol 1 M.

### *Estudio cinético.*

Con objeto de determinar el patrón de inhibición del etanol respecto al diacetilo, se realizaron diversos ensayos a concentraciones fijas de enzima, fijas y no saturantes de NADH (0,2 mM.; véase MARTÍN y BURGOS, 1972) y variables de diacetilo (entre 0,033 y 2 mM) y de inhibidor (entre 0 y 1 M). En la Fig. 2 (A) se han representado las inversas de las actividades enzimáticas en función de la concentra-

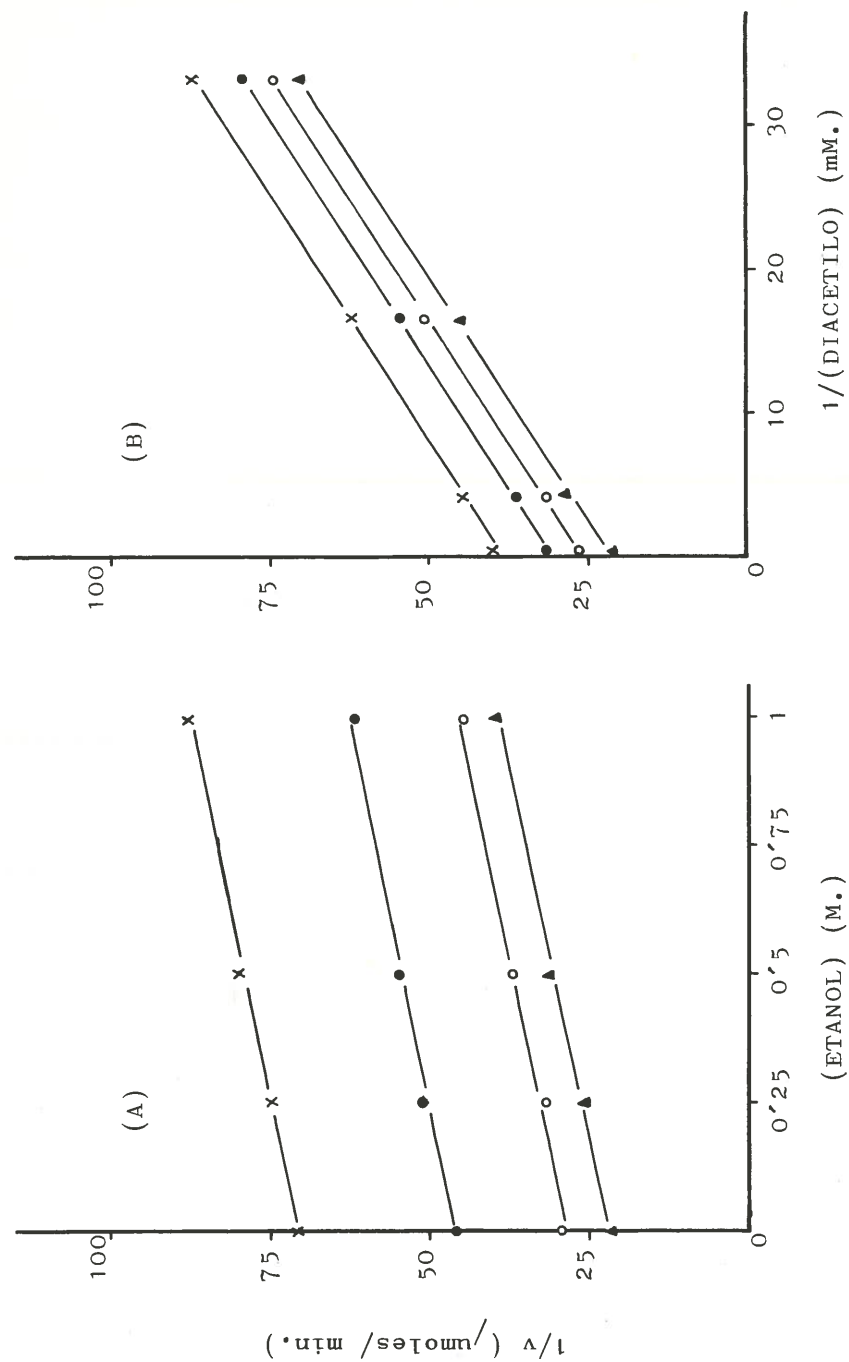


Fig. 2.—Inhibición respecto al diacetilo. Concentración de NADH: 0,2 mM. (A) Representación de  $1/v$  en función de (etanol); concentraciones de diacetilo (mM.):  $\blacktriangle$ , 1; 2; (O), 0,264; (●), 0,066; (X), 0,033. (B) Representación de  $1/v$  en función de  $1/(\text{diacetilo})$ ; concentraciones de etanol (M.):  $\blacktriangle$ , 1; (O), 0,25; (●), 0,5; (X), 1.

ción de etanol a que han sido obtenidas, dando una familia de rectas paralelas correspondientes cada una a una de las concentraciones de diacetilo empleadas. Las representaciones de la inversa de la velocidad en función de la inversa de la concentración de diacetilo dan también rectas paralelas, una para cada concentración de inhibidor (Fig. 2 B).

Los estudios de inhibición respecto al NADH se han llevado a cabo en condiciones de saturación con diacetilo (4 mM.; MARTÍN y BURGOS, 1972). Los análisis se efectuaron a concentración constante de enzima y variables de etanol (entre 0 y 1 M.) y de NADH (entre 0,05 y 0,4 mM.). Al representar los datos como la inversa de la actividad en función de la molaridad del inhibidor en el medio de ensayo (Fig. 3 A) se observa de nuevo una serie de rectas con la misma pendiente y distinto punto de corte con el eje de ordenadas, correspondientes a cada concentración de NADH utilizada. Del mismo modo (Fig. 3 B) las gráficas de  $1/v$  versus  $1/(\text{NADH})$  dan también rectas paralelas.

### DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran que, en nuestras condiciones experimentales, la inhibición por el etanol de la reacción diacetilo reductasa catalizada por el enzima de hígado de ternera es reversible y puede ser discutida aplicando las normas de Cleland (1963). La citada inhibición tiene carácter de incompetitiva respecto al diacetilo a concentraciones no saturantes de NADH lo que, de acuerdo con los criterios de CLELAND, demuestra que el etanol no se combina con la misma forma enzimática con la que lo hace el diacetilo ni con cualquier otra que preceda a ésta en la secuencia de reacción y esté conectada con ella por etapas reversibles. Si consideramos ahora los dos mecanismos en discusión, se deduce: (1) Que este patrón es consistente con un sistema al azar si se admite que el inhibidor no se fija al enzima libre ni al complejo binario E-NADH. (2) Concuera también con uno ordenado de Theorell-Chance siempre que (a) el diacetilo se fije al enzima libre y el etanol exclusivamente al complejo binario E-diacetilo; (b) el diacetilo se fije al enzima libre y el etanol exclusivamente al complejo binario enzima-segundo producto, en este caso E-acetoína; (c) que el diacetilo se fije al enzima libre y el etanol a E-diacetilo y E-acetoína simultaneamente; (d) que sea el NADH el primer substrato en interactuar con el enzima y el inhibidor lo haga con E-NAD.

Por otra parte, la inhibición respecto al NADH a concentración saturante de diacetilo es incompetitiva, lo que demuestra: (1) Que, si se considera un sistema al azar, el etanol tampoco se fija al complejo E-diacetilo. (2) Que, de tratarse de un mecanismo de Theorell-Chance, este tipo de inhibición: (a) es incompatible con un esquema en el cual el diacetilo fuese el primer substrato en fijarse al enzima y el etanol se añadiese únicamente al complejo E-diacetilo, puesto que en este caso debería ser competitiva; (b) es también incompatible con una fijación previa del diacetilo al enzima libre y una adición del inhibidor a E-diacetilo y E-acetoína,

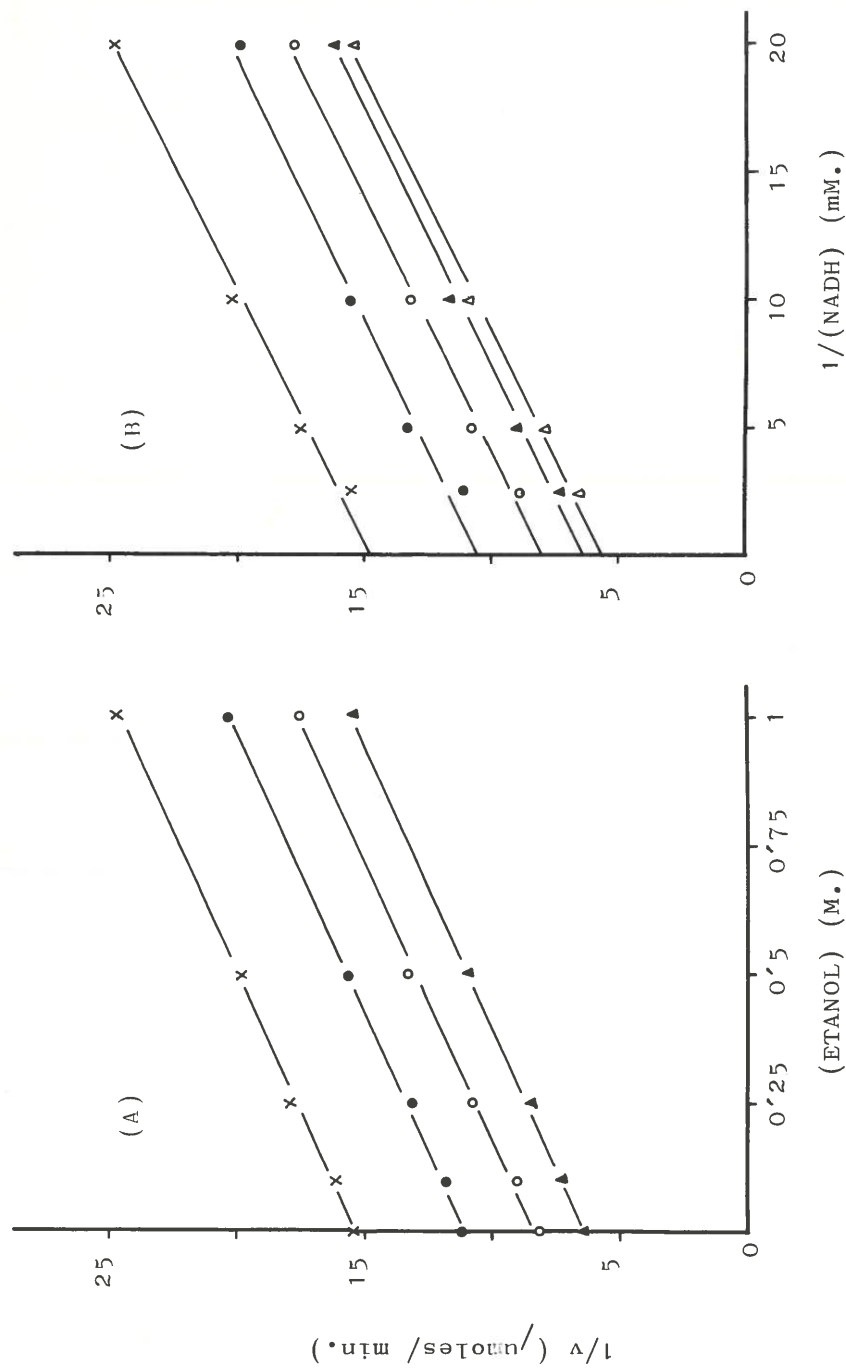


Fig. 3.—Inhibición respecto al NADH. Concentración de diacetilo: 4 mM. (A) Representación de  $1/v$  en función de (etanol); concentraciones de NADH (mM):  $\blacktriangle$ , 0.1;  $\circ$ , 0.05;  $\bullet$ , 0.025;  $\triangle$ , 0.01. (B) Representación de  $1/v$  en función de  $1/(\text{NADH})$ ; concentraciones de etanol (M.):  $\times$ , 1;  $\circ$ , 0.5;  $\bullet$ , 0.25;  $\triangle$ , 0.1.

que debería dar un patrón no competitivo; (c) concuerda, en cambio, con una interacción específica del inhibidor con el complejo enzima-segundo producto, sea éste el NAD o la acetoína.

Por tanto, si la reacción obedeciese al sistema al azar considerado el etanol tendría que fijarse al complejo E-NADH-diacetilo y no a las demás formas enzimáticas activas, una condición cuyo cumplimiento es poco más que una posibilidad teórica y que, añadida a los demás requisitos ya de por sí muy restrictivos impuestos por un esquema de esta clase con dos complejos ternarios de vía muerta, descarta definitivamente este mecanismo.

Queda pues como único posible un sistema de Theorell-Chance en el que, de acuerdo con nuestros resultados, el inhibidor establece interacción sólo con el complejo E-último producto. Teniendo en cuenta la anormalmente baja afinidad del enzima por la acetoína (MARTÍN y BURGOS, 1972) y las relaciones entre ésta y el etanol —subrayadas por el hecho de que el diacetilo, aunque pobremente, es aceptado como sustrato a reducir por la alcohol deshidrogenasa (véase JUNI y HEYM, 1957)— cabe postular que este último producto es, con toda probabilidad, el NAD. El mismo mecanismo sigue también la reacción diacetilo reductasa catalizada por las preparaciones de hígado de paloma (BURGOS y *col.*, 1974).

## RESUMEN

La inhibición por el etanol (hasta 1 M.) de la reducción del diacetilo catalizada por el enzima de hígado de ternera es reversible, acompetitiva para el diacetilo a concentración no saturante de NADH y acompetitiva para el NADH a concentración saturante de diacetilo. Este patrón de inhibición descarta que la reacción siga un sistema al azar y, junto con otros datos ya publicados, demuestra que obedece a un mecanismo de Theorell-Chance en el que el sustrato conductor es, con toda probabilidad, el coenzima.

## RESUME

L'inhibition par l'alcool éthylique jusqu'à 1 M de la réduction du diacétyl catalysée par l'enzyme de foi de veau est réversible, acompétitive par le diacétyl à une concentration non saturante de NADH et acompétitive pour le NADH à une concentration saturante de diacétyl. Ce standard d'inhibition écarte que la réaction suive un système au hasard et avec d'autres données déjà publiées démontre que cela obéit à un mécanisme de Theorell-Chance dans lequel le substrat conducteur est, très probablement, le coenzyme.

## SUMMARY

The inhibition by ethanol (up to 1 M.) of the diacetyl reduction catalyzed by the enzyme from beef liver is reversible, uncompetitive for diacetyl at unsaturating concentration of NADH and uncompetitive for NADH at saturating concentration of diacetyl. This inhibition pattern discards any random system and, with other results previously reported, proves that the reaction follows a Theorell-Chance mechanism the coenzyme being, most likely, the «leading» substrate.

## BIBLIOGRAFIA

- BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1972): *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 261-270.  
BURGOS, J., MARTÍN, R. y Díez, V. (1974): *Biochim. Biophys. Acta*, **364**, 9-16.  
CLELAND, W. W. (1963): *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 188-196.  
JUNI, E. y HEYM, G. (1957): *J. Bacteriol.*, **74**, 757-767.  
MARTÍN, R. y BURGOS, J. (1972): *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 13-18.