

**INHIBICION DE LA DIACETILO REDUCTASA DE HIGADO
DE BOVIDO POR EL ACETATO, UN POSIBLE MECANISMO
DE REGULACION DEL CICLO DEL BUTANODIOL**

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

INTRODUCCION

LARSEN y STØRMER (1973) han comprobado que el acetato inhibe la reacción butilenglicol deshidrogenasa catalizada por preparaciones enzimáticas de *Aerobacter aerogenes* compitiendo con el butilenglicol por el complejo E-NAD. Por otra parte, el citado enzima utiliza también el diacetilo (BRYN y colaboradores, 1971), siguiendo a tal objeto un mecanismo cinético de orden obligatorio en el que el NADH es el substrato conductor, según se deduce de los datos publicados por JOHANSEN y colaboradores (1973); en consecuencia, la reducción del diacetilo tiene lugar asimismo con la formación de E-NAD como etapa intermedia y debe esperarse que se encuentre igualmente inhibida por el acetato.

Se desconoce por el momento cuál es el significado biológico de este sistema de regulación de la actividad diacetilo-acetoína reductasa, aunque LARSEN y STØRMER sugieren que ello debe contribuir a incrementar la producción de butilenglicol y NAD en presencia de concentraciones altas de acetato. Sin embargo, es muy probable que juegue un papel importante en el metabolismo del diacetilo, la acetoína y el butilenglicol, puesto que el acetato es el producto resultante del ciclo de JUNI y HEYM (1956) y, junto con el acetaldehído (LOPEZ y colaboradores, 1975), de la escisión oxidativa directa de la acetoína las dos únicas vías de utilización de estos compuestos propuestas hasta ahora— a la vez que, por lo menos en algunos microorganismos, actúa como inductor de todos los enzimas que intervienen en la síntesis de butilenglicol a partir de piruvato con acetolactato como intermediario. Se consideró, por ello,

conveniente estudiar con mayor detalle las propiedades de la inhibición de la diacetilo reductasa de hígado de bóvido por el acetato, de la que ya se tenía constancia por algunos resultados previos.

MATERIAL Y METODOS

El diacetilo y el NADH se obtuvieron de las casas comerciales BDH y Boehringer, respectivamente; el acetato sódico y el potásico, de Merck.

Las determinaciones de actividad inicial se efectuaron siguiendo los cambios en E_{340} correspondientes a la oxidación del NADH a NAD en un espectrofotómetro Beckman DBGT ultratermostatado y provisto de registrador automático. Las mezclas de reacción en la cubeta muestra fueron: tampón fosfato bisódico-monopotásico pH 6,1, 0,15 mmoles; diacetilo y NADH, 12 y 0,6 micromoles, respectivamente, salvo indicación en contrario; preparación enzimática, unas 100 unidades; volumen total, 3 mls. Cubeta de referencia: agua destilada.

Las preparaciones enzimáticas se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito por BURGOS y MARTÍN (1972); se descartaron todas las partidas que no mostraron una relación lineal entre actividad y concentración de enzima en el rango de 10 a 150 unidades.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización del acetato como inhibidor reversible

En la Fig. 1 se recogen los resultados de las pruebas de linealidad entre actividad y concentración de enzima, efectuadas con preparaciones incubadas durante 30 minutos a 0-2°C en (a) agua destilada, (b) acetato sódico 50 mM y (c) acetato sódico 100 mM. La gráfica es lineal en el caso de los testigos incubados en agua destilada, pero no así en las preparaciones que contienen acetato, con una mayor desviación cuanto mayor es el volumen de muestra utilizado y cuanto mayor es la concentración de acetato en la muestra. Este comportamiento es el que cabe esperar de una inhibición reversible.

Por otra parte, las determinaciones de actividad diacetilo reductasa en preparaciones incubadas a 0-2°C en acetato sódico 100 mM y 50 mM, dieron los siguientes resultados expresados en porcentajes de inhibición respecto a los testigos incubados en presencia de acetato: (a) incubación en acetato 100 mM: 42,8 % a los 10 minutos, 41 % a los 20 minutos y 43,2 % al cabo de 30 minutos; (b) incubación en acetato 50 mM: 34 % a los 10 minutos, 37,4 % a los 20 minutos y 33,5 % a los 30 minutos. La incubación en acetato potásico da valores similares. Como puede observarse, los porcentajes de inhibición son,

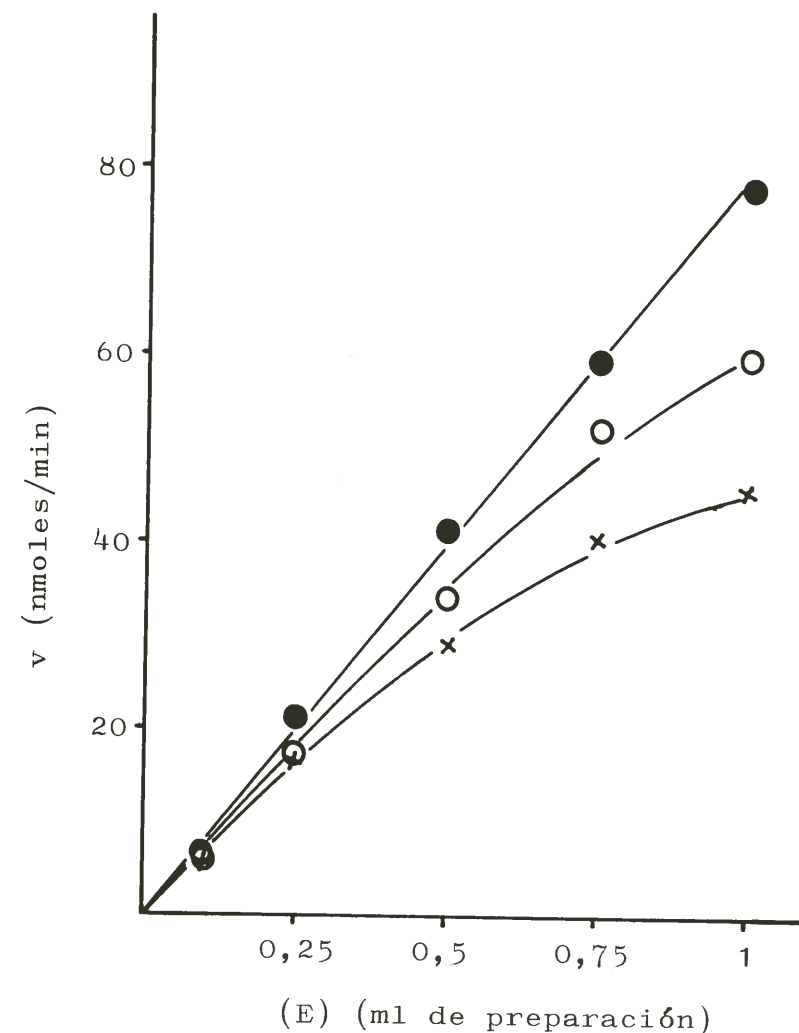


Fig. 1.—Gráficas de linealidad entre actividad y concentración de enzima: (●-●), testigos incubados en ausencia de inhibidor; (O-O), muestras incubadas en acetato sódico 50 mM; (X-X), muestras incubadas en acetato sódico 100 mM.

dentro del error experimental, constantes a lo largo del tiempo, lo que confirma que el acetato actúa como inhibidor reversible.

Mecanismo de inhibición

El patrón de inhibición por los productos de la reducción del diacetilo catalizada por el enzima aquí estudiado (MARTÍN y BURGOS, 1972) deja como únicos mecanismos de reacción posibles al de Theorell-Chance y a uno al azar

de equilibrio rápido con dos complejos ternarios abortivos; dadas las características de la inhibición por el etanol (HERRERO y colaboradores, 1974) cabe descartar los sistemas al azar, por lo que los resultados serán discutidos admitiendo que la reacción sigue el primero de estos mecanismos.

Las representaciones de la inversa de la actividad diacetilo reductasa en función de la inversa de la concentración de NADH (en el rango de 0,05-0,4 mM) a concentración fija saturante de diacetilo (4 mM; $K_r^{\text{diacetilo}} = 3,98 \times 10^{-5}$ M, $K_s^{\text{diacetilo}} = 1,22 \times 10^{-4}$ M. Véase MARTÍN y BURGOS, 1972) y variables de acetato sódico entre 0-100 mM, dan líneas rectas, una para cada concentración de inhibidor, que se cortan a la izquierda del eje de ordenadas (Fig. 2)

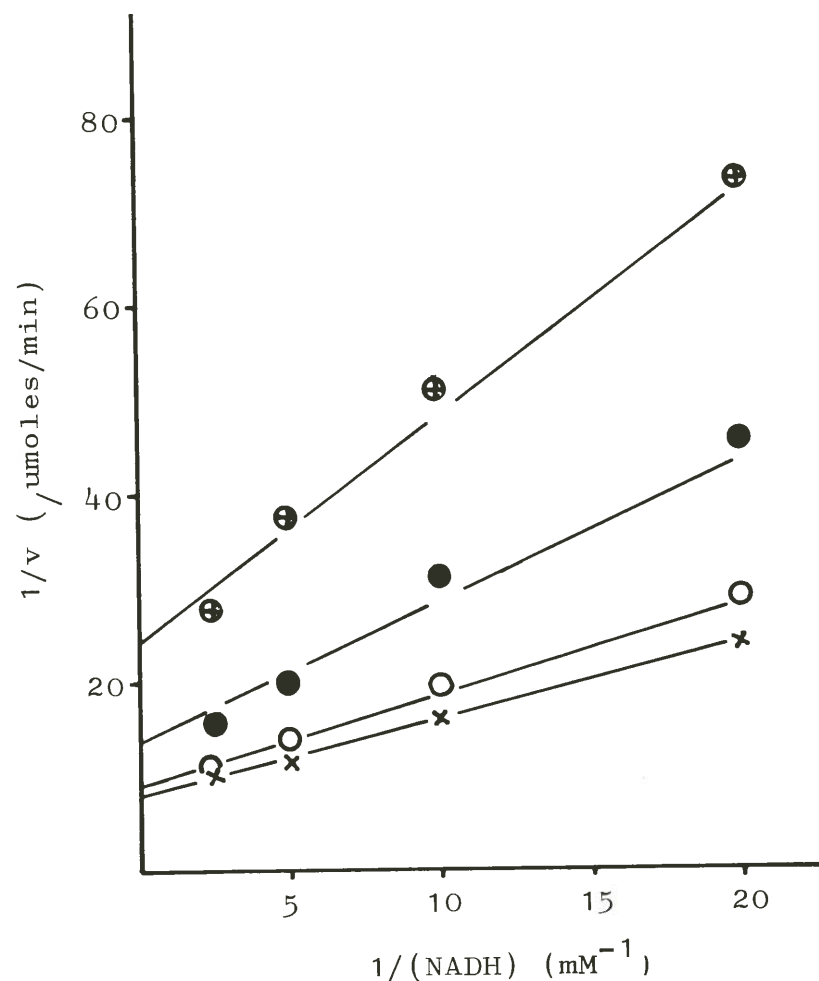


Fig. 2.—Inhibición respecto al NADH: representación primaria de la inversa de la actividad en función de la inversa de la concentración de NADH. Concentración de diacetilo, 4 mM. Concentración de acetato: (⊗-⊗), 100 mM; (●-●), 25 mM; (O-O), 5 mM; (X-X), cero.

poniendo de manifiesto que la inhibición es nocompetitiva respecto al NADH. En la Fig. 3 se representa $1/v$ en función de la inversa de la concentración de diacetilo (de 0,066 a 2 mM) a concentración fija no saturante de NADH (0,2 mM; $K_m^{\text{NADH}} = 0,1$ mM, $K_s^{\text{NADH}} = 0,312$ mM, según datos de MARTÍN y BURGOS, 1972) y variable de acetato en el rango 0-100 mM, que da asimismo una familia de rectas cuyo punto de intersección está situado a la izquierda del eje de ordenadas, mostrando que la inhibición es también nocompetitiva para el

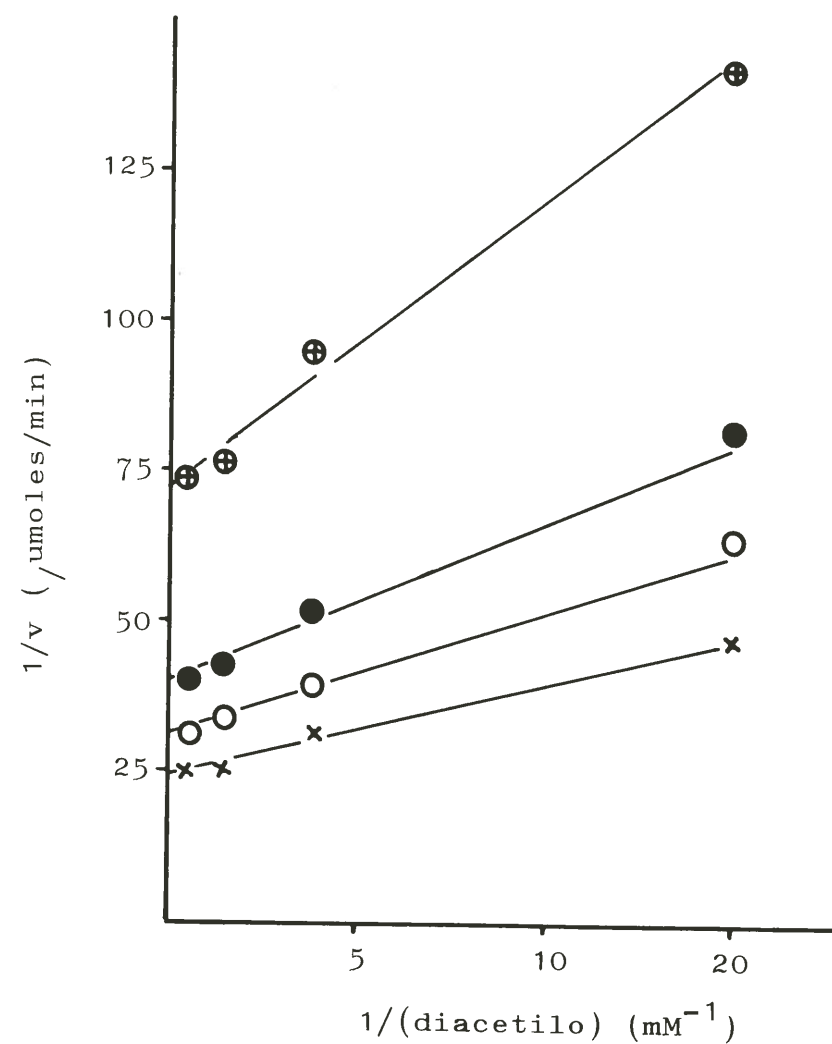


Fig. 3.—Inhibición respecto al diacetilo: representación primaria de la inversa de la actividad en función de la inversa de la concentración de diacetilo. Concentración de NADH, 0,2 mM. Concentración de acetato (mM): (⊗-⊗), 100; (●-●), 25; (O-O), 5; (X-X), cero.

diacetilo. Al representar (Fig. 4) las pendientes y los cortes en el eje de ordenadas de las Figs. 2 y 3 en función de la concentración de inhibidor, se obtienen nuevamente líneas rectas. Así pues, tanto las representaciones primarias como las secundarias son lineales, lo que indica que no se forman complejos EI₂ (para detalles sobre nomenclatura, véase CLELAND, 1963a).

El acetato no puede ser producto de una reacción de reducción como la aquí estudiada y, en consecuencia, será considerado inhibidor de vía muerta en la discusión que sigue. Para este tipo de inhibición, en un mecanismo de Theorell-Chance pueden darse los patrones que figuran en la Tabla 1, de la que se deduce que las características de la inhibición por el acetato sólo son concordantes con dos de los siete sistemas posibles: (a) su fijación al enzima libre y al complejo EQ, siempre que el primer sustrato en fijarse al enzima sea el NADH y el último producto en disociarse el NAD, lo cual parece lo más probable en vista de los datos publicados por HERRERO y colaboradores (1974) respecto a la inhibición por el etanol; y (b) su fijación a todas las formas del enzima que participan en la reacción (E, EA y EQ) independientemente de si el sustrato conductor es el diacetilo o el coenzima.

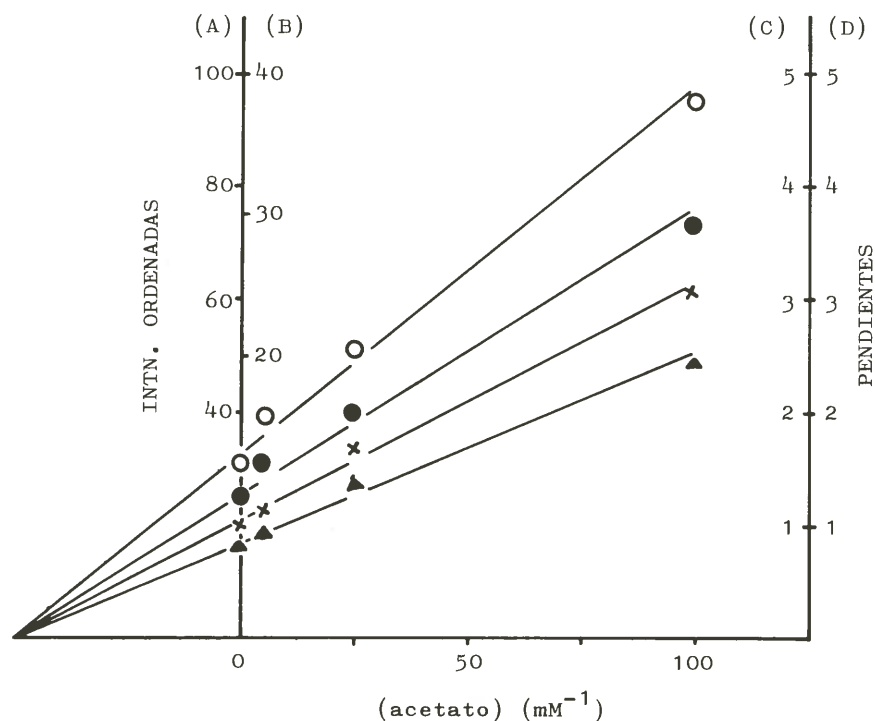


Fig. 4.—Representaciones secundarias en función de la concentración de inhibidor: (●-●), escala A, cortes en ordenadas de la Fig. 3; (X-X), escala B, cortes en ordenadas de la Fig. 2; (▲-▲), escala C, pendientes de la Fig. 2; (O-O), escala D, pendientes de la Fig. 3.

TABLE 1
Patrones de inhibición de vía muerta para el mecanismo de Theorell-Chance, según las normas de CLELAND (1963b)

Formas del enzima con que reacciona el inhibidor	TIPO DE INHIBICION			
	Sustrato variable A		Sustrato variable B	
	B saturante	B no saturante	A saturante	A no saturante
E	C	C	(-)	NC
EA	(-)	AC	C	C
EQ	AC	AC	AC	AC
E y EA	C	NC	C	NC
E y EQ	NC	NC	AC	NC
EA y EQ	AC	AC	NC	NC
E, EA y EQ	NC	NC	NC	NC

Abreviaturas: E, enzima libre; EA, complejo enzima-primer sustrato; EQ, complejo enzima-último producto; C, inhibición competitiva; NC, no competitiva; AC, acompetitiva; (-), no hay inhibición.

El mejor modo de distinguir entre estas dos posibilidades hubiera sido estudiar la inhibición a concentración saturante de NADH, que debería ser acompetitiva en el primer caso y no competitiva en el segundo, pero no ha sido posible debido a dificultades derivadas, en parte, de limitaciones instrumentales y, en parte, del sistema de análisis. Sin embargo, los resultados obtenidos permiten hacer algunas consideraciones para aclarar este problema:

La ecuación de velocidad en ausencia de productos para un mecanismo de Theorell-Chance que incluya la fijación de un inhibidor de vía muerta al enzima libre y al complejo EQ, puede expresarse del siguiente modo:

$$v = \frac{V}{1 \left(\frac{1 + (I)}{K_{IEQ}} \right) + \frac{K_m^a}{(A)} \left(\frac{1 + (I)}{K_{EI}} \right) + \frac{K_m^b}{(B)} + \frac{K_s^a K_m^b}{(A)(B)} \left(\frac{1 + (I)}{K_{EI}} \right)}$$

en la que (I), (A) y (B) expresan las concentraciones de inhibidor, del sustrato «A» y del sustrato «B», K_{IEQ} la constante de inhibición para la fijación del inhibidor al complejo EQ y K_{EI} la misma constante referida al equilibrio E + I = EI. Esta ecuación predice que el punto de intersección en abscisas de las representaciones secundarias de las pendientes de la Fig. 2 en función de (I) será igual a -K_{EI} y que las representaciones de las pendientes de la Fig. 3 versus (I) cortarán el eje de abscisas en -K_{EI} $\left(\frac{1 + (A)}{K_s^a} \right)$;

dando a K_s el valor de 0,312 mM calculado por MARTÍN y BURGOS (1972) y puesto que la concentración de NADH utilizado fue 0,2 mM, la intersección en el eje horizontal de la segunda gráfica debería ser 2,56 veces mayor que la primera cuando, por el contrario,

son sensiblemente idénticas (Fig. 4). Aunque este tipo de cálculos están sujetos a errores importantes, es poco probable que llegasen a suponer un 256 %.

Además, las representaciones secundarias de los cortes en ordenadas de las Figs. 2 y 3 en función de la concentración de inhibidor convergen también en un mismo punto sobre el eje de abscisas (Fig. 4), demostrando que la fijación del NAD no afecta a la afinidad del acetato por el enzima; en cambio, en el sistema que está siendo discutido se parte de la base de que la adición del NADH la modifica drásticamente, hasta el punto de impedir la fijación del inhibidor. Teniendo en cuenta que el supuesto de que el acetato no reacciona con E-NADH y sí con E y E-NAD exige que el substrato conductor sea el coenzima, resulta muy difícil dar una explicación razonable a estos resultados en términos de tal esquema.

Se propone, por tanto, que el acetato interacciona con todas las formas enzimáticas que participan en la reacción, sin que la fijación de ninguno de los coenzimas afecte a su afinidad, es decir, siendo $K_{IE} = K_{IEA} = K_{IEQ}$ como se deduce del examen de la Fig. 4.

Constantes de inhibición y papel biológico

Puesto que todas las representaciones secundarias cortan el eje de abscisas en el mismo punto, la constante de inhibición viene dada por el valor negativo de dicho punto, 50 mM. Esta cifra es muy superior a la concentración de acetato que cabe esperar normalmente en los tejidos animales (véase BERGMAYER, 1974), lo que representa que el enzima sólo es inhibido cuando la acumulación de aquél alcanza niveles mucho más altos que los habituales. Puesto que la reducción del diacetilo a acetoína constituye un paso alternativo en la producción de butilén glicol, no parece lógico que la inhibición por el acetato cumpla el papel sugerido por LARSEN y STØRMER para la de la diacetilo-acetoína reductasa de *A. aerogenes*, facilitar la síntesis del citado glicol a concentraciones elevadas del inhibidor; por el contrario, debería operar en sentido opuesto.

Por lo que se conoce hasta el momento acerca del metabolismo del diacetilo, no es imaginable qué ventaja biológica puede derivarse de inhibir su reducción cuando aumenta la concentración de acetato. Sin embargo, en un mecanismo de Theorell-Chance como el que sigue esta reacción participan las mismas formas enzimáticas en el sentido directo que en el inverso incluso en ausencia de productos y, por tanto, el acetato deberá frenar por el mismo mecanismo y con las mismas constantes de inhibición la oxidación de la acetoína a diacetilo que la reducción de éste a aquella. El control por el acetato de la diacetilo reductasa podría, pues, estar relacionado con el funcionamiento de la reacción en la dirección inversa. A este respecto es interesante

mencionar que el ciclo del butilén glicol propuesto por JUNI y HEYM (1956) se inicia con la oxidación del butilén glicol a acetoína y de ésta a diacetilo, el cual da lugar a diacetilmetilcarbinol más acetato en una reacción catalizada por la diacetilmetilcarbinol sintasa.

La posibilidad de que la diacetilo reductasa catalice la oxidación de la acetoína «in vivo» tiene muy poco crédito (entre otros muchos, dos de los autores de este trabajo han opinado en sentido contrario; véase DIEZ y colaboradores, 1974). No obstante, nuestros resultados indican que la inhibición por el acetato puede representar un mecanismo de regulación destinado a impedir que un funcionamiento demasiado rápido de las tres primeras etapas del ciclo del butilén glicol de lugar a un incremento peligroso en la concentración del inhibidor. En un sentido estricto no hay reacciones irreversibles; es cierto que sólo excepcionalmente ha podido demostrarse la formación de diacetilo a partir de acetoína en experiencias *in vivo*, e incluso en estos raros casos no consta que se haya debido a la actuación de la diacetilo reductasa, pero el equilibrio termodinámico de la reacción es muy favorable al sentido contrario y casi todos los métodos de determinación de diacetilo resultan comparativamente poco sensibles (excepto los mejores de cromatografía de gases con detector de captura electrónica que, en lo que conocen los autores, no han sido aplicados a estos fines) con lo que, si la reacción diacetilmetilcarbinol sintasa fuese mucho más rápida que la acetoína deshidrogenasa, podría estar produciéndose diacetilo a un ritmo alto sin que su concentración fuese detectable. De confirmarse este supuesto en futuras investigaciones, la etapa limitante de la velocidad de producción de acetato sería la oxidación de la acetoína a diacetilo y, por tanto, es justamente ésta, y no la diacetilmetilcarbinol sintasa, la que habría de ser controlada.

RESUMEN

El acetato inhibe la reacción catalizada por la diacetilo reductasa de hígado de bóvido por fijación al enzima libre, a EQ y, con un escaso nivel de incertidumbre, a EA. Esta inhibición podría representar un mecanismo de regulación para controlar la producción de acetato por las tres primeras etapas del ciclo del butilén glicol.

RÉSUMÉ

L'acétate inhibe la réaction catalysée par la diacétyl-reductase de foie de bovin par fixation à l'enzyme libre, à EQ et, très probablement, à EA. Cette inhibition pourrait représenter un mécanisme de régulation pour contrôler la production d'acétate par les trois premières étapes du cycle de butylenglycol.

SUMMARY

Acetate inhibits the diacetyl reductase reaction catalyzed by the beef liver enzyme by addition to the free enzyme, EQ and, almost certainly, to EA. This inhibition could represent a regulation mechanism to control acetate production by the first three steps of the butyleneglycol cycle.

BIBLIOGRAFIA

- BIRGMAYER, H. U. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie Academic Press, N. Y., 2ª ed., vol. IV, pág. 2.293.
- BRYN, K., HILFAND, O. y STØRMER, F. C. (1971). *Eur. J. Biochem.*, **18**, 116.
- BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 261.
- CHIFFAND, W. W. (1963a). *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 173.
- CHIFFAND, W. W. (1963b). *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 188.
- DÍZ, V., BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 253.
- HERRERO, L., MARTÍN, R., BURGOS, J. y LOPEZ LORENZO, P. (1974). *An. Fac. Vet. León*, **20**, 405.
- JOHANSEN, L., LARSEN, S. H. y STØRMER, F. C. (1973). *Eur. J. Biochem.*, **34**, 97.
- JUNI, E. y HEYM, G. (1956). *J. Bacteriol.*, **71**, 425.
- LARSEN, S. H. y STØRMER, F. C. (1973). *Eur. J. Biochem.*, **34**, 100.
- LOPEZ, J. M., THOMAS, B. y REIBLIN, H. (1975). *Eur. J. Biochem.*, **57**, 425.
- MARTÍN, R. y BURGOS, J. (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 13.