

Departamento de Fisiología y Bioquímica C.S.I.C.
Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona

Acción de un compuesto de amonio cuaternario sobre la reacción hexoquinásica en relación con su efecto sobre la absorción de glucosa en la levadura

por

J. M. Llinás,* R. Parés-Farrás y F. Ponz

(Recibido para publicar el 13 de abril de 1963)

El uranilo no afecta a la respiración endógena de la levadura (5) y tampoco modifica la fermentación alcohólica endógena espontánea (2), ni la fermentación alcohólica endógena inducida por el 2,4-dinitrofenol o la azida (5). ROTHSTEIN y HURWITZ utilizaron estos hechos para confirmar que la inhibición de la utilización aeróbica y anaeróbica de la glucosa por el uranilo en la levadura de pan, era debida a una acción específica sobre el transporte del azúcar a través de la membrana celular (6).

PARÉS-FARRÁS (3) estableció un método para determinar la acción de inhibidores sobre el transporte de glucosa en la levadura de pan, comparando el efecto de los mismos sobre la fermentación exógena y endógena en condiciones de trabajo homogéneas. Si se reduce la absorción sin alterar el metabolismo endógeno, la acción de la sustancia inhibidora, a la concentración exterior considerada, se atribuye a una acción sobre el transporte.

PARÉS-FARRÁS (3,4) encontró algunas sustancias que actuaban exclusivamente sobre la fermentación exógena hasta cierto nivel de concentración, por encima del cual inhibían también a la fermentación endógena. El cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio y otros com-

* Con una beca para investigación de la Comisaría General de Protección Escolar.

puestos de amonio cuaternario mostraron este tipo de comportamiento. El hecho de que puedan llegar a inhibir la fermentación endógena pone de manifiesto que penetran dentro de la célula de levadura. En este caso, a las concentraciones en las que sólo se inhibe la fermentación exógena pueden ser afectados el paso a través de la membrana celular o la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato, los dos únicos procesos que no se hallan comprendidos en la fermentación endógena.

Para las sustancias inhibidoras que se comportan como los compuestos de amonio cuaternario que acabamos de referir, la posible acción sobre el paso de glucosa a través de la membrana sólo puede dilucidarse con una determinación complementaria del efecto de la sustancia inhibidora sobre la reacción hexoquinásica. En el presente trabajo se discute la acción del cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio a través de sus efectos sobre la fosforilación de la glucosa *in vitro* por hexoquinasa de levadura.

Material y métodos

1. *Compuesto de amonio cuaternario.*

Cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio (P.M. 464,5). Romh and Haas Co. Sólido, cristalino, blanco. Humedad 4 %. Exento de metales pesados.

2. *ATP.*

Adenosintrifosfato Light Co. El fósforo lábil, después de hidrólisis en ClH 1N durante 15 minutos a 100°, presenta una relación 2: 3 con relación al fósforo orgánico total. Las determinaciones de fósforo inorgánico se han efectuado de acuerdo con el método de FISKE y SUBBAROW (1).

3. *Hexoquinasa de levadura.*

Hexoquinasa de levadura tipo II de Sygma, con una actividad de 50.000 unidades Kunitz-McDonald por gramo.

4. *Determinación de la actividad hexoquinásica.*

Se lleva a cabo por determinación colorimétrica de la glucosa desaparecida por fosforilación. Mezclas de reacción de 2 ml con las cantidades de ATP, Mg^{++} (añadido en forma de cloruro), glucosa y preparado enzimático indicadas en los cuadros de re-

sultados. La mitad del volumen de la mezcla de reacción se incorpora con solución de glucosa en tampón fosfato 0,03 M a pH 7,5, con o sin el inhibidor.

La reacción enzimática se deja transcurrir durante 15 minutos a 30° C, interrumpiéndose por desproteización con 3 ml de Ba (OH)₂ 0,3 N y 3 ml de SO₄ Zn 0,3 N. Además de la proteína presente, el precipitado producido retiene todo el glucosafosfato formado. En una parte alícuota de los sobrenadantes se determina la glucosa residual por el método de SOMOGYI (7). Como blanco, sin acción enzimática, la solución de hexoquinasa de la levadura se añade después de la mezcla desproteizante.

La glucosa desaparecida corresponde a la diferencia entre la hallada en los blancos y la que se encuentra en los ensayos en los que se permite la acción de la enzima. Los porcentajes de inhibición se obtienen en todos los casos por referencia a una serie paralela de ensayos, verificada simultáneamente en ausencia de amonio cuaternario.

Resultados

1. Inhibición de la reacción hexoquinásica por el cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio.

En el cuadro I se consignan las inhibiciones de la reacción hexoquinásica a distintas concentraciones del compuesto de amonio cuaternario, y a 2 concentraciones de ATP-Mg.

En las condiciones de reacción consignadas en el cuadro I la concentración mínima del compuesto de amonio cuaternario con efecto inhibitor se halla comprendida entre 2×10^{-4} M y

CUADRO I

Inhibición de la reacción hexoquinásica por el cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio. Concentración inicial de glucosa en el medio de reacción $1,1 \times 10^{-3}$ M. Concentración de hexoquinasa (tipo II Sygma) 0,3 mg/ml.

Concentración de amonio cuaternario	Concentración de ATP-Mg	Inhibición %
10^{-5} M	$1,25 \times 10^{-3}$ M	0
2×10^{-4} M	"	45
5×10^{-4} M	"	88
6×10^{-4} M	"	93
10^{-3} M	"	100
2×10^{-4} M	$2,5 \times 10^{-3}$ M	38
5×10^{-4} M	"	79

10^{-3} M. La inhibición es del 100 % para concentraciones superiores a 6×10^{-4} M.

Al doblar la concentración de ATP-Mg en el medio de reacción se reduce la inhibición, si bien en una proporción relativamente pequeña (cuadro I).

2. Efecto del compuesto de amonio cuaternario sobre el ATP

El ATP puede fijar una o varias moléculas de amonio cuaternario. Se desconoce la solubilidad de estos productos, pero al adicionar una solución de amonio cuaternario a otra de ATP se produce un precipitado aparente.

CUADRO II

Efecto del cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio sobre el título de fósforo lábil de una solución de ATP 2×10^{-3} M.

Concentración de amonio cuaternario	Fósforo lábil residual (mg/ml)
1×10^{-3} M	0,04
2×10^{-3} M	0,04
4×10^{-3} M	0,03
	0,01

Se ha determinado el ATP residual atendiendo al título de fósforo lábil, después de la adición de distintas cantidades de amonio cuaternario a una solución de ATP 10^{-3} M. Después de centrifugar se trata el sobrenadante con un exceso de solución de laurilsulfato 6×10^{-2} M para precipitar cuantitativamente el amonio cuaternario residual. Se centrifuga y se determina el ATP en el sobrenadante.

Los resultados obtenidos se consignan en el cuadro II. Puede observarse que, a partir de concentraciones de amonio cuaternario mitad de las de ATP, la cantidad de fósforo lábil residual permanece inalterada.

Discusión

La concentración de ATP-Mg es sólo ligeramente superior a la de glucosa. Si la inhibición de un 88 % fuera debida a bloqueo de ATP por el compuesto de amonio cuaternario, doblando la cantidad de ATP-Mg y manteniendo la misma concentración de amonio cuaternario, la inhibición debería des-

aparecer o disminuir considerablemente. Como se muestra en el cuadro I, al doblar la concentración de ATP-Mg los valores de inhibición disminuyen relativamente poco. Esto lleva a pensar que, si bien existe una interacción ATP-amonio cuaternario, la inhibición de la reacción enzimática se debe al efecto sobre la hexoquinasa.

El supuesto de que el amonio cuaternario inhibe a la hexoquinasa a las concentraciones estudiadas parece confirmarse por el hecho de que el fósforo lábil de las mezclas de reacción no disminuye por efecto del amonio cuaternario cuando la concentración de este último no sobrepasa la mitad de la de ATP (cuadro II). Una concentración de amonio cuaternario de 5×10^{-4} M inhibe el 88 % de la reacción hexoquinásica en un medio de reacción donde la concentración de ATP es $1,25 \times 10^{-3}$ M, esto es, más del doble de la de amonio cuaternario (cuadro I).

La utilización de glucosa exterior por la levadura de pan en condiciones anaeróbicas es inhibida por el cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio, a partir de concentraciones en el medio exterior del orden de 4×10^{-5} M (3). Esta inhibición llega a ser total para concentraciones del orden de 25×10^{-5} M.

La fermentación endógena espontánea no empieza a ser inhibida hasta concentraciones de amonio cuaternario del orden últimamente señalado y sólo se suprime para valores de 110×10^{-5} M (3).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la reacción hexoquinásica puede ser inhibida *in vitro* por el referido compuesto de amonio cuaternario, a partir de concentraciones del orden de 20×10^{-5} M, esto es, análogas a las que inhiben el metabolismo endógeno. Sin embargo, se llega a inhibir totalmente para valores aproximadamente mitad de los necesarios para inhibir totalmente el metabolismo endógeno.

Los hechos anteriores sugieren que la reacción hexoquinásica *in vitro* no es más sensible al compuesto de amonio cuaternario que el metabolismo endógeno y que, por lo tanto, la mayor sensibilidad de la utilización de glucosa exterior por la levadura se debe realmente a la inhibición del paso de glucosa a través de la membrana celular, previo a su fosforilación.

Parece evidente que las reacciones hexoquinásicas *in vitro* e *in vivo*, tal como se han llevado a cabo, no admitan comparaciones rigurosas. Sin embargo, la conclusión propuesta en el párrafo anterior queda singularmente reforzada por este mismo hecho. En efecto, se ha supuesto que la concentración de amonio cuaternario exterior sería igual a la endocelular, lo cual es alta-

mente improbable teniendo en cuenta que el amonio cuaternario se fija sobre las células de la levadura de acuerdo con una típica curva de absorción. PARÉS-FARRÁS (4) pudo mostrar que, por debajo del nivel de saturación, la cantidad de inhibidor que penetra en la célula debe ser muy pequeña frente a la que se fija sobre la membrana celular.

Una concentración de amonio cuaternario de 2×10^{-4} M inhibe cerca del 50 % de la reacción hexoquinásica *in vitro*. Una concentración exterior de amonio cuaternario de este orden supone que las células de levadura han fijado 1×10^{-5} mols/ml de levadura (4). Aún si admitiéramos que todo este amonio cuaternario hubiera penetrado en la levadura, la concentración endocelular sería del orden de 10^{-8} M, esto es, una concentración más de mil veces más pequeña de la que ha resultado capaz de inhibir la reacción hexoquinásica *in vitro*.

Parece poderse concluir que el cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio es capaz de inhibir selectivamente el paso de glucosa a través de la membrana celular, esto es, un factor de la utilización de azúcar exterior no incluido en la fermentación endógena ni en la fosforilación de la glucosa.

Es muy posible que la eventual acción sobre la hexoquinasa pueda ser excluida del mismo modo en la discusión del efecto de otros inhibidores capaces de penetrar dentro de la célula y con una acción selectiva sobre la utilización de glucosa exterior con respecto a la fermentación endógena. (*)

Resumen

Se investiga la inhibición de la hexoquinasa de levadura por el cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio (I). Hay inhibición aproximada del 50 % a 2×10^{-4} M y del 93 % con 6×10^{-4} M. Este efecto no se debe a un posible bloqueo del ATP por I. La concentración de I que inhibe a la hexoquinasa no es inferior a la que inhibe la fermentación endógena de levadura de pan y es superior a la que inhibe la fermentación exógena.

Teniendo en cuenta la posible concentración endocelular de I, la entrada de glucosa en la célula de levadura es el proceso más sensible al inhibidor.

(*) Agradecemos a la Sra. Carmen Vara su colaboración en la parte experimental.

Summary

The action of a quaternary ammonium compound on the hexokinase reaction in relation with its effect on the absorption of glucose in yeast

In previous works of one of the authors, it was shown that certain compounds of quaternary ammonium inhibited the external utilization of glucose by bread yeast in anaerobiosis, in concentrations noticeably smaller than those capable of inhibiting endogenous fermentation. From this it was inferred that these substances had a selective inhibiting influence on the passage of glucose through the cellular membrane.

Nevertheless, the authors consider that a firmer conclusion in this respect demands a complementary investigation into the effect of these substances on the hexokinase reaction, which is not included in endogenous fermentation.

The present work discusses the action of the monohydrate chloride of di-isobutyl-phenoxi-ethoxi-ethyl-dimethyl-benzil-ammonium, through its effects on the phosphorylation of glucose *in vitro* by hexokinase of yeast.

It is shown how, in the working conditions followed, the inhibiting action of the quaternary ammonium compound (Table I) cannot be due to the ATP blockage, or atleast only in a very small proportion (Table II).

A comparison of the results obtained with the effect of the same compound of quaternary ammonium *in vivo* (2, 3), suggests that the hexokinase is not inhibited in a higher proportion than the endogenous fermentation, even supposing the endocellular concentration of quaternary ammonium to be equal to the extracellular. In reality, the inhibitor which penetrates into the cell is practically negligible (3), and, even if we consider as intracellular all that is fixed superficially by the cells, its concentration would be over a thousand times lower than the minimum inhibited by the hexokinase *in vitro*.

The discussion of the results obtained permits us to conclude that the passage of the glucose through the cellular membrane in the yeast is the process which is most sensitive to the inhibitor studied. It is suggested that an analogous treatment might be useful in demonstrating the effect on the membrane of other substances capable of inhibiting the absorption of glucose by the cells of yeast.

Bibliografía

- (1) FISKE, C. H. y SUBBAROW, Y.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925.
- (2) PARÉS, R.: *R. esp. Fisiol.*, **12**, 73-91, 1956.

- (3) PARÉS, R.: *R. esp. Fisiol.*, **12**, 129-142, 1956.
- (4) PARÉS, R.: *R. esp. Fisiol.*, **12**, 153-200, 1956.
- (5) ROTHSTEIN, A. y HURWITZ, L.: *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **37**, 57, 1951.
- (6) ROTHSTEIN, A.: *Protoplasmatología*, **11**, 87, 1954.
- (7) SOLS, A.: *R. esp. Fisiol.*, **5**, 149-154, 1949.