

M. RUIZ-AMIL, J. L. CANOVAS y M. LOSADA

5

CICLO DEL ACIDO GLIOXILICO
EN UNA BACTERIA DESNITRIFICANTE
CRECIDA ANAEROBICAMENTE CON NITRATO



MADRID

1 9 6 3

CICLO DEL ÁCIDO GLIOXILICO EN UNA BACTERIA DESNITRIFICANTE CRECIDA ANAERÓBICAMENTE CON NITRATO (*)

POR

M. RUIZ-AMIL, J. L. CANOVAS y M. LOSADA

El ciclo del ácido glioxílico (8) es un mecanismo de asimilación de acetato activado, cuya función primordial es sintetizar una molécula de succinato a partir de dos de acetilcoenzima A. Sus dos enzimas características son la isocitritasa o isocítricoliasa (21) y la malatosintasa (26). Este ciclo ha sido puesto de manifiesto en microorganismos crecidos con acetato como única fuente de carbono y en plantas superiores con abundantes reservas grasas (3, 9, 12). En células animales se desconoce, por el momento, el papel que el ciclo del glioxilato puede desempeñar en la conversión de grasas en carbohidratos; sin embargo, recientemente, una de sus enzimas típicas, la isocitritasa antes mencionada, ha sido aislada del gusano *Prodemia eridania* (4).

De gran interés es, como apuntan Krebs y Lowenstein (12), el estudio de los ciclos de los ácidos cítrico y glioxílico en microorganismos crecidos anaeróbicamente con nitrato o sulfato como aceptores terminales de electrones. Nuestro trabajo pone de manifiesto que una bacteria desnitrificante crecida en anaerobiosis con nitrato, a expensas de acetato como única fuente de carbono, incorpora este último substrato al mate-

(*) El presente trabajo ha sido realizado con Ayudas del «National Institute of Health, United State Public Health Service» (AM 0684801) y de la Fundación «Juan March».

rial celular vía el ciclo del glioxilato. Todas las enzimas del ciclo han sido aisladas y caracterizadas. Además, se ha encontrado que los extractos del microorganismo en cuestión catalizan la condensación de piruvato con acetilcoenzima A para formar citramalato. Esta reacción, que puede ser la etapa inicial de una nueva vía de síntesis de glutamato (14), ha sido también encontrada en *Pseudomonas ovalis* Chester (6), *Rhodospirillum rubrum* (1) y levadura de cerveza (13).

Najjar y Allen han conseguido extractos libres de células de *Pseudomonas stutzeri* capaces de desnitrificar a expensas de nitrito (16). Experimentos posteriores con éste y otros microorganismos (18) han demostrado la naturaleza soluble de alguna (s) de las enzimas que intervienen en el correspondiente transporte de electrones, concretamente, de la enzima específica del proceso, la nitritoreductasa disimilatoria. Los extractos preparados con la bacteria desnitrificante utilizada en el presente trabajo producen gas a partir de nitrito, sin que la fracción soluble de los mismos ejerza en el proceso ningún efecto estimulante, e igualmente, son capaces de desnitrificar con nitrato (17).

MATERIAL Y METODOS

Aislamiento de la bacteria

Se ha aislado del suelo una bacteria capaz de desarrollarse en anaerobiosis en un medio sintético que contenía acetato como única fuente de carbono y electrones, y nitrato como único agente oxidante y fuente exclusiva de nitrógeno. El aislamiento se llevó a cabo inoculando muestras de suelo de jardín en recipientes de vidrio herméticamente cerrados con tapón de vidrio esmerilado y totalmente llenos de un medio nutritivo de la siguiente composición, por litro: $\text{CH}_3\text{-COOK}$, 5; NO_3K , 5; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 2; $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005; $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,04; en agua y ajustado a pH 7,0. Se incubó a 30 °C, y cuando se observó en uno de los frascos enturbiamiento, acompañado de claro desprendimiento de gas, se realizaron con él cuatro subcultivos de enriquecimiento en las mismas condiciones. Seguidamente, se aisló en placa una colonia, dos veces consecutivas. Por último, se purificó en medio líquido, siguiendo la técnica de las diluciones sucesivas. Para su conservación fue liofilizado.

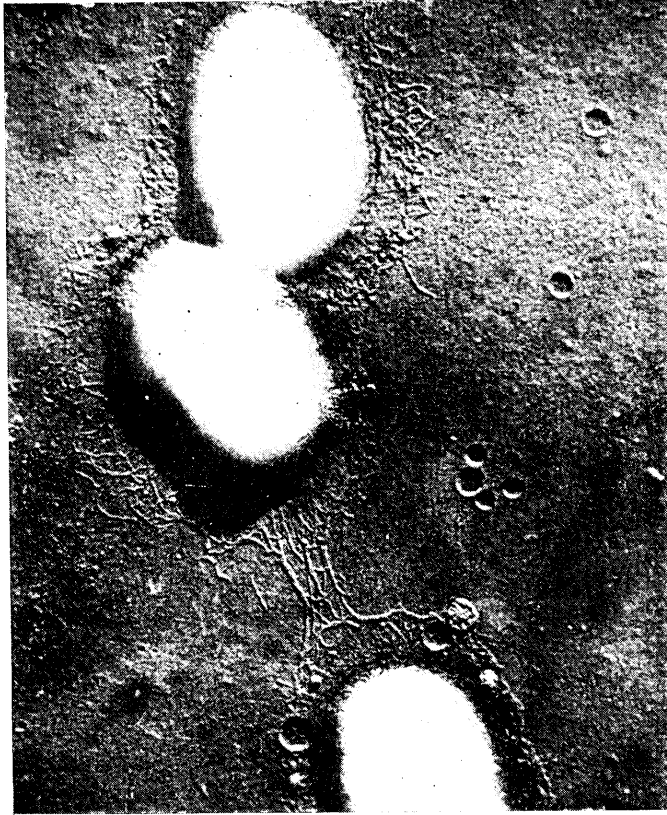


Figura 1. Fotografía al microscopio electrónico de la estirpe desnitrificante AN-III-C

La estirpe aislada (AN-III-C) se ha identificado por sus características fisiológicas y por su morfología al microscopio ordinario y electrónico (*figura 1*), como una especie de *Pseudomonas*, a pesar de carecer de flagelos. Se trata de una bacteria aerobia facultativa, activamente desnitrificante previa adaptación, de forma bacilar corta, a menudo en grupo de dos y tres células, no formadora de esporas y gram-negativa.

Cultivo y preparación de extractos

El organismo fue cultivado incubando el medio nutritivo arriba indicado con 5 por ciento de inóculo, en condiciones anaeróbicas, a 28 °C, hasta alcanzar el final de la fase logarítmica de crecimiento (dos días). Las células, separadas por centrifugación a 6.000 g durante quince minutos, se lavaron con agua destilada y se trituraron con alúmina. Una vez rotas, se extrajeron con tris 0,05 M, pH 7,6. El extracto libre de células se preparó, si no se indica otra cosa, centrifugando quince minutos a 17.000 g y tomando el sobrenadante. Todas las operaciones se realizaron a 0°-4 °C.

Ensayos enzimáticos

Las siguientes enzimas fueron ensayadas espectrofotométricamente, a la temperatura ordinaria, de acuerdo con los métodos de los autores que se mencionan: Isocitritasa y enzima condensante formadora de citrato (Dixon y Kornberg (5); malatosintasa (Reeves y Ajl (22); aconitasa (aplicando el método de Dixon y Kornberg para la isocitritasa (5), con citrato como substrato en lugar de isocitrato); málicodeshidrogenasa y enzima málica (Ochoa (20); succíniceshidrogenasa (Bonner (2); fumarasa (Massey (15); acetato-coenzima A-cinasa y acetatocinasa (Jones y Lipmann (7); fosfotransacetilasa (Stadman (23); glutámiceshidrogenasa (Strecker (25); e isocitricodeshidrogenasa (Ochoa (19).

Incorporación de (¹⁴C)acetato

La fijación de (¹⁴C-1)acetato por los extractos libres de células se llevó a cabo durante treinta minutos a 30 °C. La reacción se detuvo añadiendo ClH hasta una concentración de 0,5 N. La fijación de carbono radiactivo se midió depositando con pipeta partes alícuotas de la mezcla de reacción en planchetas de plástico, evaporando a sequedad

y contando en un aparato provisto de tubo Geiger-Müller con ventana delgada de mica. Los productos radiactivos formados fueron analizados por cromatografía (en papel Whatman núm. 1, usando como disolvente una mezcla de 52 partes, en volumen, de n-butanol; 14 de ácido acético y 34 de agua) e identificados individualmente por cromatografía con los compuestos auténticos.

Ensayos de desnitrificación

Estos ensayos se realizaron a 25 °C en atmósfera inerte (argón o nitrógeno) con células lavadas y con extractos libres de células, utilizando las habituales técnicas manométricas de Warburg. En todos los experimentos se pusieron 0,1 ml de KOH al 20 por ciento en el pocillo central de los vasos. Los extractos se obtuvieron como se indica previamente, excepto que primero se centrifugó a 3.000 g durante cinco minutos para separar la alúmina, y después a la misma aceleración durante quince minutos para sedimentar las células enteras. En los ensayos de desnitrificación con nitrito, se fraccionaron los extractos, separando el sedimento del sobrenadante por centrifugación a 20.000 g, durante cuarenta minutos.

Origen de los productos empleados

El ácido DL-citramálico fue amablemente suministrado por el Dr. A. V. Trebst, y la alúmina (A-305), por «Alcoa». Los piridín-nucleótidos, difosfopiridín-nucleótido (DPN⁺), difosfopiridín-nucleótido reducido (DPNH) y trifosfopiridín-nucleótido (TPN⁺), fueron proporcionados por la «Sigma Chemical Company». La coenzima A (CoA) y el adenosintrifosfato (ATP), por Pabst. El (¹⁴C-1)acetato, por «Research Specialties Co». La acetilcoenzima A (Ac-CoA) se sintetizó por el método de Stadtman (24). Todos los reactivos usados fueron de grado analítico.

RESULTADOS

Enzimas del ciclo del ácido glioxílico

Las figuras 2-3 ponen de manifiesto que los extractos de la bacteria desnitrificante estudiada contienen las dos enzimas características del ciclo del ácido glioxílico, isocitritasa y malatosintasa, respectivamente.

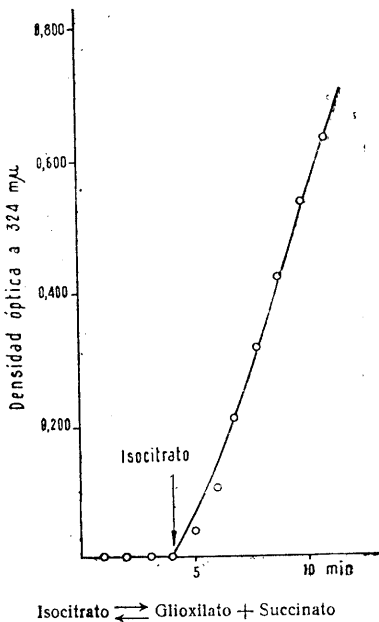


Figura 2. Isocitritasa en la estirpe AN-III-C. La mezcla reaccionante contenía en un volumen final de 3 ml, 0,2 ml de extracto de bacterias (equivalente a 13 mg de peso seco de células), y en micromoles: fosfato, pH 7, 200; cisteína, 6; cloruro magnésico, 20; y clorhidrato de fenilhidrazina, 10. Al tiempo indicado se añadieron 40 μ mol de DL (+alo)-isocitrato

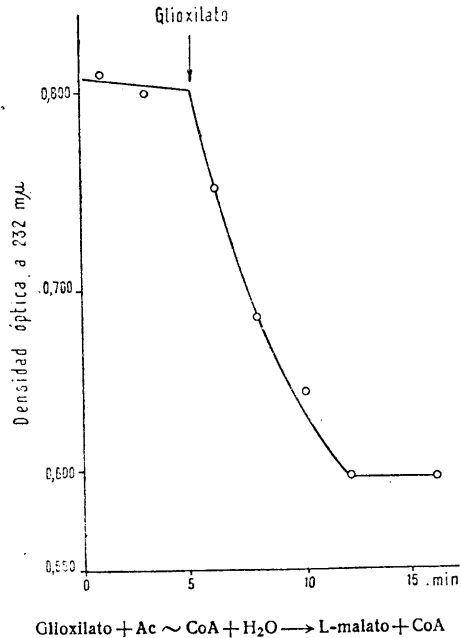


Figura 3. Malatosintasa en la estirpe AN-III-C. La mezcla reaccionante contenía en un volumen final de 3 ml, 0,2 ml de extracto de bacterias (equivalente a 13 mg de peso seco de células), y en micromoles: tris, pH 8, 200; cloruro magnésico, 10; y Ac ~ CoA, 0,26. Al tiempo indicado se añadieron 3 μ mol de glioxilato

Igualmente se ha podido demostrar la existencia de las demás enzimas que, en concomitancia con las dos citadas, intervienen en el funcionamiento del ciclo del glioxilato. Son éstas, la enzima condensante formadora de citrato (figura 4), aconitasa (figura 5), succinicodehidrogenasa (figura 6), fumarasa (figura 7) y málicodeshidrogenasa (figura 8). En todos los casos, se realizaron simultáneamente los oportunos controles, omitiendo alternativamente la enzima y el substrato(s). Las reacciones catalizadas por las enzimas investigadas aparecen indicadas en las correspondientes figuras.

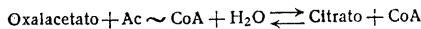
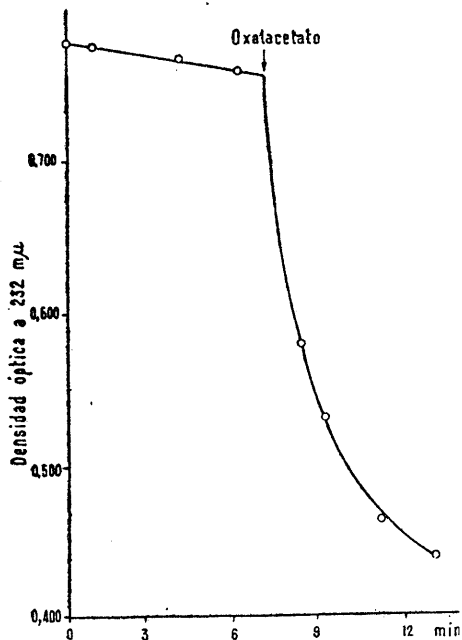


Figura 4. Enzima condensante en la estirpe AN-III-C. La mezcla reaccionante contenía en un volumen final de 3 ml, 0,1 ml de extracto de bacterias (equivalente a 6,5 mg de peso seco), 200 μmol de tris, pH 8, y 0,26 μmol de Ac ~ CoA. Al tiempo indicado se añadieron 3 μmol de ácido oxalacético

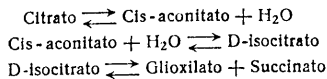
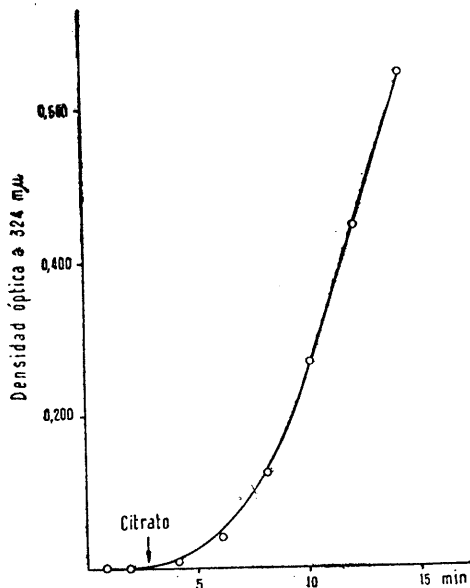


Figura 5. Aconitasa en la estirpe AN-III-C. La mezcla reaccionante contenía en un volumen total de 3 ml, 0,3 ml de extracto de bacterias (equivalente a 20 mg de peso seco de células), y en micromoles: fosfato, pH 7, 200; cisteína, 6; cloruro magnésico, 20; y clorhidrato de fenilhidrazina, 10. Al tiempo indicado se añadieron 40 μmol de citrato

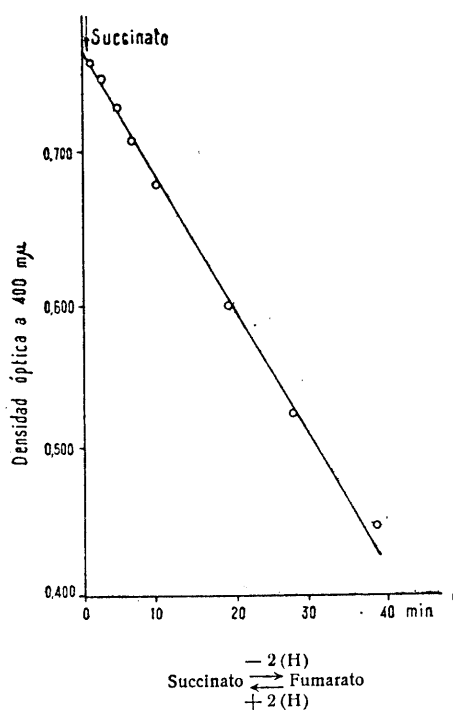


Figura 6. Succínicodehidrogenasa en la estirpe AN-III-C. La mezcla reaccionante contenía en un volumen final de 3 ml, 0,2 ml de extracto de bacterias (equivalente a 20 mg de peso seco de células), y en micromoles: fosfato, pH 7,3, 100; cianuro potásico, 30; ferricianuro potásico, 3. Al tiempo indicado se añadieron 40 μmol de succinato

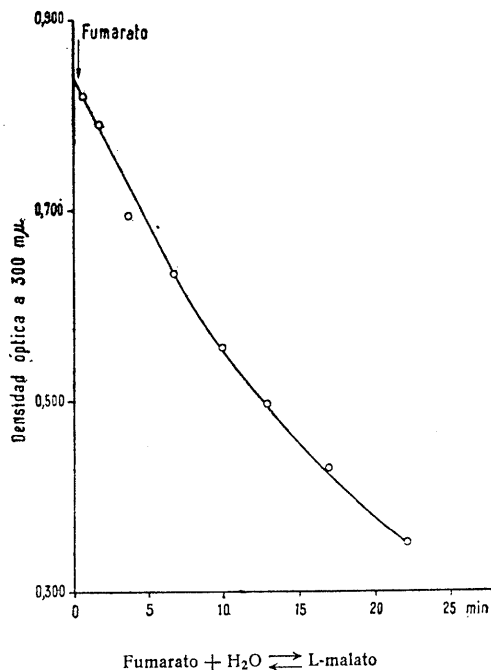


Figura 7. Fumarasa en la estirpe AN-III-C. La mezcla reaccionante contenía 0,2 ml de extracto de bacterias (equivalente a 20 mg de peso seco de células) y 200 μmol de fosfato, pH 7,3, en un volumen final de 3 ml. Al tiempo indicado se añadieron 75 μmol de fumarato

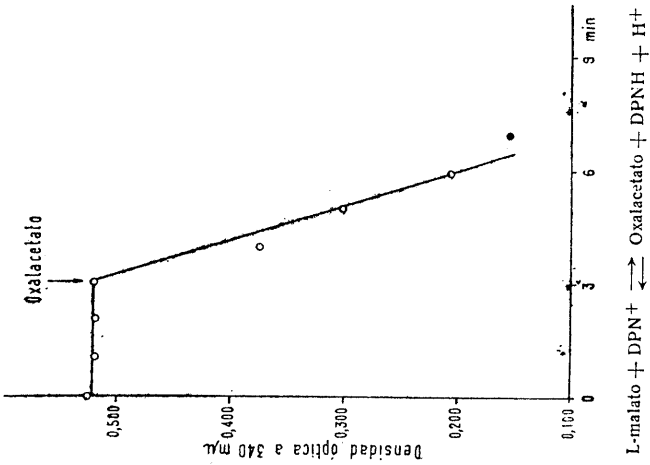


Figura 8. Málicodeshidrogenasa en la estirpe AN-III-C. La mezcla reaccionante contenía 0,1 ml de extracto de bacterias equivalente a 6,5 mg de peso seco de células, 100 μmol de tris, pH 7,6, y 0,4 μmol de DPNH en un volumen final de 3 ml. Al tiempo indicado se añadieron 2 μmol de ácido oxalacético

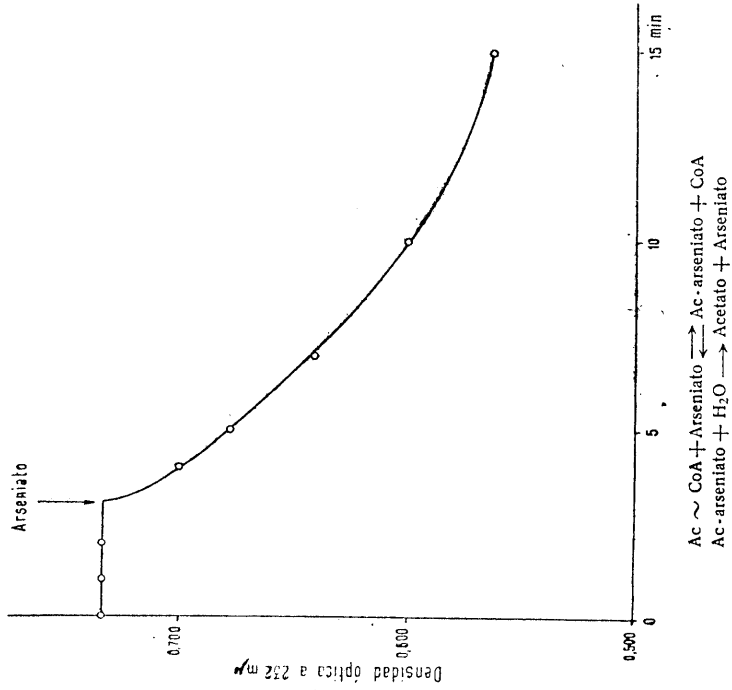


Figura 9. Fosfofransacetilasa en la estirpe AN-III-C. La mezcla reaccionante contenía extracto celular correspondiente a 13 mg, peso seco, de bacterias, 200 μmol de tris, pH 8,0, 0,26 μmol de Ac-CoA y 200 μmol de cloruro potásico, en un volumen de 3 ml. Al tiempo indicado se añadieron 15 μmol de arseniato

Otras enzimas

Se han estudiado las enzimas que intervienen en la activación del acetato. Los resultados que se exponen en el cuadro 1 ponen de mani-

Cuadro 1. Acetato-CoA-cinasa en extractos de la estirpe AN-III-C (*)

Tratamiento	Unidades Klett	
	Tiempo de incubación, minutos	
	20	60
CoA omitido	49	105
Completo	112	242

(*) La mezcla reaccionante contenía en un volumen final de 1,0 ml, extracto bacteriano equivalente a 20 mg, peso seco, de células y en micromoles: fosfato, pH 7,3, 100; acetato, 20; fluoruro potásico, 50; cloruro magnésico, 10; CoA, 0,2. Al tiempo indicado se añadieron 1,5 ml de reactivo de cloruro férrico. Se centrifugó y midió la absorción óptica del sobrenadante con un fotómetro Klett-Summer-son (filtro 54).

fiesto la existencia en los extractos de acetato-CoA-cinasa. Parece también probable la presencia de acetatocinasa, y decimos probable, porque con el método seguido (7), la demostración de esta enzima quedaría interferida si en el extracto existiesen cantidades suficientes de CoA.

La gráfica correspondiente a la figura 9 muestra la presencia en los extractos de la enzima fosfotransacetilasa, que cataliza la interconversión de $Ac \sim CoA$ y acetilfosfato.

Otra enzima investigada ha sido la isocitricodeshidrogenasa dependiente de TPN^+ , cuya actividad en los extractos aparece gráficamente representada en la figura 10.

Los diversos intentos llevados a cabo para poner de manifiesto la enzima málica utilizando alternativamente DPN^+ y TPN^+ han dado resultados negativos. Por otra parte, tampoco hemos podido demostrar la presencia en los extractos de glutámicodehidrogenasa.

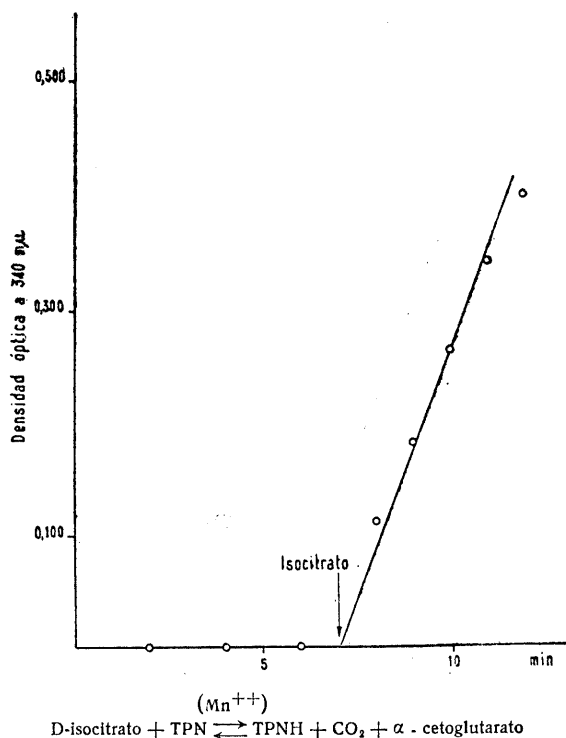


Figura 10. Isocíticodeshidrogenasa en la estirpe AN-III-C. La mezcla reaccionante contenía en un volumen de 3 ml, extracto bacteriano equivalente a 6,5 mg, peso seco, de células, y en micromoles: tris, pH 7,6, 100; cianuro potásico, 1; cloruro manganoso, 2; TPN⁺, 0,4. Al tiempo indicado se añadieron 10 μmol de DL-(+alo)isocitrato

Fijación de (¹⁴C)acetato por extractos libres de células

Los extractos de la estirpe desnitrificante incorporaron (¹⁴C-1)acetato en presencia de CoA, ATP y cualquiera de los siguientes metabolitos: glioxilato, isocitrato, oxalacetato o piruvato, tal como indica el cuadro 2. El que el porcentaje de fijación con glioxilato fuera mayor que el obte-

Cuadro 2. Fijación de (^{14}C -1)acetato por extractos libres de células en presencia de ATP, CoA y diferentes α -cetoácidos (*)

Tratamiento	Impulsos/minuto	Radiactividad incorporada, porcentaje
1. Glioxilato	16.000	31,2
2. Isocitrato	13.260	25,8
3. Piruvato	9.820	19,2
4. Oxalacetato	12.320	24,0
5. Sin sustrato	3.800	7,4

(*) La mezcla reaccionante contenía en un volumen final de 0,9 ml, extracto de bacterias, equivalente a 20 mg, peso seco, de células y en micromoles: tris, pH 7,6, 100; cloruro magnésico, 10; glutatión reducido, 10; CoA, 0,1; ATP, 5; (^{14}C -1)acetato, (2 μc), 1; y, donde se indica, 5 μmol de glioxilato, isocitrato, piruvato y oxalacetato. Tiempo de incubación, treinta minutos.

nido con isocitrato contradice los resultados de Kornberg y Madsen en *Pseudomonas* (11) y de Kornberg y Beevers en semillas de ricino (8). Estos investigadores han sugerido que un exceso de glioxilato inhibe la actividad malatosintásica. Los productos resultantes de la fijación del acetato marcado se identificaron como malato y fumarato en los tratamientos 1 y 2, y como citrato en el 4. En el tratamiento 3, el producto con mayor cantidad de radiactividad fue citramalato, acompañado de algo de citrato.

Ensayos de desnitrificación

a) Con células intactas.

Como muestra la figura 11, la estirpe desnitrificante redujo cuantitativamente nitrato a nitrógeno en presencia de acetato como donador de electrones. La producción de gas fue lineal hasta que se consumió el nitrato. En ausencia del donador de electrones o con glucosa como sustrato, no se apreció evolución de gas en las condiciones de la experiencia.

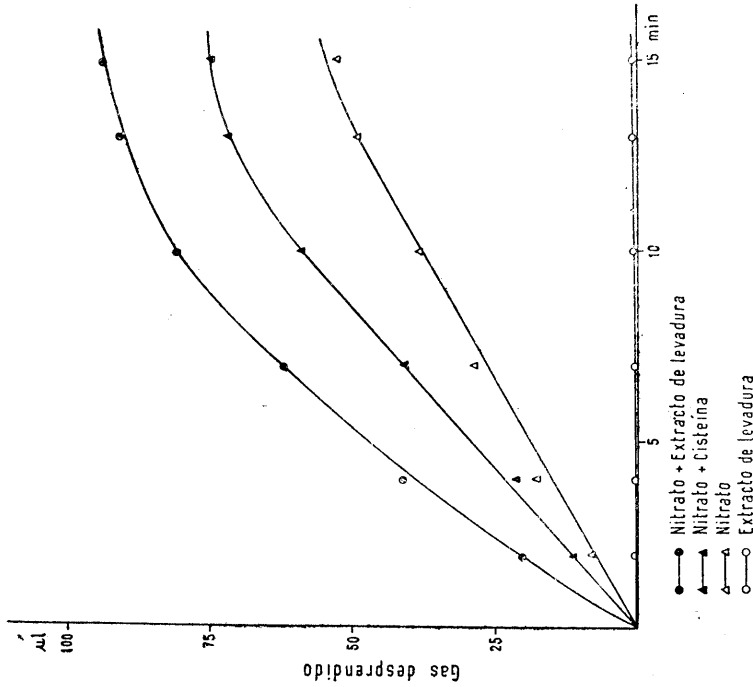


Figura 11. Desnitrificación con células enteras de la estirpe AN-III-C a expensas de nitrato. La mezcla reaccionante contenía en un volumen final de 3 ml, 5 mg, peso seco, de células; 200 μmol de tampón fosfato, pH 7,0, y donde se indica: 20 μmol de acetato; 20 μmol de glucosa; 5, 10 ó 15 μmol de nitrato. Fase gaseosa, N_2

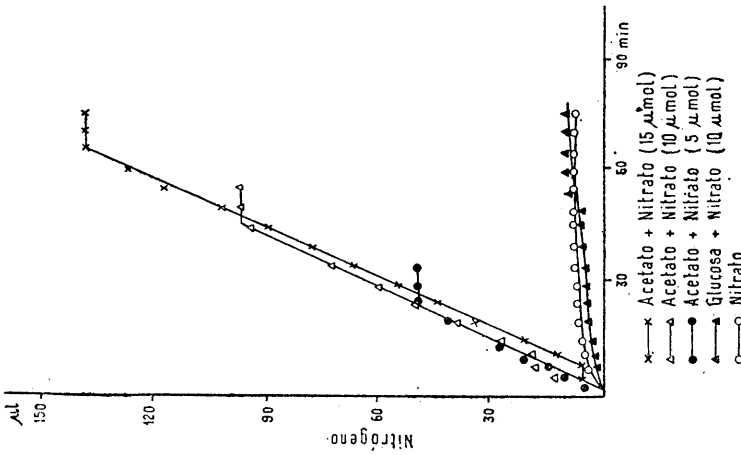


Figura 12. Desnitrificación con extracto libre de células de la estirpe AN-III-C a expensas de nitrato. La mezcla reaccionante contenía en un volumen final de 3 ml, extracto equivalente a 100 mg, peso seco, de células; tris, pH 7,6, 200 μmol ; fosfato, 10 μmol ; cloruro magnésico, 10 μmol ; y donde se indica: nitrato, 10 μmol ; cisteína, 20 μmol ; extracto de levadura Difco hervido (al que se añadieron 0,6 μmol de DPN^+ y 0,6 μmol de TPN^+), 10 mg. Fase gaseosa, argón

b) Con extractos libres de células.

La figura 12 muestra un experimento de desnitrificación con extractos libres de células a expensas de nitrato, en presencia de diferentes donadores de electrones. A diferencia de lo que ocurría en las células enteras, la producción de gas con las células rotas no fue lineal.

Asimismo se ha estudiado la acción desnitrificante de los extractos

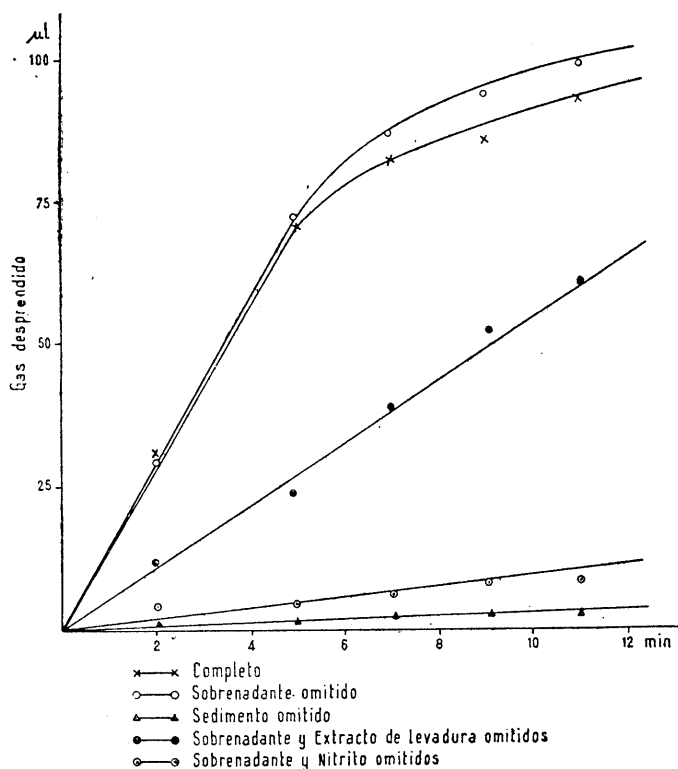


Figura 13. Desnitrificación con extracto libre de células de la estirpe AN-III-C a expensas de nitrito. La mezcla reaccionante contenía en un volumen final de 2,5 ml: sedimento y sobrenadante correspondientes a 100 mg, peso seco, de bacterias; extracto de levadura Difco hervido (al que se añadieron 0,6 μmol de DPN^+ y 0,6 μmol de TPN^+), 10 mg; y en micromoles: tris, pH 7,6, 200; fosfato, 10; cloruro magnésico, 10, y nitrito, 10. Fase gaseosa, argón

frente al nitrito, prestando especial atención a la naturaleza soluble o particulada de las enzimas causantes de la reducción. Como puede observarse en la *figura 13*, todas las enzimas de la reducción del nitrito estaban contenidas en la fracción particulada. La adición de la fracción soluble no produjo ninguna estimulación en el desprendimiento de gas.

DISCUSION

El estudio del equipo enzimático de los extractos, por un lado, y el empleo de (^{14}C)acetato como trazador, por otro, evidencian que el ciclo del ácido glioxílico opera en anaerobiosis cuando la bacteria crece en presencia de acetato como única fuente de carbono, y de nitrato como aceptor final de electrones. Por otra parte, la actividad de la malatosintasa en los extractos (0,1 μmol de malato sintetizado/hora y miligramo de peso seco de células) satisface, según nuestros cálculos, el crecimiento del microorganismo durante la fase de recolección (4 μg de carbono incorporado/hora y miligramo de peso seco de células).

La presencia en los extractos de isocitricodeshidrogenasa y de las otras enzimas comunes al ciclo del ácido cítrico, sugiere que este importante ciclo metabólico opera también cuando la bacteria desnitrificante crece en anaerobiosis con nitrato como agente oxidante.

De especial interés es, por otra parte, la condensación observada entre piruvato y Ac-CoA , pues como han señalado Losada y cols. (14) puede ser el paso inicial de una nueva ruta de síntesis de ácido glutámico, vía citramalato. A este respecto es interesante subrayar que no ha podido detectarse en los extractos crudos glutamicodeshidrogenasa, la enzima convencional que cataliza la incorporación de amoníaco.

Los extractos libres de células de la estirpe desnitrificante estudiada son capaces de desnitrificar nitrato y nitrito a expensas de donadores de electrones no bien caracterizados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. M. Rubio la realización de la micrografía electrónica del organismo utilizado, y a la señorita María Dolores Alcaín la excelente asistencia técnica prestada.

RESUMEN

Se ha aislado del suelo una estirpe desnitrificante (AN-III-C) capaz de crecer en un medio sintético con acetato como única fuente de carbono y electrones, y con nitrato como aceptor terminal de electrones y fuente exclusiva de nitrógeno.

Sus extractos libres de células catalizan la activación de acetato en presencia de ATP y CoA y desnitrifican nitrato y nitrito a expensas de donadores de electrones todavía no bien caracterizados.

Se han aislado todas las enzimas que toman parte en el ciclo del ácido glioxílico, a saber: isocitritasa, malatosintasa, enzima condensante formadora de citrato, aconitasa, succínico-deshidrogenasa, fumarasa y málicodeshidrogenasa, y además, fosfotransacetilasa e isocitrico-deshidrogenasa. La presencia de glutamicodeshidrogenasa no ha podido ser demostrada.

Utilizando (^{14}C)acetato se ha demostrado que este microorganismo es capaz de condensar el acetato activado con una serie de α -cetoácidos. La condensación con piruvato conduce a la formación de citramalato.

SUMMARY

A denitrifying bacteria (AN-III-C) was isolated from garden soil and grown on a synthetic broth containing acetate as the sole source of carbon and electrons and nitrate as the only nitrogen source and terminal electron acceptor.

The cell-free extracts catalyze the activation of acetate in the presence of ATP and CoA, and can denitrify in the presence of nitrate and nitrite.

The following enzymes, which take part in the glyoxylic acid cycle, have been separately studied: isocitritase, malate synthase, citrate-forming condensing enzyme, aconitase, succinic dehydrogenase, fumarase and malic dehydrogenase, and, in addition, phosphotransacetylase and isocitric dehydrogenase. The microorganism seems to lack glutamic dehydrogenase.

Utilising (C^{14})acetate, it was demonstrated that this microorganism is able to condense active acetate with several α -ketoacids. The condensation with pyruvate led to the formation of citramalate.

BIBLIOGRAFIA

1. BENEDICT, C. R. 1962. *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 620.
2. BONNER, W. D. *En S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN*. 1955. *Methods in Enzymology*, I, 722. Academic Press, Nueva York.
3. CÁNOVAS, J. L.; RUIZ-AMIL, M., y LOSADA, M. 1963. *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 646.
4. CARPENTER, W. D., y JAWORSKI, E. G. 1962. *Biochim. Biophys. Acta*, 58, 369.
5. DIXON, G. H., y KORNBERG, H. L. 1959. *Biochem. J.*, 72, 3 p.
6. GRAY, C. T., y KORNBERG, H. L. 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 371.
7. JONES, M. E., y LIPMANN, F. *En S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN*. 1955. *Methods in Enzymology*, I, 585. Academic Press, Nueva York.
8. KORNBERG, H. L., y BEEVERS, H. 1957. *Biochim. Biophys. Acta*, 26, 531.
9. KORNBERG, H. L., y ELSDEN, S. R. *En F. F. NORD*. 1961. *Advan. Enzymol.*, XXIII, 401.
10. KORNBERG, H. L., y KREBS, H. A. 1957. *Nature*, 179, 988.
11. KORNBERG, H. L., y MADSEN, N. B. 1957. *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 651.
12. KREBS, H. A., y LOWENSTEIN, J. M. *En D. M. GREENBERG*. 1960. *Metabolic Pathways*, I, 129. Academic Press.
13. LOSADA, M.; CÁNOVAS, J. L., y RUIZ-AMIL, M. 1963. *Comunicación presentada a la II Reunión de Bioquímicos Españoles*. Santiago de Compostela, 1963.
14. LOSADA, M.; TREBST, A. V.; OGATA, S., y ARNON, D. I. 1960. *Nature*, 186, 753.
15. MASSEY, V. *En S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN*. 1955. *Methods in Enzymology*, I, 729. Academic Press, Nueva York.
16. NAJJAR, V. A., y ALLEN, M. B. 1954. *J. Biol. Chem.*, 206, 209.
17. NAJJAR, V. A., y CHUNG, C. W. *En W. D. McELROY y B. GLAS. Symp. Inorg. Nitrogen Metab.* Baltimore, 1955, 260.
18. NASON, A. 1962. *Bacteriol. Rev.*, 26, 16.
19. OCHOA, S. *En S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN*. 1955. *Methods in Enzymology*, I, 699. Academic Press, Nueva York.
20. OCHOA, S. *En S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN*, 1955. *Methods in Enzymology*, I, 735 y 739. Academic Press, Nueva York.
21. OLSON, J. A. 1954. *Nature*, 174, 695.
22. REEVES, H. C., y AJL, S. J. 1960. *J. Bacteriol.*, 79, 341.
23. STADTMAN, E. R. 1953. *J. Biol. Chem.*, 203, 501.
24. STADTMAN, E. R. *En S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN*. 1955. *Methods in Enzymology*, III, 931. Academic Press, Nueva York.
25. STRECKER, H. S. *En S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN*. 1955. *Methods in Enzymology*, II, 220. Academic Press, Nueva York.
26. WONG, D. T. O., y AJL, S. T. 1956. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 3220.