

A. 3650

TB TD
675 ~~675~~
675

30-XI-78

77



NITRATO REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum*. INACTIVACION
POR AGENTES OXIDANTES Y SU REVERSION POR DITIOERITRITOL

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias
por la Licenciada Reyes Vila Vilar

Reyes Vila

Sevilla, Diciembre de 1978

PONENTE

Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

DIRECTOR

Dr. Antonio Paneque Guerrero
Profesor de Investigación del
C.S.I.C.

A mis padres

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla.

En primer lugar quiero agradecer al Profesor D. Manuel Losada el haberme acogido en su Departamento.

Mi más profundo agradecimiento a D. Antonio Panque Guerrero, director de esta Tesis, por su constante interés hacia mi formación. Asimismo quiero expresar mi agradecimiento a mi amigo y compañero Antonio Llobell por su contribución en la obtención de los resultados que aquí se presentan.

También quiero agradecer a mis amigos, Fernando, Jesús, Pedro, Pepe, Carlos, Toñi, Trini, Paco, Alicia y Ana su gran ayuda y muy especialmente a Isabel, Pepa, Toño y José Miguel.

Finalmente, mi agradecimiento a la Universidad de Sevilla, así como al C.S.I.C. por el apoyo económico prestado mediante la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador.

INDICE

ABREVIATURAS.....	VIII
I. INTRODUCCION.....	1
II. MATERIALES Y METODOS.....	28
II.A. CULTIVO DE CELULAS.....	29
II.B. ENZIMAS.....	30
II.B.1. <i>Preparación de extractos libres de células</i>	30
II.B.2. <i>Preparación de la nitrato reductasa</i>	31
II.B.3. <i>Ensayo de la actividad nitrato reductasa</i>	32
II.C. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS.	32
II.C.1. <i>Anaerobiosis en mezclas de incubación y ensayos</i>	32
II.C.2. <i>Cromatografía de filtración en gel</i>	33
II.C.3. <i>Determinaciones espectrofotométricas</i>	33
II.C.4. <i>Determinación de nitrito</i>	34
II.C.5. <i>Determinación de proteína</i>	34
II.C.6. <i>Medidas de pH</i>	35
II.D. REACTIVOS.....	35
III. RESULTADOS.....	37
III.A. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA NITRATO REDUCTASA CON AGENTES OXIDANTES.....	38

III.A.1. Inactivación de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u> por diversos agentes oxidantes.....	38
III.A.2. Reversión con tioles de la inactivación por oxidantes de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u>	38
III.B. ESTUDIO DE LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>A. chroococcum</u> POR PODER REDUCTOR Y AIRE.....	42
III.B.1. Inactivación de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u> dependiente de poder reductor y aire.....	42
III.B.2. Estudio cinético de la inactivación de la nitrato reductasa por poder reductor y aire.....	43
III.B.3. Efecto del pH.....	46
III.B.4. Influencia de las concentraciones de NADH y BV en la inactivación de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u> por poder reductor y aire.....	46
III.B.5. Protección contra la inactivación por poder reductor y aire de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u>	50

III.B.6. <i>Reversión de la inactivación producida por NADH, BV y aire sobre la nitrato reductasa.....</i>	50
III.C. EFECTO DE LA LUZ Y NUCLEOTIDOS FLAVINICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA DE <i>A. chroococcum</i>	54
III.C.1. <i>Fotoinactivación de la nitrato reductasa por nucleótidos flavínicos.....</i>	54
III.C.2. <i>Efecto de la concentración de FMN en la fotoinactivación.....</i>	54
III.C.3. <i>Estudio cinético de la fotoinactivación de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u></i>	57
III.C.4. <i>Efecto del pH.....</i>	57
III.C.5. <i>Efecto del EDTA en la fotoinactivación de la nitrato reductasa por nucleótidos flavínicos.....</i>	57
III.C.6. <i>Protección por diversos compuestos contra la fotoinactivación de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u>.....</i>	61
III.C.7. <i>Influencia de la intensidad y tipos de luz empleados en la fotoinactivación de la nitrato reductasa.....</i>	64

III.C.8. <i>Reversión con DTE de la fotoinactivación de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u></i>	64
III.C.9. <i>Cinética de la reversión con DTE</i>	67
III.D. FOTORREDUCCION DE NITRATO A NITRITO POR LA <u>NI</u> TRATO REDUCTASA DE <i>A. chroococcum</i>	71
IV. DISCUSION.....	76
V. CONCLUSIONES.....	99
VI. BIBLIOGRAFIA.....	104

ABREVIATURAS

ADP.....	Difosfato de adenosina
ATP.....	Trifosfato de adenosina
BV	Bencil viológeno
CNO ⁻	Ión cianato
DEAE-celulosa.....	Dietilaminoetil celulosa
DPIP.....	2,6-diclorofenolindofenol
DTE.....	Ditioeritritol
EDTA.....	Acido etilen diaminotetraacético
FAD.....	Flavín-adenín-dinucleótido
FMN.....	Flavín-adenín-mononucleótido
g.....	Aceleración de la gravedad
NAD ⁺	Nicotinamín-adenín-dinucleótido
NADP ⁺	Nicotinamín-adenín-dinucleótido fosfato
NADH.....	Nicotinamín-adenín-dinucleótido reducido
NADPH.....	Nicotinamín-adenín-dinucleótido fosfato reducido
NAD (P)H.....	NADH o NADPH indistintamente
pHMB.....	para-hidroximercuribenzoato
Tris.....	Tri-(hidroximetil)-aminometano

I. INTRODUCCION

La atmósfera terrestre es rica en oxígeno y, por consiguiente, proporciona un entorno oxidante, en el que muchos elementos tienden a combinarse con aquél. Así, el carbono se oxida a CO_2 , el nitrógeno a NO_3^- , el azufre a SO_4^{2-} , etc.

Los elementos citados, sin embargo, existen en los componentes celulares en un estado más reducido; así por ejemplo el carbono está como CH_2O , el nitrógeno como $-\text{NH}_2$ y el azufre como $-\text{SH}_2$. Por tanto, cuando un organismo necesita utilizar cualquiera de estos elementos como fuente para la síntesis de sus distintos componentes celulares, tiene que reducirlos previamente a un estado de valencia adecuado. La fuente última de poder reductor es la luz solar. Esta energía es captada, mediante la fotosíntesis, por las plantas verdes y por ciertos microorganismos, utilizándola para sintetizar compuestos orgánicos a partir del anhídrido carbónico, del nitrato y del sulfato. Los compuestos así sintetizados, son utilizados después por el reino animal y los demás organismos no fotosintéticos, para obtener energía mediante su oxidación.

De la misma forma que el carbono pasa por un ci

clo de oxidación-reducción, hay un ciclo del nitrógeno en la naturaleza, en el que este elemento pasa por distintos estados redox, reduciéndose al ser asimilado por determinados organismos vivos y oxidándose luego por otros organismos, que aprovechan así la energía que llevan almacenada estas formas reducida del nitrógeno.

El nitrato constituye, como es sabido, la fuente principal de nitrógeno que utilizan las plantas y algas verdes, así como otros microorganismos que poseen la capacidad de reducirlo hasta amoníaco para su asimilación. En general se trata de un proceso no cíclico, que requiere poder reductor (ocho equivalentes por molécula de nitrato) y no necesita ATP. La otra forma oxidada de nitrógeno inorgánico, el nitrógeno molecular, a pesar de ser mucho más abundante, es asimilado sólo por bacterias fotosintéticas (Arnon et al., 1961, Fogg et al., 1973) y las fijadoras no fotosintéticas, tanto libres como simbióticas (Yates, 1976). Este proceso de fijación de nitrógeno requiere, además de poder reductor (seis equivalentes por molécula de nitrógeno), el concurso energético del ATP .

Hay un pequeño número de bacterias capaces de interconvertir los distintos compuestos de nitrógeno inorgánico y obtener energía, por fosforilación acoplada al transporte de electrones, para su crecimiento y desarrollo. Entre ellas destacan las bacterias quimiolitotróficas nitrificantes (que oxidan el amonio hasta nitrato o nitrito), las bacterias que utilizan el nitrato, en ausencia de oxígeno, como aceptor terminal de electrones de la cadena respiratoria y, por último, las bacterias denitrificantes, que reducen el nitrato y óxidos de nitrógeno en general hasta nitrógeno molecular (Zumft y Cárdenas , en prensa).

En organismos capaces de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno, la reducción asimilatoria de nitrato hasta amoniaco transcurre en dos etapas enzimáticas : la primera consiste en la reducción de nitrato a nitrito, reacción que implica la transferencia de dos electrones y que está catalizada por el complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa (E.C.1.6.6.2.). En la segunda etapa, el nitrato se reduce hasta amoniaco, con transferencia de seis electrones, estando catalizada esta reacción por la ferredoxina-nitrito reductasa (E.C.1.7.7.1.) (Hewitt, 1975).

La nitrato reductasa de plantas superiores y algas verdes, así como la de hongos, es una molibdoflavo-proteína de elevado peso molecular (500.000 daltons), que también contiene hierro y que cataliza la transferencia de electrones desde el NAD(P)H al nitrato en una reacción en que participan secuencialmente dos actividades. Estas actividades pueden ensayarse separadamente y cada una comprende una parte de la cadena transportadora de electrones de todo el complejo enzimático. La primera mitad es una diaforasa (o NAD(P)H-deshidrogenasa) y cataliza la reducción por NAD(P)H de una variedad de aceptores de uno o dos electrones, del tipo del citocromo *c*, ferricianuro, DPIIP, etc (Paneque et al, 1968; Paneque y Losada, 1966; Zumft et al, 1970; Rivas et al, 1973). La nitrato reductasa terminal o nitrato reductasa propiamente dicha, constituye la segunda mitad del complejo, y utiliza como donadores de electrones flavín nucleótidos o viológenos reducidos químicamente con ditionito (Paneque et al, 1965; Losada et al, 1969). Ambas actividades se afectan de distinto modo por tratamientos e inhibidores selectivos; en general, la actividad diaforásica es muy sensible al tratamiento térmico y a la acción de los reactivos específicos de grupos sulfhidrilo (-SH). Ambos procesos de in-

hibición pueden prevenirse de una forma específica por la presencia de FAD, grupo prostético de la diaforasa, o de NAD(P)H, donadores fisiológicos del enzima (Losada, 1975/76). Por otra parte, la nitrato reductasa terminal, que es resistente al tratamiento térmico y a los reactivos de los grupos sulfhidrilos, puede ser total y específicamente inhibida por acomplejantes de metales, del tipo de la azida, cianuro, cianato y carbamil-fosfato. En todos los casos, la inhibición es de tipo competitivo con respecto al nitrato (Vega et al, 1972). En el caso particular del cianuro, cuando el enzima se mantiene en estado reducido por adición del nucleótido de piridina, la inhibición pasa a ser de tipo no competitivo; el ferricianuro revierte esta inhibición al reoxidar al enzima y liberar el cianuro (Vega et al, 1972; Relimpio et al, 1971; Solomonson y Vennesland, 1972; Barea et al, 1976).

En bacterias fotosintéticas la reducción de nitrato ha sido muy poco estudiada. Los trabajos realizados en *Rhodospirillum rubrum* por Katoh (1962) demuestran la presencia de una nitrato reductasa, asociada a los cromatóforos, cuando dicho organismo se cultiva en la luz, bien aeróbica o anaeróbicamente, en presencia de nitra -

to como única fuente de nitrógeno. En la bacteria sulfurosa *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* se ha descrito una nitrato reductasa que depende de ferredoxina como fuente de electrones (Malofeeva et al, 1975).

Con respecto a las algas verdeazuladas, también llamadas cianobacterias, se encontró en *Anabaena cylindrica* una nitrato reductasa asociada a partículas celulares que dependiendo del método de preparación, ultrasonidos o acetona, catalizaba la reducción de nitrato con ferredoxina reducida o NADH, respectivamente (Hattori y Myers, 1967), pero cuando el enzima se solubilizaba con Triton X-100, solamente los nucleótidos de flavina reducidos servían como donadores de electrones (Hattori, 1970). En *Anacystis nidulans* (Manzano et al, 1976), así como en *Nostoc muscorum* (Ortega et al, 1976), la nitrato reductasa se encuentra asociada a partículas fotosintéticas y la ferredoxina reducida es el donador de electrones. Tanto en *Anacystis nidulans* (Candau et al, 1976) como en *Nostoc muscorum* (Ortega et al, 1976), utilizando preparaciones particuladas que exhiben las pertinentes actividades fotosintéticas y enzimáticas, se ha podido acoplar la reducción fotosintética del nitrato a la fotooxidación

del H₂O (Ortega et al, 1976; Candau et al, 1976).Recientemente se ha visto que la nitrato reductasa de *A. nidulans* es un enzima de bajo peso molecular, unos 75.000 daltons, y que no acepta electrones de los piridín-nucleótidos reducidos (Candau, 1978).

Las bacterias pueden utilizar nitrato para dos fines distintos; en primer lugar el nitrato es usado para la síntesis de los compuestos celulares que contienen nitrógeno. Este proceso, llamado asimilación de nitrato, puede ocurrir tanto en condiciones aeróbicas, como en anaeróbicas. En segundo lugar, el nitrato puede ser utilizado en condiciones anaeróbicas como acceptor terminal de electrones; este proceso se denomina respiración de nitrato. En ambos procesos , el primer paso en la utilización del nitrato es la reducción de éste a nitrito en una reacción catalizada por la nitrato reductasa. En algunas bacterias el nitrito puede ser usado también en condiciones anaeróbicas como acceptor terminal de electrones. En este último caso el nitrato es transformado en productos gaseosos, como nitrógeno u óxido nitroso, en el proceso llamado denitrificación. La literatura acerca del metabolismo de derivados oxidados de nitrógeno por microorganismos ha

sido revisada recientemente por Payne (1973), Pichinoty (1973), Brown et al. (1974) y Stouthamer (1976).

Pichinoty y Piéchaud (1968) desarrollaron un método manométrico para el ensayo de la nitrato reductasa en bacterias. En este método, el bencil viológeno reducido es utilizado como donador de electrones para la reducción del nitrato. El bencil viológeno es reducido con hidrógeno por medio de una hidrogenasa aislada de *Desulfovibrio vulgaris*. De esta manera, la reducción de nitrato puede ser seguida por medidas de consumo de hidrógeno. Este ensayo ha sido usado para medir la reducción de nitrato y clorato en un gran número de bacterias (Pichinoty et al, 1969).

Asímismo, Lowe y Evans (1964) desarrollaron un método de ensayo para la nitrato reductasa bacteriana basado en el empleo de metil- o bencil-viológeno reducido químicamente con hidrosulfito. Este procedimiento de valoración de la actividad nitrato reductasa fué modificado posteriormente por Paneque et al. (1965) para ser aplicado al enzima de otros organismos, tanto eucarióticos como procarióticos (ver, por ejemplo, Guerrero et al., 1973)

Hay dos tipos de nitrato reductasa que pueden reducir nitrato o clorato, y que difieren en la especificidad por el sustrato y en su sensibilidad a los inhibidores; la nitrato reductasa A siempre tiene un papel en la respiración de nitrato, está asociada a membranas y reduce al clorato; la función de la nitrato reductasa B es diferente en distintas bacterias, pero siempre el clorato actúa como inhibidor de ella. En un número de bacterias anaeróbicas facultativas, la nitrato reductasa B tiene una función respiratoria (Pichinoty, 1970). *Pseudomonas putida*, que puede llevar a cabo la asimilación de nitrato pero no la respiración, forma nitrato reductasa tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas; en este organismo el enzima tiene una función nutritiva. En *Micrococcus denitrificans*, la nitrato reductasa A se forma en condiciones anaeróbicas en presencia de nitrato. Este organismo es capaz de formar además, nitrato reductasa B en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Stouthamer, 1976).

Hasta el momento sólo la nitrato reductasa A de varias bacterias ha sido obtenida en estado puro. Se han usado varios métodos para solubilizarla de la membrana; en *Klebsiella aerogenes* se ha utilizado deoxicolato al

1,5%; de esta manera, se solubiliza el 85% de la nitrato reductasa mientras que sólo el 30% de la proteína total asociada a membranas llegó a solubilizarse (Van't Riet y Planta ,1969).

La nitrato reductasa de *Escherichia coli* ha sido solubilizada por tratamiento térmico a pH alcalino (Mc Gregor et al., 1974). Se demostró que la solubilización se debía a la activación de una proteasa asociada a membranas (McGregor, 1975).

La nitrato reductasa de *Klebsiella aerogenes* puede ser obtenida en dos formas dependiendo del procedimiento utilizado para aislarla; han sido llamadas nitrato reductasa I y nitrato reductasa II (Van't Riet y Planta 1975). La nitrato reductasa I puede ser convertida en nitrato reductasa II por tratamiento a pH 9,5 en presencia de deoxicolato y ClNa 0,5 M.

La nitrato reductasa I de *K. aerogenes* tiene tres subunidades diferentes de peso molecular, $1,17 \times 10^5$, $5,7 \times 10^4$ y $5,2 \times 10^4$ daltons respectivamente en razón molecular 1:1:2. La nitrato reductasa II sólo contiene las dos

primeras subunidades en proporción 1:1; parece que las dos subunidades pequeñas de la nitrato reductasa I sólo tienen papel estructural porque la nitrato reductasa II, que carece de ellas, es más lábil que la nitrato reductasa I, pero es aún catalíticamente activa. Sin embargo, no se puede descartar un papel funcional para estas subunidades en células enteras.

McGregor et al. (1974) aislaron una nitrato reductasa de *E. coli* de 8×10^5 daltons de peso molecular, que contiene, en cantidad equimolecular, subunidades de $1,42 \times 10^5$ y $5,8 \times 10^4$ daltons. El peso molecular de la subunidad pequeña de la nitrato reductasa de *E. coli* es idéntico que el de la subunidad pequeña de la nitrato reductasa II de *K. aerogenes*.

Por tratamiento de membranas de *E. coli* con de-oxicolato fué solubilizada una nitrato reductasa por Enoch y Lester (1974), que contenía tres subunidades de $1,55 \times 10^5$, $6,3 \times 10^4$ y $1,9 \times 10^4$ daltons respectivamente. El enzima purificado contenía citocromo *c*, cuyo grupo hemo se pudo localizar en la subunidad pequeña.

Posteriormente, McGregor (1975) encontró que precipitando los extractos de *E. coli* con Tritón, se obtenía una nitrato reductasa que contenía tres subunidades de pesos moleculares $1,42 \times 10^5$, 6×10^4 y $1,95 \times 10^4$ daltons, respectivamente en razón 1:1:2. La subunidad pequeña, que está ausente en el enzima solubilizado por tratamiento térmico a pH alcalino, fué identificada como la apoproteína del citocromo *b*. Nueva evidencia para el papel del molibdeno en la formación de la nitrato reductasa bacteriana procede de estudios de competición con tungstato (Stouthamer, 1976; Guerrero et al., 1973), análisis de mutantes (Stouthamer, 1976) y ensamblaje in vitro, de una nitrato reductasa asimilatoria híbrida realizada por el grupo de Nason (Ketchum et al., 1970; Nason et al., 1971; Lee et al., 1974).

Por otra parte, se ha demostrado la presencia en la nitrato reductasa de molibdeno y hierro por estudios con inhibidores. El tiocianato, conocido quelante del molibdeno, inhibe fuertemente la actividad nitrato reductasa de *M. denitrificans* (Lam y Nicholas, 1969), *P. denitrificans* (Radcliffe y Nicholas, 1970) y *K. aerogenes* (Van't Riet et al., 1975). Asimismo, la batofenantrolina, quelan

te del hierro, tiene también un efecto inhibitor sobre la actividad nitrato reductasa en *K. aerogenes* (Van't Riet et al., 1975) y en *P. denitrificans* (Radcliffe y Nicholas, 1970). Se ha comprobado la presencia de hierro, molibdeno y grupos sulfuro lábil en las nitrato reductasas de *E. coli* (Forget, 1974), *K. aerogenes* (Van't Riet et al. 1975), *Micrococcus denitrificans* (Forget, 1971) y *M. halodenitrificans* (Rosso et al., 1973). Estos resultados prueban que el molibdeno y el hierro son componentes del enzima y esenciales para su actividad; sin embargo, no dan indicación de si participan directamente en la transferencia de electrones hasta el nitrato. Con estudios en EPR, parece concluirse que los centros sulfo-férricos participan en esta transferencia pero no está claro con respecto al molibdeno (Stouthamer, 1976).

En contraste con la nitrato reductasa respiratoria de bacterias, se sabe muy poco acerca de la nitrato reductasa asimilatoria de estos procariotas, probablemente debido a su extrema labilidad, lo que dificulta extraordinariamente su estudio. Así por ejemplo, en *K. aerogenes* el enzima es muy sensible a la sonicación (Van't Riet et al. 1968). Debido a que las nitrato reductasas asimilatoria

y respiratoria no difieren en sus parámetros cinéticos y pHs óptimos, se ha propuesto que el complejo nitrato reductasa asimilatoria tiene composición diferente al complejo de la respiratoria, pero que en ambos casos, la nitrato reductasa propiamente dicha es la misma proteína. La verificación de la hipótesis de que ambas nitrato reductasas sean la misma proteína debe ser apoyada por la purificación y caracterización de la nitrato reductasa asimilatoria, lo que, debido a su inestabilidad, presenta gran dificultad. Esta labilidad parece que es una propiedad general de todas las nitrato reductasas asimilatorias de bacterias. Por ejemplo, en extractos libres de células de *P. aeruginosa* y *B. licheniformis* no ha sido posible detectar actividad nitrato reductasa después de haber crecido aerobícamente con nitrato como fuente de nitrógeno. Por consiguiente, aún queda alguna duda de si la asimilación de nitrato en bacterias es siempre llevada a cabo por la nitrato reductasa B (Stouthamer, 1976).

Recientemente, se ha caracterizado la nitrato reductasa de *Azotobacter chroococcum* por Guerrero et al. (1973) que resultó ser una molibdo proteína soluble con un peso molecular de, aproximadamente, 1×10^5 daltons. Su actividad

se inhibe por cianuro y *p*-HMB y se estimula por la presencia de cianato.

Este enzima presenta unas propiedades cinéticas muy particulares. La formación de nitrito, cuando la actividad se ensayaba con viológeno reducido químicamente con ditionito, era proporcional al tiempo sólo durante los dos o tres primeros minutos de reacción, pasados los cuales sufría una rápida inactivación. Esta inactivación podía ser impedida con cianato, que también era capaz de reactivar al enzima una vez producida la inactivación.

Acoplando el poder reductor generado por cloroplastos de espinaca iluminados a la nitrato reductasa de *A. chroococcum*, se pudo demostrar que la ferredoxina reducida de esta bacteria es un donador de electrones para la conversión enzimática del nitrato a nitrito. Por otra parte, en un sistema modelo constituido por ferredoxina-NADP⁺ reductasa de espinaca y las proteínas de *Azotobacter*, ferredoxina y nitrato reductasa, se pudo observar una actividad significativa de nitrato reductasa dependiente de ferredoxina y soportada por NADPH (Tortolero et al., 1975).

También se ha encontrado una nitrato reductasa soluble en la bacteria anaerobia estricta *Clostridium perfringens* (Chiba e Ishimoto, 1973) que acepta los electrones de la ferredoxina reducida por NADH en una reacción catalizada por ferredoxina-NAD⁺ reductasa.

Asimismo, se ha aislado y caracterizado la nitrato reductasa asimilatoria de la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* (Villalobo et al., 1977) que resultó ser una molibdo protefina de peso molecular 96.000 daltons, que utiliza como donadores de electrones los viológenos reducidos químicamente y ferredoxina reducida con un sistema auxiliar de cloroplastos iluminados para el ensayo de su actividad.

Dependiendo de las condiciones de cultivo, se ha encontrado en la bacteria *Azotobacter chroococcum* una nitrato reductasa asociada a membranas (Vila et al., 1977). En este caso se puede descartar la posibilidad de que las células hayan utilizado el nitrato como aceptor de electrones ya que se cultivaron en condiciones aeróbicas. Se vio que un citocromo del tipo *b* participaba en la catálisis. El enzima recibe electrones de una gran variedad de com -

puestos: NAD(P)H, succinato, malato e hidrosulfito. In vitro, la vitamina K₃ estimula apreciablemente la actividad. En contraste con lo que ocurre en la nitrato reductasa soluble, el cianato y la azida, bloquean la catálisis de la nitrato reductasa particulada de *A. chroococcum*.

REGULACION DE LA NITRATO REDUCTASA

Beevers y Hageman (1969), han concluido que la etapa limitante en la asimilación de nitrato es la reacción catalizada por la nitrato reductasa. Por ello, los trabajos acerca del mecanismo de regulación de la asimilación del nitrato han sido dirigidos fundamentalmente hacia el estudio de la nitrato reductasa.

En cuanto a la síntesis y degradación del enzima en plantas superiores y algas, las actividades del sistema asimilatorio de nitrato (nitrato y nitrito reductasas) varían con la intensidad de la luz, niveles de CO₂, temperatura en el medio de cultivo y con la fuente de nitrógeno (Beevers y Hageman, 1969; Losada, 1974; Morris, 1974). En general, estos enzimas presentan un nivel máximo cuando las células se cultivan en nitrato como única

fuentes de nitrógeno y su nivel es prácticamente nulo en células cultivadas con amonio.

En trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio se ha demostrado que el complejo enzimático nitrato reductasa de organismos eucarióticos está sometido a regulación por oxidación-reducción in vivo, pudiendo existir en dos formas interconvertibles: una activa, que se inactiva in vitro por condiciones reductoras, y otra inactiva, que se reactiva, también in vitro, por condiciones oxidantes (Losada, 1973). Esta interconversión ha sido estudiada a fondo a nivel celular, subcelular y molecular. Este proceso de interconversión parece tener importancia fisiológica y, de hecho, puede obtenerse nitrato reductasa en cualquiera de sus formas, activa o inactiva, según las condiciones experimentales empleadas (Losada, 1975/76).

El amonio, producto final de la reducción asimilatoria del nitrato, es, no sólo represor nutricional de los enzimas del sistema reductor del nitrato, sino que, como veremos luego, es un metabolito que, a través de un mecanismo todavía poco conocido, provoca la conversión, in vivo, de la forma oxidada activa de la nitrato reductasa

en su forma reducida inactiva. El amonio, por él mismo, no tiene ningún efecto sobre el enzima in vitro (Hewitt, 1975; Losada, 1973, 1976; Lorimer et al., 1974).

La adición de amonio a células de *Chlorella fusca* creciendo en la luz con nitrato, produce una rápida inactivación de la porción terminal del complejo enzimático nitrato reductasa. La subsiguiente eliminación del amonio del medio de cultivo lleva consigo la reactivación de la porción terminal y, consecuentemente, de la actividad total (Losada et al., 1973). El enzima inactivado in vivo por el tratamiento con amonio puede ser reactivado hasta su actividad inicial por oxidación in vitro con ferri - cianuro (Losada, 1976).

El amonio es un agente desacoplante de la fosforilación no cíclica (Losada y Arnon, 1963) y, como tal, puede desempeñar un papel regulador muy especial en el metabolismo celular (Losada, 1976, 1974). Así, se ha podido comprobar que el amonio origina un incremento en el nivel celular de los nucleótidos de piridina (Chaparro et al., 1976) y de los nucleótidos de adenina "descargados".

El arseniato (Losada et al., 1973; Maldonado et al., 1974), que es también un desacoplante de la fotofosforilación (Losada y Arnon, 1973) ejerce el mismo efecto inactivante sobre la nitrato reductasa in vivo en algas verdes. Lo mismo ocurre con la metilamina, un derivado del amonio, que en contraste con éste actúa como desacoplante sin llegar a ser asimilado (Maldonado et al., 1974).

La inactivación in vivo de la nitrato reductasa de algas verdes por adición de amonio y otros desacoplantes, requiere luz y CO_2 , pero se puede impedir la inactivación por adición de amonio, si se evita la acumulación de poder reductor (Losada et al., 1973; Stemler y Radmer, 1975). Esto se consigue en presencia de cantidades catalíticas de vitamina K_3 (que es fácilmente fotooxidada al aire y utiliza el poder reductor disponible) o de trazas de un inhibidor del flujo de electrones no cíclico, como es el 3-(3',4'-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (Losada, 1976).

La inactivación reversible de la nitrato reductasa por amonio y otros desacoplantes se ha comprobado re-

cientemente en el alga verdeazulada *Nostoc muscorum* (Ortega et al., 1977).

In vitro, la inactivación de la porción terminal del complejo NADH-nitrato reductasa requiere nucleótidos de piridina reducidos (Gómez Moreno et al., 1972) y es potenciada por ADP (Maldonado et al., 1973). El enzima inactivado in vivo o in vitro puede reactivarse por oxidación a 0°C con ferricianuro (Losada, 1976).

El grupo de Vennesland ha propuesto un sistema de regulación metabólica para la nitrato reductasa basado en la inactivación reversible por cianuro del enzima reducido (Lorimer et al., 1974). Ellos concluyen que la inactivación in vivo después del tratamiento con amonio tiene lugar por la formación de un complejo del enzima reducido con el cianuro. En otras palabras, ellos defienden que el producto de la asimilación del amonio que inhibe a la nitrato reductasa es el cianuro.

Se han propuesto, por otra parte, otros mecanismos alternativos para explicar la existencia de formas activa e inactiva de la nitrato reductasa. Por ejemplo, la

inactivación in vivo, por amonio, de la nitrato reductasa de *Neurospora* ha sido explicada por un cambio conformacional del enzima, que afecta su sensibilidad a proteasas (Subramanian y Sorger, 1972) y una inactivación similar en *Lemna* ha sido explicada por una interacción reversible proteína-proteína (Orembajo y Stewart, 1975).

En organismos procariotas, la regulación de la nitrato reductasa ha sido menos estudiada. En general, la nitrato reductasa del tipo A de bacterias es un enzima inducible que se forma sólo en ausencia de oxígeno y en presencia de nitrato, aunque en algunos organismos es suficiente con las condiciones anaeróbicas. Así ocurre en *Bacillus licheniformis* (Schulp y Stouthamer, 1970) y en *Haemophilus influenzae* (Sinclair y White, 1970) y aun en estos organismos la cantidad de nitrato reductasa formada aumenta cuando está presente el nitrato. En condiciones anaeróbicas, el NO_2^- y la azida también pueden inducir, como el nitrato, la formación de nitrato reductasa (Hackenthal y Hackenthal, 1966 ; Groot y Stouthamer, 1970; Chipaux y Pichinoty, 1970). En presencia de oxígeno la nitrato reductasa A no se puede formar (Stouthamer, 1976; Pichinoty y d'Ornano, 1961; Pichinoty, 1965). Showe y de

Moss (1968) han sugerido que la síntesis de la nitrato reductasa está controlada por un represor sensible al sustrato y al potencial redox del medio. Sin embargo, de Groot y Stouthamer (1970) han propuesto que el factor regulador de la síntesis de nitrato reductasa es el estado de oxidación-reducción de los componentes de la cadena respiratoria. Además, se cree que en todas las condiciones en que el flujo de electrones hacia el enzima es imposible, ocurre la represión de su formación. Un posible mecanismo para explicar esta represión sería que la nitrato reductasa oxidada actuaría como su propio represor. Este es un mecanismo de regulación denominado "regulación autógena de la expresión de los genes" (Golberger, 1974).

La síntesis de la nitrato reductasa asimilatoria bacteriana es reprimida por amonio; esto ocurre en *K. aerogenes* (Van't Riet et al., 1968), *Acinetobacter calcoaceticus* (Villalobo et al., 1977) y *Azotobacter chroococcum* (Guerrero et al., 1973).

En cuanto a la regulación de la actividad nitrato reductasa asimilatoria de bacterias, se ha encontrado que la nitrato reductasa de *A. chroococcum* (Guerrero et

al., 1973] y de *Acinetobacter calcoaceticus* (Villalobo et al., 1977) se afecta in vitro por el nitrato en una forma muy peculiar: concentraciones bajas (0,01 - 0,1 mM) de nitrato inactivan al enzima casi totalmente en poco tiempo, mientras que concentraciones elevadas (10 mM) no tenían practicamente efecto. El fenómeno era estrictamente dependiente de la presencia simultánea de ditionito en la mezcla de incubación, que se mantenía a 0°C. Esta inactivación de la nitrato reductasa por la acción cooperativa de ditionito y nitrato se pudo evitar en presencia de cianato o metil viológeno. El cianato no sólo protegía al enzima contra la inactivación, sino que era capaz también de revertirla.

Cuando la incubación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* y de *A. calcoaceticus* se llevó a cabo a 30°C, en vez de a 0°C, en presencia de hidrosulfito, se pudo comprobar que el nitrato dejaba de ser un requerimiento para la inactivación del enzima (Tortolero et al., 1975; Villalobo et al., 1977).

Debido a que la nitrato reductasa de ambas bacterias aerobias puede existir, in vitro, en formas activa

e inactiva, se ha sugerido que el mecanismo de interconversión postulado para la regulación de la nitrato reductasa de eucariontes puede operar también en organismos procarionóticos (Losada, 1975/76).

Nosotros hemos llevado a cabo en este trabajo un estudio, in vitro, del efecto de condiciones experimentales oxidantes y reductoras sobre la actividad nitrato reductasa soluble de *Azotobacter chroococcum*.

Esquemáticamente, la investigación realizada por nosotros puede resumirse en los siguientes puntos:

1. Inactivación de la nitrato reductasa por agentes oxidantes, tales como ferricianuro, glutatión oxidado y diclorofenol-indofenol, y su reversión por ditioeritritol.
- 2.- Inactivación de la nitrato reductasa con el sistema NADH-NADH bencil viológeno reductasa de *A. chroococcum*, en condiciones aeróbicas, y su reversión por ditioeritritol.

3. Estudio de la fotoinactivación de la nitrato reductasa por nucleótidos de flavina. Efecto de agentes protectores y naturaleza reversible de la inactivación.
4. Fotorreducción de nitrato a nitrito por la nitrato reductasa en presencia de nucleótidos de flavina y etiléndiamino-tetraacetato.

Parte de este trabajo ha sido publicado ya (Vila et al., 1978a) o presentado en comunicaciones a congresos (Vila et al., 1978b; Llobell et al., 1978).

II. MATERIALES Y METODOS

II.A. CULTIVO DE CELULAS

El organismo utilizado en este trabajo es la bacteria fijadora de nitrógeno Azotobacter chroococcum A.T.C.C. 4412, procedente de la colección de cultivos tipo de la Universidad de Salamanca.

Las células estaban almacenadas en suspensiones de 3 ml al 60% de glicerol y a -20°C . Estas suspensiones eran inoculadas en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 250 ml de medio estéril, y estos se transferían a frascos del mismo tipo de 2 litros de capacidad, que contenían 1 litro de medio esterilizado.

El medio de cultivo contenía los siguientes compuestos a las concentraciones que se indican: Manitol, 39 mM; NO_3K , 8 mM; $\text{SO}_4\text{Mg} \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,8 mM; $\text{Cl}_2\text{Ca} \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,34 mM; $\text{SO}_4\text{Fe} \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,19 mM; ClNa , 3,4 mM; MoO_4Na_2 , 0,01 mM; EDTA, sal disódica, 0,02 mM y tampón fosfato potásico, pH 7,5 , 40 mM.

El cultivo celular se realizó siempre bajo atmósfera de aire a la temperatura de 27°C en un incubador NEW

BRUNSWICK G-25, que suministraba a los cultivos una agitación constante de 200 r.p.m. .

II.B. ENZIMAS

II.B.1. *Preparación de extractos libres de células*

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento a baja velocidad en una centrifuga SORVALL RC-2B y se lavaron con tampón Tris-ClH 0,35 M, pH 7,5 .

Para proceder a su rotura se resuspendieron en 10 ml de tampón Tris-ClH 0,35 M + DTE 0,5 mM por cada gramo de peso fresco de células; posteriormente se las sometió a sonicación en un sonicador ultrasónico BRANSON, modelo Sonifier B-12 durante 3 minutos a 70 vatios. La mezcla resultante se centrifugó durante 20 minutos a 40.000xg en una centrifuga SORVALL RC-2B refrigerada. El sobrenadante de esta centrifugación constituyó el extracto crudo exento de células utilizado para la determinación de actividades enzimáticas o para la preparación de enzimas.

II.B.2. Preparación de la nitrato reductasa

El método utilizado es, esencialmente, el descrito por Guerrero et al. (1973), con algunas variaciones. El extracto crudo se centrifugó a 144.000 x g en una ultracentrífuga BECKMAN Spinco, modelo L2-50B durante 2 horas y media. El sobrenadante de esta centrifugación constituyó la preparación de nitrato reductasa S₁₄₄. Esta preparación se diluyó hasta hacerla 50 mM en Tris-ClH, pH 7,5, + DTE 0,5 mM y se aplicó a una columna que contenía un lecho de DEAE-celulosa (50 mm de altura y 25 mm de diámetro) que se había equilibrado previamente con el mismo tampón. La nitrato reductasa se eluyó de la columna con el mismo tampón al que se había añadido 200 mM de ClNa.

Salvo en los casos que se indique, esta es la preparación de nitrato reductasa utilizada para los distintos experimentos presentados en este trabajo.

Todas las operaciones descritas se llevaron a cabo entre 0° y 4°C de temperatura.

III.B.3. *Ensayo de la actividad nitrato reductasa*

El ensayo estandar de la actividad nitrato reductasa se llevó a cabo al aire en tubos de ensayo de 5ml. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 3 minutos y contenía en un volumen final de 1 ml : tampón fosfato potásico, pH 7,0 , 100 μ moles; metil viológeno, 0,15 μ moles; NO_3K , 10 μ moles; $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$, en 0,1 ml de CO_3HNa 95 mM, 0,8mg y una cantidad adecuada de preparación enzimática.

Se hicieron controles apropiados que demostraron que las concentraciones empleadas de los distintos reactivos usados en el trabajo no tenían interferencias en el ensayo de la actividad.

Todas las incubaciones realizadas tuvieron lugar en presencia de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,0.

II.C. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

II.C.1. *Anaerobiosis en mezclas de incubación y ensayos*

En los casos en que fué necesario hacer trata-

mientos anaeróbicos, las soluciones correspondientes se pusieron en vasijas de Warburg. Para hacer la anaerobiosis se gaseó con nitrógeno durante 15 minutos. El aparato de Warburg utilizado fué un AMINCO, modelo S-14.

Cuando hizo falta iluminación se emplearon lámparas de haz frío de 100 vatios que daban una intensidad máxima de 25.000 luces. La intensidad de la luz fué medida con un fotómetro YSI-KETTERING, modelo 65-A.

II.C.2. *Cromatografía de filtración en gel*

Los tipos de gel utilizados en este trabajo han sido : Sephadex G-25 y G-100, suministrados por PHARMACIA, Upsala, Suecia. Para la recogida de fracciones se utilizó un colector automático LKB, modelo Ultrorac.

II.C.3. *Determinaciones espectrofotométricas*

Se utilizó un espectrofotómetro PYE- UNICAM SP-1800 con registro automático y, para las medidas colorimétricas en la zona visible, un Spectronic 700 de BAUSCH & LOMB.

II.C.4. *Determinación de nitrito*

El nitrito se determinó por la reacción de diazotación de Griess-Ilosway, según la técnica propuesta por Snell y Snell (1949).

A la alícuota en que se desea determinar la cantidad de nitrito se le añade 1 ml de reactivo de sulfanilamida al 1% (p/v) en ClH 2,5 M, y 1 ml de reactivo de N(-naftil)etilendiamina al 0,2% (p/v). La mezcla anterior se completa con agua hasta 5 ml y se deja desarrollar el color durante 10 min a temperatura ambiente, antes de la lectura en el fotocolorímetro. Se empleó una recta de calibrado construida con cantidades crecientes de nitrito tratadas en las condiciones previamente descritas.

II.C.5. *Determinación de proteína*

Para la determinación de la cantidad de proteína se utilizaron el método de Lowry et al. (1951) y una modificación de éste realizada por Bailey (1967) usando-

se en ambos casos seroalbúmina como proteína patrón.

II.C.6. *Medidas de pH*

El pH de las soluciones tampones empleadas se determinó con un medidor de pH BECKMAN modelo Expandomatic o con un medidor de pH METHROM modelo E-512 con esca la expandida.

II.D. REACTIVOS

Los siguientes compuestos: FAD, FMN, NADH, NADPH, NADP⁺ y Tris se adquirieron a SIGMA, San Luis, U.S.A. Bencil viológeno y metil viológeno, procedían de MANN, New York, U.S.A. y de SERVA, Heidelberg, Alemania. PHARMACIA, de Upsala, Suecia, fue el proveedor de los diferen tes tipos de Sephadex.

La deazaflavina fue cedida por el Departamento de Genética de esta Facultad.

El resto de los productos utilizados se adquirie ron a las firmas: SIGMA, MERCK, RIEDEL y FISCHER. El agua

se desionizó en un destilador DRA.

El nitrógeno, de alta pureza, fue suministrado por la S.E.O.

III. RESULTADOS

III.A. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA NITRATO REDUCTASA CON AGENTES OXIDANTES

III.A.1. *Inactivación de la nitrato reductasa de A. chroococum por diversos compuestos oxidantes*

Los resultados que se presentan en la Tabla I muestran el efecto de distintos compuestos oxidantes sobre la actividad de la nitrato reductasa parcialmente purificada. Se puede observar que el ferricianuro, el DPIP y el glutatión oxidado inactivan de forma muy marcada al enzima. La cistina también ejerce efecto inactivante; en cambio, ni el NAD^+ , ni el NADP^+ tienen ningún efecto sobre la citada actividad.

El enzima inactivo no recobró su actividad al dializarlo o filtrarlo a través de Sephadex G-25.

III.A.2. *Reversión con tioles de la inactivación por oxidantes de la nitrato reductasa de A. chroococum*

La Tabla II presenta los resultados obtenidos al tratar con diversos tioles al enzima previamente inac-

TABLA I

INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum* POR DIVERSOS COMPUESTOS OXIDANTES

ADICION	CONCENTRACION (mM)	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD
Ninguna	—	100
Glutation oxid.	10	32
Cistina	10	50
NAD ⁺	0,3	90
NADP ⁺	0,3	95
DPIP	0,5	15
Ferricianuro	0,2	8

La nitrato reductasa (2 mg/ml) fue incubada en presencia de los compuestos indicados durante 10 minutos a 30°C. Después de la incubación, se determinó la actividad nitrato reductasa en una alícuota de la mezcla de incubación y según el ensayo estandar de actividad descrito en Materiales y Métodos.

Las actividades están expresadas en porcentajes de la actividad del control sin adiciones. La actividad del control fué de 420 nmoles de NO₂⁻ / min / mg de proteína.

TABLA II

REVERSION CON TIOLES DE LA INACTIVACION POR OXIDANTES DE
LA NITRATO REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum*

ADICION	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD			
	—	+ Ditio- eritritol	+ Cisteína	+ Glutati6n red.
Ninguna	100	115	95	90
Glutati6n ox.	30	85	25	32
DPIP	25	80	28	23

La nitrato reductasa (2 mg/ml) fu6 incubada en presencia de 10 mM de glutati6n oxidado y 10 mM de DPIP, donde se indica, durante 10 minutos. Al cabo de ese tiempo se determin6 la actividad nitrato reductasa en al6cuotas de las mezclas y seg6n el ensayo estandar de actividad descrito en Materiales y M6todos. Posteriormente se a6nadi6 5 mM de DTE, ciste6na o glutati6n reducido y se incub6 durante 60 minutos. Al cabo de ese tiempo se determin6 la actividad nitrato reductasa de igual modo.

Las actividades est6n expresadas en porcentajes de la actividad del control sin adiciones. La actividad del control fu6 de 400 n moles de NO_2^- / min / mg de prote6na.

tivado con glutati3n oxidado o DPIP. Como se puede observar, el DTE revierte el efecto tanto del glutati3n oxidado como del DPIP, recuper3ndose actividad, en ambos casos, casi hasta la totalidad.

Ninguno de los otros tioles empleados, la cisteína o el glutati3n reducido, fueron capaces de reactivar, en las mismas condiciones experimentales, al enzima inactivo.

III.B. ESTUDIO DE LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA
DE A. chroococcum POR PODER REDUCTOR Y AIRE

III.B.1. *Inactivación de la nitrato reductasa de A. chroo-
coccum dependiente de poder reductor y aire*

Las dos preparaciones de nitrato reductasa utilizadas en este trabajo (ver Materiales y Métodos) exhiben actividad de NAD(P)H-bencil(metil) viológeno reductasa (Naik y Nicholas, 1966; Tortolero et al., 1975). Puesto que esta actividad deshidrogenásica es capaz de reducir a la nitrato reductasa (Tortolero et al., 1975), era interesante estudiar el efecto de la incubación de la preparación de la nitrato reductasa con NAD(P)H y bencil- ó metil viológeno. Los resultados que describimos en la Tabla III demuestran que la nitrato reductasa de *A. chroococcum* se inactiva cuando se incuba en presencia de bencil viológeno y de NAD(P)H y que este proceso requiere condiciones aeróbicas. Los nucleótidos de adenina solos no ejercían ningún efecto.

La Tabla III enseña también que la preparación de nitrato reductasa utilizada (S₁₄₄) posee poder reduc -

tor endógeno, puesto que en ausencia de NAD(P)H exógeno se logra una inactivación de la nitrato reductasa superior al 50%. En efecto, si la nitrato reductasa S₁₄₄ se sometía previamente a una filtración a través de una columna conteniendo Sphadex G-25, la inactivación era estrictamente dependiente de adición de NAD(P)H.

Las flavinas, cuando se utilizaron en sustitución de los viológenos fueron muy poco eficientes.

Como se vé en la Tabla, cuando las incubaciones se hicieron en atmósfera de nitrógeno en vez de aire, en ninguno de los casos ensayados tuvo lugar la inactivación de la nitrato reductasa.

III.B.2. *Estudio cinético de la inactivación de la nitrato reductasa por poder reductor y aire*

En la Fig. 1 se representa el tanto por ciento de actividad nitrato reductasa frente al tiempo de incubación del enzima con poder reductor en presencia de aire. Como se puede ver en la figura, la inactivación es rápida; a los cinco minutos de incubación, la actividad del enzima queda reducida aproximadamente a un 30%.

TABLA III

INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum* DEPENDIENTE DE PODER REDUCTOR Y AIRE

ADICION	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD	
	Nitrógeno	Aire
Ninguna	100	100
BV	100	45
NADH	100	95
NADH, BV	100	18
NADPH	100	100
NADPH, BV	100	27

La nitrato reductasa S₁₄₄ (4mg/ml) fué incubada a 30°C durante 15 minutos en presencia de los compuestos indicados a las siguientes concentraciones: NADH y NADPH, 0,3 mM; BV, 1,5 mM. La actividad nitrato reductasa se determinó en alícuotas de las mezclas de incubación y según el ensayo estandar de actividad descrito en Materiales y Métodos. Las actividades están expresadas en porcentajes de la actividad del control sin adiciones. La actividad del control era de 300 n moles de NO₂⁻ / min / mg proteína.

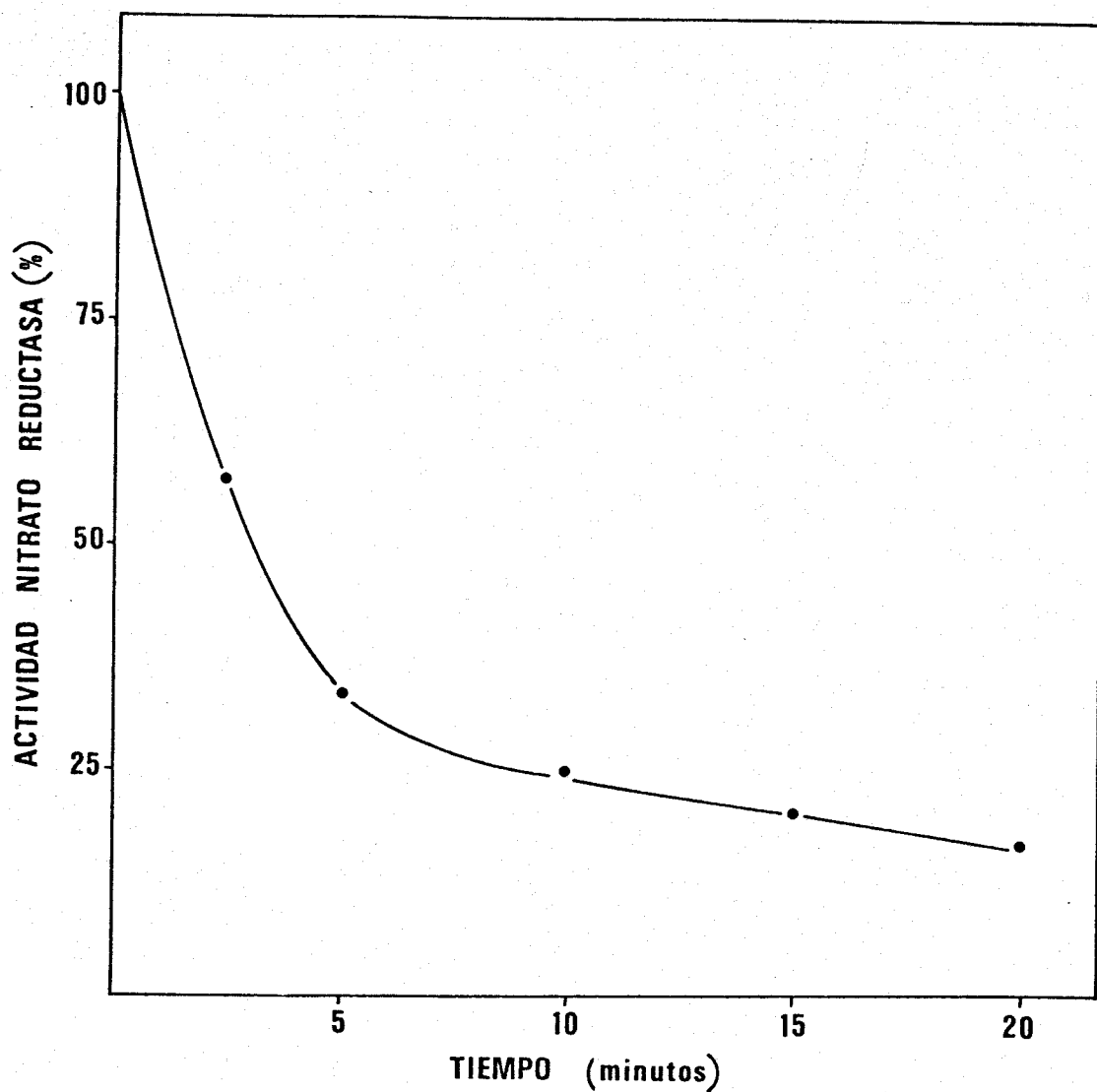


Fig. 1. Cinética de la inactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* dependiente de poder reductor y aire. La nitrato reductasa S₁₄₄ (4 mg/ml) fué incubada a 30°C en una mezcla que contenía NADH 0,3 mM y BV 1,5 mM. La actividad nitrato reductasa se determinó tomando una alícuota de la mezcla a cada tiempo indicado y según el ensayo estandar de actividad descrito en Materiales y Métodos. Las actividades están representadas como porcentajes de la actividad del control sin adiciones. Esta actividad era de 320 nmoles de NO₂⁻ / min / mg de proteína.

III.B.3. *Efecto del pH*

La inactivación de la nitrato reductasa por incubación con NADH y BV al aire depende del pH en el que se efectúe la incubación.

En la Fig.2 se representa la cinética de inactivación a varios pHs. Como se puede observar, la inactivación es máxima en la zona de pH comprendida entre los valores 7 y 8.

III.B.4. *Influencia de las concentraciones de NADH y BV en la inactivación de la nitrato reductasa de A. chroococcum por poder reductor y aire*

La concentración del NADH durante la inactivación influye en la intensidad de esta, como se puede ver en la Fig.3, haciéndose máxima dicha inactivación a concentraciones correspondientes a 0,2 ó 0,3 mM.

La Fig.4 muestra que la concentración de bencil viológeno usada también influye en la inactivación de la nitrato reductasa que estamos estudiando. Como se observa,

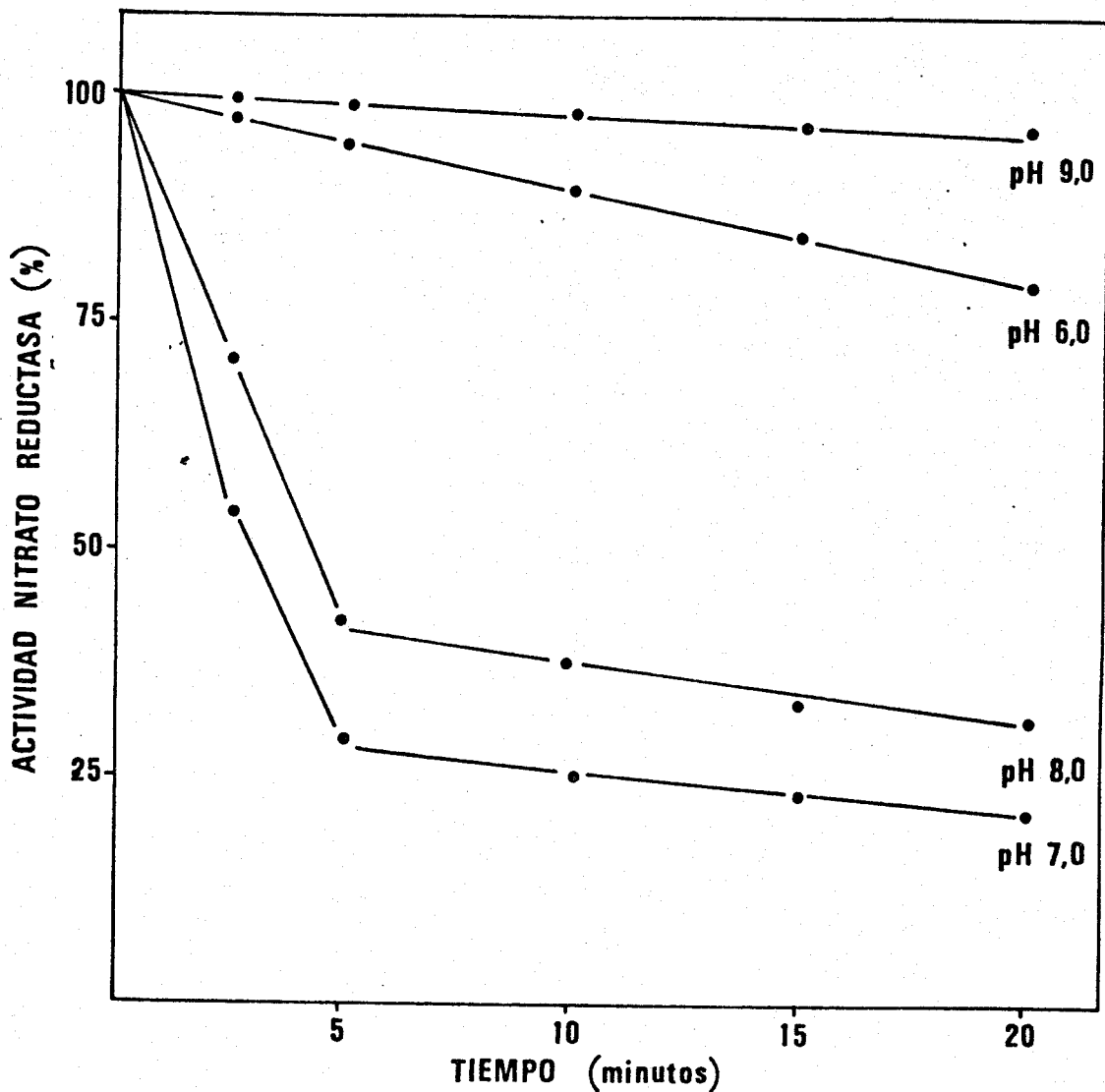


Fig. 2. Efecto del pH en la inactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* dependiente de poder reductor y aire. Las condiciones experimentales fueron como en la Tabla III, excepto que se utilizaron los siguientes tampones, a la concentración de 1,50mM: fosfato potásico, pH 6.0 y 7.0; Tris-HCl, pH 8.0 y glicil-glicina, pH 9.0. La actividad de la preparación de nitrato reductasa utilizada era 300 nmoles de NO_2^- /min x mg de proteína.

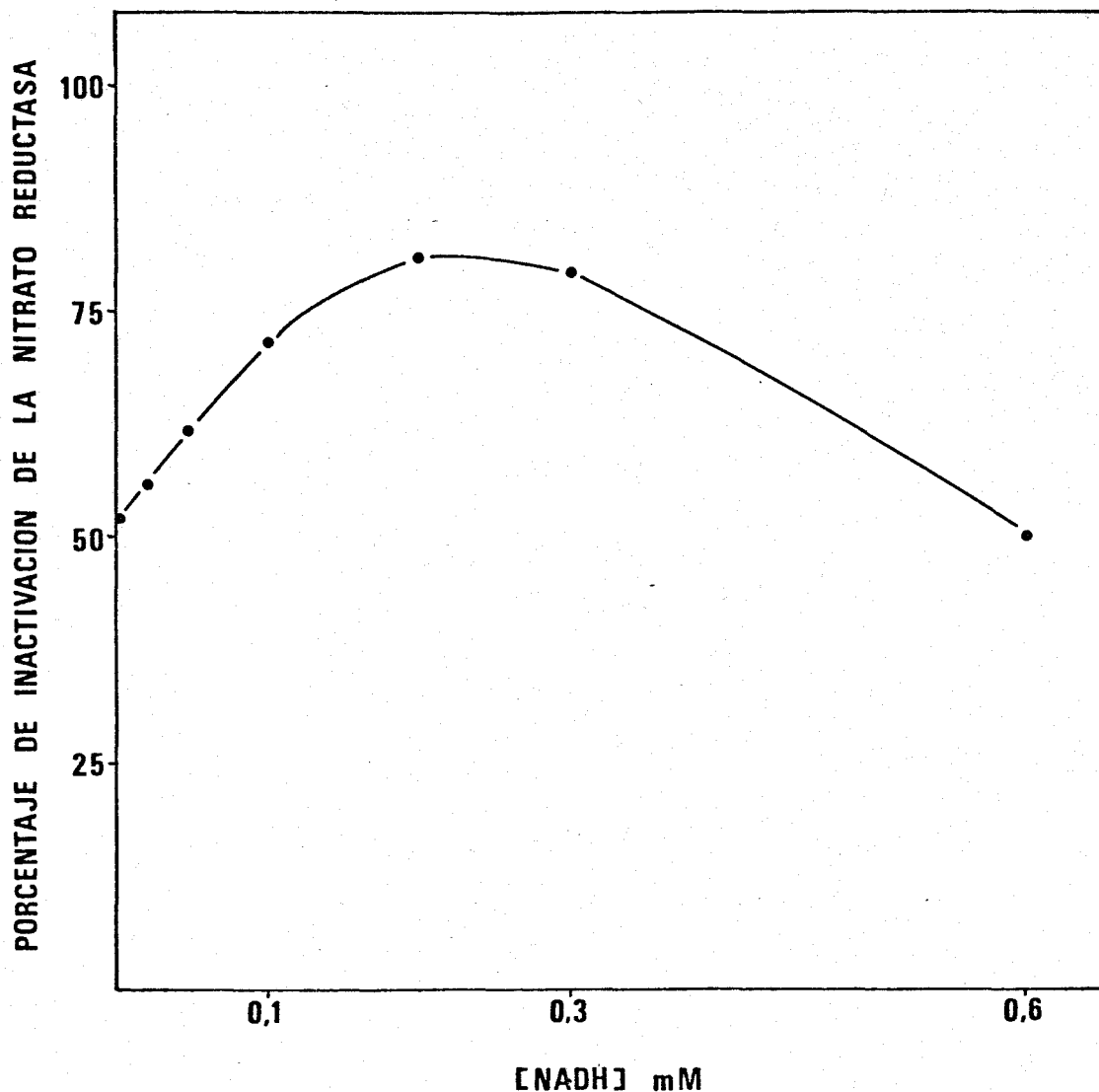


Fig. 3. Efecto de la concentración de NADH en la inactivación de la nitrato reductasa de A. chroococcum dependiente de poder reductor y aire. Las condiciones experimentales fueron como en la Tabla III excepto que se utilizó NADH a las concentraciones que se indican en la figura. La actividad de la preparación de nitrato reductasa utilizada (S_{144}) era de $325 \text{ nmoles de NO}_2^- / \text{min} / \text{mg de proteína}$.

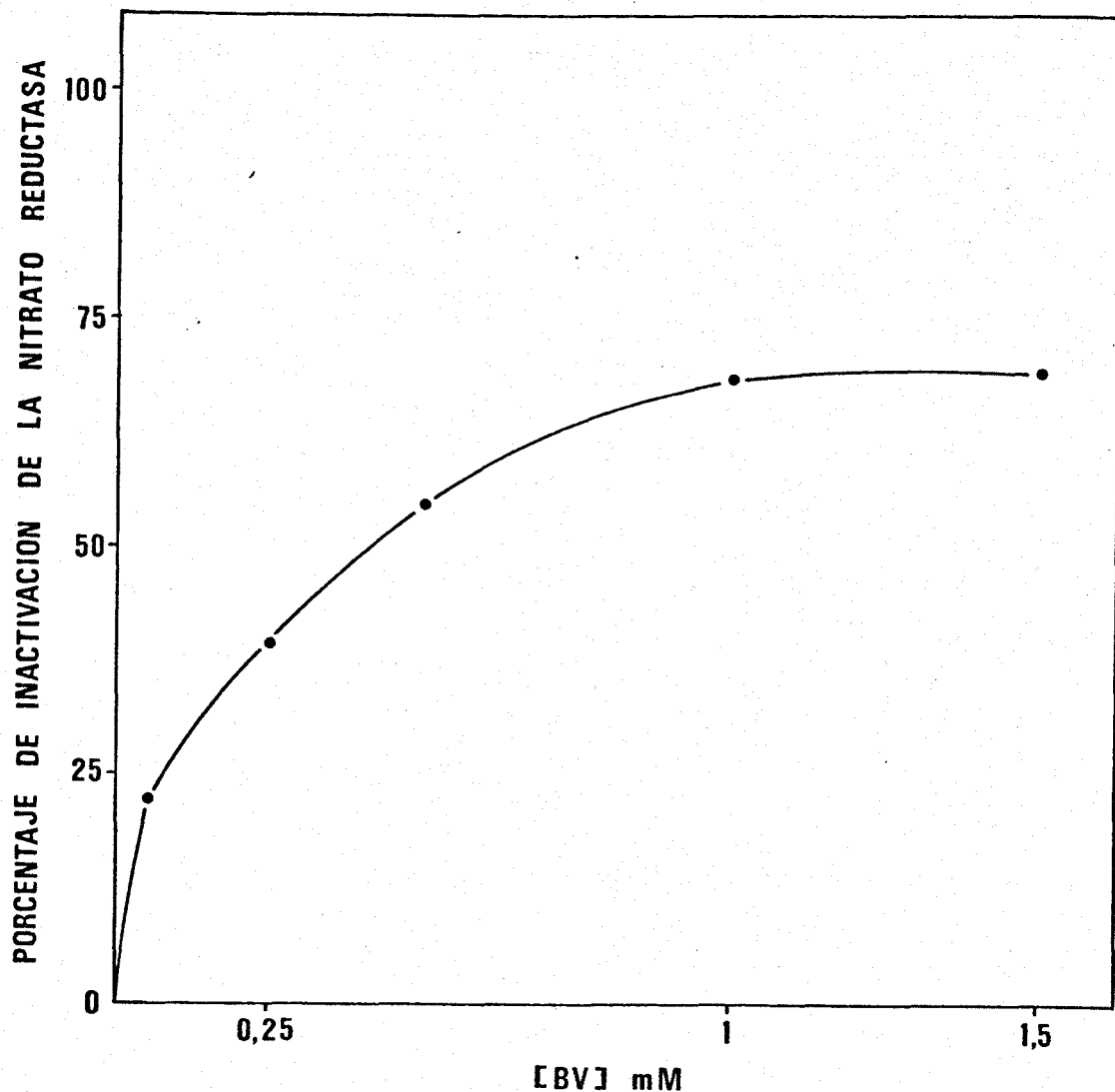


Fig. 4. Efecto de la concentración de Bencil Viológico en la inactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* dependiente de poder reductor y aire. Las condiciones experimentales fueron como en la Tabla III excepto que se utilizó BV a las concentraciones que se indican en la figura. La actividad específica de la preparación de nitrato reductasa utilizada (S_{144}) era de 340 nmoles de NO_2^- / min / mg de proteína.

se alcanza el máximo de inactivación a una concentración de 1 mM. En las Fig.3 y 4, el 0% de inactivación corresponde a la actividad del enzima sin inactivar.

III.B.5. *Protección contra la inactivación por poder reductor y aire de la nitrato reductasa de A. chroococcum*

En los resultados presentados en la Tabla IV se puede ver que el DTE protege muy efectivamente contra la inactivación producida en la nitrato reductasa por NADH y BV al aire. Asimismo, es efectivo el glutatión reducido, y, en menor grado, el nitrato.

También se puede ver en esta Tabla que el CNO⁻ no es capaz de proteger al enzima contra esta inactivación.

III.B.6. *Reversión de la inactivación producida por NADH, BV y aire sobre la nitrato reductasa*

En la Tabla V se representan los resultados obtenidos al tratar con DTE una preparación de nitrato reductasa previamente inactivada con NADH y BV al aire. Co-

no se puede ver, el DTE restaura casi totalmente la actividad enzimática.

TABLA IV

EFECTO DE DIVERSOS COMPUESTOS SOBRE LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum* DEPENDIENTE DE PODER REDUCTOR Y AIRE

ADICION	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD
Ninguna	100
NADH, BV	18
NADH, BV, CNO^-	20
NADH, BV, NO_3^-	40
NADH, BV, DTE	72
NADH, BV, Glutación red.	55

Las condiciones experimentales fueron como en la Tabla III (tratamiento al aire). Donde se indica, se utilizó CNO^- 1 mM; DTE, 5 mM y glutación reducido, 10 mM. La actividad de la muestra control era de 310 n moles de NO_2^- / min / mg proteína.

TABLA V

REVERSION CON DTE DE LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum* DEPENDIENTE DE PODER REDUCTOR Y AIRE

ADICION	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD	
	—	+DTE
Ninguna	100	102
NADH, BV	16	78

Las condiciones experimentales fueron las mismas de la Tabla III excepto que despues de los 15 minutos de incubación se añadió DTE a una concentración final de 5 mM y se dejó estar durante 60 minutos. Al cabo de este tiempo se determinó la actividad nitrato reductasa en una alícuota de la mezcla de incubación. La actividad del control era de 340 nmoles de NO_2^- formado / min / mg de proteína.

III.C. EFECTO DE LA LUZ Y NUCLEOTIDOS FLAVINICOS SOBRE LA
ACTIVIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. chroococcum*.

III.C.1. *Fotoinactivación de la nitrato reductasa por nucleótidos flavínicos*

Los resultados presentados en la Tabla VI muestran el efecto inactivante, que, sobre la actividad nitrato reductásica tienen los nucleótidos flavínicos excitados en la luz. Como se puede observar, los nucleótidos, la riboflavina y la deazaflavina ejercen una inactivación muy fuerte del enzima. La luz, por sí misma, no ejerce efecto alguno.

Si la mezcla de inactivación se mantiene en la oscuridad, la actividad se mantiene completamente.

III.C.2. *Efecto de la concentración de FMN en la fotoinactivación*

En la Fig.5 se vé la influencia de la concentración del FMN en la inactivación a la luz de la nitrato reductasa. Como se puede observar, a una concentración de

TABLA VI

FOTOINACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Azotobacter*
chroococcum POR NUCLEOTIDOS FLAVINICOS

ADICION	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD
Ninguna	100
FMN	18
FAD	20
Riboflavina	20
Deazaflavina	19
FMN, oscuridad	100

La nitrato reductasa (2mg/ml) fué incubada a 30°C en vasijas de Warburg bajo atmósfera de nitrógeno durante 8 minutos con una iluminación de 25.000 luces de intensidad y en presencia de los compuestos indicados a una concentración de 0,2 mM. Despues del tiempo de incubación se determinó la actividad nitrato reductasa en una alícuota de las mezclas de incubación y según el ensayo estandar de actividad descrito en Materiales y Metodos. Las actividades están expresadas en porcentajes de actividad del control sin adiciones. La actividad del control era de 450 nmoles de NO_2^- / min/ mg de proteína.

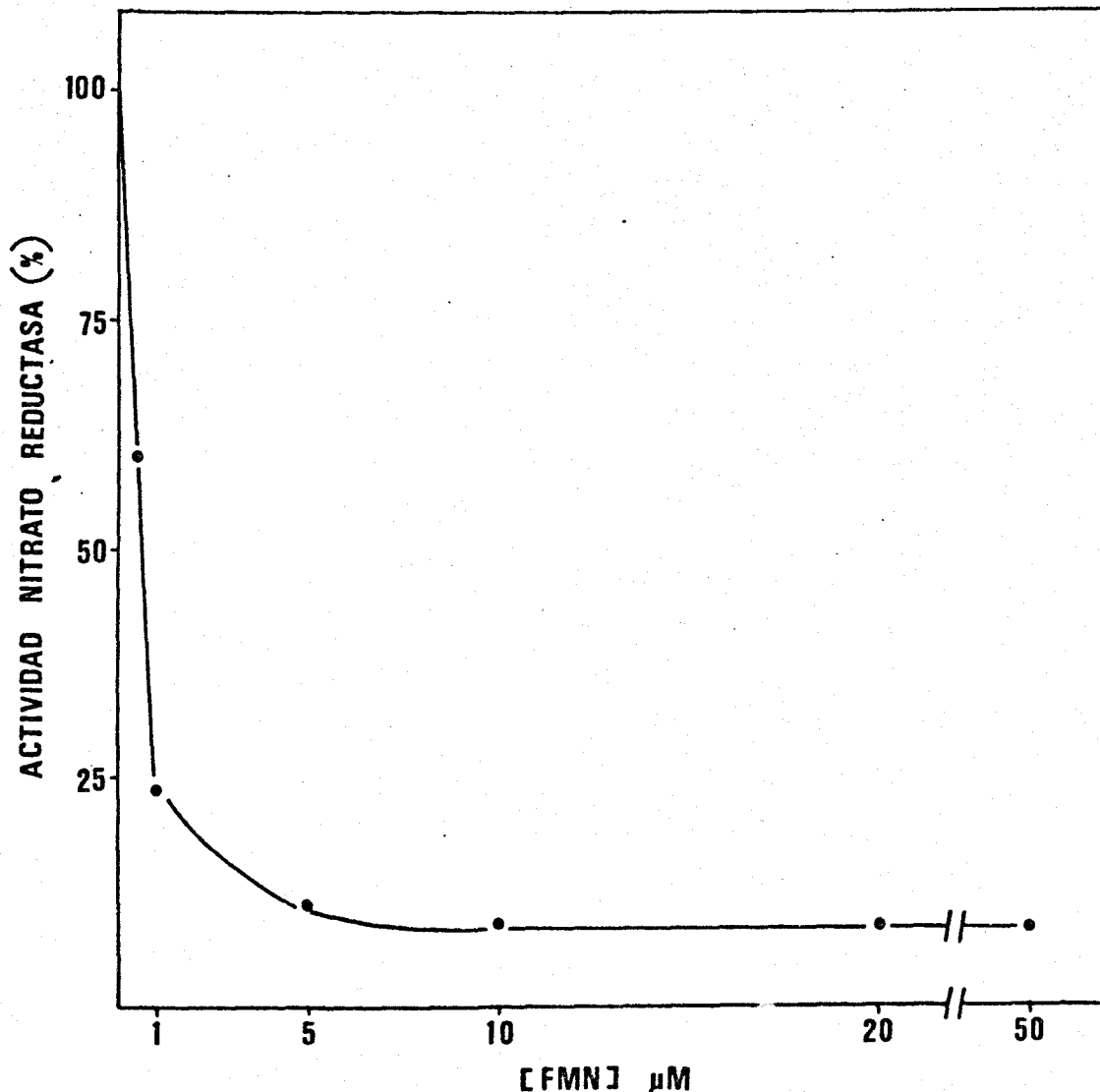


Fig. 5. Efecto de la concentración de FMN en la fotoinactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* por nucleótidos flavínicos. La nitrato reductasa (1,8 mg/ml) se incubó a 30°C, bajo atmósfera de nitrógeno, durante 8 minutos en presencia de FMN a las tres concentraciones que se indican, con una iluminación de 25.000 luces de intensidad. La actividad nitrato reductasa se determinó en una alícuota de cada mezcla y según el ensayo estandar de actividad descrito en materiales y métodos. Las actividades están representadas como porcentajes de actividad del control sin adiciones. Dicha actividad era de 450 nmoles de $\text{NO}_2^-/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína.

5 μM , ya se alcanza el máximo de inactivación.

III.C.3. *Estudio cinético de la fotoinactivación de la nitrato reductasa de A. chroococcum*

En la Fig.6 se representa el tanto por ciento de inactivación conseguido frente al tiempo de incubación de la mezcla de inactivación. Como se puede observar, la fotoinactivación de la nitrato reductasa es muy rápida. Al cabo de dos minutos la actividad ha quedado reducida a menos del 40%.

III.C.4. *Efecto del pH*

El efecto que tiene el pH en la fotoinactivación de la nitrato reductasa con nucleótidos flavínicos está representado en la Fig.7 . Como se puede observar, el pH óptimo está entre 7 y 7,5 .

III.C.5. *Efecto del EDTA en la fotoinactivación de la nitrato reductasa por nucleótidos flavínicos*

En la Tabla VII se vé como el EDTA, cuando está

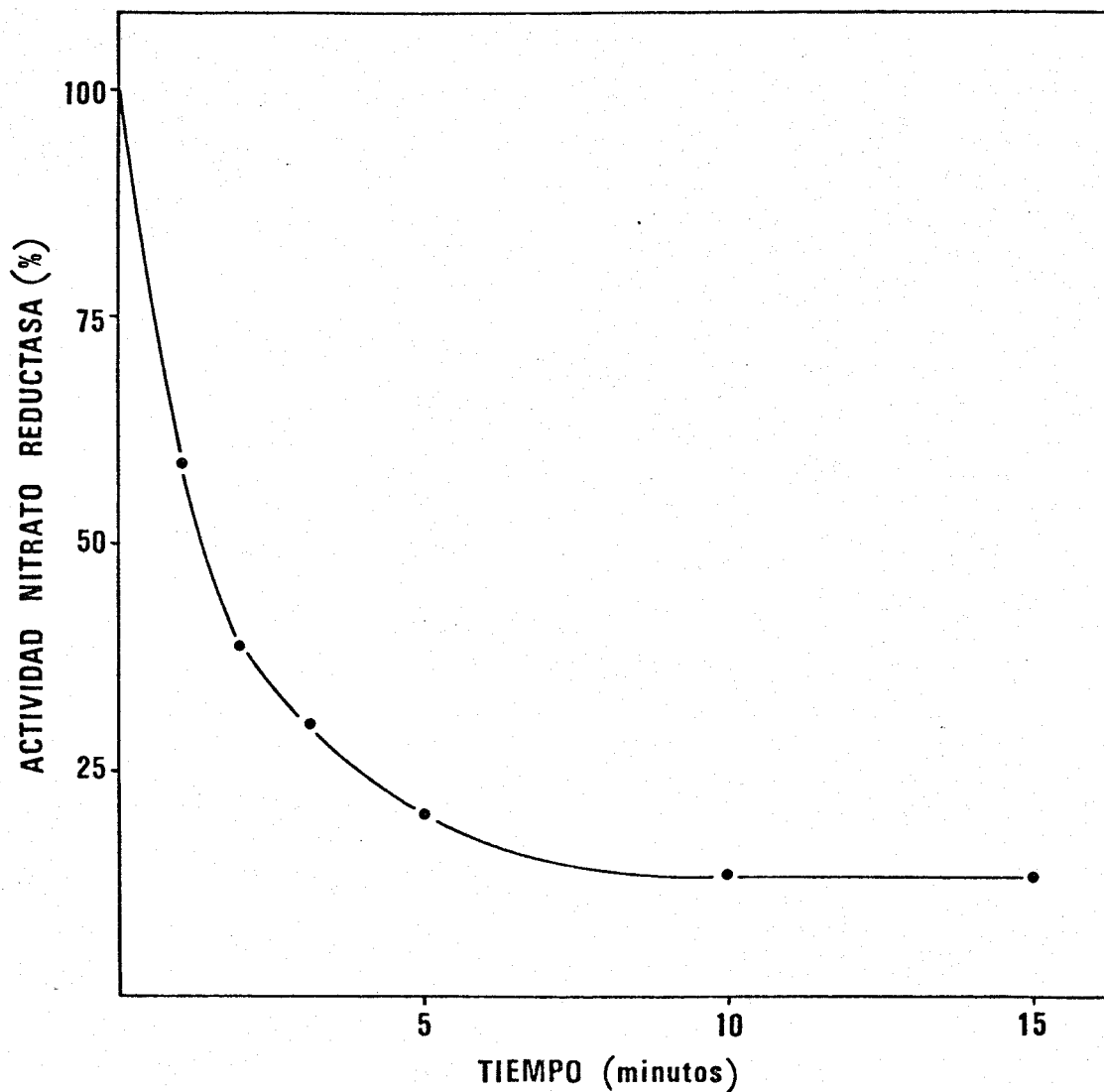


Fig. 6. Cinética de la fotoinactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* por nucleótidos flavínicos. La nitrato reductasa (1,9 mg/ml) se incubó a 30°C bajo atmósfera de nitrógeno en presencia de FMN 0,2 mM con una iluminación de 25.000 luces de intensidad. A los tiempos indicados se determinó la actividad nitrato reductasa en alícuotas de la mezcla y según el ensayo estandar de actividad descrito en Materiales y Métodos. Las actividades están representadas como porcentajes de la actividad del control sin adiciones. La actividad del control era de 450 nmoles de NO_2^- / min / mg de proteína.

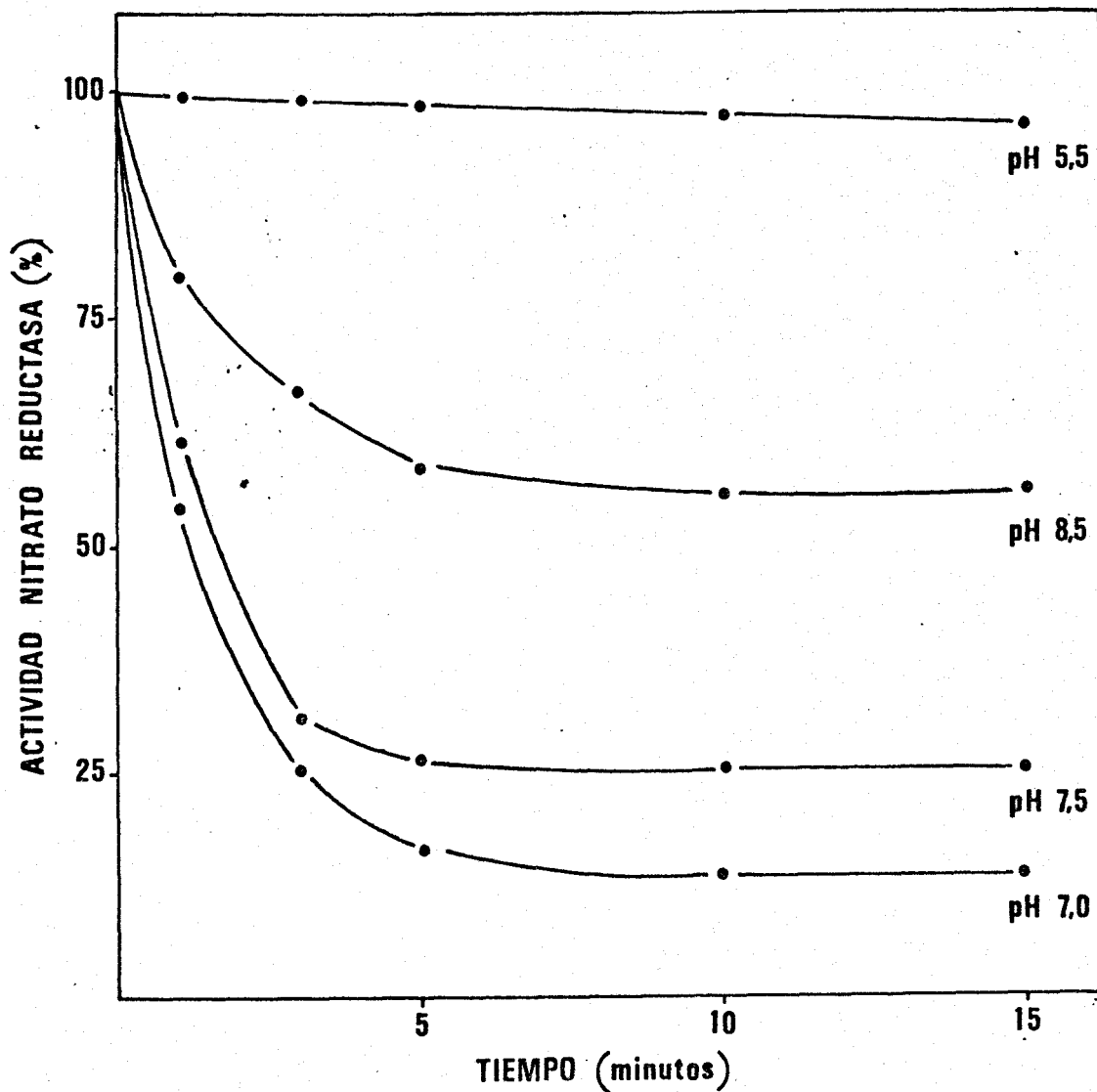


Fig. 7. Efecto del pH en la fotoinactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* por nucleótidos flavínicos. Las condiciones experimentales fueron como en la Fig.6, excepto que se utilizaron los siguientes tampones, a la concentración de 150mM: fosfato potásico, pH 5.5 y 7.0; Tris-HCl, pH 7.5 y 8.5. La actividad de la preparación de nitrato reductasa empleada era de 430 nmoles de $\text{NO}_2^-/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína.

TABLA VII

EFEECTO DEL EDTA SOBRE LA FOTOINACTIVACION DE LA NITRATO
REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum* POR NUCLEOTIDOS
FLAVINICOS

ADICION	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD
Ninguna	100
FMN	10
EDTA	105
FMN, EDTA	95

Las condiciones experimentales fueron como en la Ta-
bla VI. Donde se indica, se utilizó EDTA a una concentra-
ción final de 1 mM. La actividad de la muestra control
era de 420 nmoles de NO_2^- formado/ min / mg de proteína

presente en la mezcla de incubación, impide la inactivación de la nitrato reductasa.

La concentración de EDTA empleada, influye en el efecto protector que ejerce; esto se puede observar en la Fig.8 . El máximo de protección se alcanza, aproximadamente, cuando la concentración del EDTA es de 1 mM.

III.C.6. *Protección por diversos compuestos contra la fotoinactivación de la nitrato reductasa de A.chroococcum*

Además del EDTA, hay otros compuestos que ejercen una acción protectora de la actividad nitrato reductásica, frente a la inactivación que ésta sufre al someterla a la acción de la luz en presencia de nucleótidos de flavina.

Como se puede ver en la Tabla VIII, el DTE y el NADH protegen completamente la actividad; el ascorbato es también muy eficiente y, un poco menos, el glutatión reducido y la cisteína.

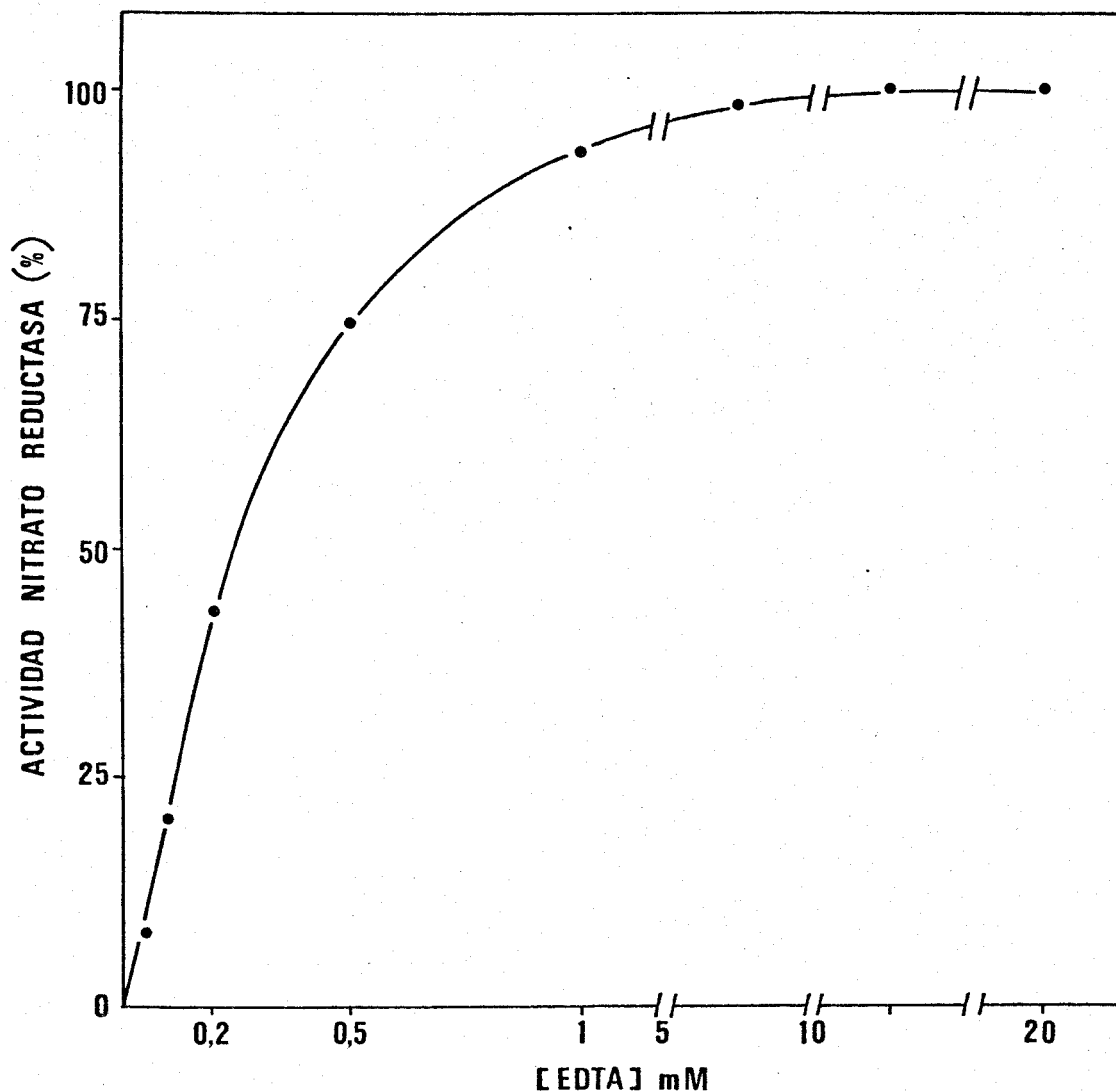


Fig. 8. Efecto de la concentración de EDTA sobre la fotoinactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* por nucleótidos flavínicos. La nitrato reductasa (2 mg/ml) se incubó a 30°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 8 minutos en presencia de FMN 0,2 mM y las concentraciones que se indican de EDTA, con iluminación de 25.000 luces de intensidad. La actividad nitrato reductasa se determinó en una alícuota de cada mezcla según el ensayo estandar de actividad descrito en Materiales y Métodos. Las actividades están representadas como porcentajes de la actividad del control sin adiciones. Dicha actividad era de 480 nmoles NO_2^- / min / mg de proteína.

TABLA VIII

EFFECTO DE DIVERSOS COMPUESTOS SOBRE LA FOTOINACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum* POR NUCLEOTIDOS FLAVINICOS

ADICION	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD
Ninguna	100
FMN	6
FMN, EDTA	90
FMN, Ascorbato	80
FMN, NADH	103
FMN, DTE	103
FMN, Cisteína	75
FMN, Glutation red.	66
FMN, I ⁻	7

La nitrato reductasa (1,6 mg/ml) se incubó, donde se indica, en presencia de los compuestos señalados en la tabla, a las siguientes concentraciones finales: FMN, 0,2mM; EDTA, 1 mM; ascorbato sódico, 10 mM; NADH, 0,3 mM; yoduro potásico, 10 mM. Las condiciones experimentales de iluminación, anaerobicidad y medida de la actividad nitrato reductasa fueron como en la Tabla VI. La actividad de la muestra control era de 470 nmoles de NO₂⁻ formado /min/ mg de proteína.

El ión yoduro no tiene efecto alguno.

III.C.7. *Influencia de la intensidad y tipo de luz empleados en la fotoinactivación de la nitrato reductasa*

La intensidad de la luz empleada para la fotoinactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*, influye en la magnitud de la inactivación conseguida. En la Fig.9 se representan los resultados obtenidos al someter al enzima a iluminación en presencia de FMN, variando la intensidad de la luz. Como se puede observar, hay un umbral de intensidad, a partir del cual, con un pequeño cambio, aumenta la inactivación en un gran porcentaje.

También influye el tipo de luz empleado. Los resultados obtenidos al variar la luz empleada se presentan en la Tabla IX donde se indica que es la luz azul la responsable de la inactivación de la nitrato reductasa. Con luz roja no tiene lugar esta inactivación.

III.C.8. *Reversión con DTE de la fotoinactivación de la nitrato reductasa de A. chroococcum*

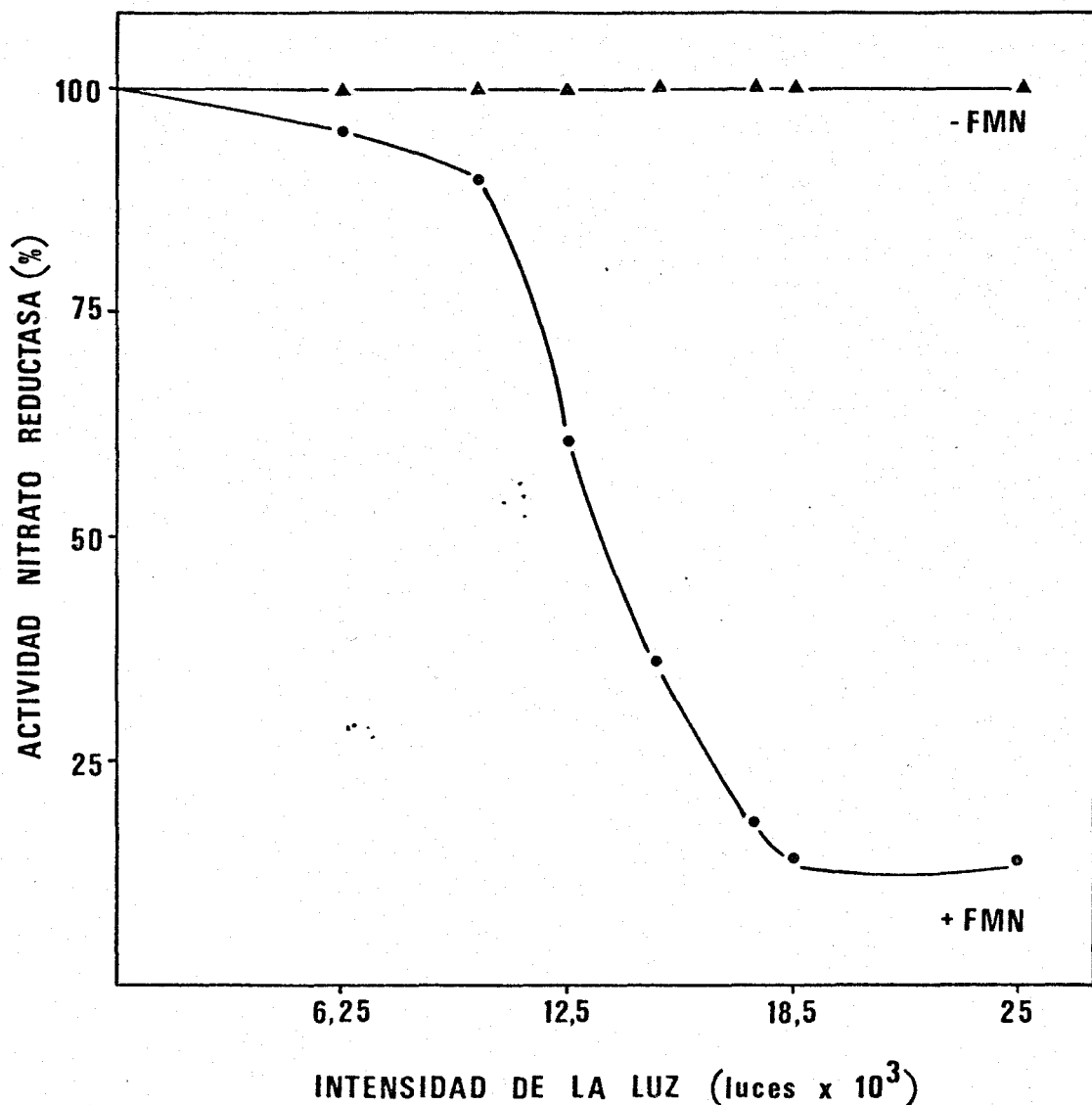


Fig. 9. Efecto de la intensidad de la luz en la fotoinactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* por nucleótidos flavínicos. La nitrato reductasa (2,1 mg/ml) se incubó a 30°C bajo atmósfera de nitrógeno, durante 8 min en presencia de FMN 0,2 mM, con iluminación a las distintas intensidades de luz que se indican. La actividad nitrato reductasa se determinó como en la fig. 8. Las actividades están representadas como porcentajes de la actividad del control sin iluminar. Dicha actividad era de 470 nmoles de NO_2^- / min / mg de proteína.

TABLA IX

EFFECTO DE DISTINTOS TIPOS DE LUZ EN LA FOTOINACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum* POR NUCLEOTIDOS FLAVINICOS

TIPO DE LUZ	INTENSIDAD (%)	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD	
		-FMN	+FMN
Blanca	100	100	10
Roja	48	100	93
Azul	40	100	35

La nitrato reductasa (2 mg/ml) se incubó a 30°C bajo atmosfera de nitrógeno durante 8 minutos en presencia de 0,2 mM de FMN y con los distintos tipos de luces indicados conseguidos con filtros de plexiglas rojo o azul respectivamente. La actividad nitrato reductasa se determinó en una alícuota de las mezclas y según el ensayo estandar de actividad descrito en Materiales y Métodos. Las actividades están expresadas en porcentajes de la actividad del control sin adiciones. Esta actividad era de 420 nmoles de NO_2^- / min / mg de proteína. El 100% de intensidad de luz corresponde a 25.000 luces.

En el caso de la inactivación de la nitrato reductasa con luz y nucleótidos flavínicos, el DTE, como en los otros dos casos de inactivación estudiados en este trabajo, consigue restaurar la actividad casi al 100%.

Estos resultados se presentan en la Tabla X . Como podemos ver, tanto en el caso en que se utiliza FMN, como en el que se utiliza FAD, el DTE es capaz de revertir la inactivación causada por estos nucleótidos. El DTE también ejerce su acción reactivante sobre un enzima sin inactivar, tratado con FMN, en la oscuridad. La concentración de DTE empleada influye en esta reversión, alcanzándose el máximo cuando el DTE se utiliza a una concentración de 5 mM, como se recoge en la Fig.10 .

III.C.9. *Cinética de la reversión con DTE*

En la Fig.11 se representan los resultados obtenidos al incubar la nitrato reductasa inactiva en presencia y ausencia de DTE durante distintos periodos de tiempo. La figura indica que, al cabo de una hora de incubación en presencia de DTE, la actividad específica de la nitrato reductasa ha subido desde 0,15 hasta mas de 0,30 U/ mg de proteína.

TABLA X

REVERSION CON DTE DE LA FOTOINACTIVACION DE LA NITRATO
 REDUCTASA DE *Azotobacter chroococcum* POR NUCLEOTIDOS
 FLAVINICOS

ADICION	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD	
	—	+ DTE
Ninguna	100	125
FMN	10	110
FAD	15	100
FMN, oscuridad	100	125

La nitrato reductasa (2,2 mg/ml) fué incubada a 30°C en vasijas de Warburg bajo atmósfera de nitrógeno durante 8 minutos con una iluminación de 25.000 luces de intensidad. Donde se indica se añadió FMN y FAD a una concentración final de 0,2 mM. Después del tiempo de incubación se determinó la actividad nitrato reductasa en alícuotas de las mezclas y según el ensayo estandar de actividad descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente se añadió DTE a una concentración final de 5 mM y se incubó 60 minutos, procediéndose entonces a determinar la actividad de igual modo. Las actividades están expresadas en porcentajes de actividad del control sin adiciones. La actividad del control era de 450 n moles de NO_2^- / min / mg de proteína.

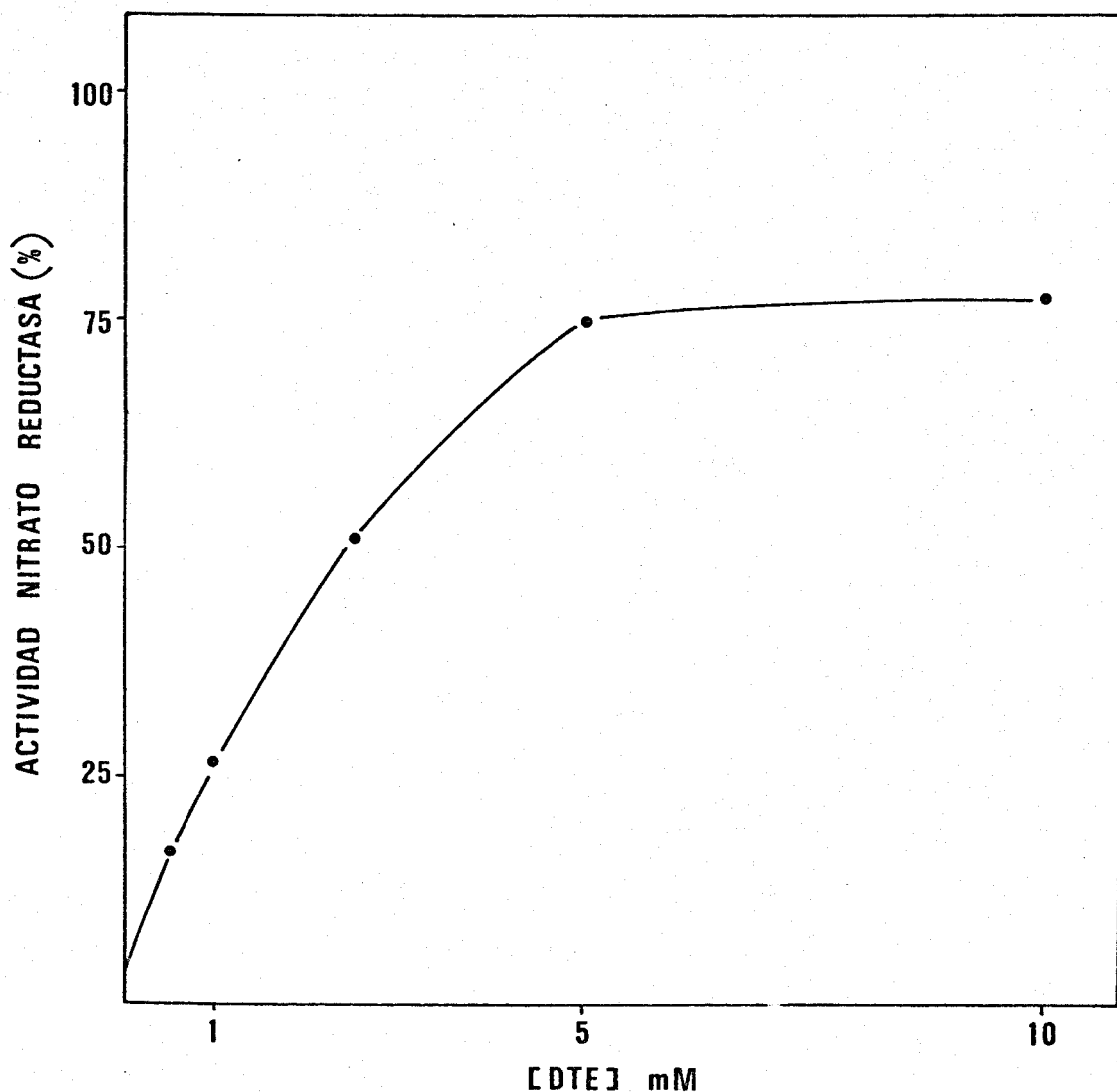


Fig.10. Efecto de la concentración de DTE en la reversión de la fotoinactivación de la nitrato reductasa de *A. chromococcum*. La nitrato reductasa (2 mg/ml), previamente fotoinactivada con FMN 0,2 mM, se incubó a 30°C durante 60 min en presencia de DTE a las concentraciones que se indican. La actividad nitrato reductasa se determinó como en la fig. 8. Las actividades están representadas como porcentajes de la actividad del control sin fotoinactivar. Esta actividad era de 460 nmoles de NO_2^- / min / mg de proteína.

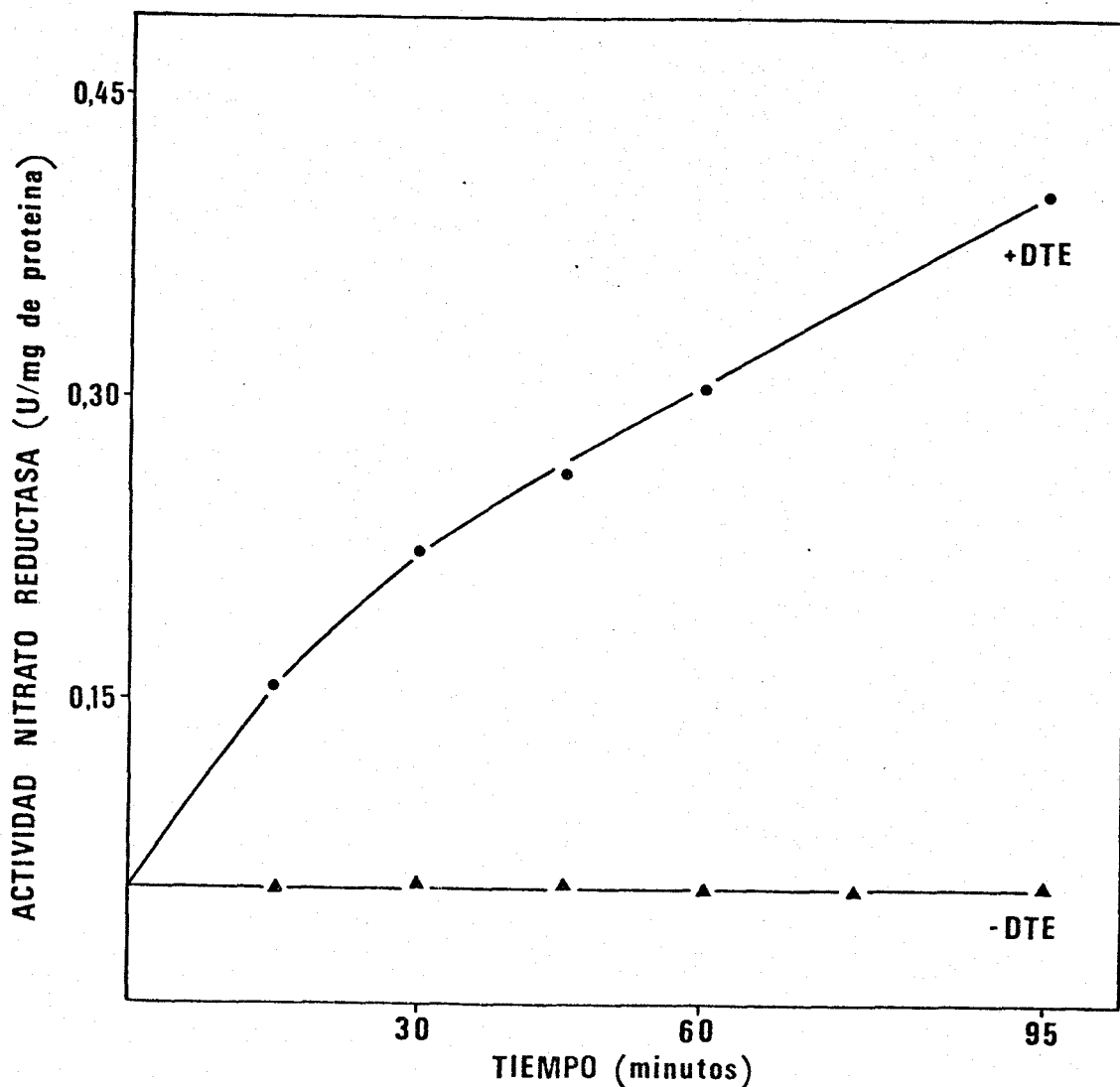


Fig.11. Cinética de la reversión con DTE de la fotoinactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*. La nitrato reductasa (2 mg/ml), previamente fotoinactivada con FMN 0,2 mM, se incubó a 30°C en presencia y ausencia de DTE 5 mM. A los tiempos indicados se determinó la actividad nitrato reductasa en una alícuota de cada mezcla y según el ensayo de actividad estandar descrito en Materiales y Métodos

1 Unidad de actividad nitrato reductasa: 1 μ mol de nitrito formado / min.

III.D. FOTORREDUCCION DE NITRATO A NITRITO POR LA NITRATO REDUCTASA DE *A. chroococcum*

En la Tabla XI se puede observar la reducción de nitrato a nitrito que tiene lugar por la nitrato reductasa cuando ésta se ilumina en presencia de FMN y de EDTA. Como se puede ver, de entre los diversos donadores de electrones ensayados, sólo el EDTA es capaz de servir como reductor de la flavina iluminada y, por tanto, del enzima. Ni el ascorbato, ni el NADH son capaces de actuar como donador de electrones, a pesar de su efecto protector contra la fotoinactivación de la nitrato reductasa (ver la Tabla VIII).

Cuando se mantiene al enzima en presencia de FMN y EDTA en la oscuridad, la reducción de nitrato a nitrito no tiene lugar.

En la Fig.12 se puede observar la fotorreducción de nitrato a nitrito en función del tiempo de ensayo. Se vé que la reacción sigue una cinética lineal.

El pH influye en esta actividad, alcanzándose el

TABLA XI

FOTORREDUCCION DE NITRATO A NITRITO POR LA NITRATO REDUC-
TASA DE *Azotobacter chroococcum*

ADICION	NITRITO FORMADO (n moles)
Ninguna	6
FMN	4,5
EDTA	5
FMN, EDTA	40
FMN, Ascorbato	4
FMN, NADH	7
FMN, EDTA, oscuridad	3

La nitrato reductasa (0,2 mg/ml) se incubó a 30°C bajo atmósfera de nitrógeno, durante 5 minutos, con iluminación de 25.000 luces en presencia de NO_3K , 10 mM y los compuestos indicados a las siguientes concentraciones: FMN, 0,2 mM; EDTA, 10 mM; Ascorbato, 10 mM; NADH, 0,3 mM. Al cabo del tiempo indicado se valoró el nitrito formado como se describe en *Métodos Analíticos*, después de eliminar las interferencias del ascorbato (Katoh, 1963) y del NADH (Medina y Nicholas, 1957) en la determinación de nitrito.

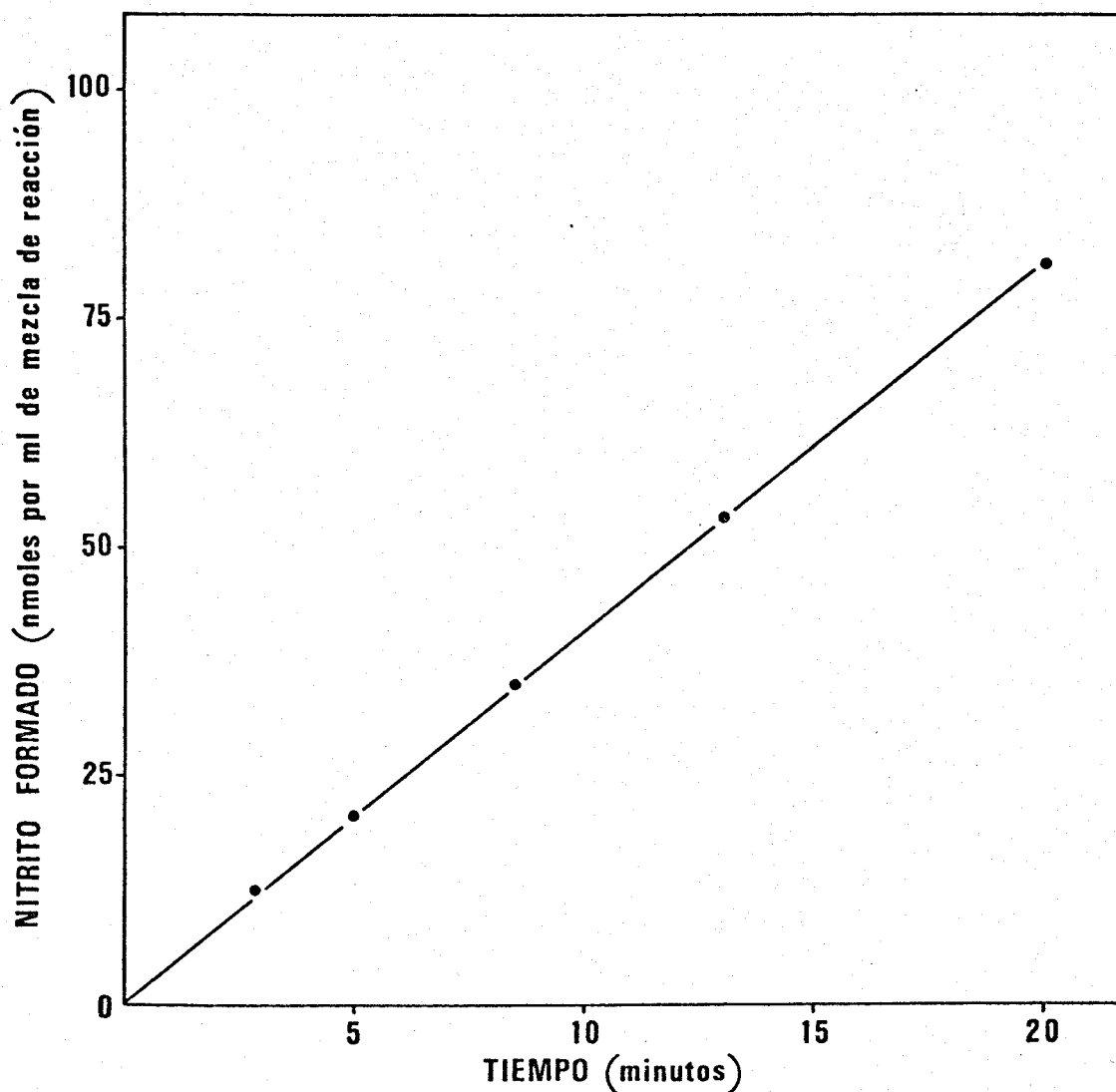


Fig.12. Cinética de la fotorreducción de nitrato a nitrito por la nitrato reductasa de *A. chroococcum*. La nitrato reductasa (0,1 mg/ml) se incubó a 30°C bajo atmósfera de nitrógeno, con iluminación de 25.000 luces de intensidad, en presencia de FMN, 0,2 mM; EDTA, 10 mM; NO_3K , 10 mM. A los tiempos indicados se valoró el nitrito formado como se describe en *Métodos Analíticos*.

máximo valor en la reducción de nitrato cuando el pH está entre 7 y 8, como se puede observar en la Fig.13 .

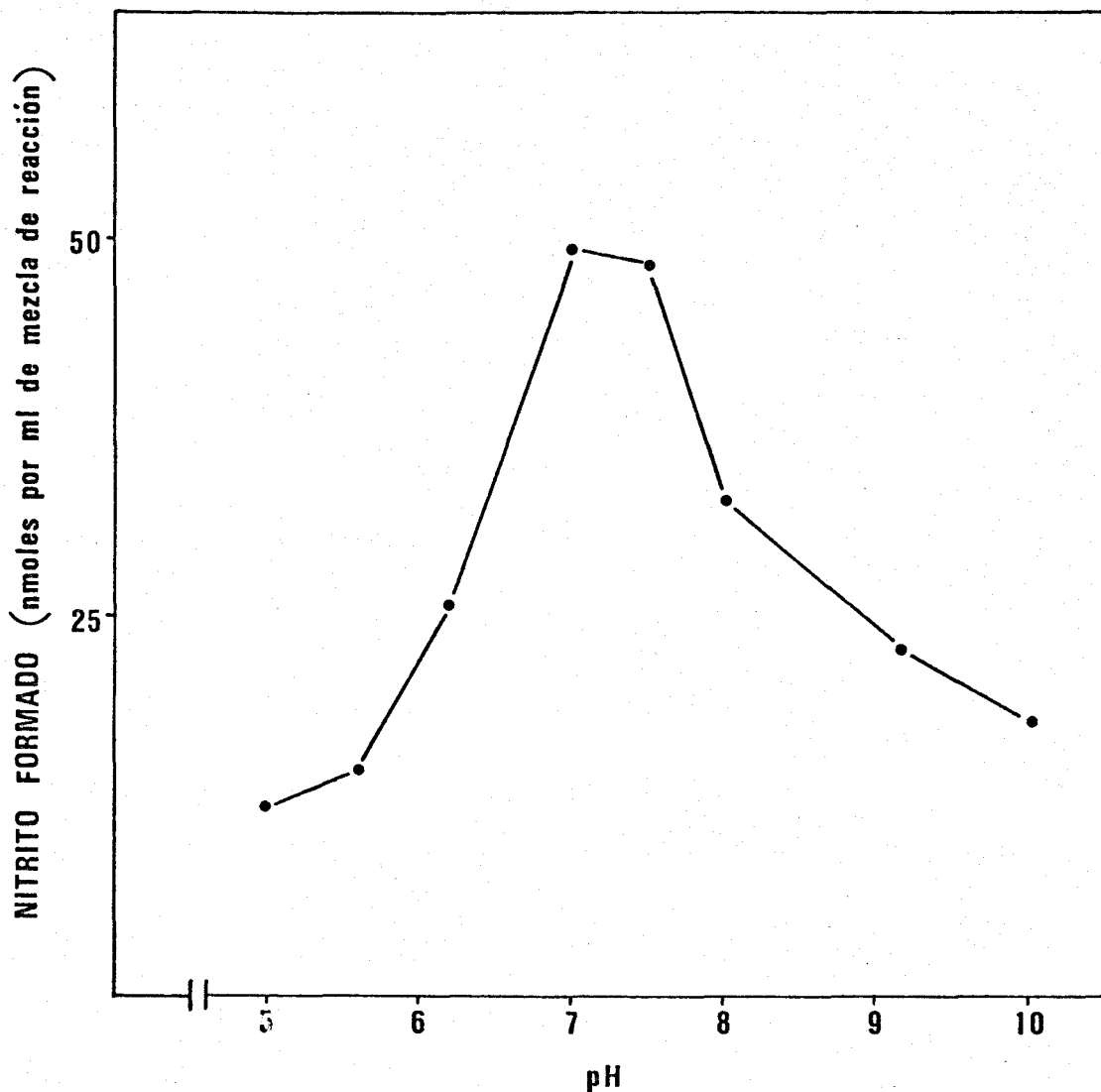


Fig.13. Efecto del pH en la fotorreducción de nitrato a nitrito por la nitrato reductasa de *A. chroococcum*. La nitrato reductasa (0,2 mg/ml) se incubó a 30°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 5 min, con iluminación de 25.000 luces de intensidad, en presencia de NO_3K 10 mM y los tampones siguientes a la concentración de 100 mM : Citrato, pH 5,0 , 5,6 y 6,2 ; fosfato potásico, pH 7,0 y 7,5 ; glicil-glicina, pH 8,0 , 9,15 y 10,0 . Al cabo del tiempo indicado se valoró el nitrito formado como se describe en *Métodos Analíticos*.

IV. DISCUSSION

La asimilación del nitrógeno nítrico constituye un proceso fundamental del metabolismo de las plantas superiores, algas, hongos y bacterias. Los estudios llevados a cabo en este Departamento y por otros grupos de trabajo, han puesto de manifiesto que en la reducción asimilatoria del nitrato a amonio intervienen, secuencialmente, dos enzimas: la nitrato y la nitrito reductasas.

Uno de los aspectos del metabolismo del nitrato que, en la actualidad, está siendo objeto de mayor atención es el de la regulación de la actividad del primer enzima de su ruta asimilatoria. La mayor parte de las investigaciones sobre la regulación de la actividad nitrato reductasa se han realizado con el enzima de algas verdes y, en menor extensión, con la nitrato reductasa de bacterias fotosintéticas y hongos. Por otra parte, sólo escasos trabajos se han dirigido hacia el conocimiento de la ruta asimilatoria del nitrato y su regulación en organismos procariontes quimiorganotróficos (Kennedy et al., 1975).

La interconversión entre dos especies enzimáticas, una activa y otra inactiva, de diversos enzimas que intervienen en diferentes procesos del metabolismo, cons-

tituye una de las formas conocidas de regulación de la actividad enzimática. Este proceso de interconversión está basado en una modificación química del enzima, normalmente la formación o rotura de un enlace covalente y, generalmente, catalizado por otro enzima.

La interconversión metabólica entre una forma activa y otra inactiva de la nitrato reductasa asimilatoria ha sido propuesta por este Departamento y corroborada por otros grupos de trabajo. De acuerdo con trabajos previos realizados en este laboratorio, la nitrato reductasa de plantas superiores (Castillo et al., 1975), algas verdes (Herrera et al., 1972), levaduras (Rivas et al., 1973) y bacterias (Guerrero et al., 1973; Villalobo et al., 1977) puede existir en dos formas: una oxidada y activa, y otra reducida e inactiva. La conversión de la forma activa en inactiva la lleva a cabo el poder reductor generado en la luz por los pigmentos fotosintéticos, o en la oscuridad, por los piridín nucleótidos reducidos (Herrera et al., 1972; Losada et al., 1973). En condiciones experimentales adecuadas, ambas formas de la nitrato reductasa, activa e inactiva, se pueden preparar in vivo e in vitro. Pero así como la obtención de la forma inactiva

de la nitrato reductasa, a partir de la especie activa, se consigue con sustratos y metabolitos celulares, no se conoce cuál es el mecanismo fisiológico de la reactivación del enzima inactivo. In vitro, sólo se ha conseguido la reactivación de la nitrato reductasa inactiva mediante oxidantes artificiales (Losada, 1975/76).

En nuestro laboratorio también se ha conseguido reactivar a la nitrato reductasa de plantas superiores y algas verdes con luz azul (Aparicio et al., 1976).

El modelo propuesto para la regulación de la actividad nitrato reductasa concuerda con la evidencia experimental obtenida con el enzima de muy diversos orígenes. Debido a que hasta hace muy poco tiempo no se disponía de preparaciones enzimáticas suficientemente purificadas, aún no se ha podido profundizar en el mecanismo químico de la interconversión. La dilucidación de los agrupamientos de la proteína, implicados en la regulación de la nitrato reductasa y, como hemos mencionado ya, la preparación de la forma activa de la nitrato reductasa, empleando condiciones experimentales y compuestos fisiológicos, constituye un a trayente campo de trabajo al que prestan su atención dis-

tintos grupos de investigadores.

Los resultados que nosotros hemos conseguido ahora pueden contribuir al esclarecimiento de la regulación del enzima nitrato reductasa de bacterias aerobias, en particular, y al mecanismo de la interconversión metabólica de la nitrato reductasa, en general.

El enzima responsable de la reducción asimilatoria de nitrato a nitrito en la bacteria aerobia *Azotobacter chroococcum*, ofrece ventajas apriorísticas, para el estudio físico-químico de sus propiedades y regulación. El hecho de carecer de la porción NAD(P)H-diaforasa, común al complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa de organismos eucarióticos, y de haberse encontrado en este laboratorio la susceptibilidad de la nitrato reductasa de *Azotobacter* a ser inactivada reversiblemente por las condiciones reductoras del método de ensayo de su actividad, justificaban un estudio más profundo de la regulación de este enzima.

El significativo aumento de los niveles de actividad nitrato reductasa en extractos crudos de *A. chroococcum* después de ser incubados, a temperatura ambiente, con

ditioeritritol (c.f. Gómez-Moreno y Palacian, 1974; Castillo et al., 1975), además de la inactivación del enzima al ser tratados los extractos crudos con ferricianuro (compuesto que lleva a cabo la reactivación de la forma inactiva de la nitrato reductasa en plantas y algas verdes in vitro (Losada, 1975/76), fueron los puntos de partida para el estudio del efecto de distintos compuestos oxidantes sobre la nitrato reductasa de *A. chroococcum*.

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que la nitrato reductasa de *A. chroococcum* se inactiva marcadamente, por tratamiento con una gran variedad de oxidantes (Tabla I).

La sulfito oxidasa hepática, otro enzima que contiene molibdeno, también se inactiva por ferricianuro (Kessler y Rajagopalan, 1974). No obstante, la inactivación de la sulfito oxidasa por ferricianuro era irreversible y hay pruebas que implican al centro de molibdeno del enzima como el lugar de la inactivación. En el caso de la nitrato reductasa, que aquí se discute, el ferricianuro y los demás agentes oxidantes que inactivan al enzima, podrían afectar a los grupos sulfhidrilos del enzima activo

oxidándolos. De hecho, el ferricianuro ha sido usado rutinariamente como un reactivo de grupos sulfhidrilos de proteínas (Webb, 1966). Esta interpretación se vé apoyada por pruebas experimentales, como es la reversión de la inactivación por ditioeritritol (Tabla II), compuesto químico que actúa sobre puentes disulfuro, a los que reduce cuantitativamente (Cleland, 1964).

Por otra parte, puesto que el ditionito, por sí mismo, es capaz de inactivar a la nitrato reductasa de *Azotobacter* (Tortolero, 1975; Paneque et al., 1976), era interesante estudiar la reducción del enzima con colorantes artificiales reducidos enzimáticamente. La actividad NAD(P)H-bencil viológeno reductasa de *Azotobacter* que nosotros hemos utilizado para estos fines, es similar a la descrita por Naik y Nicholas (1966) en *Azotobacter vinelandii*. Posteriormente, Yates (1972) purificó y describió las propiedades de una NADH-deshidrogenasa de *A. chroococcum*. Más recientemente se había encontrado que una preparación parcialmente purificada de *A. chroococcum* era capaz de catalizar la reducción de nitrato a nitrito con NAD(P)H como donador de electrones, siendo la reacción estrictamente dependiente de metil viológeno (o bencil

viológeno) como transportador de electrones. También se demostró que la reducción de nitrato, soportada por el NADPH, procedía en dos pasos catalíticos independientes, cada uno de ellos catalizado por una proteína diferente (Tortolero et al., 1975).

Utilizando, por consiguiente, el sistema NAD(P)H y NAD(P)H-bencil viológeno diaforasa, dispondríamos de un método para reducir a la nitrato reductasa soluble de *Azo*tobacter, y estudiar el efecto del suministro de poder reductor sobre su actividad.

Nuestros resultados han demostrado que, cuando el tratamiento se lleva a cabo incubando la mezcla de reacción al aire, la nitrato reductasa se inactiva, en periodos cortos de tiempo, en más de un 80% de su actividad inicial (Tabla III).

El hecho de que la simple adición del transportador, BV, origine una inactivación apreciable de la nitrato reductasa, se explica por la presencia, en la preparación enzimática utilizada, de poder reductor procedente de la célula. De acuerdo con ello, la reducción de nitrato a

nitrito en extractos crudos o en el sobrenadante de preparaciones centrifugadas a alta velocidad (unas 200.000 x g durante horas), se pone de manifiesto, también, añadiendo solamente el transportador de electrones.

Sorprendentemente, la inactivación de la nitrato reductasa no tenía lugar bajo atmósfera de nitrógeno o argon. Hemos de destacar que el efecto del oxígeno sobre la inactivación de la nitrato reductasa, dependiente de poder reductor, sólo había sido objeto de atención por parte de Vega et al., (1975) en sus estudios sobre la nitrato reductasa de *Neurospora crassa*. Simultáneamente con nuestros estudios, aunque independientemente, Vega y colaboradores, en este Departamento, han extendido sus investigaciones a la nitrato reductasa de tejidos fotosintéticos y han encontrado, de nuevo, el requerimiento de oxígeno para la inactivación reversible de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* (Chaparro et al., 1977).

La inactivación de la nitrato reductasa dependiente de poder reductor y oxígeno tiene lugar también en presencia del ión cianato. Por el contrario, la inactivación que el ditionito ejerce sobre la misma nitrato reductasa

tasa soluble de *A. chroococcum* no solamente se protege con el cianato, sino que también se revierte una vez ha tenido lugar (Tortolero, 1975). El cianato, como es sabido, es un inhibidor competitivo con respecto al nitrato de la nitrato reductasa de tejidos fotosintéticos (Losada, 1975/76) y solo afecta a la nitrato reductasa soluble de *A. chroococcum* en la forma señalada cuando se ensaya con ditionito como reductor. El hecho de que no sea capaz de proteger contra la inactivación que nosotros hemos estudiado ahora distingue este proceso, claramente, del previamente encontrado, asimismo, en este laboratorio, utilizando ditionito.

El nitrato protege de forma apreciable a la nitrato reductasa contra la inactivación, dependiente de oxígeno, que el poder reductor ejerce sobre su actividad. Ello sugiere que el agrupamiento afectado en la inactivación está relacionado estructuralmente con el sitio de unión del nitrato. Alternativamente, el efecto protector del nitrato puede explicarse si asumimos que la unión del ligando a la proteína lleva consigo un cambio de conformación en ésta que hace inaccesible el grupo responsable de la inactivación a la acción del bencil viológeno reducido.

El DTE, que como su isómero ditiotreitól, es capaz de mantener a los tioles en su estado reducido (Cleland, 1964), protege muy eficazmente contra la inactivación causada por poder reductor y aire sobre la nitrato reductasa de *A. chroococcum*; también es capaz de proteger, pero con menos efectividad, el glutatión reducido. Parece pues, que los grupos afectados por el tratamiento con poder reductor y aire y que causan la inactivación del enzima, pueden ser grupos -SH.

Los piridín nucleótidos reducidos, por sí mismos, son incapaces de inactivar a la nitrato reductasa soluble de *A. chroococcum*. Estos resultados eran de esperar habida cuenta que los citados compuestos son incapaces de actuar como donadores de electrones de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*. Bajo un punto de vista evolutivo, podemos concluir que la presencia de una porción diaforasa unida a la propia nitrato reductasa, como ocurre en el complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa de células eucarióticas, es, posiblemente, posterior a la aparición del mecanismo de regulación de la actividad nitrato reductasa por poder reductor.

El estudio del efecto del pH sobre la inactivación de la nitrato reductasa, mostró que el proceso alcanza un nivel óptimo en el intervalo de pH entre 7 y 8. Hemos de destacar que el pH óptimo para la actividad NADH-BV diaforasa está entre 8 y 9 (Yates, 1972), y que el pH óptimo de la nitrato reductasa, ensayada con ditioni - to, está alrededor de 7,5 . El significado de este experimento es que, en las condiciones experimentales utilizadas, el poder reductor no era factor limitante en el proceso global de la inactivación. La coincidencia entre los pH óptimos de la inactivación y de la actividad nitrato reductasa habla en favor del requerimiento de una configuración catalíticamente activa para que la inactivación tenga lugar.

Aunque, como ya hemos señalado, las preparaciones enzimáticas utilizadas contienen niveles elevados de poder reductor endógeno, era interesante estudiar el efecto de la adición de distintas cantidades de piridín nucleótidos reducidos. La Figura 3 y la Tabla III muestran que en ausencia de reductor añadido se consigue, aproximadamente, una inactivación de la nitrato reductasa de un 50%. Esta inactivación se eleva hasta un 80% cuando la incuba-

ción se lleva a cabo en presencia de una concentración 0,2 mM de NADH añadido. El hecho de que al aumentar la concentración del piridín nucleótido reducido, no se consiga un aumento paralelo de la inactivación, puede deberse a un agotamiento del oxígeno presente en la mezcla de reacción.

La presencia de bencil viológeno como donador inmediato de electrones para la reducción de la nitrato reductasa y su paralela inactivación, es requisito indispensable. A este respecto, hemos de señalar que, así como las preparaciones utilizadas contienen poder reductor endógeno, carecen, sin embargo, del mediador que lo transfiera a la nitrato reductasa, en las condiciones experimentales que nosotros hemos utilizado. En la actualidad, el grupo de trabajo en que se ha realizado este estudio intenta ver si la ferredoxina puede sustituir al bencil viológeno para la inactivación de la nitrato reductasa. Como ya hemos mencionado en la Introducción, nosotros habíamos encontrado previamente que la ferredoxina de *Azoto*bacter, reducida con cloroplastos iluminados, podía actuar como donador de electrones de la nitrato reductasa (Tortolero et al., 1975).

El requerimiento de oxígeno para la inactivación de la nitrato reductasa por poder reductor generado con el sistema NADH y NADH-bencil viológeno diaforasa, sugiere que este proceso esté mediado por peróxido. Así, en la inactivación de la glutamato sintasa por NADPH y O_2 (Geary y Meister, 1977), de la nitrito reductasa de *Neurospora crassa* (Vega et al., 1975) y de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* (Chaparro et al., 1977), también dependientes de O_2 , se ha propuesto que transcurran a través de la acción de un peróxido sobre los respectivos enzimas.

Apoyando esta hipótesis, hemos conseguido resultados, que no se presentan en este trabajo, en los que se ve que el enzima incubado con H_2O_2 a una concentración de 8 mM se inactiva hasta un 50%.

En nuestro caso, el hecho de que al incubar el enzima inactivado, con DTE, se restaure la actividad casi totalmente parece indicar que el peróxido está oxidando a grupos -SH del enzima, indispensables para que ejerza su acción catalítica.

Debido a la alta afinidad electrónica del estado triplete excitado de los nucleótidos de flavina (Homann y Gaffron, 1963), hemos investigado el efecto de estos pigmentos irradiados sobre la nitrato reductasa de *A. chroococcum*. Se había descrito previamente (Aparicio et al., 1976), que la forma inactiva de la nitrato reductasa de hojas de espinaca y del alga verde *Chlorella fusca*, podía reactivarse por luz azul, y que este proceso de reactivación tenía lugar en presencia de cantidades catalíticas de FMN o FAD. Con los resultados presentados en este trabajo, se demuestra que la iluminación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*, en presencia de nucleótidos de flavina, causa la pérdida de sus propiedades catalíticas. Esta inactivación es mediada por luz azul. De hecho, se conocen varias flavoproteínas que se inactivan también por luz azul (Voskresenskaya, 1972).

Si a la flavina se la mantiene reducida durante el tiempo que dura la incubación a la luz, se consigue que la inactivación no tenga lugar. Cuando se pone en la mezcla de inactivación EDTA, un donador de electrones para los nucleótidos de flavinas iluminados (Merkel y Nickerson, 1954; Schmidt y Butler, 1976), no ocurre la inacti-

vación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*; lo mismo ocurre con otros reductores, como son el NADH y el ascorbato.

Estos resultados y la reactivación del enzima inactivado con flavina y luz por DTE, sugieren que el lugar de acción de los nucleótidos de flavina iluminados pueden ser los grupos -SH que son esenciales para la estructura y catálisis del enzima. Una propuesta semejante ha sido formulada para la inhibición de algunos enzimas por flavinas excitadas (Neims y Hellerman, 1970).

Los resultados presentados en este trabajo ponen de manifiesto que la nitrato reductasa bacteriana es muy sensible a oxidantes fisiológicos y no fisiológicos. Estos compuestos parecen actuar sobre los grupos sulfhidrilos, y la apretura y unión de los puentes disulfuro pueden explicar el proceso de interconversión, in vitro, entre una forma activa reducida y otra inactiva oxidada de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*.

En conexión con estos resultados, hemos de mencionar que el grupo de Buchanan, en Berkeley, ha descrito

recientemente, un nuevo sistema para la regulación de enzimas de cloroplastos, mediante el cual, los enzimas son activados en la luz por reducción e inactivados en la oscuridad por oxidación. Este grupo ha demostrado que la activación dependiente de luz de distintos enzimas de la asimilación del CO_2 , de la NADP-malato deshidrogenasa y de la NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, está regulado por el sistema ferredoxina/tiorredoxina (Wolosiuk y Buchanan, 1977; Wolosiuk et al., 1977; Wolosiuk y Buchanan, 1978a).

Por otro lado, algunos compuestos oxidantes presentes en los cloroplastos, como el glutatión oxidado o el dehidroascorbato, están implicados en la inactivación en la oscuridad de estos enzimas (Wolosiuk y Buchanan, 1978b; Breazeale et al., 1978).

Se sabe que la tiorredoxina es el donador fisiológico de electrones implicado en la reducción de puentes disulfuro que puede ser reducida por ditioles (Wolosiuk et al., 1977; Vidal et al., 1978). Por estas causas, se puede pensar que este transportador de electrones sea el responsable de la regulación metabólica de la nitrato re

ductasa de *Azotobacter*.

Para verificar esta posibilidad, la preparación enzimática cruda utilizada en este trabajo, está siendo fraccionada. Experimentos preliminares han mostrado que la nitrato reductasa puede ser inactivada por oxidantes, después de ser filtrada a través de Sephadex G-100. Sin embargo, la reactivación por ditioeritritol del enzima inactivo, depende de algún(os) factor(es) proteico(s) que salen de la columna de Sephadex después del pico de la nitrato reductasa. Los trabajos que se realizan actualmente tienen por objeto identificar este(os) factor(es) proteico(s).

La fotorreducción de nitrato a nitrito que nosotros hemos estudiado ahora merece ser discutida detalladamente. Stoy encontró en 1956, que la riboflavina, actuando como un catalizador absorbente de luz, podría servir como donador de electrones para la reducción de nitrato a nitrito en presencia de la nitrato reductasa de hojas de trigo. La reacción, que tenía lugar sólo cuando se llevaba a cabo en condiciones anaerobicas, requería la presencia de un potente agente quelante, tal como el ácido eti-

lendiaminotetraacético. En ausencia de flavina, la reducción de nitrato cesaba completamente.

Para la explicación de sus resultados, Stoy concluyó que la riboflavina, reducida en la luz y en presencia del agente quelante, se reoxidaba por la flavina presente en la enzima. La reducción final del nitrato tendría lugar después de mediar la acción del molibdeno.

Stoy asumió la hipótesis formulada por Merkel y Nickerson (1954), según la cual, el primer paso de la reacción luminosa era la activación de la molécula de riboflavina, seguida por una rotura del agua y subsiguiente reducción del pigmento y sus resultados parecían plausibles y convincentes. Entonces no se conocía la función exacta de la sustancia quelante, por lo que se supuso que el donador de electrones terminal era la propia molécula de agua.

Posteriormente, se pudo profundizar en el estudio de la reducción fotoquímica de flavinas libres y flavoproteínas por numerosos donadores de electrones (Beinert, 1960; Frisell et al., 1959; Massey y Palmer, 1966;

McCormick, 1968), conociéndose hoy, que cuando la foto -
rreducción de la flavina se lleva a cabo en presencia de
EDTA -que ha resultado ser particularmente susceptible a
la fotooxidación con flavina (Merkel y Nickerson, 1954)-
la velocidad de su reducción es mucho más rápida. Es inte
resante destacar, que, utilizando EDTA, la fotorreducción
de la flavina llega hasta el nivel de hidroquinona y es,
aproximadamente, cuatro veces más rápida con FMN (o ribo
flavina) que con FAD(McCormick, 1968).

Puesto que nosotros hemos encontrado una fotoi-
nactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*,
en una reacción estrictamente dependiente de la presencia
de los nucleótidos de flavina o de riboflavina, y que se
impide por la presencia de EDTA, resultaba interesante es
tudiar si, eligiendo las condiciones experimentales adecua
das, era posible acoplar la fotorreducción de la flavina
a la reducción del nitrato, en presencia de la nitrato re
ductasa.

Nuestros resultados han puesto de manifiesto,
que la fotorreducción de nitrato a nitrito puede realizar
se con flavina reducida en la luz, y EDTA como donador de

electrones, mediante el concurso de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*, De esta forma, hemos corroborado los experimentos pioneros de Stoy y, al mismo tiempo, contribuido a la comprensión del mecanismo de esta singular reacción fotoquímica. Si asumimos, como habían sugerido Guerrero et al. (1973), que la nitrato reductasa soluble de *A. chroococcum* es la porción terminal del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa de plantas, hemos de concluir que la interacción de la flavina reducida con la nitrato reductasa no se realiza a través de la flavina constitutiva de la porción diaforásica, como parecía sugerir Stoy, puesto que aparentemente, la nitrato reductasa bacteriana carece de esta mitad diaforásica. Sin embargo, puede argumentarse que la nitrato reductasa soluble bacteriana no ha sido aún suficientemente purificada y, por tanto, no se debe descartar a priori la presencia de un componente flavínico que aceptara los equivalentes de reducción de la flavina exógena fotoexcitada. Esta posibilidad, no obstante, parece muy poco defendible.

Como hemos visto en la sección de Resultados, ascorbato, cisteína, glutatión reducido, NADH y EDTA, protegen contra la fotoinactivación de la nitrato reductasa,

mediada por riboflavina y sus nucleótidos. Sin embargo, de entre todos estos compuestos, sólo el EDTA es capaz de actuar como un donador de electrones en la fotorreducción de nitrato a nitrito, a pesar de que el ascorbato y los aminoácidos son fotooxidados por los nucleótidos de flavina (Beinert, 1960) y de conocerse también la fotooxidación del NADH por el FMN o el FAD excitados (Vernon, 1959).

La explicación de la incapacidad del ascorbato para actuar como donador de electrones en la fotorreducción del nitrato, puede residir en el hecho de que reduce a la flavina excitada, sólo hasta el estado de semiquinona (Homan y Gaffron, 1963). De la misma forma, los aminoácidos empleados en este estudio, el glutation y la cisteina deben producir, posiblemente, el estado semirreducido de la flavina, que sería incapaz de reducir al nitrato.

En contra de lo esperado, el NADH mostró una escasísima eficiencia como donador de electrones en la fotorreducción del nitrato, catalizada por la nitrato reductaa. Hemos de destacar, que el NADH es un buen fotorreductor de la flavina libre, habiéndose descrito (Vernon,

1959) que, en condiciones anaeróbicas, el FMN produce una fotooxidación del NADH y una fotorreducción concomitante del citocromo c. Sin embargo, en nuestro caso, utilizando condiciones experimentales adecuadas, no pudimos mostrar una fotorreducción apreciable de nitrato. La posibilidad de que las propiedades catalíticas de la nitrato reductasa resultaran afectadas en el sistema de incubación así como la variación de las concentraciones de los componentes del sistema, intensidad de luz, etc., deberán ser objeto de estudios posteriores para poder aclarar nuestros resultados.

V. CONCLUSIONES

1. La nitrato reductasa de la bacteria aerobia *Azotobacter chroococcum* es muy sensible al tratamiento in vitro con agentes oxidantes químicos y fotoquímicos.
2. La incubación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*, en la oscuridad, con cualquiera de los compuestos oxidantes, glutatión, cistina, diclorofenol indofenol y ferri-cianuro potásico, origina la rápida inactivación del enzima. Este recupera su actividad después de ser incubado en presencia del reactivo de Cleland, ditioeritritol.
3. La nitrato reductasa de *A. chroococcum* se inactiva en cortos períodos de tiempo cuando se incuba en la luz, bajo condiciones anaeróbicas, en presencia de riboflavina o de los nucleótidos de flavina a concentraciones del orden de 10^{-6} M.
4. La fotoinactivación de la nitrato reductasa se puede impedir si la reacción se lleva a cabo en presencia de alguno de los siguientes compuestos: etiléndiamino tetraacetato, ascorbato, NADH, cistina, glutatión reducido y ditioeritritol.

5. La nitrato reductasa fotoinactivada recupera su actividad cuando se trata con ditioeritritol.
6. En condiciones experimentales adecuadas, el ácido etilén diamino tetraacético, no sólo protege a la nitrato reductasa contra su fotoinactivación sino que también puede actuar como un donador de electrones, muy eficiente, para la fotorreducción enzimática del nitrato a nitrito. Ningún otro de los compuestos utilizados como protectores contra la fotoinactivación de la nitrato reductasa podía reemplazar al ácido etiléndiamino tetraacético en la fotorreducción del nitrato.
7. La fotorreducción de nitrato a nitrito catalizada por la nitrato reductasa de *A. chroococcum* exhibe una relación lineal entre el nitrito aparecido y el tiempo de ensayo. En ausencia de nitrato, la incubación prolongada, en la luz, de la mezcla de reacción, no afecta a la actividad nitrato reductasa, corroborándose de esta forma la insensibilidad de la nitrato reductasa frente al poder reductor en condiciones anaeróbicas.

8. La actividad nitrato reductasa no se afecta cuando el enzima se incuba, en condiciones anaeróbicas, con el sistema NAD(P)H-bencil viológeno reductasa de *A. chroococcum* o con los nucleótidos de piridina reducidos.
9. El tratamiento de la nitrato reductasa con el sistema NAD(P)H-bencil viológeno reductasa en condiciones aeróbicas, origina una drástica inactivación del enzima. Esta inactivación se evita por la presencia de ditioeritritol, glutatión reducido y nitrato.
10. La inactivación de la nitrato reductasa promovida por poder reductor, y dependiente de la aerobividad de la mezcla de incubación, es reversible: la incubación del enzima inactivo con ditioeritritol restaura la actividad enzimática casi en su totalidad.
11. Cuando la preparación de la nitrato reductasa utilizada en este trabajo se somete a un fraccionamiento de criba molecular en gel de Sephadex G-100, la nitrato reductasa se inactiva también por los procedimientos indicados anteriormente. Sin embargo, la actividad enzimática no se recupera entonces por tratamiento con el reactivo de Cleland.

12. Los resultados expuestos en la conclusión 11 sugieren que el efecto del ditiotrietitol sobre el enzima inactivo no se debe a la acción directa del ditiol sobre un puente disulfuro, sino que tiene lugar a través de algún factor que se elimina durante la filtración en el gel de Sephadex. Trabajos preliminares encaminados a corroborar esta hipótesis hablan en favor de la existencia de este factor. En consecuencia, la inactivación reversible de la nitrato reductasa estudiada por nosotros in vitro, puede ser fisiológicamente importante.

13. Como corolario de todo lo expuesto, la inactivación reversible de la nitrato reductasa determina la existencia de dos formas distintas del enzima: una especie reducida y activa y otra especie oxidada e inactiva.

14. Nuestros resultados indican, claramente, que el componente químico responsable de la interconversión entre las dos formas del enzima es un(os) grupo(s) sulfhidrilo(s). La oxidación y reducción de puente(s) disulfuro(s) determina cuál de las dos formas del enzima es la prevalente.

VI. BIBLIOGRAFIA

- APARICIO, P.J., ROLDAN, J.M. y CALERO, F. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, p.1071.
- ARNON, D.I., LOSADA, M., NOZAKI, M. y TOGAWA, K. (1961) *Natura*, 190, p. 601.
- BAILEY, J.L. (1967) En *Techniques in Protein Chemistry*, 2^a Ed., p. 340, Elsevier, Amsterdam.
- BAREA, J.L., SOSA, F. y CARDENAS, J. (1976) *Z. Pflanzen - physiol.*, 79, p. 237.
- BEEVERS, L. y HAGEMAN, R.H. (1969) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20, p. 495.
- BEINERT, H. (1960) En *The Enzymes*, vol. II, parte A, p. 367, editado por P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrback, Academic Press, New York.
- BREAZEALE, V.D., BUCHANAN, B.B. y WOLOSIUK, R.A. (1978) *Z. Naturforsch.*, 336, p. 521.
- BROWN, C.M., MC DONALD-BROWN, D.S. y MEERS, J.L. (1974) *Adv. Microbial Physiol.*, 11, p. 1.
- CANDAU, P., MANZANO, C. y LOSADA, M. (1976) *Nature*, 262, p. 715.
- CANDAU, P. (1978) Tesis Doctoral, en preparación.

- CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F. y PALACIAN, E. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun., 64, p. 546.
- CHAPARRO, A., MALDONADO, J.M., DIEZ, J., RELIMPIO, A.M. y LOSADA, M. (1976) Plant Sci. Letters, 6, p. 335.
- CHAPARRO, A., RELIMPIO, A.M. y VEGA, J.M. (1977) VII Congreso de la S.E.B., Resúmenes, p. 50.
- CHIBA, S. e ISHIMOTO, M. (1973) J. Biochem., 73, p. 1315.
- CHIPPAUX, M. y PICHINOTY, F. (1970) Arch. Mikrobiol., 71, p. 361.
- CLELAND, W. (1964) Biochemistry, 3, p. 480.
- ENOCH, H.G. y LESTER, R.L. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, p. 1234.
- FOGG, G.E., STEWART, W.D.P., FAY, P. y WALSBY, A.E. (1973) En *The Blue Green Algae*, Academic Press, New York.
- FORGET, P. (1971) Eur. J. Biochem., 18, p. 442.
- FORGET, P. (1974) Eur. J. Biochem., 42, p. 325.
- FRISELL, W.R., CHUNG, C.W. y MACKENZIE, C.G. (1959) J. Biol. Chem., 234, p. 1297.
- GEARY, L.E. y MEISTER, A. (1977) J. Biol. Chem., 252, p. 3501

GOLDBERGER, R.F. (1974) *Science*, 183, p. 810.

GOMEZ-MORENO, C., APARICIO, P.J., PALACIAN, E. y LOSADA, M.
(1972) *FEBS Letters*, 26, p. 11.

GOMEZ-MORENO, C. y PALACIAN, E. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.*, 160, p. 269.

DE GROOT, G.N. y STOOTHAMER, A.H. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 208, p. 414.

GUERRERO, M.G., VEGA, J.M., LEADBETTER, E. y LOSADA, M.
(1973) *Arch. Mikrobiol.*, 91, p. 287.

HOMANN, P. y GAFFRON, H. (1963) *Science*, 141, p. 905.

HACKENTAL, E. y HACKENTAL, R. (1966) *Archiv. Pharmakol.*,
254, p. 56.

HATTORI, A. y MYERS, J. (1967) *Plant Cell Physiol.*, 8, p. 327.

HATTORI, A. (1970) *Plant Cell Physiol.*, 11, p. 975.

HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L. y
LOSADA, M. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
48, p. 996.

HEWITT, E.J. (1975) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, p. 73.

KATOH, T. (1962) *Plant Cell Physiol.*, 4, p. 13.

- KATOH, T. (1963) *Plant Cell Physiol.*, 4, p. 199.
- KENNEDY, I.R., RIGAUD, J. y TRINCHANT, J.C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 397, p. 24.
- KESSLER, D.L. y RAJAGOPALAN, K.V. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 370, p. 399.
- KETCHUM, P.A., CAMBIER, H.Y., FRAZIER, W.A., MADANSKY, C.H. y NASON, A. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 66, p. 1016.
- LAM, Y. y NICHOLAS, D.J.D. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 178, p. 225.
- LEE, K.Y., PAN, S.S., ERICKSON, R. y NASON, A. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, p. 3941.
- LORIMER, G.H., GEWITZ, H., VOLCKER, V., SOLOMONSON, L.P. y VENNESLAND, B. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, p.6074.
- LOSADA, M. y ARNON, D.I. (1963) En *Metabolic Inhibitors*, vol. 2, p. 559, editado por R.M. Hochster y J.H. Quastel, Academic Press, New York.
- LOSADA, M., APARICIO, P.J. y PANEQUE, A. (1969) En *Progress in Photosynthesis Research*, vol. 3, p. 1504, editado por H. Metzner, Institut für Chemische Pflanzenphysiologie, Tübingen.

- LOSADA, M. (1973) 3rd International Symposium of Metabolic Interconversion of Enzymes, Seattle, EE.UU. .
- LOSADA, M., HERRERA, J., MALDONADO, J.M. y PANEQUE, A. (1973) *Plant Sci. Letters*, 1, p. 31.
- LOSADA, M. (1974) En *Metabolic Interconversion of Enzymes*, p. 257, editada por E.H. Fischer, E.G. Krebs, H. Neurath y E.R. Stadtman, Springer Verlag, Berlin.
- LOSADA, M. (1975/76) *J. Mol. Cat.*, 1, p. 245.
- LOSADA, M. (1976) En *Reflections on Biochemistry*, p. 73, editado por A. Kornberg, B.L. Horecker, L. Cornudella y J. Oró, Pergamon Press, Oxford.
- LOWE, R.H. y EVANS, H.J. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, 85, p. 377.
- LOWRY, G.M., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, p. 205.
- LLOBELL, A., BARCENA, J.A., VILA, R. y PANEQUE, A. (1978) XVII Reunión de la S.E.B., Resúmenes, p. 60.
- MALDONADO, J.M., HERRERA, J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, p. 27.
- MALDONADO, J.M., PUEYO, C. y CHAPARRO, A. (1974) *Rev. Real Acad. Cien. Madrid*, 68, p. 633.

- MALOFEEVA, I.V., KONDROTIEVA, E.N. y RUBIN, A.R. (1975)
FEBS Letters, 53, p. 2.
- MANZANO, C., CANDAU, P., GOMEZ-MORENO, C., RELIMPIO, A.M.
y LOSADA, M. (1976) Mol. Cell Biochem., 10, p.161.
- MASSEY, V. y PALMER, G. (1966) Biochemistry, 5, p. 3181.
- MCCORMICK, D.B. (1968) En *Flavins and Flavoproteins*, p. 154,
editado por K. Yagi, University of Tokyo Press y
University Park Press, Tokyo.
- MCGREGOR, C.H., SCHNAITMAN, C.A., NORMANSELU, D.E. y HUDGINS,
M.G. (1974) J. Biol. Chem., 249, p. 5321.
- MCGREGOR, C.H. (1975) J. Bacteriol., 121, p. 1102.
- MEDINA, A. y NICHOLAS, D.J.D. (1957) Biochim., Biophys. Acta,
23, p. 440.
- MERKEL, J.R. y NICKERSON, W.J. (1954) Biochim. Biophys. Acta,
14, p. 303.
- MORRIS, J. (1974) En *Algal Physiology and Biochemistry*, Bota-
nical Monographs, vol 10, p. 583, editada por W.D.P
Stewart, Blackwell, Oxford.
- NAIK, M.S. y NICHOLAS, D.J.D. (1966) Biochim. Biophys. Acta,
131, p. 204.

- NASON, A., KUO-YUNG LEE, SU-SHU PAM, KETCHUM, P.A., LAMBERTI, A. y DEVRIES, J. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, p. 3242.
- NEIMS, A.H. y HELLERMAN, L. (1970) Ann. Rev. Biochem., 39, p. 867.
- OREBAMJO, T.O. y STEWART, G.R. (1975) Planta, 122, p. 37.
- ORTEGA, T., CASTILLO, F. y CARDENAS, J. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, p. 885.
- ORTEGA, T., CASTILLO, F., CARDENAS, J. y LOSADA, M. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 75, p. 823.
- PANEQUE, A., DEL CAMPO, F.F., RAMIREZ, J.M. y LOSADA, M. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 109, p. 79.
- PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 128, p. 202.
- PANEQUE, A., APARICIO, P.J., CATALINA, L. y LOSADA, M. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 162, p. 149.
- PANEQUE, A., TORTOLERO, M. y VILA, R. (1976) 10th International Congress of Biochemistry, Resúmenes, p. 400.
- PAYNE, W.J. (1973) Bacteriol. Rev., 37, p. 409.
- PICHINOTY, F. y D'ORNANO, L. (1961) Ann. Inst. Pasteur, 101, p. 418.

- PICHINOTY, F. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 89, p. 378.
- PICHINOTY, F. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47, p. 1526.
- PICHINOTY, F. y PIECHAUD, M. (1968) *Ann. Inst. Pasteur*, 114, p. 77.
- PICHINOTY, F., PUIG, I., CHIPPAUX, M., BIGLIARDI-ROUVIER, J. y GENDRE, J. (1969) *Ann. Inst. Pasteur*, 116, p. 409.
- PICHINOTY, F. (1970) *Arch. für Mikrobiol.*, 71, p. 116.
- PICHINOTY, F. (1973) *Bull. Inst. Pasteur*, 71, p. 317.
- RADCLIFFE, B.C. y NICHOLAS, D.J.D. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 205, p. 273.
- RELIMPIO, A.M., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1971) *FEBS Letters*, 17, p. 276.
- RIVAS, J., GUERRERO, M.G., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1973) *Plant Sci. Letters*, 1, p. 105.
- ROSSO, J.P., FORGET, P. y PICHINOTY, F. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 321, p. 443.
- SCHMIDT, W. y BUTLER, W.L. (1976) *Photochem. Photobiol.*, 24, p. 71.
- SCHULP, J.A. y STOUTHAMER, A.H. (1970) *J. Gen. Microbiol.*, 64, p. 195.

- SHOWE, M.K. y DE MOSS, J.A. (1968) J. Bacteriol., 95, p. 1305.
- SINCLAIR, P.R. y WHITE, D.C. (1970) J. Bacteriol., 101, p. 365.
- SNELL, F.D. y SNELL, C.T. (1949) En *Colorimetric Methods of Analysis*, p. 804, D. Van Nostrand Company, New York.
- SOLOMONSON, L.P. y VENNESLAND, B. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 267, p. 544.
- STEMLER, A. y RADMER, R. (1975) Science, 190, p. 457.
- STOUTHAMER, A.H. (1976) Adv. Microbial Physiol., 14, p. 315.
- STOY, V. (1956) Biochim. Biophys. Acta, 21, p. 395.
- SUBRAMANIAN, K.N. y SORGER, G.J. (1972) J. Bacteriol., 110, p. 538.
- TORTOLERO, M., VILA, R. y PANEQUE, A. (1975) Plant Sci. Letters, 5, p. 141.
- TORTOLERO, M. (1975) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- VAN'T RIET, J., STOUTHAMER, A.H. y PLANTA, R.J. (1968) J. Bacteriol., 96, p. 1455.
- VAN'T RIET, J., VAN EE, J.H., VAN GELDER, B.F. y PLANTA, R. J. (1975) Biochim. Biophys. Acta, 405, p. 306.

- VAN'T RIET, J. y PLANTA, R.J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 379, p. 81.
- VAN'T RIET, J. y PLANTA, R.J. (1969) *Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters*, 5, p. 249.
- VEGA, J.M., HERRERA, J., RELIMPIO, A.M. y APARICIO, P.J. (1972) *Physiol. Vég.*, 10, p. 637.
- VEGA, J.M., GREENBAUM, P. y GARRETT, R.H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 377, p. 251.
- VERNON, L.P. (1959) *Biochim. Biophys. Acta*, 36, p. 177.
- VIDAL, J., JACQUOT, J.P., MEMBRE, H. y GADAL, P. (1978) *Plant Sci. Letters*, 11, p. 305.
- VILA, R., BARCENA, J.A., LLOBELL, A. y PANEQUE, A. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75, p. 682.
- VILA, R., LLOBELL, A., BARCENA, J.A. y PANEQUE, A. (1978a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, en prensa.
- VILA, R., LLOBELL, A., BARCENA, J.A. y PANEQUE, A. (1978b) XVII Reunión de la S.E.B., Resúmenes, p. 61.
- VILLALOBO, A., ROLDAN, J.M., RIVAS, J. y CARDENAS, J. (1977) *Arch. Microbiol.*, 112, p. 127.
- VOSKRESENSKAYA, N.P. (1972) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 23, p. 219.

- WEBB, J.L. (1966) En *Enzyme and Metabolic Inhibitions*, vol. II, p. 670, Academic Press, New York.
- WOLOSIUK, R.A. y BUCHANAN, B.B. (1977) *Nature*, 265, p. 565.
- WOLOSIUK, R.A., BUCHANAN, B.B. y CRAWFORD, N.A. (1977) *FEBS Letters*, 81, p. 253.
- WOLOSIUK, R.A. y BUCHANAN, B.B. (1978a) *Plant Physiol.*, 61, p. 669.
- WOLOSIUK, R.A. y BUCHANAN, B.B. (1978b) *Arch. Biochem. Biophys.*, 189, p. 97.
- YATES, M.G. (1972) *Eur. J. Biochem.*, 24, p. 347.
- YATES, M.G. (1976) *TIBS*, 1, p. 17.
- ZUMFT, W.G., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1970) *FEBS Letters*, 9, p. 157.
- ZUMFT, W.G. y CARDENAS, J. (1978) *Naturwissenschaft*, en prensa.

CIUDAD DE SEVILLA

El Tribunal integrado por los señores
el día de la fecha, para juzgar la Tesis

de Reyes Vila Vila

intitulada "Nitrato reductor de Azidoacido chromococum
su actividad por agente oxidante y su reacción por
nitrososulfato"

se acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente
cum laude

Sevilla, 20 de DIEMBRE 1978

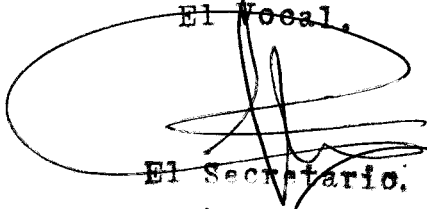
El Vocal,



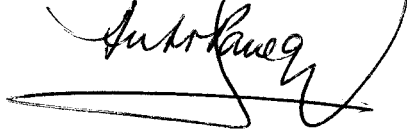
Presidente,



El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,

J. F. López Sainza

Reyes Vila

