

TD
686

TD
686

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA FERREDOXINA-NITRITO
REDUCTASA DE LA CIANOBACTERIA *Nostoc muscorum*

A. 4040



Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias por el Licenciado José Miguel Méndez Jiménez

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to José Miguel Méndez Jiménez.

Sevilla, Septiembre de 1979

PONENTE

DIRECTOR

A handwritten signature in black ink, likely belonging to Manuel Losada Villasante.

Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

A handwritten signature in black ink, likely belonging to José María Vega Piqueres.

Dr. José M^a Vega Piqueres
Profesor Agregado de Bioquímica

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
SECRETARIA

14-9-79

ENTRADA N.º 320

INDICE

ABREVIATURAS	
I. INTRODUCCION	
II. MATERIALES Y METODOS	
II.A. CULTIVO DEL MICROORGANISMO	
II.A.1. <i>Material biológico utilizado y medio de cultivo</i>	
II.A.2. <i>Condiciones especiales de cultivo</i>	
II.A.3. <i>Medida del crecimiento celular</i>	
II.A.4. <i>Recogida de células</i>	
II.B. PREPARACION DE EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS	
II.B.1. <i>Extracción con acetona</i>	
II.B.2. <i>Vibración con perlas de vidrio</i>	
II.B.3. <i>Ultrasonido</i>	
II.B.4. <i>Tratamiento con lisozima</i>	
II.B.5. <i>Prensa de French</i>	
II.C. PREPARACION DE PARTICULAS FOTOSINTETICAS	
II.D. PREPARACION DE NADP-REDUCTASA Y DE FERREDOXINA.	
II.E. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS	
II.E.1. <i>Actividad nítrito reductasa</i>	
II.E.2. <i>Actividad nítrato reductasa</i>	
II.E.3. <i>Actividad NADP-reductasa</i>	
II.E.4. <i>Otras actividades enzimáticas</i>	

II.F. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS .

II.F.1. *Concentración de proteínas*

II.F.2. *Centrifugación en gradiente de sacarosa* .

II.F.3. *Determinación del radio de Stokes por fil-*
tración en gel

II.F.4. *Determinación del peso molecular por fil-*
tración en gel

II.F.5. *Electroforesis analítica en gel de polia-*
crilamida

II.F.6. *Preparación de metil viológeno reducido* .

II.F.7. *Determinaciones espectrofotométricas*

II.F.8. *Determinación de clorofila*

II.F.9. *Determinación de proteína*

II.F.10. *Determinación de nitrito*

II.F.11. *Determinación de amoniaco*

II.F.12. *Determinación de sulfuro lábil*

II.F.13. *Determinación de hidroxilamina*

II.F.14. *Determinación de sulfito*

II.F.15. *Medidas de pH*

II.G. REACTIVOS

III. RESULTADOS

III.A. CRECIMIENTO DE *Nostoc muscorum*

III.B. SINTESIS Y LOCALIZACION DE LA NITRITO REDUCTA-
SA DE *Nostoc muscorum*

III.B.1.	<i>Represión por amonio de la nitrito reductasa</i>
III.B.2.	<i>Cinética de la desrepresión de la nitrito reductasa</i>
III.B.3.	<i>Localización intracelular de los enzimas del sistema reductor de nitrato</i>
III.C.	PURIFICACION DE LA NITRITO REDUCTASA DE <i>Nostoc muscorum</i>
III.C.1.	<i>Actividad nitrito reductasa en extractos crudos preparados por distintos métodos de rotura de las células</i>
III.C.2.	<i>Método de purificación</i>
III.C.3.	<i>Pureza del enzima</i>
III.D.	CARACTERIZACION Y PROPIEDADES DE LA NITRITO REDUCTASA DE <i>Nostoc muscorum</i>
III.D.1.	<i>Estabilidad</i>
III.D.2.	<i>Donadores de electrones</i>
III.D.3.	<i>Caracterización de la actividad MVH-nitrito reductasa</i>
III.D.4.	<i>Estequiometria de la reacción</i>
III.D.5.	<i>Estudios cinéticos</i>
III.D.6.	<i>Actividad ferredoxina:nitrito reductasa</i>
III.D.7.	<i>Inhibidores</i>
III.D.8.	<i>Propiedades moleculares</i>
III.D.9.	<i>Grupos prostéticos</i>
IV.	DISCUSION
V.	CONCLUSIONES
VI.	BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	Absorbancia
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADP	Adenosín-difosfato
ATP	Adenosín-trifosfato
BV	Bencil viológeno
CMU	3-(p-clorofenil)-1,1-dimetilurea
D	Daltons
DEAE	Dietilaminoetil
DPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
E'_0	Potencial normal de óxidorreducción
$E_{1\text{cm}}^{1\text{M}}$	Coeficiente de extinción molar
$E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}}$	Coeficiente de extinción mg/ml
EDTA	Acido etilen-diaminotetraacético
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido
FMN	Flavín-mononucleótido
Fd	Ferredoxina
$\text{Fe}_2\text{-S}_2^*$	Centro sulfoférico binuclear
$\text{Fe}_4\text{-S}_4^*$	Centro sulfoférico tetranuclear
g	Aceleración de la gravedad

$\Delta G'_0$	Incremento de energía libre standard
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
K_i	Constante de inhibición
K_M	Constante de Michaelis
LDH	Láctico deshidrogenasa
MVH	Metil viológeno reducido
NADH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato reducido
NAD(P)H	NADH ó NADPH indistintamente
pHMB	p-hidroximercuribenzoato
S	Svedberg ($= 10^{-13}$ seg)
$S_{20,w}^\circ$	Coefficiente de sedimentación
t_g	Tiempo de generación
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
p.s.i.	Libras por pulgada cuadrada

I. INTRODUCCION

El nitrógeno inorgánico constituye, en último término, la fuente de este elemento para todos los seres vivos. Los organismos capaces de asimilar el nitrógeno inorgánico constituyen la base de una pirámide trófica, y de ellos se nutren, de forma más o menos directa, el resto de los seres vivos.

El nitrógeno molecular es la forma de nitrógeno inorgánico más abundante en la biosfera. Sin embargo su asimilación solo la llevan a cabo un pequeño número de bacterias (entre las que se encuentra la cianobacteria *Nostoc muscorum*), y cuantitativamente, en términos de nitrógeno total asimilado, es una fuente relativamente pobre de este elemento para el mundo vivo.

La asimilación de nitrógeno inorgánico por los seres vivos consiste fundamentalmente en la asimilación de nitrato, que debido a la naturaleza oxidante de la atmósfera por un lado, y a la actividad nitrificante de algunos tipos de bacterias, por otro, es la forma de nitrógeno inorgánico más abundante en el suelo y en el agua. Una parte muy pequeña del nitrato en el suelo se pierde por las reacciones de desnitrificación.

El nitrógeno nítrico puede ser asimilado por distintos tipos de organismos fotosintéticos -bacterias, algas verdes y plantas superiores- o no fotosintéticos -bacterias y hongos-, siendo los organismos fotosintéticos los que realizan la contribución cuantitativamente más importante al total de nitrógeno asimilado litotróficamente.

El proceso de la asimilación de nitrato por las células implica tres estadios fundamentales: 1) entrada del nitrato al interior de la célula; 2) reducción enzimática de nitrato a amoníaco, y 3) incorporación del nitrógeno amónico a esqueletos carbonados.

La reducción asimilatoria del nitrato hasta amoniaco se ha estudiado extensamente a nivel celular, subcelular y molecular en bacterias, hongos, algas y plantas superiores. Los resultados han demostrado firmemente que la transferencia de 8 electrones que tiene lugar en esta reducción transcurre en dos etapas enzimáticas independientes (Losada, 1976; Hewitt et al., 1976; Vennesland y

Guerrero, 1979; Losada y Guerrero, 1979): En la primera, el nitrato se reduce a nitrito por una transferencia de 2 electrones. En la segunda el nitrito se reduce a amoníaco por una transferencia de 6 electrones. Estos procesos están mediados por los enzimas nitrato y nitrito reductasas respectivamente.

Se pueden distinguir dos tipos principales de nitrato reductasa asimilatoria: a) la nitrato reductasa dependiente de piridín nucleótidos, que se dá en células eucarióticas, y b) la nitrato reductasa dependiente de ferredoxina, presente en bacterias fotosintéticas (entre las que se encuentran las cianobacterias) y no fotosintéticas. A su vez hay dos tipos fundamentales de nitrito reductasa asimilatoria: a) la NAD(P)H-nitrito reductasa, que se encuentra en organismos no fotosintéticos, como bacterias y hongos, y b) la ferredoxina-nitrito reductasa, que se presenta en organismos fotosintéticos (Hewitt, 1975; Losada y Guerrero, 1979).

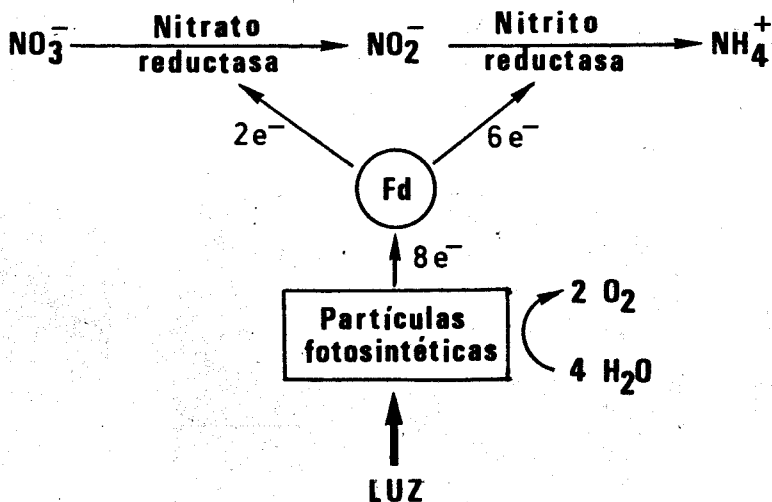
En organismos fotosintéticos del tipo de algas

verdes y plantas superiores, se ha encontrado que ambos enzimas del sistema reductor de nitrato son solubles, y aunque existe un acuerdo general con respecto a la localización intracelular de la nitrito reductasa como un enzima soluble del cloroplasto (Vega et al., 1979), existen contradicciones en la literatura con respecto a la localización intracelular de la nitrato reductasa (Losada y Guerrero, 1979).

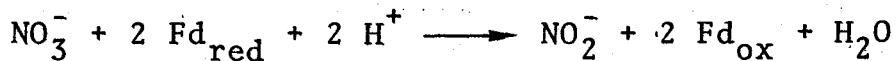
Por otra parte, se ha visto en estos organismos que la reducción enzimática de nitrito dependiente de ferredoxina está íntimamente ligada con las reacciones luminosas de la fotosíntesis, habiéndose demostrado la reducción de nitrito por cloroplastos intactos y habiéndose conseguido acoplar dicha reducción con el flujo de electrones originado al iluminar un sistema reconstituido de cloroplastos (Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979).

El proceso de la reducción del nitrato hasta amoníaco en cianobacterias se ha señalado como uno de

los ejemplos más simples y relevantes de fotosíntesis (Losada, 1976; Losada y Guerrero, 1979), ya que en estos organismos se han preparado partículas con actividad fotosintética desde agua que llevan asociados los enzimas para la reducción del nitrato hasta nitrito (Ortega et al., 1976) o para la reducción del nitrato hasta amoniaco (Candau et al., 1976). Estas preparaciones subcelulares catalizan la reducción directa del nitrato a nitrito o del nitrato hasta amoniaco dependiente de ferredoxina con un desprendimiento asociado de oxígeno, utilizando el poder reductor generado fotoquímicamente a partir del agua según el siguiente esquema (Candau et al., 1976):



La nitrato reductasa de cianobacterias cataliza la reducción de nitrato a nitrito con ferredoxina reducida según la siguiente ecuación:



$$\Delta G'_0, \text{ pH } 7,0 = -38,6 \text{ Kcal/mol}$$

Preparaciones particuladas de *Anabaena cylindrica* obtenidas por sonicación o tratamiento con acetona catalizan la reducción de nitrato a nitrito con ferredoxina o NADH respectivamente (Hattori y Myers, 1967). Sin embargo cuando el enzima se solubilizaba por tratamiento con Triton X-100, sólo servían como donadores de electrones las flavinas o viológenos reducidos (Hattori, 1970). En *Anacystis nidulans* y *Nostoc muscorum* la ferredoxina reducida, y no los piridín nucleótidos reducidos, puede donar electrones a la nitrato reductasa tanto si está en forma soluble (Manzano et al., 1976), o particulada (Manzano et al., 1976; Candau et al., 1976; Ortega et al., 1976).

En *Nostoc muscorum*, el amonio y otros desacoplantes inhiben la reducción fotosintética de nitrato por partículas de la cianobacteria. Además, la nitrato reductasa de es

te organismo se inhibe por reducción en una reacción dependiente de ferredoxina, y se reactiva por oxígeno molecular (Ortega et al., 1977a,b).

La ferredoxina-nitrato reductasa de *Anacystis nidulans* se ha purificado hasta homogeneidad utilizando como etapa básica la cromatografía de afinidad en ferredoxina-BrCN-Sefarosa (Manzano et al., 1978). Se trata de una metaloproteína con una sola cadena polipeptídica y un peso molecular de 75.000 D (Candau y Manzano, sin publicar).

La nitrito reductasa de las cianobacterias es un enzima del que se dispone muy poca información con respecto al de otros organismos fotosintéticos y no fotosintéticos, habiéndose estudiado sólo los enzimas de *Anabaena cylindrica* y *Anacystis nidulans* (Hattori y Myers, 1966; Hattori y Uesugi, 1968a,b; Ohmori y Hattori, 1970; Manzano, 1977).

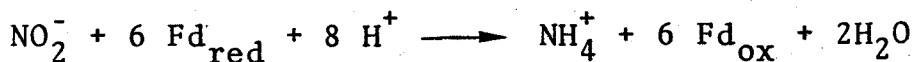
En *Anabaena cylindrica* se demostró la reducción de nitrato y nitrito a la luz por células intactas,

en condiciones de anaerobiosis y utilizando hidrógeno molecular como donador de electrones (Hattori, 1962, 1963). Fujita et al. (1964), utilizando un extracto crudo de *A. cylindrica* consiguieron acoplar la reacción de la hidrogenasa con la reducción del nitrato hasta amoníaco usando azul de metileno como mediador. Más tarde (Hattori y Myers, 1965) se observó que la nitrito reductasa de este organismo se solubilizaba fácilmente al romper las células por distintos tratamientos, y que catalizaba la reducción estequiométrica de nitrito a amoníaco utilizando NADPH como donador de electrones, en una reacción que requería ferredoxina como mediador (Hattori y Myers, 1966) o utilizando ferredoxina reducida fotosintéticamente con ascorbato-DPIP y preparaciones subcelulares de la cianobacteria o ferredoxina reducida con ditionito (Hattori y Uesugi, 1968b). La ferredoxina podía ser reemplazada por metil, bencil viológeno, o diquat.

Manzano et al. (1976) prepararon partículas fotosintéticas de la cianobacteria *Anacystis nidulans* que mantenían firmemente unida la nitrito reductasa y utilizaban como donadores de electrones ferredoxina

reducida con NADPH más NADP-reductasa de espinaca, o bien con ascorbato-DPIP en presencia de luz. Más tarde (Candau et al., 1976), se prepararon partículas fotosintéticas de esta cianobacteria que retenían la actividad de los fotosistemas I y II y que llevaban a cabo la reducción fotosintética de nitrito hasta amoníaco dependiente de ferredoxina utilizando agua como donador terminal de electrones y con un desprendimiento estequiométrico de oxígeno.

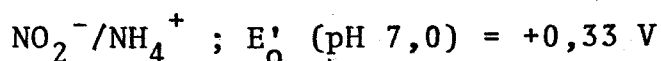
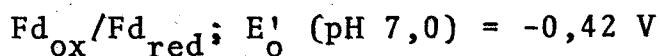
En organismos fotosintéticos, el enzima se ha clasificado como ferredoxina-nitrito oxidorreductasa (E.C.1.7.7.1), y cataliza la siguiente reacción:



$$\Delta G'_0, \text{pH } 7,0 = -103,5 \text{ kcal/mol}$$

La razón de que esta reacción sea tan exergónica se

debe a la elevada diferencia de potencial entre los pares redox interaccionantes:



Se trata pues de un enzima que cataliza la transferencia de 6 electrones, hecho poco frecuente en los sistemas biológicos y solamente compartido por la sulfito reductasa -que cataliza la reducción de sulfito a sulfuro- y la nitrógenasa -que cataliza la reducción de dinitrógeno a 2 de amoníaco.

La nitrito reductasa fotosintética tiene una marcada afinidad por la ferredoxina reducida, ya sea químicamente con ditionito, enzimáticamente con H_2 más hidrogenasa o con NADPH más NADP -reductasa o fotosintéticamente por medio de partículas fotosintéticas o cloroplastos iluminados (Losa y Paneque, 1971; Vega et al., 1979). Por otra parte, la flavodoxina, una flavoproteína de bajo peso mole-

cular que se produce en algunos organismos en condiciones de deficiencia de hierro (Zumft y Spiller, 1971) es un sustituto fisiológico de la ferredoxina, pudiendo actuar la flavodoxina (fitoflavina) reducida fotosintéticamente como donador de electrones para la reducción de nitrito por la nitrito reductasa en *Chlorella fusca* y *Anacystis nidulans* (Bothe, 1969; Zumft, 1972; Manzano, 1977).

Además del nitrito, la ferredoxina nitrito reductasa de algunas fuentes puede utilizar la hidroxilamina como aceptor de electrones, aunque la velocidad de reducción de la hidroxilamina es muy baja en comparación con la del nitrito (Zumft, 1972; Hewitt, 1975). El sulfilto no puede ser utilizado como sustrato por preparaciones puras de nitrito reductasa (Prakash y Sadana, 1972; Vega y Kamin, 1977), a pesar de que existen unas semejanzas muy marcadas entre la nitrito reductasa y la sulfito reductasa. Este último enzima puede utilizar como sustraltos, además del sulfito, el nitrito y la hidroxilamina (Zumft, 1972; Greenbaum et al., 1978).

La ferredoxina-nitrito reductasa de algas ver-

des y plantas superiores se ha purificado hasta homogeneidad y se ha visto que se trata de una ferroproteína de 60.000-63.000 D de peso molecular, constituida por una sola cadena polipeptídica con 600 residuos de aminoácidos aproximadamente (Vennesland y Guerrero, 1979; Vega et al., 1979).

Murphy et al. (1974a) han identificado el grupo prostético hemínico de la nitrito reductasa de espinaca como "sirohemo", un complejo de hierro con una tetra-hidro-porfirina del tipo isobacterioclorina con 8 cadenas laterales que contienen grupos carboxilos, y que había sido descrito previamente como componente de sulfito reductasas tanto asimilatorias como disimilatorias (Murphy et al., 1973; Murphy y Siegel, 1973).

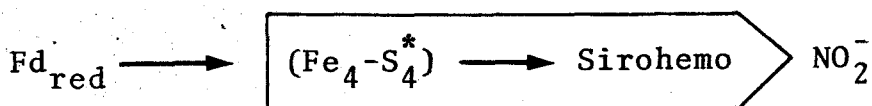
Además del sirohemo, la nitrito reductasa de espinaca contiene un centro sulfoférico, como se ha puesto de relieve por espectroscopía de EPR (Aparicio et al., 1975; Vega y Kamin, 1977; Stoller et al., 1977).

Vega y Kamin (1977) concluyeron que el enzima de espinacas contenía un sirohemo y un centro $\text{Fe}_2\text{-S}_2^*$ por molécula de proteína. Recientemente (Lancaster et al., 1979), a partir de nuevos análisis químicos y por reinterpretación de datos previos, se llegó a la conclusión de que esta nitrito reductasa contiene 6 átomos-gramo de Fe y 4 moles de S^{2-} por mol de sirohemo, estableciéndose mediante el empleo de técnicas de espectroscopía de EPR que hay un centro sulfoférico por cada hemo y que esta agrupación es del tipo $\text{Fe}_4\text{-S}_4^*$. Se trata pues del mismo tipo de centro sulfoférico que se ha encontrado recientemente en la sulfito reductasa (Siegel, 1978).

Por otra parte estos grupos prostéticos también se han identificado en la nitrito reductasa de *Cucurbita pepo*, que parece ser muy similar a la de espinaca (Cammack et al., 1978).

La unión al enzima de espinaca del nitrito y de inhibidores competitivos con respecto al nitrito altera el espectro de absorción y la señal de EPR del hie

rro hemínico de alto spin, lo que hace suponer que el sirohemo es el sitio de unión del sustrato. En cuanto al centro sulfoférico ($\text{Fe}_4\text{-S}_4^*$), éste sólo puede reducirse totalmente en presencia de inhibidores que se unen al sirohemo (como el cianuro o el CO), lo que indica que el donador de electrones reduce en primer lugar al centro sulfoférico, que a su vez transfiere los electrones al sirohemo, donde tiene lugar la reducción de nitrito a amoniaco (Aparicio et al., 1975; Vega y Kamin, 1977; Vega et al., 1979). La cadena de transporte de electrones desde la ferredoxina reducida al nitrito será por tanto:



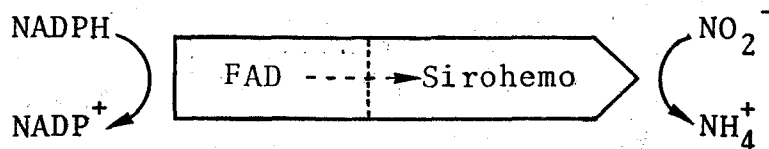
Stoller et al. (1977) han descrito para el centro sulfoférico y para el sirohemo unos valores de potencial normal de -550 mV (pH 9,0) y -50 mV (pH 7,8), respectivamente. Esto concuerda con la hipótesis de que el centro sulfoférico preceda al sirohemo en la cadena de transporte electrónico. Sin embargo, la ferredoxina del cloroplasto tiene un E'_0 (pH 7,0) de -420 mV, de forma que al ser su potencial más positivo, no podría reducir al centro sulfoférico, por lo que Stoller et al. (1977) han

propuesto que es posible que al formarse el complejo ferredoxina-nitrito reductasa o el complejo nitrito-sirohemo, el potencial normal del centro sulfoférico se haga más electropositivo, pudiendo de esta forma ser reducido por la ferredoxina.

En organismos no fotosintéticos, como bacterias (Vega et al., 1973) y hongos (Rivas et al., 1973; Lafferty y Garrett, 1974; Vega et al., 1975a), la reducción de nitrito hasta amoniaco está catalizada por una flavoferroproteína, que se ha caracterizado como NAD(P)H-nitrito oxidoreductasa (E.C.1.6.6.4).

El enzima de *Neurospora crassa* puede reducir hidroxilamina además de nitrito, aunque la K_M para la hidroxilamina es dos órdenes de magnitud más alta que la K_M para el nitrito, sugiriendo que el sustrato fisiológico es el nitrito (Lafferty y Garrett, 1974; Greenbaum et al., 1978). El enzima de *Achromobacter fischeri* puede reducir también la hidroxilamina, pero a una velocidad 8 veces menor que al nitrito. El sulfito no es reducido por este enzima, ni tampoco es inhibidor (Hewitt, 1975).

También se ha purificado hasta homogeneidad la nitrito reductasa de algunos organismos no fotosintéticos, como la NAD(P)H-nitrito reductasa del hongo *Neurospora crassa* (Greenbaum et al., 1978). Este enzima tiene de peso molecular 290.000 D (Lafferty y Garrett, 1974; Greenbaum et al., 1978) y contiene FAD y sirohemo como grupos prostéticos (Vega et al., 1975a; Greenbaum et al., 1978), desempeñando ambos un papel funcional en la reducción catalítica del nitrito a amoníaco. Se ha establecido que el sirohemo es el sitio de interacción entre el enzima y el nitrito, debido a los cambios observados en el espectro óptico de la nitrito reductasa al añadir sustratos o inhibidores (Vega et al., 1975a). El esquema del flujo de electrones que se ha propuesto para la NADPH-nitrito reductasa de *Neurospora* es el siguiente:



El sirohemo parece ser un grupo prostético característicos de las nitrito reductasas de células eucarióticas tanto fotosintéticas como no fotosintéticas (Murphy et al., 1974a; Vega et al., 1975a).

Por otra parte, los estudios realizados hasta ahora parecen indicar que la nitrito reductasa de células procarióticas no contiene sirohemo como grupo prostético, estando establecido que los enzimas de la respiración del nitrato, que reducen el nitrito a productos gaseosos (NO , N_2O , N_2) no contienen sirohemo. El enzima de *Achromobacter fische**ri* (Husain y Sadana, 1972; Prakash y Sadana, 1972, 1973), purificado hasta homogeneidad, es una proteína de 95.000 D de peso molecular que contiene 2 moles de hemo *c* por mol de enzima (Prakash y Sadana, 1972; Husain y Sadana, 1974). Esta NADH-nitrito reductasa cataliza la reducción directa de nitrito a amoníaco, aunque parece ser que este enzima es de tipo respiratorio, y se induce en condiciones no fisiológicas (baja tensión de oxígeno). La NADH-nitrito reductasa de *Escherichia coli* K 12, que cataliza la reducción de nitrito hasta amoníaco con fines asimilatorios, se ha purificado hasta homogeneidad y resulta ser un dímero de 190.000 D de peso molecular que no contiene ningún tipo de hemo como grupo prostético (Coleman et al., 1978).

Para la NAD(P)H-nitrito reductasa se ha descrito una interconversión entre una forma activa y una inactiva (Losa-da, 1974) que se ha relacionado con un cambio redox en el

enzima, de forma que las condiciones reductoras favorecerían la formación de la especie enzimática inactiva. Este tipo de interconversión de la actividad nitrito reductasa sólo se ha encontrado en las bacterias *Escherichia coli* y *Azotobacter chroococcum* (Kemp y Atkinson, 1966; Vega et al., 1973) y en el hongo *Neurospora crassa* (Lafferty y Garrett, 1974; Vega et al., 1975b), no habiéndose descrito un comportamiento similar de ninguna ferredoxina-nitrito reductasa.

Por su parte, la nitrito reductasa de *Anabaena cylindrica* se ha purificado 40 veces por precipitación con acetona y cromatografías en DEAE-celulosa. El enzima, que presenta un peso molecular de 68.000 D, se ha caracterizado parcialmente, sobre todo en lo que respecta a sus donadores y aceptores de electrones (Hattori y Uesugi, 1968a). La nitrito reductasa de *Anacystis nidulans* se ha purificado 30 veces por cromatografías en DEAE-celulosa e hidroxapatito. Se trata de una ferroproteína con un peso molecular de 54.000 D, que también se ha caracterizado parcialmente (Manzano, 1977).

Según lo expuesto anteriormente, consideramos

que la purificación y caracterización de la ferredoxina-nitrito reductasa de cianobacterias suministraría una información básica de enorme interés para el estudio de la asimilación de nitrato en estos organismos procarióticos, ya que se trata de una proteína poco estudiada a nivel molecular. Para este estudio hemos seleccionado la cianobacteria *Nostoc muscorum*, principalmente porque su nitrito reductasa es fácilmente soluble y su actividad intracelular razonablemente alta.

Los resultados que se presentan en este trabajo suponen una importante contribución al conocimiento de la ferredoxina-nitrito reductasa de *Nostoc muscorum*, tanto en lo que respecta a su composición como a sus propiedades fisicoquímicas. Sus puntos básicos son:

- 1) Puesta a punto de un método de purificación que permite obtener cantidades significativas de enzima y de buena calidad en lo que se refiere a su actividad específica y pureza.
- 2) Caracterización de donadores y aceptores de electrones, así como de los inhibidores, incluyendo estudios cinéticos

y estequiometría de la reducción de nitrito.

3) Determinación de sus parámetros moleculares, así como de la posible naturaleza de sus grupos prostéticos.

Parte de este trabajo se ha presentado en forma de resumen en Congresos Científicos (Méndez et al., 1977; Méndez y Vega, 1979).

II. MATERIALES Y METODOS

II.A. CULTIVO DEL MICROORGANISMO

II.A.1. *Material biológico utilizado y medio de cultivo*

El microorganismo utilizado en este trabajo ha sido la cianobacteria *Nostoc muscorum* estirpe 7119, cedida por el Profesor Daniel I. Arnon (Department of Plant Physiology, University of Berkeley, California, U.S.A.).

El medio de cultivo empleado fué esencialmente el descrito por Arnon et al. (1974) con ligeras modificaciones. Este medio contenía, en mg/l: Cl_2Ca , 15; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 124; ClNa , 117; MoO_4Na_2 , 1,26; VO_3Na , 0,239; $\text{PO}_4\text{HK}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1152, NO_3K , 2000, y además 1 ml/l de una solución de micronutrientes y de una solución de Fe-EDTA. La solución de micronutrientes contenía en g/l: BO_3H_3 , 2,86; $\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,81; $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,222; $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,079; $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0403. La solución de Fe-EDTA, que contenía 5 mg de Fe y 13 mg de potasio por ml, se preparó disolviendo 16 g de EDTA y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua. Esta solución se mezcló con otra preparada disolviendo 13,7 g de $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 364 ml de agua. A continuación la mezcla se burbujó con aire durante toda la noche para oxidar el hierro hasta Fe^{3+} .

Los medios de cultivo se esterilizaron en un

autoclave eléctrico SELECTA modelo P, a 1 atm de presión (120°C) durante 20 min. El fosfato se esterilizó en solución aparte, para evitar su precipitación, y posteriormente se añadió en condiciones de esterilidad al medio de cultivo.

Para la conservación de la estirpe de *Nostoc muscorum* se procedió a inocular a partir de células cultivadas en agar, 100 ml de medio de cultivo contenidos en erlenmeyers de 250 ml de capacidad. Estos cultivos, siempre en condiciones de esterilidad, se dejaban estar a temperatura ambiente, sin agitación y con la iluminación de la habitación. En estas condiciones el crecimiento era lento y las células se conservaban hasta 5-6 meses.

Las células se cultivaron normalmente en condiciones de esterilidad y bajo iluminación continua de luz blanca fluorescente (3.000 lux en la superficie del cultivo), a temperatura ambiente, en tubos de 250 ml o en botellas de 1 l, según las necesidades, por las que se hacía pasar una corriente de aire conteniendo un 2% (v/v) de CO₂ mediante una bomba de membrana RECIPROTOR. Para inocular 1 l de medio se utilizaban 20 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($A_{600 \text{ nm}} = 2,0-2,5$). Periódicamente se partió de un inóculo nuevo procedente de células conservadas

en condiciones de crecimiento retardado.

Para cultivar células en gran escala, se utilizaron indistintamente botellas de 20 l de capacidad o cajas (18,5 x 58 x 40 cm) de 40 l de capacidad. En estos casos no se guardaban condiciones de esterilidad y dada la gran masa de células que se utilizó para inocular estos cultivos y la ausencia de una fuente de carbono orgánico en los mismos, la contaminación era mínima como se comprobó por el examen microscópico del cultivo. Normalmente se añadía al cultivo silicona líquida, a una concentración final del 0,01% (v/v) para evitar la formación de espuma durante el crecimiento.

El rendimiento obtenido en estas condiciones fue de 1,7-2,3 g (peso húmedo) de células por litro de cultivo.

II.A.2. *Condiciones especiales de cultivo.*

En cultivos con fuente de nitrógeno distintas del nitrato, se sustituyó el NO_3K por ClNH_4 o bien por una mezcla de NO_3K y ClNH_4 , manteniendo la concentración total de nitrógeno igual a 20 mM. Cuando se usó NO_2Na como fuente de nitrógeno, no se sobrepasó la concentración de 2 mM

debido al efecto tóxico de esta sal (Knutsen, 1965), pero se analizaba periódicamente el contenido en nitrito del cultivo, manteniéndose la concentración original de 2 mM mediante la correspondiente adición.

En medios a los que no se añadió ningún compuesto nitrogenado, se sustituyó el NO_3K por ClK 20 mM.

Para estudiar el efecto del hierro o del cobre en las actividades enzimáticas del sistema reductor de nitrato, las células se cultivaron durante 2-3 días en cloruro amónico como única fuente de nitrógeno, según las condiciones standard, pero omitiendo la adición de las sales de hierro o cobre al medio de cultivo. Estas células se utilizaron para inocular otro medio carente del metal en cuestión, repitiéndose esta operación 2-3 veces con objeto de reducir al mínimo la concentración de metal presente en el inóculo de partida. Seguidamente se recogieron estas células y se resuspendieron en medios con nitrato como fuente de nitrógeno y distintas concentraciones del metal correspondiente.

II.A.3. *Medida del crecimiento celular*

El crecimiento celular se determinó midiendo la ab-

sorbancia a 600 nm de una alícuota del cultivo. Esta absorbancia se corresponde linealmente con el volumen de células empaquetadas, de forma que una unidad de absorbancia equivale a 1,62 μ l de células empaquetadas por mililitro de cultivo en las condiciones de centrifugación empleadas (2.000 x g, 15 min).

II.A.4. *Recogida de células*

Las células se recogieron por centrifugación a 16.000 x g durante 5 min en una centrifuga SORVALL RC2-B, o bien por filtración en vacío en un embudo Büchner con un papel de filtro.

Cuando se trataba de cultivos en gran escala, las células se recogieron por centrifugación a 23.000 x g en una centrifuga SORVALL SS-1 con un sistema de flujo continuo Szent-Gyorgyi y Blum. Posteriormente las células se lavaron con medio de cultivo fresco y se centrifugaron a 40.000 x g durante 10 min, se congelaron por inmersión en aire líquido y se almacenaron a -20°C hasta el momento de usarlas.

II.B. PREPARACION DE EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS

II.B.1. *Extracción con acetona*

Este método de rotura es básicamente el descrito por Smillie y Entsch (1971), para células de *Anacystis nidulans*.

Las células lavadas, se resuspendieron en un volumen igual de tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 y se pusieron a 0°C. A continuación se añadieron 15 volúmenes de acetona, preenfriada a -20°C, lentamente y con agitación continua. La suspensión resultante se dejó estar durante 30 min a -20°C. El precipitado se recuperó por filtración, se lavó con 5 volúmenes de acetona fría, a continuación con 5 volúmenes de dietil-éter a -20°C, se extendió sobre papel de filtro y se dejó secar a temperatura ambiente. El polvo acetónico resultante se resuspendió en tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 en la proporción de 5 ml por cada gramo de células, y se mantuvo a 0-4°C durante 2 h con agitación continua. La suspensión resultante se centrifugó a 40.000 x g durante 15 min y el sobrenadante constituyó el extracto libre de células o extracto crudo.

II.B.2. *Vibración con perlas de vidrio*

Las células lavadas se resuspendieron en un volumen igual de tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 y se mezclaron con perlas de vidrio 0,25-0,30 mm Ø hasta formar una pasta homogénea y consistente (aproximadamente 7 ml de perlas por gramo de células), que se sometió a vibración a alta velocidad en un homogeneizador BÜHLER mod. Vi 2, durante 4 min de 0 a 4°C. El material resultante se filtró por 4 capas de gasa y se lavó con tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 (10 ml de tampón por gramo de células). El homogenado resultante se centrifugó a 40.000 x g durante 15 min y el sobrenadante constituyó el extracto libre de células.

II.B.3. *Ultrasonido*

Las células lavadas se resuspendieron en tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 en la proporción de 9 ml por cada gramo de células, se pusieron a 0°C y a continuación se sometieron a un tratamiento por ultrasonidos, utilizando un sonicador BRANSON mod. B-12, a 20 KHz y 75 W durante dos periodos de 30 seg dejando un periodo de 1 min entre ambos a fin de que la temperatura del material biológico no sobrepasara los 4°C. El homogenado resultante

se centrifugó a 40.000 x g durante 15 min y el sobrenadante constituyó el extracto crudo.

II.B.4. *Tratamiento con lisozima*

Las células lavadas se resuspendieron en tampón Tris-ClH, 50 mM, pH 7,5 (9 ml/g de células), conteniendo sacarosa 0,5 M. A continuación se añadieron 200 mg de lisozima/g de células, se incubó la suspensión durante 2 horas a 30°C con agitación continua y se centrifugó a 4.500 x g durante 10 min. Los protoplastos obtenidos se resuspendieron en tampón Tris-ClH 20 mM, pH 7,5 (10 ml/g de células) y se dejaron a 0°C con agitación ocasional produciéndose su rotura por choque hipotónico. El homogenado resultante se centrifugó a 40.000 x g durante 15 min, y se desechó el precipitado.

II.B.5. *Prensa de French*

Las células lavadas se resuspendieron en tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 (9 ml de tampón/g de células) y se pasaron dos veces, a baja temperatura, por una prensa de French a 4.000 p.s.i. El homogenado resultante se centrifugó a 40.000 x g durante 15 min y el sobrenadante consti-

tuyó el extracto libre de células o extracto crudo.

II.C. PREPARACION DE PARTICULAS FOTOSINTETICAS

Las células lavadas se resuspendieron en un tampón de Tricina-KOH 50 mM, pH 7,7 conteniendo sacarosa 0,5 M y Cl_2Mg 10 mM. A continuación, las células se rompieron por ultrasonidos (20 KHz, 75 W) durante 40 seg y el homogenado resultante se centrifugó a 3.000 x g durante 5 min. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 40.000 x g durante 20 min y el precipitado resultante, resuspendido en el tampón anteriormente indicado, constituyó el sistema particulado con actividad fotosintética.

II.D. PREPARACION DE NADP-REDUCTASA Y DE FERREDOXINA

La NADP-reductasa de *Nostoc muscorum* se purificó a partir del extracto crudo correspondiente, preparado por sonicación de las células (cfr. II.B.3.), al que se añadió polvo de alúmina (100 mg/ml de extracto), con agitación suave. Después de 15 min se centrifugó la suspensión a 40.000 x g durante 5 min y se desechó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en tampón de fosfato sódico 0,25 M, pH 7,5 y se mantuvo a 0°C durante 15 min con agitación con-

tinua. Al cabo de este tiempo, la suspensión se centrifugó a 40.000 x g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se sometió a una precipitación fraccionada (30-70%, v/v) con acetona preenfriada a -20°C. El precipitado resultante se secó a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en tampón de pirofosfato sódico 0,15 M, pH 7,5, y se mantuvo durante 1 h a 2°C con agitación constante. Posteriormente se centrifugó a 40.000 x g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se sometió a una precipitación fraccionada con sulfato amónico (30-65%). El precipitado obtenido se disolvió en tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 y se dializó durante 12 h contra 200 volúmenes del mismo tampón. La preparación obtenida se aplicó a una columna (1,5 x 10 cm) de DEAE-celulosa equilibrada con el tampón antes indicado. Seguidamente la NADP reductasa se eluyó lavando la columna con el mismo tampón conteniendo 0,12 M en ClNa.

La ferredoxina de *Nostoc muscorum* se preparó siguiendo básicamente el método descrito por Mitsui y Arnon (1971), pero utilizando DEAE-Sephadex A-25 en lugar de DEAE-celulosa. Por otra parte, la ferredoxina de espinacas se preparó según el método de Buchanan y Arnon (1971).

II.E. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

II.E.1. *Actividad nitrito reductasa*

El ensayo standard de la actividad nitrito reductasa se realizó aeróbicamente en tubos de 15 ml, midiendo la desaparición de nitrito y utilizando metil viológeno reducido químicamente con ditionito como donador de electrones. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de tampón Tris-ClH pH 8,0, 2 μ moles de NO_2Na , 5 μ moles de metil viológeno, 4 mg de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ disueltos en 0,2 ml de CO_3HNa 0,24 M y una cantidad adecuada de preparación enzimática. Al cabo de 5 a 10 min de incubación de la mezcla a 30°C, la reacción se paraba por agitación vigorosa hasta la completa oxidación del ditionito empleando un aparato Super-Mixer de Lab-Line Instruments, Inc., USA. A continuación se añadían 9 ml de H_2O destilada y después de agitar se tomaban 0,3 ml de la mezcla, se añadían a otro tubo de ensayo con 2,7 ml de H_2O destilada y se valoraba el nitrito.

La actividad ferredoxina-nitrito reductasa se determinó de forma similar, pero sustituyendo el metil viológeno de la mezcla de reacción por 0,25 mg de ferredoxina.

Una Unidad de actividad nitrito reductasa es la

cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μmol de nitrito en 1 min en las condiciones del ensayo standard.

II.E.2. *Actividad nitrato reductasa*

La actividad nitrato reductasa se determinó midiendo la formación de nitrito en una mezcla de reacción que contenía en un volumen final de 1 ml: 100 μmoles de tampón Tris-ClH pH 7,5, 20 μmoles de NO_3K , 2 μmoles de metil viológeno, 2 mg de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ disueltos en 0,1 ml de CO_3HNa 0,24 M y la cantidad adecuada de la preparación enzimática. Después de incubar la mezcla 7 min a 30°C , la reacción se paraba por agitación vigorosa hasta la oxidación completa del ditió nito y se valoraba el nitrito formado.

La actividad de fotorreducción de nitrato se midió según Ortega et al. (1976).

Una Unidad de nitrato reductasa es la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1 μmol de nitrito por minuto.

II.E.3. *Actividad NADP-reductasa*

La actividad NADP-reductasa se determinó espectro-

fotométricamente siguiendo la reducción de citocromo *c* a 550 nm, en presencia de ferredoxina de *Nostoc muscorum* y de NADPH como donador de electrones, según el método descrito por Shin (1971).

Una Unidad de actividad NADP-reductasa es la cantidad de enzima capaz de catalizar la reducción de 1 μ mol de citocromo *c* por minuto.

II.E.4. *Otras actividades enzimáticas*

Las actividades de la alcohol deshidrogenasa y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se determinaron espectrofotométricamente a 340 nm, siguiendo la desaparición de piridín nucleótido reducido, según se describe en el Boehringer Biochemica Katalog.

II.F. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

II.F.1. *Concentración de proteínas*

La concentración de soluciones proteicas se realizó en una célula de ultrafiltración AMICON, modelo 52, provista de una membrana DIAFLO PM 10 que retiene los compuestos de peso molecular superior a 10.000.

II.F.2. Centrifugación en gradiente de sacarosa

Para preparar los gradientes de sacarosa se utilizaron tubos de 6,03 x 0,97 cm en el fondo de los cuales se depositaron 0,2 ml de sacarosa al 20% (p/v) en tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 conteniendo 0,2 M de ClNa. Encima se construyó un gradiente lineal de 3,8 ml de volumen y 5,5 cm de longitud del 5 al 20% (p/v) de sacarosa en el tampón antes mencionado, utilizando para ello un mezclador BUCHLER. A continuación los gradientes se enfriaron a 2°C realizándose el resto de las operaciones a esta temperatura. Una alícuota de 0,2 ml de la solución de proteína a analizar se colocó en la parte superior del gradiente, y seguidamente se llevó a cabo la centrifugación a 45.000 rpm durante 18 h en una ultracentrífuga BECKMAN SPINCO, modelo L2-50B con un rotor SW-56 Ti de tubos basculantes. Posteriormente se recogieron fracciones de los gradientes, empezando por el fondo del tubo, con un aparato BUCHLER tipo DENSI-FLOW, utilizando una bomba peristáltica LKB mod. PERPEX 10200 y un colector automático de fracciones LKB mod. ULTRORAC. Se recogieron fracciones de 3 gotas que se suplementaron con 0,9 ml de tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 y se midió la absorbancia a 280, 230 o 410 nm, analizándose las actividades enzimáticas en alícuotas de las correspondientes fracciones.

El coeficiente de sedimentación de la nitrito reductasa se calculó por el método de Martin y Ames (1961) utilizando como proteínas marcadoras: alcohol deshidrogenasa de levaduras (1 mg), $S_{w,20}^{\circ} = 7,40$ S; seroalbúmina bovina (1 mg), $S_{w,20}^{\circ} = 4,31$ S; ovoalbúmina (1 mg), $S_{w,20}^{\circ} = 3,55$ S, y mioglobina de corazón de caballo (1 mg), $S_{w,20}^{\circ} = 2,04$ S, todas ellas disueltas en el mismo tampón utilizado para preparar los gradientes.

II.F.3. *Determinación del radio de Stokes por filtración en gel*

El radio de Stokes de la nitrito reductasa de *Nos* *toe muscorum* se determinó por filtración en gel, según la técnica descrita por Siegel y Monty (1966), usando una columna (77,9 x 1,5 cm) empaquetada con Sephadex G-150 y equilibrada con tampón de fosfato 0,12 M, pH 7,5. Las soluciones de nitrito reductasa o de proteínas patrones se colocaron en la columna disueltas en 1 ml del tampón indicado, conteniendo sacarosa al 20% (p/v). El flujo de la columna, de 9 ml/h, se mantuvo constante por medio de una bomba peristáltica LKB mod. PERPEX 10.200, recogándose fracciones de 1 ml por medio de un colector automático LKB, mod. ULTRORAC.

El volumen de elución de las proteínas (V_e) se determinó midiendo la absorbancia de las fracciones a 280, 230 o 410 nm, o bien determinando las correspondientes actividades enzimáticas en alícuotas de las fracciones. El volumen de vacío de la columna (V_o) se midió determinando el volumen de elución de una muestra de 1 ml de azul dextrano 2.000 y el volumen total de la columna (V_t) se determinó calibrando la columna vacía con agua destilada. Los resultados se representaron como $(-\log K_{av})^{1/2}$ frente al radio de Stokes, según describen Laurent y Killander (1964), y siendo

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Las proteínas utilizadas como patrón y sus radios de Stokes fueron: alcohol deshidrogenasa de levadura, 4,60 nm; seroalbúmina bovina, 3,55 nm; ovoalbúmina, 2,73 nm; quimotripsinógeno A bovino, 2,24 nm; mioglobina de corazón de caballo, 2,07 nm y citocromo *c* de corazón de caballo tipo III, 1,0 nm.

II.F.4. *Determinación del peso molecular por filtración en gel*

El peso molecular de la nitrito reductasa se determinó por filtración en gel según el método de Andrews (1964) utilizando una columna de Sephadex G-150 y en las mismas condiciones experimentales del apartado anterior.

II.F.5. *Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida*

Las separaciones analíticas se hicieron a 4°C en tubos de 5 x 75 mm utilizando un aparato SHANDON, tipo 2541, y según el sistema de gel discontinuo descrito por Jovin et al. (1964). Las muestras de proteína (50-100 µg), previamente de salinizadas por filtración en Sephadex G-25, disueltas en tam pón Tris-ClH 50 mM, pH 8,0, conteniendo 20% (p/v) de sacaro-
sa, se aplicaron a geles de poliacrilamida al 7,5% con una capa superior de 0,5 cm de espesor de un gel de poliacrila-
mida al 2,5%. La electroforesis se inició conectando una co-
rriente continua de 1,5 mA/tubo durante 15 min, para a conti-
nuación aplicar una intensidad de 3 mA/tubo durante 75 min.

El tampón electrolito, de pH 8,5, estaba compuesto por Tris (1,2 g/l) y glicina (5,76 g/l). En todos los experimentos se pusieron, por lo menos en un tubo, 50 μ l de azul de bromofenol al 0,001% como marcador del desarrollo de la electroforesis.

Una vez desarrollada la electroforesis, los geles se sacaron de los tubos utilizando una jeringa con una solución de acético al 7% (v/v) en agua y las bandas de proteína se tiñeron sumergiendo los geles durante 2 h en una solución de Azul Coomassie al 1% (p/v) en acético al 7%. A continuación los geles se lavaron repetidas veces en una solución de acético al 7% (v/v) y metanol al 5% (v/v) en agua, en presencia de una resina cambiadora de iones (Dowex-50 W) que adsorbe el exceso de colorante.

La actividad MVH-nitrito reductasa se ensayó en los geles siguiendo un procedimiento similar al de Vega y Kamin (1977) para la nitrito reductasa de espinaca.

II.F.6. *Preparación de metil viológeno reducido*

La reducción del metil viológeno se llevó a cabo en tubos VACUTAINER de 2 ml de volumen, en condiciones anaeróbi

cas, bien químicamente con H_2 y asbesto de platino, o bien enzimáticamente con NADH más NADH-lipoamida oxido-reductasa (E.C. 1.6.4.3). En el primer caso la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0,8 ml: 6 μ moles de MV; 40 μ moles de tampón de fosfato pH 7,5 y unos mg de asbesto de platino. Esta mezcla de reacción se burbujeaba durante 15 min con una corriente de H_2 . En el segundo caso la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 0,8 ml: 6 μ moles de MV; 40 μ moles de tampón de fosfato pH 7,5 y 5 μ moles de NADH. La mezcla se gaseó durante 15 min con argon o CO , según los casos, y a continuación se añadieron 25 μ l de una NADH-lipoamida oxido-reductasa. La mezcla de reacción se dejó estar durante 30 min y a continuación se usó como fuente de MVH.

II.F.7. *Determinaciones espectrofotométricas*

Las medidas de absorbancia se hicieron en colorímetros BAUSCH & LOMB Spectronic, modelos 100 y 700. Las cinéticas enzimáticas y espectros de absorción se siguieron en espectrofotómetros PYE-UNICAM SP 1800 y SP 1750 con registrador incorporado.

Los coeficientes de extinción molar usados fueron:

$6,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el NAD(P)H a 340 nm y $28.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el citocromo *c* reducido a 550 nm.

II.F.8. *Determinación de clorofila*

La concentración de clorofila se determinó según el método de Arnon (1949), midiendo la absorción a 652 nm de la solución obtenida al extraer el material biológico con acetona al 80%. El coeficiente de extinción utilizado fué de $34,5 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$.

II.F.9. *Determinación de proteína*

La proteína se midió, según los casos, por el método de Lowry et al. (1951) o por el de Bailey (1967), utilizando ovoalbúmina como patrón.

La concentración de ferredoxina de *Nostoc muscorum* se determinó a partir de su absorbancia a 423 nm utilizando un coeficiente de extinción de $0,65 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ y un peso molecular de 11.000 (Mitsui y Arnon, 1971; Hase et al., 1976).

II.F.10. *Determinación de nitrato*

El nitrato se determinó colorimétricamente a 540 nm por la reacción de diazotación de Griess-Ilosway, según el

procedimiento descrito por Snell y Snell (1949). Una alícuota de la solución problema se suplementa con agua hasta 1 ml y se le añaden 1 ml de Sulfanilamida al 1% (p/v) en ClH 2,5 M y seguidamente 1 ml de una solución de N(-naftil)etilendiamina al 0,02% (p/v). Después de 10 min a temperatura ambiente se añade agua destilada hasta un volumen final de 5 ml y se mide la absorbancia a 540 nm. La cantidad de nitrito se determina por comparación con una recta patrón hecha en las mismas condiciones con cantidades conocidas de nitrito.

II.F.11. *Determinación de amoníaco*

El amoníaco se determinó colorimétricamente a 440 nm después de añadir el reactivo de Nessler, una vez fijado el amoníaco en SO_4H_2 0,01 N, según la técnica de microdifusión de Conway (1957).

II.F.12. *Determinación de sulfuro lábil*

Se realizó según el método de Siegel et al. (1973).

II.F.13. *Determinación de hidroxilamina*

La hidroxilamina se midió en la mezcla de reacción según el método descrito por Kadlubar et al. (1973).

II.F.14. *Determinación de sulfito*

El sulfito se determinó según el método descrito por Grant (1947). Se comprobó que la proteína presente en los extractos de *Nostoc muscorum* no producía interferencias significativas en el desarrollo del producto coloreado de la reacción, no siendo por tanto necesaria la adición de KOH al 1% en etanol al 10% en agua ni la adición de la solución saturada de Cl_2Hg en agua.

II.F.15. *Medidas de pH*

Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro BECKMAN mod. Expandomatic o METHROM HERISAU mod. E-512 con escala expandida.

II.G. REACTIVOS

Los piridín nucleótidos, flavín nucleótidos, alcohol deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADH-lipoamida oxido-reductasa, citocromo c, pHMB, Tris, Tricina, EDTA, DEAE-celulosa, fueron adquiridos a SIGMA, St. Louis, U.S.A. El MV, BV, ovoalbúmina, seroalbúmina, quimotripsinógeno A procedían de SERVA, Heidelberg, Alemania. El Sephadex G-150 y el DEAE-Sephadex (tipos A-25 y A-50) se adquirieron a

PHARMACIA, Upsala, Suecia. El resto de los compuestos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron a MERCK, Darmstadt, Alemania; RIEDEL, Hannover, Alemania; BDH, Poole, Inglaterra y CARLO ERBA, Milan, Italia.

El agua destilada se obtuvo mediante un destilador DRA y los gases empleados (anhídrido carbónico, monóxido de carbono, argon y nitrógeno) fueron de alta pureza y suministrados por la Sociedad Española del Oxígeno.

III. RESULTADOS

III.A. CRECIMIENTO DE *Nostoc muscorum*

La Fig. 1 muestra una curva típica de crecimiento de células de *N. muscorum*, cultivadas bajo condiciones standard en una botella de 20 l. Como puede observarse en la figura, existe una pequeña fase inicial de retardo, probablemente debido a que las células usadas en el inóculo requieren una adaptación previa al medio de cultivo nuevo. A continuación el cultivo entra en fase exponencial de crecimiento de aproximadamente dos días de duración y en la que el tiempo de generación, t_g , es de 16,5 h. En células cultivadas en semejantes condiciones y en frascos de 1 l de capacidad el tiempo de generación observado fue algo menor ($t_g = 14$ h y 20 min), probablemente debido a que en este último caso la iluminación de las células era mejor al ser su masa inferior. El tránsito a la fase estacionaria es lento, existiendo un período de algo más de dos días en que el crecimiento está limitado, bien porque la luz o algún nutriente escasea, o bien porque se dá una acumulación de productos tóxicos en el medio de cultivo.

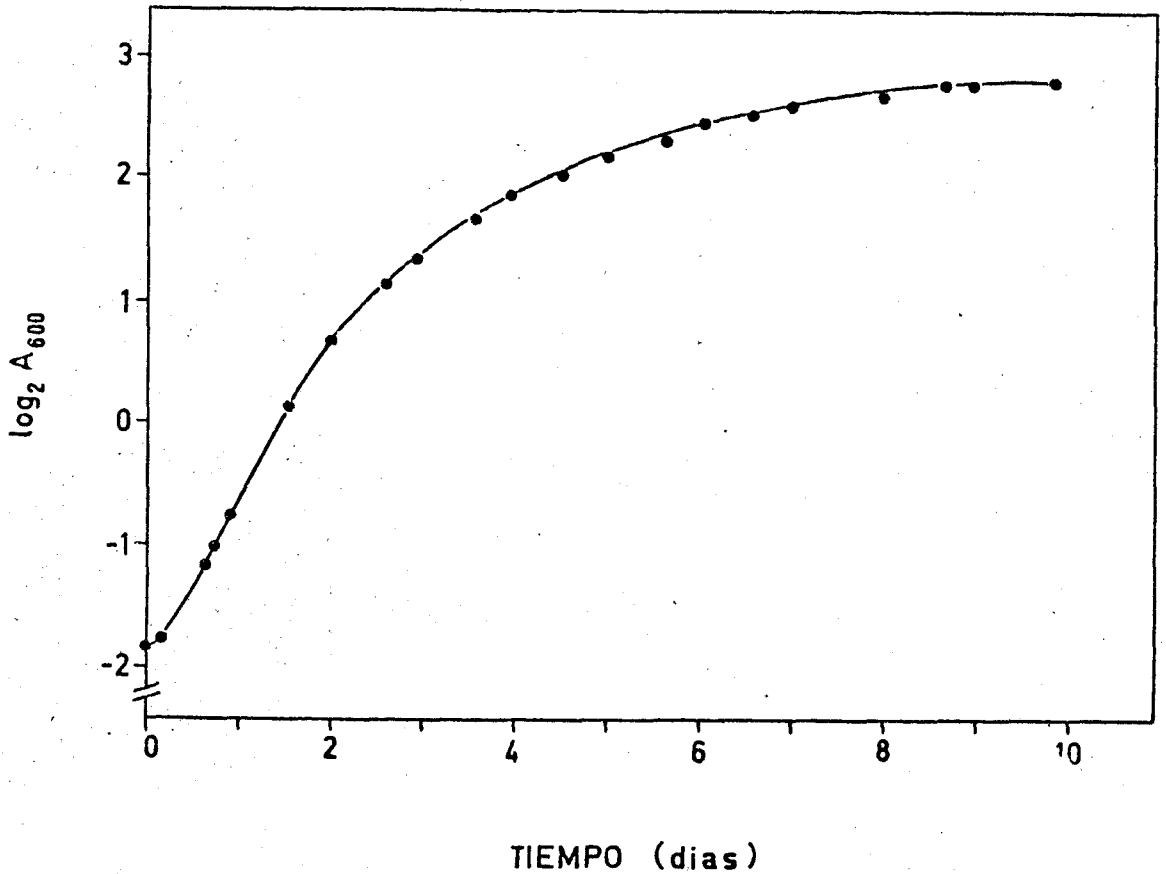


Figura 1: Curva de crecimiento de un cultivo de *Nostoc muscorum*. Las células se cultivaron en un medio (20 l) con nitrato como única fuente de nitrógeno. A los tiempos indicados se tomaron muestras del cultivo y se midió la absorbancia a 600 nm. Otras condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos.

III.B. SINTESIS Y LOCALIZACION DE LA NITRITO REDUCTASA DE *Nos* *toc muscorum*

III.B.1. Represión por amonio de la nitrito reductasa

En la Tabla I se muestran los niveles de actividad nitrito reductasa encontrados en extractos de células de *N. muscorum* cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno. Cuando se utilizó nitrato o nitrito como fuente de nitrógeno, se observaron niveles apreciables de actividad nitrito reductasa, siendo éstos mayores en nitrato que en nitrito. En cambio cuando la fuente de nitrógeno era amonio, la actividad nitrito reductasa era indetectable. Lo mismo ocurrió cuando se utilizó amonio conjuntamente con nitrato o nitrito.

III.B.2. Cinética de la desrepresión de la nitrito reductasa

En la Fig. 2 se muestra la síntesis de la nitrito reductasa de *N. muscorum* por un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Las células, que estaban cultivadas en un medio con ClNH_4 como única fuente de nitrógeno y que por tanto carecían de actividad nitrito reductasa, comienzan a sintetizar dicho enzima al poco tiempo de eliminar el amonio del medio de cultivo, alcanzándose el nivel máximo de actividad en

Tabla I

NIVELES DE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA EN CELULAS DE
Noctoc muscorum CULTIVADAS EN DISTINTAS FUENTES
 DE NITROGENO

FUENTE DE NITROGENO	MVH-NITRITO REDUCTASA (mU/mg proteína)
NO_3^-	31,5
NO_2^-	20,8
NH_4^+	0,0
$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$	0,0
$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^-$	0,4

Las células se cultivaron en medios que contenían: NO_3K 10 mM, NO_2Na 2 mM y/o ClNH_4 10 mM como fuente de nitrógeno. La concentración de nitrito se mantuvo constante por adición del compuesto, previa valoración, al medio de cultivo. Al cabo de tres días de tratamiento, las células se recogieron y la actividad MVH-nitrito reductasa se determinó en los correspondientes extractos crudos, preparados por sonicación de las células según se describe en Materiales y Métodos.

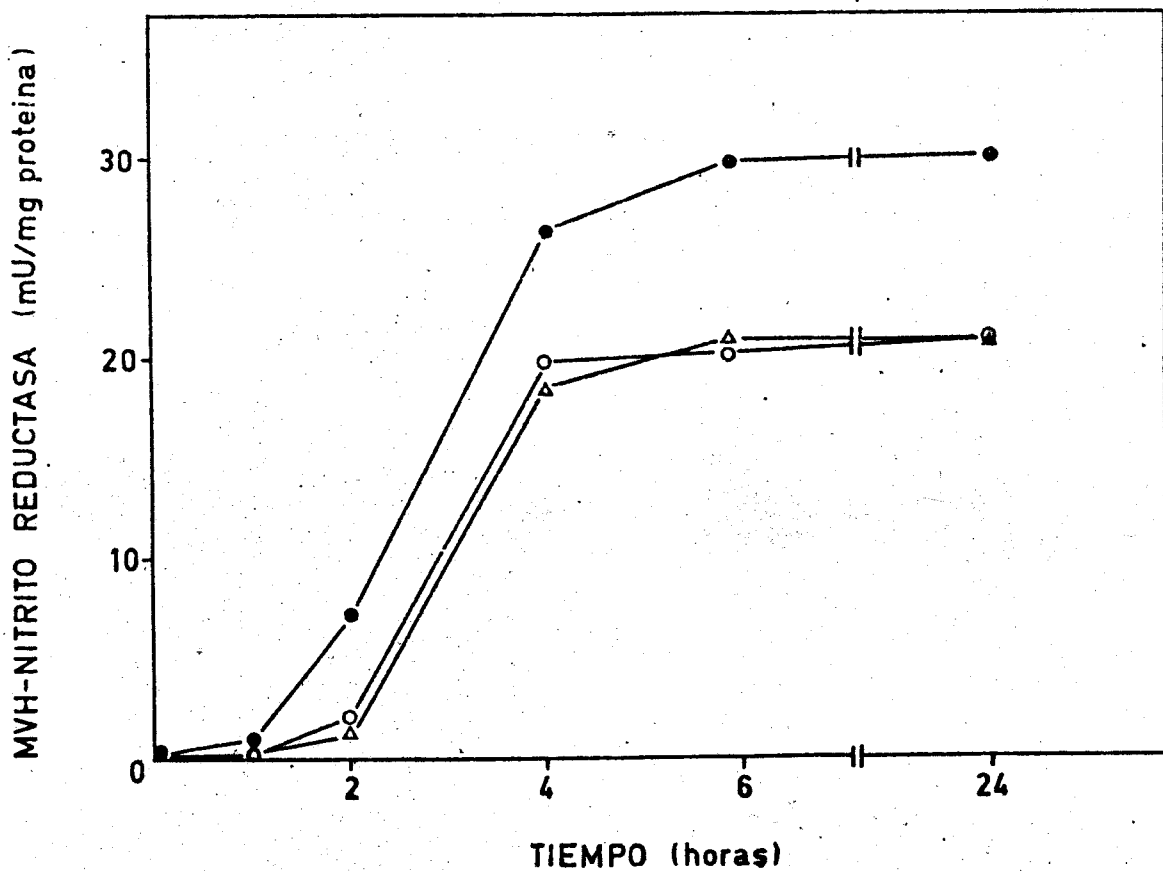


Figura 2: Cinética de la desrepresión de la nitrito reductasa e células de *Nostoc muscorum*. Las células, cultivadas en medios con amonio, se recogieron en fase exponencial de crecimiento, se lavaron dos veces con medio de cultivo fresco sin fuente de nitrógeno y finalmente se resuspendieron en este mismo medio y se colocaron en frascos de Roux de 1 l de capacidad: sin fuente de nitrógeno (O—O); con 2 mM de NO_2Na (Δ — Δ) ó con NO_3Na , 10 mM (\bullet — \bullet) como únicas fuentes de nitrógeno.

La actividad MVH-nitrito reductasa se midió en los correspondientes extractos crudos preparados a partir de células recogidas a los tiempos indicados.

zimática aproximadamente a las 6 h, manteniéndose este nivel constante durante el crecimiento exponencial del microorganismo. Se observa que los niveles máximos de actividad se consiguen cuando la fuente de nitrógeno utilizada es el nitrato, pero éste no es propiamente un inductor específico, sino simplemente la fuente más apropiada para que se produzca la síntesis del enzima, puesto que con nitrito o con N_2 como fuentes de nitrógeno también se alcanzan valores considerables de actividad nitrito reductasa.

III.B.3. *Localización intracelular de los enzimas del sistema reductor de nitrato*

Para la localización intracelular de las nitrato y nitrito reductasas, las células se rompieron enzimáticamente con lisozima como se indica en Materiales y Métodos con objeto de evitar la posible solubilización de los enzimas caso de encontrarse unidos a membranas celulares. Como se observa en la Tabla II, prácticamente toda la actividad nitrato reductasa presente en el extracto acelular aparece unida a partículas, a diferencia de la actividad nitrito reductasa, que se encuentra en su totalidad en el sobrenadante después de centrifugar el homogenado durante 15 min a 40.000 x g.

Tabla II

DISTRIBUCION DE LAS ACTIVIDADES NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS EN EXTRACTOS DE
Nostoc muscorum

FRACCION	PROTEINA (mg)	MVH-NITRATO REDUCTASA (mU)	(mU/mg prot.)	MVH-NITRITO REDUCTASA (mU)	(mU/mg prot.)
Homogenado	40,00	596,0	14,9	256,3	6,4
Sobrenadante 40.000xg, 15 min	9,25	7,2	0,8	289,6	31,3
Sedimento 40.000xg, 15 min	32,40	734,6	22,7	0,0	0,0

Células cultivadas en NO_3K 20 mM como fuente de nitrógeno, se recogieron en fase exponencial de crecimiento y después de lavarlas con medio fresco de cultivo se rompieron por tratamiento con lisozima. Las actividades MVH-nitrato reductasa y MVH-nitrito reductasa se midieron según el ensayo standard. Otros detalles acerca de las condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos.

III.C. PURIFICACION DE LA NITRITO REDUCTASA DE *Nostoc muscorum*

III.C.1. *Actividad nitrato reductasa en extractos crudos preparados por distintos métodos de rotura de las células*

La Tabla III muestra la influencia del método de rotura de las células sobre los niveles de actividad específica MVH-nitrato reductasa en el extracto crudo y sobre la recuperación de enzima que se obtiene al romper las células. A la vista de estos resultados se escogió la extracción de las células con acetona para la obtención de los extractos crudos que fueron el punto de partida para la purificación de la nitrato reductasa. Este método proporciona unos niveles de actividad específica y de recuperación del enzima comparativamente altos, y además permite un procesamiento cómodo de una gran masa de células.

III.C.2. *Método de purificación*

Etapa 1. Extracción de las células

La nitrato reductasa de *N. muscorum* se purificó a partir de un extracto libre de células (fracción 1), obteni-

ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA EN EXTRACTOS CRUDOS OBTENIDOS POR
DISTINTOS METODOS DE ROTURA DE CELULAS DE *Nostoc muscorum*.

METODO DE ROTURA DE LAS CELULAS	MVH-NITRITO REDUCTASA (mU/mg proteína)	RECUPERACION (U/g células)
Extracción con acetona	29,60	2,03
Vibración con perlas de vidrio	31,70	2,10
Sonicación	26,73	1,50
Tratamiento con Lisozima	36,01	1,53
Prensa French	25,94	2,34

Células cultivadas en NO_3K 20 mM como fuente de nitrógeno, se recogieron en fase exponencial de crecimiento y después de lavarlas con medio fresco de cultivo se congelaron hasta el momento de usarlas. Llegado el momento se descongelaron y resuspendieron en tampón 50 mM Tris-ClH, pH 7,5 (4 ml de tampón por cada gramo de peso fresco de células). A continuación se rompieron según se indica y la actividad MVH-nitrito reductasa se ensayó en los correspondientes extractos crudos. Los resultados indicados son el promedio de 3 ó más experimentos. Otras condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos.

do por extracción de 175 g de células con acetona según se indica en Materiales y Métodos (II.B.1.).

Excepto en los casos indicados la purificación se llevó a cabo entre 0-4°C. El tampón standard utilizado fué de Tris-ClH 50 mM, pH 7,5.

Etapas 2 y 3. Cromatografía en DEAE-celulosa

El extracto crudo se hizo pasar a través de una columna (5,5 x 20 cm) de DEAE-celulosa previamente equilibrada con el tampón standard. Después de lavar la columna con 1,5 l del mismo tampón, la nitrito reductasa se eluyó suplementando el tampón con 200 mM de ClNa, a una velocidad de 60 ml/h, y se recogieron fracciones de 10 ml. La ferredoxina y otras proteínas ácidas permanecían retenidas en la columna. Las fracciones que presentaban mayor actividad nitrito reductasa se mezclaron (fracción 2) y la solución obtenida se diluyó tres veces con el tampón standard y se hizo pasar por otra columna (2,5 x 80 cm) de DEAE-celulosa equilibrada con el mismo tampón. Esta columna se lavó con 2 l del tampón Tris-ClH suplementado con 80 mM de ClNa y seguidamente la actividad nitrito reductasa se eluyó de la columna suplementando el tampón con 150 mM de ClNa. Se recogieron fracciones de

10 ml y se mezclaron aquellas de mayor actividad enzimática (fracción 3).

Etapa 4. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50

La solución proteica recogida en la etapa anterior se diluyó con el tampón standard hasta una concentración final de ClNa de 100 mM, y se hizo pasar por una columna (2,5 x 32 cm) empaquetada con DEAE-Sephadex A-50 y previamente equilibrada con el tampón standard conteniendo ClNa 75 mM. A continuación la columna se lavó con 600 ml del tampón de Tris-ClH conteniendo ClNa 170 mM, y se recogieron fracciones de 10 ml. La Fig. 3 muestra el perfil típico de elución de la actividad MVH-nitrito reductasa durante esta cromatografía. Las fracciones de mayor actividad se mezclaron y la solución resultante constituyó la fracción 4.

Etapa 5. Cromatografía en Sephadex G-150

Con objeto de concentrar la preparación enzimática resultante de la etapa anterior, se diluyó con el tampón standard hasta una concentración final de 100 mM en ClNa y se hizo pasar por una columna (2,5 x 5 cm) de DEAE-Sephadex A-50 equilibrada con el tampón standard. La nitrito reducta

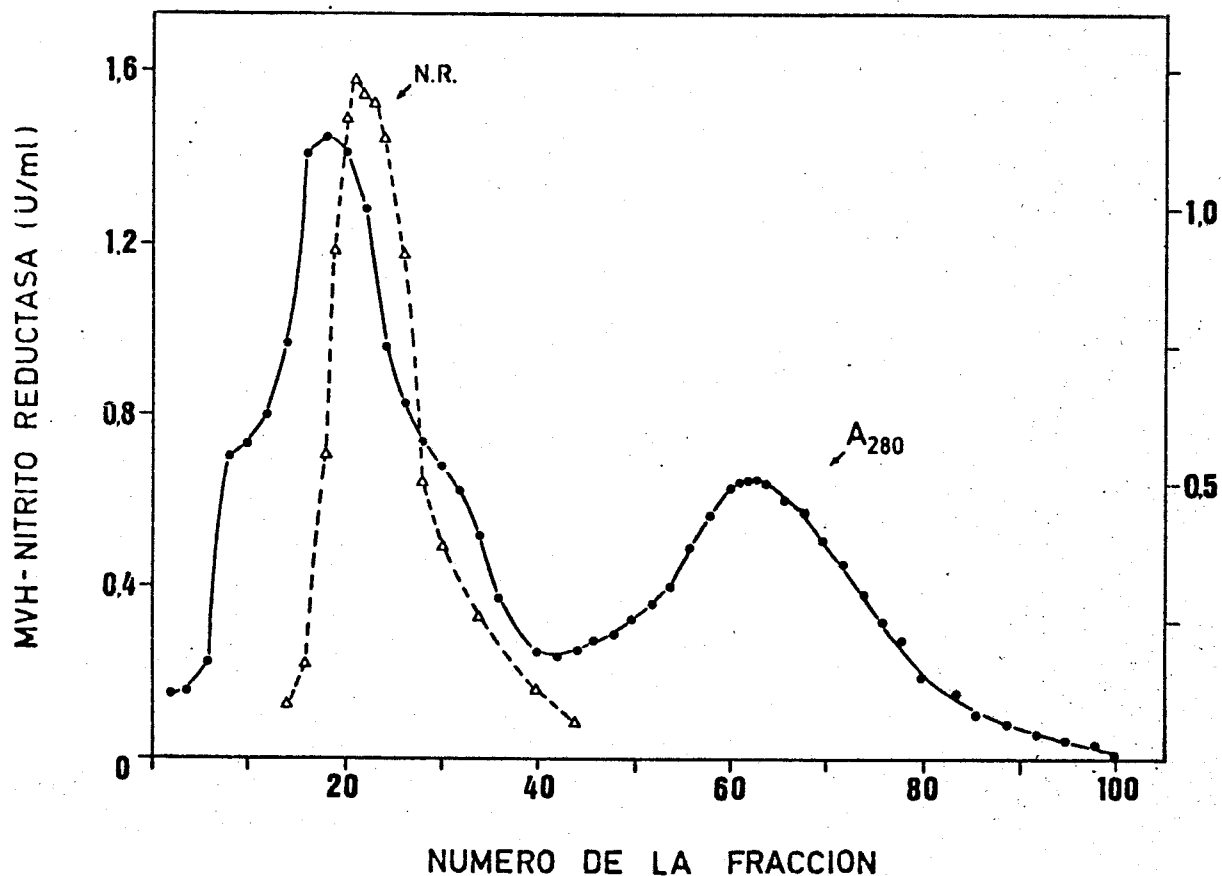


Figura 3: Perfil de elución de la actividad MVH-nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* adsorbida a una columna de Sephadex A-50. La actividad MVH-nitrito reductasa y la absorción a 280 nm se midieron utilizando alícuotas de las fracciones recogidas durante este paso de purificación. Otros detalles se indican en el texto.

sa se eluyó con este tampón conteniendo 200 mM de ClNa, concentrándose así entre 15 y 20 veces, 6 ml de la preparación resultante se filtraron a través de una columna (2,6 x 90 cm) de Sephadex G-150 equilibrada con tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5. La cromatografía se desarrolló con el mismo tampón, a una velocidad de 12 ml/h y se recogieron fracciones de 3 ml. La Fig. 4 muestra el perfil de elución de la actividad MVH-nitrito reductasa con respecto a la proteína. Las fracciones de mayor actividad nitrito reductasa (fracción 5) se utilizaron para su posterior purificación.

Etapa 6. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50

La solución proteica resultante de la etapa anterior se diluyó 2 veces con agua destilada y se aplicó a una columna (2,5 x 25 cm) de DEAE-Sephadex A-50 equilibrada con tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 conteniendo 100 mM en ClNa. A continuación se lavó la columna con 350 ml del tampón standard conteniendo 150 mM de ClNa y se recogieron fracciones de 3 ml. La Fig. 5 muestra el curso de esta cromatografía. Las fracciones del pico de actividad nitrito reductasa se mezclaron (fracción 6), y la preparación resultante se concentró 10 veces por ultrafiltración en un concentrador AMICON provisto

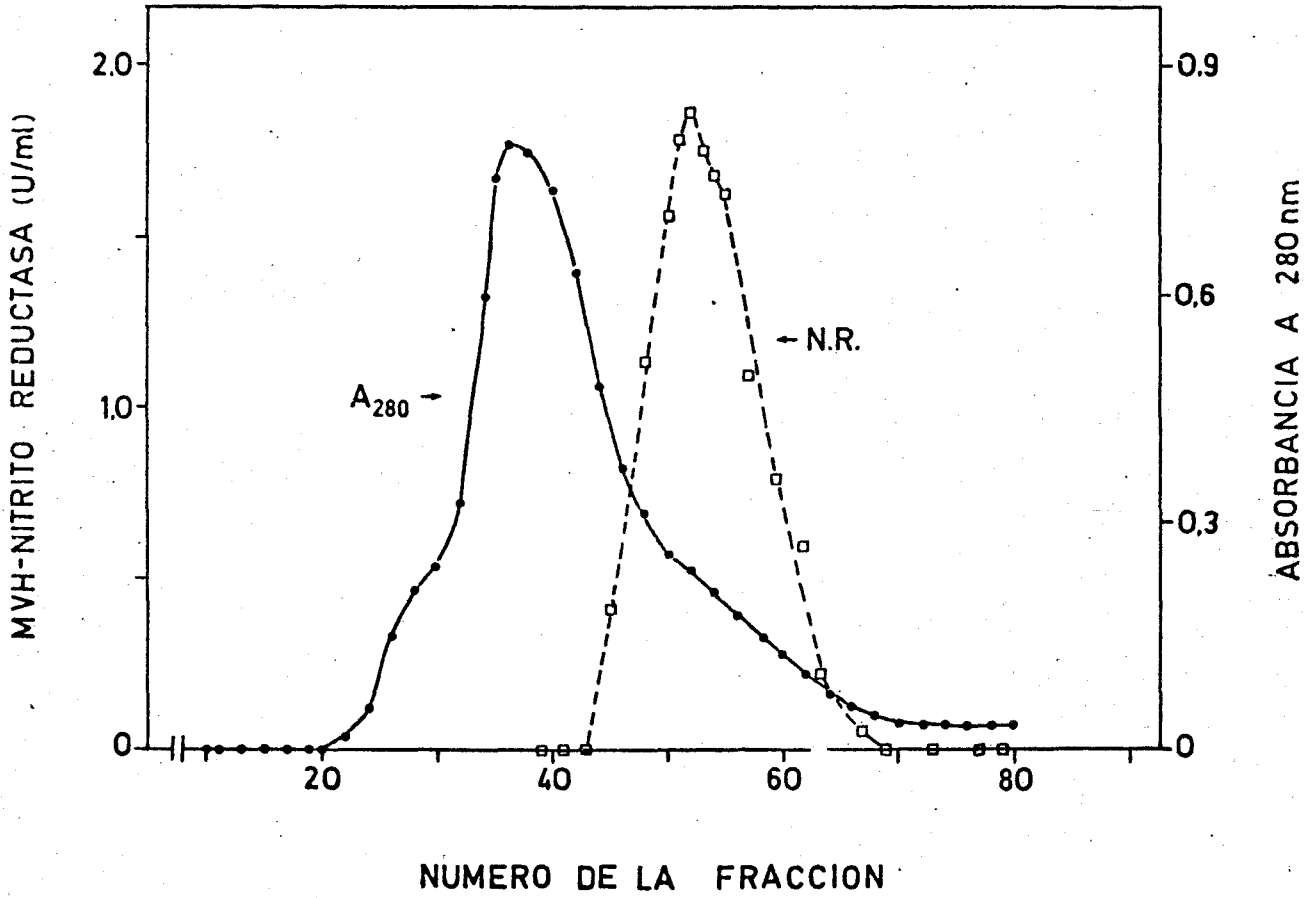


Figura 4: Cromatografía en una columna de Sephadex G-150 de la nitrato reductasa de *Nostoc muscorum*. Para más información ver el texto.

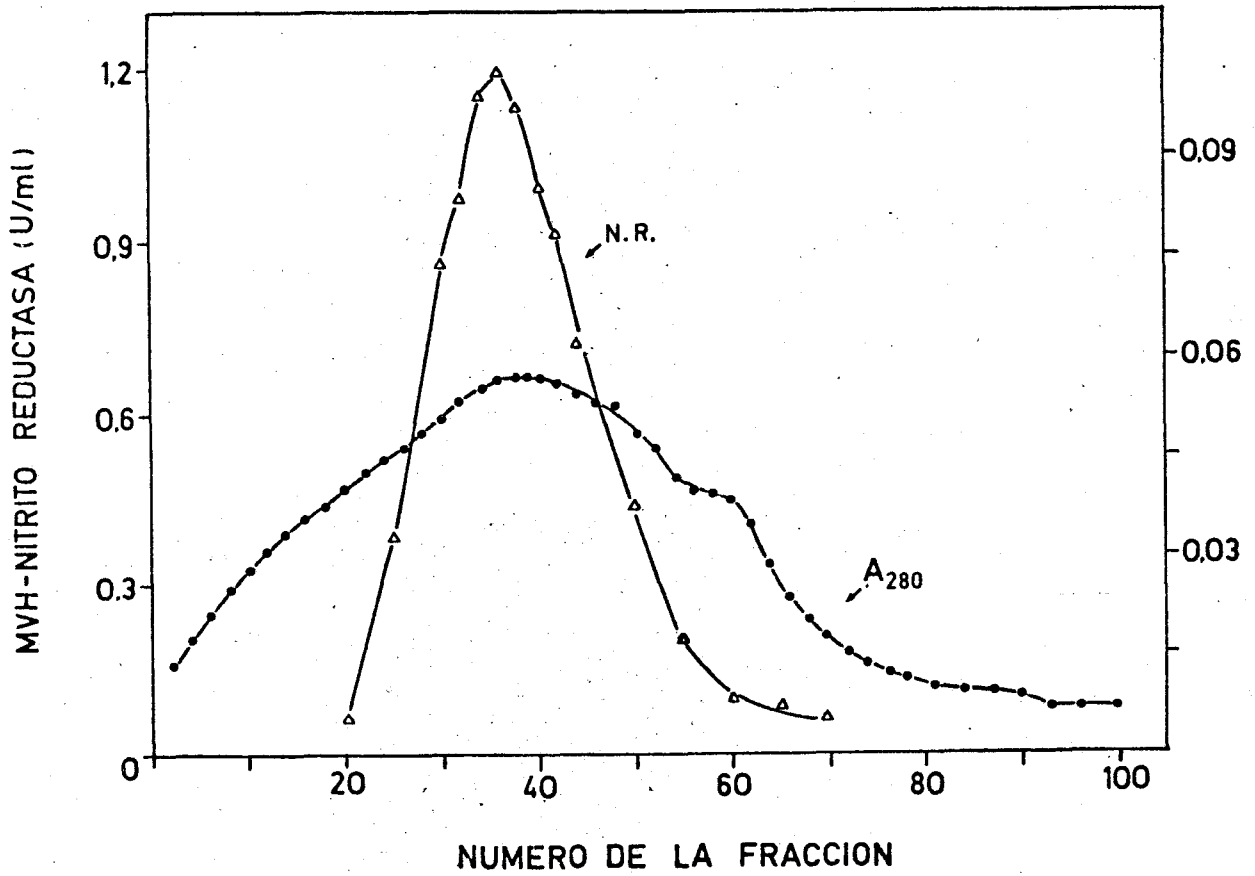


Figura 5: Perfil de elución de la actividad MVH-nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* adsorbida a una columna de Sephadex A-50. Para más información ver el texto.

de una membrana DIAFLO PM-10.

El procedimiento de purificación resumido en la Tabla IV permite obtener una preparación de nitrito reductasa (2,4 mg de proteína) con una actividad específica de 21,45 U/mg, lo que representa un factor de purificación de 763 veces y una recuperación del 15%.

III.C.3. *Pureza del enzima*

La preparación de nitrito reductasa se sometió a una electroforesis analítica en gel de 7,5% de poliacrilamida, a pH 8,5. Se estudiaron paralelamente 2 geles y se tiñeron por separado, uno para proteína y otro para la actividad MVH-nitrito reductasa, según se indica en Materiales y Métodos. La Fig. 6 muestra que en la preparación enzimática hay tres proteínas distintas, una de las cuales tiene actividad MVH-nitrito reductasa. La proteína que se corresponde con la actividad representa aproximadamente el 50% de la proteína total de la preparación.

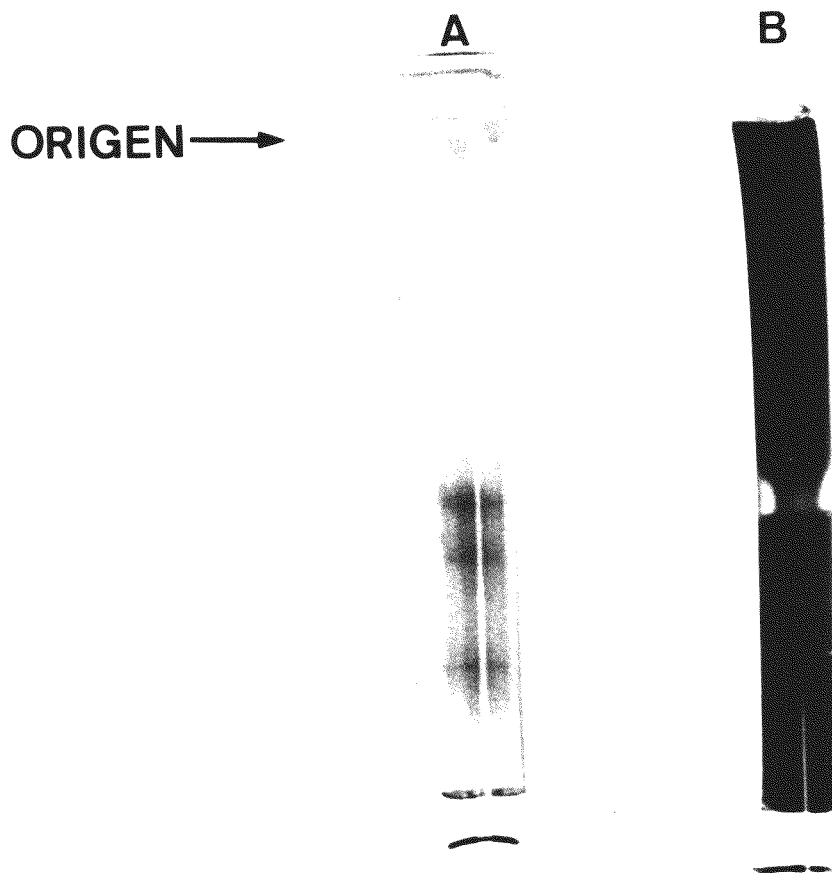
Tabla IV

PURIFICACION DE LA NITRITO REDUCTASA DE *Nostoc muscorum*

FRACCION	VOLUMEN (ml)	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD (Unidades)	RECUPERACION (%)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg)	PURIFICACION
1. Extracto crudo	1.000	12.585	353,6	100	0,028	1
2. Eluato de DEAE- celulosa	490	3.074	386,5	109	0,126	4,5
3. Eluato de DEAE- celulosa	233	978	282,9	80	0,289	10,3
4. Eluato de DEAE- Sefadex A-50	114	94,5	148,0	42	1,562	55,6
5. Eluato de Sefadex G-150	58	13,8	90,3	25	6,559	233,4
6. Eluato de DEAE- Sefadex A-50	54	2,4	51,6	15	21,450	763,3

El procedimiento de purificación se describe en Resultados. La actividad MVH-nitrito reductasa y la proteína se midieron según se indica en Materiales y Métodos.

**FIG. 6.- ELECTROFORESIS ANALITICA DE
LA NITRITO REDUCTASA (FRACCION 6)
DE *Nostoc muscorum*.**



A: PROTEINA

B: ACTIVIDAD

Figura 6: *Electroforesis en gel de poliacrilamida de la nitrito reductasa purificada de Nostoc muscorum.* La electroforesis de 65 μg de proteína se llevó a cabo en geles de 7,5% de acrilamida, durante 1 hora y 15 minutos a 3°C, con una intensidad constante de corriente continua de 3 mA por tubo.

Otros detalles del proceso electroforético y métodos de tinción se describen en Materiales y Métodos.

III.D. CARACTERIZACION Y PROPIEDADES DE LA NITRITO REDUCTASA DE *Nostoc muscorum*

III.D.1. *Estabilidad*

La nitrito reductasa parcialmente purificada puede mantenerse a -20°C sin pérdida significativa de su actividad. La solución enzimática en tampón 50 mM Tris-ClH, pH 7,5, conteniendo 150 mM de ClNa es estable a 2°C durante una semana. En general es aconsejable conservar el enzima en solución relativamente concentrada de protefna (5 mg/ml). A temperatura ambiente, la vida media de la actividad nitrito reductasa en el tampón antes indicado es de 40 h aproximadamente:

Una repetida congelación-descongelación de las soluciones de nitrito reductasa, así como una prolongada diálisis contra tampones de baja fuerza iónica pueden producir pérdidas significativas de la actividad enzimática. La estabilidad del enzima no se altera al cambiar el tampón Tris-ClH por otro equivalente de fosfato.

III.D.2. *Donadores de electrones*

Los resultados presentados en la Tabla V muestran que la nitrito reductasa parcialmente purificada de *N. mus-*

Tabla V

SISTEMA DONADOR DE ELECTRONES DE LA NITRITO REDUCTASA DE
Nostoc muscorum

SISTEMA	CONCENTRACION (mM)	NO ₂ ⁻ REDUCIDO (nmoles/min)
NADH	0,3	0,00
NADPH	0,3	0,00
S ₂ O ₄ ²⁻	23	2,04
+MV	5	102,00
+BV	5	51,20
+FAD	5	10,40
+FMN	5	8,57
+ Fd Espinaca	0,07	61,81
+ Fd <i>N. muscorum</i>	0,07	94,66

La mezcla de reacción incluía en un volumen final de 1 ml: nitrito reductasa parcialmente purificada, 20 µg de proteína; tampón Tris-ClH, pH 8,0, 100 mM; NO₂Na, 2 mM, y los distintos donadores y transportadores de electrones, a las concentraciones indicadas. Después de incubar a 30°C durante 5 minutos, se valoró el nitrito desaparecido.

corum no puede utilizar piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones. El ditionito, que por si sólo es poco eficiente como donador de electrones del enzima, resulta muy efectivo en presencia de un transportador. Existe una marcada especificidad del enzima por la ferredoxina reducida químicamente con ditionito como donador natural de electrones, siendo prácticamente ineficaces los flavín nucleótidos reducidos. Entre los sustitutos artificiales de la ferredoxina, el metil viológeno es el más eficaz.

III.D.3. *Caracterización de la actividad MVH-nitrito reductasa*

Como ensayo de rutina de la actividad nitrito reductasa se escogió como donador de electrones el metil viológeno reducido químicamente con ditionito por razones de eficiencia y economía. Con objeto de establecer las condiciones óptimas de ensayo se estudiaron las posibles variables que pudieran influir en la actividad del enzima.

Efecto de la concentración de ditionito en la mezcla de reacción

El ditionito en solución acuosa es relativamente inestable y produce entre otros compuestos, sulfito, que ha sido señalado previamente como inhibidor de otras nitrito

reductasas (Lafferty y Garrett, 1974; Vega et al., 1975b; Vega y Kamin, 1977).

La Fig. 7 muestra que una concentración inicial de 20 mM de ditionito en la mezcla de reacción es saturante. Asimismo se observa una clara tolerancia con respecto al límite superior de la concentración de ditionito, ya que concentraciones de 60 mM no afectan a la actividad enzimática, al contrario de lo observado para la nitrato reductasa de otra cianobacteria, *A. nidulans* (Manzano, 1977).

pH óptimo

La Fig. 8 presenta la variación de la actividad MVH-nitrito reductasa con el pH en un intervalo entre 5 y 11 y utilizando tampones de acético/acetato, fosfato, Tris-ClH y $\text{CO}_3\text{H}^-/\text{CO}_3^-$. El pH óptimo de trabajo es 8, tanto si se utiliza tampón fosfato como tampón Tris-ClH.

Efecto de la concentración de proteína en la actividad nitrito reductasa

La Fig. 9 muestra una clara proporcionalidad en-

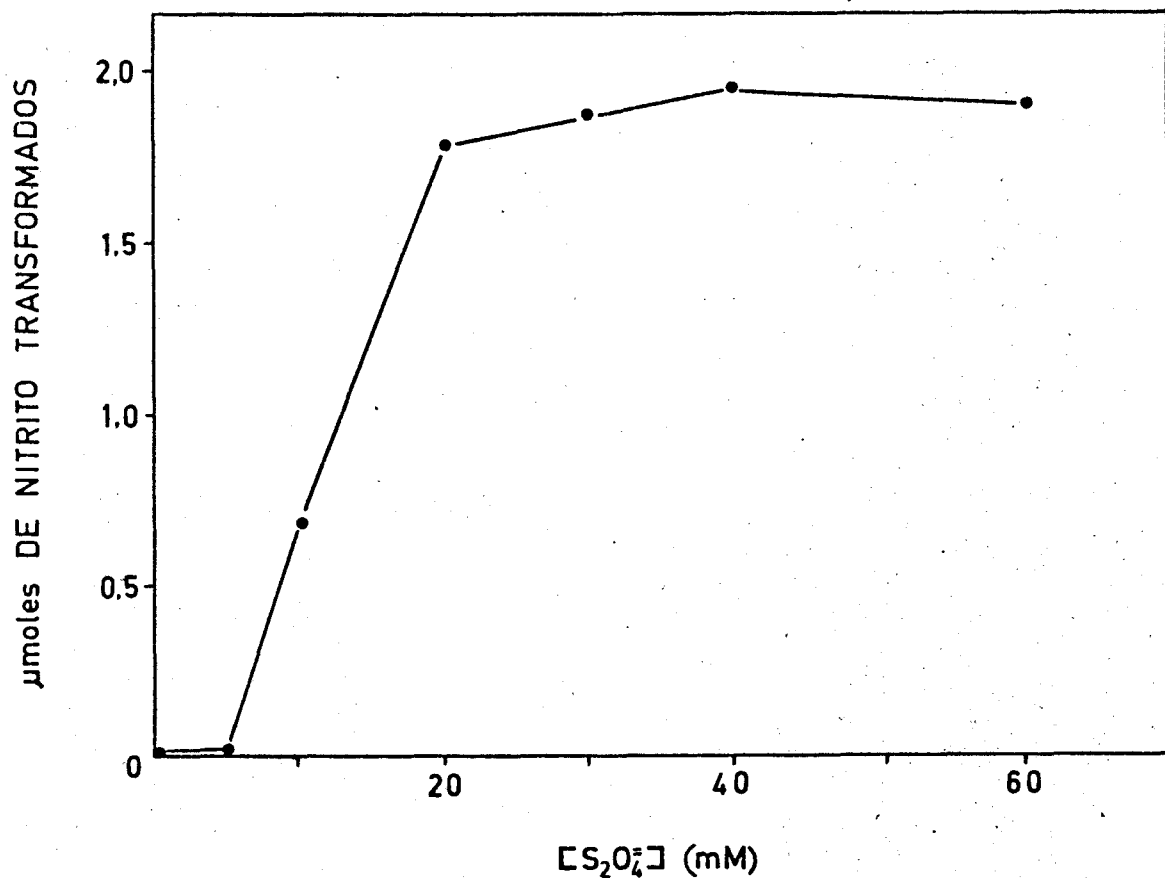


Figura 7: Efecto de la concentración de ditionito presente en la mezcla de ensayo sobre la actividad MVH-nitrito reductasa de *Nos to c muscorum*. La actividad MVH-nitrito reductasa se ensayó según el método standard descrito en Materiales y Métodos, pero utilizando las concentraciones indicadas de ditionito sódico.

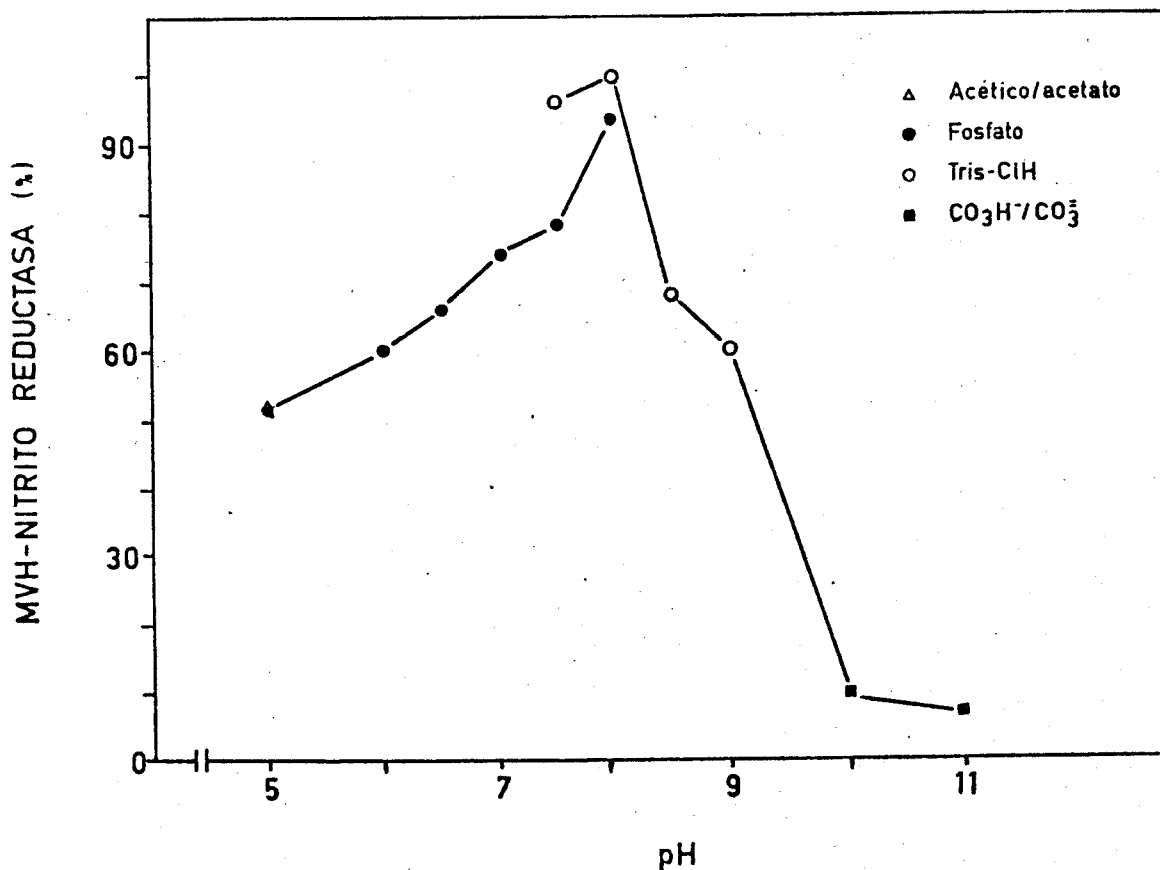


Figura 8: pH óptimo de la reacción catalizada por la nitrato reductasa de *Nostoc muscorum*. La actividad MVH-nitrato reductasa se ensayó según se indica en Materiales y Métodos, pero sustituyendo el tampón Tris-ClH pH 7,5 por 100 μ moles de los tampones indicados en la figura. El 100% de la actividad corresponde a 1,19 μ moles de nitrato reducido en 10 minutos. En cada caso se utilizó nitrato reductasa parcialmente purificada (0,034 mg de proteína).

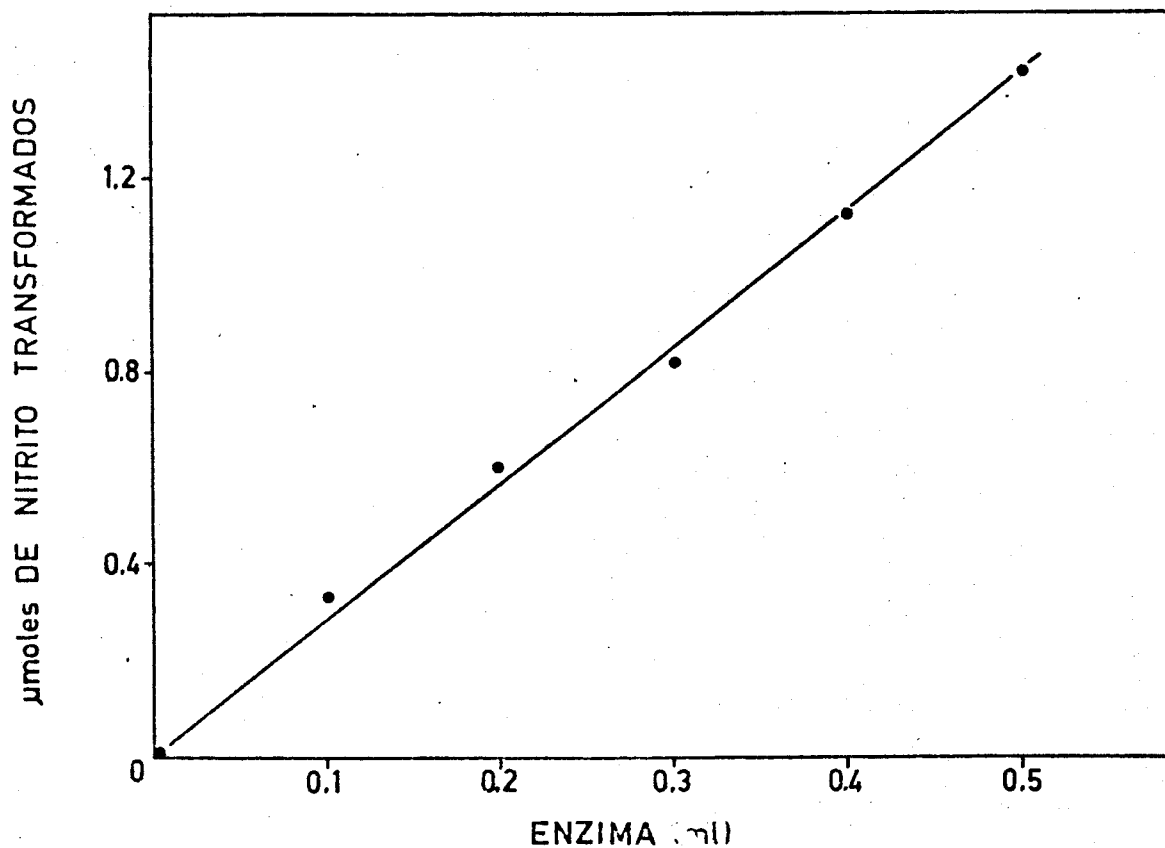


Figura 9: Actividad MVH-nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* en función de la concentración del enzima. La actividad MVH-nitrito reductasa se determinó según se indica en Materiales y Métodos, utilizando una preparación de enzima parcialmente purificada (0,046 mg de proteína/ml).

tre la cantidad de enzima añadido a la mezcla de reacción y la actividad MVH-nitrito reductasa.

Cinética de la actividad nitrito reductasa

La Fig. 10 muestra que la reducción de nitrito catalizada por la nitrito reductasa de *N. muscorum* es lineal con respecto al tiempo, manteniéndose constante la velocidad de la reacción durante 15 min como mínimo. El enzima purificado (Fig. 10 A) se comporta de forma similar al enzima en el extracto crudo (Fig. 10 B).

III.D.4. Estequiometria de la reacción

La Tabla VI muestra que la nitrito reductasa de *N. muscorum* cataliza la reducción de nitrito hasta amoniaco con una estequiometria 1:1 que se mantiene constante durante el curso de la reacción.

Los resultados demuestran que la nitrito reductasa de *N. muscorum* puede catalizar la reducción completa de nitrito hasta amoniaco, lo que conlleva la trans-

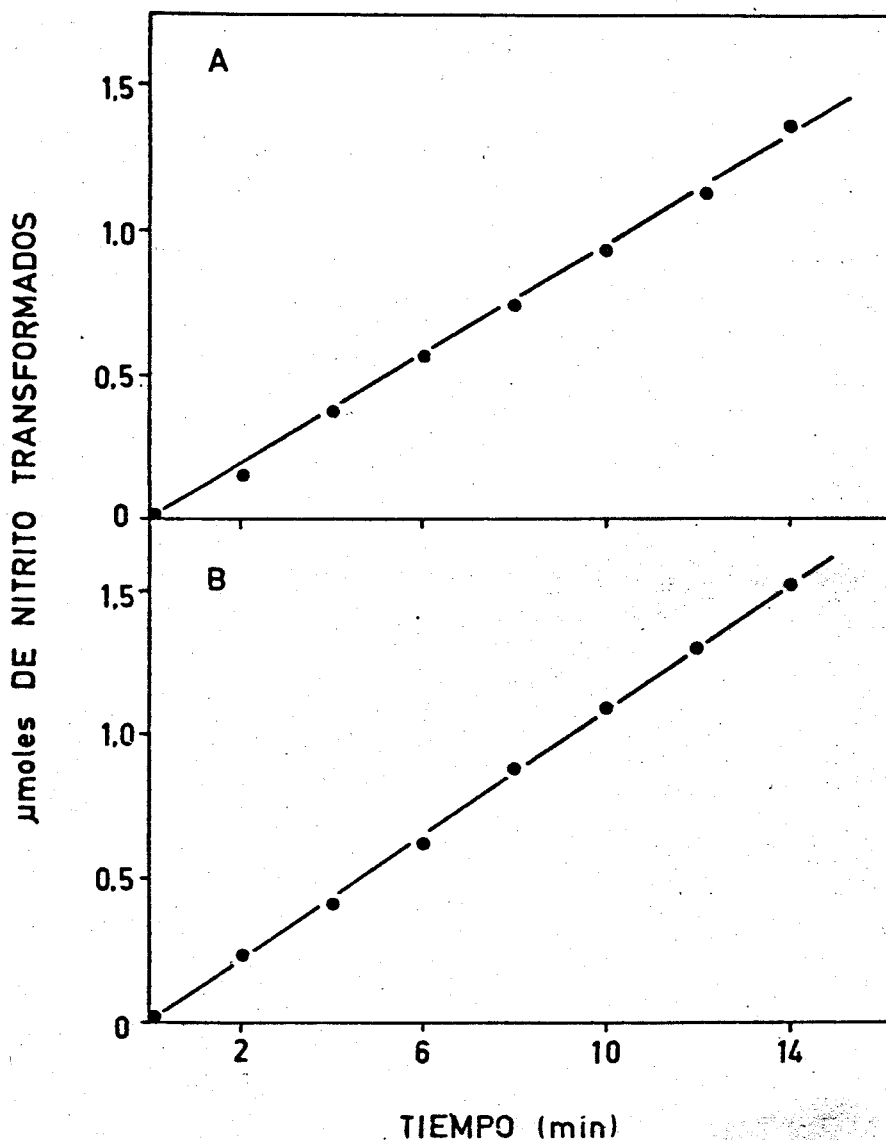


Figura 10: Cinética de la reducción de nitrito catalizada por la nitrito reductasa de *Nostoc muscorum*. Las condiciones de ensayo de la actividad MVH-nitrito reductasa fueron las mismas del ensayo standard, solo que el volumen de la mezcla de reacción fué tres veces mayor. A los tiempos que se indican se tomaron muestras de la mezcla de reacción y en ellas se valoró el nitrito presente. Se muestra la cinética obtenida con el enzima purificado, 0,014 mg de proteína (A) y con el extracto crudo, 3,58 mg de proteína (B).

Tabla VI

ESTEQUIOMETRIA DE LA REDUCCION DE NO_2^- Y LA FORMACION DE NH_4^+ EN LA REACCION CATALIZADA POR LA NITRITO REDUCTASA DE *Nostoc muscorum*

TIEMPO (min)	NO_2^- DESAPARECIDO (μmoles)	NH_4^+ FORMADO (μmoles)	RELACION $\frac{\text{NO}_2^- \text{ DESAPARECIDO}}{\text{NH}_4^+ \text{ FORMADO}}$
0	0	0	----
5	3,77	3,66	1,03
20	15,12	14,40	1,05

La mezcla de reacción, que se incubó a 30°C, contenía en un volumen final de 5 ml: 250 μmoles de tampón Tris-ClH pH 8,0; 20 μmoles de NO_2Na ; 25 μmoles de metil viológeno; 20 mg de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$; 20 mg de $^2\text{CO}_3\text{HNa}$ y nitrito reductasa purificada, 0,132 mg de proteína. A los tiempos indicados se midió en alícuotas de la mezcla de reacción el contenido en nitrito y amonio.

ferencia de seis electrones, sin la acumulación de cantidades significativas de compuestos nitrogenados de estados redox intermedios. La reacción catalizada se muestra en la siguiente ecuación:



III.D.5. Estudios cinéticos

Se estudió el comportamiento cinético de la nitrito reductasa de *N. muscorum* con respecto a sus sustratos el nitrito, la ferredoxina y el metil viológeno, determinándose la K_M para cada uno de ellos.

En este estudio se han empleado indistintamente las representaciones de Lineveawer-Burk, Woolf-Augustinsson-Hofstee ó Hanes-Woolf, utilizándose más de un tipo de representación para los datos obtenidos con cada de los sustratos, y obteniéndose resultados similares con las distintas representaciones. Las rectas trazadas en estas representaciones son las de regresión, encontrándose unos coeficientes

de determinación r^2 de 0,94 a 0,99. Los coeficientes de correlación r resultan siempre significativos para una seguridad del 99%.

La Fig. 11 muestra una representación de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de reducción de nitrato a diferentes concentraciones de este sustrato, utilizando como donador de electrones metil viológeno reducido con ditionito. La K_M para el nitrato es de 0,113 mM.

La Fig. 12 muestra una representación de Hanes-Woolf de la relación $\{MV\}/v$ a diferentes concentraciones de metil viológeno. La K_M para el metil viológeno es de 0,14 mM.

La Fig. 13 muestra una representación de Woolf-Augustinsson-Hofstee de las velocidades iniciales de reducción de nitrato a diferentes concentraciones de ferredoxina, que sustituía al MV como donador inmediato de electrones del enzima. La K_M para la ferredoxina es de 3,4 μ M.

III.D.6. *Actividad ferredoxina-nitrato reductasa*

Como ya se ha visto (Tabla V), la nitrato reductasa purificada de *N. muscorum* presenta una marcada afinidad por

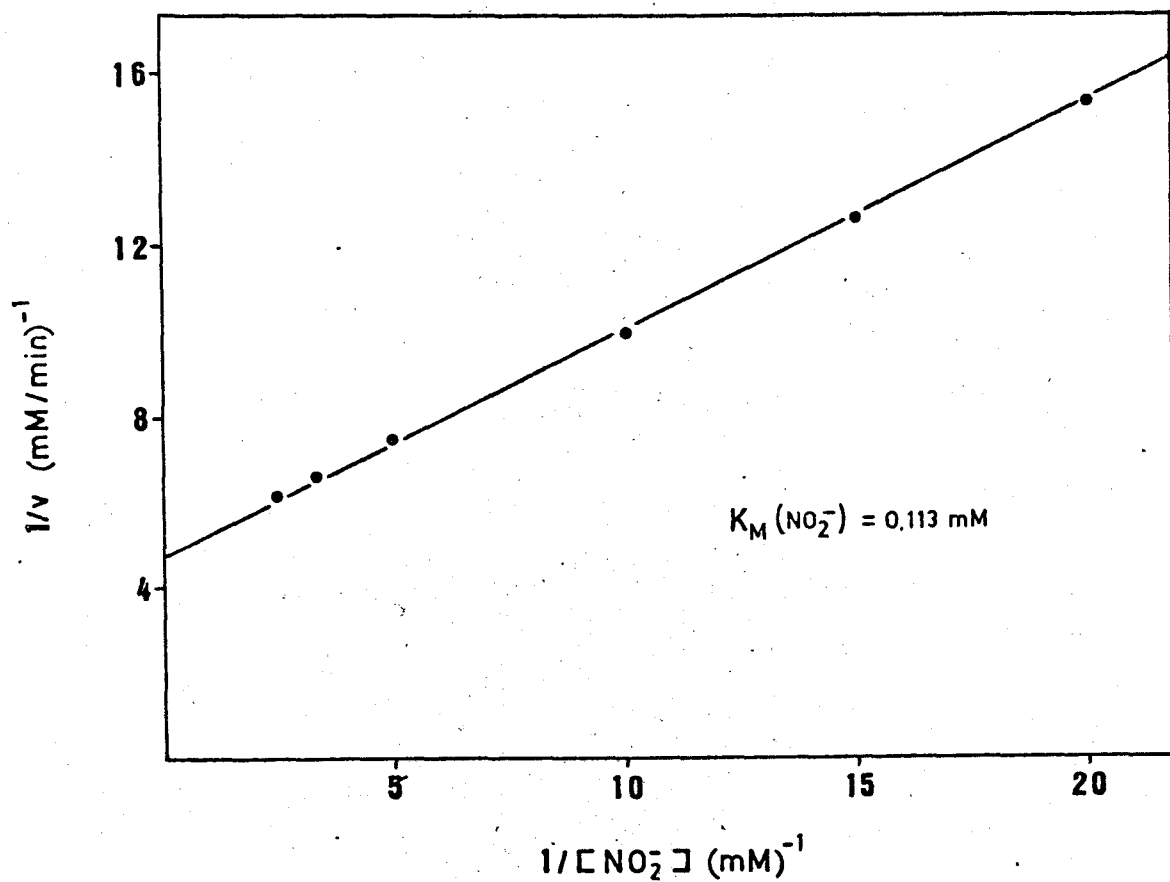


Figura 11: Representación de Lineweaver-Burk de la actividad MVH-nitrito reductasa en función de la concentración de nitrito. La actividad MVH-nitrito reductasa se midió según se indica en Materiales y Métodos, pero utilizando las concentraciones de NO_2Na indicadas en la figura, e incubando la mezcla de reacción a $30^\circ C$ durante 3 minutos. En cada medida se utilizaron $30 \mu g$ de proteína de una preparación de enzima parcialmente purificado.

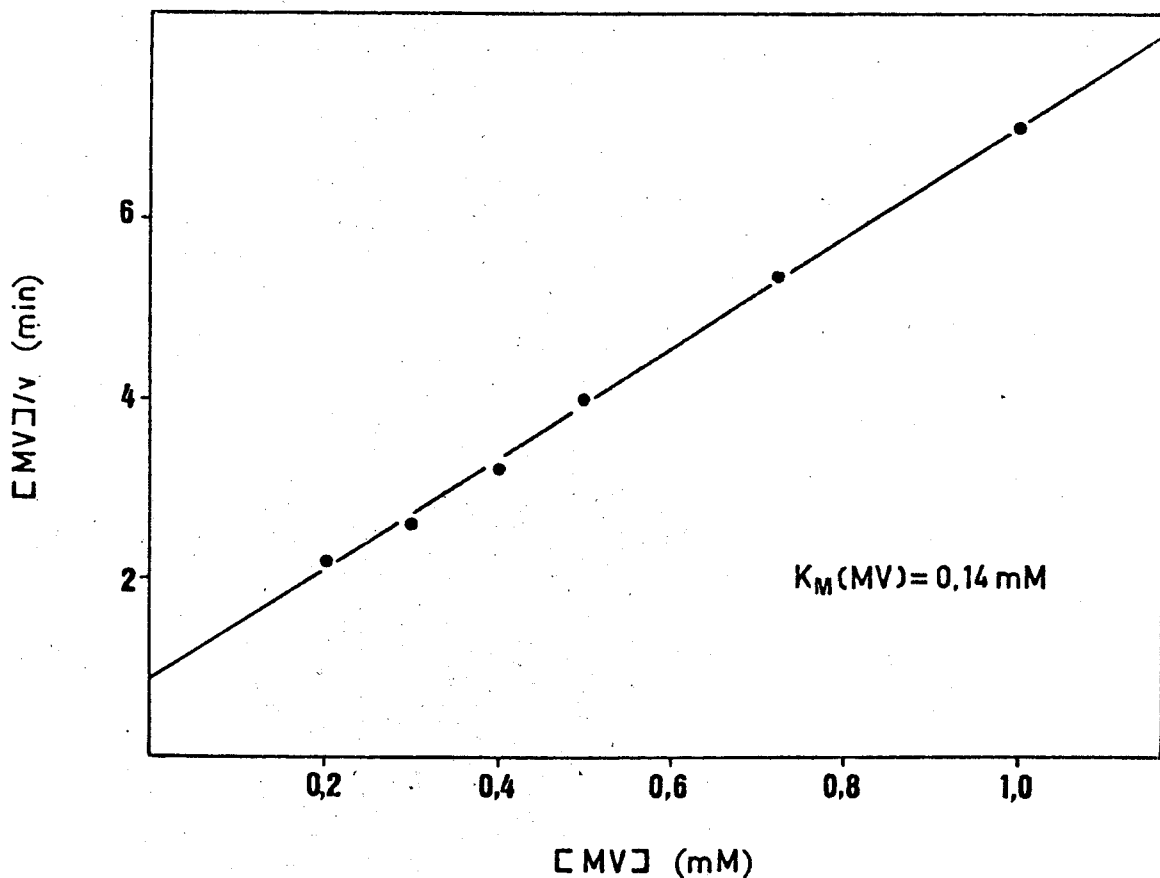


Figura 12: Representación de Hanes-Woolf de la actividad MVH-nitrito reductasa en función de la concentración de metil viológeno. La actividad MVH-nitrito reductasa se midió según se indica en Materiales y Métodos, pero utilizando las concentraciones indicadas de metil viológeno. En cada determinación de velocidad se utilizaron 22 μ g de proteína de una preparación de enzima parcialmente purificada.

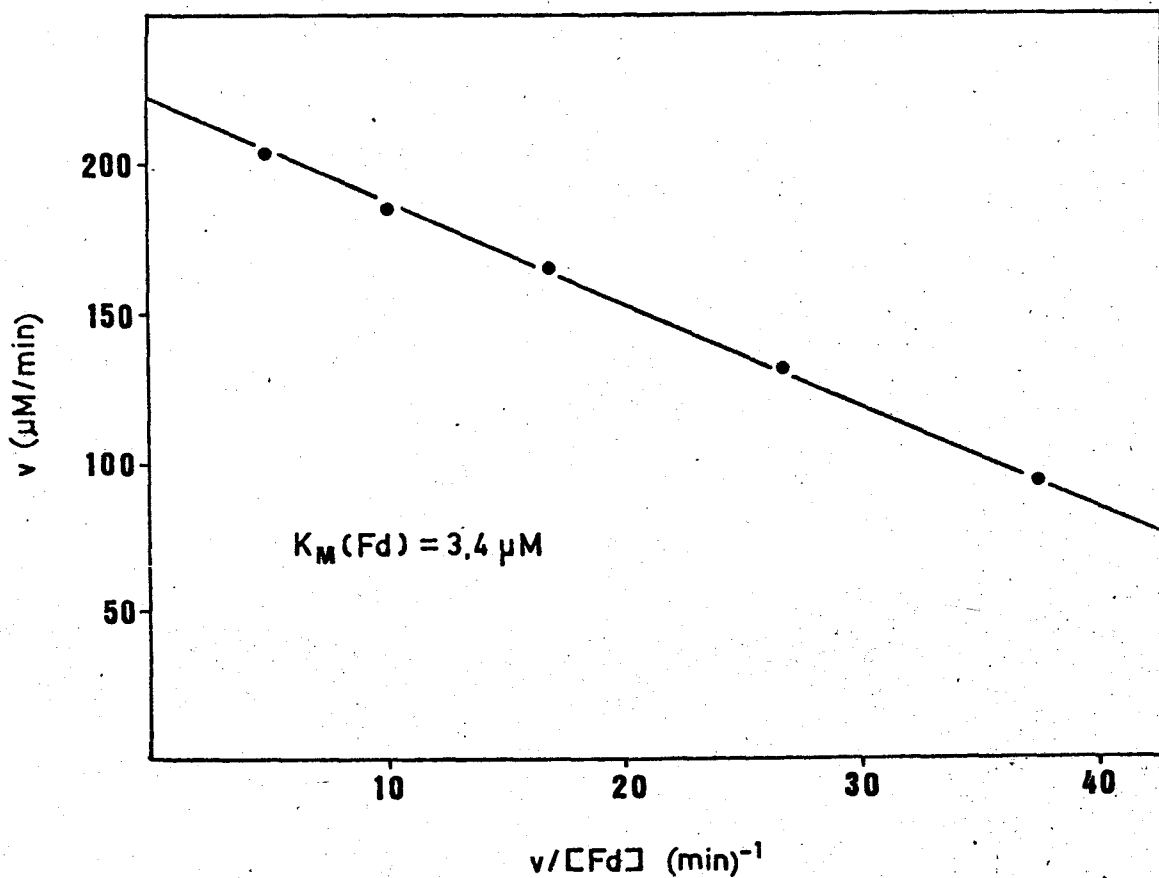


Figura 13: Representación de Woolf-Augustinsson-Hofstee de la actividad ferredoxina-nitrito reductasa en función de la concentración de ferredoxina. La actividad ferredoxina-nitrito reductasa se midió según se indica en Materiales y Métodos, pero usando ferredoxina purificada de *N. muscorum* a las concentraciones indicadas, e incubando la mezcla de reacción a 30°C durante 5 minutos. En cada determinación de velocidad se usaron $30 \mu\text{g}$ de proteína de una preparación de enzima parcialmente purificada.

la ferredoxina reducida como donador fisiológico de electrones. Sin embargo, en los estudios hasta aquí realizados se ha utilizado ditionito para reducir químicamente la ferredoxina. Los siguientes experimentos tratan de identificar el sistema fisiológico que, a través de la ferredoxina, conecta sus electrones a la nitrito reductasa para la reducción de nitrito hasta amoniaco.

Ferredoxina reducida fotosintéticamente

La ferredoxina de *N. muscorum* se redujo mediante un sistema de partículas fotosintéticas del mismo organismo, iluminado en presencia de Cl_2Mg (Mc Swain et al., 1976), utilizando agua como donador inicial de electrones. La Tabla VII muestra que la ferredoxina reducida de esta forma es capaz de donar electrones para la reducción de nitrito catalizada por la nitrito reductasa presente en el extracto crudo. Sin embargo, puede decirse que en este caso, la nitrito reductasa parcialmente purificada no se acopla eficazmente con la ferredoxina reducida de esta forma.

Cuando no se añade ferredoxina la reacción marcha algo, probablemente debido a que el extracto crudo y/o las partículas con actividad fotosintética contengan esta proteína. En presencia de CMU, inhibidor del flujo fotosintético

REDUCCION ENZIMATICA DE NITRITO CON FERREDOXINA REDUCIDA FOTOSINTETICAMENTE
 POR PARTICULAS DE *Nostoc muscorum*

SISTEMA	NITRITO REDUCIDO (nmoles/mg clorofila/hora)	
	<i>Extracto crudo</i>	<i>Enzima purificado</i>
Completo, luz	2756	82
<i>menos ferredoxina</i>	423	39
<i>menos partículas</i>	0	0
<i>menos nitrito reductasa</i>	0	0
partículas, hervidas 10 min.	0	0
Completo, luz + CMU	37	-
Completo, oscuridad	15	10

El sistema completo incluía, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de tampón Tricina-KOH, pH 7,7; 1 μ mol de NO_2Na ; 10 μ moles de Cl_2Mg ; 0,25 mg de ferredoxina purificada de *N. muscorum*, partículas de la cianobacteria, conteniendo 0,23 mg de clorofila, y 100 mU de nitrito reductasa (extracto crudo, 3,57 mg de proteína, o enzima purificado, 0,023 mg de proteína). Donde se indica se añadieron 100 nanomoles de CMU. Las mezclas de reacción se colocaron en vasijas de Warburg, con la nitrito reductasa en el brazo lateral, y se equilibraron durante 15 min a 20°C en una atmósfera de N_2 . La reacción se comenzó vertiendo el enzima al compartimento principal de la vasija, y se mantuvo con agitación suave durante 15 min a la luz (20.000 lux) o a la oscuridad. Al cabo de este tiempo se midió el contenido en nitrito de cada vasija. Otras condiciones experimentales según Materiales y Métodos.

de electrones (Wessels et al., 1956), se inhibe completamente la reducción de nitrito.

Cuando se utilizó ascorbato/DPIP en vez de agua como donador terminal de electrones, se encontró igualmente que la fotorreducción de nitrito depende de la ferredoxina, del flujo fotosintético de electrones y de la presencia de nitrito reductasa.

Ferredoxina reducida enzimáticamente

La Tabla VIII muestra que la ferredoxina reducida enzimáticamente con NADPH más NADP-reductasa es un eficaz donador de electrones para la reducción del nitrito catalizada por la nitrito reductasa del extracto crudo. Como fuente de poder reductor se utilizó un sistema regenerante de NADPH, a base de glucosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP^+ , ya que con NADPH directamente la reacción no marchaba. En estas condiciones la reducción de nitrito requiere la presencia de ferredoxina, NADPH, NADP-reductasa y nitrito reductasa. Al igual que se observa en el caso anterior la nitrito reductasa parcialmente purificada no se acopla eficazmente con la ferredoxina reducida de esta forma.

Tabla VIII

REDUCCION ENZIMATICA DE NITRITO CON FERREDOXINA REDUCIDA CON EL SISTEMA
NADPH-NADP REDUCTASA

SISTEMA	NITRITO REDUCIDO (nanomoles)	
	<i>Extracto crudo</i>	<i>Enzima purificado</i>
COMPLETO	745	87
<i>menos ferredoxina</i>	138	4
<i>menos NADP⁺</i>	0	0
<i>menos nitrito reductasa</i>	0	0
Nitrito reductasa, hervida 10 min.	0	0

El sistema completo incluía, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; 1 μ mol de NO_2Na ; 0,25 mg de ferredoxina purificada de *N. muscorum*; 40 μ moles de glucosa-6-fosfato; 0,5 μ moles de NADP^+ ; 1 Unidad de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa; 1 Unidad de NADP - reductasa purificada de *N. muscorum* y 100 mU de nitrito reductasa (extracto crudo, 3,31 mg de proteína; enzima purificado, 0,03 mg de proteína). Las mezclas de reacción se colocaron en vasijas de Warburg, con la nitrito reductasa en el brazo lateral, y se equilibraron durante 15 min a 25°C, en una atmósfera de N_2 . La reacción se comenzó vertiendo el enzima al compartimento principal de la vasija y se mantuvo con agitación suave durante 15 min. Al cabo de este tiempo se midió el contenido en nitrito de cada vasija. Otras condiciones experimentales según Materiales y Métodos.

III.D.7. *Inhibidores*

La Tabla IX muestra el efecto de distintos inhibidores sobre la actividad nitrito reductasa en una preparación purificada de esta proteína. El cianuro y la orto-fenantrolina, agentes quelantes de metales (la orto-fenantrolina presenta una unión altamente específica y estable con el Fe^{2+}), son inhibidores eficaces de la actividad nitrito reductasa, siendo el cianuro particularmente efectivo a bajas concentraciones. Por otra parte el pHMB, que reacciona específicamente con grupos -SH, o el cianato y la azida, agentes quelantes de metales, no inhiben significativamente la actividad nitrito reductasa. La incubación del enzima con 1 mM de pHMB durante 6 h a temperatura ambiente tampoco produce una inhibición apreciable de la actividad enzimática.

Inhibición por cianuro

La Fig. 14 muestra una representación de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de reducción de nitrito, a diferentes concentraciones del mismo, en ausencia y en presencia de cianuro 3 μM . La inhibición es de tipo competitivo con respecto al nitrito, calculándose una K_i para el cianuro de 1,4 μM . La recta de regresión representada tiene un r^2 de 0,94.

Tabla IX

EFFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD NITRITO
 REDUCTASA DE *Nostoc muscorum*

INHIBIDOR	CONCENTRACION (M)	INHIBICION (%)
pHMB	10^{-3}	3
CNK	10^{-5}	34
CNK	10^{-4}	83
CNOK	10^{-3}	1
N_3Na	10^{-4}	2
orto-Fenantrolina	10^{-4}	13
orto-Fenantrolina	10^{-3}	24
orto-Fenantrolina	10^{-2}	48

Las mezclas de reacción contenían en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de tampón Tris-ClH, pH 8,0; 2 μ moles de NO_2Na ; 5 μ moles de metil viológeno; 20 mg de $S_2O_4Na_2$; 20 mg de CO_2HNa ; nitrito reductasa purificada, 0,02 mg de proteína y los inhibidores correspondientes a las concentraciones indicadas. Al cabo de 10 min a 30°C se midió el nitrito en alícuotas de las mezclas de reacción. 100% de actividad nitrito reductasa corresponde a 0,125 μ moles de nitrito desaparecido por min.

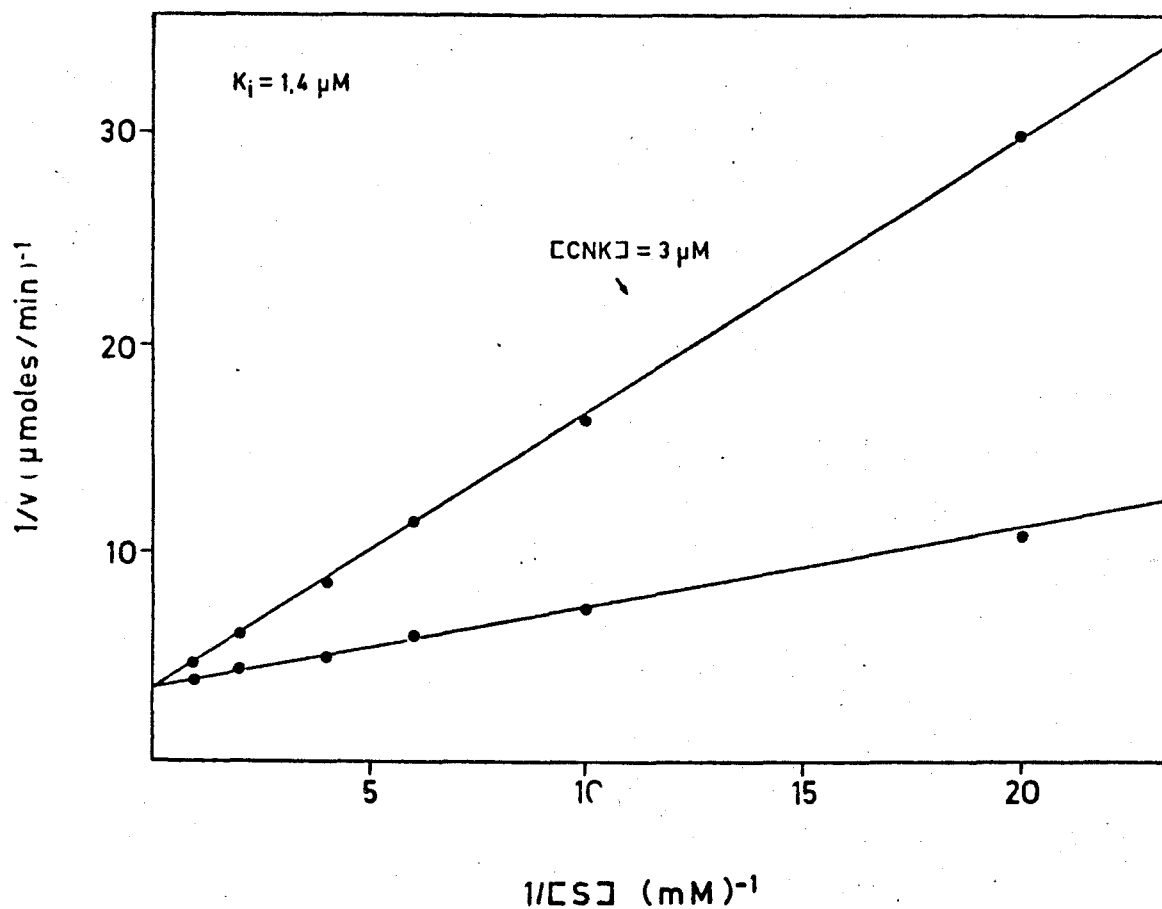


Figura 14: Inhibición por cianuro de la nitrito reductasa de *Nostoc muscorum*. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las de la figura 11. Donde se indica se añadió a la mezcla de reacción CNK hasta 3 μM .

Inhibición por hidroxilamina o sulfito

La hidroxilamina y el sulfito son sustratos y/o inhibidores de nitrito reductasas de otras fuentes (Hewitt, 1975; Greenbaum et al., 1978; Vega et al., 1979; Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979), por ello se ha analizado su posible efecto inhibitor sobre la nitrito reductasa de *N. muscorum*. La Tabla X muestra que la hidroxilamina a una concentración de 20 mM inhibe fuertemente a la nitrito reductasa, mientras que el sulfito lo hace en menor grado. La Fig. 15 muestra que la hidroxilamina es un inhibidor competitivo con respecto al nitrito, con una K_i de 0,57 mM (r^2 de la recta de regresión = 0,98).

Por otra parte, es interesante resaltar que ni la hidroxilamina ni el sulfito son sustratos de la nitrito reductasa parcialmente purificada de *N. muscorum* (Tabla XI). Como donadores de electrones se utilizaron los mismos que para la actividad nitrito reductasa (MVH ó ferredoxina reducida) pero se utilizó hidroxilamina o sulfito como posibles aceptores de electrones, y se midió su desaparición de la mezcla de reacción con el tiempo. El NAD(P)H tampoco tuvo efecto como donador de electrones.

Tabla X

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA DE
Nostoc muscorum POR HIDROXILAMINA O SULFITO

ADICION	CONCENTRACION (mM)	INHIBICION (%)
Sulfito	10	5
	20	19
Hidroxilamina	0,5	0
	1	3
	10	46
	20	87

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 250 μ moles de tampón Tris-ClH, pH 8,0; 2 μ moles de NO_2Na ; 5 μ moles de metil viológeno; 20 mg de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$; 20 mg de CO_3HNa ; nitrito reductasa (Fracción 3), 0,47 mg de proteína y SO_3Na_2 ó NH_2OH , a las concentraciones indicadas. Al cabo de 10 min a 30°C , se midió el nitrito en las correspondientes mezclas de reacción. 100% de actividad nitrito reductasa corresponde a 0,15 μ moles de nitrito desaparecido por min.

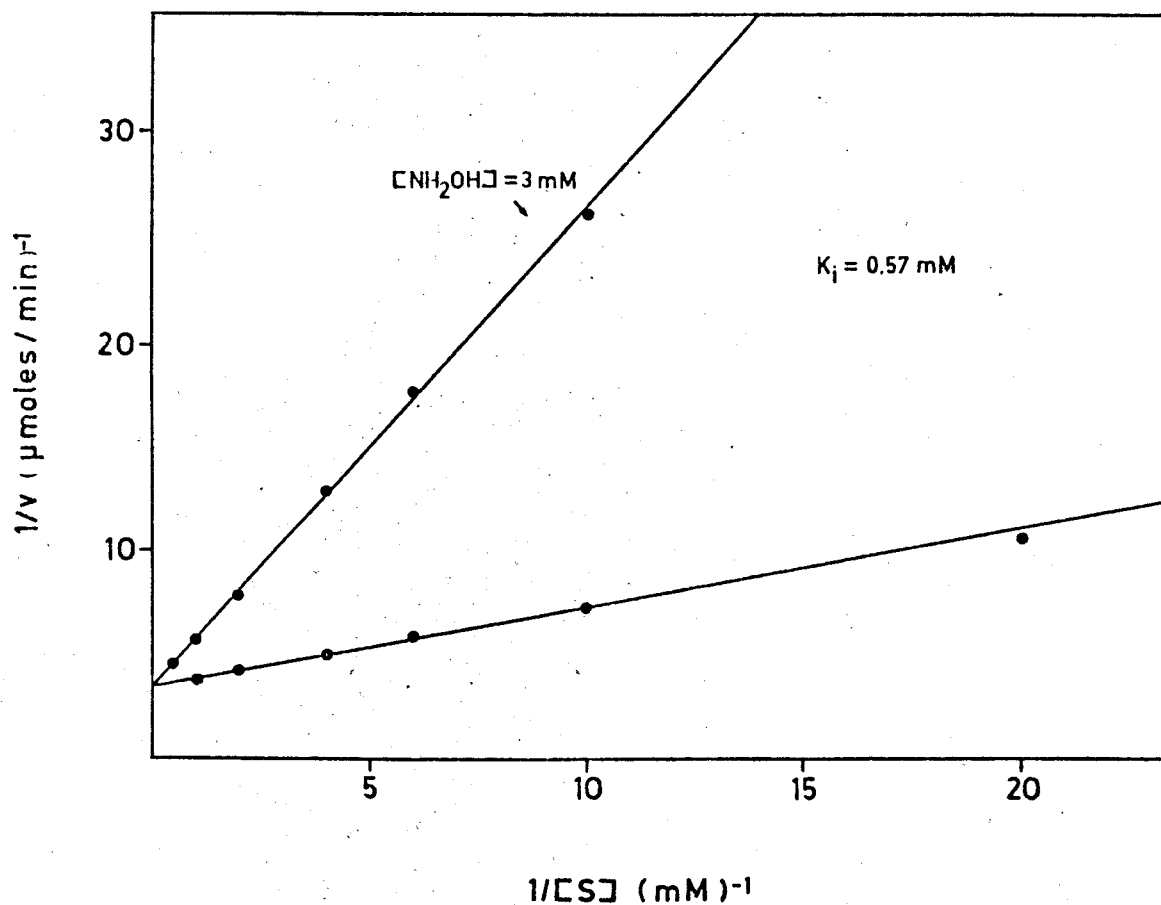


Figura 15: Inhibición por hidroxilamina de la nitrito reductasa de *Nostoc muscorum*. Las condiciones experimentales fueron semejantes a las de la figura 11. Donde se indica se añadió a la mezcla de reacción hidroxilamina hasta 3 mM.

Tabla XI

REDUCCION DE HIDROXILAMINA Y SULFITO POR LA NITRITO REDUCTASA DE
Nostoc muscorum

SISTEMA DONADOR DE ELECTRONES	ACEPTOR DE ELECTRONES	SUSTRATO DESAPARECIDO (μ moles / 15 min)
$S_2O_4^{=}$ + MV	NH_2OH	0,00
	SO_3Na_2	0,00
	NO_2Na	1,63
$S_2O_4^{=}$ + Fd	NH_2OH	0,00
	SO_3Na_2	0,00
	NO_2Na	1,51

Las mezclas de reacción fueron las del ensayo standard de la actividad nitrato reductasa, pero sustituyendo donde se in
dica el nitrato por hidroxilamina o sulfito, ambos a una con-
centración de 2 mM. Las concentraciones de nitrato, sulfito e
hidroxilamina al principio y al final de la reacción se midie
ron según se indica en Materiales y Métodos.

Inhibición por CO de la actividad nítrito reductasa

La Tabla XII muestra que cuando el enzima se incubaba en condiciones anaeróbicas con metil viológeno reducido y CO se inhibe fuertemente su actividad. Esta inactivación es reversible, y después de oxigenar la mezcla de incubación se recupera la actividad enzimática. Cuando el enzima se incubaba en presencia de CO con ditionito o con ditionito metil viológeno, la inhibición fue del 25 y del 50% respectivamente, siendo en todos los casos reversibles después de oxigenar. También se observa en la Tabla que la presencia de poder reductor es necesaria para la inhibición por CO de la actividad enzimática.

La Fig. 16 muestra la cinética de las inactivaciones antes mencionadas. Cuando la nítrito reductasa se preincuba con MVH más CO, el enzima se inactiva relativamente rápido, presentando una vida media de 2 h. Se observa que la velocidad de inactivación decrece sensiblemente después de la primera hora de incubación.

INACTIVACION DE LA NITRITO REDUCTASA DE *Nostoc muscorum*
 POR PREINCUBACION CON CO Y METIL VIOLOGENO. REACTIVACION
 POR OXIGENO

MEZCLA DE PREINCUBACION	ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA (%)	
	Anaerobiosis	Después de oxigenación
Enzima	100	
+ MVH	100	
+ S ₂ O ₄ ²⁻	96	
+ S ₂ O ₄ ²⁻ + MVH	102	
+ CO	101	
+ CO + MVH	27	101
+ CO + S ₂ O ₄ ²⁻	75	100
+ CO + S ₂ O ₄ ²⁻ + MVH	51	98

Las mezclas de preincubación se prepararon añadiendo en condiciones anaeróbicas 0,5 ml de nitrato reductasa purificado (0,09 mg de proteína) gaseada previamente con N₂ ó CO, a 0,8 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, previamente deoxigenado y saturado con N₂ ó CO y conteniendo, según se indica, 8 mg de S₂O₄Na₂, 8 mg de CO₃HNa y/ó 1 µmol de metil viológeno reducido (ver Métodos). Después de 6 horas de incubación a 22°C, la actividad nitrato reductasa se midió por adición de 50 µl de cada mezcla de preincubación a los reactivos del ensayo standard. En los casos que se indican, las mezclas de preincubación se abrieron al aire durante 12 horas y la nitrato reductasa se midió de nuevo. El 100% de actividad corresponde a 144 nanomoles de nitrato desaparecido por minuto.

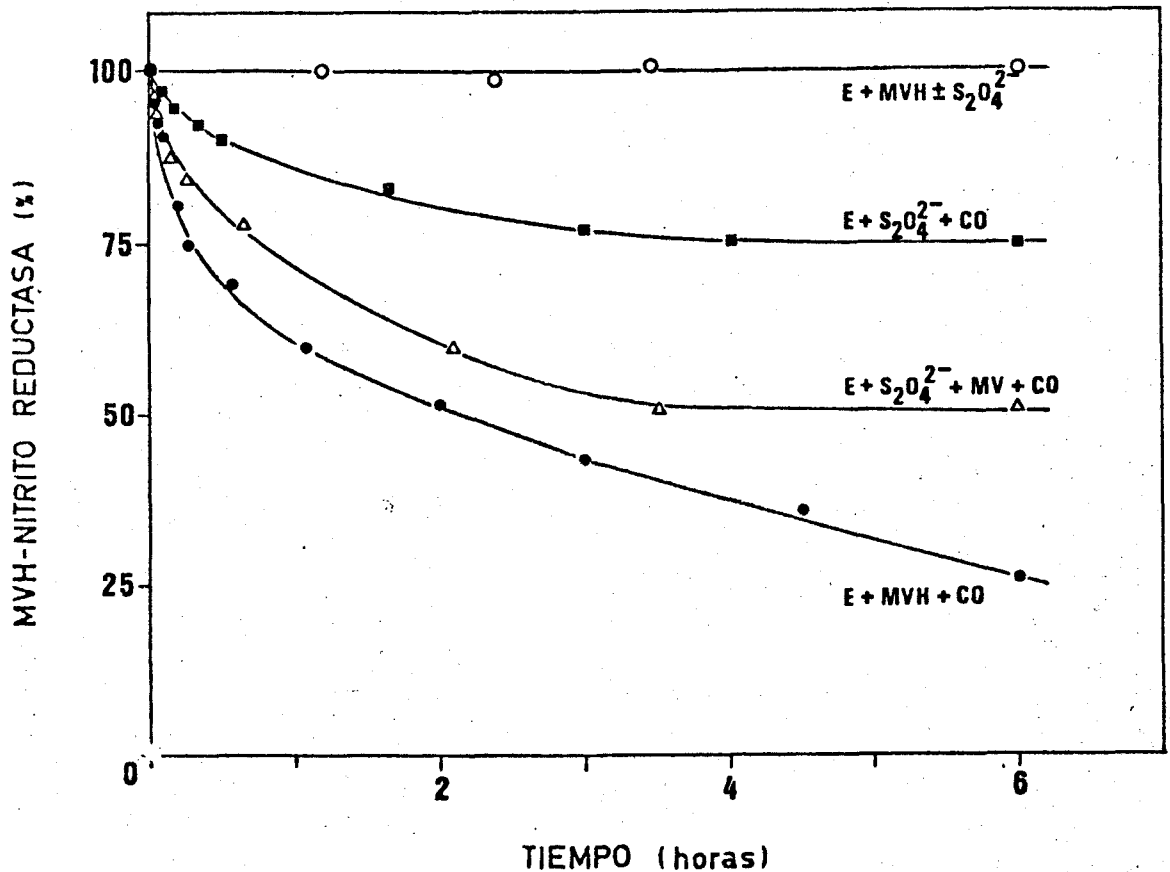


Figura 16: Cinéticas de inactivación por CO de la nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* en presencia de reductores. Las mezclas de incubación del enzima se prepararon según se indica en la Tabla XII. A los tiempos indicados se midió la actividad MVH-nitrito reductasa por adición de 50 μ l de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo standard. El 100% de la actividad corresponde a 144 nanomoles de nitrito desaparecido por minuto.

III.D.8. *Propiedades moleculares*

Peso molecular

El peso molecular de la nitrito reductasa de *N. muscorum* se ha determinado por dos métodos: método A, por filtración a través de una columna calibrada de Sephadex G-150, según Andrews (1964). Método B, por combinación de las técnicas de filtración en gel y centrifugación en gradiente de sacarosa, según el método propuesto por Siegel y Monty (1966).

En el primer método se utilizó una columna (77,9 x x 1,5 cm) de Sephadex G-150 equilibrada durante varios días con tampón de fosfato sódico 0,12 M, pH 7,5 y calibrada filtrando por separado muestras de alcohol deshidrogenasa, seroalbúmina, ovoalbúmina, quimotripsinógeno A, mioglobina y citocromo c. 2 ml de una preparación parcialmente purificada de nitrito reductasa (fracción 5) se aplicaron a la columna y el volumen de elución del enzima se determinó a partir de su curva de actividad.

En la Fig. 17 se calcula un peso molecular de 53.700 para

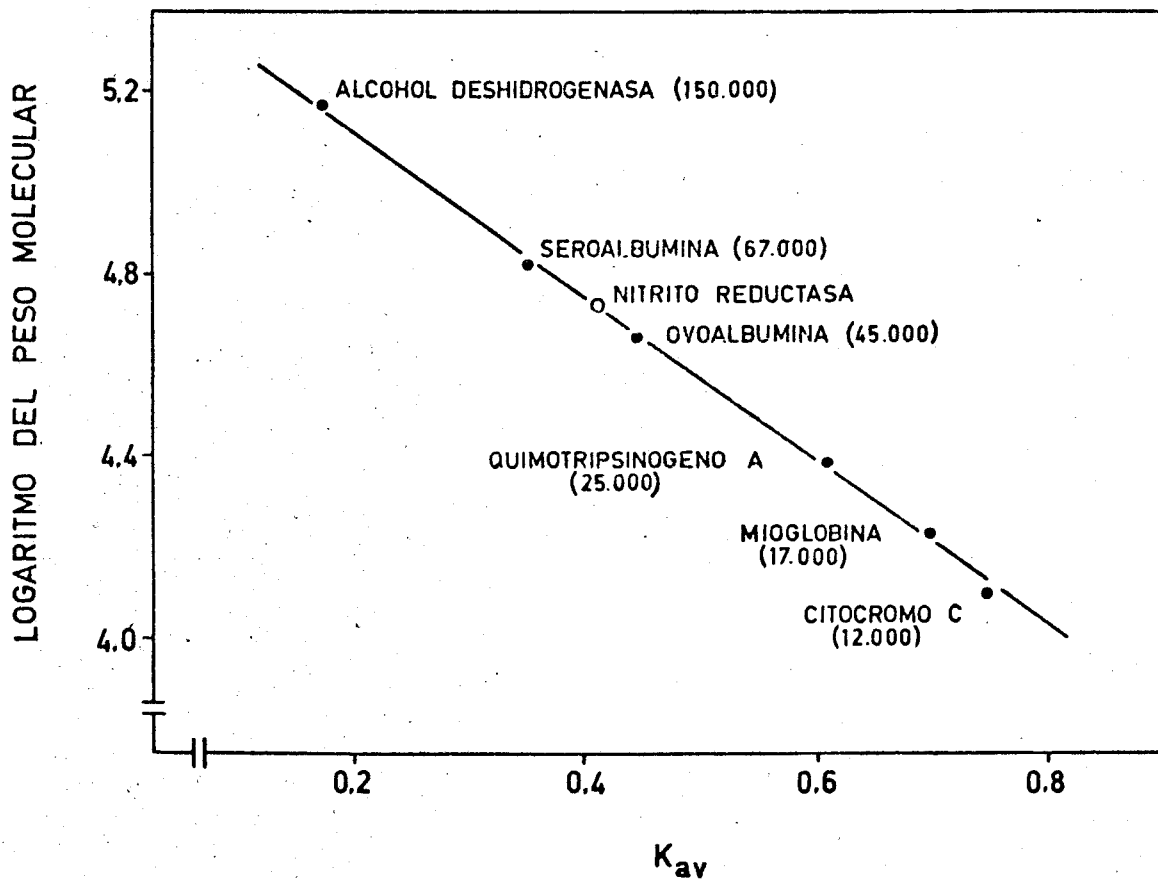


Figura 17: Determinación del peso molecular de la nitrato reductasa de *Nostoc muscorum* por filtración en Sephadex G-150. Las condiciones experimentales se detallan en el texto.

la nitrito reductasa de *N. muscorum*. Además, a partir de estos datos se obtiene un radio de Stokes, α , de 30,9 Å para la nitrito reductasa utilizando la correlación de Laurent y Killander 1964 (Fig. 18).

En el método B el peso molecular se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$M = \frac{\alpha^3 \pi \eta N S_{20,w}^{\circ}}{1 - \bar{v} \rho}$$

donde \bar{v} es el volumen parcial específico del enzima, igual a 0,725 cm³ . g⁻¹, valor seleccionado por Martin y Ames (1961) como representativo para la mayor parte de las proteínas globulares; α , el radio de Stokes; η , la viscosidad del medio, asumida igual a 0,01002 g.s⁻¹.cm⁻¹; N, el número de Avogadro; $S_{20,w}^{\circ}$, el coeficiente de sedimentación, y ρ , la densidad del medio (0,99823 g.cm⁻¹).

El coeficiente de sedimentación de la nitrito reductasa de *N. muscorum* se calculó por centrifugación a alta velocidad en un gradiente continuo de sacarosa (5 al 20%, p/v), utilizando como patrones alcohol deshidrogenasa, seroalbúmina, ovoalbúmina y mioglobina. Según se indica en la Figura 19, se obtuvo un coeficiente de sedimentación de

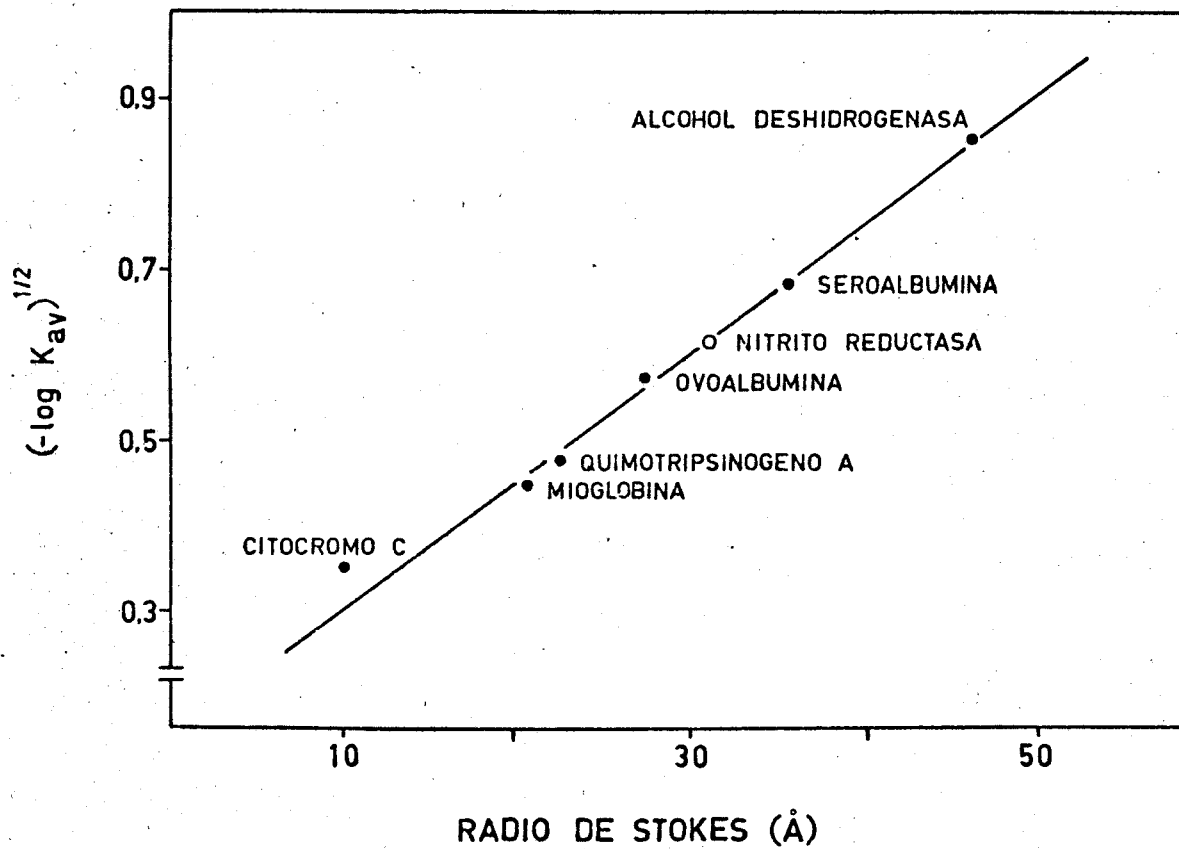


Figura 18: Determinación del radio de Stokes de la nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* por filtración en Sephadex G-150. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

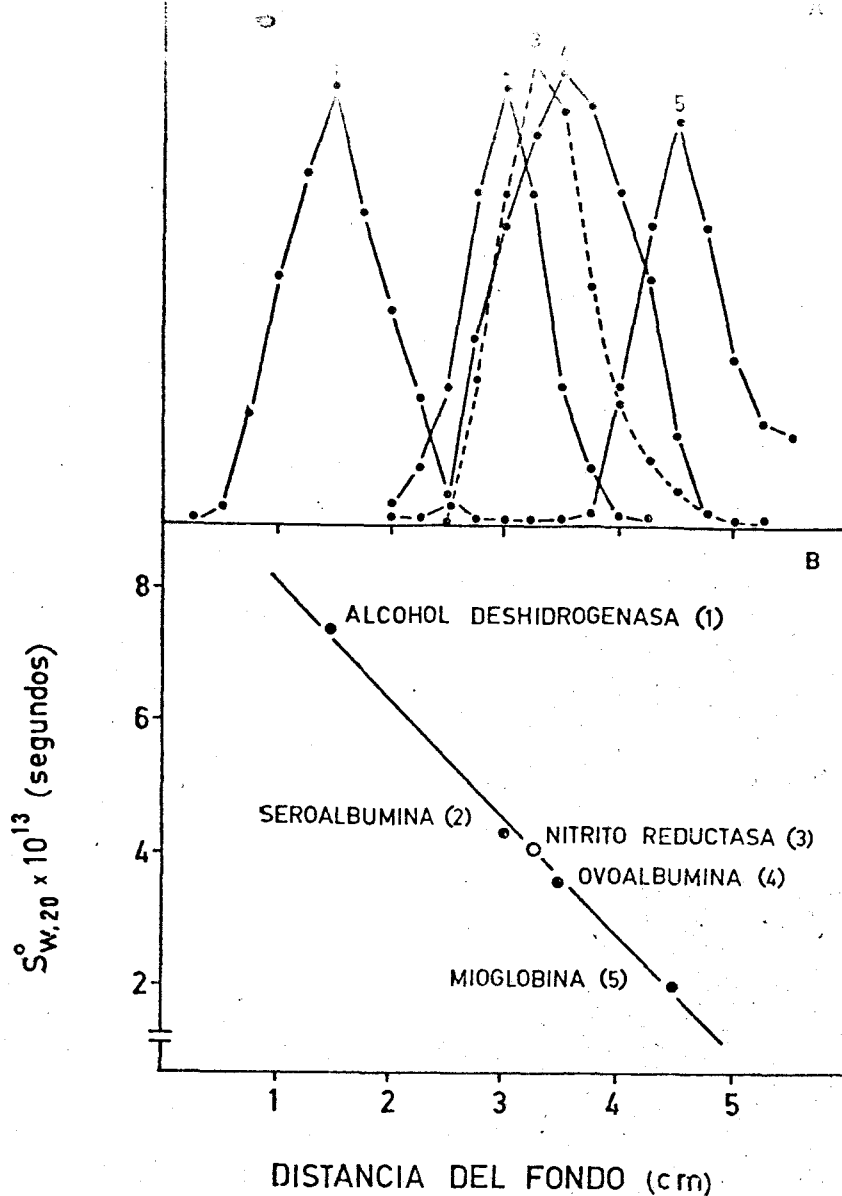


Figura 19: Determinación del coeficiente de sedimentación de la nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* por centrifugación en gradiente de sacarosa. A) Perfiles de sedimentación de la nitrito reductasa y de las proteínas marcadoras. 1: actividad alcohol deshidrogenasa (pico: 291 mU/fracción). 2: absorbancia a 230 nm (pico: 0,76). 3: actividad MVH-nitrito reductasa (pico 0,36 U/fracción). 4: absorbancia a 230 nm (pico: 0,81). 5: absorbancia a 410 nm (pico: 1,35).

B) Coeficiente de sedimentación de las proteínas en función de su distancia del fondo del tubo al terminar la centrifugación.

Otros detalles se describen en el apartado Materiales y Métodos.

$4,07 \times 10^{-13}$ seg para el enzima. Utilizando la fórmula y los valores del radio de Stokes y del coeficiente de sedimentación antes mencionados se calculó para la nitrito reductasa un peso molecular de 51.845.

Según estos datos se ha calculado un coeficiente de fricción relativo:

$$f/f_0 = \alpha \left(\frac{3 \bar{v} M}{4 \pi N} \right)^{-1/3}$$

para la nitrito reductasa de 1,255, valor relativamente bajo, que indica que la molécula de nitrito reductasa no es muy asimétrica.

III.D.9. *Grupos prostéticos*

Requerimiento de hierro para la formación de la actividad nitrito reductasa

Los resultados presentados en la Fig. 20 indican que la presencia de hierro en el medio de cultivo es necesaria para la formación *in vivo* de la actividad nitrito reductasa en *N. muscorum*. En este experimento las células se cultivaron en un medio deficiente en hierro y en presencia de ClNH_4 , una fuente de nitrógeno que reprime la síntesis de

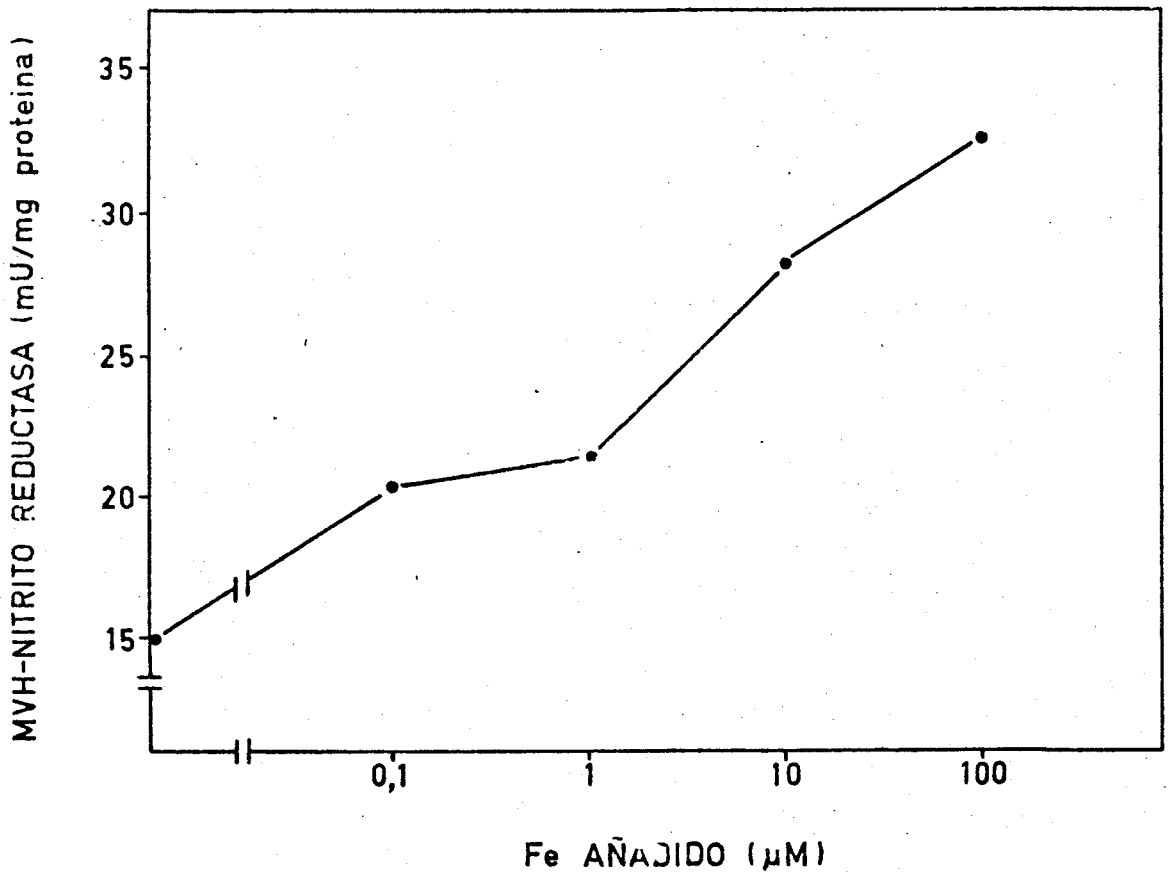


Figura 20: Efecto de la concentración de hierro añadido al medio de cultivo en los niveles intracelulares de nitrato reductasa de *Nostoc muscorum*. Las células se cultivaron (tres cultivos sucesivos) en medios sin hierro añadido y con ClNH_4 como fuente de nitrógeno. Se recogieron en fase exponencial de crecimiento, se lavaron dos veces con medio de cultivo fresco sin hierro añadido y con nitrato como fuente de nitrógeno y finalmente se resuspendieron en este mismo medio y se repartieron en distintos tubos de cultivo de 300 ml de capacidad a los que se añadió Fe-EDTA hasta la concentración final de hierro que se indica en la Figura. A las 12 horas de tratamiento, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron y se prepararon los correspondientes extractos crudos donde se midió la actividad MVH-nitrato reductasa. Otras condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos.

la nitrito reductasa. Estas células se transfirieron a nuevos medios de cultivo que contenían NO_3K como única fuente de nitrógeno y a los que se añadieron las cantidades de hierro que se indican en la Fig. 20. La sustitución de amonio por nitrato induce la síntesis de la actividad nitrito reductasa en *N. muscorum*. Después de 6 h de incubación en el nuevo medio de cultivo, las células se recogieron y la actividad nitrito reductasa se midió en los correspondientes extractos crudos. La Fig. 20 muestra que la síntesis de la actividad nitrito reductasa es dependiente de la presencia de hierro en el medio de cultivo.

Se hizo un experimento similar pero con distintas concentraciones de Cu en vez de hierro en el medio de cultivo, no observándose correlación alguna entre la actividad nitrito reductasa y la concentración de cobre en el medio de cultivo. Concentraciones de Cu superiores a $1 \mu\text{M}$ se revelaron como tóxicas para el crecimiento celular.

Asociación de un cromóforo hemínico con la nitrito reductasa

La preparación más purificada de nitrito reductasa de *N. muscorum* presenta un espectro de absorción (Fig. 21) que sugiere la presencia de un componente hemínico. El enzima muestra máximos de absorción a 280, 340-365 y 615 nm, con

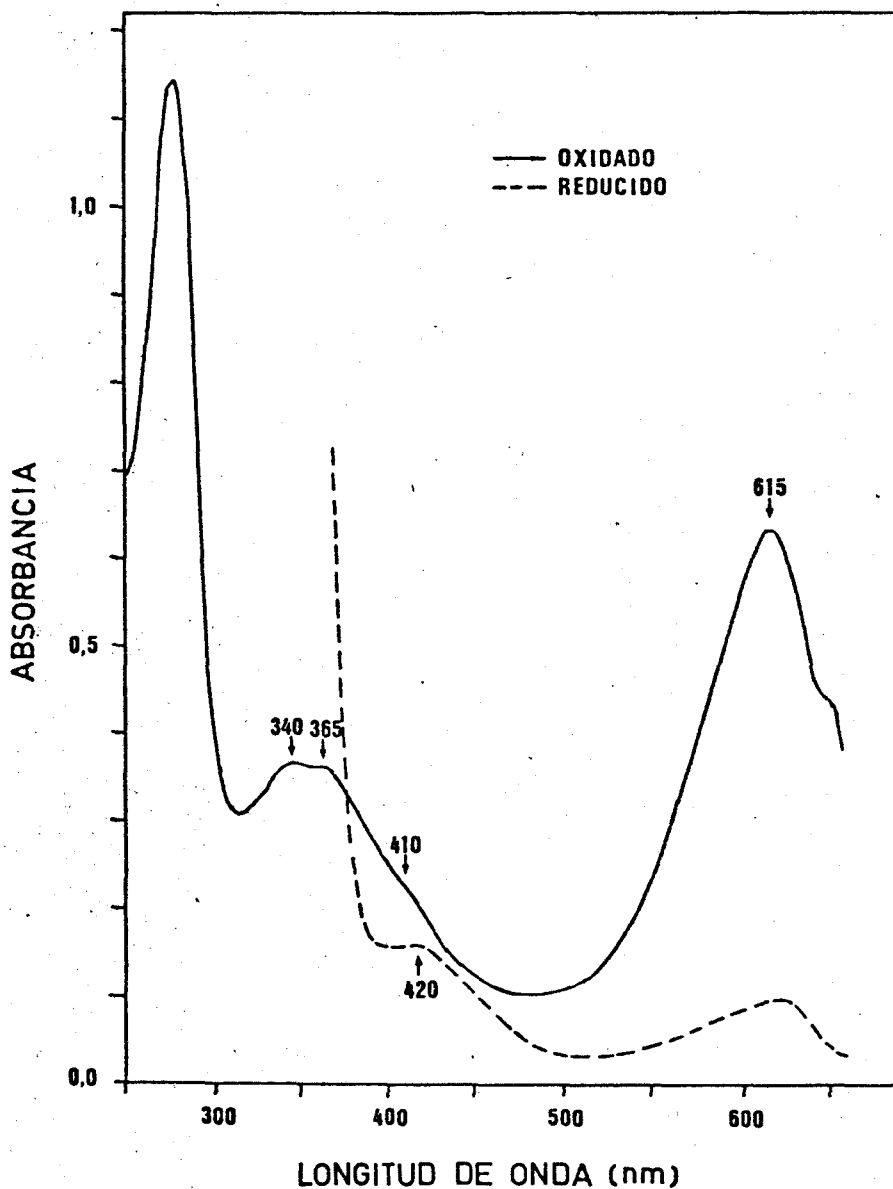


Figura 21: Espectro de absorción de la nitrito reductasa purificada de *Nostoc muscorum*. El espectro del enzima (1,17 mg/ml) en tampón Tris-ClH 0,1 M, pH 7,5 se registró contra un blanco del mismo tampón. El espectro del enzima reducido se registró inmediatamente después de la adición a la muestra de unos cristales de ditionito sódico.

un hombro a 410 nm. La preparación enzimática reducida por la adición de unos cristales de ditionito sódico, muestra un pico de absorción a 420 nm, que es indicativo de la presencia de un grupo cromóforo hemínico con una banda Soret de absorción a 410 nm (oxidado) que cambia a 420 nm (en estado reducido). La fuerte absorción que tiene esta preparación enzimática a 340-365 nm y 615 nm se debe probablemente a impurezas de ficocianina (C-ficocianina y aloficocianina), pigmentos característicos de estas cianobacterias.

La dificultad de separar de la nitrito reductasa estos pigmentos azulados nos ha impedido, de momento, la purificación hasta homogeneidad del enzima, requisito imprescindible para asegurar que el hemo que observamos en la preparación corresponde a la nitrito reductasa. Sin embargo, un análisis de la preparación parcialmente purificada de la nitrito reductasa de *N. muscorum* por centrifugación a alta velocidad en gradiente de sacarosa (Fig. 22) muestra una exacta correspondencia entre la actividad nitrito reductasa de la preparación y la absorbancia en la región Soret del hemo (420 nm) en las fracciones del gradiente.

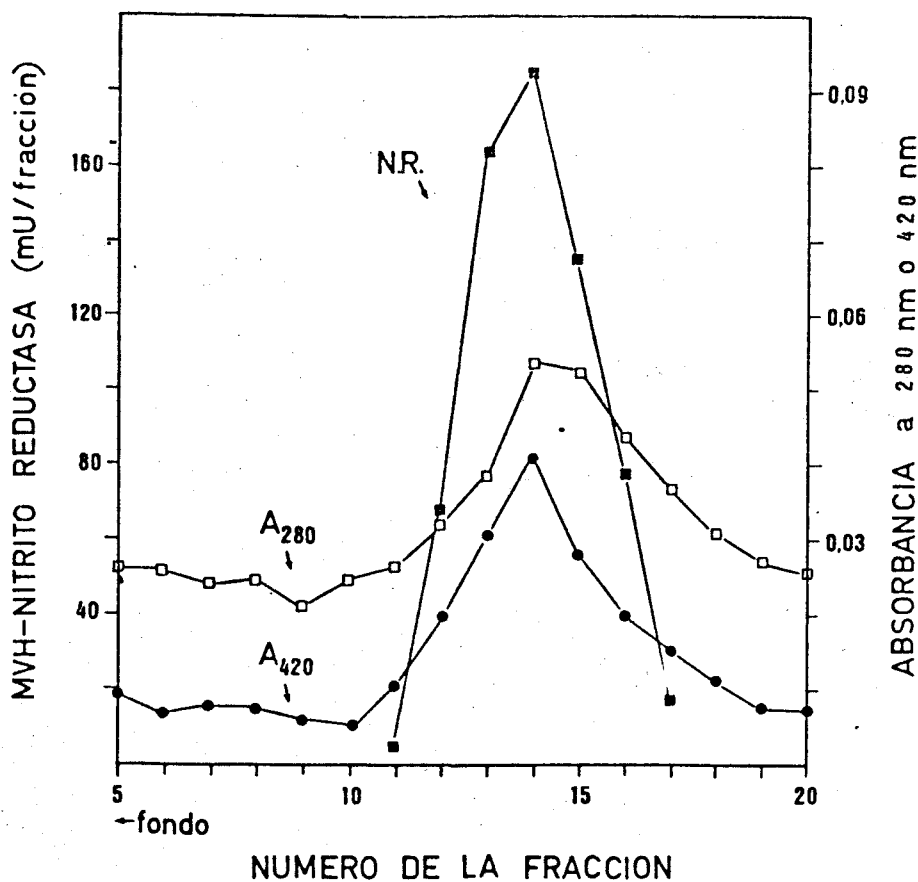


Fig. 22. Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de la nitrito reductasa purificada de *Nostoc muscorum*. El enzima purificado (42 μ g de proteína) se sometió a centrifugación a alta velocidad en un gradiente de sacarosa según se indica en Materiales y Métodos. En las fracciones obtenidas (0,19 ml) se determinó la absorción a 280 nm y, previa adición de unos cristales de ditionito sódico, la absorción a 420 nm. La actividad MVH-nitrito reductasa se midió utilizando alícuotas de las correspondientes fracciones. La fracción 1 corresponde al fondo del gradiente. Otras condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

¿Es la nitrito reductasa de *N. muscorum* una sulfoferroproteína?

Después del último paso de purificación (cromatografía en Sephadex A-50) de la nitrito reductasa de *N. muscorum* se mezclaron las fracciones próximas entre sí en el perfil de elución y se redujo el estudio del contenido en sulfuro lábil a tan sólo 4 preparaciones. Los resultados recogidos en la Fig. 23 muestran una exacta correspondencia entre la actividad nitrito reductasa y el contenido en sulfuro lábil de estas preparaciones.

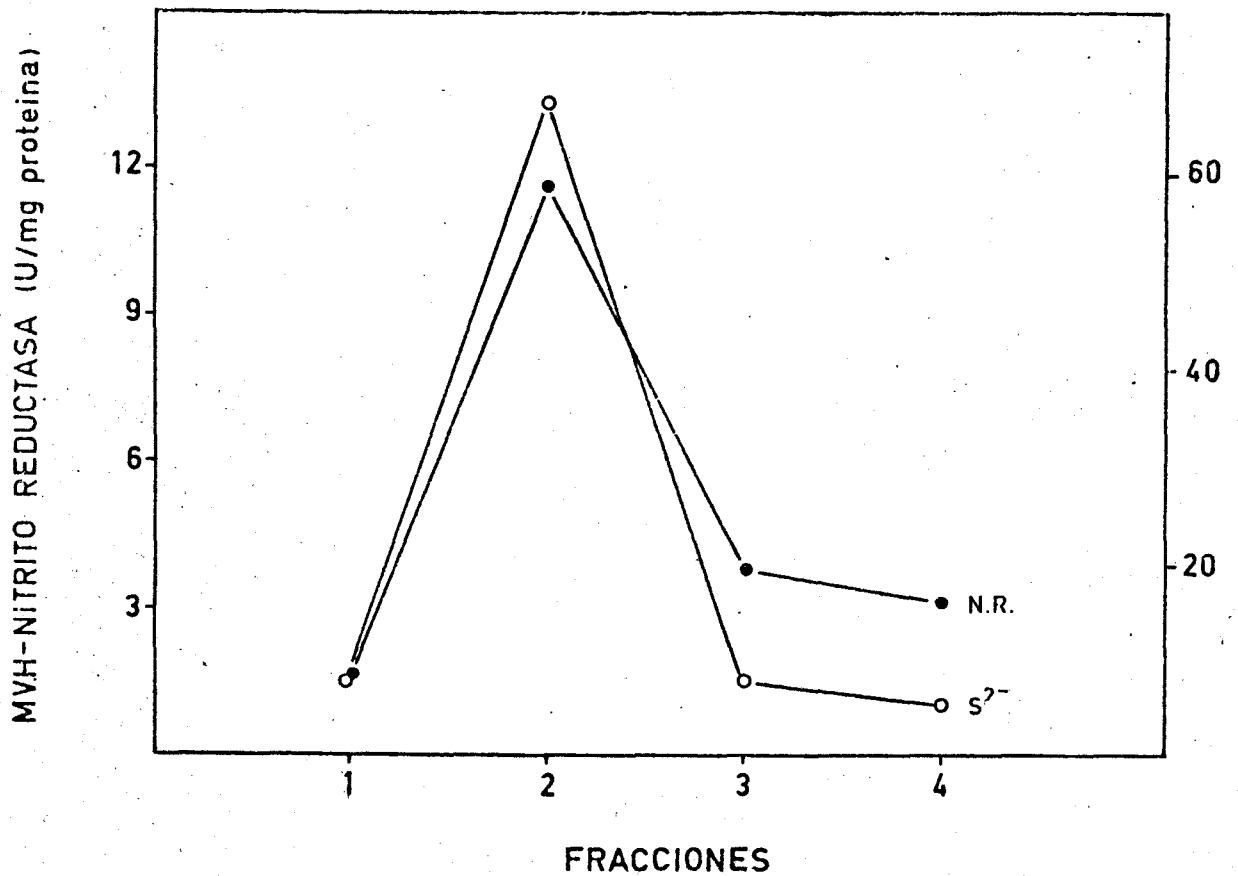


Figura 23: Correspondencia entre actividad MVH-nitrito reductasa contenido en sulfuro lábil en las fracciones de la cromatografía en Sephadex A-50. Después de la última filtración en Sephadex A-50 de la preparación de nitrito reductasa de *Nostoc muscorum*, las fracciones próximas al pico de actividad MVH-nitrito reductasa se agruparon en cuatro, se concentraron por ultrafiltración y se determinó en ella la actividad específica MVH-nitrito reductasa y su contenido en sulfuro lábil, según se indica en Materiales y Métodos.

IV. DISCUSSION

Los resultados anteriormente descritos han aportado nuevos conocimientos sobre el mecanismo de la reducción asimilatoria del nitrito a amoniaco en organismos procarióticos fotosintéticos, habiéndose purificado y caracterizado parcialmente la nitrito reductasa de la cianobacteria *Nostoc muscorum*.

El organismo utilizado en este trabajo, *N. muscorum*, se puede cultivar en condiciones autótrofas en distintas fuentes de nitrógeno como nitrato, nitrito, amoniaco ó nitrógeno molecular. En condiciones óptimas de crecimiento, con nitrato como fuente de nitrógeno, este organismo presenta un tiempo de generación de 14 h y 20 min. Está descrito que el crecimiento (25°C, iluminación saturante y aireación de CO₂ al 5% en aire) de *N. muscorum* ($t_g = 14$ h, 50 min) es más lento que el de otras cianobacterias como *Anabaena variabilis* ($t_g = 10$ h, 30 min) ó *Anacystis nidulans* ($t_g = 8$ h, 30 min) (Kratz y Myers, 1955).

La nitrito reductasa de *N. muscorum* es un enzima adaptativo, que se reprime nutricionalmente por amonio, producto final del sistema asimilatorio reductor de nitrato, al igual que ocurre con la nitrato reductasa de la misma ciano-

bacteria (Ortega, 1977). Este comportamiento es similar al observado en otra cianobacteria, *Anacystis nidulans* (Guerreiro et al., 1974). Sin embargo, en *Anabaena cylindrica* (Ohmori y Hattori, 1970), se ha visto que el nitrato, inductor de la nitrato reductasa, no es efectivo para la inducción de la nitrito reductasa, que depende de la concentración de nitrito en el medio de cultivo. En *N.muscorum*, el nivel de actividad nitrito reductasa es mayor cuando las células están cultivadas en presencia de nitrato que de nitrito, ó nitrógeno molecular, indicando que el nitrato, aunque no es un inductor específico de la síntesis del enzima, es la fuente de nitrógeno más adecuada para que ésta se produzca. Esto es similar a lo que ocurre con la nitrato reductasa del mismo organismo (Ortega, 1977), así como de otras cianobacterias (Stevens y Van Baalen, 1974; Manzano et al., 1976).

Cuando se elimina el represor del medio de cultivo tiene lugar la síntesis *de novo* del enzima, que alcanza un máximo de actividad a las 5-6 h aproximadamente (Fig. 2) que es estable durante varios días. En ausencia de fuente de nitrógeno combinado en el medio de cultivo, tiene lugar la síntesis del enzima, al contrario de lo que ocurre en *Anabaena cylindrica* (Ohmori y Hattori, 1970), organismo en que la acti

vidad de los enzimas del sistema reductor de nitrato se encuentra a niveles muy bajos cuando las células están cultivadas en nitrógeno molecular.

Mientras que la nitrato reductasa de *N. muscorum* se ha encontrado asociada a partículas (Ortega et al., 1976), al igual que ocurre en otras cianobacterias como *A. cylindrica* y *A. nidulans* (Hattori y Myers, 1965, 1966, 1967; Hattori y Uesugi, 1968a,b; Guerrero et al., 1974; Manzano et al., 1976), la nitrito reductasa de *N. muscorum* se encuentra en forma soluble, sin unir a partículas subcelulares, cualquiera que sea el método de rotura de las células empleado (Tablas II y III). En *A. cylindrica* (Hattori y Myers, 1965, 1966, 1967; Hattori y Uesugi, 1968a,b) se han obtenido resultados similares, mientras que en *A. nidulans* la nitrato reductasa se encuentra asociada a partículas subcelulares y es necesario un prolongado tratamiento de disrupción para obtenerla en forma soluble (Guerrero et al., 1974; Manzano et al., 1976).

Se ha puesto a punto un método de purificación para la nitrito reductasa de *N. muscorum*, que ha permitido conseguir preparaciones con una actividad específica de 21,45 uni

dades por miligramo de proteína con una recuperación del 15%, lo que supone una purificación de 763 veces con respecto al extracto crudo (Tabla IV), estimándose que la pureza de la preparación es del 50% aproximadamente. Esto supone un considerable avance en cuanto a purificación de nitrato reductasas de cianobacterias se refiere, ya que las descritas hasta ahora son muy preliminares, habiéndose reseñado sólo una purificación de 40 veces en *A. cylindrica* con un rendimiento del 20% (Hattori y Uesugi, 1968a), y una purificación de 30 veces en *A. nidulans* (Manzano, 1977). El método de purificación para la nitrato reductasa de *N. muscorum* descrito en el presente trabajo incluye como pasos fundamentales la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de exclusión molecular, técnicas de probada eficacia en la purificación de la nitrato reductasa de otros organismos fotosintéticos (Vega y Kamín, 1977).

Hasta ahora, se ha logrado purificar hasta homogeneidad de la ferredoxina-nitrato reductasa de algas como *Chlorella fusca* (Zumft, 1972) y *Porphyra yezoensis* (Ho et al., 1976) y de plantas superiores como espinaca (Cárdenas et al., 1972a; Shimizu y Tamura, 1974) y calabazas (Cárdenas et al., 1972b; Hucklesby et al., 1976). En cuanto a la nitrato

to reductasa asimilatoria de organismos no fotosintéticos, se ha purificado hasta homogeneidad el enzima de hongos como *Neurospora crassa* (Greenbaum et al., 1978) y de bacterias como *Achromobacter fischeri* (Husain y Sadana, 1972; Prakash y Sadana, 1972, 1973) y *Escherichia coli* (Coleman et al., 1978).

La purificación de la nitrito reductasa de *N. muscorum* presenta serias dificultades, que se pueden resumir así:

1) El protoplasma de las cianobacterias contiene por término medio 50% de proteínas, 30% de carbohidratos, 5% de lípidos y 15% de cenizas del peso seco (Fogg et al., 1973), siendo este contenido en proteínas mucho mayor que el que se encuentra en algas, plantas superiores, hongos y bacterias. Por otra parte, las ficobiliproteínas pueden llegar a suponer más del 60% de la proteína soluble total (Bogard, 1975), representando la nitrito reductasa sólo un porcentaje mínimo de las proteínas solubles. Dentro de las ficobiliproteínas que se dan en cianobacterias (c-ficocianina, c-ficoeritrina y aloficocianina), la c-ficocianina es la más abundante, llegando a representar usualmente al menos el 90% en peso de las ficobiliproteínas (Lemasson et al., 1973).

2) Todas las ficocianinas (excepto algunas aloficocianinas) y ficoeritrinas examinadas hasta el momento, se han encontrado que están compuestas de dos diferentes subunidades polipéptidicas, α y β , de distinto peso molecular. Estas subunidades α (ligera: $10 - 19,7 \cdot 10^3$ D) y β (pesada: $14 - 22,2 \cdot 10^3$ D) se asocian entre sí y forman agregados moleculares de distinto número de elementos y de distinto tamaño (Bogorad, 1975; Rudiger, 1975). Para la c-ficocianina, se ha mostrado en *Plectonema calothricoides* (Berns y Edwards, 1965) que existe en cuatro formas estructurales diferentes: monómero (α, β), trímero (α_3, β_3), hexámero ($\alpha_3\beta_3$) y dodecámero ($\alpha_6\beta_6$) que están generalmente en equilibrio. El hexámero tiene un peso molecular de 200.000 D y es probablemente la especie predominante *in vivo*. En general, el valor de pH del medio, la fuerza iónica y la concentración de proteína en el medio afectan al estado de agregación de las ficobiliproteínas (ó hHocha, 1965; Bogorad, 1975). Esto se traduce en que las ficobiliproteínas pueden presentar formas de distinto peso molecular y de distinta carga neta que se disocian fácilmente según las condiciones variables de fuerza iónica y concentración de proteínas.

Finalmente, es interesante destacar que se ha intentado en este trabajo la utilización de la cromatografía

de afinidad con ferredoxina-BrCN-Sefarosa como etapa básica para la purificación de la nitrito reductasa de *N. muscorum*. El enzima parcialmente purificado (Fracción 3) no se adsorbe a la ferredoxina-BrCN-Sefarosa empaquetada en una columna de 2x9 cm, equilibrada con tampón de Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 (\pm $S_2O_4Na_2$ 30 mM). Es posible que la elevada concentración de proteína en la preparación enzimática pueda transferir con la adsorción a la matriz del gel de la nitrito reductasa. También es posible que las condiciones de pH y fuerza iónica en que se ha realizado la filtración ó las características del gel mepleado no sean las adecuadas, pudiendo ser necesario el empleo de espaciadores o bien el uso de un gel en el que la ferredoxina esté unida a la matriz de Sefarosa por el grupo carboxilo por ejemplo, en vez de por el grupo amino. Por todo lo dicho anteriormente, no se descartan las posibilidades de este método para la purificación de la nitrito reductasa de *N. muscorum*, método que ha sido utilizado con éxito para la purificación hasta homogeneidad de la nitrito reductasa de espinaca (Ida et al., 1976) y de otros enzimas dependientes de ferredoxina en la cianobacteria *A. nidulans*, como son la nitrato reductasa y la NADP-reductasa (Manzano et al., 1978).

Existen profundas diferencias entre la nitrito reductasa de organismos fotosintéticos y no fotosintéticos (ver Tabla XIII, página siguiente), por ello presenta mucho interés el estudio de la nitrito reductasa de cianobacterias, que por una parte son organismos procarióticos y por otra organismos fotosintéticos, ocupando un estudio intermedio en la escala evolutiva, entre bacterias y algas fotosintéticas.

La nitrito reductasa de *N. muscorum* se diferencia notablemente del enzima presente en organismos no fotosintéticos, porque es incapaz de utilizar los piridín nucleótidos reducidos como donadores inmediatos de electrones y en cambio se asemeja a las nitrito reductasas de organismos verdes en que utiliza como donador de electrones la ferredoxina reducida, bien químicamente con ditionito, o bien por procedimientos más fisiológicos como la reducción enzimática por el sistema NADPH-NADP reductasa o la reducción fotosintética por medio de partículas de esta cianobacteria. El enzima de *N. muscorum* puede utilizar como transportador de electrones tanto la ferredoxina del propio organismo como la ferredoxina de espinaca aunque la primera se muestra más eficaz. Esto está de acuerdo con lo

Tabla XIII

COMPARACION DE LA NITRITO REDUCTASA DE *Nostoc muscorum* CON OTRAS NITRITO REDUCTASAS PURIFICADAS HASTA HOMOGENEIDAD

	Organismos Eucarióticos				Organismos procarióticos		
	Espinaca ^a	Calabaza ^b	<i>Chlorella fusca</i> ^a	<i>Neurospora crassa</i> ^d	<i>Nostoc muscorum</i> ^e	<i>Escherichia coli</i> ^f	<i>Achromobacter Fischeri</i> ^g
Peso molecular	61.000	63.000	63.000	290.000	52.000	190.000	95.000
coef. de sed. (S)	4,26	4,90	N.D.	9,40	4,07	8,5-9,5	5,25
radio de Stokes (A)	33,5	N.D.	N.D.	76,0	30,9	N.D.	34,9
Donador fisiológico de electrones	Fd	Fd	Fd	NAD(P)H	Fd	NADH	NAD(P)H
Actividad específica (U/mg)	108	84	52	27	21	1,7	150
Banda Soret de absorción (nm)	386	384	384	390	410?	-	409
Grupos prostéticos							
Flavina	-	-	-	+	-	+	+
(Fe-S)	+	+	?	+	+	-	-
Hemo	Sirohemo	Sirohemo	+	Sirohemo	+	-	Citocromo <i>c</i>

N.D. No determinado; ^aVega y Kamin, 1977; ^bCárdenas et al., 1972; Hucklesby et al., 1976; ^cZumft, 1972; ^dLafferty y Garrett, 1974; Vega et al., 1975; Greenbaum et al., 1978; ^eEste trabajo; ^fColeman et al., 1978; ^gPrakash y Sadana, 1972

mostrado por Mitsui y Arnon (1971), que señalaron que las características de la ferredoxina de *Nostoc sp.* eran similares a las de la ferredoxina de cloroplastos.

El ditionito no funciona como donador directo de electrones para la nitrito reductasa de *N. muscorum*, al contrario de lo que ocurre en el enzima de *Azotobacter chroococcum* (Vega et al., 1973). El enzima de *N. muscorum* no puede utilizar flavín-nucleótidos reducidos como donadores de electrones, al igual que ocurre con otras nitrito reductasas de organismos fotosintéticos. En cambio, los viológenos reducidos con ditionito, y particularmente el metil viológeno, son donadores muy eficaces de electrones para el enzima, como también ocurre en otros organismos fotosintéticos, y son los que se emplean normalmente en el ensayo de rutina de esta actividad enzimática. En *A. cylindrica*, los resultados obtenidos son similares, habiéndose comprobado que la ferredoxina, el metil (ó bencil) vilógeno y el diquat pueden servir de mediadores entre el NADPH o el ditionito y el enzima (Hattori y Myers, 1966; Hattori y Uesugi, 1968a). La nitrito reductasa de *A. nidulans* también se comporta de forma similar a este respecto (Manzano, 1977).

En *N. muscorum* no ha sido posible aislar a partir de células cultivadas en condiciones deficientes de hierro una proteína de características similares a la fitoflavina, observándose únicamente que el efecto de estas condiciones se traducía en la extracción de las células de niveles muy bajos de ferredoxina, pero sin que apareciera ninguna flavoproteína de las características de la fitoflavina, que como se ha dicho anteriormente sustituye eficazmente a la ferredoxina como donador de electrones de la nitrito reductasa de *A. nidulans* (cfr. Introducción).

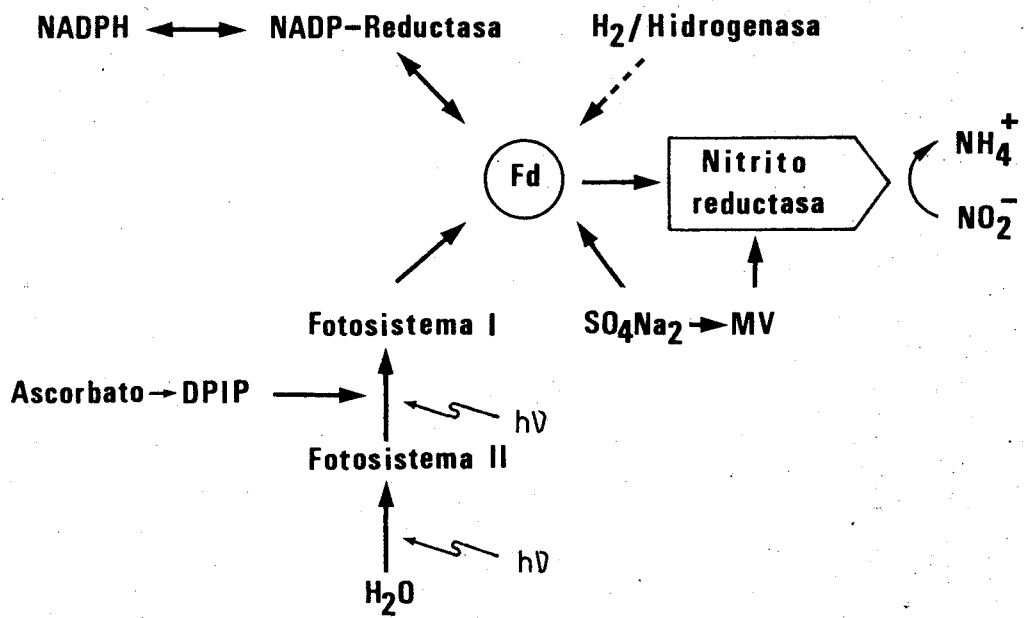
En la cianobacteria *A. cylindrica* se ha demostrado la fotorreducción de nitrito dependiente de ferredoxina con ascorbato y DPIP (Hattori y Uesugi, 1968b) utilizando una preparación de nitrito reductasa purificada 40 veces (Hattori y Uesugi, 1968a) y partículas de la cianobacteria. En el presente trabajo se ha demostrado que en *N. muscorum* se fotorreduce el nitrito en presencia de ferredoxina, utilizando partículas fotosintéticas que llevan asociadas actividad de fotosistemas I y II y una preparación cruda de nitrito reductasa, que en esta cianobacteria se encuentra en forma soluble. Por otra parte, la ferredoxina reducida enzimáticamente con el sistema NADPH-NADP reductasa de *N. muscorum* también sirve como donador de electrones para la nitri-

to reductasa de este organismo, siendo precisa la adición de un sistema regenerante de NADPH (g6P, G6PDH y NADP^+), manteniéndose la reducción lineal de nitrito como mínimo durante una hora. En *A. cylindrica* (Hattori y Myers, 1966), se mostró que había una especificidad para el NADPH (debido a la piridín nucleótido reductasa) en la reducción de nitrito dependiente de ferredoxina por extractos crudos. Al igual que en el caso de *N. muscorum*, para mantener una reducción lineal de nitrito era preciso la adición de un sistema regenerante de NADPH. Al añadir NADPH sólo, la reacción se paraba pronto, aunque quedara mucho NADPH sin oxidar en la mezcla de reacción. Estos autores concluyeron que este fenómeno se debe a que una vez que se ha gastado parte del NADPH añadido, el potencial del par NADP/NADPH no es lo suficientemente negativo como para reducir la ferredoxina.

Contrariamente a lo observado con preparaciones crudas de enzima, la nitrito reductasa de *N. muscorum* purificada 763 veces, que presenta una alta actividad de reducción de nitrito utilizando ferredoxina reducida con ditionito, no es capaz de mantener esta actividad con ferredoxina reducida fotosintética (Tabla VII) ó enzimáticamente con NADPH y NADP-reductasa (Tabla VIII). Esto puede deberse a

que el enzima haya sufrido alguna modificación durante la purificación que afecte a su capacidad para conectar con la ferredoxina reducida enzimática o fotosintéticamente. La nitrato reductasa de *A. cylindrica* sin purificar acepta electrones del NADPH vía ferredoxina (Hattori y Uesugi, 1968b), sin embargo, el enzima purificado no acepta los electrones desde NADPH en presencia de ferredoxina y NADP-reductasa ni de la ferredoxina reducida con ditionito (Hattori, 1970). Estos autores concluyeron que algún transportador de electrones desconocido que media la transferencia desde la ferredoxina reducida hasta la nitrato reductasa está presente en la preparación sin purificar (particulada) pero se pierde o inactiva durante el proceso desolubilización y/o purificación.

Los distintos sistemas donadores de electrones con posibilidad de conectar con la nitrito reductasa de *N. muscorum* se resumen en el esquema siguiente:



La cinética de la actividad MVH-nitrito reductasa de *N. muscorum* es lineal con respecto al tiempo por lo menos durante 15 min, tanto si se utilizan preparaciones enzimáticas crudas como purificadas. Este comportamiento es similar al de las nitrito reductasas parcialmente purificadas de *A. cylindrica* (Hattori y Uesugi, 1968a) y de *A. nidulans* (Manzano, 1977) y distinto del de la nitrito reductasa particulada de *A. nidulans*, que sólo mantiene una reducción lineal de nitrito durante el primer minuto de la reacción, al cabo del cual ésta se para.

La nitrito reductasa purificada de *N. muscorum* cataliza la reducción completa de nitrito a amoniaco, sin la acumulación de productos nitrogenados de número redox intermedio. La estequiometría de la reacción es de una molécula de amoniaco formado por cada molécula de nitrito desaparecido (Tabla VI), lo que es característico de las nitrito reductasas asimilatorias, donde sóloamente el amoniaco es el producto de la reacción. Se puede desechar por tanto la idea propuesta por Hattori (1962) de que en la reducción asimilatoria de nitrito a amoniaco se formaba hidroxilamina como compuesto intermedio.

La K_M para el nitrito de la nitrito reductasa de *N. muscorum* utilizando ferredoxina o metil viológeno reducido con ditionito como donadores es de 0,113 nM, valor que es similar al encontrado (0,1 - 0,6 mM) para el enzima de espinaca, maiz y *Dulaniella tertiolecta* (Vega et al., 1979), y ligeramente superior a 50 μ M y 73 μ M, valores encontrados para los enzimas de *A. cylindrica* (Hattori y Ue sugi, 1968a) y *A. nidulans* (Manzano, 1977), respectivamente. También se han encontrado valores excepcionalmente altos: 2 mM, para el enzima de raices y hojas de cebada (Bourne y Mifflin, 1973), y 40 mM, para el enzima de hojas

de Citrus (Shaked et al., 1973).

La K_M de la nitrito reductasa de *N. muscorum* para la ferredoxina reducida con ditionito es de 3,4 μM y para el metil viológeno, de 0,14 mM, valores similares a los encontrados por Hattori y Uesugi (1968a) para el enzima de *A. cylindrica*, y por Manzano (1977) para el de *A. nidulans*. La nitrito reductasa de espinaca muestra una K_M para la ferredoxina de 10 a 70 μM (Ramírez et al., 1966; Ho y Tamura, 1973) y para el metil viológeno, de 70 μM (Ramírez et al., 1966; Ida y Morita, 1973).

La interacción del sulfito o la hidroxilamina, ya sea como sustratos o como inhibidores con la molécula de nitrito reductasa parece ser un fenómeno general e independiente del tipo de nitrito reductasa de que se trate, ya sea ferredoxina-nitrito reductasa o NAD(P)H-nitrito reductasa, y parece estar relacionada con la parte del enzima donde se encuentra el hemo, como se demuestra por los cambios en los espectros de absorción o de EPR que tienen lugar al añadir estos compuesto a la preparación enzimática (Hucklesby y Hewitt, 1970; Vega y Kamin, 1977; Vega et al., 1979). La nitrito reductasa purificada de *N. muscorum* no muestra

actividad hidroxilamina reductasa ni sulfito reductasa, al igual que ocurre en *A. cylindrica* (Hattori y Uesugi, 1968a). Sin embargo, la hidroxilamina, y en menor extensión, el sulfito, son efectivos inhibidores de la nitrito reductasa de *N. muscorum*, resultando ser la inhibición por hidroxilamina de tipo competitivo con respecto al nitrito, con una K_i de 0,57 mM.

Los estudios realizados con inhibidores de la actividad nitrito reductasa de *N. muscorum* muestran una marcada sensibilidad del enzima al cianuro, un típico agente quelante de metales, lo que indica la presencia de algún metal en la molécula de la nitrito reductasa. La inhibición observada por la orto-fenantrolina hace pensar que este metal sea el hierro. Otros agentes quelantes de metales como el cianato y la azida no ejercen ningún efecto inhibitor sobre la actividad MVH-nitrito reductasa de *N. muscorum*. Este comportamiento frente a inhibidores es similar al del enzima de otros organismos, tanto del tipo ferredoxina-nitrito reductasa como del tipo NAD(P)H-nitrito reductasa en que el cianuro es un potente inhibidor, mientras que la azida y el cianato no lo son (Cárdenas et al., 1972a; Ho y Tamura, 1973; Rivas et al., 1973; Vega et al., 1975a; Vega y Kamin, 1977; Vega et al., 1979). Las nitrito reductasas de *A. cy-*

lyndrica (Hattori y Myers, 1966) y *A. nidulans* (Manzano, 1977) también se inhiben fuertemente por cianuro. La inhibición por cianuro de la nitrito reductasa de *N. muscorum* es de tipo competitivo con respecto al nitrito, habiéndose encontrado un valor de K_i de $1,4 \mu\text{M}$. El enzima de *Cucurbita pepo* (Cárdenas et al., 1972a) muestra también una inhibición por cianuro competitiva con respecto al nitrito, con un valor de K_i parecido ($0,37 \mu\text{M}$).

De particular interés resulta la inhibición de la nitrito reductasa de *N. muscorum* por CO. En otros organismos, se ha demostrado que el CO inhibe las nitrito y sulfito reductasas formando un complejo con el enzima reducido detectable espectrofotométricamente, y que la formación y disociación del complejo enzima-CO se correlaciona con la inhibición o la reversión de la inhibición de la catálisis de la reducción de nitrito o sulfito (Siegel et al., 1974; Vega et al., 1975a; Vega y Kamin, 1977). La inactivación de la nitrito reductasa de *N. muscorum* con CO requiere la presencia de un reductor, obteniéndose la máxima inactivación cuando el enzima se preincuba con metil viológeno reducido más CO. Si se añade ditionito a la mezcla de preincubación con CO que contiene metil viológeno reducido, el grado de

inactivación de la nitrito reductasa observado es menor que en ausencia de ditionito. Este efecto es similar al encontrado para el enzima de espinaca por Vega y Kamin (1977), y parece deberse a que el ditionito en disolución produce sulfito, que probablemente compite con el CO en su unión al enzima (Vega et al., 1975a), concluyéndose que el enzima podría formar un complejo con inhibidores como el cianuro y el sulfito, ó con el CO, pero no con dos de ellos simultáneamente en la misma molécula. La formación del complejo CO-nitrito reductasa es un proceso reversible (Siegel et al., 1974; Vega et al., 1975a; Vega y Kamin, 1977). Cuando la nitrito reductasa de *N. muscorum* inactivada por CO se expone al aire, la actividad enzimática se recupera gradualmente, recobrándose el 100% de la actividad inicial.

Por otro lado, la reacción de la nitrito reductasa reducida de *N. muscorum* con CO es un proceso relativamente lento en comparación con la velocidad de reacción que tienen otras hemoproteínas (hemo) cuya función normal es interaccionar con el oxígeno, como la citocromo oxidasa, mioglobina y hemoglobina, que reaccionan con el CO aproximadamente 10^4 a 10^5 veces más rápidamente. Esta propiedad la comparte con proteínas que contienen sirohemo como grupo prostético como otras nitrito reductasas (Siegel et al.,

1974; Vega et al., 1975a; Vega y Kamin, 1977) y con sulfito reductasas (Siegel et al., 1973; Murphy et al., 1973, 1974a). Murphy et al. (1974b) han demostrado que la baja velocidad de reacción del CO con el sirohemo unido a la sulfito reductasa de *E. coli* se debe al microambiente que le proporciona la cadena polipeptídica y no a la peculiar estructura química de dicho grupo, ya que el CO reacciona con el sirohemo libre 10^6 veces más rápido que con el sirohemo unido al enzima. Es muy probable, por tanto, que en la nitrito reductasa de *N. muscorum* se presente también esta barrera estérica en torno a su grupo hemínico que hace que la velocidad de reacción del enzima con el CO sea tan baja, ya que se requiere un mínimo de dos horas para que el enzima se inactive en un 50%.

En contraste con lo anterior, el CO inhibe totalmente a la nitrito reductasa de *Achromobacter fischeri* (Prakash y Sadana, 1972) después de cinco minutos de incubación con el enzima, en ausencia de reductores. Es importante resaltar que este enzima contiene hemo *c* como grupo prostético, a diferencia de lo encontrado para las otras nitrito reductasas.

No se ha encontrado en el enzima de *N. muscorum* una inhibición de la actividad por la adición de compuestos reductores como los piridín nucleótidos reducidos, el metil viológeno reducido o la ferredoxina reducida, en contraste con lo descrito para la NAD(P)H-nitrito reductasa de organismos no fotosintéticos como bacterias (Kemp y Atkinson, 1966; Vega et al., 1973) y hongos como *N. crassa* (Lafferty y Garrett, 1974; Vega et al., 1975b), cuya actividad se inhibe por NAD(P)H (\pm FAD).

El pHMB, reactivo típico de grupos sulfhidrilos, se ha reportado como inhibidor de diversas nitrito reductasas de tipo asimilatorio: espinaca (Ho y Tamura, 1973; Vega y Kamin, 1977), *Cucurbita pepo* (Cresswell et al., 1965); *Chlorella* (Zumft, 1972), *Azotobacter chroococcum* (Vega et al., 1973), *N. crassa* (Lafferty y Garrett, 1974), *Skeletonema costatum* (Llama et al., 1979), *E. coli* (Coleman et al., 1978) y *Achromobacter fischeri* (Prakash y Sadana, 1972). Cuando se preincuba durante unas horas la nitrito reductasa de plantas superiores con pHMB, el enzima se inactiva irreversiblemente, debido a serias alteraciones (degradación) en su grupo prostético (sirohemo). El pHMB no tiene efecto inhibidor sobre la nitrito reductasa de *N. muscorum*, ni siquiera después de incubar el enzima durante seis horas con

pHMB a una concentración relativamente alta (1 mM). En *A. nidulans* tampoco se inhibe la nitrito reductasa por pHMB (Manzano, 1977), pudiendo esto indicar que el enzima de cianobacterias presenta la interesante originalidad de no poseer grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad enzimática.

La nitrito reductasa de *N. muscorum* tiene un peso molecular de 52.000 D calculado a partir de los valores de radio de Stokes y coeficiente de sedimentación, y de 53.700 D calculado por filtración en gel de Sephadex G-150. El coeficiente de sedimentación, $S_{20,w}^{\circ}$, es de 4,07 S y el radio de Stokes, a , de 30,9 Å Utilizando los datos anteriores se ha calculado un coeficiente de fricción relativo de 1,255, valor que es relativamente bajo y que indica una forma no muy irregular para la molécula de nitrito reductasa.

Estos datos se aproximan mucho a los de las nitrito reductasas de organismos fotosintéticos. El enzima de *A. nidulans* tiene un peso molecular de 68.000 D, determinado por filtración en Sephadex G-200, y el enzima de *A. nidulans* tiene un peso molecular de 54.000 D, un coeficiente de sedimentación de 4,6 S y un radio de Stokes de 27,5 Å (Hatto_

ri y Uesugi, 1968a; Manzano, 1977). Análogamente, la nitrito reductasa de algas verdes y plantas superiores tiene un peso molecular de 60.000-63.000 D, coeficiente de sedimentación entre 4,26 - 4,90 S y radio de Stokes (espinaca) de 33,5 Å (Vega et al., 1979). Por otra parte estos datos son muy distintos en los encontrados en la nitrito reductasa de organismos no fotosintéticos, 290.000 D, 9,4 S, y 76 Å para el enzima de *N. crassa* (Lafferty y Garrett, 1974), 80.000-95.000 D, 5,25 S y 34,9 Å para el de *A. fischeri* (Husain y Sadana, 1972, 1974) y 190.000 D y 9,0 S para el de *E. coli* (Coleman et al., 1978). El enzima de *A. chroococcum* tiene un peso molecular de 67.000 D (Vega et al., 1973).

En *N. muscorum*, al igual que en otros organismos previamente estudiados (Cárdenas et al., 1972c; Vega et al., 1975a), la formación de la nitrito reductasa requiere la presencia de hierro en el medio de cultivo. En *N. crassa*, se ha puesto de manifiesto (Vega et al., 1975a) que lo que depende de hierro es la porción de enzima que cataliza la reducción de nitrito *per se*, mas que aquella responsable de la transferencia de electrones desde el NADPH hasta el centro reductor de nitrito.

La preparación purificada de nitrito reductasa de *N. muscorum* presentaba un ligero color azulado, debido a impurezas de los pigmentos fotosintéticos característicos de esta cianobacteria. El espectro de absorción de esta preparación mostrado en la Fig. 21, y presenta máximos de absorción a 280, 340-365 y 615 nm. Además se observa un hombro a 410 nm, que se hace más pronunciado -casi un pico a 420 nm- cuando la preparación se reduce con ditionito, que probablemente corresponde a la banda Soret de un grupo cromóforo hemínico presente en la preparación enzimática y que está asociado con la actividad nitrito reductasa, según indica el análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de esta preparación (Fig. 22). No podemos estar seguros de que las longitudes de onda correspondientes a la banda Soret de este hemo sean las observadas, ya que como se puede ver en el espectro la absorción correspondiente al hemo en esta zona está superpuesta con la de los pigmentos contaminantes.

Las nitrito reductasas de algas y plantas superiores presentan espectros de absorción característicos de hemoproteínas (Vega et al., 1979). La longitud de onda correspondiente a la banda Soret es por lo general inferior a

400 nm y está en la zona de 384-390 nm, lo que parece ser una característica común en aquellas nitrito reductasas que tienen sirohemo como grupo prostético. Cuando estas enzimas se reducen con ditionito la banda Soret no se desplaza hacia zonas de mayor longitud de onda (Vega y Kamin, 1977). Por otra parte, la nitrito reductasa de *A. fischeri* (Prakash y Sadana, 1972), que tiene hemo *c* como grupo prostético presenta un máximo a 409 nm que después de reducir el enzima se desplaza a 420 nm.

A partir de nuestros datos se desprende inequívocamente que la nitrito reductasa de *N. muscorum* es una hemoproteína. Para determinar si el grupo cromóforo de este enzima es tipo sirohemo o un típico complejo de hierro con protoporfirina IX, será necesario purificar el enzima hasta homogeneidad, extraer su grupo hemínico y estudiarlo espectrofotométricamente. En cualquier caso, el comportamiento de la nitrito reductasa de *N. muscorum* frente a reactivos típicos del hemo como son el cianuro y el CO (inhibición, tipo de inhibición, cinética de las mismas, etc....) es bastante semejante, según hemos dicho anteriormente, al de aquellas nitrito reductasas que tienen sirohemo como grupo prostético.

Está bien establecido que, además del sirohemo, la nitrito reductasa de plantas superiores contiene un centro sulfoférico por cada grupo sirohemo, como se ha puesto de relieve por estudios de EPR (Aparicio et al., 1975; Stoller et al., 1977; Vega y Kamin, 1977; Cammack et al., 1978). Los resultados de este trabajo apuntan a que la nitrito reductasa de *N. muscorum* puede tener también un centro sulfoférico en su molécula, ya que se ha observado una estrecha correlación entre la actividad específica MVH-nitrito reductasa y el contenido en sulfuro lábil por miligramo de proteína de las fracciones obtenidas a lo largo del último paso de purificación de la nitrito reductasa de este organismo.

Hasta ahora no se ha descrito la posible presencia de agrupaciones sulfoféricas en nitrito reductasas de organismos no fotosintéticos. Los estudios realizados en los enzimas de *A. fischeri* (Prakash y Sadana, 1972) y *E. coli* (Coleman et al., 1978) han indicado que carecen de este tipo de grupo prostético.

Después de este trabajo puede concluirse a modo de resumen que la nitrito reductasa de la cianobacteria *N. muscorum* es una proteína semejante a las nitrito reductasas

de organismos fotosintéticos, y muy diferente del enzima de organismos no fotosintéticos. Las características responsables de esta semejanza se resumen en la Tabla XIII, y pueden enumerarse así:

1. Tamaño molecular y propiedades fisico-químicas.
2. Especificidad por ferredoxina como donador fisiológico de electrones.
3. Grupos prostéticos, ya que contiene hemo y probablemente centro sulfoférico, y carece de flavina.
4. Comportamiento frente a reactivos típicos de hemo, como el cianuro y el CO, en lo referente a tipo, condiciones y cinéticas de inhibición.

Además de estas semejanzas señaladas con los enzimas de organismos fotosintéticos, es importante destacar que en la cianobacteria *N. muscorum*, un organismo que posee organización celular procariótica pero que sin embargo posee un aparato fotosintético de características semejantes a las de las células fotosintéticas eucarióticas (tienen clorofila *a* y realizan fotosíntesis, con desprendimiento de oxígeno), la nitrito reductasa se asemeja a la presente en eucariotas, lo que evidencia el carácter ya bien establecido (Losada, 1976; Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Gue

rrero, 1979) de la íntima relación de la reducción de nitrato con la fotosíntesis, siendo esta relación, como indican algunos autores (Kessler, 1955, 1959; Kessler y Zumft, 1973; Kulandaivelu et al., 1976) más estrecha que la que existe entre la fotosíntesis y la reducción de nitrato, destacando por ejemplo el hecho de que la nitrato reductasa de *N. muscorum* (Ortega, 1977) y otras cianobacterias como *A. nidulans* (Manzano, 1977) se asemeja notablemente a la nitrato reductasa asimilatoria de organismos procarióticos (peso molecular, estabilidad térmica, especificidad por ferredoxina como donador de electrones, carencia de una actividad diaforasa dependiente de piridín nucleótidos reducidos), presentando profundas diferencias con la nitrato reductasa de organismos eucarióticos fotosintéticos, que son complejos enzimáticos de elevado peso molecular, con especificidad por piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones (Losada y Guerrero, 1979).

V. CONCLUSIONES

1. La nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* es un enzima adaptativo, cuya síntesis se reprime nutricionalmente por la presencia de amonio en el medio de cultivo.
2. La nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* se encuentra en el protoplasma en forma soluble, sin unir a partículas subcelulares.
3. Se ha conseguido purificar la nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* 750 veces, con un rendimiento del 15%. La preparación enzimática, de actividad específica 21,45 U/mg de proteína, cataliza la reducción estequiométrica de nitrito a amoniaco, sin acumulación de productos nitrogenados de número redox intermedio.
4. La reducción de nitrito por *Nostoc muscorum* es un proceso ligado a la fotosíntesis, que suministra el poder reductor a la nitrito reductasa vía ferredoxina. En la oscuridad, la ferredoxina puede ser reducida por el sistema NADPH-NADP reductasa.
5. La hidroxilamina y el cianuro inhiben competitivamente con respecto al nitrito a la nitrito reductasa de *Nostoc*

muscorum. El enzima, que también se inhibe por orto-fenol, es insensible al pHMB. Por otra parte, el CO inhibe al enzima pero requiere la presencia simultánea de un reductor. Dicha inhibición se puede revertir por oxigenación del enzima inactivo.

6. La nitrito reductasa de *Nostoc muscorum* es una ferroproteína de 52.000 D de peso molecular que contiene un cromóforo de tipo hemínico, probablemente sirohemo, como grupo prostético. Por otra parte, se ha detectado en la preparación enzimática sulfuro lábil, que es indicativo de la probable presencia de un centro sulfoférico en la molécula del enzima.
7. La nitrito reductasa de la cianobacteria *Nostoc muscorum* es muy semejante al enzima de organismos fotosintéticos eucarióticos, y presenta diferencias esenciales con el enzima de organismos procarióticos y eucarióticos no fotosintéticos.

VI. BIBLIOGRAFIA

ANDREWS, P. (1964)
Biochem. J., 91, 222-233.

APARICIO, P.J., CARDENAS, J., ZUMFT, W.G., VEGA, J.M., HERRE
RA, J., PANEQUE, A. & LOSADA, M. (1971)
Phytochem., 10, 1487-1495.

APARICIO, P.J., KNAFF, D.B. & MALKIN, R. (1975)
Arch. Biochem. Biophys., 169, 102-107.

ARNON, D.I. (1949)
Plant Physiol., 24, 1-15.

ARNON, D.I., McSWAIN, B.D., TSUJIMOTO, H.Y. & WADA, K. (1974)
Biochim. Biophys. Acta, 357, 231-245.

BAILEY, J.L. (1967)
en Techniques in Protein Chemistry, 2nd Ed., p. 340, Elsevier,
Amsterdam.

BERNS, D.S. & EDWARDS, M.R. (1965)
Arch. Biochem. Biophys., 110, 511-516.

BOGORAD, L. (1975)
Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 369-401.

BOTHE, H. (1969)
en Progress in Photosynthesis Research (Metzner, H., ed.),
Vol. 3, pp. 1483-1491, IUBS, Tübingen.

BOURNE, W.F. & MIFLIN, B.J. (1973)
Planta, 111, 47-

BUCHANAN, B.B. & ARNON, D.I. (1971)
en Methods in Enzymol. (San Pietro, A., ed.), Vol. 23 A,
pp. 413-440, Academic Press, New York.

CAMMACK, R., HUCKLESBY, D.P. & HEWITT, E.J. (1978)
Biochem. J., 171, 519-526.

CANDAU, P., MANZANO, C. & LOSADA, M. (1976)
Nature, 262, 715-717.

CARDENAS, J., BAREA, J.L., RIVAS, J. & MORENO, C.G. (1972a)
FEBS Letters, 23, 131-135.

CARDENAS, J., RIVAS, J. & BAREA, J.L. (1972b)
Rev. Acad. Ciencias, 66, 565-577.

CARDENAS, J., RIVAS, J., PANEQUE, A. & LOSADA, M. (1972c)
Arch. Mikrobiol., 81, 260-263.

COLEMAN, K.J., CORNISH-BOWDEN, A. & COLE, J.A. (1978)
Biochem. J., 175, 483-493.

CONWAY, D.J. (1957)
en Microdiffusion analysis and volumetric error, Crosby
Lockwood, London.

CRESSWELL, C.F., HAGEMAN, R.H., HEWITT, F.J. & HUCKLESBY,
D.P. (1965)
Biochem. J., 94, 40-53.

FOGG, G.E., STEWART, W.D.P., FAY, P. & WALSBY, A.E. (1973)
en "The Blue-Green Algae". Academic Press, London y New York.

FUJITA, Y., OHAMA, H. & HATTORI, A. (1964)
Plant Cell Physiol., 5, 305-314.

GRANT, W.M. (1947)
Anal. Chem., 19, 345-346.

GREENBAUM, P., PRODOUZ, K.N. & GARRETT, R.H. (1978)
Biochim. Biophys. Acta, 526, 52-64.

GUERRERO, M.G., MANZANO, C. & LOSADA, M. (1974)
Plant Sci. Letters, 3, 273-278.

HASE, T., WADA, K., OHMIYA, M. & MATSUBARA, H. (1976)
J. Biochem. (Tokyo), 80, 993-999.

HATTORI, A. (1962)
Plant Cell Physiol., 3, 355-369.

HATTORI, A. (1963)
en Microalgae and photosynthetic bacteria, pp. 485-492. The
University of Tokyo Press, Tokyo.

HATTORI, A. & MYERS, J. (1965)
Plant Physiol., 40, iii.

HATTORI, A. & MYERS, J. (1966)
Plant Physiol., 41, 1031-1036.

HATTORI, A. & MYERS, J. (1967)
Plant Cell Physiol., 8, 327-337.

HATTORI, A. & UESUGI, I. (1968a)
Plant Cell Physiol., 9, 689-699.

HATTORI, A. & UESUGI, I. (1968b)
in Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis
(Shibata, K., Takamiya, A., Jagendorf, A.T. & Fuller, R.C.,
eds.), pp. 201-205, University of Tokyo Press, University
Park Press, State College, Pennsylvania.

HATTORI, A. (1970)
Plant Cell Physiol., 11, 975-978.

HEWITT, E.J. & HUCKLESBY, D.P. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 689-693.

HEWITT, E.J. (1975)
Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 73-100.

HEWITT, E.J., HUCKLESBY, D.P. & NOTTON, B.A. (1976)
in Plant Biochemistry (Bonner, J. & Varner, J.E., eds.),
3a edición, pp. 633-681, Academic Press, New York.

HO, C.H. & TAMURA, G. (1973)
Agr. Biol. Chem., 37, 37-44.

HO, C.H., IKAWA, T. & NISIZAWA, K. (1976)
Plant Cell Physiol., 17, 417-430.

HUCKLESBY, D.P. & HEWITT, E.J. (1970)
Biochem. J., 119, 615-627.

HUCKLESBY, D.P., JAMES, D.M., BANWELL, M.J. & HEWITT, E.J.
(1976)
Phytochem., 15, 599-603.

HUSAIN, M. & SADANA, J.C. (1972)
Anal. Biochem., 45, 316-319.

HUSAIN, M. & SADANA, J.C. (1974)
Eur. J. Biochem., 42, 283-289.

IDA, S. & MORITA, Y. (1973)
Plant Cell Physiol., 14, 661-671.

IDA, S., KOBAYAKAWA, K. & MORITA, Y. (1976)
FEBS Letters, 65, 305-308.

JOVIN, T., CHARAMBACK, A. & NAUGHTON, H.A. (1964)
Anal. Biochem., 9, 351-364.

KADLUBAR, F.F., McKEE, E.M. & ZIEGLER, D.M. (1973)
Arch. Biochem. Biophys., 156, 46-57.

KEMP, J.D. & ATKINSON, D.E. (1966)
J. Bacteriol., 92, 628-634.

KESSLER, E. (1955)
Nature, 176, 1069-1070.

KESSLER, E. (1959)
Symp. Soc. Exp. Biol., 13, 87-105.

KESSLER, E. & ZUMFT, W.G. (1973)
Planta, 111, 41-46.

KNUTSEN, G. (1965)
Biochim. Biophys. Acta, 103, 495-502.

KRATZ, W.A. & MYERS, J. (1955)
Am. J. Bot., 42, 282-287.

KULANDAIVELU, G., SPILLER, H. & BÖGER, P. (1976)
Plant Sci. Lett., 7, 225-231.

LAFFERTY, M.A. & GARRETT, R.H. (1974)
J. Biol. Chem., 249, 7555-7567.

LANCASTER, J.C., VEGA, J.M., KAMIN, H., ORME-JOHNSON, N.R.,
ORME-JOHNSON, W.H., KRUEGER, R.J. & SIEGEL, L.M. (1979)
J. Biol. Chem., 254, 1268-1272.

LAURENT, T.C. & KILLANDER, J. (1964)
J. Chromatog., 14, 317.

LEMASSON, C., TANDEAU DE MARSAC, N. & COHEN-BAZIRE, G. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 3130-3133.

LOSADA, M., PANEQUE, A., RAMIREZ, J.M. & DEL CAMPO, F.;F.
(1963)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 298-303.

LOSADA, M. & PANEQUE, A. (1971)
en Methods in Enzymology (San Pietro, A., ed.), vol. 23A,
pp. 487-491, Academic Press, New York.

LOSADA, M. (1974)
en Metabolic Interconversion of Enzymes (Fischer, E.H.,
Krebs, E.G., Neurath, H. & Stadtman, E.R., eds.), pp. 257-
-270, Springer Verlag, Berlin.

LOSADA, M. (1976)
J. Mol. Catal., 1, 245-264.

LOSADA, M. & GUERRERO, M.G. (1979)
en Photosynthesis in relation to model systems (Barber, J.,
ed.), Chapter 12, pp. 365-408, Elsevier /North-Holland Bio-
medical Press.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J.
(1951)
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

LLAMA, M.J., MACARULLA, J.M. & SERRA, J.L. (1979)
Plant Sci. Letters, 14, 169-175.

MANZANO, C., CANDAU, P., GOMEZ-MORENO, C., RELIMPIO, A.M. &
LOSADA, M. (1976)
Mol. Cell Biochem., 10, 161-169.

MANZANO, C. (1977)
Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

MANZANO, C., CANDAU, P. & GUERRERO, M.G. (1978)
Anal. Biochem., 90, 408-412.

MARTIN, R.G. & AMES, B.N. (1961)
J. Biol. Chem., 236, 1372-1379.

McSWAIN, B.D., TSUJIMOTO, H.V. & ARNON, D.I. (1976)
Biochim. Biophys. Acta, 423, 313-322.

- MENDEZ, J.M., HERRERO, A. & VEGA, J.M. (1977)
VII Congreso de la S.E.B., Abstract 5, p. 30, Pamplona.
- MENDEZ, J.M. & VEGA, J.M. (1979)
VIII Congreso de la S.E.B., Murcia.
- MITSUI, A. & ARNON, D.I. (1971)
Physiol. Plant., 25, 135-140.
- MURPHY, M.J. & SIEGEL, L.M. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 6911-6919.
- MURPHY, M.J., SIEGEL, L.M., KAMIN, H. & ROSENTHAL, D. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 2801-2814,
- MURPHY, M.J., SIEGEL, L.M., TOVE, S.R. & KAMIN, H. (1974a)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 612-616.
- MURPHY, M.J., SIEGEL, L.M. & KAMIN, H. (1974b)
J. Biol. Chem., 249, 1610-1614.
- Ó HEOCHA, C. (1965)
Ann. Rev. Plant Physiol., 16, 415-434.
- OHMORI, K. & HATTORI, A. (1970)
Plant Cell Physiol., 11, 873-878.
- ORTEGA, T., CASTILLO, F. & CARDENAS, J. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, 885-891.
- ORTEGA, T. (1977)
Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- ORTEGA, T., CASTILLO, F., CARDENAS, J. & LOSADA, M. (1977a)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 75, 823-831.
- ORTEGA, T., CASTILLO, F., CARDENAS, J. & LOSADA, M. (1977b)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 78, 185-193.
- PANEQUE, A., RAMIREZ, J.M., DEL CAMPO, F.F. & LOSADA, M.
(1964)
J. Biol. Chem., 239, 1737-1741.
- PRAKASH, O. & SADANA, J.C. (1972)
Arch. Biochem. Biophys., 148, 614-632.
- PRAKASH, O. & SADANA, J.C. (1973)
Cann. J. Microbiol., 19, 15-25.

RAMIREZ, J.M., DEL CAMPO, F;F., PANEQUE, A. & LOSADA, M.
(1966)

Biochim. Biophys. Acta, 118, 58-71.

RIVAS, J., GUERRERO, M.G., PANEQUE, A. & LOSADA, M. (1973)
Plant Sci. Lett., 1, 105-113.

RÜDIGER, W. (1975)

Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd., 88, 125-139.

SHAKED, A., BAR-AKIVA, A. & MENDEL, K. (1973)

Plant Cell Physiol., 14, 1151-1156.

SHIMIZU, J. & TAMURA, G. (1974)

J. Biochem., 75, 999-1005.

SHIN, M. (1971)

en Methods in Enzymology (San Pietro, A., ed.), Vol. 23A,
pp.440-446, Academic Press, New York.

SIEGEL, L.M. & MONTY, K.J. (1966)

Biochim. Biophys. Acta, 112, 346-362.

SIEGEL, L.M., MURPHY, M.J. & KAMIN, H. (1973)

J. Biol. Chem., 248, 251-264.

SIEGEL, L.M., DAVIS, P.S. & KAMIN, H. (1974)

J. Biol. Chem., 249, 1572-1586.

SIEGEL, L.M. (1978)

en Mechanisms of Oxidizing Enzymes (Singer, T.P. & Ondarza,
R.N., eds.), pp. 201-214, Elsevier-North Holland, New York.

SMILLIE, R.M. & ENTSCH, B. (1971)

en Methods in Enzymology (San Pietro, A., ed.), Vol. 23A,
pp. 504-514, Academic Press, New York.

SNELL, E.D. & SNELL, C.T. (1949)

en Colorimetric Methods of Analysis, p. 804, D. van Nostrand
Company, New York.

STEVENS, S.E. & VAN BAALEN, C. (1974)

Arch. Biochem. Biophys., 161, 146-152.

STOLLER, M.L., MALKIN, R. & KNAFF, D.B. (1977)

FEBS Letters, 81, 271-274.

TREBST, A. & BOTHE, H. (1966)

Ber. Deutsch. Bot. Ges., 79, 44.

VEGA, J.M., GUERRERO, M.G., LEADBETTER, E. & LOSADA, M.
(1973)
Biochem. J., 133, 701-708.

VEGA, J.M., GARRETT, R.H. & SIEGEL, L.M. (1975a)
J. Biol. Chem., 250, 7980-7989.

VEGA, J.M., GREENBAUM, P. & GARRETT, R.H. (1975b)
Biochim. Biophys. Acta, 377, 251-257.

VEGA, J.M. & KAMIN, H. (1977)
J. Biol. Chem., 252, 896-909.

VEGA, J.M., CARDENAS, J. & LOSADA, M. (1979)
in Methods in Enzymology (San Pietro, A, ed.), Vol. 69, Academic Press, New York.

VENNESLAND, B. & GUERRERO, M.G. (1979)
in Encyclopedia of Plant Physiology (New Series) (Gibbs, M. & Latzko, E., eds.), Vol. 6, Elsevier, Berlin.

WESSELS, J.S.C. & VAN DER VEEN, R. (1956)
Biochim. Biophys. Acta, 19, 548-549.

ZUMFT, W.G. & SPILLER, H. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 112.

ZUMFT, W.G. (1972)
Biochim. Biophys. Acta, 276, 363-375.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral

D. José Miguel Méndez Jiménez
titulada "Purificación y caracterización de la
Feredoxina-Nitrito Reductasa de la Cianobacteria
Nostoc Muscorum".

acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente
cum laude

Sevilla, 5 de octubre 1.979

El Vocal,



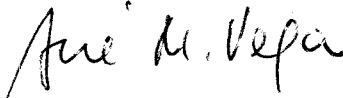
El Vocal,



El Vocal,



El Secretario,



El Doctor,

