

34. Determinación y caracterización de la actividad nitrato reductasa de la bacteria fototrófica *Rhodobacter capsulatus*

Conrado Moreno Vivían

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

RESUMEN

La determinación y la caracterización de actividades enzimáticas son procesos habituales en cualquier laboratorio bioquímico. En esta práctica se explicarán los principales métodos de análisis enzimáticos y se realizarán medidas de la actividad de una nitrato reductasa bacteriana siguiendo la cinética de aparición del producto (nitrito) en función del tiempo, estudiando el efecto de la concentración de enzima en la velocidad de la reacción, determinando la temperatura y el pH óptimos, y calculando la K_M aparente de la enzima para su sustrato, el nitrato.

Palabras clave: Actividad enzimática, cinética, constante de Michaelis-Menten (K_M), nitrato reductasa, pH óptimo, temperatura óptima.

Abreviaturas empleadas: BTP: bis-tris-propano; MV: metil viológeno; N-NEDA: N-naftil-1-etilendiamina.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las **enzimas** son catalizadores biológicos que aceleran las reacciones metabólicas. Generalmente son proteínas de elevada masa molecular, cuya actividad catalítica depende de una estructura tridimensional precisa (conformación nativa), de tal manera que su alteración puede afectar negativa o positivamente a su actividad. Para ser activas, muchas enzimas requieren la unión, ya sea mediante interacciones débiles o por enlaces covalentes, de compuestos adicionales de naturaleza no proteica llamados **cofactores**. Estos cofactores pueden ser inorgánicos (metales como Fe, Cu, Ni o Mo, entre otros) u orgánicos, en cuyo caso se denominan **coenzimas**. La enzima inactiva desprovista del cofactor es la **apoenzima**, mientras que el complejo enzimático activo formado por la apoenzima unida al cofactor se conoce como **holoenzima**.

En general, una reacción enzimática consiste en la transformación de uno o varios sustratos en uno o varios productos en un proceso catalizado por la enzima. Esto se suele esquematizar de la siguiente forma:



donde E es la enzima, S su sustrato, ES el complejo enzima-sustrato y P el producto de la reacción. Precisamente, una de las propiedades de las enzimas es la elevada especificidad que suelen presentar por su(s) sustrato(s).

Existen múltiples técnicas y métodos de determinación de actividades enzimáticas. Estas actividades se pueden medir utilizando directamente células enteras, ya sean intactas o permeabilizadas mediante ciertos tratamientos con detergentes o solventes orgánicos (análisis *in vivo* o *in situ*), o en extractos acelulares obtenidos al romper las células mediante sonicación, choque osmótico, prensa de French u otros métodos (análisis *in vitro*). Para medir el progreso de una reacción enzimática se pueden emplear **métodos cinéticos**, siguiendo de forma continua bien la desaparición del sustrato o bien la aparición del producto a lo largo del tiempo, o **métodos de equilibrio o punto final**, determinado el cambio total en la concentración de un sustrato una vez transcurrida la reacción. A su vez, para la cuantificación de los productos o sustratos de una reacción enzimática se utilizan las técnicas analíticas químicas, físicas o enzimáticas adecuadas. Generalmente se suelen emplear **métodos espectrofotométricos** cuando uno de los sustratos o productos absorbe en el visible o el ultravioleta, aunque en muchos casos se recurre a **métodos fluorimétricos, manométricos, radioquímicos o electroquímicos**. Entre estos últimos destacan las técnicas potenciométricas, los electrodos selectivos de iones, la amperimetría, la polarografía y la coulometría.

En una reacción enzimática influyen muchos factores, entre los que destacan la concentración de los sustratos, la concentración de la enzima, la presencia de sustancias activadoras o inhibidoras, el pH, la temperatura y la fuerza iónica. Para cuantificar la actividad enzimática hay que conocer la cantidad de enzima que cataliza la transformación de una cierta cantidad de sustrato en producto en un tiempo determinado. Cuando se mide una actividad enzimática se puede utilizar como unidad de medida el **katal** (kat), que es la cantidad de enzima necesaria para la conversión de un mol de sustrato en un segundo, o la denominada **unidad** (U) de actividad, que generalmente se define como la cantidad de enzima requerida para la transformación de un micromol (μmol) de sustrato por minuto. Por lo tanto, las equivalencias entre estas unidades son:

$$\begin{aligned}1 \text{ kat} &= 1 \text{ mol s}^{-1} = 6 \times 10^7 \mu\text{mol min}^{-1} = 6 \times 10^7 \text{ U} \\1 \text{ U} &= 1 \mu\text{mol min}^{-1} = 1,667 \times 10^{-8} \text{ kat} = 16,67 \text{ nkat}\end{aligned}$$

La actividad de una preparación enzimática se suele expresar en katalos o unidades por unidad de volumen (kat L^{-1} o U mL^{-1}), o de forma más precisa como **actividad específica**, que corresponde a la actividad enzimática por unidad de peso de proteína (kat kg^{-1} o U mg^{-1}). Otra forma de cuantificar la actividad enzimática es mediante la **actividad molar**, que coincide con el **número de recambio** o la **constante catalítica** de la enzima, y se puede definir como el número de moles (o moléculas) de sustrato que se transforman en producto por mol (o molécula) de enzima en la unidad de tiempo, midiéndose en s^{-1} o en min^{-1} .

El objetivo de la práctica es familiarizar al alumno con las medidas de las actividades enzimáticas, estudiar la cinética de aparición del producto en función del tiempo y el efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad

de la reacción, determinar la temperatura y el pH óptimos de la actividad enzimática, y calcular la K_M aparente de la enzima para su sustrato. Para ello vamos a estudiar la nitrato reductasa de la bacteria fototrófica *Rhodobacter capsulatus*, enzima que posee un centro sulfoférico del tipo [4Fe-4S] y un cofactor de molibdeno en forma de dinucleótido de molibdopterina y guanina. La nitrato reductasa cataliza la reducción de nitrato a nitrito en una reacción que requiere dos electrones que son suministrados *in vivo* por el NADH, pero que *in vitro* pueden ser aportados por un donador artificial de electrones como el metil viológeno (MV) reducido químicamente con ditionito. El análisis de la nitrato reductasa se realizará *in vivo* con una suspensión celular de *R. capsulatus* utilizando un método de punto final basado en la cuantificación del nitrito formado en la reacción tras 10 minutos de ensayo mediante una determinación espectrofotométrica basada en la reacción de diazotación. El nitrito formado en la reacción enzimática reacciona con la sulfanilamida para producir una sal de diazonio que posteriormente reacciona con la *N*-naftil-1-etilendiamina (N-NEDA) para formar una amina aromática de color rosa debido a que absorbe la luz de 540 nm (ver práctica 8, apartado II).

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

Para la realización de esta práctica son necesarios los siguientes materiales y productos:

2.1. Material

- Tubos de ensayo.
- Gradillas.
- Viales Eppendorf.
- Pipetas de 1 y 5 mL.
- Pipetas automáticas de 0,5 a 1000 μL .
- Papel indicador de pH.
- Vasos de precipitado de 100 mL.
- Baños de agua termostatizados.
- Recipiente aislante para hielo.
- Guantes.
- Agitadores Vortex.
- Espectrofotómetros.
- Microcentrífugas.

2.2. Reactivos y productos

- Agua destilada.
- Hielo.
- Nitrato potásico (KNO_3) 100 mM.
- Tampón Bis-Tris-Propano (BTP) 0,5 M a diferentes pH entre 7 y 10.
- Metil viológeno (MV) 2 mM.
- Ditionito sódico (solución con 8 mg mL^{-1} en tampón BTP, recién preparada).
- Ácido clorhídrico.
- Reactivo de sulfanilamida (solución con 5 g de sulfanilamida en 100 mL de HCl y 400 mL de agua destilada, guardada en frasco topacio para protegerla de la luz).

- Reactivo de N-NEDA (solución con 100 mg de N-NEDA en 500 mL de agua destilada, guardada en frasco topacio para protegerla de la luz).
- Suspensión de células de la bacteria *Rhodobacter capsulatus* (preparada previamente por el profesor): se centrifuga 1 L de un cultivo fototrófico de esta bacteria en un medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno y el precipitado celular se resuspende en unos 50 mL de tampón BTP 50 mM, pH 7 que se reparten en viales de 1 mL para guardarlos en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

Cada grupo de prácticas dispondrá de una serie de tubos de ensayo en gradillas y de viales Eppendorf, así como las correspondientes pipetas y soluciones a utilizar. En primer lugar se realizará una cinética de aparición del producto en función del tiempo, en segundo lugar se realizarán ensayos de actividad utilizando diferentes concentraciones de enzima, en tercer lugar se analizará el efecto del pH, en cuarto lugar se estudiará el efecto de la temperatura y finalmente se realizará el cálculo de la K_M aparente de la nitrato reductasa para el nitrato. En todos los casos, la mezcla de reacción para el ensayo de la actividad nitrato reductasa incluirá el sustrato (0,1 mL de KNO_3 100 mM, o concentraciones variables en el caso del cálculo de la K_M), un tampón (0,2 mL de tampón BTP 0,5 M a pH 9, o a diferentes pH para el estudio del efecto del pH), la suspensión celular como fuente de enzima (0,1 mL), el sistema donador de electrones (0,1 mL de metil viológeno 2 mM y 0,1 mL de una solución recién preparada con 8 mg mL^{-1} de ditionito sódico en tampón BTP 0,5 M, pH 9), y agua destilada hasta un volumen final de 1 mL. La reacción se inicia con la adición del ditionito, lo que produce la aparición de un color azul-violeta por reducción del metil viológeno (MV), y los tubos se incuban durante 10 minutos (o distintos tiempos en el caso de la cinética de aparición del producto) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (o a diferentes temperaturas entre 0 y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando se estudia el efecto de la temperatura). La reacción se detiene al agitar en un vortex los diferentes tubos, lo que provoca la oxidación del MV y la pérdida del color azul-violeta. En todos los casos se realizará un blanco en el que no se deja transcurrir la reacción porque se agita a tiempo cero, inmediatamente después de añadir el ditionito, para reoxidar el MV e impedir la transferencia de electrones a la enzima. Tras realizar los ensayos, se procederá a cuantificar el nitrito formado en las diferentes reacciones mediante la adición de 1 mL del reactivo de sulfanilamida y 1 mL del reactivo de N-NEDA. Como la suspensión celular utilizada produce una cierta turbidez en las muestras, antes de medir la absorbancia a 540 nm se transfiere 1 mL de cada uno de los ensayos a viales Eppendorf para precipitar las células por centrifugación en una microcentrífuga de mesa a la máxima velocidad (13.000 rpm) durante 3 min. Los sobrenadantes se transfieren a cubetas de 1 mL para medir en el espectrofotómetro la absorbancia a 540 nm de cada muestra respecto a su correspondiente blanco. Para conocer la concentración de nitrito correspondiente a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos se utilizará el coeficiente de extinción ($51,9\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) obtenido a partir de una recta de calibrado elaborada en las mismas condiciones con distintas concentraciones conocidas de nitrito ((ver práctica 8, apartado II, correspondiente a la determinación espectrofotométrica de nitrito). Para calcular la actividad específica, el profesor proporcionará el dato de la

concentración de proteínas (en mg mL^{-1}) de la suspensión celular utilizada o se calculará la cantidad de proteínas de dicha suspensión mediante el método de Lowry (ver práctica 29).

3.1. Cinética de aparición del producto en función del tiempo

Se toman 6 tubos de ensayo, uno marcado con la letra B para el blanco y los restantes numerados del 1 al 5, y se añaden con las correspondientes pipetas las cantidades de los componentes de la mezcla de ensayo que se indican en la Tabla 1. Tras iniciar la reacción por la adición de ditionito, cada tubo se incuba en un baño termostatzado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ el tiempo indicado en la tabla (entre 0 y 15 min).

Tabla 1. Cinética de aparición de producto.						
	Blanco (B)	1	2	3	4	5
KNO_3 100 mM	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Tampón BTP 0,5 M, pH 9	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Agua	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
MV 2 mM	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Suspensión celular	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Ditionito sódico (8 mg mL^{-1})	0,1 ml ^a	0,1 ml				
Tiempo de incubación a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$	0 min	1 min	2 min	5 min	10 min	15 min
Absorbancia a 540 nm	0					

^aAgitar en el vortex inmediatamente después de añadir el ditionito hasta que desaparezca el color azul-violeta.

Transcurrido el tiempo de incubación, todos los tubos se agitan en el vortex hasta la desaparición del color azul-violeta, se les añaden 1 ml del reactivo de sulfanilamida y 1 ml del reactivo de NNEDA, y se transfiere 1 ml de cada tubo a los correspondientes viales Eppendorf, previamente marcados y numerados, para centrifugarlos a 13.000 rpm durante 3 min. Finalmente se mide la absorbancia a 540 nm de los sobrenadantes obtenidos y se anota en la fila inferior de la Tabla 1 para proceder al cálculo de la actividad.

3.2. Efecto de la concentración de la enzima

Se toman 6 tubos de ensayo, uno marcado con la letra B para el blanco y los restantes numerados del 1 al 5, y se añaden con las correspondientes pipetas las cantidades de los componentes de la mezcla de ensayo que se indican en la Tabla 2. En cada tubo se añade un volumen diferente de agua y de suspensión celular para ver el efecto de la concentración de enzima, y tras iniciar la reacción por la adición de ditionito los tubos se incuban en un baño termostatzado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. A continuación, todos los tubos se agitan en el vortex hasta la desaparición del color azul-violeta, se les añaden 1 ml del reactivo de sulfanilamida y 1 ml del reactivo de NNEDA, y se transfiere 1 ml de cada tubo a los correspondientes viales Eppendorf, previamente marcados y numerados, para centrifugarlos a 13.000 rpm durante 3 min. Finalmente se mide la absorbancia a 540 nm de los sobrenadantes obtenidos y se anota en la fila inferior de la Tabla 2 para proceder al cálculo de la actividad.

Tabla 2. Efecto de la concentración de la enzima.						
	Blanco (B)	1	2	3	4	5

KNO ₃ 100 mM	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Tampón BTP 0,5 M, pH 9	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Agua	0,5 ml	0,495 ml	0,49 ml	0,45 ml	0,4 ml	0,3 ml
MV 2 mM	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Suspensión celular	0 ml	0,005 ml	0,01 ml	0,05 ml	0,1 ml	0,2 ml
Ditionito sódico (8 mg ml ⁻¹)	0,1 ml ^a	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Absorbancia a 540 nm	0					

^aAgitar en el vortex inmediatamente después de añadir el ditionito hasta que desaparezca el color azul-violeta.

3.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Se toman 6 tubos de ensayo, uno marcado con la letra B para el blanco y los restantes numerados del 1 al 5, y se añaden con las correspondientes pipetas las cantidades de los componentes de la mezcla de ensayo que se indican en la Tabla 3. En cada tubo se añaden 0,2 ml de tampón BTP 0,5 M a los diferentes pH indicados (entre 7 y 10) para ver el efecto del pH sobre la actividad enzimática. Tras iniciar la reacción por la adición de ditionito, los tubos se incuban en un baño termostatzado a 30 °C durante 10 minutos. A continuación, todos los tubos se agitan en el vortex hasta la desaparición del color azul-violeta, se les añaden 1 ml del reactivo de sulfanilamida y 1 ml del reactivo de NNEDA, y se transfiere 1 ml de cada tubo a los correspondientes viales Eppendorf, previamente marcados y numerados, para centrifugarlos a 13.000 rpm durante 3 min. Finalmente se mide la absorbancia a 540 nm de los sobrenadantes obtenidos y se anota en la fila inferior de la Tabla 3 para proceder al cálculo de las actividades enzimáticas a cada pH. El pH óptimo es el valor de pH para el cual se obtiene la máxima actividad.

	Blanco (B)	1 (pH 7)	2 (pH 8)	3 (pH 8,5)	4 (pH 9)	5 (pH 10)
KNO ₃ 100 mM	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Tampón BTP 0,5 M (≠ pH)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
	(pH 9) ^a	(pH 7)	(pH 8)	(pH 8,5)	(pH 9)	(pH 10)
Agua	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
MV 2 mM	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Suspensión celular	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Ditionito sódico (8 mg ml ⁻¹)	0,1 ml ^b	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Absorbancia a 540 nm	0					

^aPara el blanco se puede utilizar el tampón BTP a cualquier pH, por ejemplo pH 9.

^bAgitar en el vortex inmediatamente después de añadir el ditionito hasta que desaparezca el color azul-violeta.

3.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Se toman 6 tubos de ensayo, uno marcado con la letra B para el blanco y los restantes numerados del 1 al 5, y se añaden con las correspondientes pipetas las cantidades de los componentes de la mezcla de ensayo que se indican en la Tabla 4. Tras iniciar la reacción por la adición de ditionito, el tubo 1 se incuba en hielo (0 °C), el tubo 2 se deja a temperatura ambiente (unos 20 °C), y los tubos 3, 4 y 5 se incuban en baños termostatzados a 30, 45 y 60 °C, respectivamente. Las incubaciones se realizan durante 10 minutos y el blanco se puede incubar a cualquier temperatura. Todos los tubos se agitan en el

vortex hasta la desaparición del color azul-violeta, se les añaden 1 ml del reactivo de sulfanilamida y 1 ml del reactivo de NNEDA, y se transfiere 1 ml de cada tubo a los correspondientes viales Eppendorf, previamente marcados y numerados, para centrifugarlos a 13.000 rpm durante 3 min. Finalmente se mide la absorbancia a 540 nm de los sobrenadantes obtenidos y se anota en la fila inferior de la Tabla 4 para proceder al cálculo de las actividades enzimáticas a cada temperatura. La temperatura óptima es aquella para la cual se obtiene la máxima actividad.

	Blanco (B) ^a	1 (0 °C)	2 (20 °C)	3 (30 °C)	4 (45 °C)	5 (60 °C)
KNO ₃ 100 mM	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Tampón BTP 0,5 M a pH 9	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Agua	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
MV 2 mM	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Suspensión celular	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Ditionito sódico (8 mg ml ⁻¹)	0,1 ml ^b	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Temperatura incubación	30 °C ^a	0 °C	20 °C	30 °C	45 °C	60 °C
Absorbancia a 540 nm	0					

^aEl blanco se puede incubar a cualquier temperatura, por ejemplo 30 °C.

^bAgitar en el vortex inmediatamente después de añadir el ditionito hasta que desaparezca el color azul-violeta.

3.5. Determinación de la K_M aparente para el nitrato

Se toman 6 tubos de ensayo, uno marcado con la letra B para el blanco y los restantes numerados del 1 al 5, y se añaden con las correspondientes pipetas las cantidades de los componentes de la mezcla de ensayo que se indican en la Tabla 5. En el blanco no se añade nitrato y en cada uno de los ensayos se pone una cantidad diferente de nitrato, entre 0,05 y 10 mM, ya que a cada tubo numerado del 1 al 5 se le añade 0,1 ml de las correspondientes disoluciones de KNO₃ entre 0,5 y 100 mM y todos tienen un volumen final de 1 ml. Tras iniciar la reacción por la adición de ditionito, los tubos se incuban en un baño termostatzado a 30 °C durante 10 minutos. A continuación, todos los tubos se agitan en el vortex hasta la desaparición del color azul-violeta, se les añaden 1 ml del reactivo de sulfanilamida y 1 ml del reactivo de NNEDA, y se transfiere 1 ml de cada tubo a los correspondientes viales Eppendorf, previamente marcados y numerados, para centrifugarlos a 13.000 rpm durante 3 min. Finalmente se mide la absorbancia a 540 nm de los sobrenadantes obtenidos y se anota en la fila inferior de la Tabla 5 para proceder al cálculo de las actividades enzimáticas para cada concentración de sustrato. Para calcular la K_M aparente de la enzima para el nitrato se realizará la representación de Lineweaver-Burk, para lo que hay que calcular el inverso de la concentración de sustrato (mM⁻¹) y el inverso de la velocidad de reacción (μmol⁻¹ min) obtenida para cada una de dichas concentraciones de sustrato. En esta representación, los puntos se deben ajustar a una recta cuya prolongación debe cortar al eje X (inverso de la concentración de sustrato) en un punto con valor negativo que corresponde al inverso de la K_M , también con valor negativo.

Tabla 5. Determinación de la K_M aparente de la nitrato reductasa para el nitrato.
--

	Blanco (B)	1	2	3	4	5
KNO ₃ (concentración)	0 ml	0,1 ml (0,5 mM)	0,1 ml (1 mM)	0,1 ml (5 mM)	0,1 ml (10 mM)	0,1 ml (100 mM)
Tampón BTP 0,5 M a pH 9	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Agua	0,5 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
MV 2 mM	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Suspensión celular	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Ditionito sódico (8 mg ml ⁻¹)	0,1 ml ^a	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Concentración de nitrato en el ensayo	0	0,05 mM	0,1 mM	0,5 mM	1 mM	10 mM
Absorbancia a 540 nm	0					

^aAgitar en el vortex inmediatamente después de añadir el ditionito hasta que desaparezca el color azul-violeta.

4. RESULTADOS ESPERADOS Y DISCUSIÓN

Con los datos de la absorbancia a 540 nm de cada ensayo se procederá al cálculo de las correspondientes actividades enzimáticas y a la realización de las representaciones gráficas de los resultados obtenidos. Estos resultados se presentarán y discutirán en una memoria que debe elaborar y entregar cada alumno. La cinética de aparición del producto permitirá conocer la linealidad del proceso y calcular la actividad nitrato reductasa de la muestra (mU ml⁻¹) o la actividad específica (mU mg⁻¹) si se conoce el contenido en proteínas de la muestra. El cálculo de las actividades debe realizarse en los tiempos en los que se observe linealidad, es decir, cuando la cantidad de nitrito formado aumenta proporcionalmente con el tiempo de ensayo y en la representación gráfica de la velocidad de reacción (actividad) frente al tiempo se obtenga una recta. Al estudiar el efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción se debe observar un aumento de la velocidad (actividad) proporcional al incremento en la concentración de enzima, pero sin embargo, la actividad específica debe ser la misma en todos los casos ya que precisamente el aumento de velocidad se debe al aumento en la cantidad de enzima (proteínas). En las representaciones de las actividades enzimáticas frente a los diferentes valores de pH o temperaturas se debe obtener una gráficas con forma de campana, ya que la actividad va aumentando a medida que nos aproximamos a los valores de pH o temperatura óptimos para posteriormente descender cuando sobrepasamos dichos valores. Las máximas actividades se deben observar a pH 9 y a 30 °C, ya que éstos son los valores de pH y temperatura óptimos para la nitrato reductasa de *R. capsulatus*. Finalmente, en la representación de Lineweaver-Burk del inverso de la velocidad (actividad) frente al inverso de la concentración de sustrato (nitrato) debe obtenerse una recta que corte el eje X (inverso de la concentración de nitrato, en mM⁻¹) aproximadamente en el punto -10, ya que la K_M aparente para el nitrato de la nitrato reductasa de *R. capsulatus* cuando se utiliza metil viológeno reducido por ditionito como donador de electrones al pH y la temperatura óptimos es de aproximadamente 0,1 mM.

5. BIBLIOGRAFÍA

Blasco R, Castillo F, Martínez-Luque M (1997): The assimilatory nitrate reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1 is a flavoprotein. FEBS Letters 414: 45-49.

- Martínez-Luque M, Dobao MM, Castillo F (1991): Characterization of the assimilatory and dissimilatory nitrate-reducing systems in *Rhodobacter*. A comparative study. FEMS Microbiology Letters 83: 329-334.
- Moreno-Vivián C, Castillo F, Cárdenas J (1982): Effect of light and darkness on nitrate assimilation by *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1. Photosynthesis Research 3: 313-319.
- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F (1999): Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. Journal of Bacteriology 181: 6573-6584.