

# Inducción de biosíntesis de ureasa en *Proteus mirabilis*

por

Carlos Vicente Córdoba

PRESENTADO POR EL ACADÉMICO D. FLORENCIO BUSTINZA LACHIONDO

## INTRODUCCIÓN

La ureasa (urea amido hidrolasa, EC 3.5.1.5) representa un tipo especial de amidasa (1) que realiza la hidratación de una diamida con su consiguiente ruptura. Este enzima ha sido ampliamente estudiado, quizá debido a tres razones principales:

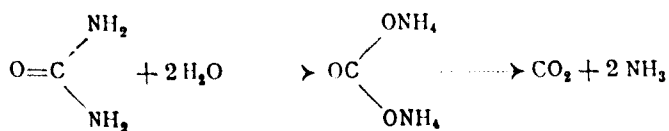
a) Su razón histórica, ya que fue el primer enzima cristalizado (2).

b) Su facilidad de medida.

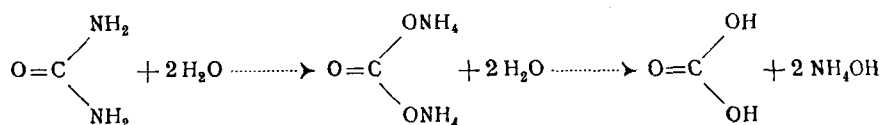
c) Su gran interés clínico.

En efecto, un considerable número de estudios sobre ureasa estaban enfocados a su utilización en análisis clínicos de urea en orina y sangre (3, 4). También en el campo de la bacteriología se ha utilizado este enzima como un criterio, la mayor parte de las veces, exclusivamente taxonómico (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

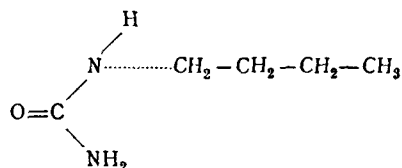
La estequiometría de la hidrólisis de la urea por la ureasa es un problema que ha estado sometido a amplias discusiones. Modernamente se acepta la formación de amoníaco y anhídrido carbónico directamente o, tal vez, la formación de carbonato amónico que se hidrolizaría de forma espontánea (1):



o más correctamente:

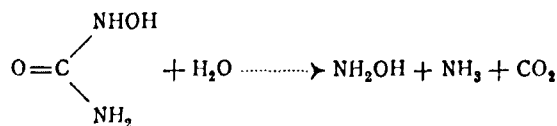


Hasta hoy día, este enzima ha sido considerado como uno de los de especificidad más restringida: su único sustrato era la urea. La hipótesis de Werner (13) de que la mono-n-butil-urea era hidrolizada por el enzima ha sido totalmente desechada:



La aparición de amoníaco como producto de la hidrólisis aparente del biuret significó el intento de encontrar de nuevo un segundo sustrato de la ureasa (14). Sin embargo, fue demostrado, sin lugar a dudas, que esta aparición de amoníaco era debida a contaminaciones del producto por urea.

Fisher, Winter y Davidson (15), en 1965, demostraron que la hidroxíurea era un verdadero segundo sustrato para la ureasa:



La producción de hidroxilamina excluía la participación de urea contaminante, como en el caso del biuret.

La mayoría de los datos sobre el enzima en sí (Km, peso molecular, temperatura y pH óptimos) (16, 17, 18, 19, 20) fueron estudiados por Sumner y su escuela. También se había descrito una amplia gama de inhibidores de la actividad enzimática, fundamentalmente entre análogos estructurales del sustrato (21, 22, 23, 24). Sin embargo, muy poco (¿nada?) se conocía sobre la, llamémosla, fisiología del enzima.

En 1955, de Turk (25) estudia lo que él llama «adaptive for-

mation» de ureasa en suspensiones lavadas de *Pseudomonas aeruginosa*. Este autor observó que células lavadas de *Ps. aeruginosa* hacían desaparecer urea si disponían de una fuente de carbono apropiada para suministrar energía mediante su oxidación. Si las células se suspendían solamente en urea, esta urea podía ser recogida íntegra después de un período de cinco horas. Sin embargo, si la urea se añadía después de que cantidades crecientes de succinato hubieran sido oxidadas por las bacterias, la urea comenzaba inmediatamente a desaparecer. Lo mismo sucedía si urea y succinato se añadían juntos salvo que, en este caso, la desaparición comenzaba después de un período de latencia de treinta minutos.

Es curioso notar que, en estas experiencias, de Turk considera como sustrato de inducción, como inductor, el succinato, ya que las células, frente a urea exclusivamente, eran incapaces de hidrolizarla.

Realizó las mismas experiencias con ácido úrico y vio que, no habiendo primero oxidación de sustrato (succinato), se acumula urea, mientras que esta acumulación se ve impedida previa oxidación de succinato.

Una nueva noticia sobre la biosíntesis de ureasa nos llega en 1958 a raíz del debatido problema de la presunta actividad ureásica en rumiantes. La urea se viene utilizando como suplementación nitrogenada en la dieta del ganado vacuno (26), y se sabía que esta urea desaparecía rápidamente, debido a la actividad gástrica de los animales. Se ha demostrado que esta «ureasa animal» (27, 28, 29) está en su mayor parte asociada a la flora bacteriana del estómago de los rumiantes.

También se han realizado experiencias en el sentido de suministrar biuret como suplemento nitrogenado. Se ha demostrado que el metabolismo del biuret, en este caso, excluye por completo toda acción ureásica. Una pequeña fracción de la actividad ureásica gástrica era dependiente de protozoos (30). A este respecto, Sojima *et al.* demuestran que ciertos protozoos del contenido gástrico de rumiantes pueden producir ureasa adaptativamente en presencia de urea (31).

Este hecho nos es ya conocido. Un enzima, tal vez enmascarado, tal vez inexistente, puede hacerse notar o puede demostrar actividad si el individuo productor crece en presencia de sustrato.

La cuestión de que un enzima inducible se sintetice *de novo* o

a partir de un precursor ya existente fue explicada satisfactoriamente por Rotman y Spiegelman (32) para la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* en el sentido de que menos del 1 % de su carbono derivaba de algunos componentes celulares que existían antes de la adición del inductor.

A este respecto, Mehta *et al.* (33) dan información sobre la biosíntesis inducida de ureasa por *Azotobacter vinelandii*. Estos autores afirman que, para el citado microorganismo en células lavadas, «la síntesis *de novo* de proteínas está específicamente dirigida hacia síntesis de ureasa solamente en presencia del inductor».

Sus argumentos están basados en el efecto del cloranfenicol sobre la síntesis de ureasa. En un período de treinta segundos, la síntesis de ureasa por suspensiones de células lavadas de *A. vinelandii* es inhibida casi por completo, mientras que se demuestra una inhibición del orden del 50 % cuando el cloranfenicol se añade al medio al cabo de quince minutos de incubación con el microorganismo. El hecho de que este antibiótico interfiera con la formación de cadenas polipeptídicas «nacientes», apoya la afirmación de estos autores.

También Mehta *et al.*, en el mismo trabajo, encuentran que la tiourea se comporta como inductor de la síntesis de ureasa en células lavadas y en células en crecimiento de *A. vinelandii*. La tiourea se conoce desde antiguo como inhibidor de la actividad ureásica y no se ha descrito que, bajo ninguna condición, pueda ser hidrolizada o modificada bajo la acción del enzima. Esto haría sospechar que existe, para este microorganismo, un fenómeno de biosíntesis gratuita del enzima. Tal hecho se podría afirmar concluyentemente si los autores dieran datos sobre el crecimiento o sobre aspectos metabólicos relacionados, ya que con Umbarger (34) se puede afirmar que:

«La formación gratuita de enzima ocurre cuando ni la aparición del enzima ni la presencia del inductor afectan el metabolismo de la célula.»

Sin embargo, para *A. vinelandii*, la tiourea se muestra como un inductor más eficaz que la misma urea, teniendo igual efectividad para concentraciones que van desde 1 mM a 6 mM. Los autores sugieren que puede ser debido al hecho de que, al no ser la tiourea hidrolizada, se evita la presencia de amoníaco, que reprimiría la síntesis inducida del enzima.

Esta represión por producto final ha sido estudiada perfectamente por Magaña-Plaza y Ruiz-Herrera para *Proteus rettgeri* (35). En células mantenidas en «steady state», mediante un quimiostato que da una concentración de urea constante de 50  $\mu$ moles/ml, la adición de amoníaco al medio provoca una bajada en la actividad ureásica de las muestras recogidas de 0,38 a 0,03  $\Delta$  pH/mg de células/minuto. Esto estaría de acuerdo con las afirmaciones de Mehta *et al.* para *A. vinelandii*.

En el mismo trabajo se consideran los iones amonio como inhibidores, no solamente de la actividad enzimática (inhibidor competitivo), sino del transporte de urea a través de la pared y membrana celular, pero a nuestro juicio, los datos aportados a este respecto no son suficientemente concluyentes.

En *P. rettgeri* se ha demostrado asimismo, represión de la síntesis de ureasa por glucosa. Se basa esta afirmación en ensayos en los que se mide la riqueza en ureasa de cultivos que han crecido en medio cuya fuente de carbono es glicerol o glucosa.

La presencia de glucosa en el medio de incubación hacía bajar en gran manera la velocidad de síntesis del enzima. Si el inóculo procedía, por otra parte, de cultivos en medio sólido cuya fuente de carbono era glucosa, la velocidad de síntesis era intermedia entre la de los cultivos que crecían exclusivamente en glicerol y la de los que crecían exclusivamente en glucosa. Los autores suponen que el período de incubación en medio que contenía glicerol no era suficiente para la eliminación de un catabolito represor que se acumulaba en las células durante su crecimiento en medio con glucosa. Estos resultados están de acuerdo con los de Mehta *et al.* para *A. vinelandii*.

El fenómeno de represión por glucosa, homologable en sus efectos a los fenómenos de represión por producto final, es común a una gran cantidad de enzimas catabólicos (34, 36). McFall y Mandelstam (37) consideran que se lleva a cabo por la formación de catabolitos represores, que es acelerada por el catabolismo de la glucosa. En el caso de la  $\beta$ -galactosidasa, Nakada y Magasanik (38) demuestran que no es la glucosa el represor, sino un producto de su catabolismo.

El hecho incuestionable es que, para un mismo enzima (ureasa), inducible en tres especies de microorganismos, se ha demostrado represión de su síntesis en presencia de glucosa. Hasta el momento

no nos es conocido ningún represor específico de la síntesis del enzima por nosotros estudiado, ya que los mismo iones amonio han mostrado ser represores de la glutamato dehidrogenasa en presencia de su sustrato (39).

Los mecanismos de regulación a los que la ureasa parece estar sometida, están de acuerdo con el modelo propuesto por Jacob y Monod (40).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. *Reactivos y productos*

Los diversos productos inorgánicos utilizados fueron:

fosfatos:  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ,  $\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  
 $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ;

sulfatos:  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ,  
 $\text{SO}_4\text{H}_2$ ;

halogenuros:  $\text{I}_2\text{Hg}$ ,  $\text{IK}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ClNa}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ,  $\text{ClK}$ ,  
 $\text{ClH}$ ;

carbonatos:  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ ,  $\text{CO}_3\text{K}_2$ ;

hidróxidos:  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$ ;

todos de grado analítico, de E. Merck, AG.

Para los cultivos del microorganismo se emplearon Ionagar número 2 y Peptona bacteriológica de Oxoid, y ácido nicotínico de Hema Drug Co. Inc.

Se utilizaron como disolventes orgánicos acetona y toluol (Merck) y etilmercaptano (Fluka AG.), amablemente proporcionado este último por el profesor doctor D. A. M. Municio.

Como fuente de carbono se utilizaron glicerol, glucosa y las sales sódicas de los ácidos cítrico, fumárico, succínico,  $\alpha$ -cetoglutarico, acético y láctico, todos de Merck, y las sales sódicas de los ácidos L-málico (Light Co. Ltd.) y cis-oxalacético (Sigma Chemical Co.).

La urea era de Boots Pure Drug Co. Ltd., y sus análogos formamida (Merck), N,N-dimetilformamida (Fisher Sc. Co.), amablemente proporcionada por el doctor E. Cadenas, y la N-formilurea (Fluka, AG).

Para la curva patrón de proteínas se utilizó ovoalbúmina soluble de J. T. Baker Chemical Co., y para la valoración de proteínas el reactivo de fenoles de Analema.

La DEAE-celulosa era de Sigma Chemical Co.

## 2.2. Aparatos

Las medidas de pH se realizaron por medio de un potenciómetro Beckman, modelo Expandomatic, y un Pust B 24/CO.

Las medidas de colorimetría y turbidimetría se llevaron a cabo en un fotocolorímetro Spectronic 20, con cubetas de 1 cm de paso de luz.

Las centrifugaciones se hicieron en una centrífuga Wifug, con tubos de polietileno de 50 ml de volumen.

Para la diálisis se utilizaron tripas de diálisis (Union Carbide Corporation), amablemente proporcionadas por el doctor E. Viñuela, y un Hotplate Magnetic Stirrer de Cenco.

Las pesadas de precisión se llevaban a cabo en una balanza monoplato Monopan de Sauter.

Las medidas de velocidad de reacción enzimática se realizaban en unidades Conway MD-120 de Gallenkamp.

Para las técnicas cromatográficas se utilizaban columnas Pobel de 20 cm × 1 cm Ø.

## 2.3. Cultivo del microorganismo

*Proteus mirabilis* NCIB 5887 se mantenía en un medio sólido de la siguiente composición:  $\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ : 0,7 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ : 0,3 g;  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ : 0,01 g; glicerol: 0,4 g; peptona: 0,5 g; agar: 1,5 g; agua destilada: 100 ml (35).

El medio basal para cultivos líquidos era el siguiente:  $\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ : 0,7 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ : 0,3 g;  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ : 0,01 g; peptona: 1 g; agua destilada: 100 ml. A este medio se añadían diferentes fuentes de carbono y urea, o sus análogos, como inductores. Los cultivos se llevaban a cabo en estufas a 37° en medio sólido durante veinticuatro horas, y en medio líquido, el tiempo requerido por cada experiencia.

El medio mínimo se preparó como modificación a la modifica-

ción de Sandys sobre el medio de Fildes (41) de la siguiente manera:  $\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ : 1,16 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ : 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ : 0,004 g;  $\text{ClNa}$ : 0,48 g; urea: 0,24 g; ácido nicotínico, 0,012 %: 2 ml; glicerol: 0,55 g; agua destilada: 100 ml.

#### 2.4. Determinación del crecimiento

Las células se cultivaban en cubetas especiales para Spectronic 20, clasificadas por parejas según el método del  $\text{Cl}_2\text{Co}$  (42). La turbidez de los cultivos se medía en este aparato a una longitud de onda seleccionada, para la cual la absorción del medio era mínima. Esta longitud de onda era de 610 m $\mu$  para medios con peptona, y de 910 m $\mu$  para medio mínimo. Para esta medida se equipaba el fotolorímetro con un filtro rojo.

Se construyó una curva de absorción frente a peso seco, de la siguiente manera: se hicieron diluciones en potencias de 2 en los tubos de turbidimetría, se midió su absorción a 610 (910) m $\mu$  y se centrifugaron las células a 3.500 rpm. Decantado el medio, se lavaron tres veces con suficiente cantidad de agua destilada y estéril y se secaron a 80°. Los pesos por ml de cultivo se enfrentaron a las absorbancias para dar la gráfica de la figura 1.

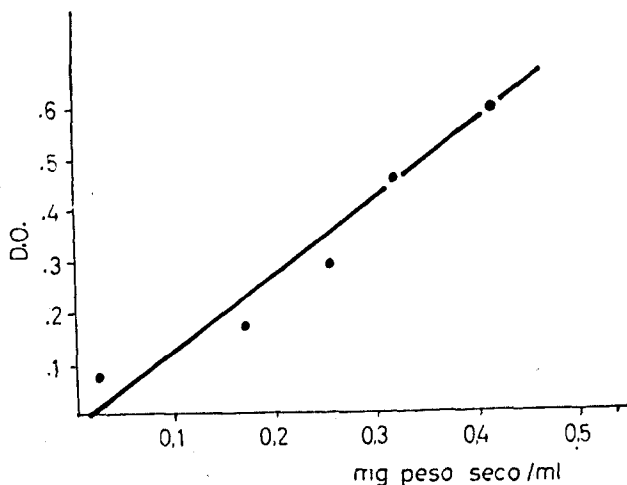


Fig. 1.—Curva patrón de peso seco frente a D. O. de cultivos de *P. mirabilis*. Los cultivos en medio líquido se hacían según el protocolo dado en Métodos. La D. O. se medía a 610 m $\mu$ .



### 2.5. Medida de la actividad enzimática

De entre los numerosos métodos descritos, bien de desaparición de sustrato (43, 44, 45), bien de aparición de amoníaco (3, 46, 47, 48), o de anhídrido carbónico (22, 49, 50), se escogieron dos para realizar medidas relativas a:

a) Extractos enzimáticos: se midió la producción de amoníaco por el método de microdifusión de Conway (51), utilizando para parar la reacción enzimática  $\text{CO}_2\text{K}_2$  a saturación, y como absorbente del amoníaco formado,  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,02 N. El sulfato amónico se valoraba por el método de Nessler (52), midiendo la absorción a 440 m $\mu$ . La curva patrón que se da en la figura 2 se construyó con molaridades crecientes de sulfato amónico Merck.

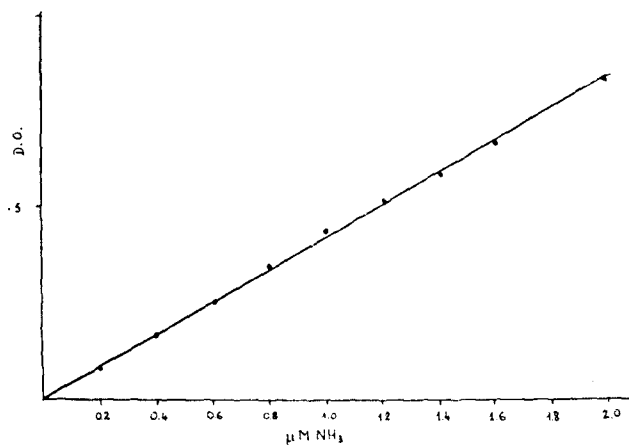


Fig. 2.—Curva patrón de valoración de amoníaco por el método de Nessler. En 5 ml de volumen final, que contenían molaridades crecientes de  $\text{NH}_4^+$ , se añadían 0,3 ml de reactivo de Nessler. La D. O. se medía a 440 m $\mu$ .

b) Células enteras: se llevó a cabo por el método de Magaña-Plaza y Ruiz-Herrera (35); midiendo el cambio de pH en una solución de urea en agua bidestilada producido por la acción de células que han sido previamente tratadas con toluol para abolir la permeabilidad celular.

c) Medida de la cantidad de proteínas: se realizó por colorimetría según el método de Lowry *et al.* (53), basado en la producción

de color por el reactivo de fenoles con aminoácidos de tipo fenólico. La curva patrón de la figura 3 se construía añadiendo a 1 ml de solución acuosa de proteína patrón 5 ml de un reactivo compuesto por la mezcla de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2 % en  $\text{NaOH}$  0,1 N, y  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 0,5 % en tartrato sódico-potásico al 1 % en la proporción 50:1 v/v. Los tubos se agitaban fuertemente y se mantenían quince minutos en incubación a  $30^\circ$ . Al cabo de este tiempo se añadían

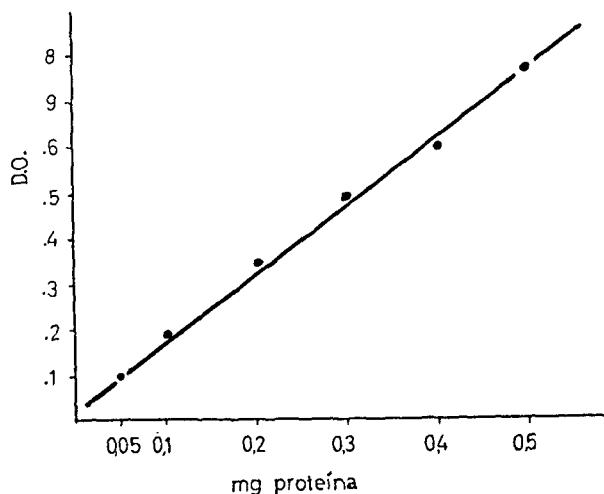


Fig. 3.—Curva patrón de valoración de proteínas. El procedimiento se describe en Métodos. La O. D. se medía a 500  $\text{m}\mu$ .

0,5 ml de reactivo diluido de Folin llevado a 1 N de ácido con  $\text{NaOH}$  y fenoltaleína. La mezcla se agitaba fuertemente y se incubaba durante veinte minutos a  $30^\circ$ . La densidad óptica se medía a 500  $\text{m}\mu$ .

d) La actividad específica del enzima se estimó en  $\mu\text{moles NH}_3/\text{mg proteína/minuto}$ .

## 2.6. Cromatografía de adsorción y de cambio iónico

La cromatografía de adsorción se realizó sobre gel de fosfato cálcico, equilibrado con tampón fosfato 0,001 M de pH 6,9 y preparado según Tiselius *et al.* (54).

La DEAE-celulosa fue preparada según el método de Seubert y Remberger (55), equilibrada con tampón fosfato 0,001 M de pH 7,7.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. *Inducción de la biosíntesis de ureasa*

Hemos dicho en la introducción que se ha descrito la urea como inductor específico de síntesis de ureasa para *Proteus rettgeri* (35). Según nuestros experimentos, la inducción de síntesis de ureasa por urea en *P. mirabilis* tienen componentes fundamentalmente distintos que en el caso anterior.

Utilizando como fuente de carbono glicerol 0,33 M se hicieron crecer inóculos procedentes de cultivo cuyo nivel de ureasa era nulo, según nuestros métodos de medida, tal y como se describe en métodos, en medio basal suplementado con urea. Las células, recogidas por centrifugación, fueron lavadas con tampón fosfato 0,001 M de pH 6,9 tres veces y por último tratadas con etilmercaptano 0,14 M en acetona. Los polvos, secados a vacío, fueron suspendidos en suficiente cantidad del mismo tampón para que la concentración final fuera de 1 mg de peso seco/ml. Esta suspensión, que contenía teóricamente el total de la actividad ureásica, fue utilizada para las determinaciones del enzima.

##### 3.1.1. *Cinética de la inducción. Influencia del tiempo de inducción.*

Utilizando concentraciones de urea de  $40 \cdot 10^{-3}$  M se varió el tiempo de inducción de una a siete horas. En esta escala temporal, la variación del peso seco para una unidad de bacterias ( $10^8$ ) era mínima, como se ve en la figura 4. La variación de la densidad óptica en este tiempo nos daba ausencia de crecimiento o muy poco crecimiento. Por ello cambiamos el planteamiento de la curva clásica de la cinética de inducción a una en la que se enfrentaba la actividad específica del enzima con el tiempo de inducción del cultivo.

Considerando velocidad de reacción a igualdad de peso seco, los cultivos alcanzaban un máximo de actividad a las cuatro horas de inducción, a partir del cual la velocidad de reacción catalizada por 1 mg de peso seco de bacterias entraba en fase estacionaria (fig. 5).

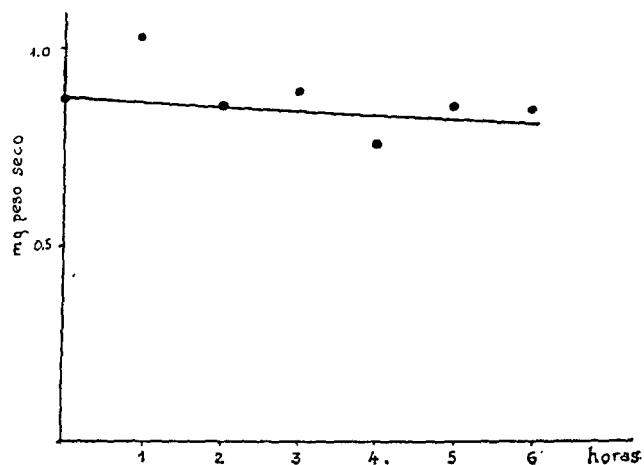


Fig. 4.—Variación del peso seco de cultivos de *P. mirabilis* por unidad de bacterias ( $10^8$ ) en función del tiempo de inducción. La concentración de inductor en medio basal líquido era  $40 \cdot 10^{-3}$  M.

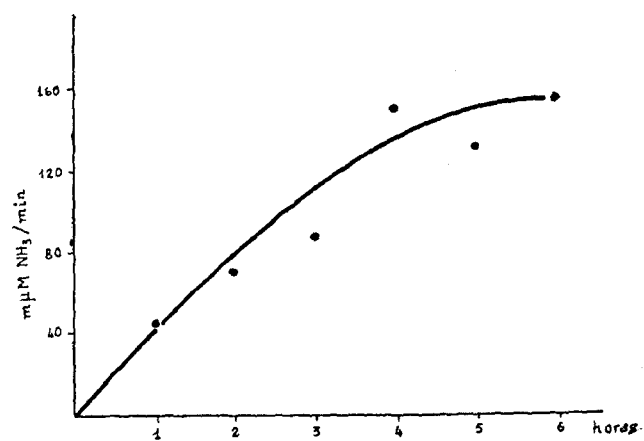


Fig. 5.—Actividad enzimática de *P. mirabilis* en función del tiempo de inducción. La velocidad de reacción se medía poniendo en contacto  $40 \mu\text{M}$  de urea,  $150 \mu\text{M}$  de fosfato y 1 mg de peso seco de bacterias. La reacción se paraba con  $\text{CO}_3\text{K}_2$  a saturación, siendo el volumen final de 3 ml. Las demás condiciones se especifican en Métodos.

A nivel de actividad específica, la curva entra en fase estacionaria prácticamente en el mismo período de tiempo (fig. 6).

Si consideramos estos tres hechos:

- a) constancia en el peso seco por unidad de número de bacterias;
- b) aumento progresivo de la velocidad de reacción a igualdad de peso seco en función del tiempo de inducción, hasta alcanzar un máximo a las cuatro horas;
- c) aumento progresivo de la actividad específica en función del tiempo de inducción, tendiendo a estabilizarse,

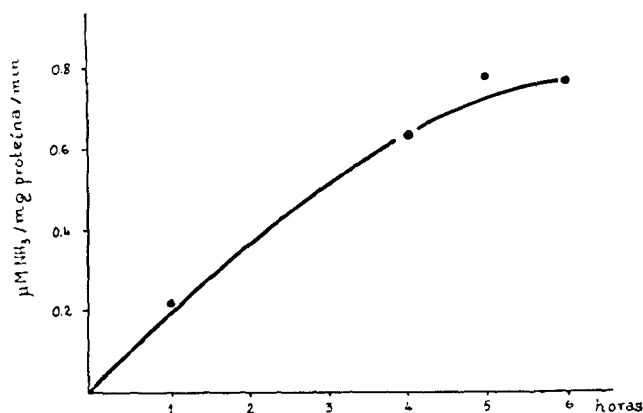


Fig. 6.—Actividad específica de la ureasa de *P. mirabilis* en función del tiempo de inducción. La velocidad de reacción se medía como en el caso anterior. Los mg de proteína/mg de peso seco se median por el método de Lowry *et al.*

se deduce que la ureasa, catalíticamente activa, se biosintetiza en presencia de inductor y aumenta su cantidad (actividad) progresivamente de una manera más rápida que el resto de las proteínas valoradas hasta un momento en que esta fracción de enzima se comporta como constante respecto al total de proteínas bacterianas.

### 2.1.2. Influencia de la concentración del inductor.

Determinado el tiempo de inducción de cuatro horas, se ensayaron diversas concentraciones de urea en calidad de inductor. Magaña-Plaza y Ruiz-Herrera (35), según indicaciones de Guo y Liu (5), utilizan para *P. rettgeri* concentraciones de urea del 2 %.

Esta misma concentración, para *P. mirabilis* resulta prohibitiva en nuestros ensayos, así como el tiempo de incubación de una noche que ellos utilizaban.

De las concentraciones utilizadas por nosotros (20, 40, 80, 160 y 320  $\mu$ M de inductor/ml), se da un máximo de inducción para un tiempo de cuatro horas a concentración de urea de  $80 \cdot 10^{-3}$  M, mientras que  $320 \cdot 10^{-3}$  M, aproximadamente el 2 % (0,33 M), se revela totalmente ineficaz.

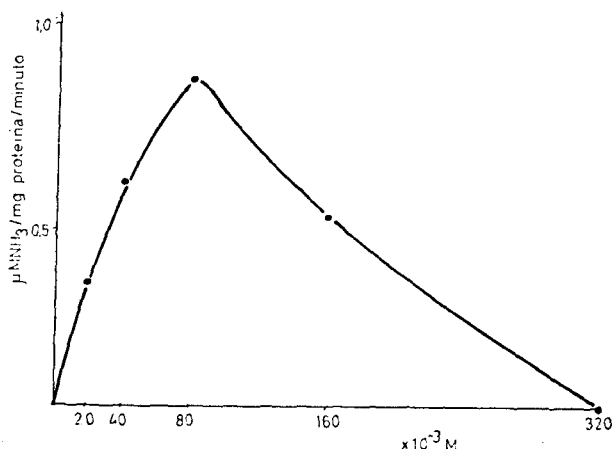


Fig. 7.—Actividad específica de la ureasa de *P. mirabilis* en función de la concentración de inductor. En el eje de abscisas se dan molaridades de urea en medio basal líquido. El tiempo de inducción fue de cuatro horas en todos los casos.

El hecho de utilizar peptona como suplementación de los medios de cultivo hizo que se estableciera un índice de la posible acción de este material sobre la actividad ureásica de las bacterias. Esto estaba basado en que, en ciertos casos (ureasa de adormidera y cacahuet) (56), la actividad enzimática sufría una notable exaltación por acción de peptonas.

Las bacterias que crecían en medio mínimo alcanzaban un promedio de actividad en los extractos acetona-etilmercaptano aproximadamente igual a las que crecen en medio con peptona más urea, salvo que lo hacen con una diferencia de veinte horas. Sin embargo, la fase de latencia en medio con peptona casi nunca sobrepasa las cuatro horas en *P. mirabilis*.

En medio mínimo con urea, esta fase de latencia dura veintitrés horas. Por tanto, se podría concluir que, en ambos casos, la máxima actividad ureásica coincide con el final de la fase de latencia.

La adición de peptonas suministra a las células aminoácidos ya hechos, lo que les permite sintetizar proteínas (entre ellas la ureasa), más rápidamente que si no hay peptona en el medio. Esto redundaría en más rápido crecimiento y una mayor facilidad de utilización de la urea (tabla I).

TABLA I

*Influencia de peptona sobre actividad enzimática de Proteus mirabilis*

Suplementación	Tiempo de inducción (2)	Actividad específica (1)
Peptona ... ..	4	< 0,0005
Peptona + urea ... ..	4	0,64
Urea ... ..	4	0,19
	24	0,61

(1) La actividad específica viene dada en  $\mu\text{M NH}_3/\text{mg proteína/minuto}$ .

(2) El tiempo de inducción viene dado en horas.

### 3.2. Especificidad del inductor

#### 3.2.1. Antecedentes.

El hecho de que en un determinado organismo se induzca síntesis de un enzima por un compuesto que no es sustrato de la reacción enzimática, se conoce desde hace algunos años. Quizá el caso más citado sea la inducción de la  $\beta$ -galactosidasa por ciertos  $\beta$ -tiogalactósidos. También se conoce el caso contrario, en el que un sustrato, la neogalactosa, no induce síntesis del enzima.

Con respecto a la ureasa, ya se ha citado que para *A. vinelandii* existe inducción de la biosíntesis del enzima por tiourea (33), que se comporta como inhibidor de la reacción enzimática, pero nunca como sustrato.

En *P. rettgeri* habían sido ensayados también a este fin, una serie de análogos estructurales de la urea que no se comportaban como sustratos. Estos eran, de nuevo tiourea, N-metilurea y N,N-dimetilurea. En ningún caso se apreció inducción de la síntesis del enzima (35).

Mehta *et al.* (33) observaron que para *A. vinelandii* hay inducción de biosíntesis de ureasa por arginina. No dan más dato. Pero emiten la hipótesis de que esta inducción puede ser indirecta debido a la formación de urea a partir de arginina por una reacción catalizada por arginasa.

Para *P. mirabilis* hemos ensayado tres análogos estructurales de la urea, de los que en nuestras revisiones bibliográficas no hemos encontrado referencia a alguna acción sobre el enzima, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos tres análogos eran N-formilurea, formamida y N,N-dimetilformamida.

### 3.2.2. ¿Hay inducción gratuita para la ureasa?

Partiendo de cultivos de *P. mirabilis*, cuyo nivel de ureasa era nulo, se sembraron inóculos en medios basales en los cuales la urea había sido sustituida por sus análogos. Se mantuvieron creciendo durante cuatro horas, como en el caso anterior, al cabo de las cuales las células fueron centrifugadas, lavadas y tratadas con acetona-etil-mercaptano. Las concentraciones empleadas para los tres compuestos fueron  $20$ ,  $40$ ,  $60$  y  $80 \cdot 10^{-3}$  M en medio basal.

Manteniendo la proporción de 1 mg de peso seco/ml en tampón fosfato  $0,001$  M de pH 6,9, se midió la actividad específica de los diferentes cultivos. Los resultados vienen dados en las tablas II, III y IV, y en las figuras 8, 9 y 10.

En los tres casos existía inducción de biosíntesis de ureasa, con la particularidad que, también en los tres casos, la mayor velocidad de inducción correspondía a la concentración de inductor, para la cual el crecimiento de la población bacteriana había sido mínimo. Particularmente espectacular fue el caso de la formamida a concentración de  $20 \cdot 10^{-3}$  M, para la cual la actividad enzimática duplica a la obtenida por la urea en su mayor velocidad de inducción, mientras que el crecimiento no es sólo nulo, sino que la densidad óptica de las muestras disminuye a lo largo de las cuatro horas, quizá debido a un fenómeno de autólisis (figs. 11, 12 y 13).

Se pensó que estos tres compuestos podían ser no solamente in-



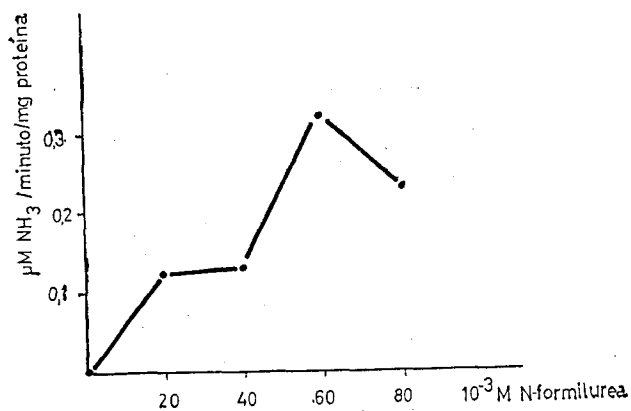


Fig. 8.—Actividad específica de la ureasa de *P. mirabilis* en función de la concentración de N-formilurea, considerado como inductor en medio basal líquido. El tiempo de inducción fue, en todos los casos, de cuatro horas.

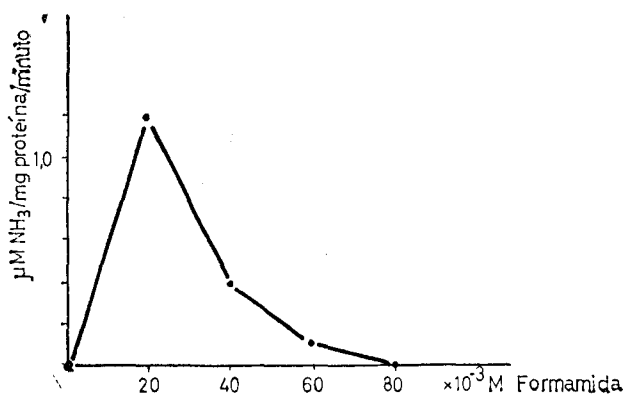


Fig. 9.—Actividad específica de la ureasa de *P. mirabilis* en función de la concentración de formamida, considerada como inductor, en medio basal líquido. El tiempo de inducción fue, en todos los casos, de cuatro horas.

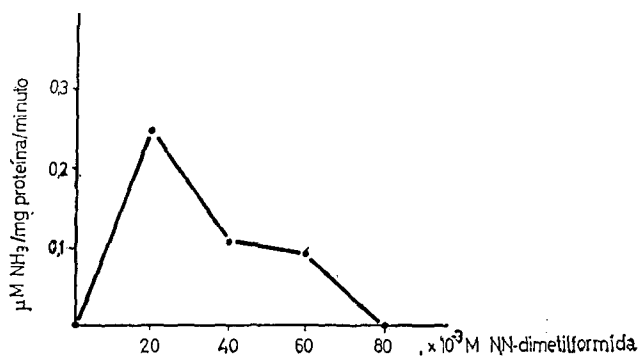


Fig. 10.—Actividad específica de la ureasa de *P. mirabilis* en función de la concentración de N,N-dimetilformamida, considerada como inductor, en medio basal líquido. El tiempo de inducción fue, en todos los casos, de cuatro horas.

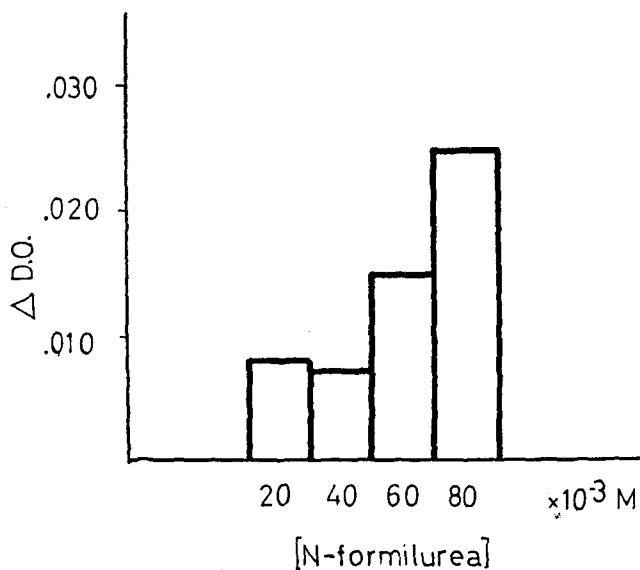


Fig. 11.—Crecimiento de *P. mirabilis* en medio líquido durante las cuatro horas de inducción en función de la concentración de N-formilurea. La D.O. se media a 610  $m\mu$ .

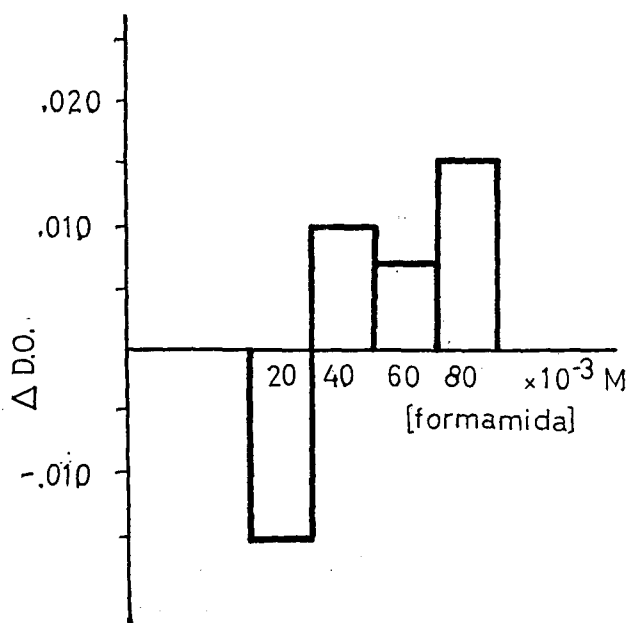


Fig. 12.—Crecimiento de *P. mirabilis* en medio líquido durante las cuatro horas de inducción, en función de la concentración de formamida. La D. O. se medía a 610  $m\mu$ .

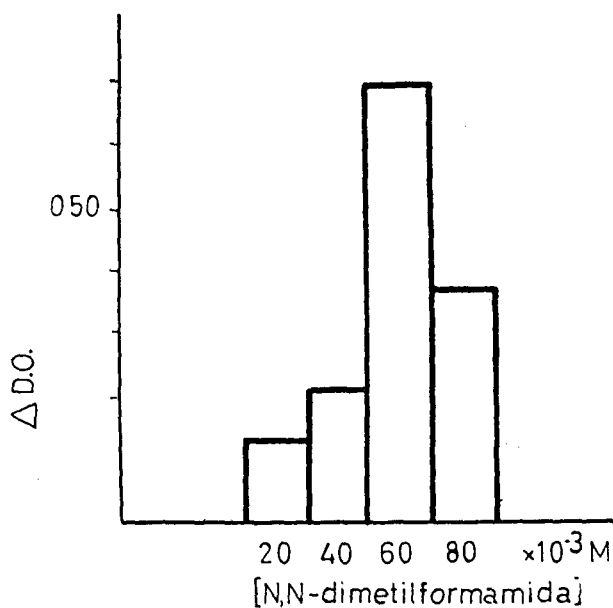


Fig. 13.—Crecimiento de *P. mirabilis* en medio líquido durante las cuatro horas de inducción, en función de la concentración de N,N-dimetilformamida. La D. O. se medía a 610  $m\mu$ .

ductores, sino también sustratos de la ureasa. Más adelante demostraremos que esto no es cierto en ninguno de los casos.

¿Se puede hablar de inducción gratuita del enzima? En las figuras se demuestra que el crecimiento de la población bacteriana se ve modificado por la presencia de los tres análogos, lo cual implicaría que, en cierta forma, hay diferencias en el metabolismo celular entre bacterias que crecen sin inductores y bacterias que crecen en presencia de los mismos. Basándonos en este hecho, sólo se podría afirmar que existe, en *P. mirabilis*, inducción de biosíntesis de ureasa provocada por compuestos que no son sustratos del enzima.

TABLA II

*Inducción de biosíntesis de ureasa por N-formilurea*

Concentración $\times 10^{-3}$ M	mg proteína/ mg peso seco	Actividad específica (1)
20	0.40	0.12
40	0.59	0.13
60	0.56	0.32
80	0.65	0.23

(1) La actividad específica viene dada en  $\mu\text{M NH}_3/\text{mg proteína/minuto}$ .

TABLA III

*Inducción de la biosíntesis de ureasa por formamida*

Concentración $\times 10^{-3}$ M	mg proteína/ mg peso seco	Actividad específica (1)
20	0.48	0.20
40	0.50	0.40
60	0.54	0.11
80	0.35	$< 0.0005$

(1) La actividad específica viene dada en  $\mu\text{M NH}_3/\text{mg proteína/minuto}$ .

T A B L A I V

*Inducción de biosíntesis de ureasa por N,N-dimetilformamida*

Concentración $\times 10^{-3}$ M	mg proteína/ mg peso seco	Actividad específica (1)
20	0.98	0.25
40	0.96	0.10
60	0.50	0.10
80	0.45	< 0.0005

(1) La actividad específica viene dada en  $\mu\text{M NH}_3/\text{mg proteína/minuto}$ .

### 3.3. Purificación del enzima

La ureasa ha sido ampliamente estudiada respecto a procesos de purificación desde que fue cristalizada por Sumner, a partir de semillas de *Cannavalia ensiformis*, en 1926 (2). La mayoría de los procesos concernían a precipitaciones con disolventes orgánicos, siguiendo el método desarrollado por el premio Nobel, aunque se sabe que la ureasa cristalizada por éste era un complejo de varias proteínas (57). Los disolventes orgánicos más corrientemente empleados fueron acetona (2) y alcohol (58), empleándose en ciertos casos éter de petróleo como tratamiento previo con efectos desengrasantes (59). En nuestros intentos de purificación de ureasa proveniente de semillas de *Citrullus vulgaris*, hemos empleado éter de petróleo con tres veces más rendimiento que cuando se empleaba éter sulfúrico.

Para ciertas ureasas bacterianas (5) se ha utilizado una mezcla de alcohol amílico : cloroformo 1/4 v/v, que se añadía a una suspensión bacteriana en solución salina.

Las precipitaciones con sales han sido empleadas en muchos casos, obteniéndose buenos resultados, especialmente con el método de Hanabusa (60). También ha sido empleado con ureasa bacteriana (61). Normalmente se utilizaba sulfato amónico.

La cromatografía ha sido empleada en mucha menor extensión, más corrientemente de adsorción sobre gel de fosfato cálcico (60, 61) y en ciertos casos sobre papel (62), usando para el desarrollo clorhi-

drato de cisteína y glicina en solución acuosa. El fraccionamiento de la proteína enzimática se llevaba a cabo sobre CM-celulosa (63).

Mamiya y Gorin introducen el uso del 2-mercaptoetanol (64) como modificación del procedimiento de Creeth y Nichol (65). En otros casos se utilizaba sulfuro de hidrógeno como agente protector (61). La adición de sulfito o de 2-mercaptoetanol al disolvente de precipitación aumentaba el rendimiento de la actividad específica del enzima. Esto parece ser debido a la acción despolimerizante de estos compuestos, aunque, como es lógico, actúan como buenos protectores de los grupos  $-SH$  de la proteína enzimática. Los experimentos de velocidad de sedimentación dan valores de  $S_{20}$  de 19, 28 y 36 s. Los compuestos antes citados convierten estos tres picos en uno solo de 19 s. Esto se interpreta en el sentido de que la ureasa en solución tiende a la formación de dímeros y trimeros por establecimiento de puentes disulfuro intermoleculares, que serían rotos por la acción del 2-mercaptoetanol.

Nosotros hemos empleado el etilmercaptano, tanto en preparaciones de semillas de sandía como bacterianas, a concentraciones de 0,14 M, obteniendo resultados hasta diez veces superiores a los obtenidos por Mamiya y Gorin para la misma concentración de 2-mercaptoetanol.

### 3.3.1. *Preparación de polvos acetónicos y extractos libres de células.*

Las células se cultivaban en tubos de turbidimetría con el medio basal líquido descrito en métodos y suplementado con urea  $40 \cdot 10^{-3}$  M. Se incubaban durante cuatro horas a 37° y se centrifugaban a 3 500 rpm durante veinte minutos. Las células así recogidas se lavaban tres veces con suficiente cantidad de tampón fosfato 0,001 M de pH 7,7, y dos veces con etilmercaptano 0,14 M en acetona pura. Los polvos acetónicos así preparados se secaban a vacío y se ponían en extracción en tampón fosfato 0,001 M de pH 7,7. La cantidad de proteína utilizada para los ensayos de actividad específica fue de 15  $\mu g/ml$ .

La suspensión de polvos acetónicos se centrifugaban a 6.500 rpm durante veinte minutos. El sobrenadante se almacenaba a 0° y al sedimento se le añadía igual cantidad del mismo tampón. Se agitaba

muy suavemente durante cinco minutos y se volvía a centrifugar. El sobrenadante de esta centrifugación se mezclaba con el anterior y se añadía tampón hasta tener aproximadamente 2 mg de proteína/ml.

### 3.3.2. Cromatografía sobre DEAE-celulosa.

Fracciones de 9 ml del extracto libre de células se pasaban por una columna de DEAE-celulosa equilibrada con tampón fosfato 0,001 M de pH 7,7. Las dimensiones de la columna eran de 8 cm de altura por 1 cm de Ø. Toda la proteína activa queda retenida por la celulosa. La ureasa no comienza a ser eluida hasta que han pasado por la columna tres veces su volumen de eluyente. La mayor actividad específica corresponde a la fracción eluida con  $\text{Cl}^-$  0,35 M en el mismo tampón en que está equilibrada la columna, como se ve en la figura 14.

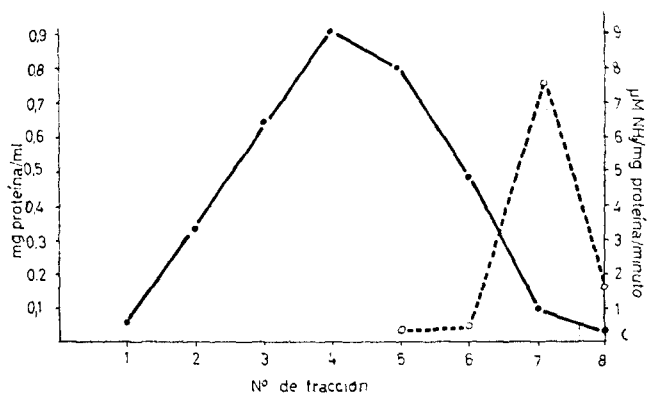


Fig. 14.—Cromatografía en DEAE-celulosa del extracto libre de células. ●—● mg proteína/ml; ○—○  $\mu\text{M NH}_3/\text{mg proteína/minuto}$ .

### 3.3.3. Cromatografía de adsorción sobre gel de fosfato cálcico.

Las fracciones 7 y 8, eluidas de la columna de celulosa, correspondientes a concentraciones de  $\text{Cl}^-$  0,35 y 0,40 M, respectivamente, se dializan durante tres cuartos de hora frente a dos litros de tampón fosfato 0,001 M de pH 6,9. La diálisis se realiza a 4° y con agitación. Al dializado se le añade gel de fosfato cálcico equilibrado con el mismo tampón en la proporción de 75 mg por mg de protei-

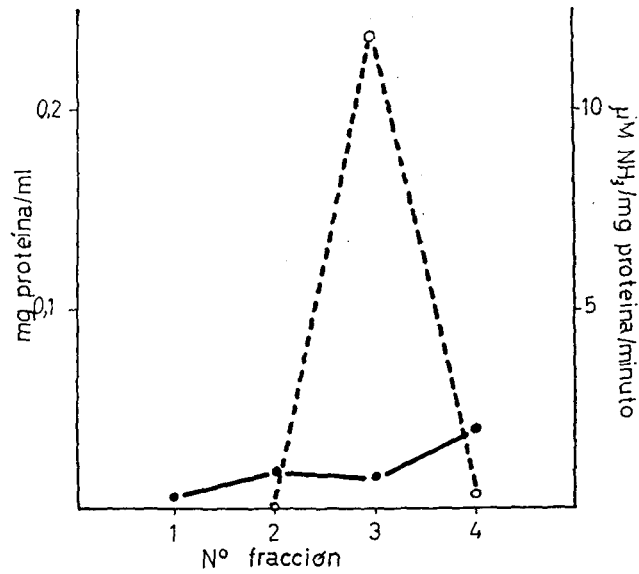


Fig. 15.—Cromatografía sobre gel de fosfato cálcico de las fracciones 7 y 8 de la cromatografía sobre DEAE.celulosa. ● —● mg proteína/ml; ○ —○  $\mu\text{M NH}_3/\text{mg proteína/minuto}$ .

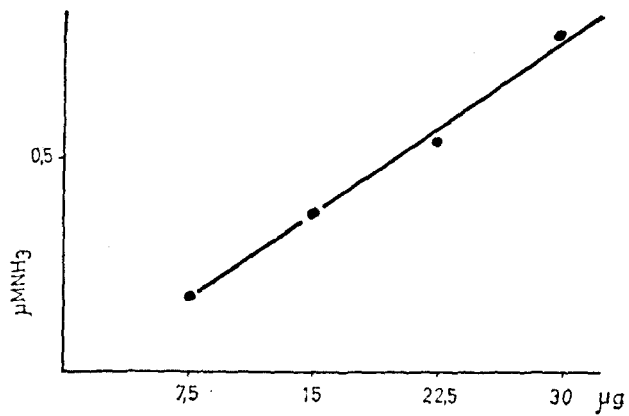


Fig. 16.—Actividad de la ureasa de *P. mirabilis* en función de la cantidad de protena. Las condiciones experimentales fueron las del ensayo standard.



na. A esta concentración, toda la proteína activa queda retenida en el gel centrifugado a 2.500 rpm durante cinco minutos. Las eluciones se realizan con concentraciones crecientes de tampón al mismo pH. La mayor parte, casi la totalidad, de la actividad ureásica correspondía a la fracción eluida con tampón fosfato 0,05 M.

La ureasa, al cabo de estos pasos, se encuentra purificada 120 veces con relación al extracto crudo.

### 3.3.4. *Influencia de la concentración del enzima.*

Manteniendo constante la concentración de sustrato, se ha ensayado el efecto de la cantidad de enzima sobre la velocidad de reacción. Según indicaciones de Wall y Laidler (66, 67), para bajas concentraciones de enzima, con las que, según estos autores, incrementa más rápidamente la actividad, la velocidad de reacción guarda una relación lineal con la concentración de ureasa, según se demuestra en la figura 16.

T A B L A V

*Purificación de ureasa de Proteus mirabilis*

FRACCION	mg proteína totales	Actividad específica	Actividad total	Recuperación %
Extracto crudo ... ..	97,20	0,10	9,72	100
Extracto libre de células ... ..	20,00	0,30	6,00	61,7
Fracciones 7-8 DEAE-celulosa.	0,99	4,50	4,45	45,7
Fracción 3 de gel de fosfato cálcico ... ..	0,15	12,00	1,80	18,5

La actividad específica viene dada en  $\mu\text{M NH}_3/\text{mg proteína}/\text{minuto}$ .

### 3.3.5. *Influencia de la concentración de sustrato.*

Se han realizado ensayos para determinar la variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. La recta resultante de enfrentar inverso de concentración con inverso de velocidad, se ha hecho para 20  $\mu\text{g}$  de enzima, ya que este dato se necesitaba para el estudio de las inhibiciones por análogos estructu-

rales de la urea. Para estos estudios se aumentó la concentración de enzima, ya que la N-formilurea se ha revelado como fuerte inhibidor, frente al cual las velocidades de reacción para 15  $\mu$ g de proteína casi no eran mensurables por nuestro método. Estos datos se dan en la figura 17.

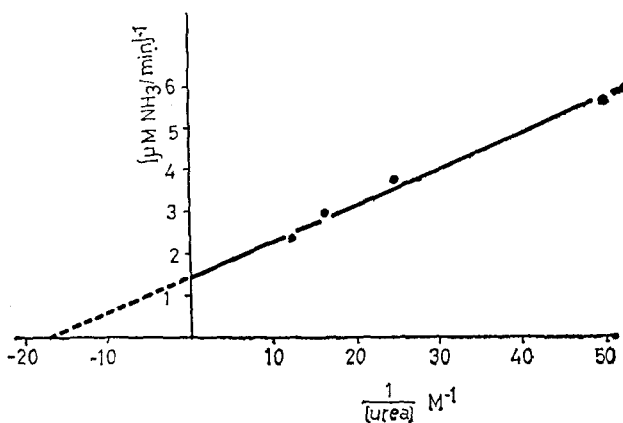
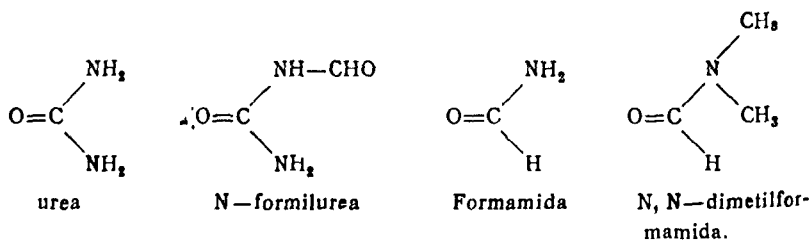


Fig. 17.—Representación inversa de la influencia de la concentración de urea sobre la actividad de la ureasa de *P. mirabilis*. Las condiciones experimentales son las del ensayo standard.

### 3.4. Inhibidores

Los compuestos ensayados como sustratos de inducción distintos de la urea han sido N-formil-urea, formamida y N,N-dimetilformamida, que presentan marcada analogía estructural con el sustrato de la ureasa:



por lo que se pensó que podrían actuar de alguna forma con la ureasa, bien sea como posibles sustratos, bien como inhibidores.

### 3.41. Existencia de la inhibición.

Demostramos la existencia de inhibición de la ureasa por los tres análogos estructurales de la urea haciendo actuar concentraciones crecientes sobre 20  $\mu$ g de enzima y determinando después la velocidad de reacción frente a una concentración conocida de sustrato. A los 20  $\mu$ g de enzima se les añadía, en experiencias separadas, 20, 40, 60 y 80  $\mu$ M del presunto inhibidor. Se incubaba durante cinco minutos a 37° en unidades Conway, al cabo de los cuales se añadían 40  $\mu$ M de urea. Se dejaba actuar al enzima en tiempos crecientes y se paraba la reacción enzimática con carbonato potásico a saturación, tal y como se describe en Métodos. Tomando como 0 % de inhibición la velocidad de reacción en ausencia de los tres análogos, se cons-

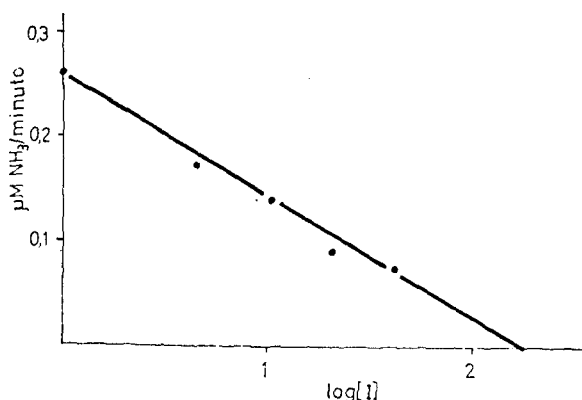


Fig. 18.—Inhibición de ureasa por N-formilurea. En un volumen final de 3 ml se mezclaron 40  $\mu$ M de urea, 20  $\mu$ g de enzima y molaridades crecientes de inhibidor. Enzima e inhibidor se incuban durante cinco minutos a 37° antes de la adición del sustrato.

truyeron gráficas en las que se enfrentaban velocidades de reacción y logaritmos de las concentraciones de inhibidor, de tal manera que la gráfica fuera, en todos los casos, una recta. Los resultados se dan en las figuras 18, 19 y 20. Por este método se determinó la concentración de los tres inhibidores, que daba el 50 % de inhibición y que eran  $25,7 \cdot 10^{-3}$  M para la formamida, y  $10,5 \cdot 10^{-3}$  M, tanto para la N-formilurea como para la N,N-dimetilformamida.

Aumentando el tiempo de incubación de enzima + inhibidor, se

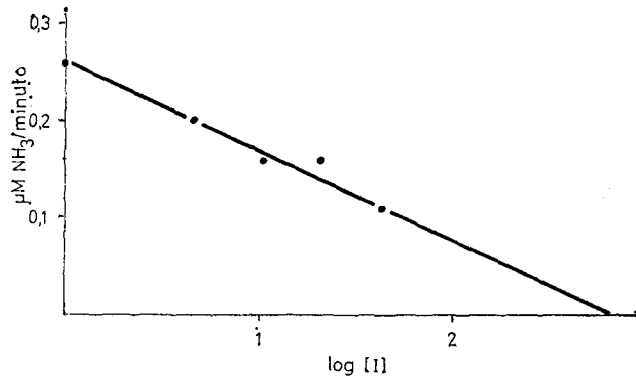


Fig. 19.—Inhibición de ureasa por formamida. En un volumen final de 3 ml se mezclaron 40  $\mu$ M de urea, 20  $\mu$ g de enzima y molaridades crecientes de inhibidor. Enzima e inhibidor se incubaban durante cinco minutos a 37° antes de la adición de sustrato.

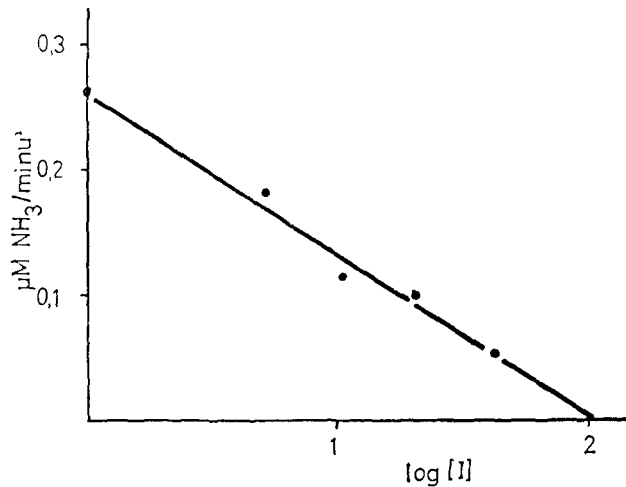


Fig. 20.—Inhibición de ureasa por N,N-dimetilformamida. En un volumen final de 3 ml se mezclaron 40  $\mu$ M de urea, 20  $\mu$ g de enzima y molaridades crecientes de inhibidor. Enzima e inhibidor se incubaban durante cinco minutos a 37° antes de la adición de sustrato.

vio que en todos los casos crecía el porcentaje de inhibición. Los controles en los que se hacía actuar únicamente enzima + inhibidor, nunca dieron desprendimiento de amoníaco detectable por nuestro método.

### 3.4.2. *Cinética de la inhibición.*

Una vez escogida la concentración de los tres inhibidores, que daba un 50 % de inhibición, se estudió el efecto de esta concentración en presencia de concentraciones crecientes de sustrato (20, 40, 60 y  $80 \cdot 10^{-3}$  M). Halladas las velocidades de reacción correspondientes, se hicieron gráficas en las que se enfrentaban inversos de velocidad de reacción ( $\mu\text{M NH}_3/\text{minuto}$ ) $^{-1}$  a inversos de concentraciones de sustrato  $1/(\text{urea}) \text{ M}^{-1}$ . En los tres casos, la recta resultante coincidía lógicamente, cortando a la recta recíproca sin inhibidor en la parte negativa del eje de las X. Esto demostraba que la inhibición era no competitiva.

Una inhibición del mismo tipo ha sido dada por Gale para la hidroxíurea (22), y por Kleczkowski y Dabrowska (24) para la fenilurea y D-fenilalanina.

### 3.4.3. *Irreversibilidad de la inhibición.*

Era interesante estudiar si esta inhibición de tipo no competitivo era reversible o irreversible. Para ello se incubaron enzima e inhibidor en la proporción de 20  $\mu\text{M}$  de inhibidor por cada 20  $\mu\text{g}$  de enzima en tubos tapados durante media hora a 37°. Al cabo de este tiempo, la mezcla se dializó durante veinticuatro horas, con agitación, frente a dos litros de tampón fosfato 0,001 M de pH 7,7. El baño de diálisis fue cambiado cinco veces. La temperatura, durante todo el proceso, fue de 4°.

A las veinticuatro horas, el producto de diálisis se hizo reaccionar con 40  $\mu\text{M}$  de urea en unidades Conway. Los resultados se dan en la tabla VI. En los tres casos se mantiene casi idéntico el porcentaje de inhibición, lo que demuestra concluyentemente la irreversibilidad de la inhibición por N-formilurea, formamida y N,N-dimetilformamida.

No se ha insistido más en estudios cinéticos de estas inhibiciones

que serán continuados con más detalle, ya que nuestro interés primordial estaba centrado en demostrar que, en ningún caso, existía una reacción enzimática que tuviera como sustrato cualquiera de los tres compuestos. Con esto el estudio de la inducción por los análogos estructurales quedaba completado.

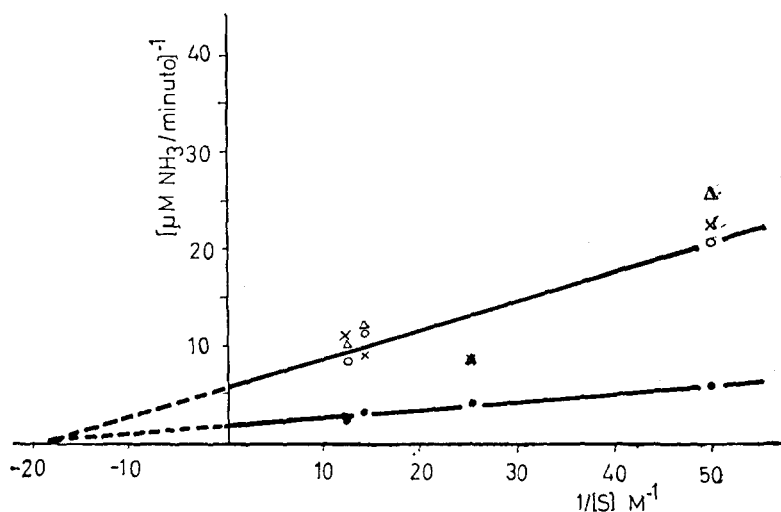


Fig. 21.—Inhibición no competitiva de la ureasa por ○—○ N-formilurea, △—△ formamida y ×—× N,N-dimetilformamida. La concentración de inhibidor utilizada era la que da el 50 % de inhibición. La cantidad de enzima era de 20  $\mu$ g. y el volumen final, de 3 ml.

TABLA VI

*Irreversibilidad de las inhibiciones por N-formilurea, formamida  
N,N-dimetilformamida*

	$\mu$ M $\text{NH}_3$ /minuto	% Inhibición
E no dializado ... ..	0,26	—
E dializado ... ..	0,20	0
E + N-formilurea no dializado... ..	0,09	55
E + N-formilurea dializado ... ..	0,10	50
E + formamida no dializado ... ..	0,16	20
E + formamida dializado... ..	0,15	25
E + N,N-dimetilformamida no dializado... ..	0,10	50
E + N,N-dimetilformamida dializado ... ..	0,10	50

### 3.5. *Influencia de las fuentes de carbono en el proceso de inducción*

Se ha demostrado que la ureasa es biosintetizada por *P. mirabilis* en presencia de urea. De Turk (25), en sus experimentos con *Ps. aeruginosa*, había concluido que la energía producida por oxidación del succinato era utilizada para la biosíntesis del enzima. Esto nos llevó a investigar la acción de diversas fuentes de carbono en el proceso de inducción de ureasa.

#### 3.5.1. *Discusión del método de ensayo.*

Magaña-Plaza y Ruiz-Herrera (35) estudiaron la influencia de ciertas fuentes de carbono sobre *P. rettgeri* empleando células enteras. El método seguido y adoptado por nosotros es el siguiente:

Las células se hacían crecer durante cuatro horas en tubos de turbidimetría, se centrifugaban y se lavaban con agua bidestilada ( $\text{pH} \approx 6,9$ ) y acto seguido se resuspendían en suficiente cantidad de este agua a la que se añadían 0,1 volúmenes de toluol, de tal manera que la concentración final fuera de 1 mg de peso seco/ml. Se agitaban fuertemente durante veinte minutos a  $37^\circ$  y se añadían diferentes volúmenes a  $40 \mu\text{M}$  de urea, de tal manera que el volumen final de reacción fuera de 3 ml. En esta mezcla de reacción se medía la variación de pH en el tiempo.

El método está basado en la alcalinización progresiva de esta mezcla, debida a la producción de amoníaco a partir de la urea por acción enzimática. Sin embargo, el análisis de la reacción se lleva a cabo usando un sistema de dos fases, lo cual debe influir también en el proceso de inducción (68). El inconveniente se elude por tratamiento con toluol, cuyo efecto, según estos autores, es el de abolir la permeabilidad celular, con lo cual la urea puede entrar libremente en las células, o la ureasa salir, lo que nos daría un sistema teóricamente de una sola fase.

En la figura 22 se muestran los resultados de este planteamiento. Las células tratadas con toluol muestran una mayor efectividad de hidrólisis de la urea ( $v = 0,61 \Delta\text{pH}/\text{minuto}$ ) que aquellas que no han sido tratadas ( $v = 0,12 \Delta\text{pH}/\text{minuto}$ ). Un control realizado sin urea nos da la seguridad de que no hay alcalinización por causas ajenas a la reacción enzimática.

El método ha sido utilizado en todos los experimentos que se refieren a continuación. Se podía oponer a esto el que se debía haber mantenido el mismo criterio de experimentación que en el estudio de la cinética de la inducción. Una razón nos ha movido a adoptar en este caso el criterio de variación de pH y es que ha sido utilizado para medir la influencia de fuentes de carbono sobre el mecanismo de la inducción en *P. rettgeri*. El trabajar nosotros con otra especie de *Proteus* y el utilizar algunas de las fuentes de carbono usadas para *P. rettgeri*, nos hicieron adoptar el mismo método, con lo cual nuestros datos serán más fácilmente comparables.

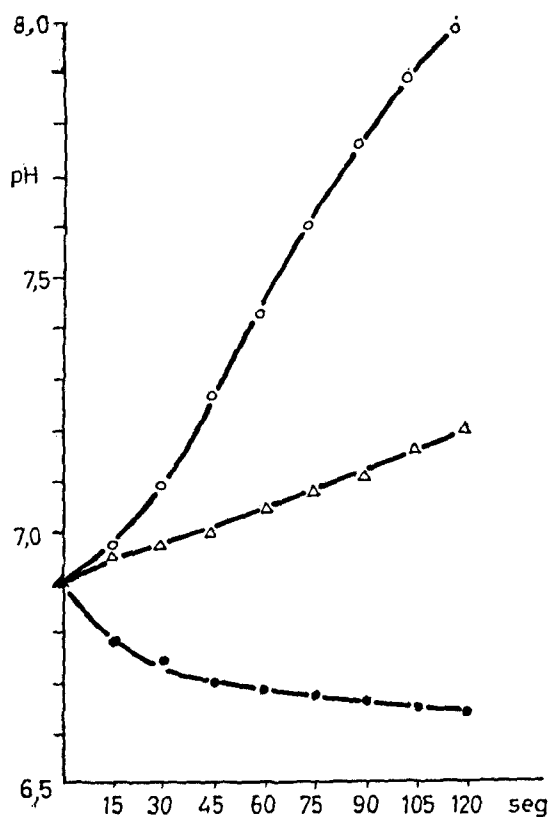


Fig. 22.—Efecto del toluol sobre la actividad ureásica de *Proteus mirabilis*. ○—○, células tratadas con toluol; ●—●, células tratadas con toluol sin urea; △—△, células sin tratar con toluol. Las condiciones experimentales se describen en el texto.



### 3.5.2. Los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Manteniendo el período de cuatro horas de inducción, se cultivaron células en medio basal, en el que el glicerol era sustituido como fuente de carbono por metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs. La concentración de estos metabolitos era la misma que la del glicerol.

Suponemos que en las células la síntesis de sus proteínas estará relacionada con la disponibilidad de nutrientes y con la energía de que dispongan. El añadir metabolitos exógenos que se pueden incluir en los procesos oxidativos celulares nos daría diferentes rendimientos en los niveles de proteína activa.

En la tabla VII se dan los resultados para succinato,, acetato, citrato, malato, fumarato,  $\alpha$ -cetoglutarato y cis-oxalacetato.

TABLA VII

*Influencia de intermediarios del TCA sobre inducción de ureasa*

FUENTE DE CARBONO	Actividad específica (1)
Succinato ... ..	0,48
Acetato... ..	0,32
Fumarato ... ..	0,07
L-malato ... ..	0,10
Citrato... ..	0,15
$\alpha$ cetoglutarato... ..	0,07
Cis-oxalacetato ... ..	0,03

(1) La actividad específica viene dada en  $\Delta$  pH/mg peso seco/minuto

Se ha utilizado el concepto de  $\Delta$  pH/mg de células como medida de la cantidad de ureasa presente en la fracción total de proteínas de la célula. De entre ellos, el succinato es el que demuestra mayor rendimiento, lo que está de acuerdo con los resultados de de Turk para *Ps. aeruginosa*. Sin embargo, el mismo metabolito muestra mucha menor efectividad en cuanto a crecimiento de la población bacte-

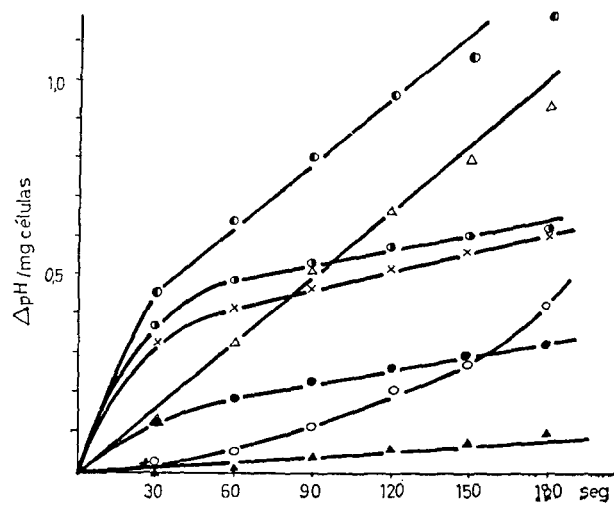


Fig. 23.—Influencia de  $\bigcirc$ — $\bigcirc$  succinato;  $\bullet$ — $\bullet$  fumarato;  $\bullet$ — $\bullet$   $\alpha$ -cetoglutarato;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$  cis-oxalacetato;  $\triangle$ — $\triangle$  acetato;  $\bigcirc$ — $\bigcirc$  citrato;  $\times$ — $\times$  L-malato sobre la velocidad de síntesis de ureasa en *Proteus mirabilis*. Las condiciones experimentales se describen en el texto.

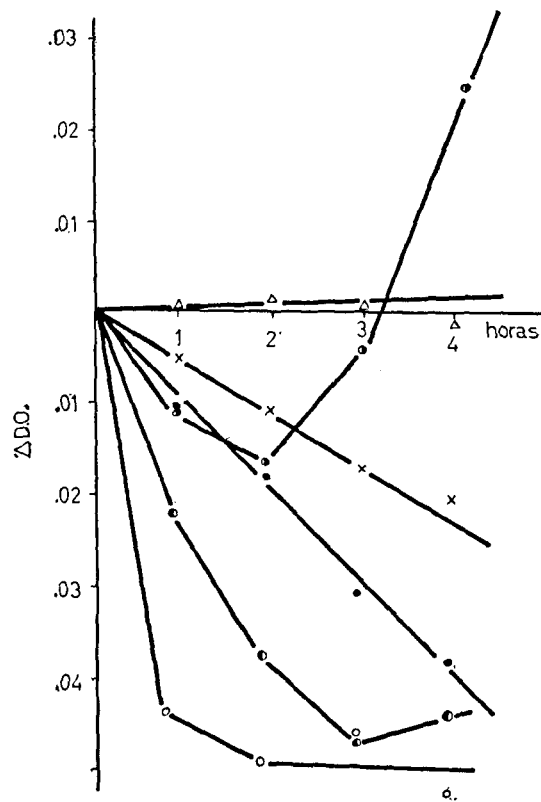


Fig. 24.—Influencia de los intermediarios del TCA en el crecimiento de *P. mirabilis*. La clave de puntos para cada uno de los intermediarios se da en la figura 23.

riana se refiere. En el extremo contrario, el fumarato muestra uno de los menores rendimientos en cuanto a síntesis del enzima activo, mientras que, en el período de cuatro horas, el cultivo ha entrado en fase exponencial de crecimiento.

Es curioso observar, que tanto el fumarato como el  $\alpha$ -cetoglutarato, relacionados con incorporación directa de amoníaco para dar aminoácidos, son los que menos rendimiento dan, junto con exalacetato, en cuanto a síntesis de ureasa se refiere.

### 3.5.3. Otras fuentes de carbono.

Además del glicerol y los intermediarios ya estudiados del ciclo de Krebs, se ha investigado el efecto de la glucosa y el lactato sobre la síntesis del enzima.

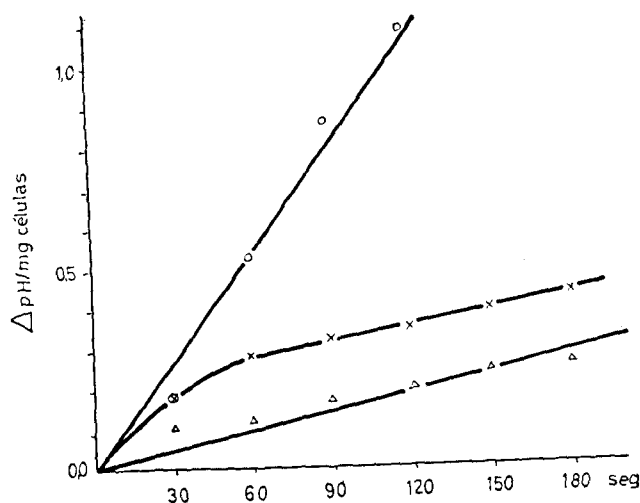


Fig. 25. — Influencia de ○—○ glicerol; x—x lactato y △—△ glucosa sobre la velocidad de biosíntesis de ureasa en *P. mirabilis*. Las condiciones experimentales vienen dadas en el texto.

La glucosa se muestra como un magnífico sustrato de crecimiento. Los incrementos de densidad óptica observados durante las cuatro horas de inducción eran realmente notables en comparación con los medidos para el resto de las fuentes de carbono ensayadas. Por el contrario, el lactato se muestra como mal sustrato de crecimiento,

ya que, durante el período de cuatro horas, la población bacteriana permanece en fase de latencia.

La velocidad de síntesis de ureasa es en ambos casos disminuida, especialmente en células que crecen en presencia de lactato.

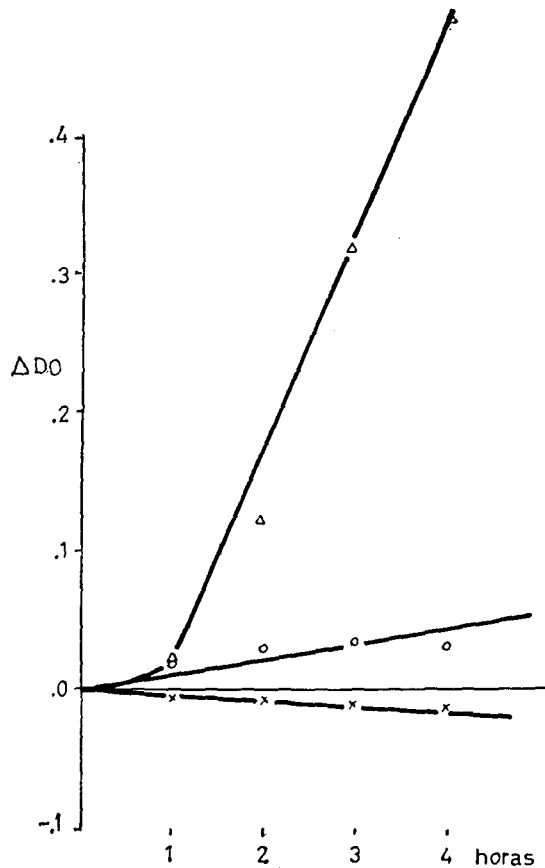


Fig. 26.—Influencia de  $\circ$ — $\circ$  glicerol;  $\times$ — $\times$  lactato, y  $\Delta$ — $\Delta$  glucosa en el crecimiento de *P. mirabilis*.

La hipótesis de que la glucosa se comportaba como represor de la síntesis del enzima se trata en el siguiente apartado.

La cinética de la velocidad de reacción de la ureasa producida por células que crecían en presencia de succinato, fumarato y malato principalmente, comporta factores anormales que han sido observados

también en el caso de células que crecen en presencia de lactato y que serán discutidos más adelante.

La dependencia de la biosíntesis de ureasa en *P. mirabilis* de las fuentes de carbono utilizadas se da en las figuras 23 y 25. La variación del crecimiento de las poblaciones bacterianas que crecen en estas fuentes se da en las figuras 24 y 26.

En la figura 26 se observa el hecho de que células que crecen en glicerol muestran un crecimiento activo ya en la primera hora de inducción. Esto parecería estar en desacuerdo con lo enunciado en el párrafo 3.1.1. Sin embargo, en el caso que nos ocupa, se partía de células con un nivel de ureasa positivo, mientras que en el anterior se partía de células con nivel de ureasa nulo. Esto parece indicar que el enzima tiene un efecto de aprovechamiento de la urea exógena para la síntesis de componentes celulares, aprovechamiento que sería más rápido en células que ya contienen el enzima.

TABLA VIII

*Influencia de fuentes de carbono sobre inducción de ureasa*

FUENTE DE CARBONO	Actividad específica (1)
Glicerol ... ..	0.61
Glucosa ... ..	0.05
Lactato ... ..	0.03

(1) La actividad específica viene dada en  $\Delta$  pH/mg peso seco/minuto.

#### 3.4.5. Represión por glucosa.

El hecho de ser la glucosa represora de la síntesis de gran cantidad de enzimas inducibles, nos obligó a plantear experimentos para tratar de demostrar la misma propiedad con la ureasa *P. mirabilis*.

Para ello se partió de un cultivo con nivel de ureasa conocido. De este cultivo se sembraron inóculos en dos tipos de medio sólido, uno con glicerol como fuente de carbono y otro con glucosa.

Los cultivos se mantuvieron veinticuatro horas en estufa a 37°. De estos cultivos se hicieron las siguientes siembras:

- 1) De inóculo en glicerol a medio líquido con glicerol.
- 2) » » » » » » » » glucosa.
- 3) » » » glucosa » » » » glicerol.
- 4) » » » » » » » » glucosa.

Como se ve en la figura 27, la mayor velocidad de síntesis de enzima corresponde al experimento 1) y la menor al experimento 4), mientras que en los experimentos 2) y 3) las velocidades eran intermedias. En el experimento 2), las bacterias en el momento de

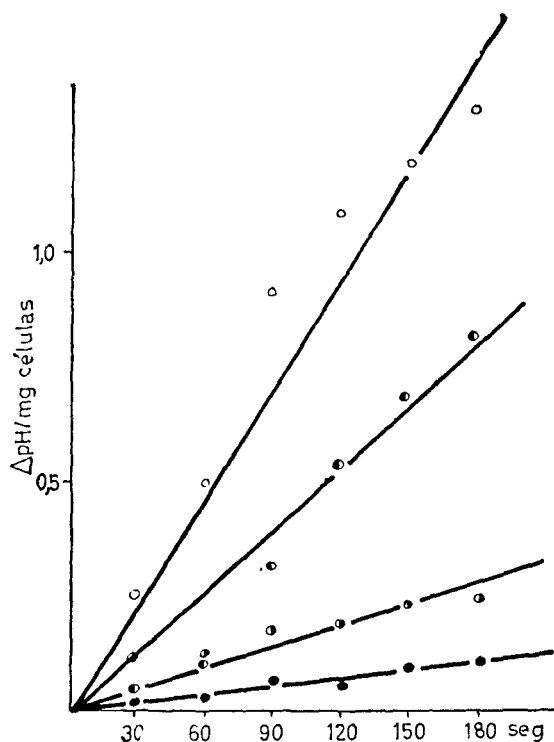


Fig. 27.—Represión por glucosa de la biosíntesis de ureasa en *P. mirabilis*. ○—○ de inóculo en glicerol a medio con glicerol; ●—● de inóculo en glicerol a medio con glucosa; ○—○ de inóculo en glucosa a medio con glicerol; ●—● de inóculo en glucosa a medio con glucosa.

ser traspasadas a medio con glucosa, tenían teóricamente el mismo nivel de ureasa que las del experimento 1). Sin embargo, en las cuatro horas en las que se mantiene creciendo en medio con glucosa, ésta se acumula rápidamente dentro de la célula. Si el tiempo de generación de *P. mirabilis* en glucosa es algo mayor que dos horas, en cuatro horas habría de dos a tres generaciones, lo que, si es la glucosa represora, diluiría el nivel del enzima a uno comprendido entre el 30 y 50 % respecto al del experimento 1).

En el experimento 3) el nivel de ureasa es mayor que en el 2), ya que las bacterias, de un nivel rebajado de ureasa, fruto de su crecimiento en medio sólido con glucosa, por efecto de su crecimiento durante cuatro horas en un medio sin glucosa y que, además, favorece la inducción, elevaría el nivel de enzima.

Esta interpretación nos parece concluyente. La glucosa o un producto de catabolismo, lo cual será discutido más adelante, reprime la síntesis de enzima en presencia de su inductor.

#### 4. DISCUSIÓN

El trabajo experimental de este tesis comenzó investigando la presencia de ureasa en semillas existentes en la colección de nuestro laboratorio. Partimos de los trabajos de Damodaran *et al.* (59), encontrando actividad ureásica en semillas de sandía (*Citrullus vulgaris*) y en gran cantidad de otras cucurbitáceas: las variedades *ovifera*, *verrucosa* y *microcarpa* de *Cucurbita pepo*, *Citrullus colocynthis*, *Luffa acutangula*, *Lagenaria vulgaris* y *Momordica balsamina*; en frondes de helechos: *Asplenium nidum* y *Nephrolepis exaltata*.

Fue interesante encontrar, asimismo, actividad ureásica en semillas, hojas e inflorescencias jóvenes de una leguminosa, *Wistaria sinensis*, sobre la cual no hemos encontrado ninguna cita bibliográfica anterior.

Los experimentos sobre germinación de semillas nos dieron resultados interesantes. La presencia de urea en el medio retardaba la germinación, pero, sin embargo, se notaba un sensible aumento de la actividad ureásica de los cotiledones. Este hecho fue el que nos decidió a tratar de investigar el efecto de la urea sobre organismos vivos más manejables: las bacterias.

Hemos demostrado ya que el enzima aparece en una población de *Proteus mirabilis* solamente cuando una determinada sustancia

está presente en el medio de cultivo: urea o sus análogos citados en el apartado 3.2.

Según nuestros métodos, cultivos cuyo nivel de ureasa es nulo incrementan su contenido en enzima manteniendo constante el peso seco de la población, su contenido total de proteínas y la densidad óptica de las muestras. Esto parece indicar que la síntesis de ureasa en presencia de urea va en detrimento de la síntesis de otras proteínas. Esto, indiscutiblemente, no es un caso único. Sin embargo, los resultados para *Proteus rettgeri* son otros, ya que, según Magaña-Plaza y Ruiz-Herrera (35), la ureasa se comporta en todo momento como una fracción constante del contenido total de proteínas.

En nuestro caso, la variación en la concentración del inductor tampoco nos da aumento de proteínas totales.

Con respecto a los análogos de urea como inductores, se aprecia crecimiento en todos los casos con un aumento correlativo en proteínas totales. Pero esto no desmiente nuestras observaciones para la urea, ya que, en estos casos, la mayor actividad ureásica siempre corresponde al menor crecimiento. Un caso ejemplar sería el ya citado de la formamida, a concentración de  $20 \cdot 10^{-3}$  M, para la cual la actividad enzimática es máxima ( $1,2 \mu\text{M NH}_3/\text{mg proteína/minuto}$ ), siendo el crecimiento negativo.

La purificación del enzima se ha llevado a cabo por procedimientos casi exclusivamente cromatográficos. Las precipitaciones con acetona o sulfato amónico han sido evitadas sistemáticamente, ya que, en nuestros ensayos, los incrementos de actividad observados por estos procedimientos eran mínimos y no justificaban su utilización.

Se ha tomado como control para determinar índices de purificación el extracto crudo por dos razones principales:

- 1) Por su significación como total de actividad ureásica de los cultivos utilizados.

- 2) Porque su comparación con el extracto libre de células nos daba una medida directa de la acción despolimerizante del etilmercaptano (tabla IX).

Esto estaría de acuerdo con Creeth y Nichol (65) y con Mamiya y Gorin (64) en el sentido de que, como consecuencia directa de la despolimerización, hay mayor solubilidad y, consecuentemente, mayor actividad.



Como pH óptimo se ha tomado 6,9, semejante al 7 encontrado. La temperatura óptima tomada fue la clásica de 37° (51).

El estudio de las inhibiciones de la ureasa por los tres análogos estructurales de la urea ensayados, N-formilurea, formamida y N,N-dimetilformamida, no han sido llevados hasta sus últimas consecuencias, ya que nuestro interés primordial era demostrar que, en ningún caso, se podían considerar como sustratos de reacción ureásica.

T A B L A I X

*Acción del etilmercaptano sobre la actividad ureásica*

T R A T A M I E N T O	Extracto crudo (1)	Extrato libre de células
Acetona ... ..	0,08	0,15
Acetona-etilmercaptano ... ..	0,10	0,30

(1) Las actividades de los extractos vienen medidas en  $\mu\text{M}$  de  $\text{NH}_3/\text{mg}$  proteína/minuto.

El estudio de la utilización de diferentes fuentes de carbono por *Proteus mirabilis* arroja luz sobre la posible utilidad de la ureasa para el microorganismo.

La urea siempre se ha considerado como medio de excreción de nitrógeno por animales.

Se conocen también casos de producción de urea por microorganismos: hongos como *Aspergillus nidulans* (69), por acción de la arginasa, o *Penicillium roqueforti* (70, 71), por acción del mismo enzima; bacterias como *E. coli* (72), como producto de la vía de síntesis de la putrescina.

Actualmente no conocemos que alguno de estos procesos pueda darse en *P. mirabilis*, aunque se sabe que este microorganismo posee completo el arsenal enzimático necesario para la síntesis de la arginina (73, 74). El problema podría ser enfocado desde el punto de vista del aprovechamiento de productos de hidrólisis de la urea.

Es obvio que la ureasa sólo se sintetiza en *P. mirabilis* en presencia de urea exógena (o alguno de sus análogos). Su aparición trae consigo la presencia en el medio de amoníaco y anhídrido carbónico. Hasta aquí su síntesis y las consecuencias de la reacción

que cataliza. ¿Cuál sería su finalidad? Desde este punto de vista, el amoníaco producido por la urea como producto de su hidrólisis enzimática es un compuesto altamente sugestivo. Infinidad de microorganismos lo utilizan mediante incorporación directa a cetoácidos para dar aminoácidos. El hecho de que, en *P. rettgeri*, este amoníaco ejerza represión sobre la síntesis de ureasa (35), parece indicar algo positivo en este sentido.

El amoníaco puede ser incorporado a  $\alpha$ -cetoglutarato para dar glutamato, a fumarato para dar aspartato o a piruvato para dar alanina. De los compuestos por nosotros ensayados, el  $\alpha$ -cetoglutarato da un nivel bajísimo de síntesis de ureasa, tan sólo superado por el cis-oxalacetato. ¿Está esto en contraposición con lo anterior? Aparentemente sí. Sin embargo, continuando esta línea de investigación, se ha demostrado en nuestro laboratorio que existe represión de biosíntesis de ureasa por L-glutamato en *P. mirabilis*. Mehta *et al.* demostraron lo mismo para *A. vinelandii* (33).

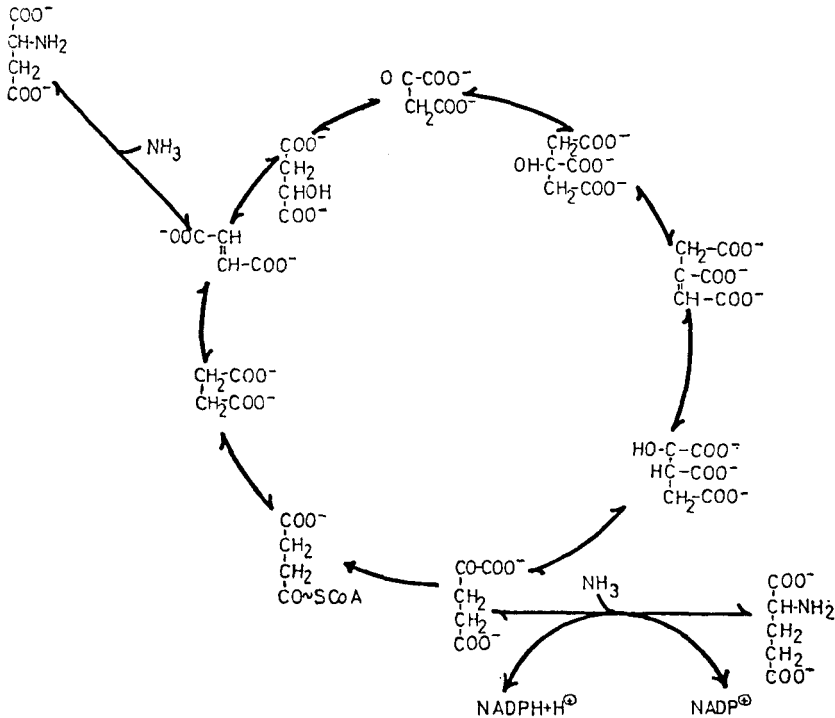
¿Fodría ser represión por producto final? Aún no lo sabemos. Pero de todas maneras, esto aportaría un dato positivo al problema de la incorporación del amoníaco procedente de la urea.

¿Por qué, entonces, el  $\alpha$ -cetoglutarato da tan baja efectividad en el proceso de inducción? Hay que resaltar el hecho de que son dos cetoácidos,  $\alpha$ -cetoglutarato y cis-oxalacetato, los menos efectivos. Clarke y Meadow (75) demuestran para *Pseudomonas aeruginosa* la existencia de permeasas específicas para los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Los periodos de inactividad de células enteras en oxidar los intermediarios suministrados por vía exógena son función directa del nivel de permeasa existente en la membrana. Mientras que los enzimas del ciclo muestran ser constitutivos, las permeasas específicas de los intermediarios estudiados por estos autores son inducibles por la presencia en el medio de su sustrato.

Esto explicaría que, en todos los casos, la velocidad de síntesis de ureasa sea más baja cuando las células utilizan como fuentes de carbono metabolitos del ciclo de Krebs en lugar de glicerol, si suponemos que *P. mirabilis* posee también un sistema de permeasas para estos metabolitos.

¿Por qué son precisamente dos cetoácidos los que menor rendimiento dan? Lardy, Paetkau y Walter (76), estudiando el papel de las mitocondrias en el suministro de precursores de fosfoenolpiru-

vato, demuestran que piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato y oxalacetato en el interior de la mitocondria no se mezclan con el «pool» de cetoácidos extramitocondriales, dada su imposibilidad para traspasar la doble membrana. Para estar sometidos a transporte deben sufrir primero una transaminación, con lo cual efectuarían su paso a través de la membrana bajo la forma de aminoácidos.



Quizá un proceso similar podría darse en nuestro caso, lo cual explicaría el bajo rendimiento de estos dos cetoácidos que hemos contrastado, aunque extrapolar de células eucarióticas a procarióticas resulta difícil en muchos casos.

El fumarato, precursor directo del aspartato, muestra en nuestros experimentos una baja actividad muy discutible.

La gráfica de actividad ureásica en función de este ácido presenta factores anormales que también se observan en el caso del lactato, succinato y L-malato, principalmente. Esta gráfica, en lugar de una recta, que correspondería a una reacción enzimática de orden

cero, es una parábola. Se podría concluir, a primera vista, que la urea desaparece en la mezcla de reacción tan rápidamente, que el enzima, a partir de los treinta segundos, no trabaja a saturación de sustrato. A esto se objeta inmediatamente que las condiciones experimentales eran las mismas en todos los casos.

En el período de los treinta primeros segundos, la actividad para el fumarato es alta, casi superponible en la gráfica con la correspondiente al L-malato, lo que estaría de acuerdo con la hipótesis del aprovechamiento del amoníaco. Sin embargo, a partir de estos treinta segundos, hay una brusca bajada de actividad. No hay razón ninguna para suponer que el enzima sintetizado sea distinto según las fuentes de carbono. La única posibilidad sería que el enzima formado haya sido labilizado por alguna circunstancia que aún nos es desconocida.

Los productos de la reacción de hidrólisis de la urea por la ureasa son dos. Y la presencia de amoníaco oscurece en gran manera el hecho de que existe producción de anhídrido carbónico. No hemos investigado nada a este respecto. Pero este producto tiene varias e interesantes vías de aprovechamiento, algunas de ellas (si se demostrara actividad piruvato carboxilásica en *P. mirabilis*) (77, 78) directamente relacionadas con la glucosa.

Si se acepta que la glucosa o, más probablemente, un metabolito relacionado con ella, ejerce represión sobre la biosíntesis de ureasa, el aprovechamiento del anhídrido carbónico producido nos abriría caminos nuevos en los mecanismos de regulación metabólica de la bacteria por nosotros estudiada.

También hay que hacer notar que la glucosa, en ciertos casos, se comporta como una buena fuente de glutamato (79, 80). No sabemos si éste es el caso de *P. mirabilis*, pero de nuevo se nos propone otra magnífica hipótesis de trabajo.

Al tratar de resumir nuestro trabajo, queda una fuerte evidencia de que lo realizado sólo es una mínima parte frente a la labor que queda por realizar. La ureasa sólo se sintetiza en una bacteria en presencia de un inductor. En el caso de que el inductor sea su propio sustrato, la consecuencia inmediata es la aparición y, quizá, ulterior aprovechamiento del amoníaco y anhídrido carbónico. Uno de los productos para otra especie de *Proteus* ha demostrado ser represor de la biosíntesis del enzima. Por nuestra parte, hemos demostrado que un aminoácido, L-glutamato, que podría ser producto del aprovechamiento por la bacteria del amoníaco, ejerce también

acción represora. Hasta aquí lo realizado. Demostrar la validez de nuestras hipótesis de utilización de los productos de reacción ureásica, investigación detallada de los mecanismos de control, demostración en la bacteria por nosotros estudiada de los enzimas relacionados con los procesos que hemos esbozado, tratar de encontrar los verdaderos represores es el trabajo futuro.

### 5. CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado inducción de biosíntesis de ureasa en *Proteus mirabilis* en presencia de urea. La síntesis del enzima parece realizarse en detrimento de otras proteínas bacterianas.

2. La inducción también se da en presencia de otros compuestos relacionados con la urea, pero que no son sustratos del enzima. La inducción parece ser no tan específica como en el caso anterior, ya que la síntesis del enzima va acompañada de crecimiento de la población bacteriana.

3. Se ha purificado el enzima 120 veces por método casi exclusivamente cromatográficos. La velocidad de hidrólisis de la urea aumenta progresivamente, en relación lineal, con el aumento de la cantidad de proteína enzimáticamente activa.

4. Las sustancias que se han revelado como inductores de la biosíntesis de ureasa, y que son análogos estructurales de la urea, inhiben el enzima *in vitro* de forma no competitiva e irreversible. En ningún caso han mostrado ser hidrolizadas por acción enzimática.

5. Se ha demostrado que la síntesis del enzima es reprimida por la presencia de glucosa en el medio. Se cree, con fundamento, que esta represión no es consecuencia directa de la misma glucosa, sino de algunas sustancias relacionadas, o cuya síntesis es favorecida, por la presencia de glucosa.

6. Se ha demostrado que la velocidad de síntesis del enzima es función de la presencia de otra fuente de carbono exógena de que la bacteria dispone y que esta velocidad debe estar también en función del posible aprovechamiento de los productos de reacción ureásica por la bacteria.

\* \* \*

Agradecemos a la casa Pfizer la ayuda económica recibida, que nos permitió la puesta a punto de las técnicas de valoración de urea y ureasa, y a la Fundación Juan March, que nos subvencionó con una beca durante la realización de este trabajo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) JAVILLIER, M., POLONOVSKI, M., FLORKIN, M., BOULANGER, P., LEMOIGNE, M., ROCHE, J. y WURNISIER, R.: *Traité de Biochimie Générale*, t. II, fasc. II, pág. 438, Mason et Cie, Paris, 1964.
- (2) SUMNER, J. B.: *The isolation and crystallization of enzyme urease*. «J. Biol. Chem.», 69, 435, 1926.
- (3) KHALEQUE, K. A., MUZZAM, M. G. e ISPAHANI, P.: *A simple method for the use of water melon urease in the estimation of blood urea*. «J. clin. Path.», 17, 97, 1964.
- (4) CORTINA, P.: *Ureogénesis experimental en condiciones normales y patológicas*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, Valencia, 1964.
- (5) GUO, M. M. S. y LIU, P. V.: *Serological specificities of ureases of Proteus species*. «J. gen. Microbiol.», 38, 417, 1965.
- (6) STEWART, D. J.: *The urease activity of fluorescens Pseudomonads*. «J. gen. Microbiol.», 41, 169, 1965.
- (7) BRAUDE, A. I. y SIEMIENSKI, J.: *Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis*. «J. Bact.», 80, 171, 1960.
- (8) SHEPARD, M. C., LUNCEFORD, C. D.: *Occurrence of urease in T strains of Mycoplasma*. «J. Bact.», 93, 1531, 1967.
- (9) BROOKS, M. E. y EPPS, H. B. G.: *Taxonomic studies of the genus Clostridium, Clostridium bifementans and Clostridium sordellii*. «J. gen. Microbiol.», 21, 144, 1958.
- (10) WHITE, E. C. y HILL, J. H.: *Bacterial urease*. «J. Urol.», 45, 744, 1941.
- (11) HENDERSON, A.: *The urease activity of Acinetobacter lwoffii and A. anitratus*. «J. gen. Microbiol.», 46, 399, 1967.
- (12) BUSTINZA, F.: *Urea y ureasa en los seres vivos*. «Res. Cient. Soc. Esp. Hist. Nat.», 6, 113, 1931.
- (13) WERNER, E. A., citado en SUMNER, J. B. y SOMERS, G. F.: *Chemistry and methods of enzymes*. 2.<sup>a</sup> edición, pág. 156, Academic Press, New York, 1947.
- (14) SHAW, W. H. R. y KITIAKOWSKY, G. B.: «J. Am. Chem. Soc.», 72, 2817, 1950.
- (15) FISHBEIN, W. N., WINTER, T. S. y DAVIDSON, J. D.: *Urease catalysis. I. Stoichiometry, specificity and kinetics of a second substrate: hydroxyurea*. «J. Bio. Chem.», 240, 2402, 1965.

- (16) SUMNER, J. B.: *The recrystallization of urease*. «J. Biol. Chem.», 70, 97, 1926.
- (17) — — y HAND, D. B.: *Crystalline urease*. «J. Biol. Chem.», 76, 149, 1928.
- (18) — — GRALEN, N. y ERICKSON, H.: *The molecular weight of urease*. «J. Biol. Chem.», 125, 37, 1938.
- (19) — — Urease. En COLOWIK, S. P. y KAPLAN, N. O., ed.: *Methods in enzymology*. Vol. II, pág. 378, Academic Press, New York, 1955.
- (20) — — y SOMERS, G. F.: *Chemistry and methods of enzymes*. 2.<sup>a</sup> ed., pág. 17, Academic Press, New York, 1947.
- (21) GORIN, G. y CHIN, C. C.: *Urease IV. Reaction with N-ethylmaleimide and with silver ion*. «Biochim. Biophys. Acta», 99, 418, 1965.
- (22) GALE, G. R.: *Inhibition of urease by hydroxyurea*. «Biochem. Pharm.», 14, 693, 1965.
- (23) FISHBEIN, W. N. y CARBONE, P. P.: *Urease catalysis. II. Inhibition of enzyme by hydroxyurea, hydroxylamine and acethydroxamic acid*. «J. Biol. Chem.», 240, 2407, 1965.
- (24) KLECKOWSKI, K. y DABROWSKA, M.: *Inhibition of urease by phenylurca and D-phenylalanine*. «Bull. Acad. Pol. Sc.», 16, 267, 1968.
- (25) DE TURK, W. E.: *The adaptative formation of urease by washed suspensions of Pseudomonas aeruginosa*. «J. Bact.», 70, 187, 1955.
- (26) SCHWARTZ, H. M.: *The rumen metabolism of non-protein nitrogen*. En Briggs, M. H. ed.: *Urea as a protein supplement*, pág. 55, Pergamon Press, Oxford, 1967.
- (27) RAHMAN, S. A. y DECKER, P.: *Comparative study of the urease in the rumen wall and rumen content*. «Nature», 209, 618, 1966.
- (28) DELLUVA, A. M., MARKLEY, K. y DAVIES, R. E.: *The absence of gastric urease in germ-free animals*. «Biochim. Biophys. Acta», 151, 646, 1968.
- (29) FARLIN, S. D., BROWN, R. E. y GARRIGUS, U. S.: *In vivo metabolism of biuret and urea by sheep*. «J. Anim. Sc.», 27, 771, 1968.
- (30) JONES, G. A.: *Ureolytic rumen bacteria*. En Briggs, M. H. ed.: *Urea as a protein supplement*, pág. 114, Pergamon Press, Oxford, 1967.
- (31) SOEJIMA, M., SUGAWARA, K. y SHIMURA, K.: Citados en Briggs, M. H.: *Urea as a protein supplement*, pág. 114, Pergamon Press, Oxford, 1967.
- (32) ROTMAN, B. y SPIEGELMAN, S.: *On the origin of the carbon in the induced synthesis of  $\beta$ -galactosidase in Escherichia coli*. «J. Bact.», 68, 419, 1954.

- (33) MEHTA, S. L., NAIK, M. S. y DAS, N. B.: *Induced synthesis of urease in Azotobacter vinelandii*. «Ind. J. Biochem.», 4, 194, 1967.
- (34) UMBARGER, H. E.: *The integration of metabolic pathways*. «Ann. Rev. Plant. Physiol.», 14, 19, 1963.
- (35) MAGAÑA-PLAZA, I. y RUIZ-HERRERA, J.: *Mechanisms of regulation of urease biosynthesis in Proteus rettgeri*. «J. Bact.», 93, 1294, 1967.
- (36) COHEN, G.: *Le métabolisme cellulaire et sa régulation*, pág. 19. Hermann, Paris, 1967.
- (37) MCFALL, E. y MANDELSTAM, J.: *Specific metabolic repression of three induced enzymes in Escherichia coli*. «Biochem. J.», 89, 391, 1963.
- (38) NAKADA, D. y MAGASANIK, B.: *The roles of inducer and catabolite repressor in the synthesis of  $\beta$ -galactosidase by Escherichia coli*. «J. Mol. Biol.», 8, 105, 1964.
- (39) HIERHOLZER, G. y HOLZER, H.: «Biochem. Z.», 339, 175, 1963.
- (40) JACOB, F. y MONOD, J.: *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of protein*. «J. Mol. Biol.», 3, 318, 1961.
- (41) JONES, H. E. y PARK, R. W. A.: *The influence of medium composition on the growth and swarming of Proteus*. «J. gen. Microbiol.», 47, 369, 1967.
- (42) RALLO, A.: *Iniciación al estudio de la actividad antibiótica del L-usnato sódico frente a Sarcina lutea y Proteus mirabilis por método turbidométrico*. Tesina de licenciatura. Madrid, 1967. Sin publicar.
- (43) BAILLY, M., FONTY, P. y LEGER, N.: *Le dosage de l'urée dans les liquides biologiques a l'aide du p-diméthylaminobenzaldéhyde*. «Ann. Biol. clin.», 25, 10-12, 1221-1232, 1967.
- (44) SIEST, G. y VIGNERON, C.: *Etude du dosage de l'urée et de la citrulline en milieu protéique. Méthode manuelle et automatique à la diacetylmonoxime*. «Clin. Chim. Acta», 20, 373, 1968.
- (45) HOGG, M. L.: *Methods for the estimation of urea in foods*. en BRIGGS, M. H. ed.: *Urea as a protein supplement*, página 455, Pergamon Press, Oxford, 1967.
- (46) CHIN, C. C. y GORIN, G.: *Urease VII, Some observations on the assay method of Sumner*. «Anal. Biochem.», 17, 60, 1966.
- (47) GORIN, G. y CHIN, C. C.: *Urease VI. A new method of assay and the specific enzymic activity*. «Anal. Biochem.», 17, 49, 1966.
- (48) KALTAWASSER, H. y SCHLEGEL, H. G.: *NADH-dependent coupled enzyme assay for the urease and other ammonia-producing systems*. «Anal. Biochem.», 16, 132, 1966.
- (49) SKUJINS, J. J. y McLAREN, A. D.: *Enzyme reaction rates at limited water activities*. «Science», 158, 1569, 1967.



- (50) COOK, A. R.: *Urea as sole source of nitrogen for plant growth. II. Urease and the metabolism of urea in Spirodela oligorrhiza*. «Planta», 83, 13, 1968.
- (51) CONWAY, E. J.: *Microdiffusion analysis and volumetric error*. Crosby Lock wood, London, 1957.
- (52) *Standard Methods*, American Public Health Association Inc. New York, 1955.
- (53) LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. «J. Biol. Chem.», 193, 265, 1951.
- (54) TISELIUS *et al.*: citados en LEGGET BAILEY, J.: *Techniques in protein chemistry*, pág. 278, Elsevier Publishing Co. Amsterdam, 1967.
- (55) SEUBERT, W. y REMBERGER, U.: «Biochem. Z.», 334, 401, 1961.
- (56) FERNÁNDEZ, O. y PIZARROSO, A.: *Fermentos de las semillas oleaginosas (ureasas)*. Asoc. Esp. Prog. Ciencias. Congr. Sevilla, mayo 1917.
- (57) NEILANDS, J. B. y STUMP, P. K.: *Outlines of enzyme chemistry*. Traducción española con el título de *Principios de enzimología*, pág. 60, Aguilar, Madrid, 1967.
- (58) SUMNER, J. B.: *The chemical nature of enzymes*. «J. Wash. Acad. Sc.», 38, 113, 1948.
- (59) DAMODARAN, M. y SIVARAMAKRISHNAN, P. M.: *New sources of urease for determination of urea*. «Biochem. J.», 31, 1041, 1937.
- (60) HANABUSA, K.: *High-yield crystallization of urease from jack bean*. «Nature», 189, 551, 1961.
- (61) LARSON, A. D. y KALLIO, R. E.: *Purification and properties of bacterial urease*. «J. Bact.», 68, 67, 1954.
- (62) FRANKLIN, A. E. y QUASTEL, J. H.: *Paper chromatography of protein and enzymes*. «Science», 110, 447, 1949.
- (63) SHADAKSHARASWAMY, M. y HILL, R. M.: *Fractionation of urease on CM-cellulose*. «Arch. Biochem. Biophys.», 97, 607, 1962.
- (64) MAMIYA, G. y GORIN, G.: *Some observation on the procedure for isolation of urease*. «Biochim. Biophys. Acta.», 105, 382, 1965.
- (65) CREETH, J. M. y NICHOL, L. W.: *Evidence for the chemical interaction of urease in solution*. «Biochem. J.», 77, 230, 1960.
- (66) WALL, M. C. y LAIDLER, K. J.: *The molecular kinetics of the urea-urease system. IV. The reaction in a inert buffer*. «Arch. Biochem. Biophys.», 43, 299, 1953.
- (67) WALL, M. C. y LAIDLER, K. J.: *The molecular kinetics of urea-urease system. V. Relationship between activity and concentration of urease solution*. «Arch. Biochem. Biophys.», 43, 307, 1953.

- (68) SOLS, A.: *Regulation of carbohydrate transport and metabolism in yeast*. En MILLS, A. K. ed.: *Aspects in yeast metabolism*, pág. 47, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1968.
- (69) PIOTROWSKA, M., SAWICKI, M. y WEGLENSKI, P.: *Mutants of the arginine-proline pathway in Aspergillus nidulans*. «J. gen. Microbiol.», 55, 301, 1969.
- (70) BRUNEL, A., BRUNEL-CAPELLE, G. y MIQUEL, A.: *Biosynthèse induite de la L-arginine-uréohydrolase (arginase), de la  $\gamma$ -guanidinobutyrique-uréohydrolase et de la guanidinoacétique-uréohydrolase (glycocyaminase) chez Penicillium roqueforti*. «C. R. Acad. Sc. Paris», 264, 2777, 1967.
- (71) BRUNEL-CAPELLE, G., BRUNEL, A. y MIQUEL, A.: *Biosynthèse induite de la L-arginine-uréohydrolase (arginase) chez Penicillium roqueforti en fonction de la croissance. Influence de Pion  $Mn^{++}$* . «C. R. Acad. Sc. Paris», 265, 1297, 1967.
- (72) MORRIS, D. R. y KORFRON, K. L.: *Urea production and putrescine biosynthesis in Escherichia coli*. «J. Bact.», 94, 1516, 1967.
- (73) PROZESKY, O. W.: *Arginine synthesis in Proteus mirabilis*. «J. gen. Microbiol.», 49, 325, 1967.
- (74) PROZESKY, O. W.: *Regulation of the arginine pathway in Proteus mirabilis*. «J. gen. Microbiol.», 55, 89, 1969.
- (75) CLARKE, P. H. y MEADOW, P. M.: *Evidence for the occurrence of permeases for tricarboxylic acid cycle intermediates in Pseudomonas aeruginosa*. «J. gen. Microbiol.», 20, 144, 1959.
- (76) LARDY, H. A., PAETKAU, V. y WALTER, P.: *The role of mitochondria in supplying precursors of phosphoenolpyruvate*. «Proc. Nat. Acad. Sc.», 53, 1410, 1965.
- (77) RUIZ-AMIL, M., TORRONTGUI, G., PALACIAN, E., CATALINA, L. y LOSADA M.: *Properties and function of yeast pyruvate carboxylase*. «J. Biol. Chem.», 240, 3485, 1965.
- (78) FERNÁNDEZ, M. J., MEDRANO, L., RUIZ-AMIL, M. y LOSADA, M.: *Regulation and function of pyruvate kinase and malate enzyme in yeast*. «European J. Biochem.», 3, 11, 1967.
- (79) BARKER, H. A.: *Structure and function of cobamide coenzymes*. «Fed. Proc.», 20, 956, 1961.
- (80) SEBEK, O. K. y BARKER, H. A.: *Metabolism of  $\beta$ -methyl-aspartate by a Pseudomonad*. «J. Bact.», 96, 2094, 1968.