

REDUCCIÓN BACTERIANA DE CROMO HEXAVALENTE: MECANISMOS Y APLICACIONES*

Martha I. Ramírez-Díaz¹, Héctor Riveros-Rosas², Jesús Campos-García¹ y Carlos Cervantes¹

RESUMEN

El amplio uso industrial de los derivados del cromo, un metal pesado, ha ocasionado que estos compuestos sean considerados como serios contaminantes ambientales. En la naturaleza, el cromo se encuentra principalmente en dos estados de oxidación: la forma trivalente Cr (III), que es relativamente inocua, y la forma hexavalente Cr (VI), considerada una especie tóxica. El Cr (III) a nivel extracelular es relativamente inocuo debido a su insolubilidad. En contraste, en el interior de la célula el Cr (III) es altamente tóxico debido a su capacidad para unirse al DNA y a las proteínas. El Cr (VI) usualmente se encuentra como iones cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), los cuales atraviesan fácilmente la membrana plasmática al ser capturados erróneamente por el sistema de transporte de sulfato. En el ambiente, el Cr (VI) puede ser reducido a Cr (III), ya sea de manera abiótica o mediante enzimas llamadas cromato reductasas. El estudio de estas enzimas ha adquirido gran interés por su posible uso en la biorremediación de la contaminación por cromato. Varias cromato reductasas han sido identificadas en diversas especies bacterianas. La cromato reductasa mejor caracterizada es la enzima ChrR de la bacteria gram negativa *Pseudomonas putida*, que pertenece a la familia de flavoproteínas reductasas dependientes de NAD(P)H. Esta familia actualmente posee 243 proteínas homólogas a ChrR que unen al cofactor FMN y que se encuentran ampliamente distribuidas en los tres dominios de la vida. En este trabajo se resumen las propiedades de los sistemas bacterianos de reducción de Cr (VI) como un mecanismo empleado por los microorganismos para contrarrestar los efectos tóxicos del cromo y sus derivados.

PALABRAS CLAVE: reducción de cromato, familia de flavoproteínas reductasas dependientes de NAD(P)H, biorremediación.

ABSTRACT

Bacterial reduction of hexavalent chromium: mechanisms and applications.

The broad industrial use of derivatives of chromium, a heavy metal, has caused that these compounds are regarded as serious environmental contaminants. In nature, chromium is found primarily in two oxidation states: the trivalent form Cr (III), which is relatively innocuous, and the hexavalent form Cr (VI), considered a more toxic species. At the extracellular level, Cr (III) is relatively harmless because of its insolubility. In contrast, inside the cell Cr (III) is highly toxic because of its ability to bind to DNA and proteins. Cr (VI) is usually found as chromate (CrO_4^{2-}) or dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) ions, which easily cross the plasmatic membrane to be mistakenly taken up arrested by the sulfate transport systems. In the environment, Cr (VI) can be reduced to Cr (III), either by abiotic ways or by enzymes called chromate reductases. The study of these enzymes has gained great interest for their potential use in bioremediation of pollution by chromate. Several chromate reductases have been identified in different bacterial species. The best characterized chromate reductase is the ChrR enzyme from the gram-negative bacteria *Pseudomonas putida*, which belongs to the family of NAD(P)H dependent flavoprotein reductases. This family currently includes 243 ChrR homologous proteins that bind the FMN cofactor and that are widely distributed in the three domains of life. This paper summarizes the properties of bacterial systems that reduce Cr (VI) as a mechanism used by microorganisms to resist the toxic effects of chromium and its derivatives.

KEY WORDS: Chromate reduction, family of NAD(P)H dependent flavoprotein reductases, bioremediation.

*Recibido: 11 de noviembre de 2008 Aceptado: 16 de junio de 2009

¹Instituto de investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana, Morelia, Michoacán; ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; D.F., México. Enviar correspondencia a: Martha I. Ramírez-Díaz. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B-3, Ciudad Universitaria. 58030, Morelia, Mich., México. Telefono/fax: +52 (443) 326-5788. Correo E: marthaisela_ramirez@hotmail.com

1. Generalidades del cromo

1.1 Cromo en el ambiente

El cromo (Cr) es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica, con un número atómico de 24 y un peso atómico de 51.996. El Cr es el séptimo elemento más abundante sobre la tierra y normalmente se localiza en rocas, suelos, plantas, animales y emisiones volcánicas. Se ha estimado que la presencia de Cr en la atmósfera de países de Europa y América es de 0.001 a 1.1 ppb; en fertilizantes fosfatados de 66 a 245 ppm y en polvos residuales de incineraciones municipales de 490 ppm (1). La concentración de Cr en aguas intercontinentales no contaminadas es de 0.1 a 0.5 ppm, mientras que en aguas negras, municipales y residenciales oscila entre 0.1 a 36 mg/cápita/día (1). Así, se ha establecido que la toxicidad del Cr (como cromato de potasio) en humanos es de 0.5 a 1 g por vía oral (1).

Aunque el Cr existe en estados de oxidación que van de -2 a +6, las formas más estables y abundantes son las especies trivalente Cr (III) y hexavalente Cr (VI). El Cr (VI) comúnmente está presente en solución formando los oxianiones hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), dependiendo del pH. El Cr (VI) existe en forma de anión soluble en agua, el cual puede persistir en este ambiente por largos períodos y es considerado como un contaminante importante por el Departamento de Energía de sitios de desecho de EUA (2). Por otra parte, los derivados del Cr (III) son menos móviles y principalmente existen en el ambiente formando complejos estables con ligandos orgánicos o inorgánicos (3). En el año 2000 se procesaron aproximadamente 15 millones de toneladas de cromita (FeCr_2O_4), de las cuales cerca de un 70% se empleó para producir aleaciones metálicas; por ejemplo, para obtener ferrocromo (una

aleación de cromo, hierro y carbono). Otra parte (aproximadamente 15%) se empleó directamente como material refractario y el resto se utilizó en la industria química para obtener diferentes compuestos de cromo. Así, el amplio uso del Cr en diversos procesos industriales ha convertido a este metal en un serio contaminante del aire, suelo y agua (4).

1.2 Transporte del cromo

En diversas especies bacterianas se ha demostrado que el Cr (VI) en forma de cromato entra activamente a las células a través del sistema de transporte del sulfato (Fig. 1A). La analogía química entre el cromato y el sulfato ha sido enfatizada por el hecho de que el cromato es un inhibidor competitivo del transporte del sulfato en todas las especies bacterianas que han sido estudiadas (4). En contraste, el Cr (III) atraviesa las membranas con muy baja eficiencia debido a que forma compuestos insolubles en soluciones acuosas no ácidas (Fig. 1B).

1.3. Toxicidad del cromo

Los efectos tóxicos del Cr dependen de su estado de oxidación (5). A nivel extracelular, el Cr (VI) es altamente tóxico para la mayoría de las bacterias ya que es transportado activamente al citoplasma, mientras que el Cr (III) es relativamente inofensivo debido a su insolubilidad e incapacidad de atravesar las membranas celulares (5). En el interior de la célula, la toxicidad del Cr se relaciona principalmente con el proceso de reducción del Cr (VI) a estados de oxidación inferiores [como Cr (V) y Cr (III)] (Fig. 1C). Este proceso puede ocasionar la formación de radicales libres, generando estrés oxidativo (Fig. 1D) y en consecuencia diversos efectos tóxicos en el DNA, lípidos y en las proteínas (Fig. 1E y 1F). Se considera que el daño oxidativo al DNA es responsable de los efectos genotóxicos causados por

el cromato (6). La exposición ocupacional al cromato se postula como un serio problema toxicológico, pues se ha demostrado que el Cr (VI) es un agente potencialmente carcinógeno en humanos (7).

2. Reducción del cromato

Se ha descrito que bajo ciertas condiciones ambientales, el Cr puede ser interconvertido a Cr (III) y Cr (VI) a través de reacciones de óxido-reducción de naturaleza biótica o abiótica. La reducción del Cr (VI) puede ocurrir bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas y puede estar asociada a la fracción soluble o a la membrana celular (8). Por consiguiente, la reducción extracelular o periplasmática de Cr (VI) a Cr (III), que genera un compuesto impermeable y no tóxico a nivel extracelular, puede ser considerada como un mecanismo de resistencia a cromato (8). En bacterias, los mecanismos de resistencia a cromato pueden ser codificados por genes plasmídicos o cromosómicos (4). Los sistemas de resistencia codificados en el cromosoma se han relacionado generalmente con la reducción extracelular del Cr (VI) a Cr (III), tanto por enzimas específicas como no específicas (5).

2.1. Reducción enzimática del cromato

La reducción del cromato se ha descrito en diversas especies bacterianas, aunque sólo unas pocas enzimas han sido caracterizadas (5). Ishibashi y col. (9) sugirieron que las Cr (VI) reductasas pueden tener un papel primario diferente a la reducción de Cr (VI) y que esta segunda función adquirida de las Cr (VI) reductasas puede relacionarse con el reciente incremento del Cr (VI) en el ambiente como consecuencia de actividades antropogénicas. Así, varias Cr (VI) reductasas han sido caracterizadas en el contexto de sustratos alternos; es-

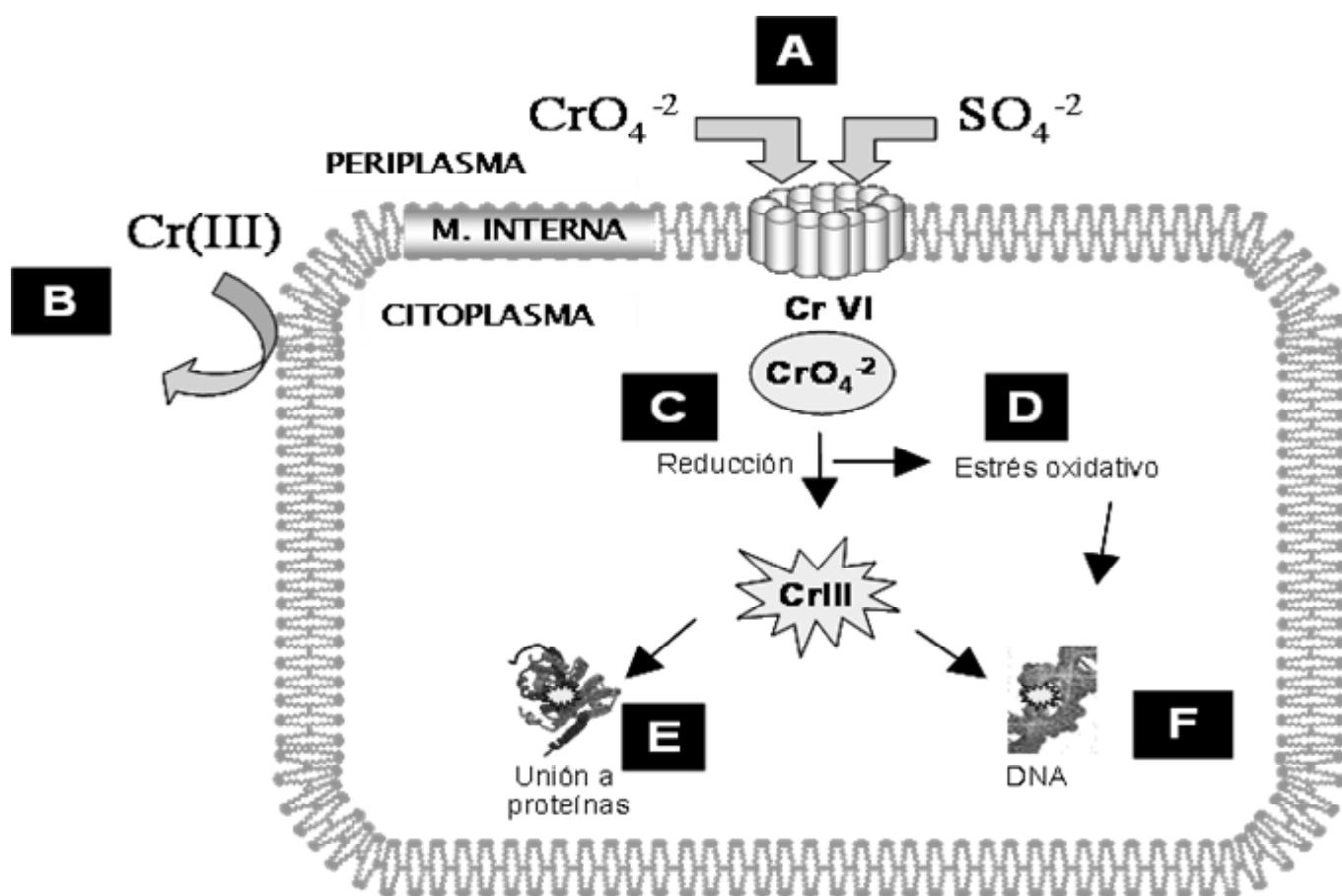


Figura 1. Transporte y toxicidad del cromato en la célula bacteriana. A) Captación del Cr (VI) [CrO_4^{2-}] a través del sistema de transporte del sulfato (SO_4^{2-}). B) Las membranas biológicas son impermeables al Cr (III), por lo que éste resulta inocuo extracelularmente. C) Reducción intracelular de Cr (VI) a Cr (III). D) Estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la reducción de Cr (VI). E) Daño ocasionado por la interacción del Cr (III) con las proteínas o F) con el DNA. Modificado de Ramírez-Díaz y col. (2).

tas enzimas frecuentemente muestran actividad de NADH:flavín oxidoreductasas (8). Este es el caso de las nitrorreductasas NfsA/NfsB de la bacteria Gram negativa *Vibrio harveyi*, que presentan propiedades de nitrofurazona nitrorreductasa como función primaria y actividad de cromato reductasa como actividad secundaria, o la reductasa férrica FerB de *Paracoccus denitrificans* (una bacteria Gram negativa y oxidante de nitrógeno), que usa tanto Fe (III)-nitrilotriacetato como cromato como sustratos (5).

Actualmente la Cr (VI) reductasa más estudiada es la proteína ChrR de la bacteria Gram negativa *Pseudomonas putida*, una flavoenzima

soluble que une FMN (flavin mononucleótido) y cataliza la reducción de Cr (VI) a Cr (III) (10). Se ha propuesto que esta enzima se sitúa en el periplasma ya que de manera similar a proteínas con esta localización el residuo del extremo N-terminal no corresponde a metionina; su ubicación celular la hace atractiva para usos en biorremediación. ChrR funciona como un dímero de 50 kDa y muestra actividad de reductasa dependiente de NADH con una K_m de 260 μM para el cromato y una V_{max} de 8.8 nmol de cromato por $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína (11). Esta enzima multifuncional, además de su actividad de cromato reductasa, reduce al ferricianuro (11).

La enzima ChrR purificada presentó una actividad de quinona reductasa, generando flavin semiquinona durante la reducción de cromato; esta reacción transfiere más de 25% de los electrones del NADH al anión superóxido y probablemente produce especies transitorias de Cr (V), lo que minimiza que esta especie de cromo reaccione con H_2O_2 generando un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS). De esta manera, ChrR parece proveer de un mecanismo de defensa antioxidante a *P. putida* a través de la protección de las células del estrés ocasionado, por ejemplo, por H_2O_2 (12). De hecho, la expresión de ChrR se induce en células expuestas a H_2O_2 (10) o a cromato (11). En resumen,

ChrR en una ruta reduce Cr (VI) a Cr (III) generando el intermediario Cr (V) y el anión superóxido y por un mecanismo adicional reduce quinonas, protegiendo a las células de las especies reactivas de oxígeno (ERO).

ChrR contiene la secuencia LFVTPEYNXXXXXXLNAIDXXS, la cual puede estar involucrada en la unión con FMN encontrándose conservada en varios miembros de la familia COG0431 (grupo de proteínas ortólogas procarióticas) y KOG4530 (grupo de ortólogos eucarióticos) (8). Estas proteínas han sido agrupadas también en la familia FMN reductasas dependientes de NAD(P)H que a su vez forma parte del clan de las flavoproteínas, que incluye proteínas redox de unión a FMN o FAD (8).

La cromato reductasa YieF de la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* presenta homología con la enzima ChR de *P. putida* (11). YieF tiene un amplio rango de sustratos y puede reducir, además de cromato, al vanadio (V), molibdeno (VI), compuestos como ferrocianuro, varias quinonas, 2,6-dihidrocloroindolfenol y prodro-gas como mitomicina C y 5-aziridinil-2,4-dinitrobenzamida (11). El mecanismo de acción de YieF involucra la reducción del cromato por la transferencia obligada de cuatro electrones por cada dímero de proteína; de esta manera, la enzima transfiere simultáneamente tres electrones al Cr (VI) para producir Cr (III) y un electrón al oxígeno molecular generando ERO (11). Debido a la formación de una cantidad baja de ERO, YieF proporciona un mecanismo efectivo de protección contra cromato en *E. coli*. Otra enzima de *E. coli*, la flavín reductasa Fre, reduce cromato a través de una estrategia diferente que involucra la formación de un complejo de Cr (III) con el cofactor NAD (8). Esta interacción puede estar relacionada con la notoria capacidad del Cr (III) para formar aductos con el DNA.

En conclusión, la reducción de Cr (VI) parece ser una estrategia importante de resistencia a cromato en bacterias, aunque el uso de sustratos alternos, además del Cr (VI), sugiere que la actividad de reducción de este ión en los microorganismos es un mecanismo de adaptación enzimática ocasionada por la creciente exposición a cromato (5).

2.2. Familia de FMN reductasas dependientes de NAD(P)H

La familia de proteínas FMN reductasas dependientes de NAD(P)H (FMN_red) que incluye posibles ortólogos de ChrR, actualmente comprende al menos 243 proteínas homologas que unen al cofactor FMN (Fig. 2). Los miembros de este grupo están ampliamente distribuidos, sugiriendo un origen evolutivo muy antiguo para estas proteínas. El uso de NAD(P)H y la ausencia del radical flavín semiquinona distingue a estas proteínas de las flavodoxinas, que adoptan la misma forma estructural terciaria (8). La familia FMN_red puede dividirse en diez grupos principales, donde cada uno probablemente corresponde a diferentes subfamilias de proteínas (Fig. 2). Sólo tres de estos grupos incluyen proteínas caracterizadas y se les ha definido como subfamilias, de manera similar a como se han nombrado previamente otros grupos de proteínas (14).

La subfamilia I es el grupo más numeroso (73 secuencias homólogas) y está presente principalmente en proteobacterias. La proteína ChrR de *P. putida*, descrita anteriormente está incluida en esta subfamilia (8).

La subfamilia II, formada de 32 proteínas homologas, está presente en arqueas, bacterias (principalmente proteobacterias) y plantas (8). Tres proteínas de este grupo han sido caracterizadas: la proteína dimérica YieF de *E. coli*, descrita como la primera cromato reductasa soluble (11); la pro-

teína dimérica FMN reductasa de *P. aeruginosa* PAO1 (15); y la proteína tetramérica NAD(P)H:quinona reductasa (NQR) de la planta *Arabidopsis thaliana* (13).

La subfamilia III comprende nueve proteínas homologas, presentes en bacterias del grupo firmicutes, hongos y el moho mucilaginoso *Dictyostelium discoideum* (8). A esta subfamilia pertenecen dos proteínas caracterizadas: la azo reductasa de la bacteria Gram positiva *Bacillus sp.* OY1-2 (15) y la proteína dimérica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* YLR011wp (16). La proteína de *Bacillus* transforma azo colorantes (sustancias orgánicas que poseen nitrógeno unido a un anillo aromático) una reacción mediada por la actividad de reductasa del grupo azo en presencia de NAD(P)H (15). YLR011wp posee además una actividad reductora débil pero específica sobre azo colorantes y nitro compuestos, en adición a una fuerte actividad de ferricianuro reductasa (16).

En resumen, la capacidad multifuncional de los miembros de la familia FMN_red dependiente de NAD(P)H sugiere que la reducción de Cr (VI) no es la actividad principal de estas proteínas. Esto puede estar relacionado con el hecho de que el cromo está presente en la naturaleza principalmente como Cr (III) y de que la introducción de especies de Cr (VI) en el ambiente es un evento relativamente reciente (8).

3. Biorremediación de cromato

A diferencia de los herbicidas, los pesticidas y otros compuestos tóxicos que pueden degradarse biológicamente, los metales pesados como el Cr no pueden ser eliminados y permanecen en los suelos o sedimentos, donde se liberan lentamente al agua (1). La remoción de cromato de agua contaminada se ha realizado tradicionalmente a través de la reducción de Cr (VI) a Cr (III) por métodos químicos o

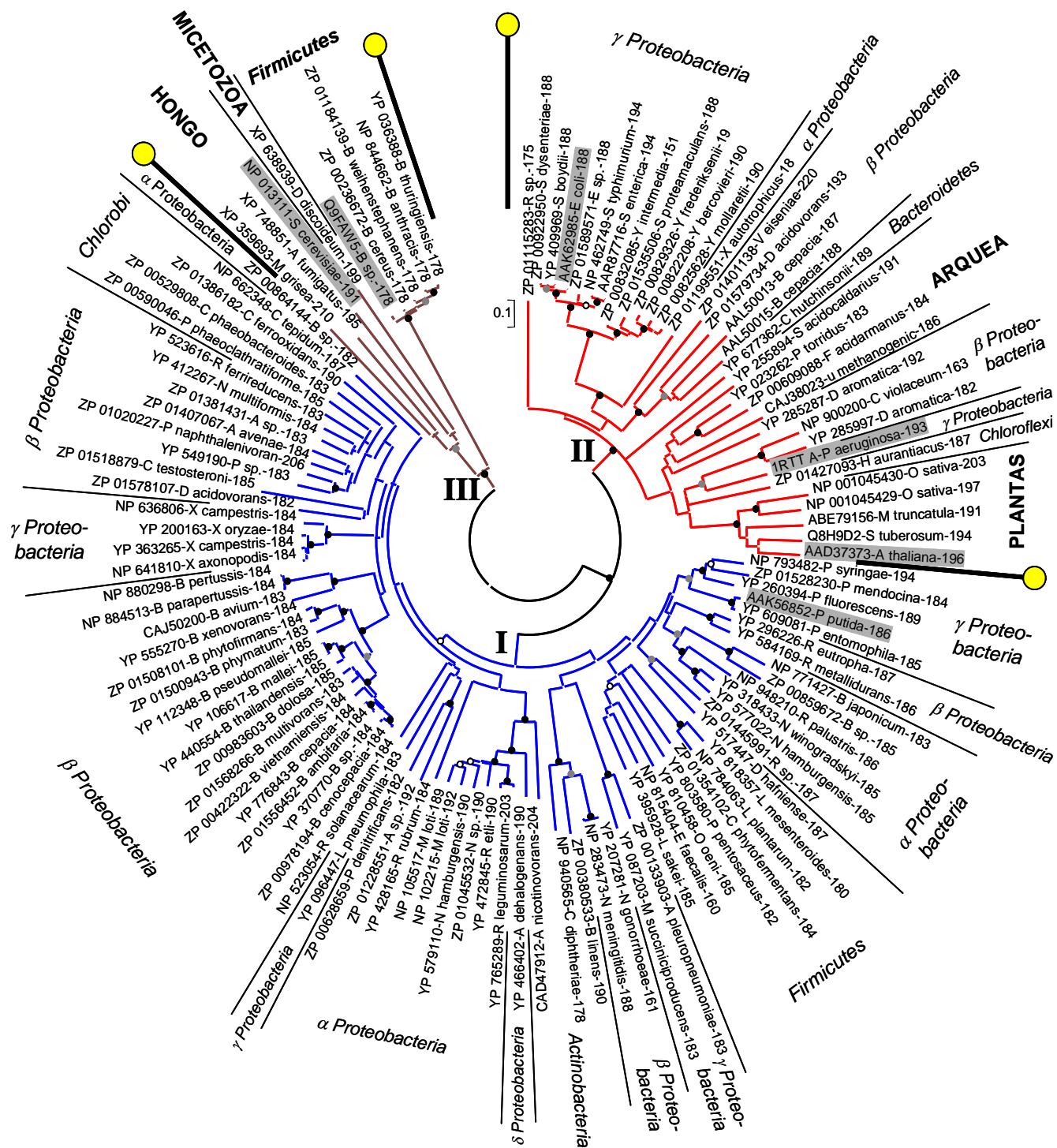


Figura 2. Análisis filogenético de la familia FMN reductasas dependientes de NAD(P)H (FMN_red). Se muestra un árbol consenso construido con el método de mínima evolución (ME). Se usaron secuencias de proteínas que pertenecen a las tres subfamilias que poseen al menos una proteína caracterizada (líneas sombreadas). El árbol fue calculado usando el programa MEGA 3.1. Se obtuvieron topologías similares usando los métodos de vecino más próximo (NJ), máxima parsimonia (MP) y promedio aritmético de los grupos de pares no ponderados (UPGMA). Se incluye el número de acceso de cada secuencia, la abreviatura del nombre de la especie y el tamaño de la proteína (número de residuos). Los límites de las subfamilias (I-III) se indican con líneas gruesas. Los puntos en las barras indican los nodos con >70% (abiertos), >80% (gris), o >90% (cerrado) del valor bootstrap derivado de 1,000 repeticiones de los árboles obtenidos simultáneamente con los métodos UPGMA, NJ, ME y MP.

bioquímicos, seguidos de la filtración/sedimentación. Sin embargo, la eliminación del cromato por estos métodos resulta costosa e ineficiente (1). A partir de que se ha encontrado que una gran cantidad de microorganismos aislados, tanto de sitios contaminados con cromato como de ecosistemas naturales no contaminados, con capacidad para reducir Cr(VI), estos organismos han sido propuestos como alternativas biotecnológicas para la biorremediación de la contaminación por cromato (4).

En este contexto, se han descrito microorganismos con potencial en biorremediación como la bacteria Gram negativa *Serratia marcescens*, aislada de un efluente terciario (aguas con desechos sólidos, líquidos o gaseosos), la cual es capaz de reducir Cr (VI) y remover cerca del 80% del cromato presente en el medio (15). Por otro lado, el desarrollo de cepas bacterianas con capacidad mejorada para la resistencia y reducción de Cr(VI) se ha considerado como una aproximación inicial para la biorremediación de cromato (16). En

este sentido, la proteína ChrR6, una mutante de la enzima ChrR generada por medio de evolución dirigida, mostró un marcado incremento en su capacidad de remediación de cromato. La proteína ChrR6 presentó parámetros cinéticos superiores para la reducción de cromato en todas las condiciones analizadas; reflejo de esto es el aumento de 300 veces en su eficacia catalítica (medida como el cociente k_{cat}/K_m). Así, se ha propuesto que esta enzima puede convertir a *E. coli* en una bacteria eficiente para la remediación de cromato (16).

En síntesis, es previsible en un futuro cercano, el uso de los microorganismos ya sea nativos o modificados genéticamente, para favorecer la remoción del Cr (VI) de ambientes contaminados.

Conclusiones

Los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos para combatir la toxicidad del cromato. Entre ellos se encuentra la reducción de cromato. Se ha reportado que muchas especies bacterianas reducen Cr (VI) a Cr (III);

sin embargo, las propiedades bioquímicas de las cromato reductasas han sido dilucidadas sólo para algunas enzimas. La amplia diversidad de estas enzimas, así como la multiplicidad de funciones que desarrollan, apoyan la hipótesis de que la reducción del cromato es una función secundaria adquirida por las diferentes cromato reductasas. No obstante, aunque la función fisiológica de las cromato reductasas ChrR de *P. putida* y YieF de *E. coli* es incierta, éstas son enzimas con propiedades promisorias para estudios de biorremediación principalmente para la generación de cepas reductoras de cromato más eficientes.

Agradecimiento. La investigación de nuestros laboratorios ha contado con apoyos de la Coordinación de la Investigación Científica (UMSNH), del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Michoacán (COECYT) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación (PAPIIT-UNAM IN208308).

REFERENCIAS

1. Cervantes C, Moreno R (1999) Contaminación ambiental por metales pesados. A.G.T. Editor, S. A. México. p. 157.
2. Riley RG, Zachara JM, Wobber FJ (1992) Chemical contaminants on DOE lands and selection of contaminant mixtures for subsurface science research. Report DOE/ER-0547T. US Department of Energy, Washington, DC
3. Zayed A, Terry N (2003) Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. Plant Soil 249: 139-156.
4. Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Taveras H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol. Rev. 25: 335-347.
5. Cervantes C, Campos-García J (2007) Reduction and efflux of chromate by bacteria. In: Molecular Microbiology of Heavy Metals, Springer-Verlag, Berlin. p. 407-420.
6. Luo H, Lu Y, Shi X, Mao Y, Dalal, NS (1996) Chromium (IV)-mediated Fenton-like reaction causes DNA damage: Implication to genotoxicity of chromate. Ann. Clin. Lab. Sci. 26: 185-191.
7. De Flora S. 2000 Treshold mechanisms and site specificity in chromium (VI) carcinogenesis. Carcinogenesis 21: 533-541.
8. Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas E, Campos-García J, Cervantes C (2008) Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. Biometals 21: 321-32.

9. Ishibashi Y, Cervantes C, Silver S (1990) Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2268-2270.
10. Park CH, Keyhan M, Wielinga B, Fendorf S, Matin A (2000) Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1788-1795.
11. Ackerley DF, Gonzalez CF, Park CH, Blake R, Keyhan M, Matin A (2004) Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 873-882.
12. González CF, Ackerley DF, Lynch SV, Matin A (2005) ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H₂O₂. J. Biol. Chem. 280: 22590-22595.
13. Sparla F, Tedeschi G, Pupillo P, Trost P (1999) Cloning and heterologous expression of NAD(P)H:quinone reductase of *Arabidopsis thaliana*, a functional homologue of animal DT-diaphorase. FEBS Lett. 463: 382-386.
14. Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Villalobos-Molina R, Pardo JP, Piña E (2003) Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. Eur. J. Biochem. 270: 3309-3334.
15. Suzuki Y, Yoda T, Ruhul A, Sugiura W (2001) Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil. J. Biol. Chem. 276: 9059-9065.
16. Liger D, Graille M, Zhou CZ, Leulliot N, Quevillon-Cheruel S, Blondeau K, Janin J, Van Tilbeurgh H (2004) Crystal structure and functional characterization of yeast YLR011wp, an enzyme with NAD(P)H-FMN and ferric iron reductase activities. J. Biol. Chem. 279: 34890-34897.