

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

LA FOTOSINTESIS DEL NITROGENO NITRICO

DISCURSO

LEIDO EN EL ACTO DE SU RECEPCION

POR EL

Excmo. Sr. D. MANUEL LOSADA VILLASANTE

Y

CONTESTACION

DEL

Excmo. Sr. D. ENRIQUE SANCHEZ-MONGE Y PARELLADA

EL DIA 19 DE ABRIL DE 1972



MADRID

Domicilio de la Academia:

VALVERDE, 22. TELEFONO 221 25 29

1972



Dep. Legal SE - 48 - 1972.

Impreso en los talleres de «Gráficas Sevillanas, S.L.» - Conde de Torrejón, 17 - Sevilla.

DISCURSO

DEL

Excmo. Sr. D. MANUEL LOSADA VILLASANTE

LA FOTOSINTESIS
DEL NITROGENO NITRICO

EXCMO. SEÑOR PRESIDENTE,
EXCMOS. SEÑORES ACADEMICOS,
SEÑORAS, SEÑORES:

Con intensa emoción quiero, ante todo, expresar mi gratitud más sincera a la Real Academia de Ciencias por el honor que me ha dispensado con su elección para ocupar la vacante de mi querido maestro, don José María Albareda y Herrera. Consciente de mis limitaciones y deficiencias, considero, señores académicos, que la distinción que me habéis otorgado con este nombramiento es fruto de vuestra benevolencia más que de mis méritos, lo que hace aún, si cabe, más profundo y sentido mi agradecimiento, y acrecienta mi responsabilidad y entusiasmo para compartir vuestras tareas científicas.

Hace ahora 25 años que, con motivo de mi venida a Madrid para continuar mis estudios universitarios iniciados en Sevilla, tuve la suerte de contar entre mis profesores a don José María Albareda, entusiasta, desinteresado y decidido buscador y promotor de vocaciones científicas. Para mí, como para tantos otros jóvenes, el encuentro con don José María habría de ser decisivo para el rumbo de nuestras carreras. Con singular habilidad y pulso firme supo orientarnos y dirigirnos por los apartados caminos de la investigación. Su profunda inteligencia, su prestigio científico, su fe de pionero, su insobornable honradez y su bondad de padre conquistaron nuestra simpatía y admiración desde el primer momento, agrupándonos, a su alrededor, a la sombra del Arbol de la Ciencia, que él mismo, con inmenso amor y sacrificio, estaba plantando con la esperanza de que su sana y rica savia diese pronto a la maltrecha España los frutos frescos y saludables que ésta urgentemente precisaba para convalecer de sus heridas, y renacer con rapidez y fuerza de su reciente y amarga tragedia.

Al comenzar nuestros estudios de Facultad, había un matiz que distinguía fundamentalmente a Albareda en su quehacer universitario, y que ejercía irresistible atractivo y causaba enorme impacto en nuestro mundillo estudiantil: su fervor por la investigación y su confianza ilimitada en el potencial científico de España, especialmente de las generaciones jóvenes. Albareda dedicó efectivamente sus mejores páginas a los jóvenes investigadores (1).

Cuando Albareda inició su actividad docente en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid era ya una figura consagrada por su brillante historial académico e investigador. Después de un período inicial de formación en la Universidad de Zaragoza, junto a los profesores Rocasolano y Rius, había completado su trayectoria científica (como pensionado de la Universidad de Bonn, la Junta para Ampliación de Estudios, y la Fundación Ramsay) en las universidades, escuelas técnicas y estaciones experimentales de mayor categoría de Europa (Bonn, Zurich, Königsberg y Rothamsted). Además, Albareda conocía a fondo la magnífica organización, espíritu de continuidad y labor gigantesca de las universidades de vanguardia de Alemania, Suiza e Inglaterra. Su carácter disciplinado y su inquietud perfeccionista le hacían sentir verdadera veneración por las grandes universidades de las pequeñas ciudades alemanas, pletóricas de nombres famosos.

Enemigo de la rutina, la vulgaridad y la ostentación, las explicaciones de don José María en la Universidad eran, como él, sobrias, desaliñadas y algo torpes en la forma, pero conceptualmente muy ricas y densas, muy excitantes y formativas, llenas de admiración y respeto por los grandes descubrimientos de la Ciencia. Hablaba sin pedantería ni estridencias, con voz sosegada y melodiosa, con precisión y encanto, y sus lecciones adquirían especial relieve cuando se adentraba en el estudio de las formas y estructuras cristalinas, los minerales de la arcilla, las propiedades físico-químicas del suelo, la problemática de su origen y evolución, su función como soporte y sustento de la vida vegetal —temas que habían sido objeto de sus propias investigaciones en el extranjero, y que habría de desarrollar después ampliamente en España—.

Aunque Albareda cumplía con el máximo escrúpulo sus deberes académicos para con todos, no era hombre de masas, sino de minorías, de minorías selectas, a las que consagraba todo su afán. No atraía grandes auditorios, con los que jamás hubiera podido entrar en resonancia. Su atención se polarizaba hacia la juventud industriosa e idealista, a la que ganaba día a día, estimulándola a superarse, infundiéndole ansias de saber, abriéndole horizontes nuevos. En las clases de don José María había

orden y armonía, familiaridad y diálogo. Interrumpía con frecuencia su charla para provocar con naturalidad la reacción espontánea de los alumnos y establecer con ellos mejor contacto.

Poseía Albareda un elevado sentido estético, una sensibilidad exquisita para las obras de arte y para la belleza, grandiosidad y magnificencia de la naturaleza, que gustaba de transmitir al mundo juvenil, al que, sin regateos, dedicaba muchos de sus días de vacación. Organizaba a menudo, con fines recreativos, culturales y científicos, en compañía de los alumnos que más se interesaban por las Ciencias Naturales, de colaboradores de su instituto y de algún profesor extranjero, excursiones al campo y la montaña, a los pantanos, a ciudades y aldeas, a ermitas y lugares apartados. Nunca faltaban, en estas salidas, el martillo y la azada, los saquitos de lona para la toma de muestras. Era entonces —en el autobús, caminando, durante la comida— cuando don José María entraba en contacto y se compenetraba mejor con sus discípulos, cuando ejercía más directamente su magisterio, cuando forjaba planes a corto y largo plazo. A los estudiantes que más se distinguían y que mostraban más interés por la investigación, los incorporaba inmediatamente, sin esperar a que se graduasen, a la vida del laboratorio.

A pesar de ser la Edafología la ciencia de su especialidad, Albareda no fue nunca proselitista en forzar vocaciones hacia este campo. Tenía un concepto universal de la Ciencia, y conocía y estaba relacionado con los mejores centros de investigación extranjeros. Por citar sólo mi caso, que me permito aducir como ejemplo, por ser bastante ilustrativo a este respecto, a mí me envió, después de un período previo de entrenamiento en su instituto, a la Universidad de Münster, primero, a estudiar Citología y Fisiología Celular; después, al Laboratorio Carlsberg de Copenhague, a investigar en Genética Bioquímica; y finalmente, a la Universidad de California, en Berkeley, a especializarme en Fotosíntesis. Nunca perdía su relación personal con los becarios, interesándose particularmente en los problemas específicos que estaban investigando. No sólo les escribía periódicamente, sino que, en la medida de lo posible, los visitaba, conviviendo con ellos algunos días. Se desvelaba además por abrirles cauce a su vuelta, procurando por todos los medios que las investigaciones iniciadas en el extranjero pudieran ser continuadas en España sin menoscabo ni interrupción.

Soñaba Albareda con que la Universidad española pudiera, poco a poco, ir adquiriendo la capacidad investigadora que caracterizaba e imprimía su sello a las universidades sajonas, pero sabía que la reforma no podía hacerse fácilmente desde dentro, con criterio igualitario. No cabía

duda que la Universidad y las escuelas técnicas, viveros de la mejor juventud y proveedoras de los facultativos y técnicos responsables del desarrollo del país, impartían también los títulos de doctor, pero las cátedras investigadoras eran más bien excepción, y se creaban sin dotarlas de personal, laboratorios ni medios para la investigación. El saber es fundamental para el científico, pero apenas da fruto si los conocimientos quedan estériles por inanición. Había que romper círculos viciosos, que redimir a la Universidad, que sacarla de su estado de postración, y para ello era fundamental la formación de personal investigador seleccionado. Además, la Universidad no podía erigirse con la exclusiva de la investigación, y era evidente la necesidad de centros de investigación técnica y de ciencia aplicada al margen de la propia Universidad y de las escuelas técnicas. Todos estos fines podría cumplirlos un organismo que tuviera como finalidad fomentar, orientar y coordinar la investigación científica nacional. Albareda fue, en nuestra época, el inspirador y ejecutor del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, como antes lo habían sido Giner de los Rios y Castillejo de la Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas.

Albareda fue, ante todo y para todos, un hombre bueno, limpio, sencillo y digno, de trato afable, generosamente abierto a los demás, que empleó su portentoso talento y sus admirables dotes de organizador entregándose en cuerpo y alma a la difícil y fecunda tarea de elevar el nivel científico y moral de nuestra patria. Su ecuanimidad y sensatez, su integridad y nobleza, le granjearon el cariño y respeto de cuantos le trataron. Albareda se exigió mucho a sí mismo, pero fue muy indulgente y comprensivo con las debilidades y exaltaciones de los demás, a pesar de que, a veces, las sintió con mucho dolor en su propia carne. Su finc tacto y espíritu moderador salieron siempre triunfantes cuando fue necesario limar aristas ásperas y cortantes, amortiguar golpes, resolver conflictos, conciliar posturas extremas. No fue nunca centralista, intransigente ni sectario. Sin embargo, en los momentos difíciles supo aplicar su doctrina con serenidad, fortaleza y rectitud de conciencia, sin desmayos ni rendiciones. Yo le vi varias veces caer agotado y deshecho en el sofá de su despacho, su resistencia física minada por las dificultades y contratiempos. Pero su temple de acero, su voluntad firme e indomable no fueron nunca presas del desánimo. Si había fracasado cien veces en su justo propósito ¿por qué no perseverar e intentarlo una vez más?

Quizás el mejor y más objetivo testimonio que se pueda dar de la labor de Albareda se debe a don Gregorio Marañón (2), quien, en 1952, al contestar a su discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina

afirmó abiertamente y sin rodeos: "La obra del Consejo Superior de Investigaciones Científicas es uno de los acontecimientos fundamentales en la vida cultural de nuestro país... Como yo no estoy en el centro de la ortodoxia política a cuyo calor ha surgido la gran estructura del Consejo, creo que tengo autoridad para que mi elogio alcance el doble valor que la sinceridad rigurosa de espectador y colaborador, y no de fundador, añade a la estricta verdad... Y es lo cierto que en nuestro país no han tenido nunca los hombres de ciencia tantas posibilidades de trabajar y de ser ayudados por el Estado en sus afanes como bajo la tutela del Consejo". Más recientemente, don Enrique Gutiérrez Ríos, compañero fiel y conocedor como pocos de Albareda, ha hecho su semblanza después de su muerte, analizando, con magistral pericia y cariño entrañable, los aspectos más sobresalientes de su vida y obra (3).

Como colofón a esta breve introducción, permitidme ahora exponer resumidamente las principales razones que me han movido a escoger como tema de mi disertación "La Fotosíntesis del Nitrógeno Nítrico" En primer lugar, porque, como hago notar más tarde, se trata de un problema de trascendental importancia científica y económica, que hace tiempo viene siendo atacado con continuidad y desde diversos frentes —especialmente el bioquímico— en nuestro Departamento. En segundo lugar, porque, aunque todavía no sea frecuente incluir la asimilación del nitrato dentro del campo de la Fotosíntesis, este criterio obedece a razones históricas más que científicas, y es imperioso un nuevo enfoque del problema, que permita situarlo, con visión clara e integradora, en su verdadero contexto. Y finalmente, como cálido homenaje a la memoria de don José María Albareda, que inició su carrera científica en los laboratorios de Rocasolano, ocupados en aquel entonces con problemas de fertilidad, concretamente con la asimilación del nitrógeno por las plantas y la acción catalítica que ciertos metales ejercen en el proceso. El propio Albareda prestó cuidadosa atención a la función de los oligoelementos en Biología (4). En nuestro discurso trataremos especialmente del carácter esencial del hierro y del molibdeno en la asimilación de nitrato, y de las interferencias producidas por el volframio, metal muy español, que, sin ser funcional, suplanta al molibdeno en el sitio activo de los enzimas responsables de tan importante menester.

LA FOTOSINTESIS DEL NITROGENO NITRICO

I. FUENTES DE ENERGIA BIOLOGICA

Desde un punto de vista mecanicista, la vida es un equilibrio dinámico e inestable de reacciones fisicoquímicas que se suceden y concatan en perfecto orden y armonía. Hasta tal punto es este equilibrio característico de la vida que su interrupción es la mejor evidencia de la muerte. Para mantener este equilibrio, para crecer, multiplicarse y desarrollar sus múltiples actividades vitales, los organismos han de consumir continuamente energía. Pero las células vivas, que trabajan a temperatura y presión más o menos constantes, no pueden usar calor como fuente de energía a la manera de las máquinas de vapor inventadas por el hombre, que requieren un salto de temperatura para transformar calor en trabajo; saben, sin embargo, utilizar preciosamente, con simplicidad y eficacia, la energía física contenida en la *luz* y la energía química almacenada en los *alimentos*.

Atendiendo precisamente a las fuentes energéticas de que se nutren, los organismos pueden clasificarse en dos grupos: quimioenergéticos y fotoenergéticos (5,6). *Organismos quimioenergéticos* son aquellos que aprovechan la energía contenida en los compuestos que metabolizan. A este grupo pertenecen los seres más primitivos, como las bacterias, y los más evolucionados, como el hombre. Todos los organismos quimioenergéticos adquieren la energía fisiológica que precisan para su funcionamiento descomponiendo anaeróbica o aeróbicamente los sustratos que ingieren, mediante los procesos catabólicos conocidos como Fermentación y Respiración. Los *organismos fotoenergéticos* obtienen su energía fisiológica a expensas de la luz solar, por medio de las reacciones luminosas de la Fotosíntesis. A este grupo pertenecen las algas y plantas superiores.

Tanto la *Fermentación* y la *Respiración* como la *Fotosíntesis* en su sentido más estricto son fundamentalmente equivalentes en cuanto implican procesos redox de conversión de energía en los que la energía física que liberan los electrones en su caída desde niveles más altos (o reducidos) a otros más bajos (u oxidados) queda finalmente atrapada como energía química en los enlaces de pirofosfato del compuesto que constituye la *moneda energética* universal que los seres vivos utilizan en sus transacciones; a saber, el *adenosín trifosfato*, comúnmente abreviado como *ATP*. Las células descargan el ATP, separando sus restos terminales de fosfato, y emplean esta energía en la realización de los diversos tipos de trabajo fisiológico: químico, osmótico, mecánico, eléctrico, etc. Como ejemplo ilustrativo de las enormes cantidades de ATP que, en continuo recambio, necesitan los organismos, digamos que el hombre consume al día aproximadamente la equivalente a su propio peso.

II. BIOSÍNTESIS DEL MATERIAL CELULAR

Limitándonos ahora al *trabajo químico de la biosíntesis* de los componentes celulares —el proceso más complejo y, valga la redundancia, vital de cuantos efectúan los organismos vivos, y el que aquí más específicamente nos interesa— hay diferencias sustanciales entre los organismos quimioenergéticos, por un lado, y los fotoenergéticos, por otro. Estas diferencias obedecen a razones obvias que a continuación analizaremos, y que son, en principio, consecuencia inmediata del distinto grado de óxido-reducción que presentan las sustancias que, respectivamente, utilizan como alimentos estos dos tipos de organismos. Ellas nos explican por qué —si se exceptúan las bacterias fotosintéticas y las algas adaptadas a condiciones anaeróbicas, que son más bien organismos fotoquimioenergéticos— las reacciones básicas de la Fotosíntesis no pueden limitarse, como las de la Fermentación y la Respiración, a la síntesis de ATP, sino que han de incluir, además, la generación de poder reductor a partir del agua, proceso que biológicamente, y debido con toda probabilidad a diferencias de potencial no superables por el ATP, sólo es posible a expensas de la luz con el concurso de la clorofila. La existencia de ciertos organismos quimioenergéticos excepcionales —como las bacterias nitrificantes—, que pueden utilizar en la oscuridad otros compuestos inorgánicos reducidos —concretamente de nitrógeno— como fuente de poder

reductor, queda explicada porque, en estos casos, el ATP —obtenido por fosforilación acoplada a la propia oxidación del derivado inorgánico— puede, por sí solo, superar las diferencias de potencial, no tan elevadas, implicadas en el proceso, sin que sea, por tanto, indispensable el concurso de la energía radiante para la generación de poder reductor.

En general, podemos afirmar que *los organismos quimioergónicos asimilan nutrientes fisiológicamente ricos en poder reductor*, cuyo estado de óxido-reducción es, en cierto modo, equiparable al del material celular que sintetizan. En consecuencia, dichos organismos disponen más o menos fácilmente de poder reductor sin necesidad de tener que valerse de reacciones fotoquímicas, y obtienen toda la energía de enlace que precisan para sus reacciones anabólicas mediante la *Fermentación* y la *Respiración*, procesos bioenergéticos exclusivamente dirigidos a la *producción de ATP*.

En cambio, *los organismos fotoergónicos*, que, en condiciones normales, *se nutren sólo de compuestos oxidados sin valor energético*, a los que han de reducir hasta el nivel de óxido-reducción característico de los componentes celulares, requieren para sus reacciones biosintéticas *ATP* y *poder reductor* que han de generar necesariamente merced a las *reacciones fotoquímicas* de la Fotosíntesis. En otras palabras, todos los elementos biogénicos primordiales que, en forma inorgánica, toman las plantas de su medio ambiente para sintetizar su propia materia están, en general, completamente quemados, es decir, oxidados al límite: el carbono, como anhídrido carbónico (CO_2); el nitrógeno, como nitrato (NO_3^-), o nitrógeno molecular (N_2); el fósforo, como fosfato (PO_4H^-); el azufre, como sulfato (SO_4^{2-}), y el hidrógeno, como agua (H_2O). Por el contrario, después de su asimilación fotosintética, el carbono, el nitrógeno y el azufre aparecen en estado reducido, constituyendo las sustancias orgánicas típicas del material vegetal sintetizado; el carbono a un nivel variable de óxido-reducción, cuyo promedio puede representarse simplíficadamente como (CH_2O); el nitrógeno a nivel amoniacal (NH_3), y el azufre a nivel de sulfuro de hidrógeno (SH_2), siendo el oxígeno el único que, al donar el hidrógeno y liberarse del agua como producto de desecho, aparece, lógicamente y por contraste, más oxidado (O_2). El fósforo, curiosamente, no cambia de valencia, sino exclusivamente de fosfato inorgánico a fosfato orgánico.

En sentido amplio, la *Fotosíntesis* que realizan las algas y plantas superiores consiste, pues, en la *conversión, a expensas de la energía solar, de las asociaciones estables de átomos características de los nutrientes minerales* de que se alimentan *en oxígeno molecular y otras asociaciones*

inestables, las cuales llegan a alcanzar el maravilloso nivel de organización de los intrincados y gigantescos edificios moleculares y celulares de la materia viva.

Revelada hace ya unos años (7) la ruta de la asimilación fotosintética del carbono —que excluye la participación directa de la luz de alguna manera “sui generis”—, *la Fotosíntesis no puede de ningún modo identificarse con carácter exclusivo* —como erróneamente se ha venido admitiendo desde casi su descubrimiento— *con las reacciones de reducción y asimilación del dióxido de carbono* (8), si bien son fáciles de comprender las razones de tipo histórico que motivaron el que este proceso llegase a considerarse como lo único peculiar de la Función Clorofílica. Como discutiremos más adelante, la Fotosíntesis comprende igualmente la fotorreducción de las formas oxidadas de los otros elementos biogénicos primordiales —nitrógeno y azufre— y su posterior asimilación (5).

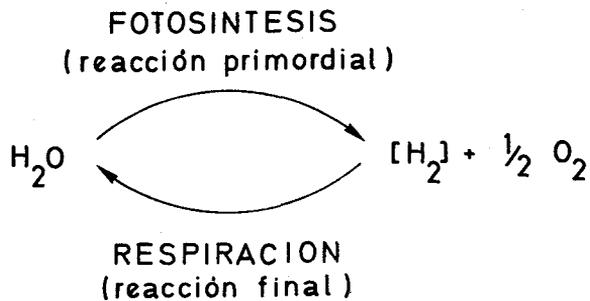
Fue precisamente el convencimiento de que la Fotosíntesis no se limita a la asimilación del anhídrido carbónico la razón principal que me impulsó, al regresar de Estados Unidos, después de cuatro años de estancia en el laboratorio del profesor ARNON —a quien públicamente deseo ahora expresar mi admiración y agradecimiento más sinceros y entrañables—, a iniciar el estudio de la Fotosíntesis del nitrato, sin olvidar por ello el metabolismo del carbono, íntimamente relacionado con el del nitrógeno.

III. REACCIONES LUMINOSAS DE LA FOTOSÍNTESIS

Por sorprendente que ello parezca, *la reacción más simple y trascendental que, desde un punto de vista bioenergético, existe sobre la Tierra*, y a la que la vida misma debe desde casi sus orígenes su propia y continuada existencia, es *la que calladamente, y con constancia y eficacia admirables, verifican los organismos fotosintéticos* del tipo de las plantas verdes, *rompiendo el agua, a expensas de la luz solar, en sus dos elementos integrantes —hidrógeno y oxígeno—, y fabricando simultáneamente ATP*. Esta es una de las dos reacciones básicas de la Fotosíntesis.

También trascendental, e igualmente sencilla y silenciosa, es la reacción inversa, característica de la fase final de la Respiración, que permite a los organismos aerobios quemar gradual y eficientemente el hidrógeno con el oxígeno atmosférico para obtener ATP.

El hecho de que los organismos fotoergónicos y quimioergónicos más evolucionados hayan desarrollado unos orgánulos citoplásmicos altamente diferenciados, llamados respectivamente *cloroplastos* y *mitocondrias*, para convertir la energía potencial contenida en la luz o en los alimentos en energía química fisiológica, refleja la importancia que las células conceden a sus funciones energéticas. Los cloroplastos y las mitocondrias son, sin duda, las más importantes *centrales transformadoras de energía* de las células eucarióticas, donde se llevan a cabo, respectivamente, la Fotosíntesis y la Respiración. Las ecuaciones siguientes resumen conjuntamente lo más esencial de ambos procesos:



En este esquema, las flechas curvadas pretenden indicar que Fotosíntesis y Respiración discurren por vías distintas: la primera, cuesta arriba, impulsada por la luz, y la segunda, cuesta abajo, a favor del gradiente de potencial. Al representar el hidrógeno entre corchetes se quiere señalar que no se trata necesariamente de hidrógeno molecular, sino de hidrógeno metabólicamente activo, combinado con coenzimas redox de potenciales similares al del electrodo de hidrógeno.

El estudio bioenergético de las ecuaciones anteriores es en extremo interesante e instructivo. Puesto que la rotura de un mol de agua requiere cuatro einsteins de luz roja (160 Kcal), y puesto que en la reacción —característica de la fotofosforilación no cíclica— se produce, a la par que hidrógeno y oxígeno (56 Kcal), un mol de ATP (8 Kcal), se puede calcular que el rendimiento de esta reacción primordial de la Fotosíntesis es del 40 por ciento. Por otro lado, como la oxidación respiratoria del hidrógeno por el oxígeno (56 Kcal) se acopla con la síntesis de tres ATP (24 Kcal), el rendimiento de esta reacción final de la Respiración es también del 40 por ciento. Estos balances nos indican que ambos procesos metabólicos transcurren, como es ley general, con pérdida de energía libre, y que los organismos aerobios aprovechan la energía solar, a través de

las plantas, con un rendimiento que puede llegar como máximo al 16 por ciento. Si consideramos que estas dos ecuaciones constituyen el principio y el fin del metabolismo energético de los seres vivos, podemos concluir que la energética biológica se desarrolla esencialmente entre dos sistemas redox (hidrógeno y oxígeno), cuya diferencia de potencial es sólo de aproximadamente un voltio.

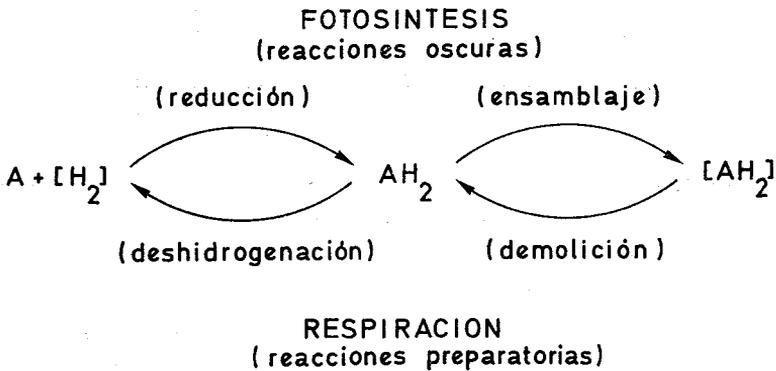
El mecanismo de las reacciones luminosas de la Fotosíntesis ha sido fundamentalmente esclarecido durante los últimos años por ARNON y su grupo (8,9) en la Universidad de California, en Berkeley. Dichas reacciones incluyen no sólo la *fotofosforilación no cíclica* —exclusiva de las algas y plantas superiores—, que acabamos de considerar, sino también la *fotofosforilación cíclica* —común a las bacterias fotosintéticas—, en la que, al discurrir el flujo de los electrones activados por la luz a través de un circuito cerrado, el balance neto es exclusivamente la síntesis de ATP. En cierto modo podríamos decir que el ejemplo más simple de Fotosíntesis es la generación luminosa de ATP (10).

IV. REACCIONES OSCURAS DE LA FOTOSÍNTESIS

ATP y poder reductor son, según ARNON (8,9), los productos finales de la Fotosíntesis propiamente dicha, que *constituyen el poder asimilatorio* disponible para la reducción y posterior asimilación de los elementos biogénicos primordiales: carbono, nitrógeno y azufre. Si representamos las formas oxidadas de estos elementos por A —dado su carácter aceptor de electrones—, podemos simplificarmente describir la *primera fase* de las reacciones oscuras de la Fotosíntesis como procesos redox que resultan en su *reducción* a AH_2 ; el anhídrido carbónico a aldehído; el nitrato —o nitrógeno molecular— a amoníaco, y el azufre a sulfuro. Al proceso de reducción de estos elementos sucede la *segunda fase* de las reacciones oscuras de la Fotosíntesis, en la que *primero se biosintetizan los metabolitos intermediarios* de bajo peso molecular que constituyen las subunidades de las macromoléculas (monosacáridos, ácidos grasos, aminoácidos y nucleótidos) y *después se forman los propios polímeros* (polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), que *finalmente se agregan y organizan integrándose en estructuras moleculares y celulares complejas*, a las cuales podemos representar por (AH_2) . Por tanto, du-

rante las reacciones oscuras de la Fotosíntesis, los elementos biogénicos se reducen, organifican y organizan.

Los organismos quimioergónicos desdoblan y degradan después, a través de innumerables reacciones catabólicas, las grandes moléculas de la materia vegetal fotosintetizada, y mediante las reacciones de deshidrogenación preparativas de la fase final de la Respiración —que incluyen las Fermentaciones— obtienen de nuevo hidrógeno, a la par que mineralizan otra vez la materia orgánica, según indican las ecuaciones:

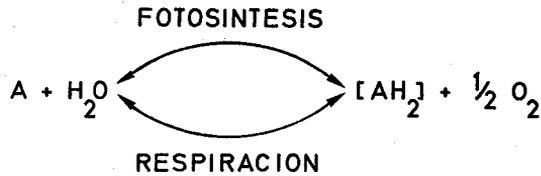


V. FOTOSINTESIS EN SENTIDO AMPLIO

En resumen, *la Fotosíntesis en sentido amplio incluye las reacciones de conversión de la energía luminosa en poder reductor y energía química de enlace, así como también las reacciones oscuras subsiguientes que resultan en la utilización del poder asimilatorio para la reducción de los elementos biogénicos oxidados y su posterior asimilación.* Y a la inversa, la Respiración en sentido amplio incluye, como reacciones previas, la degradación de las macromoléculas y la posterior deshidrogenación de los elementos biogénicos reducidos, y, finalmente, la oxidación por el oxígeno molecular del hidrógeno liberado, que permite la síntesis de energía química de enlace.

Por tanto, en el equilibrio actual del mundo vivo, los organismos fotoergónicos organifican la materia inorgánica, y los quimioergónicos mineralizan la materia orgánica, construyendo los unos lo que los otros des-

truyen, y cerrando entre ambos el fantástico ciclo que representan las siguientes ecuaciones globales:

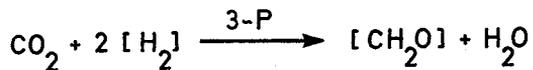


VI. RUTAS FOTOSINTETICAS FUNDAMENTALES

En este apartado, y antes de entrar de lleno en la Fotosíntesis del nitrato, queremos exponer resumidamente las vías que siguen los tres elementos biogénicos primordiales —carbono, nitrógeno y azufre— durante su reducción fotosintética.

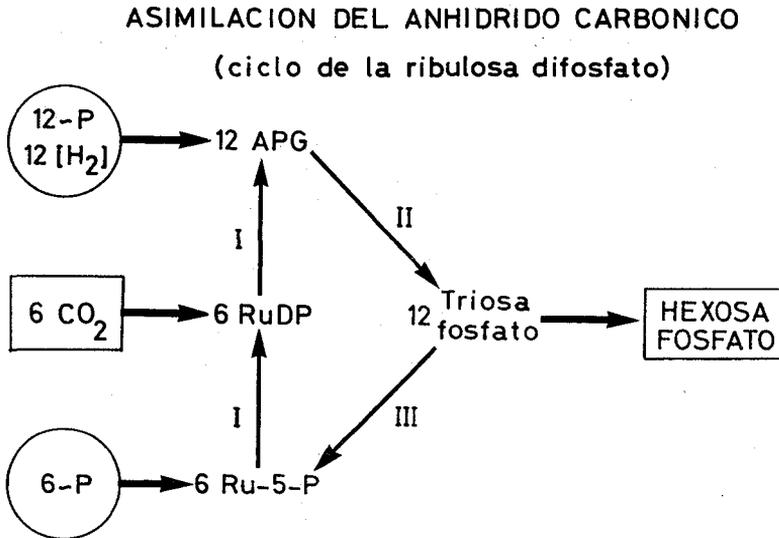
La *reducción fotosintética del anhídrido carbónico a azúcar*, resuelta esencialmente por CALVIN y su grupo (7) en la Universidad de California, en Berkeley, requiere cuatro equivalentes de poder reductor (como trifosfopiridín nucleótido) y tres moléculas de ATP, y transcurre según la ecuación:

REDUCCION DEL ANHIDRIDO CARBONICO A AZUCAR



El resultado neto de la reacción es la formación de aldehído fórmico, incorporado a una molécula de azúcar como grupo alcohólico. No se trata, por tanto, simplemente de la desoxigenación e hidrogenación de una misma molécula de anhídrido carbónico —o, lo que es lo mismo, de la doble desoxigenación del ácido carbónico, su forma hidratada—, que conduciría a la formación de aldehído fórmico libre. La realidad es que el anhídrido carbónico se fija primero (fase I) a una molécula aceptora de azúcar, la ribulosa difosfato (RuDP) —previamente activada por fosforilación en 1 de la ribulosa-5-fosfato (Ru-5-P)—, dando lugar a la formación de dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (APG), cuyos grupos carboxilos sufren entonces (fase II) —también previa activación por fos-

forilación— la desoxigenación a grupos aldehidos, con lo que resultan dos moléculas de triosa fosfato. La molécula aceptora se regenera después (fase III) durante el proceso, que tiene, en consecuencia, carácter cíclico, según se representa en el siguiente esquema (11), referido a la reducción de seis moléculas de anhídrido carbónico y a la formación de una molécula de hexosa fosfato:



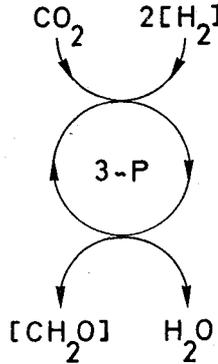
o, más simplificada, en el esquema abreviado de la página 22, referido a una sola molécula de anhídrido carbónico:

Después de las anteriores consideraciones merece destacarse el hecho de que, siendo el ciclo de CALVIN esencialmente el inverso del ciclo de la degradación de las hexosas por la ruta de las pentosas, presente la peculiaridad de sustituir los dos pasos redox consecutivos de ésta por el típico de la glicolisis, repetido dos veces. De este modo, en lugar de la carboxilación reductiva de la ribulosa-5-fosfato y de la posterior reducción del grupo carboxilo del ácido 6-fosfoglicónico a grupo aldehído para formar glucosa-6-fosfato, se produce la carboxilación de la ribulosa-5-fosfato activada, y la reducción de los grupos carboxilos —también activados— de las dos moléculas de ácido fosfoglicérico resultantes, con cuya modificación el proceso resulta energéticamente viable.

Una variante, todavía dudosa, del ciclo de CALVIN podría ser la que se ha dado en llamar ruta del ácido C₄-dicarboxílico, o ciclo de HATCH-SLACK-KORTSHACK (12,13), que opera en hierbas tropicales y en ciertas dicotiledóneas. En esta ruta, el grupo β-carboxilo del ácido oxalacético,

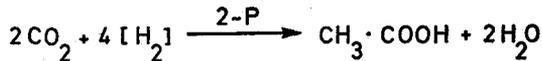
resultante de la fijación del anhídrido carbónico por el ácido fosfoenolpirúvico, sería, a su vez, transferido a la ribulosa difosfato en una reacción de transcarboxilación todavía no bien caracterizada, en la que, como consecuencia, se liberaría ácido pirúvico. El ácido pirúvico así formado regeneraría entonces el ácido fosfoenolpirúvico en la reacción catalizada por la piruvato-fosfato-dikinasa, que depende de ATP y consume dos enlaces de fosfato ricos en energía.

ASIMILACION DEL ANHIDRIDO CARBONICO
(ciclo abreviado de la ribulosa difosfato)



Aunque el *ciclo reductivo de la ribulosa difosfato* estaba considerado como el único mecanismo para la asimilación del anhídrido carbónico, ARNON y colaboradores (14) han descubierto recientemente que las bacterias fotosintéticas poseen un nuevo mecanismo —llamado *ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos*— que les permite la *reducción del anhídrido carbónico a ácido acético* con ocho equivalentes de poder reductor (dos de ellos como ferredoxina) y dos moléculas de ATP, según indica la siguiente ecuación:

REDUCCION DEL ANHIDRIDO CARBONICO A ACIDO ACETICO

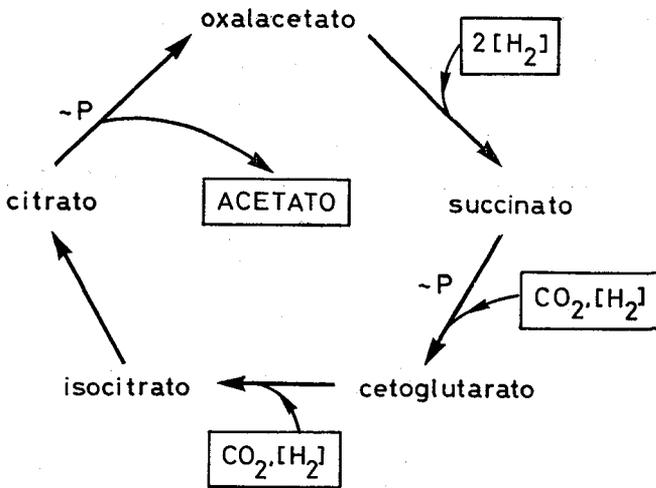


En este ciclo —que, como su nombre indica, es esencialmente el inverso del ciclo de KREBS— hay dos reacciones que merecen mencionarse por su peculiaridad, pues son las que salvan las barreras energéticas: 1) la carboxilación reductiva del succinil-CoA a α -cetoglutarato, dependiente de ferredoxina y catalizada por la α -cetoglutarato sintasa, y

2) la escisión del citrato en acetyl-CoA y oxalacetato, dependiente de ATP y CoA, y catalizada por la citrato liasa.

Al dar una vuelta el ciclo, el ácido oxalacético, que sirve de eslabón inicial, se reduce primero a ácido succínico, al sufrir su grupo carbonilo dos hidrogenaciones consecutivas y transformarse sucesivamente en grupo alcohólico y grupo metileno. Después —y previa activación dependiente de ATP y CoA de uno de los grupos carboxilos del ácido succínico— tiene lugar la primera carboxilación reductiva, que resulta en la reducción del grupo carboxilo activado a grupo carbonilo, con formación del ácido α -cetoglutarico. A continuación ocurre la segunda carboxilación

ASIMILACION DEL ANHIDRIDO CARBONICO
(ciclo reductivo de los ácidos tricarboxilicos)



reductiva, reduciéndose el grupo carbonilo del ácido α -cetoglutarico a grupo alcohólico y formándose el ácido isocítrico. Finalmente, tras la isomerización del ácido isocítrico a ácido cítrico —que lleva consigo la reducción del que era grupo alcohólico a grupo metileno—, se produce la reacción de rotura, dependiente de ATP, regenerándose el ácido oxalacético y liberándose ácido acético como acetyl-CoA.

Nótese que el ácido acético liberado está constituido por un grupo carboxilo proveniente de uno de los del ácido oxalacético inicial y por un grupo metilo procedente de su carbono adyacente.

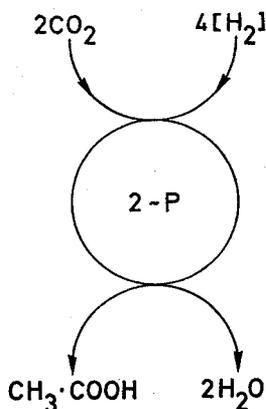
Ninguna de las dos moléculas de anhídrido carbónico fijadas se reduce durante la primera vuelta, apareciendo tal cuales, como grupos car-

bóxilos, en el ácido oxalacético resultante. De hecho, son el grupo carbonilo del ácido oxalacético inicial, así como uno de sus grupos carboxilos, los que experimentan, cada uno de ellos, las dos hidrogenaciones sucesivas que conducen a la reducción total del primero a grupo metileno y a la reducción parcial del segundo a grupo alcohólico. No obstante, el grupo ceto del ácido oxalacético original aparece regenerado al final del ciclo debido a las reacciones de oxido-reducción intramolecular que tienen lugar durante la isomerización del ácido isocítrico a cítrico y la subsiguiente escisión de éste. El resultado neto es, pues, como si el ácido oxalacético se desgajase liberando una molécula de ácido acético, y el ácido oxálico resultante sufriese una hidrogenación cuádruple a acetaldehído seguida de una doble carboxilación que regenerase el cetoácido tetracarboxonado.

Las fases más importantes del ciclo reductivo de los ácidos tricarbóxicos se representan en el esquema de la página 23.

Más abreviadamente, el ciclo puede representarse también así:

ASIMILACION DEL ANHIDRIDO CARBONICO
(ciclo reductivo abreviado de los acidos tricarbóxicos)

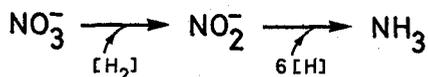


La *reducción fotosintética del nitrato a amoníaco* se diferencia de la reducción del anhídrido carbónico, aparte de otras particularidades, en no ser proceso cíclico ni requerir ATP. Es, sin embargo, más cara en cuanto a poder reductor (ocho equivalentes por molécula) y depende de dos coenzimas —difosfopiridín nucleótido y ferredoxina—, que actúan secuencialmente reduciendo el nitrato a nitrito, y éste a amoníaco.

La reducción fotosintética del nitrato ha sido intensamente estudia-

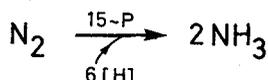
da en diversos laboratorios durante los últimos veinte años, habiendo contribuido decisivamente a su esclarecimiento las investigaciones realizadas en nuestro Departamento, según se analizará más adelante.

REDUCCION DEL NITRATO A AMONIACO



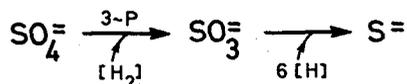
La *reducción fotosintética del nitrógeno molecular a amoniaco* que realizan las bacterias fotosintéticas (15,16) y las algas verde-azuladas (17-19) es un proceso no cíclico que requiere, además de poder reductor —suministrado como ferredoxina—, ATP, según han demostrado los recientes trabajos preliminares de ARNON y su grupo (20). De acuerdo con la evidencia actual (21), la estequiometría de la reacción es:

REDUCCION DEL NITROGENO MOLECULAR A AMONIACO



La *reducción fotosintética del sulfato a sulfuro*, estudiada principalmente por los grupos de TREBST (22) y BANDURSKY (23), es similar a la del nitrato en cuanto que es proceso abierto e implica ocho equivalentes de poder reductor con intervención de la ferredoxina. El primer paso —reducción de sulfato a sulfito— consume tres enlaces de fosfato ricos en energía en la activación del sulfato, mientras que el segundo —reducción del sulfito a sulfuro— sólo requiere poder reductor, que es suministrado por la ferredoxina:

REDUCCION DEL SULFATO A SULFURO



A primera vista parece sorprendente que la reducción del sulfato a sulfito requiera tres enlaces de fosfato, en tanto que la aparentemente similar del nitrato a nitrito no necesita ninguno. El hecho parece aún más extraño si se tiene en cuenta que existen bacterias —como las del género *Desulfovibrio* y las denitrificantes— que obtienen su energía por respiración anaerobia, reduciendo sulfato y nitrato, respectivamente. La explicación debe residir en las acusadas diferencias de potencial que, a pH fisiológico, presentan los sistemas sulfato-sulfito ($E'_0 = -0,49 \text{ V}$) y nitrato-nitri-

to ($E'_0 = +0,42 \text{ V}$). Por ello, la reducción del sulfato —como la del grupo carboxilo— exige activación previa por el ATP para aumentar el potencial del sistema, en tanto que la del nitrato no. La aparente paradoja de que las bacterias reductoras de sulfato puedan obtener ATP durante su reducción queda resuelta si se tiene en cuenta que la posterior reducción de sulfito a sulfuro puede suministrar suficiente ATP, compensando de este modo el gasto previo inevitable y haciendo que el balance neto de la reacción total sea energéticamente favorable.

Para terminar este apartado, hagamos notar que no parece probable que sea mero capricho o coincidencia el que la *ferredoxina* —donador de un solo electrón— haya sido elegida como *agente reductor específico para las reacciones biológicas de reducción de tres compuestos minerales que implican la transferencia de seis electrones* (nitrógeno-amoniaco, nitrito-amoniaco y sulfito-sulfuro). Añadamos en fin que, aunque todavía permanecen oscuras las características de la reacción de desnitrificación de reducción de nitrito a nitrógeno molecular —proceso que también implica la captura de seis electrones—, se puede presagiar sin grave riesgo que el donador de electrones será también una ferredoxina no hemínica del tipo de las ferredoxinas (24).

VII. ASIMILACION FOTOSINTETICA DEL NITRATO

VII. 1. Interés científico y económico

Ei nitrógeno constituye aproximadamente el dos por ciento del peso seco de las plantas, lo que, a escala mundial, supone la incorporación al reino vegetal de 10.000 millones de toneladas anuales de este elemento. Exceptuadas aquellas especies que directamente (como las algas verde-azuladas o por asociación simbiótica con bacterias (como las leguminosas) fijan el nitrógeno atmosférico, *las plantas utilizan predominantemente nitrato como fuente de nitrógeno*. En las circunstancias en que, en la práctica agrícola, se emplean fertilizantes como el amoniaco o la urea, es también el nitrato el compuesto que verdaderamente asimilan las plantas, debido a la nitrificación (precedida de hidrólisis en el caso de la urea) que efectúan previamente las bacterias del suelo.

La amplia y profunda significación biológica de la asimilación del nitrógeno nítrico en la luz radica, por tanto, no sólo en el hecho de que

el nitrato es la principal fuente de nitrógeno que utilizan las plantas, sino también en que su reducción a amoníaco y su posterior metabolismo dependen de y están muy estrechamente ligados a las reacciones fotosintéticas propiamente dichas. Realmente *es fabulosa la cantidad de energía solar que requiere el mundo vegetal para llevar a cabo la asimilación del nitrato*, globalmente considerada. Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, el proceso en sí sólo requiere luz como fuente energética primaria para la síntesis de poder asimilatorio; de hecho, las propias plantas en ciertas condiciones, así como determinados tejidos vegetales y algunos microorganismos —tales como bacterias y hongos—, lo pueden efectuar totalmente en la oscuridad.

Un mejor conocimiento del mecanismo de la asimilación fotosintética del nitrato y de su regulación genética y bioquímica puede fácil y económicamente traducirse en un *incremento considerable del rendimiento y valor nutritivo de las cosechas*, al permitir aumentar la cantidad, proporción y riqueza de su contenido proteico. A este respecto hay que recordar que los compuestos nitrogenados resultantes de la asimilación del nitrato —proteínas y ácidos nucleicos— son las sustancias cualitativa y cuantitativamente más características de la materia viva, y que, en último término, son las plantas los seres vivos a los que ha cabido en suerte suministrar dichos compuestos a todos los demás organismos. Por ello, los científicos que trabajan en campos relacionados con la nutrición no pueden olvidar que tienen también la obligación moral de contribuir con sus investigaciones al mejoramiento de la alimentación humana —actualmente deficitaria, por desgracia, en vastas zonas de la Tierra—, con la esperanza de que este tipo de investigaciones pueda además ayudar significativamente a resolver o paliar la angustiosa incógnita del problema de la superpoblación, que hoy tanto agobia a moralistas, científicos, sociólogos, economistas, políticos, etc.

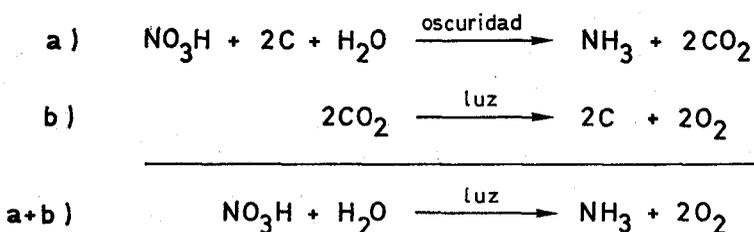
VII. 2. Antecedentes históricos

Aunque el efecto de la luz en la asimilación fotosintética del nitrato se conoce desde hace mucho tiempo, el mecanismo íntimo del proceso sólo ha sido relativamente aclarado en época reciente.

Por lo que se refiere a su reducción a amoníaco, WARBURG hizo notar en varias de sus últimas publicaciones (25,26) que el *nitrato* es, de hecho, el *primer reactivo de Hill descubierto*. En efecto, en 1920, WARBURG y NEGELEIN (27) realizaron el experimento fundamental, ya clá-

sico en Fotosíntesis, de que las células vivas del alga *Chlorella* suspendidas en soluciones de nitrato a las que no se añadía anhídrido carbónico desprendían oxígeno en la luz a la par que reducían estequiométricamente el nitrato a amoniaco. No obstante, como estos autores encontraron además que el alga podía también oxidar en la oscuridad sus hidratos de carbono a anhídrido carbónico con la simultánea reducción del nitrato a amoniaco, interpretaron la reducción fotosintética del nitrato como un proceso resultante de dos reacciones parciales: a) una reacción oscura, en la que el carbono celular era oxidado a dióxido de carbono por el nitrato, y b) una reacción luminosa, en la que el dióxido de carbono así formado era subsecuentemente escindido en carbono y oxígeno, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

REDUCCION FOTOSINTETICA DEL NITRATO
(Hipótesis de Warburg)



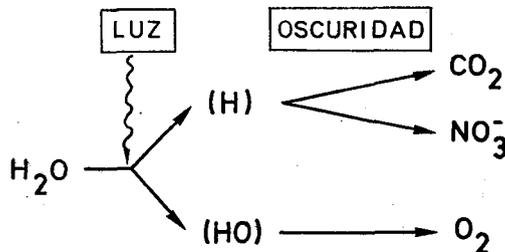
Recientemente, WARBURG (28) repitió sus experimentos con técnicas más perfeccionadas, subrayando de nuevo en sus conclusiones, de manera categórica y tajante, que la ecuación neta anteriormente escrita es engañosa, en el sentido de que lo que parece una fotólisis del agua es, de hecho, en su mecanismo, una fotólisis del anhídrido carbónico. Como es bien sabido, WARBURG —uno de los bioquímicos más famosos de todos los tiempos, y uno de los pioneros que más se han distinguido por sus brillantes y profundos estudios en Fotosíntesis— ha defendido hasta su muerte, con enorme carácter y tenacidad no exenta de razones, la idea clásica de que la reacción básica de la Fotosíntesis es la *fotólisis del anhídrido carbónico*.

Hace diez años, con motivo de la celebración de la Primera Conferencia Europea sobre Fotosíntesis, yo tuve la dicha y el privilegio de poder conocer y admirar de cerca, en toda su galanura, madurez y grandeza, la impresionante personalidad científica y humana, adornada de fino y cachazudo humor, del profesor WARBURG, al tener ocasión de acompañarle una noche, en unión de mi amigo y compañero, el doctor BOVE, a cenar en un restaurante del Barrio Latino de París. La sabrosa y amena conversación

del profesor WARBURG, rebotante de sabiduría, experiencia y elegancia, y salpicada de íntimas y enjundiosas historias y anécdotas, a veces matizadas con comentarios de acre y punzante ingenio, nos mantuvo muy a gusto, alertas y embobados, durante horas, a los dos jóvenes acompañantes. ¡Cuánto y cuán fácilmente se puede aprender en tan corto tiempo de un verdadero maestro, de un gigante de la Ciencia, que ha vivido una de las épocas de más esplendor y gloria de la Biología, entregado en soledad a su ideal de escudriñar en el laboratorio los misterios más recónditos de la vida y la muerte! Sin embargo, de todo cuanto habló, lo que a mí me produjo mayor sorpresa, y lo que ya, desde entonces, quedará para siempre grabado en mi conciencia sin posibilidad de olvido. fue la respuesta escueta y rotunda, muy de su estilo, con que sin vacilación, pero tenso y radiante, contestó a mi pregunta de cuál había sido el descubrimiento más importante que había realizado a lo largo de su muy larga vida, repleta de conquistas y éxitos científicos sin par: "Que un fotón absorbido por la clorofila rompe una molécula activa de anhídrido carbónico en carbono y oxígeno".

Un cambio radical en el concepto de Fotosíntesis ocurrió en los años treinta, cuando VAN NIEL (29) postuló —tras una serie de geniales e inquisitivos experimentos con bacterias fotosintéticas, felizmente interpretados a la luz de la bioquímica comparada— que la reacción fundamental de la Fotosíntesis no es la fotólisis del anhídrido carbónico, sino la *oxido-reducción del agua* promovida por la luz y catalizada por la clorofila. Esta reacción resulta —en las algas y plantas superiores— en la escisión de

REDUCCION FOTOSINTETICA DEL NITRATO (Hipótesis de van Niel)



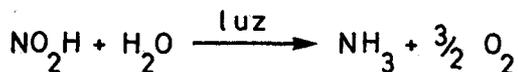
la molécula de agua en hidrógeno y oxígeno, según hemos analizado previamente. VAN NIEL ha sido no sólo el fundador de la era moderna de la Fotosíntesis, sino el iniciador que, con visión simple y clara del proceso, ha lanzado a una inmensa legión de investigadores a realizar desde los más diversos puntos de vista —físico, químico, biológico— experimentos tan numerosos como fecundos, que han culminado en fecha reciente con el esclarecimiento casi completo de este maravilloso proceso. De acuerdo con la teoría de la fotólisis del agua, el propio VAN NIEL (29), así como RABINOWITCH (30) interpretaron la *reducción fotosintética del nitrato* como un *proceso esencialmente análogo al de la fotorreducción del anhídrido carbónico pero independiente de él*, en el que el nitrato sustituye al

dióxido de carbono como aceptor final de electrones, según muestra el esquema de la página 29.

Más tarde, VAN NIEL y sus colaboradores ALLEN y WRIGHT (31) presentaron pruebas convincentes en favor de esta hipótesis, al demostrar que, a concentraciones no limitantes de anhídrido carbónico y a alta intensidad de luz, las suspensiones de células de *Chlorella* desprendían más oxígeno cuando se añadía simultáneamente nitrato.

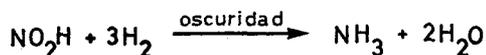
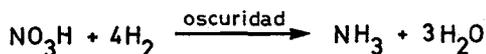
La *reducción fotosintética del nitrito* fue descubierta por KESSLER (32) en células vivas del alga *Ankistrodesmus* y por VANECKO y VARNER (33) en hojas de trigo, y fue más tarde corroborada por otros autores en otras algas (34,35) y plantas superiores (36). La reducción del nitrato en la luz transcurre estequiométricamente, de acuerdo con la ecuación:

REDUCCION FOTOSINTETICA DEL NITRITO



KESSLER (37) encontró también que *las algas verdes pueden reducir en la oscuridad el nitrato y el nitrito a amoníaco con hidrógeno molecular como donador de electrones*, según las ecuaciones:

REDUCCION DEL NITRATO Y NITRITO POR EL HIDROGENO



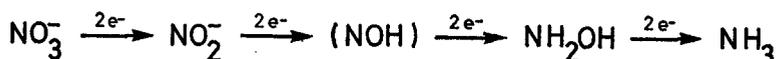
Respecto a otros posibles estadios intermedios, MEYER y SCHULTZE (38), basándose en consideraciones puramente químicas, habían propuesto a fines del siglo pasado que *la reducción biológica del nitrato a amoníaco*, proceso que implica la ganancia de ocho electrones, o átomos de hidrógeno, debía tener lugar en *cuatro pasos sucesivos de dos electrones cada uno*, a través de nitrito, hiponitrito e hidroxilamina, según indica el esquema de arriba de la página 31.

Influídos por esta sugestiva hipótesis, los bioquímicos buscaron —y

aparentemente encontraron— en una variedad de organismos (bacterias, hongos, algas y plantas superiores) los correspondientes enzimas, a los que denominaron nitrato reductasa, nitrito reductasa, hiponitrito reductasa e hidroxilamina reductasa, respectivamente. En general, estos enzimas fueron caracterizados como metaloflavoproteínas dependientes de piridín nucleótidos, concluyéndose también que el proceso fotoquímico de la asimilación del nitrato dependía de compuestos de carbono y enlaces de fosfato ricos en energía.

RUTA DE LA REDUCCION DEL NITRATO

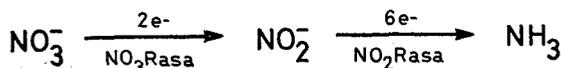
(Hipotesis de Meyer y Schultze)



Las investigaciones realizadas por el equipo de nuestro Departamento durante los últimos diez años —tanto a nivel celular como subcelular y enzimático— han puesto de manifiesto, sin embargo, que la reducción del nitrato a amoníaco en los tejidos fotosintéticos ocurre en *sólo dos estadios*, ninguno de los cuales requiere ATP ni compuestos de carbono. *Primero, el nitrato se reduce a nitrito* (cambiando de valencia +5 a +3) en una reacción que implica *dos electrones* y está catalizada por la nitrato reductasa (abreviada como NO₃Rasa). *A continuación, el nitrito se reduce a amoníaco* (cambiando de valencia +3 a —3) en una reacción que implica *seis electrones* y está catalizada por la nitrito reductasa (abreviada como NO₂Rasa). El proceso, en conjunto, transcurre pues según la ruta discutida previamente, que esquemáticamente podemos también representar así:

RUTA DE LA REDUCCION DEL NITRATO

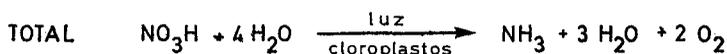
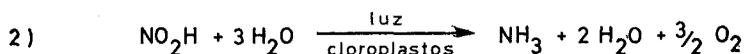
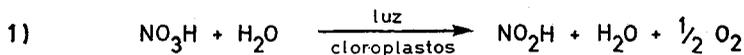
(evidencia actual)



En cuanto al proceso fotosintético en sí de reducción del nitrato a amoníaco va acompañado de fosforilación y de desprendimiento de oxígeno, y es el resultado de dos reacciones parciales: 1) la fotorreducción

del nitrato a nitrito, y 2) la fotorreducción del nitrito a amoníaco, de acuerdo con las ecuaciones siguientes:

FOTO-REDUCCION DEL NITRATO POR CLOROPLASTOS



Aquellos que estén especialmente interesados en profundizar más críticamente en la evolución de nuestros conocimientos en el área de la asimilación del nitrato pueden consultar las excelentes revisiones que sobre este tema se han escrito durante los últimos años (39-58). Nosotros, por nuestra parte, haremos a lo largo de este discurso frecuentes referencias a ellas, así como a los trabajos específicos más pertinentes, pero prestaremos particular atención a las investigaciones realizadas en nuestro propio Departamento. Mi principal propósito es presentar al día los resultados, de forma simplificada, ordenada, coherente y comprensiva, no necesariamente en sucesión cronológica ni con ambición de ser exhaustivos, sino seleccionando los que, a nuestro juicio, marcan jalones más destacados en el desarrollo del tema. En particular discutiremos los aspectos más relevantes de la Fotosíntesis del nitrógeno nítrico en algas y plantas superiores, tanto por lo que se refiere a las propiedades de los enzimas del sistema reductor de nitrato implicados en el proceso y a su regulación metabólica, como a la reproducción del propio proceso reductivo "in vitro" en un sistema reconstituido de cloroplastos.

Creo que es ésta, ocasión propicia para testimoniar, no como fórmula de mera consideración y cortesía, sino como expresión del más profundo y sincero agradecimiento, nuestro reconocimiento a las siguientes instituciones, que, con su ayuda, hicieron posible la realización de nuestros propósitos investigadores en pro de la ciencia española, en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, primero, y en la Universidad de Sevilla, después: Ministerio de Educación y Ciencia; Fondo Nacional de Ayuda a la Investigación; Instituto de Estudios Nucleares, J. E. N.; The

National Institutes of Health, USA; Philips Research Laboratories, Holanda; Fundación Manuel Aguilar; Fundación Juan March, y Laboratorios Lepetit. También quiero agradecer, con especial cariño, a mi mujer, Antonia Friend, la ingente labor de dibujar todos los esquemas y figuras.

VII. 3. Reducción del nitrato a nitrito

Tanto en algas (59-63) como en plantas superiores (56,57,60), la reducción del nitrato a nitrito está catalizada por la flavomolibdoproteína *NADH-nitrato reductasa*, complejo enzimático de alto peso molecular, cuyos mecanismos de acción y regulación presentan características tan peculiares y marcadas que lo distinguen actualmente como objeto preferente de estudio dentro de los campos de la Genética Molecular, Biofísica, Bioquímica y Fisiología Celular.

Aunque todavía no se ha elaborado un método definitivo para la *purificación* de este enzima —método que, por otra parte, ha de presentar ligeras variantes según el material vegetal elegido— cabe afirmar que la

TABLE I
PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA (62)

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad total (unidades)	Recuperación (%)	Actividad específica (mU/mg proteína)
I. Extracto crudo	1290	62,3	29,7	100	0,37
II. Sobrenadante de 27.000 g	1200	34,2	27,0	91	0,66
III. Eluato de DEAE-celulosa	1150	29,7	31,0	104	0,94
IV. Eluato de gel de fosfato cálcico	210	3,0	37,2	125	6,2
V. Precipitado de sulfato amónico (0-50%)	30	36,3	24,3	81	22,5
VI. Eluato de alúmina Cy	14,5	1,3	8,1	27	430,0
VII. Conjunto de fracciones de filtración en agarosa	20,5	0,15	2,0	6,7	666,5

cromatografía en gel de fosfato cálcico y de alúmina Cy, así como la precipitación con sulfato amónico, son pasos de purificación particularmente adecuados. La Tabla I resume, a modo de ejemplo, la purificación de casi 2.000 veces de la nitrato reductasa de hojas de espinaca (62).

El peso molecular del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*

(59-61) y de espinaca (60,62) ha sido determinado conforme a la técnica de ANDREWS (64) por filtración en columna de gel de agarosa calibrada con proteínas de peso molecular conocido. Como muestra la Fig. 1, el peso molecular del enzima de espinaca, obtenido utilizando, como proteínas de referencia, ovoalbúmina, seroalbúmina, γ -globulina y apoferritina, resultó ser de 500.000; valor idéntico arrojó el enzima de *Chlorella*. Otros autores han dado valores similares (500.000-600.000) para el enzima de

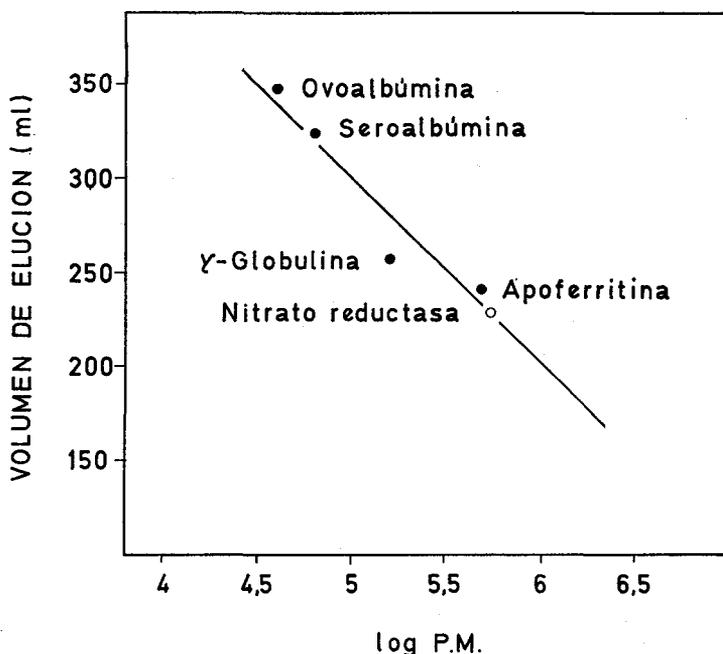


FIG. 1. *Peso molecular (500.000) del complejo NADH-nitrato reductasa de espinaca.* La determinación se llevó a cabo por filtración en columna de agarosa calibrada con proteínas de peso molecular conocido (60,62).

hojas de trigo (57), y valores submúltiplos para enzimas de variados orígenes: 230.000 para el de *Neurospora crassa* (65) y 160.000 para el de maíz (57), lo que sugiere que el complejo enzimático tenga carácter oligomérico con distintos grados de agregación.

Los resultados que se presentan en la Tabla II demuestran que el complejo nitrato reductasa de espinaca utiliza específicamente, como donador de electrones, el NADH (66). Esta especificidad por el NADH, frente al NADPH, parece ser norma general en las plantas con clorofila (62), y deben considerarse al menos como dudosos, si no erróneos, aquellos ca-

sos que han sido descritos como inespecíficos para el piridín nucleótido en plantas superiores (57).

TABLA II
ESPECIFICIDAD POR EL NADH DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA (66)

Donador de electrones	NO ₂ ⁻ formado
	(μ moles)
NADH	0,63
NADPH	0,03

La perfecta *estequiometría* de la reacción catalizada por la NADH-nitrato reductasa respecto al NADH oxidado, nitrato reducido y nitrito formado ha permitido, según muestra la Tabla III, poner a punto un *método de ensayo* muy exacto, simple y rápido *para la determinación* espectrofotométrica o colorimétrica *del nitrato*, utilizando como catalizador para su reducción el enzima de espinaca (67).

TABLA III
ESTEQUIOMETRIA DE LA REDUCCION DEL NITRATO A NITRITO POR EL NADH, CATALIZADA POR LA NADH-NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA (67)

NO ₃ ⁻ añadido	NADH oxidado	NO ₂ ⁻ formado
(nmoles)	(nmoles)	(nmoles)
10	10,3	10,2
30	30,2	30,1
50	49,7	50,0
70	69,8	69,5
100	99,2	100,0

En el *transporte de dos electrones* del NADH al nitrato que realiza el *complejo NADH-nitrato reductasa* (abreviado como NADH-NO₃Rasa) intervienen sucesivamente *dos actividades enzimáticas*, que, como indica

esquemáticamente la Fig. 2, pueden ensayarse fácil e independientemente por métodos químicos. La primera es una *diaforasa* dependiente de FAD, que puede reducir una variedad de aceptores de electrones con NADH, y la segunda, la *nitrato reductasa terminal* o *nitrato reductasa propiamente dicha*, que requiere molibdeno, y a la que designaremos como

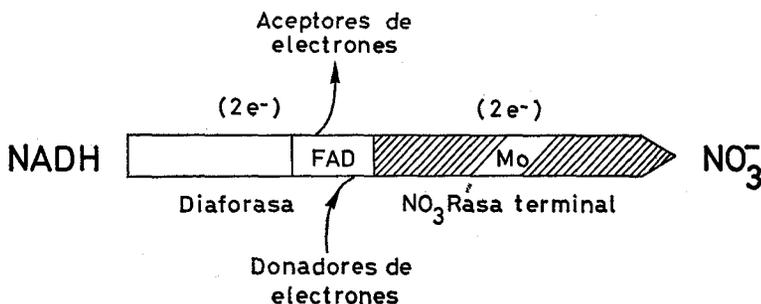


FIG. 2. Representación esquemática de la reducción enzimática del nitrato a nitrito por el NADH. El proceso, que implica la transferencia de dos electrones del NADH al nitrato, está catalizado por el complejo enzimático de alto peso molecular (500.000) NADH-nitrato reductasa. Según muestra el esquema, en la reacción conjunta participan, al menos, dos actividades enzimáticas, que, aunque naturalmente operan acopladas en secuencia, pueden también analizarse de manera artificial separadamente, drenando o introduciendo electrones a mitad de recorrido: primero, una NADH-diaforasa dependiente de FAD, que puede utilizar diversos aceptores de electrones, como el citocromo *c* o el ferricianuro, para oxidar el NADH, y segundo, la molibdo proteína nitrato reductasa propiamente dicha, o nitrato reductasa terminal, que puede utilizar flavín nucleótidos o colorantes artificiales reducidos como donadores de electrones para reducir el nitrato (60,68).

FNH₂-nitrato reductasa (abreviadamente FNH₂-NO₃Rasa), ya que puede utilizar flavín nucleótidos reducidos (tanto FADH₂ como FMNH₂) como donadores exógenos de electrones para la reducción del nitrato a nitrito (60,68).

La *especificidad* que exhibe la NADH-nitrato reductasa por el piridín nucleótido cuando cataliza la reducción del nitrato es lógicamente la misma que muestra cuando actúa como *diaforasa* frente a otros aceptores de electrones. Como enseña la Fig. 3, la actividad diaforásica propia del complejo es patente sólo frente a NADH y casi insignificante con NADPH (62).

Aunque la evidencia actual (57,62,68) apoya fuertemente el criterio de que el NADH es el donador fisiológico inicial de electrones de la NADH-

nitrito reductasa, no se sabe hasta qué punto los *flavín nucleótidos reducidos* —en forma libre o como grupos prostéticos de enzimas— pueden también tener importancia fisiológica como *donadores "intermedios"* a nivel de la FNH₂-nitrito reductasa. De hecho, numerosos experimentos (69,70) han demostrado que "in vitro" los flavín nucleótidos pueden me-

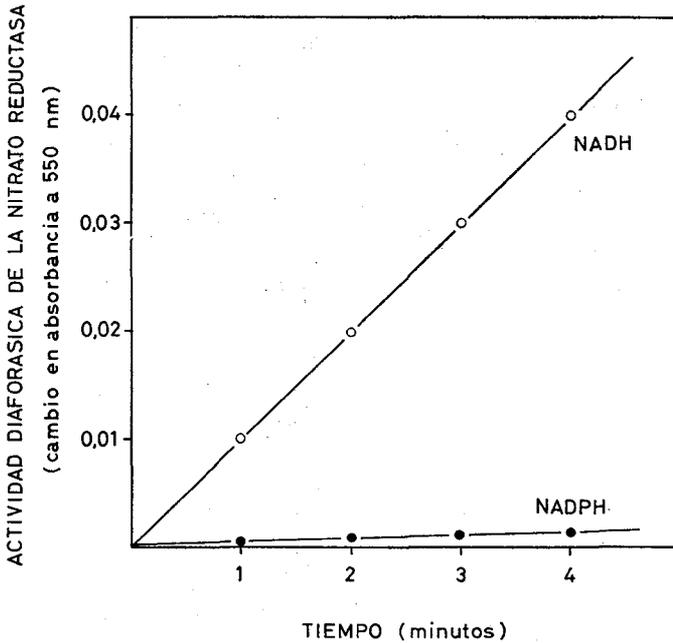


FIG. 3. Especificidad por el NADH de la diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*. La actividad diaforásica se determinó espectrofotométricamente frente a NADH y NADPH, utilizando citocromo *c* como aceptor de electrones (62).

diar en la reducción del nitrato por la nitrato reductasa terminal (sin que en estos casos sea necesario el concurso de la NADH-diaforasa inicial del complejo), actuando como *transportadores de los electrones suministrados por una variedad de sistemas enzimáticos auxiliares*; a saber, "grana" iluminados de cloroplastos, hidrógeno-hidrogenasa, NADPH-diaforasa y NADH-diaforasa, según indica el esquema de la Fig. 4. Para evitar confusionismos conviene, sin embargo, aclarar aquí que tanto la NADPH-diaforasa (71) como la NADH-diaforasa (70) que acoplan, a través de los flavín nucleótidos, con la nitrato reductasa terminal han sido bien caracterizados como enzimas cloroplásticas distintos de la NADH-diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa. Experimentos futuros (especialmente

con mutantes carentes de la actividad diaforásica propia de la nitrato reductasa) podrán demostrar si efectivamente alguno de los sistemas reseñados —u otros equivalentes— participan “in vivo” en rutas reductivas del nitrato que obvian el requerimiento de NADH.

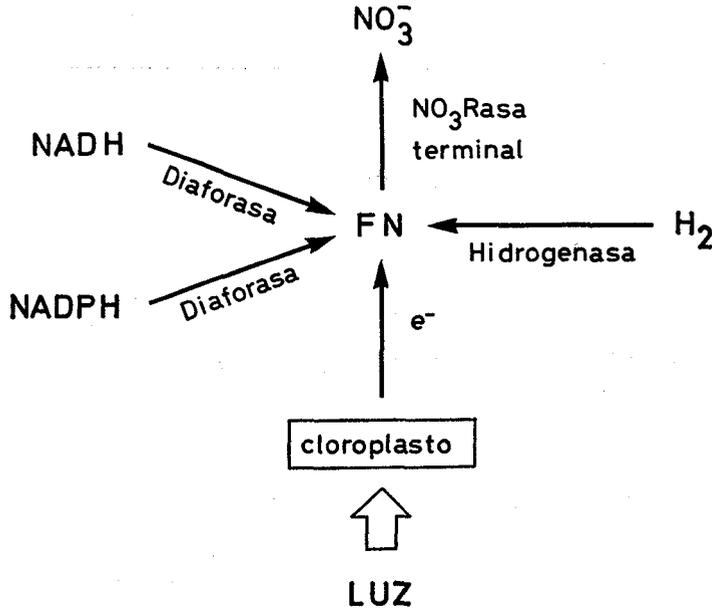


FIG. 4. Representación esquemática de la función mediadora de los flavín nucleótidos (FN) como transportadores de electrones en la reducción enzimática del nitrato a nitrito. Los flavín nucleótidos reducidos por una variedad de sistemas donadores de electrones (grana iluminados, hidrógeno-hidrogenasa, NADH-NADH diaforasa, NADPH-NADPH diaforasa) pueden actuar, a su vez, como donadores de electrones en la reacción catalizada por la nitrato reductasa terminal del complejo NADH-nitrato reductasa.

Puesto que el *hidrosulfito* reduce químicamente a los flavín nucleótidos —y a sus sustitutos artificiales en la reacción catalizada por la nitrato reductasa terminal, los viológenos—, su uso como *reductor* ha resultado muy útil para el estudio y ensayo rutinario de la actividad del enzima (57,62).

Las dos actividades (*NADH-diaforasa* y *FNH₂-nitrato reductasa*) del complejo enzimático NADH-nitrato reductasa, tanto de algas como de plantas superiores, se distinguen nítidamente entre sí por su *diferente sensibilidad al tratamiento térmico y a la acción de inhibidores selectivos* (68). En efecto, mientras que el calentamiento suave a 45° durante cinco mi-

nutos y la incubación con *p*-cloromercuribenzoato a baja concentración inactivan completamente la NADH-diaforasa (Tabla IV) sin afectar a la FNH₂-nitrato reductasa (Tabla V), el cianuro y la azida inhiben totalmente a la segunda actividad (Tabla V) sin influir sobre la primera (Tabla IV).

TABLA IV

EFECTO DEL CALENTAMIENTO E INHIBIDORES EN LA ACTIVIDAD DIAFORASICA PROPIA DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA (68)

Tratamiento o adición	Inhibición
	(%)
Enzima calentado 5 min a 45° C	90
pCMB 0,1 mM	100
CNK 1 mM	0
N ₃ Na 1 mM	0

Naturalmente, tanto el calor como cualquiera de los inhibidores mencionados impiden la reducción del nitrato por el NADH catalizada por el complejo enzimático en conjunto (Tabla VI).

TABLA V

EFECTO DEL CALENTAMIENTO E INHIBIDORES EN LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASICA TERMINAL PROPIA DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA (68)

Tratamiento o adición	Inhibición
	(%)
Enzima calentado 5 min a 45° C	12
pCMB 0,1 mM	18
CNK 1 mM	100
N ₃ Na 1 mM	100

TABLA V.

EFEECTO DEL CALENTAMIENTO E INHIBIDORES EN LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA (68)

Tratamiento o adición	Inhibición (%)
Enzima calentado 5 min a 45° C	95
pCMB 0,1 mM	95
CNK 1 mM	100
N ₃ Na 1 mM	100

Es muy interesante el hecho de que, tanto en *Chlorella* (72) como en espinaca (73), la inactivación por el calor de la mitad diaforásica del complejo NADH-nitrato reductasa puede prevenirse si el tratamiento se efectúa en presencia de cantidad mínima de FAD, bastando concentraciones del orden de 1 micromolar para preservar el 50% de la actividad. (A este respecto merece recordarse (52) que la Km de la nitrato reductasa terminal por los flavín nucleótidos reducidos, como donadores de electrones, es bastante más alta, del orden de 20 micromolar). La Tabla VII muestra que

TABLA VII

EFEECTO PROTECTOR DEL FAD CONTRA LA INACTIVACION TERMICA DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA DE *Chlorella* (72)

Adición	Concentración (mM)	NO ₂ ⁻ formado (nmoles)
Ninguna		0
NADH	0,6	0
FAD	0,02	44
FMN	0,02	2,5
MV	0,8	0
NO ₃ ⁻	10	0
Ninguna, no calentado		48

El tratamiento térmico previo de la preparación enzimática se efectuó a 45° durante cinco minutos, en presencia de cada uno de los cofactores o sustratos indicados.

sólo el FAD, entre los diversos cofactores y sustratos naturales y artificiales ensayados, es capaz de proteger específicamente al enzima contra la inactivación térmica (72). Análogamente, *la inhibición de la diaforasa por el p-cloromercuribenzoato puede también prevenirse, en el caso del enzima de espinaca, no sólo por el FAD sino por el NADH* (73). La Fig. 5 muestra el efecto protector de distintas concentraciones de NADH contra la inactivación de la diaforasa por el p-cloromercuribenzoato (73). El enzima

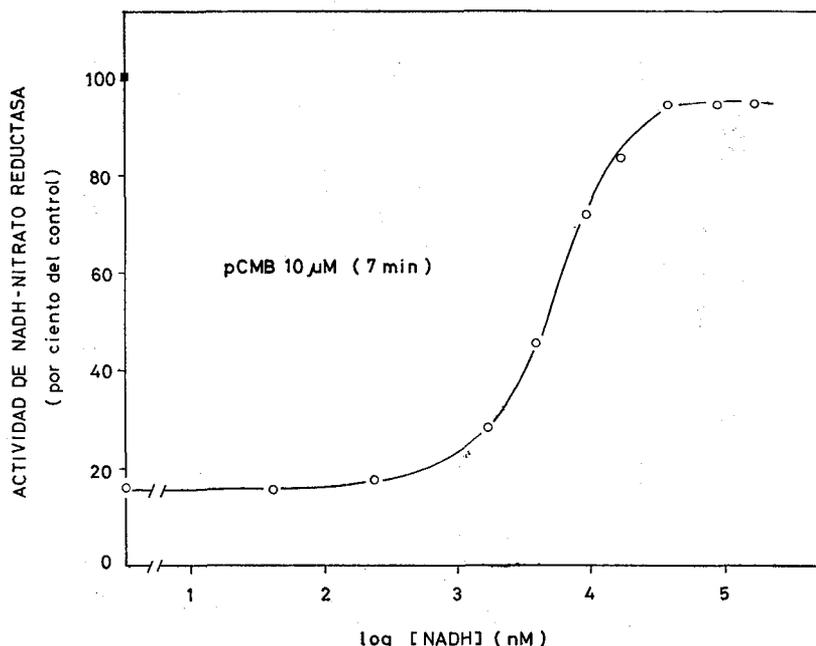


FIG. 5. Efecto protector del NADH contra la inactivación del complejo NADH-nitrato reductasa de espinaca por el pCMB. La actividad se estimó después de siete minutos de preincubación a temperatura ambiente en presencia del inhibidor y de concentraciones crecientes de NADH. El valor control de actividad (100%) corresponde al enzima preincubado en ausencia de inhibidor (73).

de *Chlorella* parece más estricto en cuanto a su protección contra los mercuriales, pues sólo se protege por el NADH, no por el FAD (74). En cualquier caso, la protección requiere que el enzima no haya sido inactivado anteriormente por el calor o por preincubación con el derivado mercuríco, ya que entonces la posterior adición de NADH o FAD no ejerce efecto protector alguno. Aparentemente, cuando estos nucleótidos piridínicos o flavínicos específicos se unen previamente a la proteína por sus sitios

activos la hacen especialmente resistente contra la desnaturalización térmica o la inhibición química.

Estos fenómenos explican no sólo la especial sensibilidad de la NADH-diaforasa (y, en consecuencia, de la NADH-nitrato reductasa) frente al calor y a los compuestos de mercurio, sino la extraordinaria *labili-*

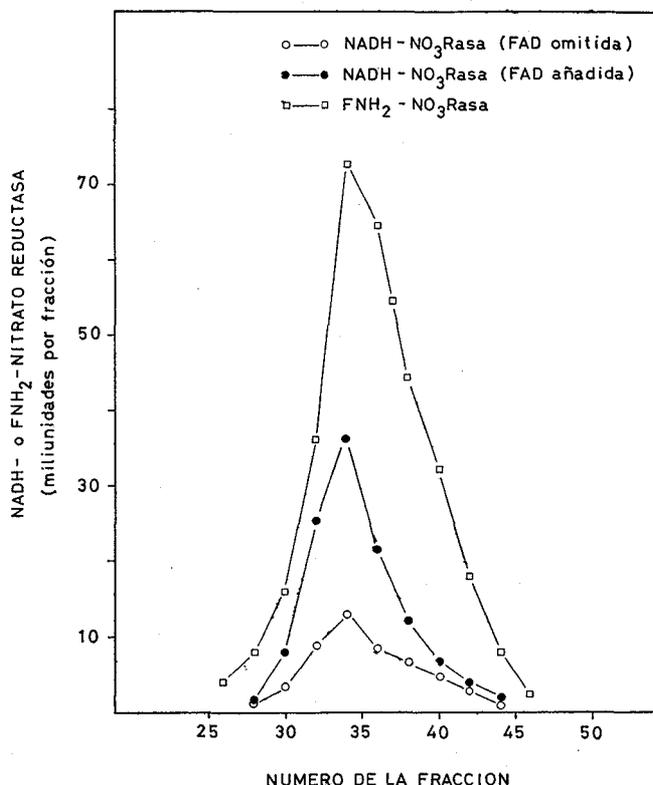


FIG. 6. Estimulación por el FAD de la actividad NADH-nitrato reductasa de *Chlorella* después de la filtración con gel de agarosa. Las fracciones se ensayaron inmediatamente después de su salida de la columna, tras la adición, en su caso, de FAD 20 micromolar (59).

dad del enzima durante la purificación, especialmente durante la filtración con gel, proceso que parece remover fácilmente el derivado flavínico (59, 73). Por ello, el FAD no es sólo agente estabilizador a concentraciones muy bajas durante la conservación o purificación del enzima, sino que su efecto activador —que no es demostrable con preparaciones crudas— se hace evidente después del tratamiento con Sephadex o agarosa, como muestra la Fig. 6 para el enzima de *Chlorella* (59).

Es significativo que hasta la fecha sólo este tipo de ataque haya permitido identificar al *FAD* como *grupo prostético de la mitad diaforásica* del complejo NADH-nitrato reductasa. Así VENNESLAND y JETSCHMANN (75) intentaron sin éxito resolver el enzima en apoenzima y flavina libre por el método clásico del tratamiento con sulfato amónico en medio ácido. Por otro lado, el *espectro de absorción* de las preparaciones más pu-

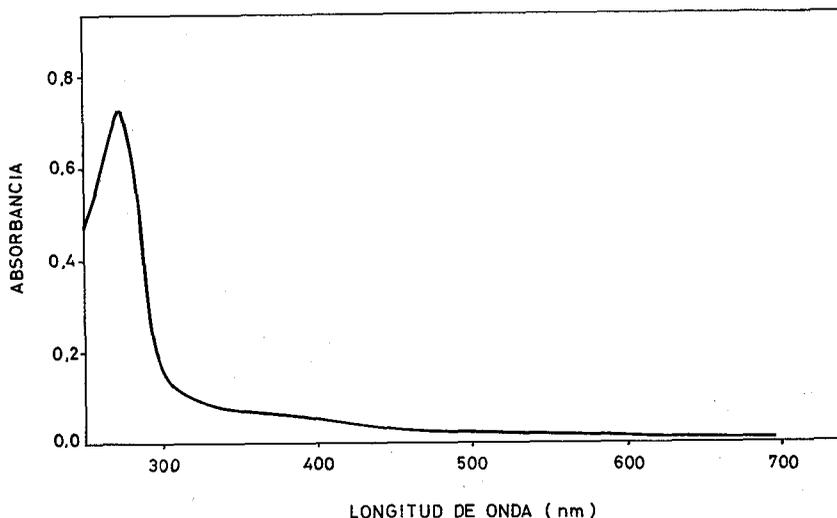


FIG. 7. *Espectro de absorción de la NADH-nitrato reductasa de espinaca.*

rificadas de nitrato reductasa de diversos orígenes (60,62,72) no muestra —a diferencia de las flavoproteínas típicas— indicación alguna de bandas de absorción de nucleótidos flavínicos, sino más bien —como enseña la Fig. 7, correspondiente al enzima de espinaca— una *absorción generalizada a lo largo de toda la zona visible, con un hombro alrededor de 410 nm.*

Por lo que se refiere a la segunda mitad del complejo enzimático, es decir a la *FNH₂-nitrato reductasa*, la *acción inhibitoria del cianuro* merece especial atención (73,74). Como indica la Tabla VIII (74), el cianuro sólo ejerce su potente efecto inhibitor en tanto en cuanto el *enzima*, en este caso de *Chlorella*, se mantiene en estado *reducido* por la adición del donador fisiológico NADH —o alternativamente de FNH₂, o incluso de NADPH—. La adición simultánea de nitrato protege competitivamente al enzima de la inhibición por cianuro; sin embargo, una vez el cianuro ha sido fijado por el enzima reducido, el nitrato no es capaz de superar

TABLA VIII

INHIBICION POR EL CIANURO Y PROTECCION POR EL NITRATO DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Chlorella* REDUCIDA POR EL NAD(P)H (74)

Adición	NADH oxidado (nmoles por min)
Ninguna	34
CN^-	29
NADH	30
CN^- , NADH	4
CN^- , NADH, NO_3^-	24
NADPH	24
CN^- , NADPH	7
CN^- , NADPH, NO_3^-	32
CN^- , NAD^+	27
CN^- , NADP^+	27

La actividad se estimó después de preincubar el enzima a temperatura ambiente durante siete minutos con los compuestos que se indican.

esta inhibición, que es entonces, en consecuencia, como muestra la Fig. 8 para el enzima de espinaca (73), de carácter no competitivo, con una K_i de 0,2 micromolar. *El ferricianuro*, no obstante, *revierte*, incluso en estas condiciones, *la inhibición producida por el cianuro*, probablemente porque, dado su extremado carácter de "ladrón" de electrones, oxida al enzima, liberándolo de la acción del inhibidor (74).

En contraste con el cianuro, *la azida ejerce una acción inhibidora* que no parece depender del estado de reducción del enzima, aunque conserva su carácter competitivo frente al nitrato (73,74). De especial relevancia desde el punto de vista fisiológico puede ser —como discutiremos más adelante— *la inhibición por el carbamil fosfato* (73,74), también del tipo competitivo, con una K_i de 60 micromolar, según muestra la Fig. 9 para el enzima de *Chlorella* (74).

Finalmente, merece mencionarse que la nitrato reductasa de plantas fotosintéticas —a semejanza del enzima de bacterias (76)— puede utilizar *clorato* como *aceptor terminal de electrones*, con parecida velocidad

máxima respecto al nitrato, pero con afinidad del orden de 10 veces menor (73,74). Es también digno de subrayarse que ninguno de los inhibidores antes citados (cianuro, azida o carbamil fosfato) puede actuar como aceptor de electrones, al modo de como funcionan con la nitrogenasa (21). El mecanismo de acción de estos compuestos sobre la nitrato reductasa está seguramente relacionado con su capacidad quelante de me-

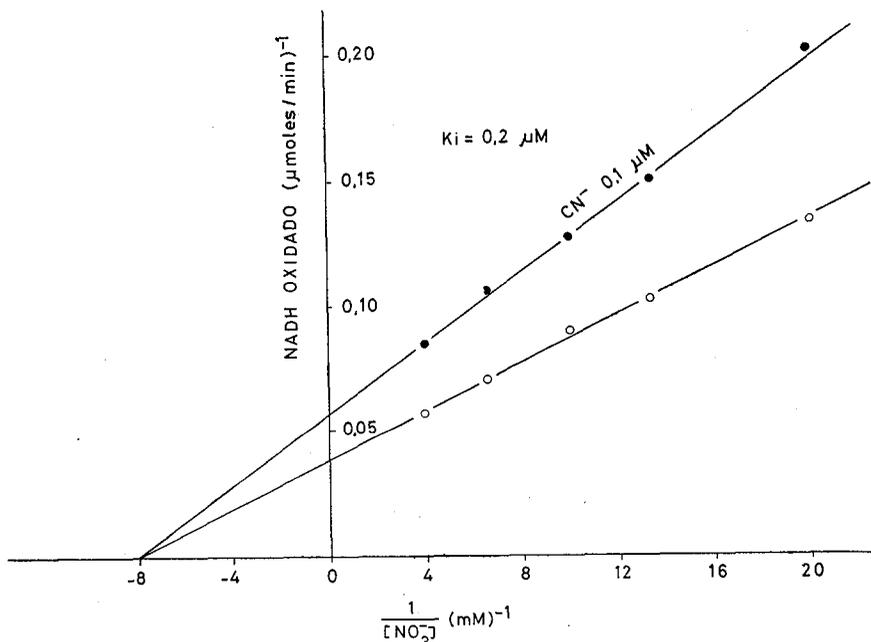


FIG. 8. Inhibición no competitiva respecto al nitrato de la NADH-nitrato reductasa de espinaca previamente tratada con cianuro en presencia de NADH. Después de siete minutos de preincubación a temperatura ambiente, se estimó la actividad NADH-nitrato reductasa en función de la concentración de nitrato (73).

tales, concretamente del molibdeno. Esto nos lleva ahora, de manera inmediata, a considerar el papel de este elemento traza en la reducción del nitrógeno, aspecto singular que, por su primordial importancia, debe ciertamente ser tratado con prolijidad en sus principales facetas.

Desde los experimentos de BORTELS, en 1930, sobre la fijación del nitrógeno gaseoso por *Azotobacter chroococcum* (77), se sabe que el molibdeno ocupa una posición excepcionalmente destacada en el metabolismo del nitrógeno inorgánico. La función bioquímica del molibdeno no se limita, sin embargo, a su papel en la fijación del nitrógeno molecular, pro-

ceso que, en los últimos años, ha sido exhaustivamente investigado a nivel celular y enzimático (21,78). La primera prueba de que el molibdeno es también esencial para la *utilización del nitrato* se debe a STEINBERG (79), quien en 1937 puso de manifiesto el requerimiento absoluto que presenta el *Aspergillus niger* por este oligoelemento, pero sólo cuando el hongo crece en medios con nitrato, no cuando utiliza nitrógeno amónico como fuente de nitrógeno.

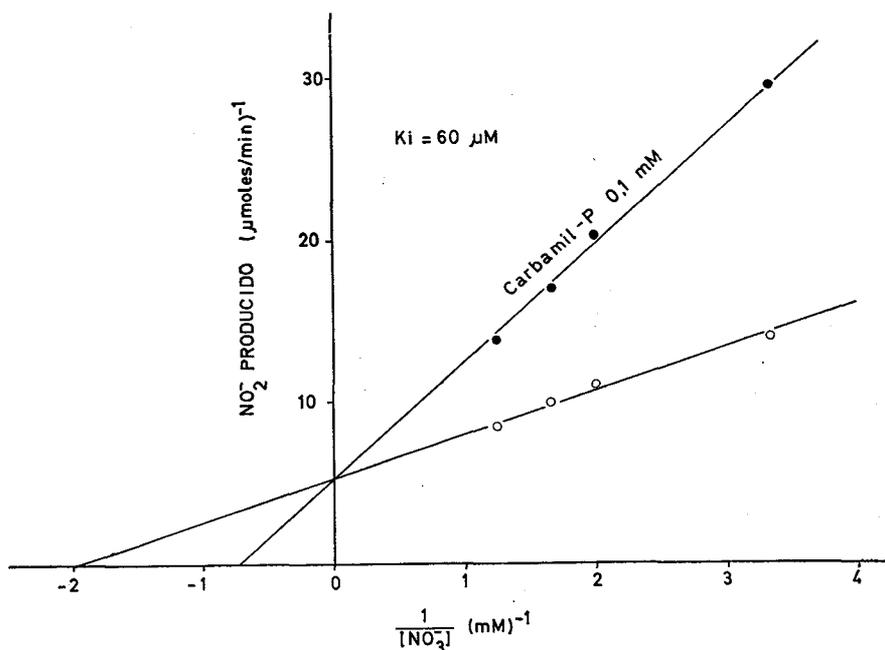


FIG. 9. Inhibición por el carbamíl fosfato en competencia con el nitrato de la NADH-nitrato reductasa de *Chorella* (74).

La esencialidad del molibdeno fue también ratificada en plantas superiores, en 1939, por ARNON y STOUT (80), al conseguir producir matas deficientes de tomate en condiciones estrictamente controladas. Desde entonces, muchos investigadores han demostrado que el molibdeno es indispensable para una variedad de microorganismos y plantas (45,48). Aunque las plantas superiores cultivadas con nitrato en medios deficientes en molibdeno muestran muchos efectos que pueden razonablemente explicarse por la función del molibdeno en la reducción del nitrato, existen otros que aparentemente no están relacionados con la fuente de nitrógeno utilizada (45). Sin embargo, en las algas clorofíceas *Chlorella* (81)

y *Scenedesmus* (82,83), la función del molibdeno se limita exclusivamente a la reducción del nitrato, ya que la indispensabilidad por el metal para el crecimiento queda abolida cuando se emplean, como sustitutos del nitrato, formas reducidas de nitrógeno, tales como el amoníaco o la urea.

Respecto a la asociación del molibdeno con la nitrato reductasa, la primera y casi única evidencia relativamente convincente era hasta la fecha la concerniente al enzima de *Neurospora* (65,84) y de hojas de soja (85). Las técnicas analíticas usuales (colorimetría, absorción atómica, espectrografía) no han conducido a resultados conclusivos, ni siquiera cuan-

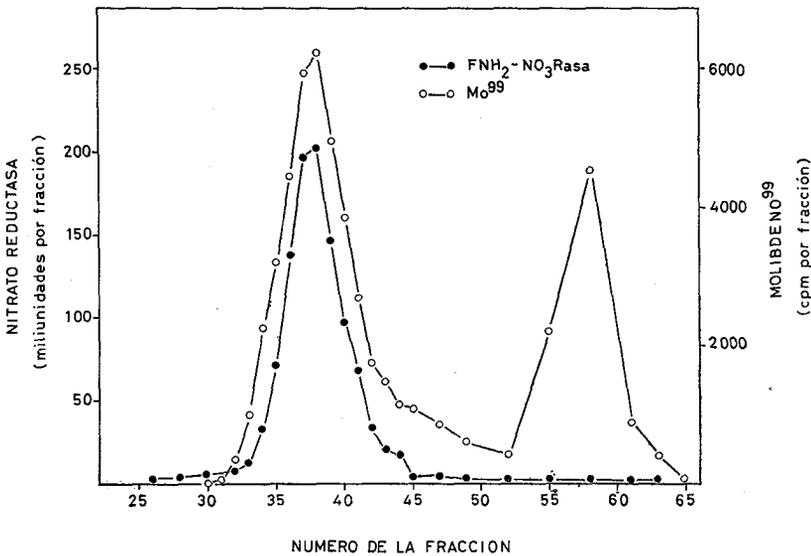


FIG. 10. Paralelismo entre la actividad de la nitrato reductasa de *Chlorella* y la radioactividad del Mo^{99} . Las fracciones analizadas corresponden a las obtenidas tras el paso de purificación del enzima por filtración con gel de agarosa (89).

do se han utilizado las preparaciones enzimáticas más puras (68,76). Además, algunos autores han defendido obstinadamente que el molibdeno era inductor de la síntesis de la nitrato reductasa y no meramente componente del enzima (86,87). Experimentos recientes, que a continuación resumimos, han permitido, sin embargo, identificar sin lugar a dudas al molibdeno como constituyente de la nitrato reductasa, y han demostrado además su esencialidad como elemento funcional en la reducción del nitrato, resolviendo de una vez y definitivamente a nivel molecular la tan

debatida cuestión del papel de este micronutriente en el metabolismo del nitrógeno nítrico.

El requerimiento en molibdeno para el crecimiento de Scenedesmus en medios con nitrato, determinado por ARNON et al. (82), es extraordinariamente bajo, del orden de 1 a 10 nm. También en Chlorella bastan concentraciones similares para alcanzar un crecimiento vigoroso, por lo que es suficiente, sin más aditamento, con las impurezas del metal que normalmente contiene el medio de cultivo para lograr crecimientos óptimos (88).

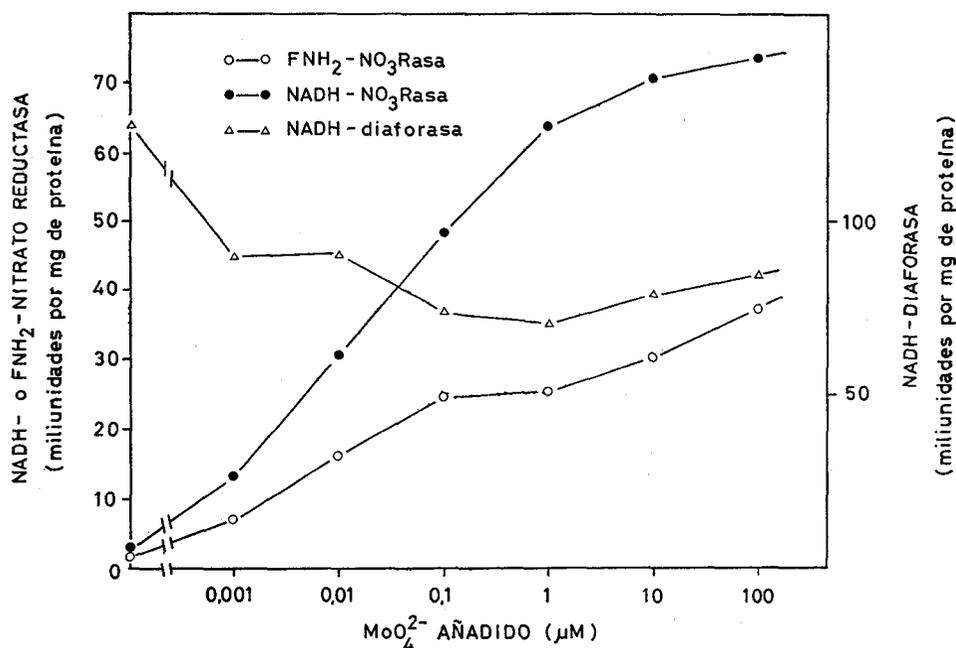


FIG. 11. Efecto de la concentración del molibdato añadido al medio en los niveles de actividad de los enzimas del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*. Las actividades enzimáticas se determinaron en los extractos celulares de los correspondientes cultivos (88).

Suministrando molibdato marcado con Mo⁹⁹ a células de *Chlorella* procedentes de un cultivo con sulfato amónico —en el momento de iniciarse la derrepresión del enzima reductor de nitrato, como consecuencia de la eliminación de amoníaco del medio (véase pág. 63)— se ha conseguido (89) la incorporación de molibdeno radioactivo a la nitrato reductasa sintetizada “de novo”. La estrecha correspondencia entre la actividad del enzima y la radioactividad del Mo⁹⁹ tras la purificación por filtración en gel

de agarosa (antes y después de la asociación del enzima con azul dextrano) permite concluir (89) que *el molibdeno es un componente de la nitrato reductasa* (Fig. 10). Experimentos similares han conducido a los mismos resultados en espinaca (90,91).

Aunque la *adición de molibdato al medio* standard de cultivo hasta concentraciones de 100 micromolar no afecta prácticamente al crecimiento de *Chlorella* (1 mM produce ya clara inhibición), *el efecto en los niveles*

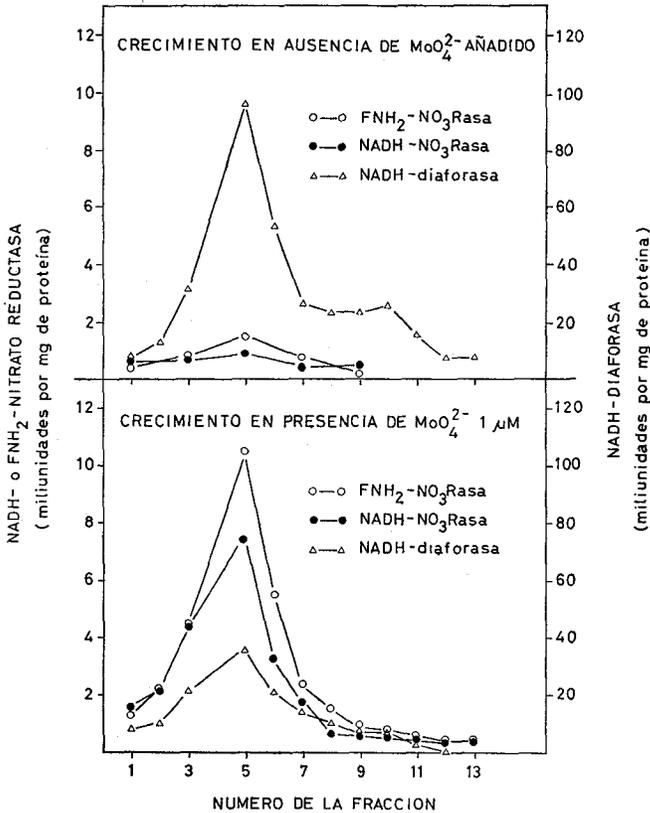


FIG. 12. *Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de extractos de células de Chlorella (cultivadas en medio con y sin molibdato añadido) respecto a la distribución de las actividades del complejo NADH-nitrato reductasa (88).*

de actividad de la nitrato reductasa es sorprendentemente marcado (Fig. 11). La realidad es que mientras, en los extractos celulares, el nivel de la NADH-diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa alcanza su valor

máximo —incluso más alto que el normal— a concentraciones mínimas de molibdeno, los niveles de actividad de la NADH-nitrato reductasa y de la FNH_2 -nitrato reductasa son originalmente bajos (aunque suficientes para un crecimiento óptimo) y aumentan gradualmente hasta 20 veces el valor inicial, a medida que se eleva la concentración del metal en el medio (88).

Al someter al *análisis por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa* los extractos de células de *Chlorella* cultivadas en ausencia de molibdato y, alternativamente, en presencia de molibdato 1 micromolar, las actividades del complejo NADH-nitrato reductasa se distribuyen, como puede verse en la Fig. 12, coincidiendo todas ellas en las mismas fracciones (88). Esto sugiere que *el complejo proteico se forma íntegramente tanto en presencia como en ausencia de molibdeno, si bien en este último caso sólo es activo como diaforasa. El metal, por tanto, no es necesario como inductor para la síntesis, en todo o en parte, de la proteína, sino más bien como constituyente funcional indispensable para la actividad de su segunda mitad, o nitrato reductasa propiamente dicha.*

Particular interés —especialmente por cuanto atañe a posibles repercusiones prácticas inmediatas de vasto alcance— presenta la inhibición por el volframio del crecimiento de microorganismos, algas y plantas superiores en medios con nitrato. En 1956, HIGGINS *et al.* (92) encontraron que el tungsteno es un inhibidor competitivo del molibdeno en *A. niger* cuando el nitrato es la única fuente de nitrógeno. Experimentos similares en *Azotobacter vinelandii* (93,94) demostraron que el volframio compite con el molibdeno tanto en la utilización del nitrato como en la fijación del nitrógeno molecular.

La Fig. 13 muestra que *el tungsteno impide muy eficazmente el crecimiento de Chlorella en medios con nitrato* a los que no se añade molibdeno. La inhibición alcanza valores superiores al 50 por ciento a concentración de tungstato 1 micromolar y llega a ser prácticamente total por encima de 10 micromolar. No obstante, *la adición de molibdeno —en proporción 1:10 respecto al volframio— a los cultivos inhibidos revierte por completo el efecto preventivo del tungsteno*, efecto que, por otro lado, permanece inalterado en los correspondientes cultivos controles (88).

La fotografía en color correspondiente a la Fig. 14 muestra el aparato para el cultivo de algas instalado en nuestro Departamento de la Universidad de Sevilla.

Como indican las Figs. 15-17, *el tungsteno sólo interfiere con el creci-*

miento de *Chlorella* cuando la fuente de nitrógeno es nitrato. Si se sustituye el nitrato (Fig. 15) por nitrito (Fig. 16) o por amoníaco (Fig. 17), el efecto "herbicida" del volframio desaparece totalmente, incluso cuando su concentración alcanza valores (100 micromolar) que, en las mismas condiciones, determinan una paralización absoluta del crecimiento en medios con nitrato (88,95). El papel del molibdeno en la asimilación del nitrato por células de *Chlorella* se limita, por tanto, exclusivamente a la reducción del nitrato a nitrito.

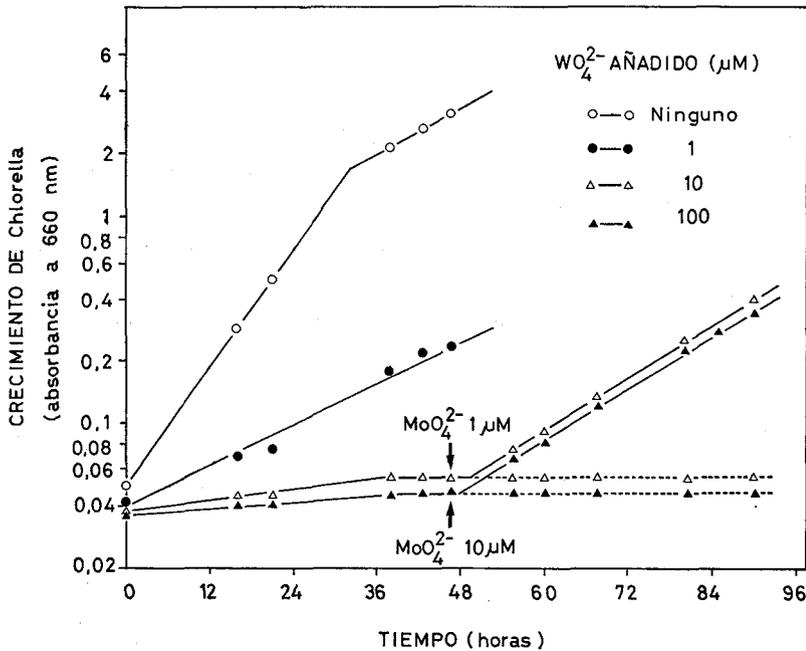


FIG. 13. Efecto de la concentración de tungstato en el crecimiento de *Chlorella* en medios con nitrato (sin molibdato añadido), y reversión de la inhibición por la posterior adición de molibdato (88).

AFRIDI y HEWITT (86) ensayaron la posibilidad de sustituir el molibdeno por volframio en tejidos de plantas deficientes en molibdeno, pero no observaron ningún efecto estimulante ni antagónico en la actividad de la nitrato reductasa. Más recientemente, sin embargo, HEIMER *et al.* (96) y WRAY y FILNER (97) han examinado el efecto del volframio en competencia con el molibdeno en la formación del enzima activo en cultivos de células de tabaco y en tallos de cebada, encontrando que el complejo en-

zimático se forma en presencia de tungsteno, pero sólo es funcional con respecto a su actividad diaforásica.

La Tabla IX muestra el efecto del volframio, en competencia con el molibdeno, en las actividades enzimáticas del sistema reductor de nitrato de *Chlorella* (88,95). Como puede verse, el tungsteno interfiere sólo con los niveles de actividad —dependiente de molibdeno— de la nitrato reductasa (ensayada con NADH o con FNH₂ como donador de electrones); en cambio no afecta a la síntesis del complejo NADH-nitrato reductasa (estimada por su actividad NADH-diaforasa). Experimentos similares han conducido a los mismos resultados en espinaca (90).

TABLA IX

EFFECTO DEL TUNGSTATO EN COMPETENCIA CON EL MOLIBDATO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LOS ENZIMAS DEL SISTEMA REDUCTOR DE NITRATO DE *Chlorella* (95)

MoO ₄ ²⁻	WO ₄ ²⁻	NADH-diaforasa	NADH-NO ₃ Rasa	NO ₂ Rasa
(μM)		(miliunidades por mg de proteína)		
0,1	0	116	98	101
0,1	1	115	34	104
0,1	10	128	5	148
0,1	100	200	5	230

Las actividades enzimáticas corresponden a extractos de células cultivadas en medios con nitrato y las cantidades indicadas de metales.

Suministrando radiovolframio a células de *Chlorella* en condiciones similares a las descritas previamente para el radiomolibdeno (véase pág. 48) se ha demostrado que también el volframio se incorpora al complejo NADH-nitrato reductasa y permanece unido a él durante los pasos habituales de purificación. Los resultados de los experimentos paralelos que recoge la Fig. 18 establecen además que el molibdeno y el tungsteno compiten por el mismo sitio activo del enzima. En efecto, cuando (a) células de *Chlorella* cultivadas con amoniaco se derreprimen en presencia de W¹⁸⁵-volframato, el complejo enzimático sintetizado "de novo" aparece

zimático se forma en presencia de tungsteno, pero sólo es funcional con respecto a su actividad diaforásica.

La Tabla IX muestra el efecto del volframio, en competencia con el molibdeno, en las actividades enzimáticas del sistema reductor de nitrato de *Chlorella* (88,95). Como puede verse, el tungsteno interfiere sólo con los niveles de actividad —dependiente de molibdeno— de la nitrato reductasa (ensayada con NADH o con FNH₂ como donador de electrones); en cambio no afecta a la síntesis del complejo NADH-nitrato reductasa (estimada por su actividad NADH-diaforasa). Experimentos similares han conducido a los mismos resultados en espinaca (90).

TABLA IX

EFFECTO DEL TUNGSTATO EN COMPETENCIA CON EL MOLIBDATO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LOS ENZIMAS DEL SISTEMA REDUCTOR DE NITRATO DE *Chlorella* (95)

MoO ₄ ²⁻	WO ₄ ²⁻	NADH-diaforasa	NADH-NO ₃ Rasa	NO ₂ Rasa
(μM)		(miliunidades por mg de proteína)		
0,1	0	116	98	101
0,1	1	115	34	104
0,1	10	128	5	148
0,1	100	200	5	230

Las actividades enzimáticas corresponden a extractos de células cultivadas en medios con nitrato y las cantidades indicadas de metales.

Suministrando radiovolframio a células de *Chlorella* en condiciones similares a las descritas previamente para el radiomolibdeno (véase pág. 48) se ha demostrado que también el volframio se incorpora al complejo NADH-nitrato reductasa y permanece unido a él durante los pasos habituales de purificación. Los resultados de los experimentos paralelos que recoge la Fig. 18 establecen además que el molibdeno y el tungsteno compiten por el mismo sitio activo del enzima. En efecto, cuando (a) células de *Chlorella* cultivadas con amoniaco se derreprimen en presencia de W¹⁸⁵-volframato, el complejo enzimático sintetizado "de novo" aparece

zimático se forma en presencia de tungsteno, pero sólo es funcional con respecto a su actividad diaforásica.

La Tabla IX muestra el efecto del volframio, en competencia con el molibdeno, en las actividades enzimáticas del sistema reductor de nitrato de *Chlorella* (88,95). Como puede verse, el tungsteno interfiere sólo con los niveles de actividad —dependiente de molibdeno— de la nitrato reductasa (ensayada con NADH o con FNH₂ como donador de electrones); en cambio no afecta a la síntesis del complejo NADH-nitrato reductasa (estimada por su actividad NADH-diaforasa). Experimentos similares han conducido a los mismos resultados en espinaca (90).

TABLA IX

EFFECTO DEL TUNGSTATO EN COMPETENCIA CON EL MOLIBDATO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LOS ENZIMAS DEL SISTEMA REDUCTOR DE NITRATO DE *Chlorella* (95)

MoO ₄ ²⁻	WO ₄ ²⁻	NADH-diaforasa	NADH-NO ₃ Rasa	NO ₂ Rasa
(μM)		(miliunidades por mg de proteína)		
0,1	0	116	98	101
0,1	1	115	34	104
0,1	10	128	5	148
0,1	100	200	5	230

Las actividades enzimáticas corresponden a extractos de células cultivadas en medios con nitrato y las cantidades indicadas de metales.

Suministrando radiovolframio a células de *Chlorella* en condiciones similares a las descritas previamente para el radiomolibdeno (véase pág. 48) se ha demostrado que también el volframio se incorpora al complejo NADH-nitrato reductasa y permanece unido a él durante los pasos habituales de purificación. Los resultados de los experimentos paralelos que recoge la Fig. 18 establecen además que el molibdeno y el tungsteno compiten por el mismo sitio activo del enzima. En efecto, cuando (a) células de *Chlorella* cultivadas con amoniaco se derreprimen en presencia de W¹⁸⁵-volframato, el complejo enzimático sintetizado "de novo" aparece

marcado con W^{185} y es inactivo como nitrato reductasa, aunque conserva inalterada su actividad diaforásica. Si, en cambio (b) la derrepresión se efectúa en presencia de W^{185} —volframato pero con molibdato frío a concentración equimolecular, el complejo enzimático que se forma incorpora, respecto al anterior, mucha menos radioactividad, a la par que exhibe

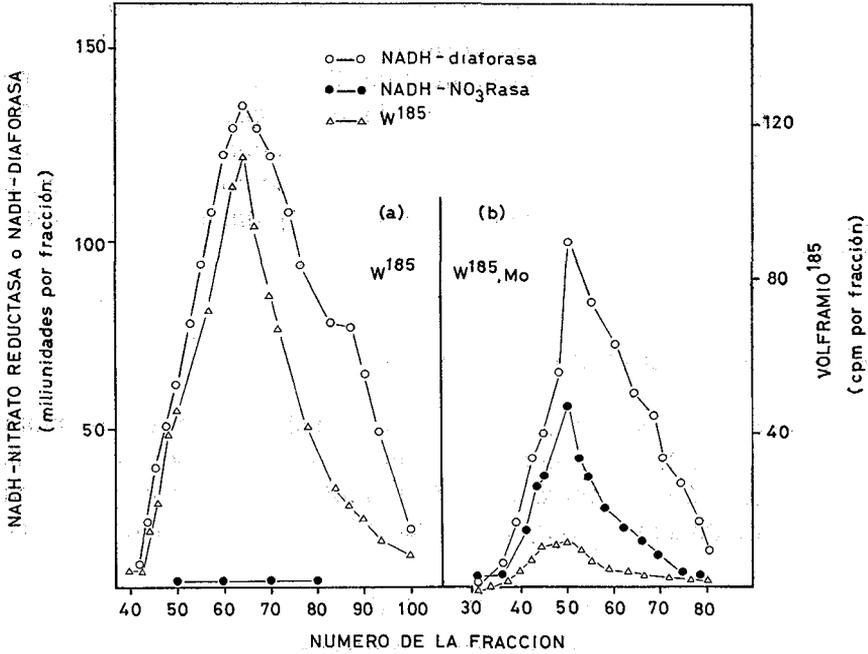


FIG. 18. Competencia entre molibdeno y volframio por el mismo sitio en la nitrato reductasa de *Chlorella*. La síntesis celular del complejo NADH-nitrato reductasa tuvo lugar en presencia de (a) W^{185} -tungstato 10 micromolar o (b) W^{185} -tungstato 10 micromolar más molibdato frío 10 micromolar. La radioactividad del W^{185} y las actividades del complejo se determinaron en las fracciones resultantes de la purificación del enzima por filtración con gel de agarosa (98).

su característica actividad de nitrato reductasa dependiente de molibdeno. La asociación del volframio con la proteína es aparentemente más débil que la del molibdeno, ya que, si se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida los respectivos complejos metalo-enzimáticos marcados con W^{185} o Mo^{99} , sólo en el primer caso se remueve fácilmente el metal, apareciendo la correspondiente radioactividad en las fracciones del frente que salen en cabeza de la proteína misma (88,98). El enzima de espinaca se comporta de manera análoga (90).

Puesto que la xantina oxidasa, el enzima responsable de la formación del ácido urico en animales, es también una molibdo proteína, cabe la posibilidad de que el tungsteno, que inhibe su actividad (99,100), sea apropiado como remedio eficaz para el tratamiento de ciertas enfermedades relacionadas con el metabolismo anormal de las purinas.

Aunque parece estar bien establecido que el citocromo b_{557} forma parte como grupo prostético de la nitrato reductasa de *Neurospora* (65, 84), no hay evidencia de que el enzima de algas (89,101) y plantas superiores (57) sea también una hemoproteína. En este sentido, el enzima de tejidos clorofílicos se asemeja más al de *Aspergillus nidulans* (102) y a la xantina oxidasa de animales (103), que carecen de citocromos. Por otra parte, incluso la participación del hierro, como simple metal, en la constitución de la nitrato reductasa de algas y plantas verdes es de momento dudosa (89,101).

VII. 4. Reducción del nitrato a amoniaco

En todas las células fotosintéticas investigadas hasta el momento (54,56,58,60,61,104), la reducción del nitrato a amoniaco está catalizada por la ferroproteína ferredoxina-nitrato reductasa, enzima que, a pesar de su tamaño relativamente pequeño, presenta la peculiaridad de transferir

TABLE X
PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA (60, 104)

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad total (unidades)	Recuperación (%)	Actividad específica (unidades/mg proteína)
I. Extracto crudo	980	49,6	660	100	0,013
II. Precipitado de acetona	132	12,6	465	70	0,277
III. Eluato de DEAE-celulosa libre de ferredoxina	120	11,7	500	76	0,356
IV. Eluato de DEAE-celulosa	27	14,8	297	45	0,550
V. Conjunto de fracciones de cromatografía en DEAE-celulosa	190	0,24	246	38	5,400
VI. Conjunto concentrado de fracciones de filtración en Sephadex G-100	3,6	0,88	92	14	28,400

seis electrones de un donador de un solo electrón al sustrato, sin que durante la reacción se libere ningún producto intermediario. El mecanismo íntimo del proceso constituye, por tanto, tema de indudable atractivo y de enorme interés fisicoquímico.

Los métodos que con más éxito se han empleado para la *purificación* de este enzima incluyen preferentemente los siguientes pasos: precipitación con acetona o fraccionamiento con sulfato amónico, adsorción en

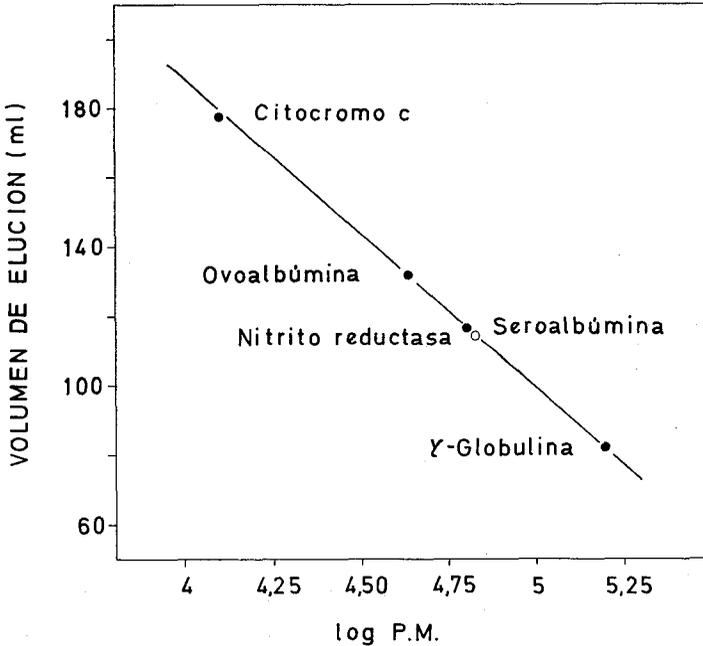


FIG. 19. *Peso molecular* (63.000) de la *nitrito reductasa de espinaca*. La determinación se llevó a cabo por filtración en columna de Sephadex G-200 calibrada con proteínas de peso molecular conocido (60, 104).

DEAE-celulosa, y filtración en Sephadex G-100. Como caso típico, la Tabla X resume la purificación, de unas 2.000 veces, de la nitrito reductasa de hojas de espinaca (60,104).

El *peso molecular* de la nitrito reductasa de diversas algas y plantas superiores, determinado por filtración en gel y por centrifugación en gradiente de sacarosa, *oscila entre 60.000 y 70.000* (56,58). La Fig. 19 muestra los resultados obtenidos con el enzima de espinaca, utilizando una

columna de Sephadex G-200, calibrada con citocromo c, ovoalbúmina, se-roalbúmina y gamma-globulina (60,104).

La nitrito reductasa utiliza específicamente ferredoxina como donador de electrones (54,56,58), aunque este transportador es eventualmente reemplazable por fitoflavina (105).

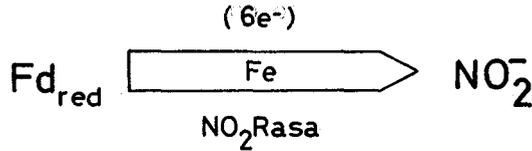


FIG. 20. Representación esquemática de la reducción enzimática del nitrito a amoníaco por la ferredoxina reducida. La reacción, que implica la transferencia de seis electrones, está catalizada por la ferroproteína nitrito reductasa, de peso molecular 63.000 (60).

La Fig. 20 representa esquemáticamente el transporte de seis electrones que realiza la nitrito reductasa, enzima dependiente de hierro, desde la ferredoxina reducida hasta el nitrito (60). La reacción transcurre estequiométricamente, reduciéndose todo el nitrito a amoníaco (54,56,58).

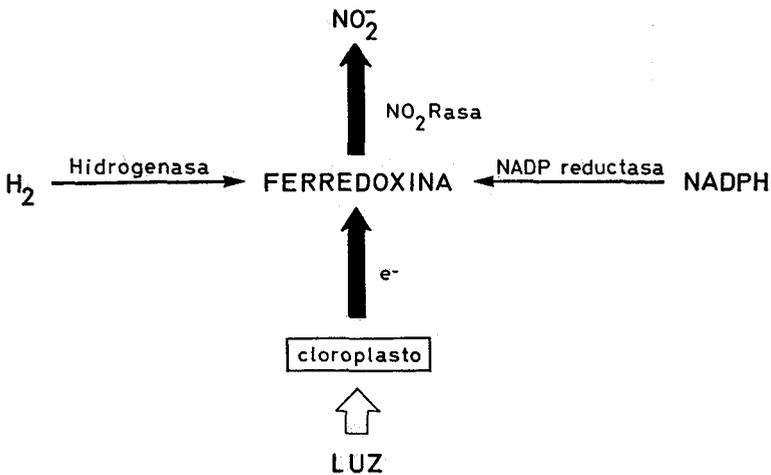


FIG. 21. Representación esquemática de la función mediadora de la ferredoxina como transportador de electrones en la reducción enzimática del nitrito a amoníaco. La ferredoxina reducida por una variedad de sistemas donadores de electrones ("grana" iluminados, hidrógeno-hidrogenasa, NADPH-NADP reductasa) puede actuar, a su vez, como donador de electrones en la reacción catalizada por la nitrito reductasa (106).

Como indica el esquema de la Fig. 21, la *ferredoxina* puede actuar como transportador de electrones en la reducción del nitrito por la nitrito reductasa, utilizando los siguientes sistemas enzimáticos auxiliares como donadores de electrones: "grana" iluminados de cloroplastos, hidrógeno-hidrogenasa y NADPH-ferredoxina reductasa (54,56,58,106,107).

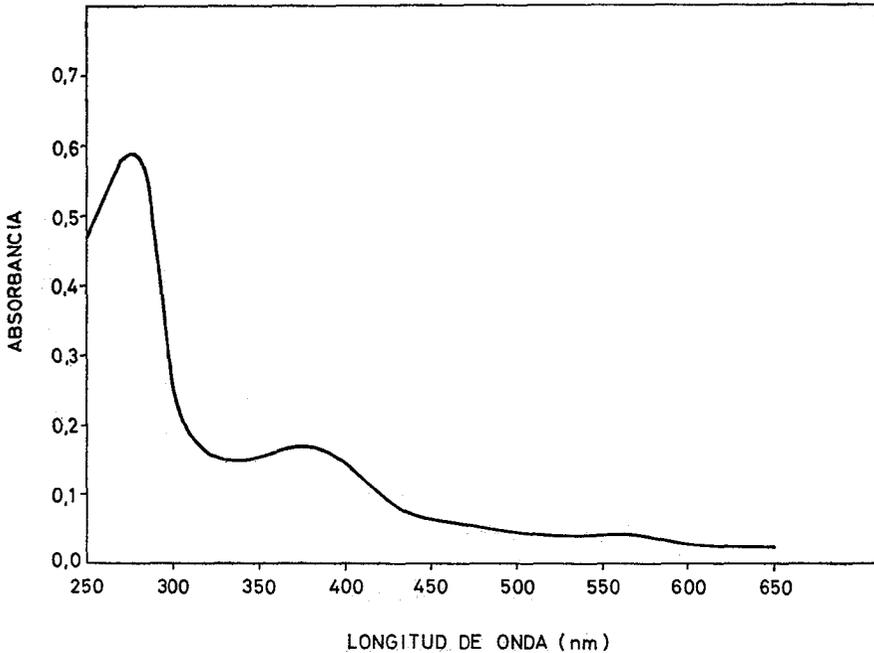


FIG. 22. Espectro de absorción de la nitrito reductasa de espinaca (60, 104).

Un donador terminal de electrones que puede emplearse cómodamente en el estudio de la reacción de reducción del nitrito por la nitrito reductasa es el hidrosulfito, que, aunque no reduce directamente al enzima, sí reduce químicamente al transportador intermedio, bien sea *ferredoxina* o su sustituto artificial en la reacción, *metil viológeno* (58,104).

El espectro de absorción de la nitrito reductasa de espinaca purificada hasta homogeneidad por electroforesis en gel de poliacrilamida muestra (58,60,104), además de la banda de absorción típica de las proteínas, dos máximos a 380 y 570 nm, y un hombro a 292 nm (Fig. 22). Idénticas características espectrales posee el enzima de otras fuentes (61, 104). En contra de la opinión defendida por numerosos autores y bastante generalizada (43,47-51,108-112) se puede afirmar que la *nitrito* reduc-

tasa de algas y plantas verdes no muestra, ni por su espectro ni por sus propiedades, indicación alguna de ser una flavoproteína (58).

Como la nitrato reductasa, la nitrito reductasa se inhibe competitivamente frente al nitrito por el cianuro, pero curiosamente, y a diferencia de aquélla, es insensible a la azida (58,104). La acción inhibitoria del cianuro se ejerce probablemente a nivel del hierro que contiene el enzima (58,60,104).

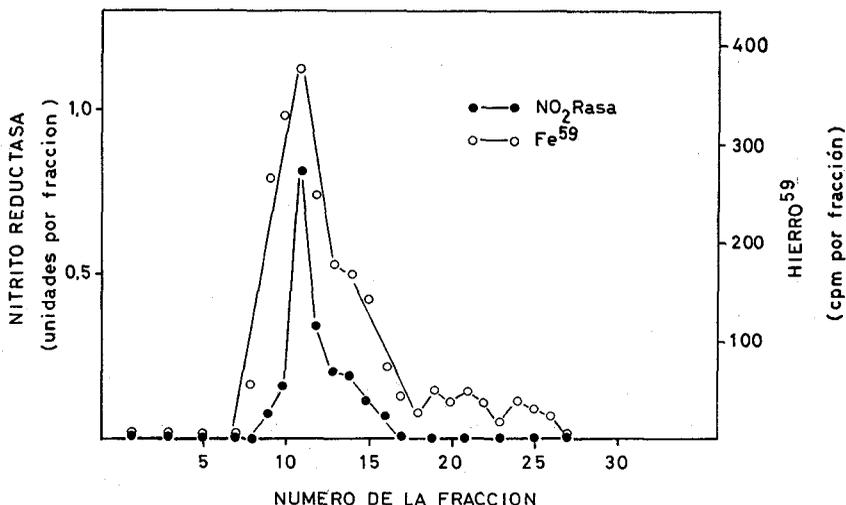


FIG. 23. Paralelismo entre la actividad de la nitrito reductasa de *Chlorella* y la radioactividad del Fe^{59} . Las fracciones analizadas corresponden a las obtenidas tras el paso de purificación del enzima por electroforesis en gel de poliacrilamida (89).

Aunque los investigadores que se han ocupado del estudio de la nitrito reductasa han adelantado repetidamente, con precipitación más digna de crítica que de encomio, que el enzima requiere —como constituyentes o activadores— diversos metales (43,47-51,56,108-110,112), la única evidencia definitiva hasta la fecha es la de la participación estructural y funcional del hierro, aparentemente en forma no hemínica (58,60,104).

Suministrando Fe^{59} , como ión ferroso, a células de *Chlorella* procedentes de un cultivo con sulfato amónico —en el momento de iniciarse la derrepresión del sistema reductor de nitrato, como consecuencia de la eliminación de amoniaco del medio (véase pág. 63)— se ha conseguido (89) la incorporación de hierro radioactivo a la nitrito reductasa sintetizada “de novo”. La estrecha correspondencia entre la actividad del enzi-

ma y la radioactividad del Fe^{59} tras la purificación del enzima por electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 23) permite concluir que *el hierro es un componente de la nitrito reductasa* (89).

El análisis del enzima puro de diversas fuentes (espinaca, calabaza y *Chlorella*) por métodos colorimétricos, espectrográficos y de absorción atómica ha revelado, además, sobre la base de un peso molecular de 63.000, que *la nitrito reductasa contiene dos átomos de hierro* (60,89,104). Los mismos métodos excluyen, sin embargo, la presencia de cobre y manganeso (104), los metales más frecuentemente propuestos (43,47-51,56).

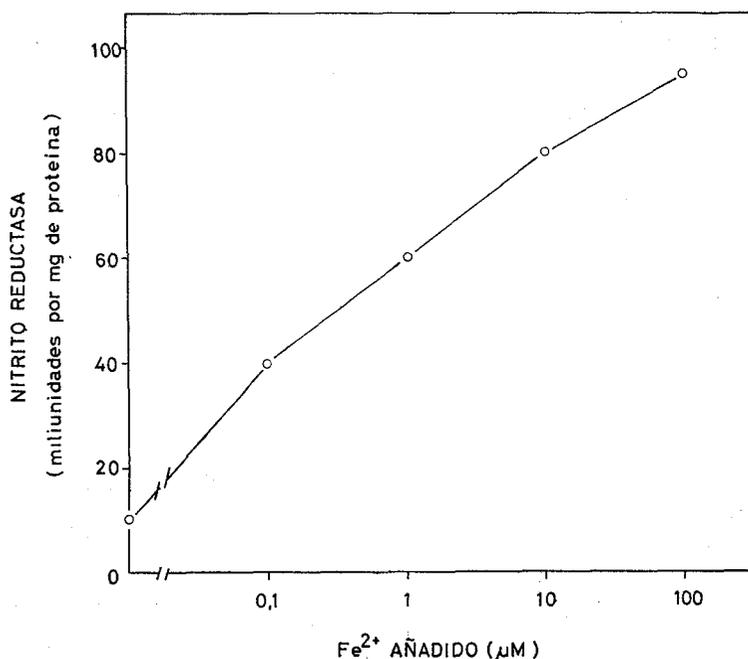


FIG. 24. *Efecto de la concentración del hierro añadido al medio en los niveles de actividad de la nitrito reductasa de Chlorella.* La actividad del enzima se determinó en los extractos celulares de los correspondientes cultivos (101).

Aunque la *adición de hierro al medio standard de cultivo* (hasta la concentración 100 micromolar) sólo afecta ligera aunque progresivamente al crecimiento de *Chlorella*, *el efecto de la provisión del metal en el nivel de actividad de la nitrito reductasa* (101) *es sorprendentemente marcado* (Fig. 24). En contraste, el nivel de los enzimas del complejo NADH-nitrato reductasa no muestra aparentemente, bajo las mismas condiciones, ninguna dependencia del suministro de hierro (101). El valor de estos resul-

tados se potencia mutuamente con el de los descritos previamente para el molibdeno (88). En contraste con la nitrato reductasa, la nítrito reductasa no incorpora molibdeno radioactivo (95). Además, la adición de molibdato al medio de cultivo, que tan drásticamente afecta a la nitrato reductasa (véase pág. 49), no ejerce influencia alguna sobre la nítrito reductasa (95). Finalmente, la adición de tungstato no sólo no interfiere con el crecimiento de *Chlorella* en medios con nítrito, sino que, como puede verse en la Tabla IX, no afecta —o incluso estimula— a la actividad de la nítrito reductasa (95).

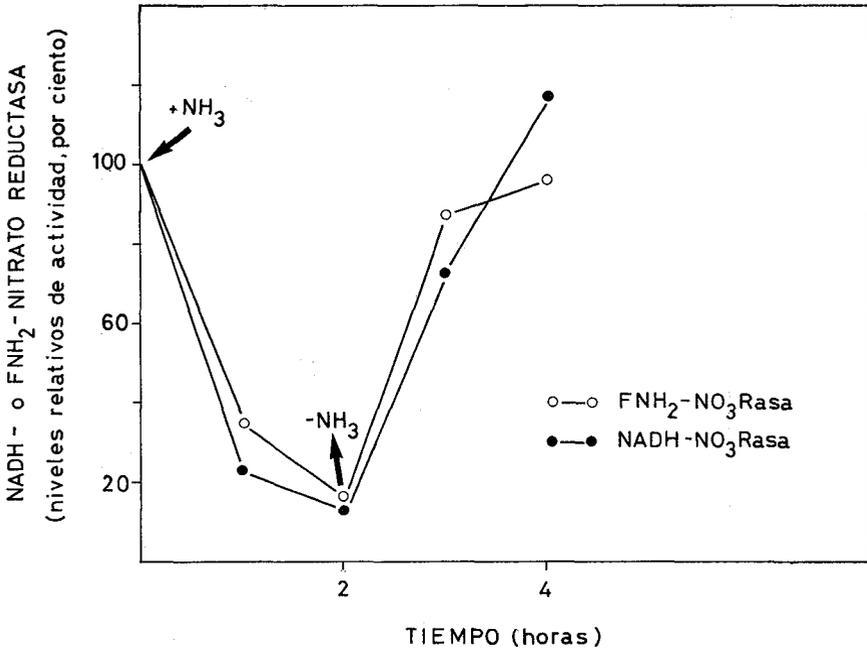


FIG. 25. Cinética de la inactivación y reactivación "in vivo" de la nitrato reductasa terminal de *Chlorella* por adición y sustracción, respectivamente, de amoníaco al medio de cultivo. Las actividades enzimáticas se determinaron en los extractos celulares a los tiempos indicados (113).

VII. 5. Regulación del sistema reductor de nitrato

La adición de amoníaco a células de *Chlorella* creciendo logarítmicamente en medios con nitrato provoca la inmediata inactivación de la FNH₂-nitrato reductasa y, en consecuencia, del complejo NADH-nitrato reductasa. En cambio, ni la mitad diaforásica del complejo, ni la nítrito

reductasa se inactivan por este tratamiento. Si, cuando ya la nitrato reductasa se encuentra prácticamente inactiva, se *remueve el amoniaco del medio*, las células recuperan rápidamente sus niveles iniciales de actividad. La Fig. 25 muestra la cinética de la inactivación y reactivación "in vivo" de la nitrato reductasa, provocadas, respectivamente, por la mera adición y sustracción de amoniaco al medio de cultivo. El proceso, en conjunto, transcurre en un período de tiempo relativamente breve, com-

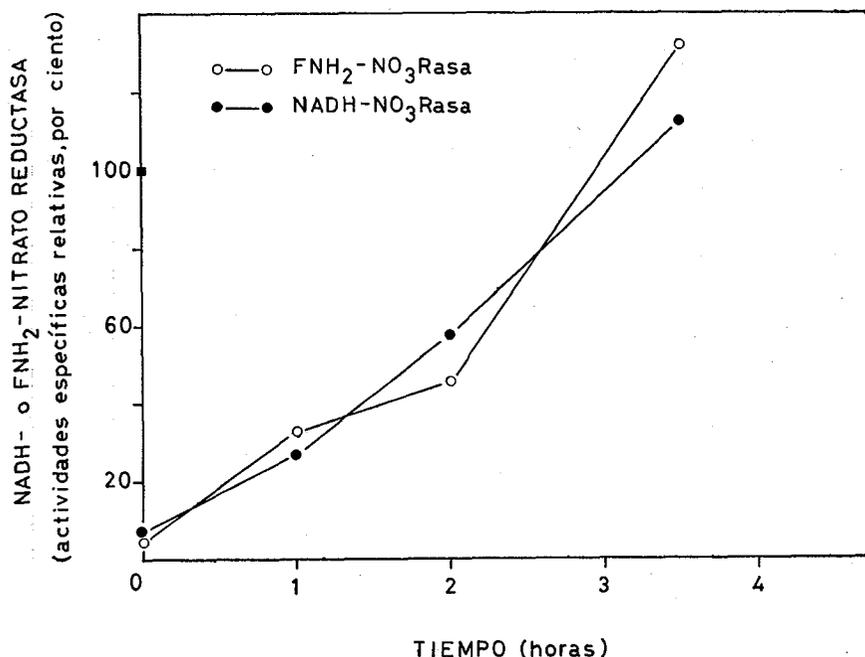


FIG. 26. Cinética de la reactivación "in vitro" de la nitrato reductasa terminal de *Chlorella*. Se prepararon extractos de células previamente inactivadas por tratamiento con amoniaco y se mantuvieron en la cámara fría durante la reactivación (63).

parado con el tiempo de generación, de unas ocho horas, de la *Chlorella* (113). Aunque todavía no se ha identificado el compuesto inmediato causante de esta fulminante y decisiva inactivación, el hecho de que el amoniaco "per se" no produzca ningún efecto sobre el enzima "in vitro" parece sugerir, en principio, que el verdadero agente inactivante sea un derivado más o menos directo del metabolismo del amoniaco, tal vez el propio carbamil fosfato (véase pág. 44). Por otro lado, el estado de oxidoreducción y de energía de las células puede también, a través de los niveles de ciertos coenzimas, en concreto del NADH (véase pág. 43) y del

ADP (114,115), afectar decisivamente a la sensibilidad del enzima a la inactivación. Lógicamente, la actividad de un complejo enzimático que desempeña una función clave en la iniciación de una ruta metabólica tan fundamental como la de la asimilación del nitrato debe estar simultáneamente controlada por la acción moduladora de una variedad de efectores.

Hasta el momento, poco se sabe sobre el mecanismo de la inactivación y de la reactivación de la nitrato reductasa. Como muestra la Fig. 26, en *Chlorella* se ha conseguido "in vitro" la completa reactivación del en-

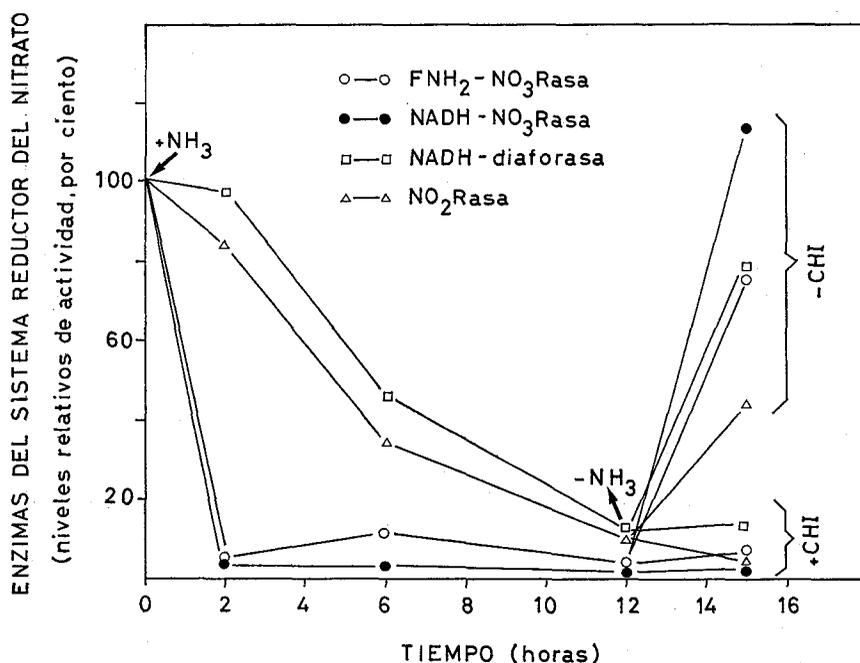


FIG. 27. Cinética de la inactivación, represión y derrepresión de los enzimas del sistema reductor de nitrato en *Chlorella*. Las flechas indican los tiempos de adición y sustracción de amoníaco al medio de cultivo. Las actividades de los enzimas se determinaron en los extractos celulares a los tiempos indicados. En presencia de cicloheximida (10 microgramos por ml), la derrepresión no tuvo lugar (113).

zima inactivo, simplemente dejando estar en frío durante unas horas los extractos de células previamente tratadas con amoníaco (63,113). Según RIGANO (116), en el alga termo-acidófila *Cyanidium caldarium*, la reactivación es completa en 20 minutos a 50° y prácticamente instantánea a 75°; puesto que, además, tanto la inactivación como la reactivación son

independientes de la acción de la cicloheximida, puede excluirse que estos fenómenos reversibles estén relacionados con la degradación y resíntesis de la proteína enzimática.

Todos los enzimas del sistema reductor de nitrato (es decir, el complejo nitrato reductasa y la nitrito reductasa) de *Chlorella* están sujetos a represión por el amoníaco (113), decreciendo su contenido a valores insignificantes después de un tratamiento de unas 12 horas. Como puede verse en la Fig. 27, al añadir amoníaco a células derreprimidas creciendo logarítmicamente en nitrato, el nivel de actividad de la nitrato reductasa cae bruscamente, más como consecuencia de la inactivación previamente des-

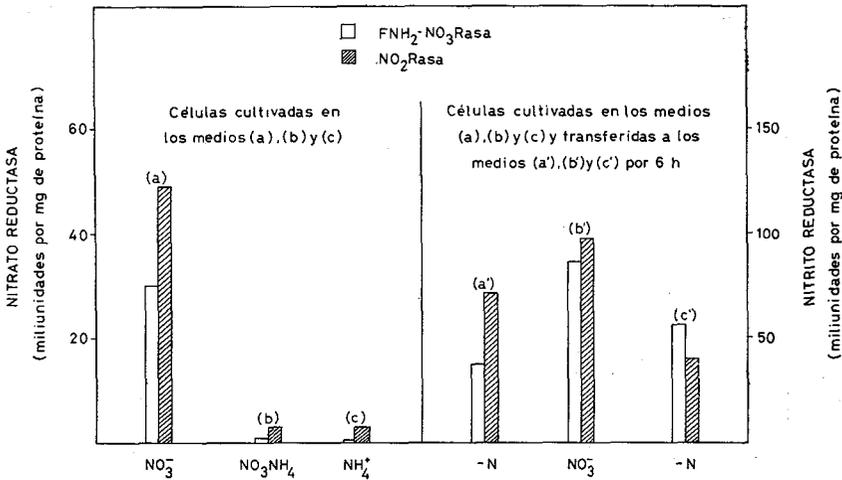


FIG. 28. Represión por el amoníaco, y derrepresión por su eliminación, de los enzimas del sistema reductor de nitrato en *Chlorella*. Las actividades enzimáticas se determinaron en los extractos celulares de los correspondientes cultivos (95).

crita que de la represión en sí, en tanto que los niveles de actividad de la diaforasa y de la nitrito reductasa, que realmente reflejan con más fidelidad las concentraciones celulares de los enzimas del sistema reductor de nitrato, descienden más suavemente. Si entonces se remueve por lavado el amoníaco y se suspenden de nuevo las células en medio fresco con nitrato, los niveles de todos los enzimas del sistema reductor de nitrato experimentan una rápida e inmediata subida, como consecuencia de su derrepresión. Esta síntesis "de novo" de las proteínas del sistema reductor de nitrato es sensible a la acción de la cicloheximida, por lo que

de alguna manera deben estar implicados en ella los ribosomas citoplásmicos 80 S (113).

Aunque se haya defendido repetidamente, no sin excesivo alambicamiento, que el nitrato es el inductor nutricional de la nitrato reductasa de algas y plantas superiores (54,56,117-120), los resultados que recoge la Fig. 28 hablan más bien en favor de la acción represora del amoniaco sobre todo el sistema reductor de nitrato (95). En efecto, las células de

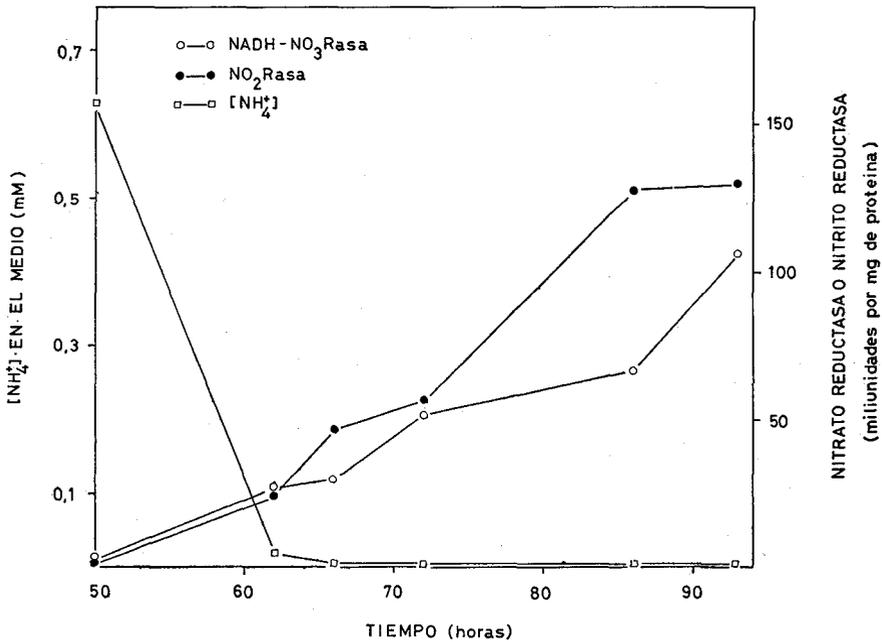


FIG. 29. Cinética de la derrepresión de los enzimas del sistema reductor de nitrato de *Chlorella*, en función de la concentración de amoniaco en el medio de cultivo. Las células se cultivaron en un medio conteniendo inicialmente amoniaco 8 mM. Los niveles de enzimas en las células, así como la concentración de amoniaco en el medio, se determinaron a los tiempos indicados (95).

Chlorella cultivadas en presencia de amoniaco —con o sin nitrato— presentan siempre niveles bajos de enzimas del sistema reductor de nitrato. Por otro lado, cuando el amoniaco se elimina del medio, la formación de nitrato reductasa y nitrito reductasa ocurre tanto en ausencia como en presencia de nitrato, tal vez con más vigor en este último caso por el mero suministro de una fuente de nitrógeno apropiada al efecto (88,95).

Los estudios cinéticos de la Fig. 29 muestran claramente cómo las células reprimidas de *Chlorella* inician la síntesis de los enzimas del sistema reductor de nitrato en cuanto agotan el amoníaco del medio (95). De manera análoga se comporta el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (121, 122).

Los estudios de *complementación "in vitro"* realizados por el grupo de NASON (123) con preparaciones libres de células de ciertos mutantes de *Neurospora* permiten concluir que el complejo NADPH-nitrato reduc-

TABLA XI
*DISTRIBUCION DE LA NITRITO REDUCTASA EN LAS FRACCIONES
SUBCELULARES DE UN HOMOGENADO DE HOJAS DE ESPINACA (107)*

Preparación	Actividad total	Actividad específica
	(%)	(miliunidades por mg proteína)
Homogenado foliar	100	15
a) Sobrenadante	76	14
b) Cloroplastos	21	70*

*Determinada en el extracto de cloroplastos.

tasa de este hongo está constituido, al menos, por dos subunidades proteicas, codificadas por cistrones diferentes. La primera (NADPH-diaforasa) es adaptativa y no requiere estar asociada con la segunda para exhibir su actividad; en cambio, ésta (FNH₂-nitrato reductasa) es constitutiva, y precisa de su asociación con la primera para ser activa.

Es interesante que estos experimentos de ensamblaje "in vitro" hayan permitido también la obtención de un complejo híbrido funcional de NADPH-nitrato reductasa integrado por la subunidad NADPH-diaforasa de *Neurospora* y la subunidad FNH₂-nitrato reductasa de xantina oxidasa de animales superiores. La complementación exige que la xantina oxidasa haya sido previamente tratada con ácido a pH 2,5 para separarla en sus propias subunidades polipeptídicas y permitir entonces la interacción con la subunidad de *Neurospora* y la consiguiente formación del híbrido (103).

Si estos resultados fueran extrapolables al complejo NADH-nitrato

reductasa de algas y plantas verdes, resultaría que este complejo sería desdoblable en subunidades, y que la nitrato reductasa propiamente dicha, o FNH_2 -nitrato reductasa, sería también constitutiva —aunque su actividad sólo se manifestase cuando estuviese asociada con la diaforasa adaptativa—. Experimentos preliminares (124) indican que efectivamente el complejo puede separarse, dando origen a una diaforasa activa de menor peso molecular; la subunidad de nitrato reductasa terminal no ha podido todavía ser detectada, quizás por no poder exhibir su actividad si no está asociada con la diaforasa.

TABLA XII

FLGA DE LA NITRITO REDUCTASA DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA POR REPETIDOS LAVADOS CON SOLUCION «ISOTONICA» DE ClNa (107)

Preparación de cloroplastos	Contenido en NO_2 Rasa (%)
Sin Lavar*	100
Lavada una vez	49
Lavada dos veces	15

*La actividad específica de esta preparación fue de 0,4 unidades por mg de clorofila.

VII. 6. Localización de los enzimas del sistema reductor de nitrato

Aunque la mayor parte de las investigaciones relativas a los enzimas del sistema reductor de nitrato se han realizado utilizando, como material de partida, *algas y tejidos foliares* (54,56-58), está bien probado que estos enzimas se encuentran también presentes en las *raíces* (54,56), si bien se admite que, normalmente, la contribución de éstas a la asimilación global del nitrato por la planta es de carácter limitado. A este respecto es importante destacar —ya que hasta ahora (54,56) se ignoraba cuál podría ser el mecanismo de que disponen los tejidos oscuros para reducir el nitrato o, más concretamente, el nitrito— que *mutantes incolores de Chlorella* que crecen heterotróficamente con glucosa en la oscuridad poseen el mismo equipo enzimático (incluidos los donadores específicos de electrones) que las células normales verdes que crecen autotróficamente en la luz con dióxido de carbono (125-127).

En cuanto a la *localización intracelular* de los enzimas del sistema reductor de nitrato, parece haber general acuerdo en que están más o menos asociados, estructural y funcionalmente, con los orgánulos fotosintéticos (cromatóforos y cloroplastos) o respiratorios (mitocondrias). Li-

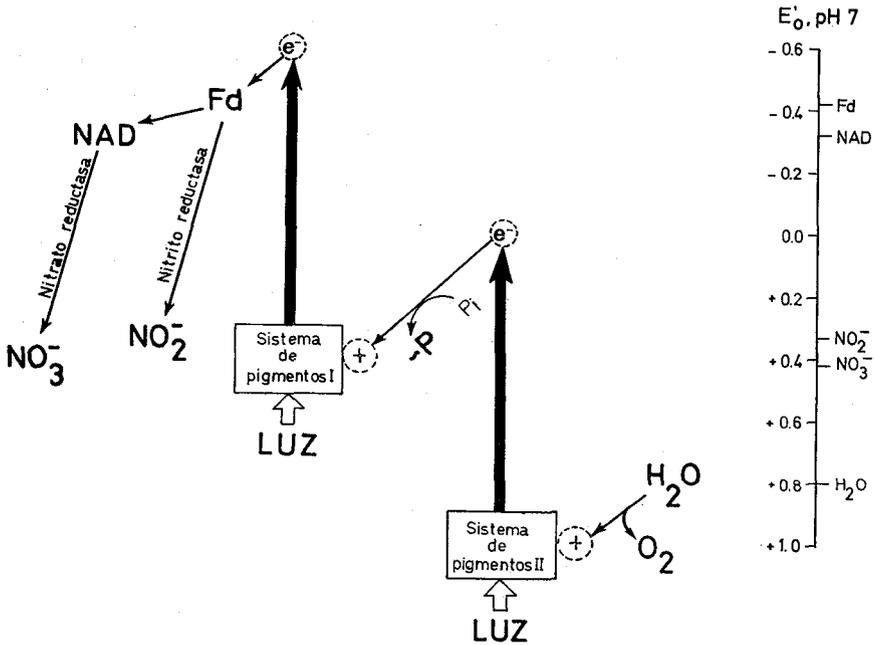


FIG. 30. Representación esquemática de la fotosíntesis no cíclica acoplada con la oxidación del agua y con la reducción del nitrato y del nitrito en un sistema reconstituido de cloroplastos. El donador terminal de electrones es el agua, que se oxida durante el proceso a oxígeno molecular. El transporte de cada electrón desde el agua hasta la ferredoxina requiere dos cuantos de luz, que son absorbidos y transformados en energía electrónica por los sistemas de pigmentos II y I, actuando en serie. La energía liberada como consecuencia de la caída de cada par de electrones del sistema II al sistema I es captada y utilizada por el sistema fosforilante acoplado con el sistema de transporte de la cadena del citocromo para la formación de un enlace de fosfato rico en energía. La transferencia de electrones de la ferredoxina al NAD está catalizada por la NAD (P) reductasa. NAD y ferredoxina son, respectivamente, los transportadores de electrones que directamente median la reducción del nitrato a nitrito y del nitrito a amoníaco por los enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa (60,62,141).

mitándonos ahora a los enzimas de los tejidos clorofílicos, la mayoría de los autores coinciden en considerar a la *nitrito reductasa* como *enzima típicamente cloroplástico* (54,56,58); en cambio hay *discusión* en lo que

atañe a la nitrato reductasa (54,56,57), pues, aunque la presencia del enzima en cromatóforos o cloroplastos ha sido suficientemente demostrada (52,128-132), podría tratarse de preparaciones contaminadas por fracciones no cloroplásticas o que hubieran adsorbido el enzima durante las técnicas de aislamiento. Por otro lado, mientras COUPE *et al.* (129) consideran que la nitrato reductasa se encuentra preferentemente en los cloroplastos, RITENOUR *et al.* (133) y SCHRADER *et al.* (134) la sitúan predominantemente en el citoplasma. Una solución de compromiso que explica-

TABLA XIII
 ESTEQUIOMETRIA DE LA FOTORREDUCCION DEL NITRATO A NITRITO
 ACOPLADA CON LA FOTO-OXIDACION DE AGUA A OXIGENO EN UN
 SISTEMA RECONSTITUIDO DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA (142)

NO ₃ ⁻ añadido (μ moles)	NO ₂ ⁻ formado (μ moles)	O ₂ desprendido (μ átomos g)
0	0,0	0,2
1	0,9	1,1
2	1,8	1,8
3	2,8	2,8

La mezcla reaccionante contenía, además de las cantidades indicadas de nitrato, «grana» frescos, ferredoxina, NAD(P) reductasa, NAD y nitrato reductasa.

ría estas contradicciones ha sido ya apuntada por RITENOUR *et al.* (133), al admitir la posibilidad de que la nitrato reductasa puede encontrarse ligada a la membrana externa de los cloroplastos. Esta proposición parece haber sido recientemente dilucidada en sentido afirmativo por EAGLESHAM y HEWITT (115).

En cualquier caso es innegable que, al preparar los cloroplastos, los enzimas en ellos contenidos pueden fugarse fácilmente al medio de extracción, tanto más expeditamente cuanto más se purifiquen dichos orgánulos. A modo ilustrativo, la Tabla XI muestra (107) que, a pesar de localizarse la nitrato reductasa dentro de los cloroplastos, una fracción significativa del enzima de espinaca aparece en el sobrenadante del homogenizado foliar, si bien su actividad específica alcanza su valor máximo en el propio extracto de los cloroplastos. Cuando, además (107), los cloro-

plastos enteros se lavan repetidamente con solución isotónica de cloruro sódico, el enzima sale prontamente de ellos, reduciéndose su contenido, tras uno y dos lavados, a la mitad, y menos de una cuarta parte, respectivamente (Tabla XII). Estas pérdidas durante la extracción podrían ser todavía más drásticas en el caso de la nitrato reductasa si, como se acaba de discutir, el enzima estuviera realmente localizado en la membrana externa de los cloroplastos, fácilmente removible.

TABLA XIV

ESTEQUIOMETRIA DE LA FOTORREDUCCION DEL NITRITO A AMONIACO ACOPLADA A LA FOTO-OXIDACION DEL AGUA A OXIGENO EN UN SISTEMA RECONSTITUIDO DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA (106).

NO ₂ añadido	NH ₃ formado	O ₂ desprendido
(μ moles)	(μ moles)	(μ átomos g)
0,0	0,0	0,0
0,5	0,4	1,3
1,5	1,3	4,2

La mezcla reaccionante contenía, además de las cantidades indicadas de nitrito, «grana» frescos, ferredoxina y nitrito reductasa.

Finalmente es interesante señalar que la glutamato deshidrogenasa —la proteína encargada de incorporar el amoniaco en un esqueleto orgánico—, así como las transaminasas específicas de glutamato, aspartato y alanina, la glutamato sintetasa, y *otros muchos enzimas del metabolismo nitrogenado, se encuentran también localizados en los cloroplastos* (135-140).

VII. 7. Reducción fotosintética del nitrato por sistemas reconstituídos de cloroplastos

Los resultados que a continuación se resumen demuestran que *un sistema reconstituído de cloroplastos de espinaca —integrado por “grana” frescos, ferredoxina, NAD(P) reductasa, NAD, nitrato reductasa y nitrito reductasa— puede catalizar, en la luz, la reducción gradual de nitrato a nitrito, y de éste a amoniaco, acoplada con la oxidación del agua a*

oxígeno molecular. La Fig. 30 representa esquemáticamente el flujo de electrones característico de la fotofosforilación no cíclica que, partiendo del agua, reduce sucesivamente al nitrato y al nitrito (60,62,141).

La reacción de fotorreducción del nitrato a amoníaco por el agua es estequiométrica, y puede analizarse independientemente en sus dos estados si se ensayan por separado los sistemas reductor de nitrato (142) y de nitrito (106), desprendiéndose un átomo de oxígeno por cada mo-

TABLA XV
FOTORREDUCCION GRADUAL DEL NITRATO A AMONIACO ACOPLADA
CON LA LIBERACION DE OXIGENO EN UN SISTEMA RECONSTITUIDO
DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA (142)

Sistema	NO ₂ ⁻ formado (μ moles)	NH ₃ formado (μ moles)	O ₂ desprendido (μ átomos g)
Completo	0,5	1,8	7,0
NAD omitido	0,0	0,0	0,0
NO ₃ Rasa omitida	0,0	0,0	0,0
NO ₂ Rasa omitida	3,4	0,1	3,2

La mezcla reaccionante completa contenía «grana» frescos, ferredoxina, NAD (P) reductasa, NAD, nitrato reductasa, nitrito reductasa y nitrato.

lécula de nitrato reducida a nitrito, en el primer caso (Tabla XIII), y tres átomos de oxígeno por cada molécula de nitrito reducida a amoníaco, en el segundo (Tabla XIV).

La reacción total se puede también realizar paulatinamente en un mismo sistema si se van añadiendo de manera sucesiva los enzimas o cofactores característicos de uno y otro de los dos sistemas aislados hasta completar íntegramente el sistema conjunto. Por ejemplo, la Tabla XV muestra que, en ausencia de NAD o de nitrato reductasa —cofactor y enzima, respectivamente, del primer sistema—, la reacción no tiene en absoluto lugar. Si se omite la nitrito reductasa, la reacción se detiene en el segundo paso, acumulándose nitrito sin que pueda formarse nada de amoníaco. Por último, en el sistema completo, la reducción del nitrato procede sin obstáculos, a través de nitrito, hasta amoníaco (142).

La Fig. 31 representa esquemáticamente la estequiometría de la reducción gradual del nitrato a amoníaco por un sistema de "grana" frescos de cloroplastos iluminados, así como la distribución cuantitativa de los electrones implicados en el proceso. La reacción luminosa previa a la reducción de los compuestos nitrogenados determina la oxidación de cuatro moléculas de agua y suministra ocho electrones a la ferredoxina, a la par que libera dos moléculas de oxígeno. Las reacciones oscuras sub-

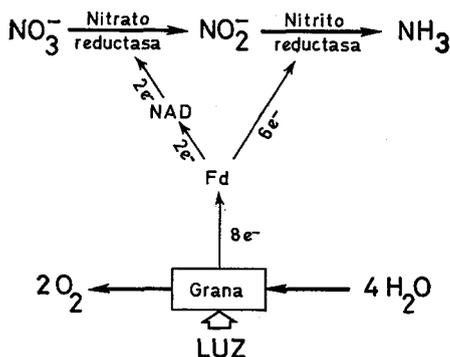


FIG. 31. Representación esquemática estequiométrica de la reducción fotosintética del nitrato a amoníaco acoplada con el desprendimiento de oxígeno en un sistema reconstituido de cloroplastos. El proceso en su conjunto requiere la fotooxidación de cuatro moléculas de agua con la liberación concomitante de dos moléculas de oxígeno. Los ocho electrones fotoactivados por la clorofila son aceptados por la ferredoxina oxidada, que transfiere dos al NAD a través de la NAD(P) reductasa. Los enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa catalizan entonces gradualmente la reducción del nitrato a nitrito (2e) por el NADH, y del nitrito a amoníaco (6e) por la ferredoxina reducida.

siguientes de reducción del nitrato y nitrito comprenden, respectivamente: 1) la transferencia de dos electrones de la ferredoxina al sistema nitrato reductasa-nitrato a través del NAD, y 2) la transferencia directa de seis electrones de la ferredoxina al sistema nitrito reductasa-nitrito.

Tanto la fotorreducción del nitrato como la del nitrito están acopladas con la formación de ATP, a razón de un enlace de fosfato rico en energía por cada par de electrones transferido a lo largo de la cadena de transporte fotosintética (69,106,107). Por ejemplo, la Fig. 32 ilustra como, en presencia de ortofosfato y ADP, la fotorreducción del nitrito por un sistema reconstituido de cloroplastos es concomitante con la formación de una molécula de ATP por cada dos electrones que cede el agua. El

descenso de velocidad, que, como indica la figura, experimenta con el tiempo la síntesis de ATP respecto al desprendimiento de oxígeno puede tener interés fisiológico y estar motivado por el efecto inhibitor que el amoniaco producido ejerce al desacoplar el transporte de electrones de la fosforilación (106).

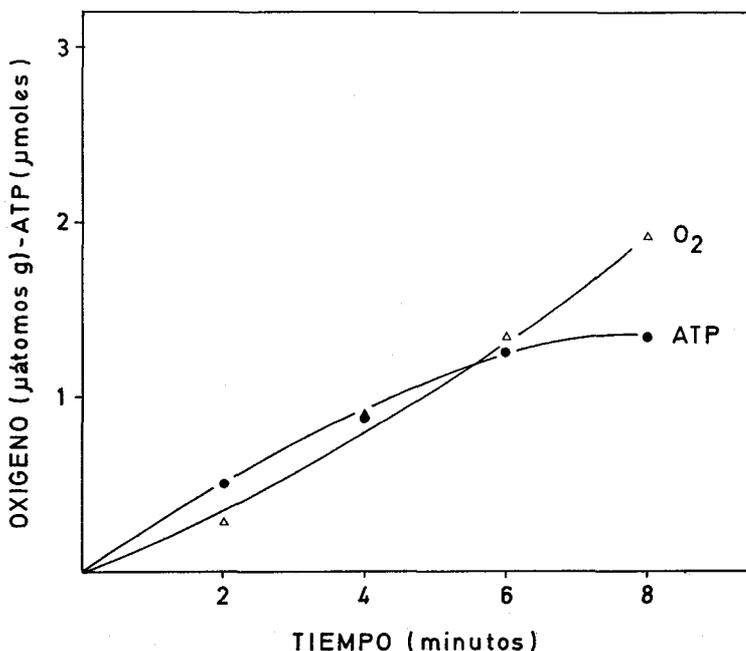


FIG. 32. Estequiometría y cinética del desprendimiento de oxígeno y de la formación de ATP en la fotosíntesis no cíclica con nitrito como aceptor terminal de electrones en un sistema reconstituido de cloroplastos de espinaca, integrado por "grana" frescos, ferredoxina, nitrito reductasa, nitrito, ADP y Pi (106).

En las condiciones elegidas para los experimentos previamente descritos (ausencia de los enzimas del ciclo de CALVIN y de bicarbonato añadido, potasa en el pocillo central de las vasijas, y atmósfera de un gas inerte) puede excluirse la asimilación de anhídrido carbónico, y, en consecuencia, la posibilidad de que se sinteticen, primero, hidratos de carbono, que sirvan después como donadores de electrones para la reducción oscura del nitrato y nitrito. No obstante puede argüirse, según ha apuntado HILL (143), en apoyo parcial de la hipótesis de WARBURG antes discutida (28), que, incluso en tales condiciones, las mínimas cantidades resi-

duales de anhídrido carbónico presentes podrían bastar para actuar catalíticamente en las reacciones fotoquímicas propiamente dichas.

Por cuanto se refiere al ATP, puede también excluirse la participación de este compuesto rico en energía en la fotorreducción "in vitro" del nitrato y nitrito por un sistema de cloroplastos reconstituido, ya que en ningún caso el proceso depende de su adición ni de la operatividad del propio sistema fotofosforilante. Las conclusiones de diversos autores (35,51) de que la reducción del nitrito debía depender de ATP se basaban en la interpretación, a nuestro modo de ver errónea, dada a la inhibición por el 2,4-dinitrofenol. Hoy está ya bien establecido (144,145) que, puesto que este dinitroderivado se reduce fácilmente, tanto por los "grana" de cloroplastos iluminados como por la ferredoxina, puede competir eficazmente por el poder reductor.

A pesar de lo dicho, queda irresuelta la cuestión de si los resultados obtenidos "in vitro" con sistemas libres de células pueden extrapolarse al proceso de la fotoasimilación del nitrato "in vivo", tal como lo efectúan las células íntegras. En otras palabras ¿suministran los sistemas de pigmentos del aparato fotosintético, por medio de sus reacciones fotoquímicas, directamente los electrones al sistema reductor de nitrato, o lo hacen indirectamente, con el concurso adicional de rutas metabólicas complejas, que pueden implicar compuestos de carbono intermediarios e incluso enzimas exocloroplásticas? Antes de discutir estos puntos, conviene hacer notar que hay desacuerdo entre los autores respecto al mecanismo de acción de la luz sobre la asimilación del nitrato. En tanto que BÜRSTROM (146) sostiene que las hojas de trigo contienen un único sistema fotosintético reductor de nitrato, MENDEL y VISSER (147) opinan que las hojas de tomate contienen un sistema oscuro —dependiente de algún sustrato orgánico— y otro dependiente de la luz. Por lo demás, también se ha sugerido que la acción estimulante de la luz en la asimilación del nitrato podría residir no sólo en su papel de proveedor —más o menos directo— de poder reductor, sino en su efecto sobre el nivel de la nitrato reductasa o sobre la disponibilidad de nitrato (54).

Limitándonos al papel de la luz como generador de poder reductor es importante establecer si la asimilación del nitrato "in vivo" depende absolutamente de anhídrido carbónico y cuáles son las razones que determinan esta dependencia. Antes hemos apuntado (véase pág. 72) la posibilidad de que el anhídrido carbónico interviniese, más que como fotolito en sí, de acuerdo con WARBURG (26,28), como eslabón indispensable para el flujo no cíclico de electrones (143). Ahora podemos añadir que el dióxido de carbono podría alternativamente servir de base para la for-

mación fotosintética, en su sentido más clásico, de compuestos del tipo del fosfogliceraldehido u otros derivados fosforilados de azúcares, muy adecuados para suministrar —en los propios cloroplastos o en el citoplasma— el NADH necesario a la nitrato reductasa (54). En cualquier caso, las siguientes consideraciones aconsejan proceder con cautela, si no con desconfianza, al interpretar los resultados más significativos. Así, mientras hay que admitir como hecho incontrovertible el descubrimiento de WARBURG (28) de que el desprendimiento de oxígeno dependiente de la fotorreducción de nitrato por células vivas de *Chlorella* cesa comple-

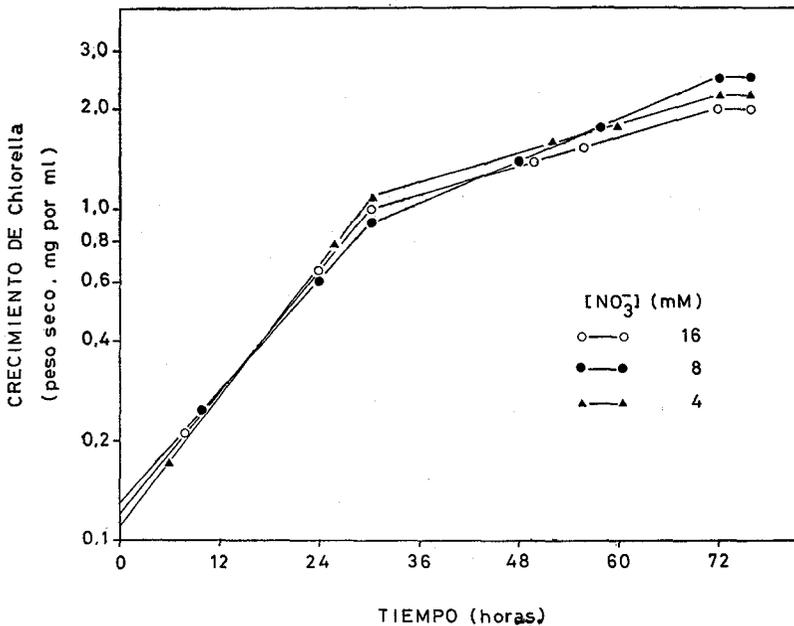


FIG. 33. Crecimiento en peso de *Chlorella*, en medios con distintas concentraciones de nitrato (151).

tamente cuando se remueve el dióxido de carbono con potasa, hay que tener presente que dicho experimento fue realizado bajo condiciones demasiado forzadas, quizás afisiológicas, ya que a pH 4,5 todo el anhídrido carbónico celular debe ser removido por el alcalí. Por la misma razón hay que aceptar con prudente reserva la conclusión de STILLER (148) de que la reducción con hidrógeno molecular de nitrito a amoníaco por células enteras de *Chlorella* está mediada por una hidrogenasa que requiere anhídrido carbónico. No deja de ser curioso que fuera el propio WARBURG quien idease el método manométrico indirecto para evitar las di-

ficultades inherentes a las medidas de absorción de oxígeno en ausencia de anhídrido carbónico durante la respiración, ya que entonces existe siempre la posibilidad de que dichas medidas no sean válidas, al no poder estimarse la influencia que ejerce la eliminación del anhídrido carbónico del sistema reaccionante en la velocidad o en el curso de la toma de oxígeno (149). Es también notable que WARBURG imprimiese a muchas de sus publicaciones un tono fuertemente polémico, atacando desafortadamente interpretaciones que él mismo había ofrecido inicialmente como plausibles y que luego ignoraría de forma absoluta. Baste como

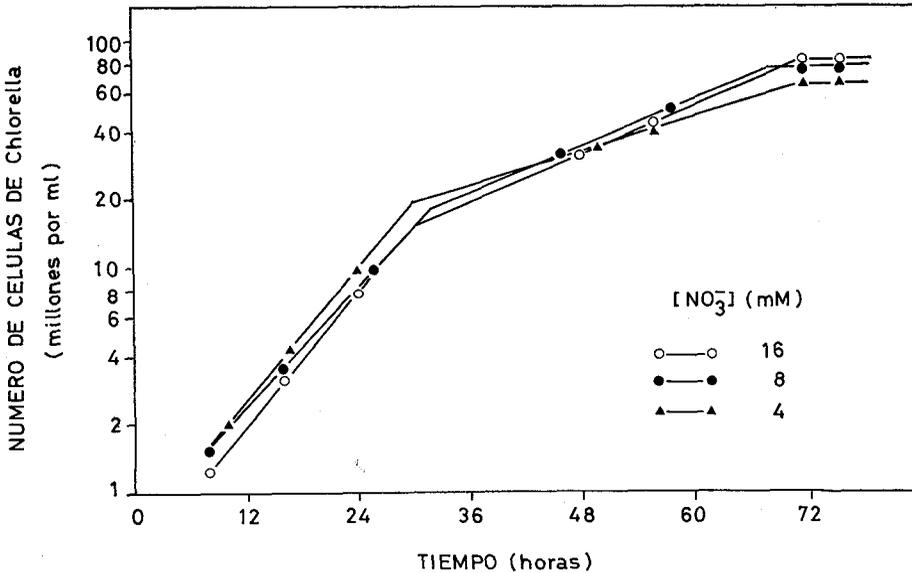


FIG. 34. Crecimiento en población celular de *Chlorella*, en medios con distintas concentraciones de nitrato (151).

muestra el siguiente párrafo (150), escrito en 1948: "Se debería también investigar si los gránulos verdes suspendidos en soluciones de nitrato desprenden oxígeno cuando se iluminan, ya que en este caso habría que excluir la ruta a través del ácido carbónico, por no poder los gránulos reducir dicho ácido".

Por lo que atañe al *sitio donde opera "in vivo" el sistema reductor de nitrato*, cuestión parcialmente debatible según discutimos con amplitud en apartado VII. 6, es importante citar aquí dos experimentos que demuestran suficientemente la estrecha asociación de dicho sistema con el

aparato fotosintético propiamente dicho, tanto en algas como en plantas superiores: En *Anabaena cylindrica*, HATTORI y MYERS (130) han aislado una preparación subcelular que muestra una elevada actividad del sistema fotoquímico I asociado con la nitrato reductasa; en espinaca, HEBER y FRENCH (131) han encontrado que la adición de nitrato a una preparación iluminada de cloroplastos intactos promueve el desprendimiento concomitante de oxígeno molecular.

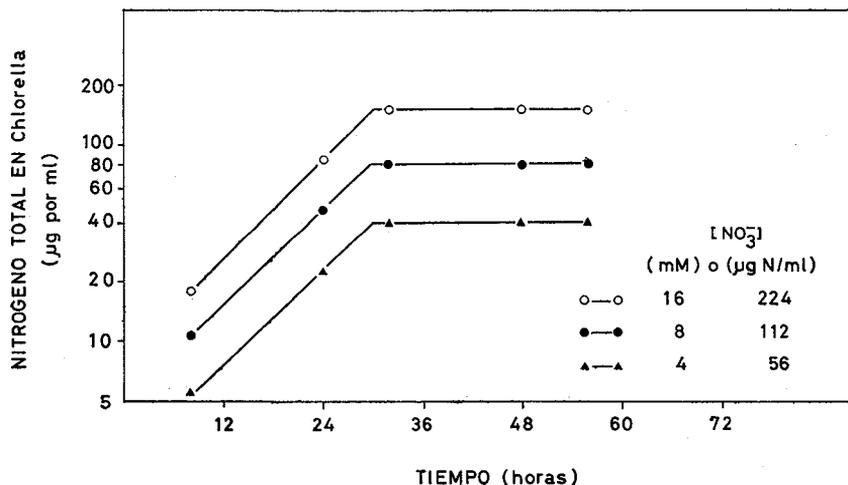


FIG. 35. Contenido en nitrógeno reducido de *Chlorella* creciendo en medios con distintas concentraciones de nitrato. Las determinaciones del nitrógeno reducido total (amoniacal y orgánico) se llevaron a cabo por el método de Kjeldahl a los tiempos indicados (151).

VII. 8. Reducción del nitrato e Incorporación del nitrógeno en proteína

Aparte de presentar ventajas indudables como material idóneo para la realización de investigaciones básicas en Bioquímica y Fisiología Celular, las algas verdes unicelulares del tipo *Chlorella* pueden llegar a constituir, en un futuro no lejano, una *fuentes importante de material vegetal de cosecha para la alimentación animal e incluso humana*, perspectiva tan ansiada como relevante en el momento actual. De aquí el interés de estudiar en este organismo, en conjunción con la reducción del nitrato, la *incorporación del nitrógeno en proteína, con vistas a incrementar el contenido proteico de los productos de la Fotosíntesis*.

Los prometedores resultados que a continuación se resumen (151)

indican en primer lugar que, en las condiciones standard de cultivo, el crecimiento celular de *Chlorella* —estimado tanto por el peso seco, como por la población celular, o por la absorbancia a 660 nm— no se afecta por la concentración de nitrato en el medio, entre los límites de 4 y 16 mM (Figs. 33 y 34). El marcado cambio de pendiente que, hacia las 30 horas, muestran todas las curvas de crecimiento parece obedecer al agotamiento de nitrato en el medio al cabo de este tiempo.

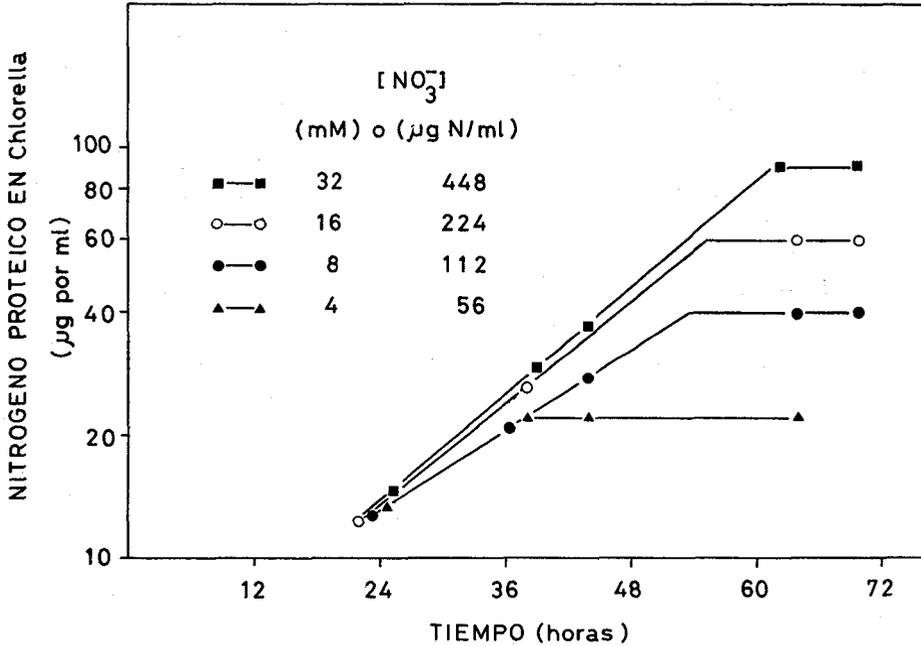


FIG. 36. Contenido en nitrógeno proteico de *Chlorella* creciendo en medios con distintas concentraciones de nitrato. La proteína se determinó, a los tiempos indicados, en los extractos resultantes de digerir con sosa el material celular (151).

No obstante (151), a pesar de que, como decimos, el crecimiento y la multiplicación celular son independientes —dentro de los márgenes citados— de la concentración de nitrato utilizada, el contenido total en nitrógeno reducido de las células responde fielmente, desde el principio al fin, a los niveles de nitrógeno nítrico en el medio, y alcanza, por último, al cabo también de unas 30 horas, los valores límites determinados por dichos niveles, a los que casi iguala (Fig. 35).

En extremo interesante es la *evolución del nitrógeno reducido en las células* una vez terminado el período de crecimiento propiamente dicho, pues es entonces, como muestra la Fig. 36, cuando principalmente *el nitrógeno se incorpora en material proteico*, cuyo contenido celular asciende gradualmente *hasta alcanzar topes casi proporcionales a los niveles de nitrato empleados*, de tal modo que hacia el 30 por ciento del nitrógeno nítrico inicial puede acabar constituyendo proteína (151). A este respecto es interesante mencionar aquí que, en su reciente revisión sobre la reducción del nitrato en plantas superiores, BEEVERS y HAGEMAN (54) refieren a experiencias de campo, en trigo, que demuestran que la aplicación de fertilizantes nitrogenados por encima del nivel que la práctica agrícola aconseja se traduce en el aumento del contenido en nitrato reductasa y proteína de la gramínea.

Parece pues que *una manera simple de conseguir acrecentar el contenido proteico de las cosechas vegetales puede consistir en suministrar adecuadamente a las plantas niveles de nitrógeno inorgánico superiores a los que éstas requieren normalmente para su crecimiento óptimo*. La utilización de organismos vegetales apropiados para un abordaje genético-bioquímico del problema puede facilitar enormemente el logro de este sueño feliz de mejorar la cantidad y la calidad de las proteínas fabricadas, limpia, suave y eficazmente, a la luz del Sol —con agua, dióxido de carbono, nitrato y sulfato— por las plantas, organismos que no sólo purifican el ambiente, sino que embellecen y recrean el paisaje.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALBAREDA, J. M.^a, *Consideraciones sobre la Investigación Científica* (1951), Madrid.
2. MARAÑÓN, G., *Contestación al Ingreso de D. José María Albareda en la Real Academia Nacional de Medicina* (1952), Madrid.
3. GUTIÉRREZ RÍOS, E., *José María Albareda. Una Epoca de la Cultura Española* (1970), Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
4. ALBAREDA, J. M.^a, *Los Oligoelementos en Geología y Biología. Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina* (1952), Madrid.
5. WHATLEY, F. R. y M. LOSADA, en A. C. Giese, *Photophysiology*, vol. 1, p. 11 (1964), Academic Press.
6. LOSADA, M., *Atlántida* 4, 339 (1965).
7. CALVIN, M. y J. A. BASSHAM, *The Photosynthesis of Carbon Compounds* (1962), W. A. Benjamin, Inc.
8. ARNON, D. I., *Physiol. Rev.* 47, 317 (1967).
9. ARNON, D. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 68, 2883 (1971).
10. LOSADA, M., A. V. TREBST, S. OGATA y D. I. ARNON, *Nature* 186, 753 (1960).
11. LOSADA, M., A. V. TREBST y D. I. ARNON, *J. Biol. Chem.* 235, 332 (1960).
12. HATCH, M. D. y C. R. SLACK, en L. Reinhold y Y. Liwschitz, *Progress in Phytochemistry*, vol. 2, p. 35 (1970), Interscience Publishers.
13. WALKER, D. A. y A. R. CROFTS, *Ann. Rev. Biochem.* 39, 389 (1970).
14. BUCHANAN, B. B. y D. I. ARNON, *Advan. Enzymol.* 33, 119 (1970).
15. ARNON, D. I., M. LOSADA, M. NOZAKI y K. TAGAWA, *Nature* 190, 601 (1961).
16. LOSADA, M., M. NOZAKI y D. I. ARNON, en W. D. McElroy y B. Glass, *Light and Life*, p. 570 (1961), The Johns Hopkins Press.
17. FOGG, G. E., en R. A. Lewin, *Physiology and Biochemistry of Algae*, p. 161 (1962), Academic Press.
18. DAVIS, E. B. y R. G. TISCHER, *Nature* 212, 302 (1966).
19. FOGG, G. E., *Photosynthesis* (1968), The English Universities Press Ltd.
20. YOCH, D. C. y D. I. ARNON, *Biochim. Biophys. Acta.* 197, 180 (1970).
21. HARDY, R. W. F. y E. KNIGHT, Jr., en L. Reinhold y Y. Liwschitz, *Progress in Phytochemistry*, vol. 1, p. 407 (1968), Interscience Publishers.
22. SCHMIDT, A. y A. TREBST, *Biochim. Biophys. Acta* 180, 529 (1969).

23. BANDURSKI, R. S., en J. Bonner y J. E. Varner, *Plant Biochemistry*, p. 467 (1965), Academic Press.
24. SAN PIETRO, A. (ed.), *Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion* (1965), The Antioch Press.
25. WARBURG, O. y G. KRIPPAHL, *Z. Naturforschg.* 13b, 509 (1958).
26. WARBURG, O., *Ann. Rev. Biochem.* 33, 1 (1964).
27. WARBURG, O. y E. NEGELEIN, *Biochem. Z.* 110, 66 (1920).
28. WARBURG, O., G. KRIPPAHL y C. JETSCHMANN, *Z. Naturforschg.* 20b, 993 (1965).
29. VAN NIEL, C. B., *Advan. Enzymol.* 1, 263 (1941).
30. RABINOWITCH, E. I., *Photosynthesis and related Processes*, vol. 1 (1945), Interscience Publishers.
31. VAN NIEL, C. B., M. B. ALLEN y B. E. WRIGHT, *Biochim. Biophys. Acta* 12, 67 (1953).
32. KESSLER, E., *Nature* 176, 1069 (1955).
33. VANECKO, S. y J. E. VARNER, *Plant Physiol.* 30, 388 (1955).
34. HUZISIGE, H. y K. SATOH, *Biol. J. Okayama Univ.* 6, 71 (1960).
35. HATTORI, A., *Plant Cell Physiol.* 3, 355 (1962).
36. MARRE, E., G. FORTI, R. BIANCHETTI y B. PARISI, en *La Photosynthese*, p. 557 (1963), Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
37. KESSLER, E., *Arch. Biochem. Biophys.* 62, 241 (1956).
38. MEYER, V. y E. SCHULZE, *Ber.* 17, 1554 (1894).
39. McELROY, W. D. y B. H. GLASS (eds.), *Symposium on Inorganic Nitrogen Metabolism* (1956), Johns Hopkins Press.
40. NASON, A. y H. TAKAHASHI, *Ann. Rev. Microbiol.* 12, 203 (1958).
41. PORTER, H. K. (ed.), *Symposium Soc. Exptl. Biol.* 13 (1959).
42. MACKEE, H. S., *Nitrogen Metabolism in Plants* (1962), Clarendon Press.
43. NASON, A., *Bacteriol. Rev.* 26, 16 (1962).
44. SYRETT, P. J., en R. A. Lewin, *Physiology and Biochemistry of Algae*, p. 171 (1962), Academic Press.
45. HEWITT, E. J., en F. C. Steward, *Plant Physiology*, vol. 3, p. 137 (1963), Academic Press.
46. NASON, A., en P. D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck, *The Enzymes*, vol. 7, p. 587 (1963), Academic Press.
47. NASON, A. y W. D. McELROY, en F. C. Steward, *Plant Physiology*, vol. 3, p. 451 (1963), Academic Press.
48. NICHOLAS, D. J. D., en F. C. Steward, *Plant Physiology*, vol. 3, p. 363 (1963), Academic Press.
49. TAKAHASHI, H., S. TANIGUCHI y F. EGAMI, en M. Florin y H. S. Mason, *Comparative Biochemistry*, vol. 5, p. 91 (1963), Academic Press.
50. HEWITT, E. J. y D. J. D. NICHOLAS, en H. F. Linsken, B. D. Sanwal y M. V. Tracey, *Modern Methods of Plant Analysis*, vol. 7, p. 67 (1964), Springer Verlag.
51. KESSLER, E., *Ann. Rev. Plant Physiol.* 15, 57 (1964).
52. LOSADA, M., en J. B. Thomas y J. C. Goedheer, *Currents in Photosynthesis*, p. 431 (1966), A. D. Donker, Publ.
53. HEWITT, E. J. y C. Y. CUTTING (eds.), *Recent Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants* (1968), Academic Press.
54. BEEVERS, L. y R. H. HAGEMAN, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20, 495 (1969).

55. LOSADA, M., *International Biochemical Meeting*, p. 139 (1971), Santa Margherita, Italia.
56. KIRBY, E. A. (ed), *Nitrogen Nutrition of the Plant* (1970), Universidad de Leeds.
57. HAGEMAN, R. H. y D. P. HUCKLESBY, en A. San Pietro, *Methods in Enzymology*, vol. 23, p. 491 (1971), Academic Press.
58. LOSADA, M. y A. PANEQUE, en A. San Pietro, *Methods in Enzymology*, vol. 23, p. 487 (1971), Academic Press.
59. ZUMFT, W. G., A. PANEQUE, P. J. APARICIO y M. LOSADA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 980 (1969).
60. LOSADA, M. y A. PANEQUE, *I. Q.*, núm. 16, 41 (1970).
61. ZUMFT, W. G., Tesis doctoral, Universidad de Erlangen-Nürenberg (1970).
62. APARICIO, P. J., *Anales de la Universidad Hispalense*, Serie Ciencias, núm. 13 (1971).
63. VEGA, J. M.^a, Tesis doctoral, Universidad de Sevilla (1972).
64. ANDREWS, P., *Biochem. J.* 91, 222 (1964).
65. GARRET, R. H. y A. NASON, *J. Biol. Chem.* 244, 2870 (1969).
66. PANEQUE, A. y M. LOSADA, *Biochim. Biophys. Acta* 128, 202 (1966).
67. RELIMPIO, A. M.^a, M. G. GUERRERO, A. PANEQUE y M. LOSADA, *Z. Pflanzenphysiol.* 66, 290 (1971).
68. LOSADA, M., P. J. APARICIO y A. PANEQUE, en H. Metzner, *Progress in Photosynthesis Research*, vol. 3, p. 1504 (1969), H. Laupp, jr.
69. LOSADA, M., J. M. RAMÍREZ, A. PANEQUE y F. F. DEL CAMPO, *Biochim. Biophys. Acta* 109, 86 (1965).
70. PANEQUE, A., P. J. APARICIO, L. CATALINA y M. LOSADA, *Biochim. Biophys. Acta* 162, 149 (1968).
71. SHIN, M. y D. I. ARNON, *J. Biol. Chem.* 240, 1405 (1965).
72. ZUMFT, W. G., P. J. APARICIO, A. PANEQUE y M. LOSADA, *FEBS Letters* 9, 157 (1970).
73. RELIMPIO, A. M.^a, P. J. APARICIO, A. PANEQUE y M. LOSADA, *FEBS Letters* 17, 226 (1971).
74. VEGA, J. M.^a, J. HERRERA, A. M.^a RELIMPIO. y P. J. APARICIO, (manuscrito en preparación).
75. VENNESLAND, B., y C. JETSCHMANN, *Biochim. Biophys. Acta* 229, 554 (1971).
76. FORGET, P., *European J. Biochem.* 18, 442 (1971).
77. BORTELS, H., *Arch. Mikrobiol.* 1, 333 (1930).
78. POSTGATE, J. R. (ed), *The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation* (1971), Plenum Press.
79. STEINBERG, R. A., *J. Agr. Research* 55, 891 (1937).
80. ARNON, D. I. y P. R. STOUT, *Plant Physiol.* 14, 599 (1939).
81. WALKER, J. B., *Arch. Biochem. Biophys.* 46, 1 (1953).
82. ARNON, D. I., P. S. ICHIOKA, G. WESEL, A. FUJIWARA y J. T. WOOLLEY, *Physiol. Plantarum* 8, 538 (1955).
83. ICHIOKA, P. S. y D. I. ARNON, *Physiol. Plantarum* 8, 552 (1955).
84. GARRET, R. H. y A. NASON, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 58, 1603 (1967)
85. NICHOLAS, D. J. D. y A. NASON, *Plant Physiol.* 30, 135 (1955).
86. AFRIDI, M. M. R. K. y E. J. HEWITT, *J. Exptl. Botany* 15, 251 (1964).
87. AFRIDI, M. M. R. K. y E. J. HEWITT, *J. Exptl. Botany* 16, 628 (1965).
88. VEGA, J. M.^a, J. HERRERA, P. J. APARICIO, A. PANEQUE y M. LOSADA, *Plant Physiol.* 48, 294 (1971).

89. APARICIO, P. J., J. CÁRDENAS, W. G. ZUMFT, J. M.^a VEGA, J. HERRERA, A. PANEQUE y M. LOSADA, *Phytochem.* 10, 1487 (1971).
90. NOTTON, B. A. y E. J. HEWITT, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 702 (1971).
91. NOTTON, B. A. y E. J. HEWITT, *Plant Cell Physiol.* 12, 465 (1971).
92. HIGGINS, E. S., D. A. RICHERT y W. W. WESTERFELD, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 92, 509 (1956).
93. TAKAHASHI, H. y A. NASON, *Biochim. Biophys. Acta* 23, 433 (1957).
94. KEELER, R. F. y J. E. VARNER, *Arch. Biochem. Biophys.* 70, 585 (1957).
95. CÁRDENAS, J., J. RIVAS, A. PANEQUE y M. LOSADA, *Arch. Mikrobiol.* 79, 367 (1971).
96. HELMER, Y. M., J. L. WRAY y P. FILNER, *Plant Physiol.* 44, 1197 (1969).
97. WRAY, J. L. y P. FILNER, *Biochem. J.* 119, 715 (1970).
98. PANEQUE, A., J. M.^a VEGA, J. CÁRDENAS, J. HERRERA, P. J. APARICIO y M. LOSADA, *Plant Cell Physiol.* 13, 104 (1972).
99. HIGGINS, E. S., D. A. RICHERT y W. W. WESTERFELD, *Federation Proc.* 15, 274 (1956).
100. HIGGINS, E. S., D. A. RICHERT y W. W. WESTERFELD, *J. Nutrition* 59, 539 (1956).
101. CÁRDENAS, J., J. RIVAS, A. PANEQUE y M. LOSADA, *Arch. Mikrobiol.* 81, 260 (1972).
102. DOWNEY, R. J., *J. Bacteriol.* 105, 759 (1971).
103. KETCHUM, P. A., H. Y. CAMBIER, W. A. FRAZIER III, C. MADANSKY y A. NASON, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 66, 1016 (1970).
104. CÁRDENAS, J., Tesis doctoral, Universidad de Sevilla (1972).
105. SMILLIE, R. M. y B. ENTSCH, en A. San Pietro, *Methods in Enzymology*, vol. 23, p. 504 (1971), Academic Press.
106. PANEQUE, A., J. M. RAMÍREZ, F. F. DEL CAMPO y M. LOSADA, *J. Biol. Chem.* 239, 1737 (1964).
107. RAMÍREZ, J. M., F. F. DEL CAMPO, A. PANEQUE y M. LOSADA, *Biochim. Biophys. Acta* 118, 58 (1966).
108. NASON, A., R. G. ABRAHAM y B. C. AVERBACH, *Biochim. Biophys. Acta* 15, 159 (1954).
109. NICHOLAS, D. J. D., A. MEDINA y O. T. G. JONES, *Biochim. Biophys. Acta* 37, 468 (1960).
110. ROUSSOS, G. G. y A. NASON, *J. Biol. Chem.* 235, 2997 (1960).
111. CZYGAN, F. C., *Planta* 60, 225 (1963).
112. HUZISIGE, H., K. SATOH, K. TANAKA y T. HAYASIDA, *Plant Cell Physiol.* 4, 307 (1963).
113. LOSADA, M., A. PANEQUE, P. J. APARICIO, J. M.^a VEGA, J. CÁRDENAS y J. HERRERA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33, 1009 (1970).
114. NELSON, N. y I. ILAN, *Plant Cell Physiol.* 10, 143 (1969).
115. EAGLESHAM, A. R. J. y E. J. HEWITT, *FEBS Letters* 16, 315 (1971).
116. RIGANO, C., *Arch. Mikrobiol.* 76, 265 (1971).
117. KESSLER, E. y H. OESTERHELD, *Nature* 228, 287 (1970).
118. OHMORI, K. y A. HATTORI, *Plant Cell Physiol.* 11, 873 (1970).
119. SMITH, F. W. y J. F. THOMPSON, *Plant Physiol.* 48, 224 (1971).
120. KELKER, H. C. y P. FILNER, *Biochim. Biophys. Acta* 252, 69 (1971).
121. HERRERA, J., Tesis doctoral, Universidad de Granada (en preparación).
122. LÓPEZ BAREA, J., Tesis doctoral, Universidad de Sevilla (en preparación).
123. NASON, A., A. D. ANTOINE, P. A. KETCHUM, W. A. FRAZIER III y D. K. LEE, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 65, 137 (1970).
124. APARICIO, P. J., C. GÓMEZ MORENO y E. PALACIAN (resultados no publicados).

125. GUERRERO, M. G., J. RIVAS, A. PANEQUE y M. LOSADA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 82 (1971).
126. GUERRERO, M. G., Tesis doctoral, Universidad de Sevilla (en preparación).
127. RIVAS, J., Tesis doctoral, Universidad de Sevilla (en preparación).
128. CHAMPIGNY, M. L., *Physiol. Veg.* 1, 139 (1963).
129. COUPE, M., M. L. CHAMPIGNY y A. MOYSE, *Physiol. Veg.* 5, 271 (1967).
130. HATTORI, A. y J. MYERS, *Plant Cell Physiol.* 8, 327 (1967).
131. HEBER, U. y C. S. FRENCH, *Planta* 79, 99 (1968).
132. GRANT, B. R., C. A. ATKINS y D. T. CANVIN, *Planta* 94, 60 (1970).
133. RITENOUR, G. L., K. W. JOY, J. BUNNING y R. H. HAGEMAN, *Plant Physiol.* 42, 233 (1966).
134. SCHRADER, L. E., L. BEEVERS y R. H. HAGEMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 14 (1967).
135. LOSADA, M. y D. I. ARNON, en H. F. Linsken, B. D. Sanwal y M. V. Tracey, *Modern Methods of Plant Analysis*, vol. 7, p. 569 (1964), Springer Verlag.
136. GOODWIN, T. W. (ed.), *Biochemistry of Chloroplasts*, vol. 2 (1967), Academic Press.
137. HALL, D. O. y F. R. WHATLEY, en D. B. Roodyn, *Enzyme Cytology* (1967), Academic Press.
138. LEECH, R. M. y P. R. KIRK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 685 (1968).
139. RAMÍREZ, J. M., F. F. DEL CAMPO y D. I. ARNON, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 59, 606 (1968).
140. GIBBS, M. (ed.), *Structure and Function of Chloroplasts* (1971), Springer Verlag.
141. LOSADA, M., A. PANEQUE, P. J. APARICIO, J. CÁRDENAS y J. M.^a VEGA, en *Libro Homenaje al Profesor D. Obdulio Fernández* (1969), Madrid.
142. PANEQUE, A., P. J. APARICIO, J. CÁRDENAS, J. M.^a VEGA y M. LOSADA, *FEBS Letters* 3, 57 (1969).
143. HILL, R., *Essays in Biochem.* 1, 121 (1965).
144. WESSELS, J. C. S., *Biochim. Biophys. Acta* 109, 357 (1965).
145. DEL CAMPO, F. F., J. M. RAMÍREZ, A. PANEQUE y M. LOSADA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 547 (1966).
146. BURSTRÖM, H., *Ann. Roy. Agr. Coll. Sweden* 11, 1 (1943).
147. MENDEL, J. L. y D. W. VISSER, *Arch. Biochem. Biophys.* 32, 158 (1951).
148. STILLER, M., *Plant Physiol.* 41, 348 (1966).
149. HUMBREIT, W. W., R. H. BURRIS y J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques* (1957), Burgess Publishing Co.
150. WARBURG, O., *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten* (1948), W. Saenger.
151. SANZ, P., Beca Fundación J. March (1970-71).

CONTESTACION

DEL

Excmo. Sr. D. ENRIQUE SANCHEZ-MONGE Y PARELLADA

EXCMO. SR. PRESIDENTE,
EXCMOS. SRES. ACADEMICOS,
SRAS., SRES.

Don Manuel Losada Villasante va a tomar posesión de la medalla académica que ostentó en su día don José María Albareda, de tan grata memoria. Fue precisamente el profesor Albareda quien, hace muchos años, me presentó al profesor Losada, con quien desde entonces me une una buena amistad. Esta amistad es la causa de que el honor de contestar al discurso de recepción de este nuevo académico esté acompañado de otro sentimiento personal de sincera alegría. Pero he procurado que este breve análisis de la obra científica de nuestro nuevo académico sea completamente objetivo.

Nació el profesor Losada en Carmona, provincia de Sevilla, el 20 de diciembre de 1929 y realizó en dicha ciudad sus primeros estudios de Bachillerato, que terminaría después en Sevilla. Cursó la carrera de Farmacia en la Universidad de Madrid, licenciándose en 1952 y obteniendo el *Premio Extraordinario de Licenciatura* y también el *Premio Nacional de Fin de Carrera*.

Su primera beca la disfrutó a partir de 1954 en el Instituto Botánico de la Universidad de Múnster, en Alemania, bajo la dirección del profesor Strugger, pasando en 1955, también como becario, a los Laboratorios Carlsberg, de Copenhague, bajo la dirección del profesor Winge.

Durante el año de 1956 obtuvo el título de Doctor en Farmacia y el *Premio Extraordinario de Doctorado*. Publicó ya durante este año sus primeros trabajos en la revista *Protoplasma*, trabajos que versaron sobre plastidios y otros orgánulos celulares y que eran resultado de los estudios realizados en colaboración con el profesor Strugger.

En 1957 alcanza el título de *Colaborador Científico del C.S.I.C.* y publica los resultados de sus trabajos en el Laboratorio Carlsberg sobre fermentación de azúcares por levaduras y su base genética.

Pero creo que es a partir de 1958, cuando marcha como becario de la Junta de Energía Nuclear al Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de California en Berkeley, cuando se define ya claramente lo que va a ser su línea de trabajo en la investigación, porque es allí donde inicia su colaboración con el profesor Arnon y sus estudios sobre fotosíntesis.

La calidad y dedicación que demuestra en su trabajo le permite ocupar en 1959 una plaza de *Investigador Bioquímico* en el Departamento de Fisiología Celular de la Universidad de California en Berkeley. Comienza entonces su larga serie de publicaciones, resultado de sus trabajos, con una orientación muy definida hacia el tema científico que nos ha expuesto en su discurso, tema en el que es considerado una autoridad mundial.

Los trabajos de los años de Berkeley, realizados en colaboración con Arnon y otros, versan primero sobre la asimilación del anhídrido carbónico y fotosíntesis en cloroplastos aislados, orientándose después, entre 1960 y 1961, hacia la fotofijación del nitrógeno y el fotodesprendimiento de hidrógeno, y hacia el mecanismo de las reacciones luminosas propiamente dichas en plantas y bacterias fotosintéticas.

Regresa a España en 1962 y alcanza el grado de *Investigador del C.S.I.C.*, siendo nombrado *Jefe de la Sección de Bioquímica y Fisiología Celular* del Instituto de Edafología y Biología Vegetal del C.S.I.C. Sus publicaciones en esta época, 1962 y 1963, realizadas ya en colaboración con su propio equipo de investigación, tratan sobre los mecanismos de asimilación y disimilación del nitrato, y también sobre el ciclo del ácido glioxílico en plántulas de olivo y en bacterias.

Es también en 1963 cuando inicia su actividad docente universitaria al ser nombrado *Profesor encargado de Fisiología Química* de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Madrid. También alcanza en este año la *Jefatura del Departamento de Biología Celular* del Instituto de Edafología y Biología Vegetal del C.S.I.C.

Al transformarse este Departamento en *Instituto de Biología Celular* en 1964, es nombrado *Director* del mismo y *Jefe* de su Sección de Fisiología Celular.

A lo largo de los años 1964 y 1965 publica una quincena de artículos en los que da a conocer sus avances en el estudio de la reducción del nitrato y de su asimilación fotosintética.

En 1966 los resultados de sus trabajos se ven reflejados en otra media docena de artículos que centran especialmente la atención sobre la acción de la ferredoxina y el NAD en la fotorreducción del nitrato. También publica notables trabajos sobre el metabolismo intermediario de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos en levaduras.

En oposiciones realizadas en 1967 gana la *Cátedra de Química Fisiológica* de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sevilla y en 1968 es nombrado *Jefe del Departamento de Morfología y Fisiología* de dicha Universidad y del Instituto de Biología Celular del C.S.I.C., cargos que sigue desempeñando en la actualidad.

Entre 1967 y 1969, en más de una veintena de artículos, da a conocer los resultados de sus trabajos sobre la identificación de las actividades enzimáticas que intervienen en la reducción del nitrato y sobre la regulación enzimática en rutas metabólicas centrales en levaduras.

Sus estudios sobre nitrato y nitrito reductasas, en algas del género *Chlorella* y en espinaca, se prosiguen a lo largo de 1970 y dan como resultado una decena de artículos en los que trata de la regulación de estos enzimas y de la presencia y papel desempeñado por el molibdeno y el hierro como constituyentes de los mismos.

En 1971 prosigue su línea de trabajo y además publica otros notables artículos sobre la puesta a punto de métodos para la microdeterminación enzimática del nitrato.

La producción científica del profesor Losada es, como hemos visto a grandes rasgos, muy importante en cantidad. De su calidad da buena prueba la categoría internacional de las revistas en que estos trabajos han sido publicados: *Protoplasma*, *Journal of Biological Chemistry*, *Nature*, *Biochemical Journal*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Washington*, *Biochimica et Biophysica Acta*, *Biochemische Zeitschrift*, *Comptes Rendus del Lab. Carlsberg*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *European Journal of Biochemistry*, *FEBS Letters*, *Plant and Cell Physiology*, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, *Archiv für Mikrobiologie*, *Agrochimica*, *Phytochemistry*, y *Plant Physiology*, sin olvidar nuestras revistas *Microbiología Española* y los *Anales de Edafología y Biología Vegetal*, y de *Aula Dei*.

Además de sus publicaciones en revistas periódicas y de varias revisiones en obras de reconocido prestigio y amplia difusión, nuestro nuevo académico ha pronunciado conferencias y presentado comunicaciones científicas en innumerables congresos nacionales e internacionales y ha sido invitado muchas veces a presentar los resultados de sus investigaciones en centros españoles y extranjeros.

Como consecuencia de su labor científica y como justo reconocimiento de la misma, el profesor Losada ha recibido numerosos premios y distinciones. Aparte de los premios de licenciatura, fin de carrera y doctorado recibió:

- En 1961 una beca de la Fundación March para estudios en España.
- En 1962 la ayuda March del grupo de Ciencias Naturales.
- Ayudas de los "National Institutes of Health" de los Estados Unidos, de 1963 a 1965.
- Ayudas del Fondo Nacional de Investigación en 1965 y 1967.
- Ayuda de los Laboratorios Lepetit en 1968.
- Ayuda del Instituto de Estudios Nucleares de la J.E.N. en 1969.
- Ayuda de los Laboratorios de Investigación Philips en 1970.
- Ayuda de la Fundación Manuel Aguilar en 1971.
- En representación del C.S.I.C. es Consejero Nacional de Educación en 1966 y 1967.
- Consejero de número del Patronato Santiago Ramón y Cajal del C.S.I.C. desde 1968.
- Recibe la encomienda de la Orden de Alfonso X el Sabio en 1964.
- Premio Nacional de Ciencias Francisco Franco en 1965.
- Académico correspondiente de esta Academia en 1964 y electo para numerario en 1966.

Permítaseme que mi contestación al tema del discurso del profesor Losada la enfoque desde el punto de vista de mi propia especialidad agronómica y genética.

La mejor utilización de los fertilizantes nitrogenados ha jugado un papel esencial en el aumento de las producciones unitarias de las cosechas mundiales más importantes, tales como el trigo, el maíz y el arroz.

Tanto es así, que uno de los enfoques actuales de la mejora genética de cereales, tales como el trigo, la cebada, la avena y el arroz es el de la consecución de genotipos de talla baja, en los que se reduce la longitud de entrenudos sin disminuir el número ni el tamaño de las hojas, lo cual reduciría la actividad fotosintética. Estos genotipos resisten grandes dosis de abonado nitrogenado sin sufrir el accidente del encamado, que dificulta la recolección y disminuye la cosecha en cantidad y calidad.

Pero este enfoque de la mejora genética vegetal puede y debe ser perfeccionado a la luz de los resultados de investigaciones, tales como las que el profesor Losada nos ha expuesto en su discurso.

La vía metabólica desde el nitrato, suministrado a las plantas en forma de abono nitrogenado, hasta la proteína, parece bastante clara y las investigaciones de Losada y otros autores demuestran una elevada correlación positiva entre la actividad de la nitrato reductasa en la planta y su contenido proteico.

Por otra parte, experimentos realizados en pleno campo demuestran que la reducción en la cantidad de luz recibida por las plantas, sea mediante sombreado artificial, sea mediante un aumento en las densidades de siembra, afecta en mayor grado al metabolismo nitrogenado (acumulación de nitrato y reducción de proteína) que a la fijación fotosintética del anhídrido carbónico.

El perfeccionamiento a que me refiero en el enfoque de nuestros objetivos de la mejora genética vegetal está basado en el hecho de que todo problema de mejora genética, todo problema de selección entre una población heterogénea de plantas para encontrar aquellas que tengan una mayor expresión de un carácter, tiene el mismo mecanismo elemental de solución. Este mecanismo consiste en la puesta a punto de un método que permita determinar rápidamente y con la suficiente precisión cuáles, entre los miles de plantas que forman la población heterogénea, son las que tienen realmente una mayor expresión del carácter que se selecciona. La eficacia del proceso aumenta enormemente si puede realizarse con plántulas o mejor todavía con semillas.

Nuestro objetivo en la mejora genética respecto al carácter "elevado contenido proteico" es coincidente con el de "mejor utilización del abonado nitrogenado", y esto no sólo mediante la obtención de plantas de talla baja y que no encamen, sino mediante la obtención de plantas en las que el índice de transformación de nitrato a proteína sea lo más elevado posible.

Los trabajos que el profesor Losada nos ha expuesto tan magistralmente en su discurso serían clasificados como investigación básica o fundamental por los que pretenden, erróneamente a mi juicio, separar lo que llaman investigación básica de lo que llaman investigación aplicada, dosificándolas incluso a nivel de planificación estatal. Sin embargo, las consecuencias prácticas de las investigaciones del profesor Losada y otros como él pueden ser importantísimas al proporcionarnos un nuevo método de selección vegetal.

La actividad de la nitrato reductasa, como toda actividad enzimática, está regulada por sistemas genéticos sujetos a mutación. Aun suponiendo que se tratara en este caso de un sistema genético muy simple, incluso monogénico, existirán complejos génicos reguladores de otros sistemas enzimáticos que en interacción con el de la nitrato reductasa formarán un sistema metabólico más o menos equilibrado. Esto quiere decir que el carácter "elevada actividad nitrato reductásica" es seleccionable.

Si estudios tales como los realizados por Losada nos hacen ver la relación entre la actividad de la nitrato reductasa en la plántula y la actividad en la planta adulta, o mejor aún la relación entre la actividad de este enzima en la plántula y el contenido proteico de la cosecha, se habrá encontrado una eficacísima herramienta de selección. En efecto, poniendo a punto un método no destructivo, rápido y preciso para la determinación de la nitrato reductasa en la plántula se puede llevar a cabo esta determinación en las poblaciones heterogéneas en selección, haciendo esto en condiciones de laboratorio en las que los factores ambientales se regulen con gran precisión. Podrán seleccionarse así plántulas adultas con un índice muy elevado para la utilización de abonos nitrogenados. Además, si se realiza la selección con baja intensidad lumínica, los genotipos seleccionados podrán ser tolerantes a elevadas densidades de siembra, lo cual es otro objetivo de importancia en la mejora de algunas de nuestras plantas cultivadas,

Quiero salir aquí al paso de quien pueda pensar que se trata de una pura especulación. Ya en 1967, en el volumen 19 de *Advances in Agronomy*, se publicó un artículo de Hageman, Leng y Dudley titulado "A Biochemical Approach to Corn Breeding" en el que proponían la utilización de la medida de actividades enzimáticas en los híbridos de maíz como el mejor método para la evaluación de tales híbridos, excluyendo las influencias ambientales.

Estoy seguro de que el equipo de trabajo que dirige el Profesor Lo-

sada seguirá avanzando en su línea para continuar ofreciendo, directa o indirectamente, valiosa información y nuevos métodos de trabajo a los que nos movemos en otros campos de la investigación.

Quiero terminar dando la bienvenida al Profesor Doctor don Manuel Losada Villasante, expresándole en nombre de todos los compañeros de esta Academia nuestra satisfacción por contarle entre nosotros representando una rama científica tal como la Bioquímica, cuyo crecimiento en los últimos veinte años puede calificarse de gigantesco.

De la preparación, dedicación al trabajo y entusiasmo del Profesor Losada cabe esperar grandes resultados para la Ciencia española y universal.

PUBLICACIONES DEL PROFESOR LOSADA

Trabajos de Investigación

1. DIE PLASTIDEM IN DEN ALBICATEM GEWEBEN DER BLÄETTER EINER MEDIOVARIEGATEN FORM VON *Chlorophytum comosum*. *Protoplasmas* 45, 540-551 (1956). S. Strugger und M. Losada.
2. DIE ZELORGANELLE DER WURZELHAARE VON *Trianea bogotensis*. *Protoplasma* 46, 578-584 (1956). E. S. Perner und M. Losada.
3. THE HYDROLYSIS OF RAFFINOSE BY YEAST MELIBIASE AND THE FERMENTATION OF RAFFINOSE BY COMPLEMENTARY GENE ACTION. *Compt. Rend. d. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol.*, 25, 460-481 (1957). M. Losada.
4. ESTUDIO CITOLOGICO DE LA EPIDERMIS DEL BULBO DE UNA VARIEDAD HEXAPLOIDE DE *Scilla maritima* L. *An. Edaf. Fisiol. Veg.* XVI, 885-901 (1957). M. Losada y G. Giménez.
5. HIDROLISIS DE LA RAFINOSA POR LA MELIBIASA DE LA LEVADURA Y FERMENTACION DE DICHO AZUCAR POR LA ACCION COMPLEMENTARIA DE DIVERSOS GENES. *An. Edaf. Fisiol. Veg.* XVII, 123-127 (1958). M. Losada.
6. PHOTOCHEMICAL REACTIONS AND CO₂ ASSIMILATION IN PHOTOSYNTHESIS BY CHLOROPLASTS. *Fed. Proc.* 18, 719 (1959). D. I. Arnon, A. V. Trebst and M. Losada.
7. REQUIREMENTS FOR CO₂ ASSIMILATION IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM. *IX International Botanical Congress. Proceedings II*, 404 (1959). A. V. Trebst, M. Losada and D. I. Arnon.
8. PHOTOSYNTHESIS BY ISOLATED CHLOROPLASTS: X. DEPENDENCE OF CARBON DIOXIDE ASSIMILATION ON THE PHOTOCHEMICAL REACTIONS OF CHLOROPLASTS. *J. Biol. Chem.* 234, 3055-3058 (1959). A. V. Trebst, M. Losada and D. I. Arnon.
9. PHOTOSYNTHESIS BY ISOLATED CHLOROPLASTS: XI. CO₂ ASSIMILATION IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM. *J. Biol. Chem.* 235, 832-839 (1960). M. Losada, A. V. Trebst and D. I. Arnon.
10. PHOTOSYNTHESIS BY ISOLATED CHLOROPLASTS: XII. INHIBITORS OF CO₂ ASSIMILATION IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM. *J. Biol. Chem.* 235, 840-844 (1960). A. V. Trebst, M. Losada and D. I. Arnon.
11. BACTERIAL PHOTOSYNTHESIS AND THE ASSIMILATION OF ACETATE VIA CITRAMALIC AND CITRIC ACID. *Federation Proc.* 19, 212 (1960). D. I. Arnon, M. Losada, A. V. Trebst and S. Ogata.
12. EQUIVALENCE OF LIGHT AND ADENOSINE TRIPHOSPHATE IN BACTERIAL PHOTOSYNTHESIS. *Nature* 186, 753-760 (1960). M. Losada, A. V. Trebst, S. Ogata and D. I. Arnon.

13. PHOTOFIXATION OF NITROGEN AND PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN BY THIOSULFATE DURING BACTERIAL PHOTOSYNTHESIS. *Biochem. J.* 77, 23p (1960). D. I. Arnon, M. Losada, M. Nozaki and K. Tagawa.
14. PHOTOREDUCTION OF HYDROGEN GAS BY *Chromatium* CELLS. In *Light and Life*, 570-575 (1961). Ed. by W. D. McElroy and B. Glass. Johns Hopkins Press. M. Losada, M. Nozaki and D. I. Arnon.
15. PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN, PHOTOFIXATION OF NITROGEN AND A UNIFIED CONCEPT OF PHOTOSYNTHESIS. *Nature* 190, 601-604 (1961). D. I. Arnon, M. Losada, M. Nozaki and K. Tagawa.
16. SEPARATION OF TWO LIGHT REACTIONS IN NONCYCLIC PHOTOPHOSPHORYLATION OF GREEN PLANTS. *Nature* 190, 605-610 (1961). M. Losada, F. R. Whatley and D. I. Arnon.
17. PHOTOSYNTHETIC PHOSPHORYLATION AND MOLECULAR OXYGEN. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 47, 1314-1334 (1961). D. I. Arnon, M. Losada, F. R. Whatley, H. Y. Tsujimoto, D. Hall and A. Horton.
18. NITRITE REDUCTION BY ISOLATED CHLOROPLASTS IN LIGHT. *Nature* 198, 90-91 (1963). A. Paneque, F. F. del Campo and M. Losada.
19. MECHANISM OF NITRITE REDUCTION IN CHLOROPLASTS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10, 298-303 (1963). M. Losada, A. Paneque, J. M. Ramírez and F. F. del Campo.
20. NITRATE REDUCTION IN THE LIGHT BY ISOLATED CHLOROPLASTS. *Biochim. Biophys. Acta* 66, 450-452 (1963). F. F. del Campo, A. Paneque, J. M. Ramírez and M. Losada.
21. THE GLYOXYLATE CYCLE IN OLIVE SEEDLINGS. *Biochim. Biophys. Acta* 73, 646-649 (1963). J. L. Cánovas, M. Ruiz-Amil and M. Losada.
22. CICLO DEL ACIDO GLIOXILICO EN UNA BACTERIA DENITRIFICANTE CRECIDA ANAEROBICAMENTE CON NITRATO. *Microbiol. Españ.* 16, 231-248 (1963). M. Ruiz-Amil, J. L. Cánovas y M. Losada.
23. LIGHT AND DARK PHASES OF NITRITE REDUCTION BY CHLOROPLASTS. *FEBS Abstracts*, 54 (1964). M. Losada, J. M. Ramírez, A. Paneque and F. F. del Campo.
24. SYNTHESIS OF OXALOACETATE AND CITRAMALATE FROM PYRUVATE IN BAKER'S YEAST. *FEBS Abstracts*, 73-74 (1964). J. L. Cánovas, M. Ruiz-Amil and M. Losada.
25. MECANISMO DE LA ASIMILACION FOTOSINTETICA DEL NITRATO. *XXVII Congreso Luso-Español para el Progreso de las Ciencias*, 109 (1964). M. Losada, A. Paneque, J. M. Ramírez y F. F. del Campo.
26. MECHANISM OF NITRATE REDUCTION IN CHLOROPLASTS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 297-302 (1964). J. M. Ramírez, F. F. del Campo, A. Paneque and M. Losada.
27. CITRAMALATO SINTASA EN *Rhodospseudomonas palustris*. *Microbiol. Españ.* 17, 55-62 (1964). J. L. Cánovas, M. Ruiz-Amil y M. Losada.
28. OXALACETATE, CITRAMALATE AND GLUTAMATE FORMATION FROM PYRUVATE IN BAKER'S YEASTS. *Biochem. Z.* 340, 60-74 (1964). M. Losada, J. L. Cánovas and M. Ruiz-Amil.
29. LIGHT AND DARK REDUCTION OF NITRITE IN A RECONSTITUTED ENZYMIC SYSTEM. *J. Biol. Chem.* 239, 1737-1741 (1964). A. Paneque, J. M. Ramírez, F. F. del Campo and M. Losada.

30. CONDENSATION OF α -KETOBUTYRATE AND ACETYL-CoA IN BAKER'S YEASTS. *Arch. Mikrobiol.* 50, 164-170 (1965). J. L. Cánovas, M. Ruiz-Amil and M. Losada.
31. NITRATE REDUCTION WITH MOLECULAR HYDROGEN IN A RECONSTITUTED ENZYMIC SYSTEM. *Nature* 205, 387-388 (1965). F. F. del Campo, A. Paneque, J. M. Ramírez and M. Losada.
32. LIGHT AND DARK REDUCTION OF NITRATE IN A RECONSTITUTED ENZYMIC SYSTEM. *FEBS Abstracts*, 109 (1965). A. Paneque, F. F. del Campo, J. M. Ramírez and M. Losada.
33. PROPERTIES AND FUNCTION OF YEAST PYRUVATE CARBOXYLASE. *FEBS Abstracts*, 206 (1965). M. Ruiz-Amil, G. de Torriontegui, E. Palacián, L. Catalina and M. Losada.
34. FLAVIN NUCLEOTIDE NITRATE REDUCTASE FROM SPINACH. *Biochim. Biophys. Acta* 109, 79-85 (1965). A. Paneque, F. F. del Campo, J. M. Ramírez and M. Losada.
35. LIGHT AND DARK REDUCTION OF NITRATE IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM. *Biochim. Biophys. Acta* 109, 86-96 (1965). M. Losada, J. M. Ramírez, A. Paneque and F. F. del Campo.
36. PROPERTIES AND FUNCTION OF YEAST PYRUVATE CARBOXYLASE. *J. Biol. Chem.* 240, 3485-3492 (1965). M. Ruiz-Amil, G. de Torriontegui, E. Palacián, L. Catalina and M. Losada.
37. REDUCTION OF NITRATE TO AMMONIA IN CHLOROPLASTS. In *Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion*, 211-219 (1965). Ed. by A. San Pietro. Antioch Press. M. Losada, A. Paneque, J. M. Ramírez and F. F. del Campo.
38. FERREDOXIN NITRITE REDUCTASE FROM SPINACH. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 58-71 (1966). J. M. Ramírez, F. F. del Campo, A. Paneque and M. Losada.
39. PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE IN GLUCONEOGENESIS AND ITS REPRESSION BY HEXOSES IN YEASTS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 227-231 (1966). G. de Torriontegui, E. Palacián and M. Losada.
40. FERREDOXIN AND THE DARK AND LIGHT REDUCTION OF DINITROPHENOL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 547-553 (1966). F. F. del Campo, J. M. Ramírez, A. Paneque and M. Losada.
41. NITRATE ASSIMILATION IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM. In *Current in Photosynthesis*, 431-439 (1966). Ed. by J. B. Thomas and J. C. Goedheer. Ad. Donker. M. Losada.
42. LIGHT REDUCTION OF NITRATE BY CHLOROPLAST DEPENDING ON FERREDOXIN AND NAD. *Biochim. Biophys. Acta* 126, 578-580 (1966). M. Losada and A. Paneque.
43. COMPARATIVE REDUCTION OF NITRATE BY SPINACH NITRATE REDUCTASE WITH NADH₂ AND NADPH₂. *Biochim. Biophys. Acta* 128, 202-204 (1966). A. Paneque and M. Losada.
44. INHIBITION OF YEAST PYRUVATE CARBOXYLASE BY L-ASPARTATE AND OXALOACETATE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 644-649 (1966). E. Palacián, G. Torriontegui and M. Losada.
45. CELLULAR DISTRIBUTION OF YEAST PYRUVATE DECARBOXYLASE, AND ITS INDUCTION BY GLUCOSE. *Arch. Mikrobiol.* 55, 46-53 (1966). M. Ruiz-Amil, M.^a J. Fernández, L. Medrano and M. Losada.

46. INDUCCION POR GLUCOSA DE PIRUVATO DESCARBOXILASA Y PIRUVATO KINASA EN LEVADURAS. *IV Congreso Nacional de Bioquímicos Españoles. Resúmenes*, 27 (1967). M.^a J. Fernández, L. Medrano, M. Ruiz-Amil y M. Losada.
47. REPRESION POR HEXOSAS DE LA SINTESIS DE FOSFOENOL-PIRUVATO CARBOXIQUINASA EN LEVADURAS. *IV Congreso Nacional de Bioquímicos Españoles. Resúmenes*, 29 (1967). E. Palacián, G. de Torriontegui y M. Losada.
48. REPRESION POR GLUCOSA DEL ENZIMA MALICO EN RHODOTORULA GLUTINIS. *IV Congreso Nacional de Bioquímicos Españoles. Resúmenes*, 30 (1967). M. Ruiz-Amil, M.^a J. Fernández, L. Medrano y M. Losada.
49. REDUCCION FOTOSINTETICA DEL NITRATO DEPENDIENTE DE FERREDOXINA Y NAD. *IV Congreso Nacional de Bioquímicos Españoles. Resúmenes*, 57 (1967). A. Paneque, P. J. Aparicio y M. Losada.
50. REGULATION OF THE LEVELS OF PYRUVATE KINASE AND MALATE ENZYME IN YEAST. *FEBS Abstracts*, 149 (1967). M. Losada, M.^a J. Fernández, L. Medrano and M. Ruiz-Amil.
51. REGULATION AND FUNCTION OF PYRUVATE KINASE AND MALATE ENZYME IN YEAST. *European J. Biochem.* 3, 11-18 (1967). M.^a J. Fernández, L. Medrano, M. Ruiz-Amil and M. Losada.
52. REDUCCION DE NITRATO Y NITRITO POR CLOROPLASTOS. *An. Edaf. Fis. Veg.* XXVI, 335-349 (1967). M. Losada y A. Paneque.
53. ENZYMATIC REDUCTION OF NITRATE WITH FLAVIN NUCLEOTIDES REDUCED BY A NEW CHLOROPLAST NADH₂ SPECIFIC DIAPHORASE. *Biochim. Biophys. Acta* 162, 149-151 (1968). A. Paneque, P. J. Aparicio, L. Catalina and M. Losada.
54. UTILIZATION OF MALATE OR ASPARTATE BY A YEAST LACKING MALATE ENZYME. *Arch. Mikrobiol.* 62, 192-197 (1968). G. de Torriontegui, E. Palacián, E. F. Tresguerres and M. Losada.
55. ENZYMATIC REDUCTION OF NITRATE WITH NADH. *VII International Symposium of Agrochimica. Communications*, 16 (1968). A. Paneque, P. J. Aparicio and M. Losada.
56. SEPARATION OF TWO ENZYME ACTIVITIES IN THE REDUCTION OF NITRATE WITH NADH₂. *International Congress of Photosynthesis Research. Preprints*, 135 (1968). M. Losada, P. J. Aparicio and A. Paneque.
57. UNA NUEVA DIAFORASA DE CLOROPLASTOS ESPECIFICA DE NADH. *VIII Reunión de la SEB. Resúmenes*, 34 (1968). P. J. Aparicio, A. Paneque y M. Losada.
58. ENZYMATIC REDUCTION OF NITRATE WITH NADH₂. *Agrochim.* 13, 177-184 (1969). A. Paneque, P. J. Aparicio and M. Losada.
59. NITRATE AS A HILL REAGENT IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM. *FEBS Abstracts*, 281 (1969). A. Paneque, P. J. Aparicio, J. Cárdenas, J. M.^a Vega and M. Losada.
60. NITRATE AS A HILL REAGENT IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM. *FEBS Letters* 3, 57-59 (1969). A. Paneque, P. J. Aparicio, J. Cárdenas, J. M.^a Vega and M. Losada.
61. ESTUDIO DE LA NITRATO REDUCTASA DEL ALGA CHLORELLA. *Anales de Aula Dei* 10, 744-753 (1969). P. J. Aparicio, A. Paneque, M. Rodríguez-López y M. Losada.

62. SEPARATION OF TWO ENZYME ACTIVITIES IN THE REDUCTION OF NITRATE WITH NADH . In *Progress in Photosynthesis Research*, vol. III, 1504-1509 (1969). Ed. by H. Metzner, H. Laupp jr. M. Losada, P. J. Aparicio and A. Paneque.
63. REACCION DE HILL "IN VITRO" CON NITRATO Y NITRITO. En *Libro Homenaje al Prof. D. Obdulio Fernández con motivo del Cincuentenario de su ingreso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 319-333 (1969). M. Losada, A. Paneque, P. J. Aparicio, J. Cárdenas y J. M.^a Vega.
64. EFFECT OF GLUCOSE ON PYRUVATE UTILIZATION BY RHODOTORULA GLUTINIS. *Arch. Mikrobiol.* 66, 239-249 (1969). L. Medrano, M. Ruiz-Amil and M. Losada.
65. MECHANISM OF NITRATE REDUCTION IN CHLORELLA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 980-986 (1969). W. G. Zumft, A. Paneque, P. J. Aparicio and M. Losada.
66. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACAS. *XIV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física y Química. Comunicaciones*, 199 (1969). P. J. Aparicio, J. M.^a Vega, J. Cárdenas, A. M.^a Relimpio, A. Paneque y M. Losada.
67. NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS DEL ALGA CHLORELLA. *XIV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física y Química. Comunicaciones*, 200 (1969). W. G. Zumft, P. J. Aparicio, A. Paneque y M. Losada.
68. INACTIVATION AND REPRESION BY AMMONIUM OF THE NITRATE REDUCING SYSTEM IN *Chlorella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 1009-1015 (1970). M. Losada, A. Paneque, P. J. Aparicio, J. M.^a Vega, J. Cárdenas and J. Herrera.
69. EL MOLIBDENO COMO CONSTITUYENTE DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Chlorella*. *X Reunión de la SEB. Resúmenes*, 82 (1970). P. J. Aparicio, J. M.^a Vega, W. G. Zumft, A. Paneque y M. Losada.
70. DETERMINACION ENZIMATICA DE NITRATO CON LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA. *X Reunión de la SEB. Resúmenes*, 90 (1970). A. M.^a Relimpio, M. García-Guerrero, A. Paneque y M. Losada.
71. INACTIVATION Y REPRESION POR AMONIACO DE LA NITRATO REDUCTASA DE CHLORELLA. *X Reunión de la SEB. Resúmenes*, 91 (1970). J. M.^a Vega, A. Paneque, P. J. Aparicio, J. Herrera y M. Losada.
72. NITRITO REDUCTASA ASIMILATORIA Y SU REPRESION POR AMONIACO EN CHLORELLA. *X Reunión de la SEB. Resúmenes*, 92 (1970). J. Cárdenas, J. Rivas, A. Paneque y M. Losada.
73. THE ASSIMILATORY NITRATE REDUCING SYSTEM AND ITS REGULATION BY AMMONIA IN *Chlorella*. *1st International Symposium on "Metabolic Interconversion of enzymes". Outlines of Lectures*, 59-64 (1970). M. Losada.
74. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ROLE OF FAD IN THE NADH-NITRATE REDUCING SYSTEM FROM *Chlorella*. *FEBS Letters* 9, 157-160 (1970). W. G. Zumft, P. J. Aparicio, A. Paneque and M. Losada.
75. MECANISMO MOLECULAR DE LA ASIMILACION FOTOSINTETICA DEL NITRATO EN ALGAS Y PLANTAS SUPERIORES. *I. Q.*, n.º 16, 41-45 (1970). M. Losada y A. Paneque.
76. MOLYBDENUM AND IRON AS CONSTITUENTS OF THE ENZYMES OF THE NITRATE REDUCING SYSTEM FROM *Chlorella*. *Phytochem.* 10, 1487-1495 (1971). P. J. Aparicio, J. Cárdenas, W. G. Zumft, J. M.^a Vega, J. Herrera, A. Paneque and M. Losada.

77. ROLE OF MOLYBDENUM IN NITRATE REDUCTION BY *Chlorella*. *Plant Physiol.* 48, 294-299 (1971). J. M.^a Vega, J. Herrera, P. J. Aparicio, A. Paneque and M. Losada.
78. THE ROLE OF MOLYBDENUM AND IRON IN THE ASSIMILATORY REDUCTION OF NITRATE. *International Biochemical Meeting, S. Margherita (Italy). Outlines of the papers*, 139-141 (1971), M. Losada.
79. MECHANISM AND REGULATION OF THE NITRATE-REDUCING SYSTEM FROM THE ALGA *Chlorella*. 5.^o Congreso Nacional de Bioquímica. *Resúmenes*, 13 (1971). M. Losada.
80. INCORPORATION OF RADIOACTIVE TUNGSTATE IN NITRATE REDUCTASE FROM *Chlorella*. 5.^o Congreso Nacional de Bioquímica. *Resúmenes*, 69 (1971). A. Paneque, J. M.^a Vega, J. Cárdenas, J. Herrera, P. J. Aparicio and M. Losada.
81. A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE ENZYMATIC MICRO-DETERMINATION OF NITRATE. 5.^o Congreso Nacional de Bioquímica. *Resúmenes*, 91 (1971). A. M.^a Relimpio, M. G. Guerrero, A. Paneque and M. Losada.
82. MOLYBDENUM AND THE NITRATE-REDUCING SYSTEM FROM *Chlorella*. *Arch. Mikrobiol.* 79, 367-376 (1971). J. Cárdenas, J. Rivas, A. Paneque and M. Losada.
83. DETERMINATION OF NITRATE WITH NITRATE REDUCTASE FROM SPINACH LEAVES. *Z. Pflanzenphysiol.* 66, 290-293 (1971). A. M.^a Relimpio, M. G. Guerrero, A. Paneque and M. Losada.
84. SPECIFIC PROTECTION AGAINST INHIBITORS OF THE NADH-NITRATE REDUCTASE COMPLEX FROM SPINACH. *FEBS Letters* 17, 226-230 (1971). A. M.^a Relimpio, M. G. Guerrero, A. Paneque and M. Losada.
85. MECHANISM OF NITRATE AND NITRITE REDUCTION IN *Chlorella* CELLS GROWN IN THE DARK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 82-89 (1971). M. G. Guerrero, J. Rivas, A. Paneque and M. Losada.
86. EFFECT OF IRON SUPPLY ON THE ACTIVITIES OF THE NITRATE-REDUCING SYSTEM FROM *Chlorella*. *Arch. Mikrobiol.* 81, 260-263 (1972). J. Cárdenas, J. Rivas, A. Paneque and M. Losada.
87. ¹⁵W-LABELLED NITRATE REDUCTASE FROM *Chlorella*. *Plant Cell Physiol.* 13, 104-107 (1972). A. Paneque, J. M.^a Vega, J. Cárdenas, J. Herrera, P. J. Aparicio and M. Losada.

Revisiones

1. SELECTIVE INHIBITORS OF PHOTOSYNTHESIS. In *Metabolic Inhibitors*, vol. II, 559-593 (1963). Ed. by R. M. Hochster and J. H. Quastel. Academic Press. M. Losada and D. I. Arnon.
2. ENZYME SYSTEMS IN PHOTOSYNTHESIS. In *Modern Methods of Plant Analysis*, vol. VII, 569-615 (1964). Ed. by H. F. Linskens, B. D. Sanwal and M. V. Tracey. Springer Verlag. M. Losada and D. I. Arnon.
3. THE PHOTOCHEMICAL REACTIONS OF PHOTOSYNTHESIS. In *Photo-physiology*, vol. I, 111-154 (1964). Ed. by A. C. Giese, Academic Press. F. R. Whatley and M. Losada.
4. NITRITE REDUCTASE. In *Methods in Enzymology*, vol. XXIII, 487-491 (1971). Ed. by A. San Pietro. Academic Press. M. Losada and A. Paneque.

Otras publicaciones científicas

LA FOTOSINTESIS, BASE DE LA VIDA. *Las Ciencias* 4, 264-276 (1961). M. Losada.

EL PREMIO NOBEL DE QUIMICA. *Arbor* 49, 81-83 (1961). M. Losada.

LA FOSFORILACION Y LOS DISTINTOS TIPOS DE FOTOSINTESIS. *Escyt*, vol. VI, 247-250 (1961). Salvat. M. Losada.

CONCEPTOS ACTUALES EN FOTOSINTESIS Y QUIMIOSINTESIS. En *Problemas Modernos de Ciencias Naturales*, 91-111 (1965). *Publicaciones de la Dirección General de Enseñanza Media*. M. Losada.

LUZ, MATERIA Y VIDA. *Atlántida* 16, 1-16 (1965). M. Losada.

LA FOTOSINTESIS Y LA ASIMILACION DEL NITROGENO. 45 págs. (1970). *Publicaciones de la Universidad Internacional Menéndez Pelayo*. M. Losada.

REFLEXIONES EN TORNO AL PROBLEMA DE LA UNIVERSIDAD. *Atlántida* 9, 337-353 (1971). M. Losada.

S. OCHOA; T. O. AVERY; FOTOSINTESIS; CLOROFILA. Artículos en *Gran Enciclopedia Rialp* (en prensa). M. Losada.

Traducciones

FOTOSINTESIS. *Escyt*, vol. VI, 240-247 (1964). Salvat. E. Rabinowitch. (Traducido del original inglés, *Photosynthesis*, por M. Losada).

METABOLISMO VEGETAL. *Escyt*, vol. VIII, 630-645 (1964). Salvat. J. E. Varnier. (Traducido del original inglés, *Plant Metabolism*, por M. Losada).

EL MUNDO DE LOS MICROBIOS. 724 págs. (1965). Aguilar. R. Y. Stanier, M. Doudoroff y E. A. Adelberg. (Traducido del original inglés, *The Microbial World*, por I. García Acha, M. Losada y J. Rodríguez Villanueva).

LA SINTESIS DEL ADN, por A. Kornberg. ESTRUCTURA DEL GEN Y ESTRUCTURA DE LA PROTEINA, por Ch. Yanofsky. EL CONTROL DE LAS REACCIONES BIOQUIMICAS, por J. P. Changeux. COMO SE INICIAN LAS PROTEINAS, por B. F. C. Clarck y K. A. Marcker. (Traducidos del original inglés, de los artículos correspondientes del *Scientific American*, por M. Losada, y publicados bajo la dirección de J. R. Villanueva en *La Célula Viva* (1969) por Editorial Blume).

LAS PROTEINAS, por P. Doty. LA ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS PROTEINAS, por W. H. Stein y S. Moore. ENZYMAS PROTEOLITICAS, por H. Neurath. VIDA Y LUZ, por G. Wald. LA FUNCION DE LA CLOROFILA EN LA FOTOSINTESIS, por E. I. Rabinowitch y Govindjee. EL MECANISMO DE LA FOTOSINTESIS, por R. P. Levine. FOSILES QUIMICOS, por G. Eglinton y M. Calvin. LA EVOLUCION DE LA HEMOGLOBINA, por E. Zuckerkandl. EL ORIGEN DE LA VIDA, por G. Wald. (Traducidos del original inglés, de los artículos correspondientes del *Scientific American*, por M. Losada, y publicados bajo la dirección de J. R. Villanueva en *La base molecular de la vida* (1971) por Editorial Blume).