

M. LOSADA y A. PANEQUE

REDUCCION DE NITRATO Y NITRITO  
POR CLOROPLASTOS



PUBLICADO EN  
ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA  
TOMO XXVI, NÚMS. 1-4.—MADRID, 1967



# REDUCCION DE NITRATO Y NITRITO POR CLOROPLASTOS

M. LOSADA (\*) y A. PANEQUE

## SUMMARY

### LIGHT REDUCTION OF NITRATE AND NITRITE BY CHLOROPLASTS

Two chloroplast enzymes, nitrate- and nitrite-reductase, have been purified from spinach leaves and their properties studied.

Flavin nucleotides are the electron carriers which mediate, both in the dark and in the light, the transfer of electrons from a variety of electron donor systems to nitrate with the aid of spinach nitrate reductase. Ferredoxins are the electron carriers which mediate, both in the dark and in the light, the transfer of electron from a variety of electron donor systems to nitrite with the aid of spinach nitrite reductase.

In the light, and in the presence of grana, FMN, ferredoxin, nitrate reductase and nitrite reductase, nitrate can be successively reduced, first to nitrite and then to ammonia.

In the absence of NADP reductase, neither flavin nucleotide-nitrate reductase nor ferredoxin-nitrite reductase can use by themselves NADPH<sub>2</sub> as electron donor.

Nitrate reductase can use NADH<sub>2</sub> as the electron donor without adding any external cofactor or enzyme.

Las reacciones fundamentales de la fotosíntesis consisten en la conversión de la energía luminosa absorbida por las clorofilas y pigmentos auxiliares en energía química, bajo la forma de poder reductor y enlaces de fosfato ricos en energía (1, 2). La energía química así acumulada por las células fotosintéticas se emplea luego, en la oscuridad, en la reducción de los compuestos inorgánicos oxidados que constituyen los nutrientes esenciales de todo organismo vegetal, a saber, CO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>=</sup> (6, 20, 57), o en la asimilación de ácidos orgánicos (31, 46) y reducción de H<sup>+</sup> y N<sub>2</sub> (3, 4, 5, 26) que llevan a cabo las algas y bacterias fotosintéticas.

El mecanismo de la asimilación fotosintética del anhídrido carbónico ha sido revelado en los últimos años gracias a los equipos de investiga-

---

(\*) Director del Instituto de Biología Celular. C. S. I. 7.

dores de los profesores Calvin (8) y Arnon (1, 2), principalmente: todos los enzimas que intervienen en el ciclo de su reducción han sido encontrados en los cloroplastos (30, 47, 48). En cambio, el mecanismo de la asimilación fotosintética del nitrato ha permanecido fundamentalmente desconocido hasta ahora, a pesar de haber sido intensamente estudiado por fisiólogos y bioquímicos durante más de un siglo, por ser el nitrato del suelo la fuente principal de nitrógeno de las plantas superiores (15, 32).

Warburg ha hecho notar (52, 54) que la primera reacción de Hill fue descubierta cuando él encontró que el alga *Chlorella*, suspendida en soluciones de nitrato, a las que se añadía  $\text{CO}_2$ , desprendía  $\text{O}_2$  en la luz. Warburg encontró además que, también en la oscuridad, el alga podía reducir nitrato a amoníaco con la oxidación simultánea de hidratos de carbono a  $\text{CO}_2$ , e interpretó, en consecuencia, la reducción fotoquímica del nitrato como un proceso resultante de dos reacciones: 1) conversión en la luz del anhídrido carbónico en materia orgánica y  $\text{O}_2$ , y 2) oxidación en la oscuridad de los compuestos orgánicos así formados por el nitrato, con regeneración de  $\text{CO}_2$ . Van Niel, sin embargo, indicó (49) que la reducción del nitrato en la luz podía interpretarse como una reacción esencialmente análoga a la reducción fotoquímica del  $\text{CO}_2$ , en la que el nitrato sustituyese al  $\text{CO}_2$  como aceptor terminal de electrones. Evidencia en favor de esta hipótesis fue más tarde presentada por el propio Van Niel y sus colaboradores (50), al demostrar que, a concentraciones no limitantes de  $\text{CO}_2$  y a alta intensidad de luz, las suspensiones de células intactas de *Chlorella* desprendían  $\text{O}_2$  a mayor velocidad cuando se añadía simultáneamente nitrato.

La reducción fotoquímica del nitrato fue descubierta por Kessler (19) utilizando el alga *Ankistrodesmus*, y fue más tarde corroborada por otros autores en otras algas (13, 16) y plantas superiores (33, 50). Kessler también descubrió (19) que el alga *Ankistrodesmus* podía utilizar hidrógeno molecular, como donador de electrones, para la reducción de nitrato y nitrito en la oscuridad.

El enzima asimilatorio que cataliza la reducción de nitrato a nitrito, fue aislado por primera vez de hojas de soja y de tejidos de varias otras plantas superiores por Evans y Nason (36). Desde entonces ha sido descrito en diversas especies (15) y ha sido clasificado sistemáticamente (44) como una  $\text{NAD(P)H}_2$ -nitrato reductasa, porque, de acuerdo con su naturaleza conocida y su modo de acción, se comportaba como una molibdoflavoproteína, que específicamente requería  $\text{NAD(P)H}_2$  como donadores de electrones. Aunque el NADP es el nucleótido que específicamente reduce fotoquímicamente los cloroplastos (1, 2), nuestros trabajos han demostrado que en su forma reducida sólo puede actuar como donador de electrones en la reducción del nitrato por la nitrato reductasa, cuando simultáneamente están presentes flavin nucleótido y NADP reductasa (29). El  $\text{NADH}_2$  puede, en cambio, actuar como donador de electrones en la reducción del nitrato por la nitrato reductasa sin requerir esta

reacción la adición de ninguno otro cofactor o enzima (40). Estos resultados pueden explicar la especificidad de la nitrato reductasa por  $\text{NADH}_2$  encontrada por Beevers *et al.* (7) en 15 de las 16 especies de plantas investigadas.

El enzima de plantas que cataliza la reducción de nitrito (37, 45) ha sido también sistemáticamente clasificado como  $\text{NAD(P)H}_2$ -nitrito reductasa (44), porque se pensaba que requería específicamente estos nucleótidos como donadores de electrones. Los resultados de nuestras investigaciones han puesto de manifiesto, sin embargo, que la reducción de nitrito, tanto en la luz como en la oscuridad, es catalizada por un enzima que sólo utiliza ferredoxina reducida como donador de electrones (27, 41, 43). Los trabajos de Huzisige *et al.* (17, 18) y Hewitt y Betts (14) han demostrado también la participación de la ferredoxina y nitrito reductasa en la reducción fotoquímica del nitrito en las plantas superiores. En las bacterias, sin embargo, Mortenson (34, 35) ha comunicado que el hierro (posiblemente como ión férrico) parece acoplar la reducción no enzimática del nitrito a amoníaco por ferredoxina reducida.

Aunque Kessler (20) ha concluido recientemente que la reducción fotosintética del nitrato por las plantas es un complicado proceso, en el que la luz ha de suministrar nicotinamida-adenin dinucleótidos reducidos, fosfatos ricos en energía y compuestos de carbono, nuestras investigaciones (23, 28), realizadas con cloroplastos y enzimas aislados de espinaca, han revelado que la asimilación fotosintética del nitrato no requiere ATP ni compuestos de carbono, y han aclarado, además, cómo interviene la energía luminosa en la reducción de nitrato a amoníaco, paso previo para la incorporación del nitrógeno en aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos, las sustancias más características de las células vivas.

En resumen, la reducción fotoquímica del nitrato a amoníaco transcurre en dos pasos principales que requieren transportadores de electrones y enzimas específicos: Primero, los electrones de la clorofila activada por la luz son transferidos, a través de flavin nucleótidos o de ferredoxina y NAD, al nitrato, que de esta manera se reduce a nitrito, en una reacción catalizada por la nitrito reductasa. Después, en un proceso análogo, el nitrito se reduce a amoníaco con el concurso de la ferredoxina y de otro enzima también específico, la nitrito reductasa. El transporte no cíclico de electrones desde el agua hasta el nitrato o nitrito requiere energía luminosa que se emplea no sólo en la reducción de estos compuestos de nitrógeno y en el desprendimiento de oxígeno, sino en la formación de enlaces energéticos de pirofosfato.

El mecanismo de la reducción fotoquímica y oscura del dinitrofenol ha sido recientemente investigado por Wessels (55) y también en nuestro laboratorio (12). Su reducción requiere ferredoxina en la oscuridad, pero no en la luz cuando se utilizan cloroplastos iluminados como fuente de poder reductor. La inhibición por este nitroderivado del transporte foto-

sintético no cíclico de electrones (24) ha sido localizada en el sistema que interviene en la fotooxidación del agua.

A continuación resumimos en forma muy abreviada los resultados más sobresalientes obtenidos por el equipo de investigadores de la Sección de Fisiología Celular, entre los años 1963-1966, sobre la asimilación fotosintética del nitrato y nitrito.

#### LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS

Diferentes investigadores han puesto de manifiesto que los cloroplastos contienen, además de un conjunto de enzimas que intervienen en la síntesis de hidratos de carbono, lípidos y proteínas (25), nitrato y nitrito reductasas, que catalizan, respectivamente, la reducción de nitrato a nitrito (10) y de nitrito a amoníaco (27, 38). Marré *et al.* (33) concluyeron bastante indirectamente que la reducción del nitrito (tanto en la oscuridad como en la luz) debía tener lugar en las capas externas del citoplasma y fuera de los cloroplastos, pero los resultados de nuestras investigaciones indican que la reducción del nitrito tiene lugar, al menos en parte, en los cloroplastos. Nosotros encontramos (43) que cuando los cloroplastos de espinaca eran aislados de acuerdo con la técnica de Whatley y Arnon (56), triturando las hojas con una solución isotónica de ClNa 0,35 M, la actividad de la nitrito reductasa en el homogenado foliar se distribuía entre el sobrenadante y los cloroplastos, como indica la tabla I. Aunque la actividad total de la fracción sobrenadante era mayor que la de los cloroplastos, éstos eran más activos en relación

TABLA I

*Distribución de la nitrito reductasa en las fracciones subcelulares de las hojas de espinaca*

(Ramírez, Del Campo, Paneque y Losada (43))

Fracción	Actividad total (por ciento)	Actividad específica (mil unidades* mg proteína)
Homogenado foliar... ..	100	15
Sobrenadante ... ..	76	14
Cloroplastos ... ..	21	70**

\* Las unidades están expresadas en micromoles de nitrito reducido por min. en las condiciones del ensayo standard (43).

\*\* Determinada en el extracto de cloroplastos.

con el contenido en proteínas. Los resultados presentados en la tabla II demuestran además que, si los cloroplastos así obtenidos se lavaban repetidamente con la misma solución «isotónica» y después se centrifugaban, la mayor parte de la nitrito reductasa era removida y recuperada en las correspondientes fracciones sobrenadantes, indicando que el enzima sale fácilmente de los cloroplastos. Los cloroplastos, sin embargo, no se rompían durante el tratamiento, porque los sobrenadantes de los sucesivos lavados no contenían prácticamente ninguna clorofila (sólo el so-

TABLA II

*Salida de la nitrito reductasa de los cloroplastos por lavados repetidos con solución isotónica*

(Ramírez, Del Campo, Paneque y Losada (43))

Preparación de cloroplastos	Contenido (%)	
	Expto. 1	Expto. 2
Sin lavar *	100	100
Lavada una vez	50	48
Lavada dos veces	21	10

\* La actividad específica de esta preparación, expresada en micromoles de nitrito reducido por min. por mg. de clorofila en las condiciones del ensayo standard (43), era de 0,4.

brenadante obtenido por centrifugación del homogenado de las hojas incluía en sí un valor medio del 20 por 100 de la clorofila total de dicho homogenado). También se encontró rompiendo los cloroplastos en una solución hipotónica de  $\text{ClNa}$  0,035 M y centrifugando después la preparación resultante de cloroplastos rotos (56), que casi toda la nitrito reductasa (75-100 por 100) estaba presente en el extracto de cloroplastos y sólo una pequeña parte (25-0 por 100) permanecía ligada a los grana.

#### REDUCCIÓN DE NITRATO A NITRITO POR LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACAS

La nitrato reductasa libre de NADP reductasa y de nitrito reductasa, ha sido purificada unas 130 veces (actividad específica, 0,5 u. i.) a partir de un homogenado de espinacas libre de ferredoxina por un procedimiento que incluía, como pasos principales, adsorción en gel de fosfato de calcio y cromatografía en columna de hidroxapatito (39). La tabla III muestra los donadores y transportadores de electrones de la reacción catalizada por la nitrato reductasa. Como indica la figura 1, uti-

lizando nucleótidos flavínicos como cofactores, se consiguió la reducción de nitrato con cualquiera de los siguientes sistemas como donadores de electrones: 1) grana iluminados de espinaca; 2) NADPH<sub>2</sub>-NADP reductasa de espinacas, y 3) H<sub>2</sub>-hidrogenasa de *Clostridium pasteurianum*

TABLA III

Donadores y transportadores de electrones en la reacción catalizada por la nitrato reductasa de espinaca

Donador de electrones		Transportador de electrones		Reacción
Natural	Artificial	Natural	Artificial	
1. Sistema de grana iluminados	Famili S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	Flavín nucleótidos	Viológenos	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2e <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O
2. Sistema NADPH <sub>2</sub> -NADP reductasa				
3. Sistema H <sub>2</sub> -hidrogenasa				

(11, 29, 42). En la luz, el sistema más efectivo de cloroplastos fue el constituido por grana calentados y ascorbato-diclorofenol indofenol. La explicación de este fenómeno pudo ser aclarada, y radica en el hecho de que el calentamiento suave de los cloroplastos destruye la posibilidad del flujo

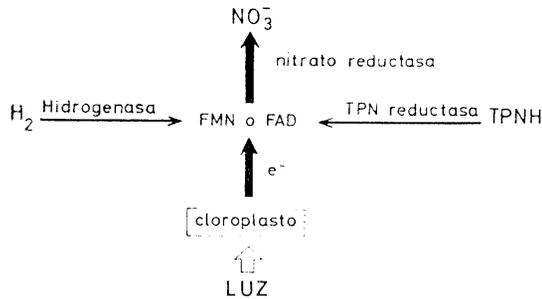


Fig. 1. Representación esquemática de la reducción del nitrato en la luz y en la oscuridad. (Del Campo, Paneque, Ramírez y Losada (11).)

cíclico o pseudocíclico de electrones que cataliza el FMN. En las condiciones experimentales adecuadas y en presencia de ortofosfato y ADP, la reducción fotoquímica de nitrato a nitrito iba acompañada de la formación de cantidades estequiométricas de ATP (29). Un donador artificial de electrones que resultó ser muy útil para el ensayo aerobio del enzima, fue el hidrosulfito de sodio (39). El metil- y el bencil-viológeno fueron tam-

bien efectivos como transportadores de electrones en la reducción enzimática luminosa u oscura del nitrato a nitrito (10, 39, 42).

En la tabla IV se muestran el pH óptimo, los inhibidores y los valores de las  $K_m$  para los sustratos de la nitrato reductasa; la reducción

TABLA IV

*pH óptimo, inhibidores y valores de las  $K_m$  para los sustratos de la nitrato reductasa de espinaca*

pH óptimo	Inhibidores	$K_m$
7.3 - 7.8	CNK, 1 mM, 100 % $N_3Na$ , 1 mM, 100 %	FMN $H_2$ , 0.02 mM FAD $H_2$ , 0.02 mM $NO_3^-$ , 0.2 mM
	Tratamiento por el calor durante 10 min. a 60°, 100 %	

del nitrato no se afectó por concentraciones de p-cloromercuribenzoato que inhibían completamente la reducción del NADP, pero sí por concentraciones de azida que no influían en la actividad de la nitrito reductasa (29, 39).

Los trabajos que actualmente se realizan en nuestro laboratorio (40, 21) han demostrado que una preparación purificada cerca de mil veces de nitrato reductasa de espinaca, que no utiliza en absoluto el NADPH<sub>2</sub> como donador de electrones, puede, en cambio, reducir el nitrato con NADH<sub>2</sub> en la oscuridad (tabla V) o con un sistema constituido por grana iluminados, ferredoxina y NAD en la luz (tabla VI). La nitrato reductasa utilizada en estos experimentos se purificó por el procedimiento primeramente descrito hasta la fracción de  $SO_4(NH_4)_2$  (39), y después por adsorción en alúmina C  $\gamma$  y elución con pirofosfato.

TABLA V

*Efecto comparativo del NADH<sub>2</sub> y NADPH<sub>2</sub> en la reducción del nitrato por la nitrato reductasa*

(Paneque y Losada (40))

Donador de electrones	Adición	$NO_2^-$ formado ( $\mu$ moles)
NADH <sub>2</sub>	Ninguna	0.63
NADPH <sub>2</sub>	FMN NADPH <sub>2</sub> diaforasa	0.55
NADPH <sub>2</sub>	FMN	0.04
NADPH <sub>2</sub>	NADPH <sub>2</sub> diaforasa	0.02

TABLA VI

*Fotorreducción de nitrato por cloroplastos dependiente de ferredoxina y NAD*

(Losada y Paneque (21))

SISTEMA	Nitrito formado µ moles.
Completo ... ..	0,54
Menos ferredoxina ... ..	0,33
Menos NAD ... ..	0,02
Menos nitrato reductasa ... ..	0,02
Completo, pero NADP en lugar de NAD ... ..	0,04

Puesto que, como muestra la figura 2, esta preparación de nitrato reductasa contiene actividad diaforásica específica de  $\text{NADH}_2$  (con ferricianuro, indofenoles, vitamina  $\text{K}_3$  o citocromo C, como aceptores), sensible a la inhibición por p-cloromercuribenzoato, es muy probable que el mecanismo de la reducción del nitrato por  $\text{NADH}_2$  sea similar al previa-

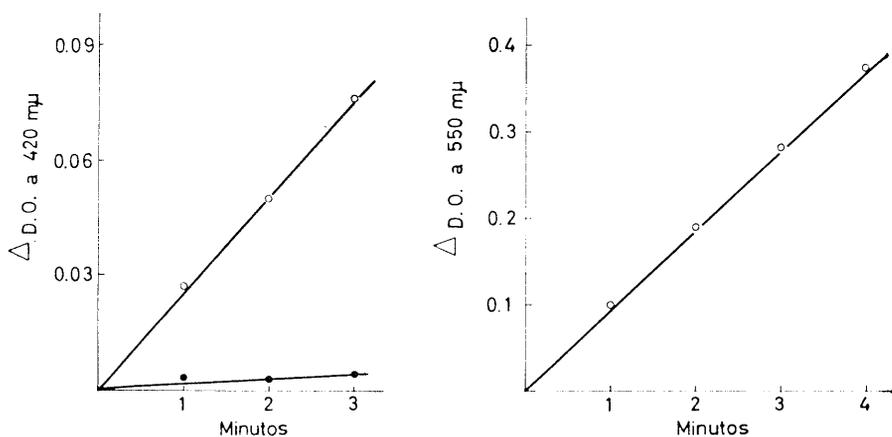


Fig. 2. (Izquierda). Actividad diaforásica específica de  $\text{NADH}_2$  en una preparación purificada de nitrato reductasa de espinacas. (Derecha). Reducción del citocromo C con  $\text{NADH}_2$  por la misma preparación. (Paneque y Losada (40).)

—○—○—  $\text{NADH}_2$ ; —●—●—  $\text{NADPH}_2$

mente descrito para el  $\text{NADPH}_2$  (29). El cofactor que transporta los electrones del sistema  $\text{NADH}_2$ - $\text{NADH}_2$  diaforasa al sistema nitrato-nitrato reductasa, no ha sido aún identificado, pero resultados preliminares abogan por su existencia. El hecho de que nuestra diaforasa específica para el  $\text{NADH}_2$  reduzca directamente el citocromo C, es otra prueba de la función de este cofactor, ya que la  $\text{NADPH}_2$  diaforasa descrita en espinacas por Lazzarini y San Pietro (22), sólo reduce este citocromo en presencia de menadiona.

REDUCCION DE NITRITO A AMONIACO POR LA NITRITO REDUCTASA DE ESPINACAS

La nitrito reductasa se purificó unas 500 veces (actividad específica, 4,2 u. i.) de un homogenado crudo de hojas de espinaca por un procedimiento que incluía, principalmente, precipitación con acetona, paso por una columna de DEAE-celulosa, elución de un lecho de DEAE-celulosa y cromatografía en una columna de DEAE-celulosa. De acuerdo con su

TABLA VII

Donadores y transportadores de electrones en la reacción catalizada por la nitrito reductasa de espinacas

	Donador de electrones		Transportador de electrones		Reacción
	Natural	Artificial	Natural	Artificial	
1. Sistemas de grana iluminados		S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	Ferredoxina	Viológenos	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + 6e <sup>-</sup> + 8H <sup>+</sup> → → NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub> O
2. Sistema NADPH <sub>2</sub> -NADP reductasa					
3. Sistema H <sub>2</sub> -hidrogenasa					

espectro de absorción, la nitrito reductasa así obtenida, que no contenía NADP reductasa ni nitrito reductasa, no es una flavoproteína (43).

En la tabla VII se incluyen los donadores y transportadores de electrones de la reacción catalizada por la nitrito reductasa. Como en el caso

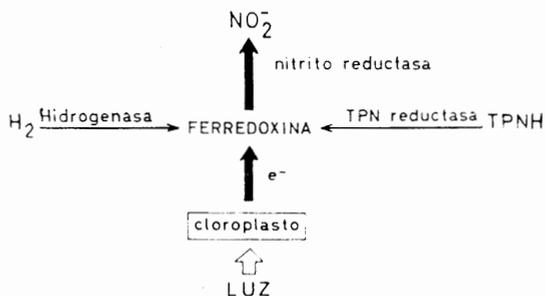


Fig. 3. Representación esquemática de la reducción del nitrito en la luz y en la oscuridad. (Pancque, Ramírez, Del Campo y Losada (41).)

del nitrato, pero utilizando ferredoxinas de espinaca o de *Cl. pasteurianum* como cofactores, los siguientes sistemas fueron efectivos en la reducción enzimática del nitrito a amoníaco, según se indica en la figura 3: 1) grana iluminados de espinaca; 2) NADPH<sub>2</sub>-NADP reductasa de es-

pinacas, y 3)  $H_2$ -hidrogenasa de *Cl. pasteurianum* (27, 41, 43). En presencia de grana frescos y con  $H_2O$  como donador terminal de electrones c (después de inhibir con DCMU la fotooxidación del agua) con dicloro-fenol indofenol reducido por ascorbato como donador artificial de electrones, la reducción fotoquímica del nitrito iba acompañada de la formación de cantidades estequiométricas de ATP (41, 43). La reducción enzimática de nitrito a amoníaco con hidrosulfito como reductor, fue favorablemente aplicada al estudio del enzima utilizando ferredoxina o viológenos como cofactores (43). En nuestras condiciones, no tuvo lugar reducción química del nitrito (ver 9, 15) por estos transportadores artificiales de electrones.

La tabla VIII muestra el pH óptimo, los inhibidores y los valores de las  $K_m$  para los sustratos de la nitrito reductasa (41, 43). La azida no afectó la reacción, y el p-cloromercuribenzoato 0,1 mM sólo inhibió cuando la ferredoxina era el cofactor, demostrando así que el enzima en sí no era sensible a este inhibidor a la concentración utilizada (43). Nues-

TABLA VIII

*pH óptimo, inhibidores y valores de las  $K_m$  para los sustratos de la nitrito reductasa de espinacas*

pH óptimo	Inhibidores	$K_m$
7,1 - 7,8	CNK, 1 mM, 100 % Tratamiento por el calor durante 10 min. a 60°, 100 %	Fd * red, 0,22 mg/ml $NO_2^-$ , 0,1 mM

\* La relación de densidades ópticas  $\frac{420 \text{ m } \mu}{274 \text{ m } \mu}$  de la preparación de ferredoxina oxidada de espinaca era 0,35.

TABLA IX

*Fotorreducción de nitrato a amoníaco*

(Losada, Ramírez, Paneque y Del Campo (29))

Sistema	Nitrito formado ( $\mu$ moles)	Amoníaco formado ( $\mu$ moles)
Completo ... ..	0,1	1,5
Menos FMN ... ..	0	0,2
Menos nitrato reductasa... ..	0	0
Menos Fd ... ..	1,3	0,1
Menos nitrito reductasa ... ..	1,3	0,2

tros resultados actuales (43) indican que la reducción del nitrito por la nitrito reductasa no es más rápida que la correspondiente formación de amoníaco, y que la hidroxilamina no es un intermediario en la reacción (ver 9).

#### REDUCCIÓN DE NITRATO A AMONIACO POR UN SISTEMA RECONSTRUIDO DE CLOROPLASTOS

Como puede verse en la tabla IX, el nitrato fue completamente reducido a amoníaco por un sistema constituido por grana de espinaca calentados, ascorbato-diclorofenol indofenol como donador de electrones, y FMN, ferredoxina, nitrato reductasa y nitrito reductasa. La reacción tuvo lugar en dos fases: 1) reducción del nitrato a nitrito por la flavín nucleótido-nitrato reductasa, y 2) reducción del nitrito a amoníaco por la ferredoxina-nitrito reductasa (29). La tabla X demuestra que sólo la

TABLE X

*Efecto de la azida en la reducción fotoquímica del nitrato y nitrito*

(Ramírez, Del Campo, Paneque y Losada (43))

Acceptor de electrones	Adición	Amoniaco formado ( $\mu$ moles)
$\text{NO}_3^-$	Ninguna	0.8
$\text{NO}_3^-$	Ninguna	0
$\text{NO}_2^-$	Azida, 1 mM	3.1
$\text{NO}_2^-$	Azida, 1 mM	3.3

primera reacción fue sensible a la azida (43). La figura 4 muestra esquemáticamente el proceso de la reducción fotosintética de nitrato a nitrito y de nitrito a amoníaco.

#### REDUCCIÓN DEL DINITROFENOL EN LA LUZ Y EN LA OSCURIDAD

Creemos de interés terminar este trabajo con nuestros recientes resultados (12), que ponen de manifiesto que los cloroplastos pueden reducir en luz el 2,4-dinitrofenol, incluso en ausencia de ferredoxina (tabla XI). En la oscuridad, en cambio, y utilizando el sistema  $\text{H}_2$ -hidrogenasa de *Cl. pasteurianum*, como donador de electrones, las ferredoxinas de bac-

terías o de plantas u otros cofactores son indispensables para la reducción del dinitroderivado, que procede vía 2-amino-4 nitrofenol hasta 2,4 diaminofenol. A concentraciones relativamente altas (1,5 mM), el 2,4-di-

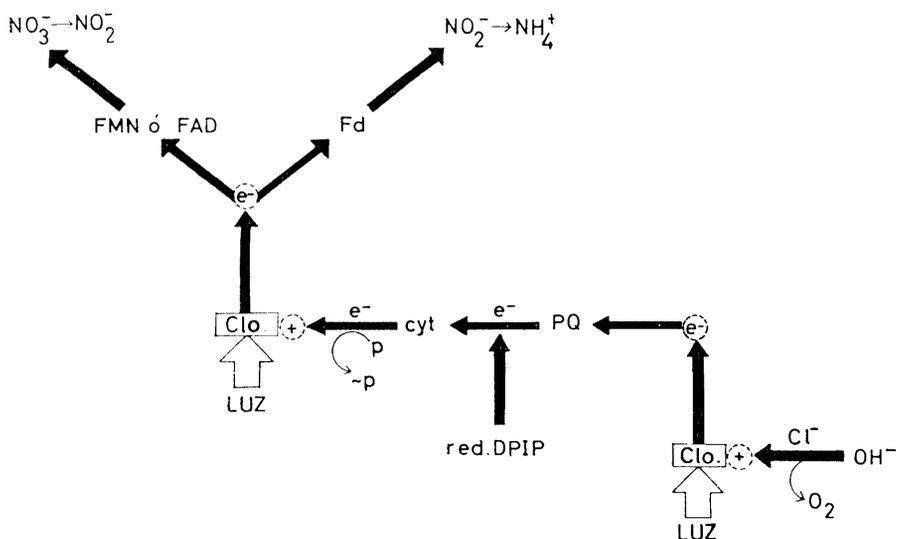


Fig. 4. Representación esquemática de la reducción fotosintética de nitrato a nitrito y de nitrito a amoníaco.

T A B L A X I

*Efecto comparativo de la ferredoxina en la fotorreducción del NADP, DNF y ANF por cloroplastos con ascorbato como donador de electrones*

Adición	Ascorbato desaparecido	NADPH <sub>2</sub> formado (μ moles)	ANF presente (μ moles)
NADP	0,3	0,3	—
NADP, Fd	6,4	6,5	—
DNF	7,3	—	1,8
DNF, Fd	6,4	—	2,0
ANF	5,4	—	4,3
ANF	5,3	—	4,2

nitrofenol inhibe el segundo sistema fotosintético (es decir, la fotooxidación del agua), pero no afecta el flujo de electrones del primer sistema con ascorbato-diclorofenol indofenol como agente reductor (tabla XI).

## RESUMEN

A partir de hojas de espinacas se han purificado y estudiado dos enzimas de crocoplastos, nitrato- y nitrito-reductasas.

Se han encontrado que los nucleótidos flavínicos son los transportadores de electrones que median, tanto en la luz como en la oscuridad, la transferencia de electrones desde diversos sistemas donadores hasta el nitrato, en presencia del enzima nitrato reductasa. Las ferredoxinas son los transportadores de electrones que median tanto en la luz como en la oscuridad, la transferencia de electrones desde diversos sistemas donadores hasta el nitrito, en presencia del enzima nitrito reductasa.

En la luz, y en presencia de grana, FMN, ferredoxina, nitrato reductasa y nitrito reductasa, el nitrato puede ser reducido sucesivamente primero a nitrito y después a amoníaco.

En ausencia de NADP reductasa, ni la flavin nucleótido-nitrato reductasa ni la ferredoxina-nitrito reductasa pueden utilizar  $\text{NADPN}_2$  como donador de electrones.

La nitrato reductasa puede utilizar  $\text{NADH}_2$  como donador de electrones sin la adición de ningún cofactor o enzima.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) ARNON, D. I. 1963. Proceedings of the Vth International Congress of Biochemistry, Moscow, 1961, vol. VI. Pergamon Press, London, p. 201.
- (2) ARNON, D. I. 1963. La photosynthèse. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, p. 509.
- (3) ARNON, D. I., LOSADA, M., NOZAKI, M. and TAGAWA, K. 1960. Biochem. J., **77**, 23.
- (4) ARNON, D. I., LOSADA, M., NOZAKI, M. and TAGAWA, K. 1961. Nature, **190**, 601.
- (5) ARNON, D. I., MITSUI, A. and PANEQUE, A. 1961. Science, **134**, 1425.
- (6) BANDURSKI, R. S. 1965. Plant Biochemistry, J. Bonner and J. E. Varner, eds. Academic Press, New York, p. 482.
- (7) BEYERS, L., FLESDER, D. and HAGEMAN, R. H. 1964. Biochim. Biophys. Acta, **89**, 453.
- (8) CALVIN, M. and BASSHAM, J. A. 1962. The Photosynthesis of carbon compounds. Benjamin, W. A., Inc.
- (9) CRESWELL, C. F., HAGEMAN, R. H., HEWITT, E. J. and HUCKLESBY, D. P. 1965. Biochem. J., **94**, 40.
- (10) DEL CAMPO, F. F., PANEQUE, A., RAMÍREZ, J. M. and LOSADA, M. 1963. Biochim. Biophys. Acta, **66**, 450.
- (11) DEL CAMPO, F. F., PANEQUE, A., RAMÍREZ, J. M. and LOSADA, M. 1965. Nature, **205**, 387.
- (12) DEL CAMPO, F. F., RAMÍREZ, J. M., PANEQUE, A. and LOSADA, M. 1966. Biochem. Biophys. Res. Commun., **22**, 547.
- (13) HATTORI, A. 1962. Plant Cell Physiol., **3**, 355.
- (14) HEWITT, E. J. and BETTS, G. F. 1963. Biochem. J., **89**, 20 p.
- (15) HEWITT, E. J. and NICHOLAS, D. J. D. 1964. Modern Methods of Plant Analysis, vol. 7 (H. F. Linskens, B. D. Sanwal and M. V. Tracey, eds.). Springer Verlag, Berlin, p. 67.
- (16) HUZISIGE, H. and SATOH, K. 1960. Biol. J. of Okayama Univ., **6**, 71.
- (17) HUZISIGE, H. and SATOH, K. 1961. Botan. Mag. (Tokyo), **74**, 178.
- (18) HUZISIGE, H., SATOH, K., TANAKA, K. and HAYASHIDA, T. 1963. Plant Cell Physiol., **4**, 307.

- (19) KESSLER, E. 1959. Symposia Soc. Exptl. Biol., 13, 87.
- (20) KESSLER, E. 1964. Ann. Rev. Plant Physiol., 15, 57.
- (21) LOSADA, M. and PANEQUE, A. 1966. Biochim. Biophys. Acta, 126, 578.
- (22) LAZZARINI, R. A. and SAN PIETRO, A. 1964. Arch. Biochem. Biophys., 106, 6.
- (23) LOSADA, M. 1966. Currents in Photosynthesis (J. B. Thomas and J. C. Goedheer., eds.). A. D. Donker, Publ., Amsterdam, p. 431.
- (24) LOSADA, M. and ARNON, D. I. 1963. Metabolic Inhibitors, vol. 2 (R. M. Hochster and J. H. Quastel, eds.). Academic Press, New York, p. 559.
- (25) LOSADA, M. and ARNON, D. I. 1964. Modern Methods of Plant Analysis, vol. 7 (H. F. Linskens, B. D. Sanwal and M. V. Tracey, eds.). Springer Verlag, Berlin, p. 569.
- (26) LOSADA, M., NOZAKI, M. and ARNON, D. I. 1961. Light and Life (W. D. McElroy and B. Glass, eds.). Johns Hopkins Univ. Press, p. 570.
- (27) LOSADA, M., PANEQUE, A., RAMÍREZ, J. M. and DEL CAMPO, F. F. 1963. Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 298.
- (28) LOSADA, M., PANEQUE, A., RAMÍREZ, J. M. and DEL CAMPO, F. F. 1965. *Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion* (A. San Pietro, ed.). Antioch Press, Yellow Springs, p. 211.
- (29) LOSADA, M., RAMÍREZ, J. M., PANEQUE, A. and DEL CAMPO, F. F. 1965. Biochim. Biophys. Acta, 109, 86.
- (30) LOSADA, M., TREBST, A. V. and ARNON, D. I. 1960. J. Biol. Chem., 235, 832.
- (31) LOSADA, M., TREBST, A. V., OGATA, S. and ARNON, D. I. 1960. Nature, 186, 753.
- (32) MACKEE, H. S. 1962. Nitrogen Metabolism in Plants, Clarendon Press, Oxford.
- (33) MARRE, E., FORTI, G., BIANCHIETTI, R. and PARISI, B. 1963. La Photosynthèse. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, p. 557.
- (34) MORTENSON, L. E. 1963. Ann. Rev. Microbiol., 17, 115.
- (35) MORTENSON, L. E. 1963. Bacteriol. Proc., 117.
- (36) NASON, A. 1963. The Enzymes, vol. 7 (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, eds.). Academic Press, New York, p. 587.
- (37) NASON, A., ABRAHAM, R. G. and AVERBACH, B. C., Biochim. Biophys. Acta, 15, 160.
- (38) PANEQUE, A., DEL CAMPO, F. F. and LOSADA, M. 1963. Nature, 198, 90.
- (39) PANEQUE, A., DEL CAMPO, F. F., RAMÍREZ, J. M. and LOSADA, M. 1965. Biochim. Biophys. Acta, 109, 79.
- (40) PANEQUE, A. and LOSADA, M. 1966. Biochim. Biophys. Acta, 128, 202.
- (41) PANEQUE, A., RAMÍREZ, J. M., DEL CAMPO, F. F. and LOSADA, M. 1964. J. Biol. Chem., 239, 1737.
- (42) RAMÍREZ, J. M., DEL CAMPO, F. F., PANEQUE, A. and LOSADA, M. 1964. Biochem. Biophys. Res. Comm., 15, 297.
- (43) RAMÍREZ, J. M., DEL CAMPO, F. F., PANEQUE, A. and LOSADA, M. 1966. Biochim. Biophys. Acta, 118, 58.
- (44) Recommendations (1964) of the International Union of Biochemistry in *Enzyme Nomenclature*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1965, p. 80.
- (45) ROUSSOS, G. G. and NASON, A. 1960. J. Biol. Chem., 235, 2997.
- (46) STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M., KUSINAWA, R. and CONTOPOLLOU, R. 1959. Proc. Nat. Acad. Sci., 45, 1246.
- (47) TREBST, A. V., LOSADA, M. and ARNON, D. I. 1959. J. Biol. Chem., 234, 3055.
- (48) TREBST, A. V., LOSADA, M. and ARNON, D. I. 1960. J. Biol. Chem., 235, 840.
- (49) VAN NIEL, C. B. 1941. Advan. Enzymol., 1, 263.
- (50) VAN NIEL, C. B., ALLEN, M. B. and WRIGHT, B. E. 1953. Biochim. Biophys. Acta, 12, 67.
- (51) VANECKO, S. and VARNER, J. E. 1955. Plant Physiol., 30, 388.

- (52) WARBURG, O. H. 1962. Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- (53) WARBURG, O. H. 1964. Prefactory chapter, Ann. Rev. Biochem., 33, 1.
- (54) WARBURG, O. H., KRIPPAL, G. und JETSCHMANN, C. 1965. Z. Naturf., 20b 993.
- (55) WESSELS, J. S. C. 1965. Biochim. Biophys. Acta, 109, 357.
- (56) WHATLEY, F. R. and ARNON, D. I. 1963. Methods in Enzymology, vol. 6 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.). Academic Press, New York. p. 308.
- (57) WHATLEY, F. R. and LOSADA, M. 1964. Photophysiology, vol. 1 (A. C. Giese, ed.). Academic Press, New York, p. 111.

Recibido para publicación: 23-11-1966