

Carmelo R i g a n o

**Azione del trattamento termico e del pH
sull'attività in « vitro » di un enzima
(nitrato riduttasi) estratto da *Cyanidium
caldarium* (ceppo Pozzuoli), alga acidofila e termale.***

Il *Cyanidium caldarium* è un'alga termale acido-resistente. Vive in natura fino alla temperatura di 53°-60° (BROCK, 1967; RIGANO & CONFORTI, 1967), ed in ambienti acidi per acido solforico, con pH qualche volta addirittura uguale a 1 (HIROSE, 1950); in laboratorio è stato coltivato fino alla temperatura di 60° C (ASCIONE & AL., 1965), ed in presenza di concentrazioni 1 N (ALLEN, 1959) e 2 N (RIGANO & TADDEI, 1967) di acido solforico. *C. caldarium* è legato per la sua crescita a mezzi acidi, ed il limite più alto di pH al quale vive è 5 (FUKUDA, 1958; ASCIONE & AL., 1965); presenta un *optimum* di crescita a 45° C (ASCIONE & AL., 1965), ed alla stessa temperatura presenta l'*optimum* per la fotosintesi e la respirazione (FUKUDA, 1958). Esistono numerosi esempi di altre alghe le quali, rispetto al *Cyanidium*, crescono a temperature più elevate, (BROCK, 1967), fino a 73°-75° C, ma si tratta in generale di Cianoficee, di organismi cioè che presentano cellule poco differenziate. *C. caldarium*, malgrado non presenti una così elevata termo-resistenza, presenta tuttavia un interesse particolare in quanto costituisce tra l'altro un raro esempio di organismo termale, le cui cellule presentano una struttura decisamente evoluta nella quale è possibile distinguere nucleo, cloroplasto e mitocondri.

Ci è parso perciò importante stabilire se le proteine estratte dal *Cyanidium* presentassero lo stesso carattere di termo-resi-

* Lavoro eseguito con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, nell'ambito del Comitato Biologia e Medicina, Gruppo « Ecologia », presso l'Istituto Botanico dell'Università di Napoli (Facoltà di Scienze).

stenza alla inattivazione termica che presentano in generale le proteine estratte dagli organismi termali. In questa nota verrà discusso il comportamento dell'enzima nitrato-riduttasi nei confronti del trattamento termico; verrà stabilito inoltre qual'è l'azione del pH sull'attività in vitro di questo enzima.

MATERIALI E METODI

Il ceppo di *C. caldarium* da noi impiegato per questa ricerca, è stato isolato a partire da materiale prelevato alla solfataria di Pozzuoli; il suo isolamento è stato ottenuto per successivi trasferimenti su mezzo di ALLEN (1959) agarizzato e non acidificato, alla temperatura di 45° C. Il materiale di partenza è stato, prima di essere trasferito all'agar, coltivato per lungo tempo su mezzo liquido contenente soltanto nitrato come sorgente d'azoto. Le colture di arricchimento erano allestite sempre su mezzo di Allen in bottiglie di Roux da 1 litro, in condizioni di illuminazione continua (intensità luminosa, 15.000 lux), ed alla temperatura di 45° C; esse erano vigorosamente aereate con aria arricchita del 5 % di CO₂. Il mezzo di Allen era modificato perché l'acido solforico è stato portato alla concentrazione 0,03 M (invece di 0,001), ed è stato sempre impiegato nitrato come sorgente d'azoto, invece dell'NH₄⁺. Il ceppo da noi isolato differisce da altri (ALLEN, 1959) soltanto perché utilizza il nitrato, ma per le altre caratteristiche: pigmenti, riproduzione, morfologia, ecologia e acido-resistenza, ne è in tutto simile (RIGANO, 1965).

Preparazione degli estratti e tecnica di dosaggio della nitrato-riduttasi. Le colture, in fase esponenziale di crescita, erano raccolte e lavate per centrifugazione. Le cellule, risospese in tampone fosfato 0,01 M, pH 7, erano rotte alla French-press; l'estratto era liberato dalle scorie per centrifugazione a 27.000 × g. L'attività nitrato-riduttasica degli estratti era determinata con la tecnica colorimetrica di LOWE & EVANS (1964). Sulla tecnica di Lowe ed Evans e sulla sua applicazione alle alghe unicellulari verrà ampiamente riferito in un successivo articolo (RIGANO, in stampa). L'attività dei sistemi allestiti con gli estratti di *Cyanidium* è rigorosamente proporzionale alla concentrazione di enzima.

Inattivazione termica. L'inattivazione della nitrato-riduttasi era fatta in tubicini da 7 ml, contenenti 0,2 ml d'estratto e 1 ml d'acqua; i tubicini erano posti in bagnomaria regolato alla temperatura scelta (60°, 70° e 75° C) che restava costante, e, trascorso il tempo di inattivazione (fra 0 e 30 minuti, come riportato in ascissa del grafico 1), venivano immediatamente immersi in ghiaccio. La misura dell'attività nitrato-riduttasica era fatta negli stessi tubicini a 30° C ed a pH 7,5, ed era ricavata dalla quantità di nitriti accumulati in 10 minuti, dosati per colorimetria.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati riguardanti l'inattivazione termica e l'azione del pH sull'attività nitrato-riduttasica degli estratti di *Cyanidium* sono rappresentati rispettivamente nei grafici 1 e 2.

Azione della temperatura. L'azione del pretrattamento termico degli estratti si esplica sull'attività nitrato-riduttasica in due differenti modi, e cioè: 1) nella primissima fase del trattamento (circa 2 minuti a 70° C), si ha una attivazione dell'enzima che riduce i nitrati con una velocità di circa 1,5 volte maggiore rispetto all'estratto non trattato; 2) nella fase successiva, mentre l'enzima mantiene a 60° C la sua attività inalterata per almeno 40 minuti (la durata dell'esperimento), a 70° C perde il 50 % di attività dopo circa 12 minuti. A 75° infine l'estratto perde totalmente l'attività dopo circa 5 minuti.

Attivazione di enzimi dovuta ad un pretrattamento termico sono state messe in evidenza da SWARTZ & AL. (1958) per una pirofosfatasi in *Proteus vulgaris* e da BODINE & AL. (1941) per una protirosinasi estratta da uova di *Orthoptera*, mentre attivazioni da preincubazione con cisteina sono state messe in evidenza da THOMPSON & AL. (1958) per una aldolasi estratta dal batterio termale *Bacillus stearothermophilus*. Non discuteremo di questo aspetto del trattamento termico della nitrato-riduttasi di *Cyanidium*: esso è attualmente oggetto di studio nel nostro laboratorio e verrà trattato in modo particolare quando i dati a nostra disposizione saranno maggiori.

Per stabilire un confronto con un'alga non termale, lo stesso esperimento di inattivazione termica è stato allestito con *Ankistrodesmus braunii* che è un'alga verde unicellulare. I risultati ottenuti alla temperatura di 55° C sono riportati nel grafico 1 (linea tratteggiata): la nitrato-riduttasi di questo organismo perde il 50 % di attività dopo circa 5 minuti di esposizione a 55° C, ed è completamente inattivata da un trattamento a 60° C per 5 minuti.

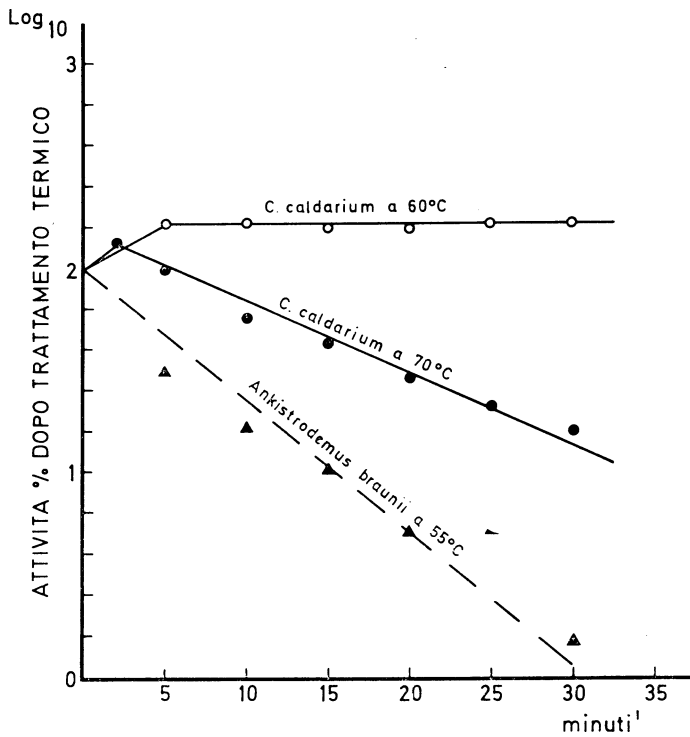


Fig. 2. - Attività nitrato-riduttasica di estratti di *Cyanidium caldarium* (alga termale) dopo trattamento termico a 60° e a 70°C, e, per confronto, di *Ankistrodesmus braunii* (alga non termale) a 55°C.

Dalla figura 1 risulta molto chiaramente che la nitrato-riduttasi di *Cyanidium* è molto più stabile all'inattivazione termica di quella di *A. braunii*; essa è più stabile inoltre della

nitrito-riduttasi di *Spinacia* la quale, come riporta PANEQUE & AL. (1965) è inattivata per un trattamento di 10 minuti alla temperatura di 60° C. La temperatura alla quale si inattiva l'enzima di *Cyanidium* risulta di almeno 15° C più alta di quella alla quale si inattiva lo stesso enzima estratto da organismi non termali, e di 15-20° C più elevata rispetto alla massima temperatura di crescita dell'alga (55-60° C).

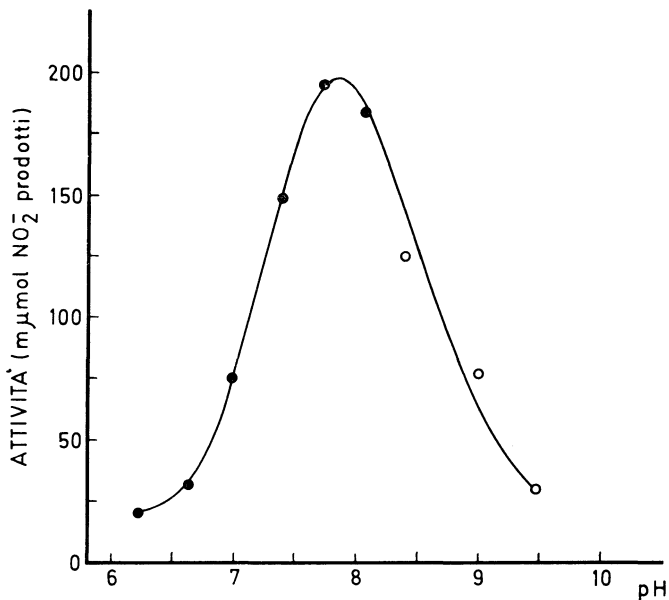


Fig. 2. - Azione del pH sull'attività nitrito-riduttasica di estratti di *Cyanidium caldarium*. tampone fosfato 0,15 M; o o o o o tampone tris-HCl della stessa molarità.

Azione del pH. Il grafico N. 2 rappresenta l'attività nitrito-riduttasica di un estratto di *Cyanidium* in funzione del pH. L'esperimento è stato eseguito in presenza di tampone fosfato 0,16 M e tampone tris-HCl della stessa molarità, nell'intervallo di pH 6-10. Il massimo di attività dell'enzima si trova a pH 7,8.

CONCLUSIONI

Le proteine estratte da organismi termali in generale si inattivano ad una temperatura più elevata rispetto alle stesse proteine estratte da organismi non termali; in generale esse sono stabili alla massima temperatura di crescita dell'organismo, ma non a temperature di molte più alte (BROCK, 1967). MARRÈ (1957) ha estratto da una Cianoficea termale, *Aphanocapsa thermalis*, una TPNH-citrocromo C riduttasi più stabile all'inattivazione termica e meno sensibile all'azione di composti che agiscono rompendo i legami di idrogeno (1958), rispetto allo stesso enzima estratto da una Cianoficea non termale; THOMPSON (1958) ha studiato una aldolasi di un batterio termale, *Bacillus stearothermophilus*, che era stabile fino alla temperatura di circa 75° C. La nitrato-riduttasi di *Cyanidium* presenta tutte le caratteristiche delle proteine termo-resistenti, e cioè: maggiore stabilità all'inattivazione termica delle nitrato-riduttasi estratte da organismi non termali; temperatura di inattivazione posta ad una temperatura di almeno 15° C più alta della temperatura massima di crescita dell'alga (55° - 60° C). ASCIONE & FRESCO (1964) hanno trovato addirittura che in *Cyanidium*, se coltivato a temperature elevate, gli enzimi attivanti gli amminoacidi sono stabili ad un trattamento termico di 5 minuti a 100° C.

A proposito del pH c'è da notare che mentre *Cyanidium* è un'alga particolarmente acido-resistente, la nitrato-riduttasi da esso estratta presenta un optimum di pH a 7,8. L'optimum di altre nitrato-riduttasi estratte da altri organismi era compreso fra 6,4 (enzima assimilativo dei batteri, PICHINOTY, 1964), 6,8 (enzima dell'alga *Ankistrodesmus*) e 7,5 (enzima di Spinacia, PANEQUE & AL., 1965). Il valore di pH che rappresenta l'optimum per la nitrato-riduttasi di *Cyanidium* è dunque il più alto finora riscontrato.

RIASSUNTO

Viene riferito sull'azione del pretrattamento termico sulla attività in vitro di una nitrato-riduttasi estratta dall'alga termale *Cyanidium caldarium*. L'enzima è stabile ad un trattamento di 60°C, e perde totalmente la sua attività soltanto per un trattamento di 75°C dopo 5 minuti; a 70°C perde il 50% di attività dopo circa 12 minuti. Nella primissima fase del trattamento viene notata una leggera attivazione dell'enzima, sia a 60°C che a 70°C. La nitrato-riduttasi di *Cyanidium* si presenta più termoresistente delle nitrato-riduttasi estratte da organismi non termali.

Il suo optimum di pH è prossimo a 7,8.

SUMMARY

Heat inactivation of nitrate-reductase obtained from *Cyanidium caldarium* (Pozzuoli strain) is reported. The enzyme is completely inactivated by exposure to 75°C for 5 minutes, but is stable to 60°C; at 70°C it loses 50% of its activity after 12 minutes of exposure. In the first periode of treatment (2 minutes at 70°C) the heat has an activating effect on the enzyme. The nitrate reductase from *Cyanidium* is more stable to temperature effect than the same enzyme obtained from no thermal organisms.

Its pH optimum is at 7,8 value.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN M. B., 1959. *Studies with Cyanidium caldarium, an anomalously pigmented chlorophyte*. Arch. Mikrobiol., **32**: 270-277.
- ASCIONE R. & J. R. FRESCO, 1964. *Heat-stable amino acid enzymes from a thermophile*. Fed. Proc., **23**: 163.
- ASCIONE R., W. SOUTHWICH, J. R. FRESCO, 1966. *Laboratory culturing of a thermophilic alga at high temperatures*. Science, **153**: 752-755.
- BODINE J. H. & T. H. ALLEN, 1941. *Enzymes in ontogenesis (Orthoptera): XV. Some properties of protyrosinases*. J. Cell. and Comp. Physiol., **18**: 152-160.
- BROCK T. D., 1967. *Life at high temperatures*. Science, **158**: 1012-1019.
- BROCK T. D., 1967. *Microrganisms adapted to high temperatures*. Nature, **214**: 882.
- FUKUDA I., 1958. *Physiological studies on a thermophilic blue-green alga Cyanidium caldarium GEITLER*. Bot. Mag., **71**: 79-86.
- HIROSE H., 1950. *Studies on Cyanidium caldarium (TILDEN) GEITLER with special reference to its ecology and distribution in Japan*. Journ. Jap. Bot., **25**: 179-184.
- LOWE R. H. & H. J. EVANS, 1964. *Preparation and some properties of a soluble nitrate reductase from Rhizobium japonicum*. Biochim. Biophys. Acta, **85**: 377-389.
- MARRÈ E. & O. SERVETTAZ, 1957. *Ricerche sull'adattamento proteico in organismi termo-resistenti. II Sulla termo-resistenza «in vitro» del sistema citocromo riduttasico di Cianoficce termali*. Rend. Acc. Naz. Lincei, Cl. Sc. Fis. Mat. Nat., **22**: 91-98.
- MARRÈ E., M. ALBERTARIO, E. VACCARI, 1958. *Ricerche sull'adattamento proteico in organismi termo-resistenti. III Relativa insensibilità di enzimi di Cianoficce a denaturanti che agiscono rompendo i legami di idrogeno*. Rend. Acc. Naz. Lincei, Cl. Sc. Fis. Mat. Nat., **24**: 349-353.
- MARRÈ E., 1962. *Enzymes from hot-spring algae*. In «Physiology and biochemistry of algae», R. A. Lewin Ed., Acad. Press, New York.
- PICHINOTY F., 1964. *Identification d'une nitrate-réductase d'origine bactérienne*. C. R. Acad. Sc., **259**: 3868-3871.
- PANEQUE A., F. F. DEL CAMPO, J. M. RAMIREZ, M. LOSADA. *Flavin nucleotide nitrate reductase from Spinach*. Biochim. Biophys. Acta, **109**: 79-85.

- RIGANO C., 1965. *Presenza dell'alga unicellulare Cyanidium caldarium (TILDEN) GEITLER nei terreni fumarolici dei Campi Flegrei e di Ischia (Napoli)*. Delpinoa, **6-7**: 196.
- RIGANO C. & T. CONFORTI, 1967. *Ecologia e distribuzione dell'alga unicellulare Cyanidium caldarium (TILDEN) GEITLER nei Campi Flegrei*. Delpinoa, **8-9**: 1-9.
- RIGANO C. & R. TADDEI, 1967. *Estrema acido-resistenza dell'alga Cyanidium caldarium (TILDEN) GEITLER vivente alla solfatara di Pozzuoli*. Delpinoa, **8-9**: 53-58.
- THOMPSON T. L., W. S. MILITZER, C. E. GEORGI, 1958. *Partial denaturation of a bacterial aldolase without loss of activity*. J. Bacteriol., **76**: 337-341.
- SWARTZ M. N., N. O. KAPLAN, M. F. LAMBORG, 1958. *A «Heat-activated» diphosphopyridinnucleotide pyrophosphatase from Proteus vulgaris*. J. Biol. Chem., **232**: 1051-1063.