

Estudio de la nitrato reductasa del alga *Chlorella*

por P. J. APARICIO, A. PANEQUE, M. RODRIGUEZ-LOPEZ*, y M. LOSADA

Sección de Bioquímica Vegetal, Instituto de Biología Celular,
C.S.I.C. y Facultad de Ciencias, Universidad de Sevilla

Recibido el 20 - I - 69

A B S T R A C T

APARICIO, P. J., PANEQUE, A., RODRÍGUEZ-LÓPEZ *, M., LOSADA, M. Study of nitrate reductase from *Chlorella*. *An. Aula Dei*, 10 (4): 744-753.

A NADH-specific nitrate reductase was purified from the cytoplasmic fraction of *Chlorella pyrenoidosa* by a procedure which includes adsorption on and elution from gels of calcium phosphate and of alumina C γ . The absorption spectrum of the purified enzyme did not show any peak of flavin nucleotides. The enzyme could use, besides NADH, viologen dyes and flavin nucleotides reduced by sodium hydrosulfite for the reduction of nitrate to nitrite. Nitrate reductase from this alga seems to be analogous to that previously studied in spinach leaves.

INTRODUCCION

El mecanismo de la asimilación del nitrato por las plantas superiores es un proceso de fundamental importancia en Bioquímica

* Dirección permanente: Instituto G. Marañón, C.S.I.C., Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid.

y Fisiología Vegetal y en Agricultura, por ser el nitrato la fuente principal, inmediata o remota, de nitrógeno del mundo vivo. Para que las plantas puedan sintetizar compuestos orgánicos nitrogenados han de reducir, primeramente, el nitrato hasta amoníaco, forma en que el nitrógeno se incorpora en los aminoácidos, los precursores de las sustancias más características de la materia viva: proteínas y ácidos nucleicos. Los compuestos nitrogenados sintetizados por las plantas sirven a su vez, posteriormente, de fuente de nitrógeno para el reino animal.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio en hojas de espinacas han demostrado que la reducción del nitrato a amoníaco se realiza a través de dos pasos enzimáticos diferentes, catalizado cada uno de ellos por una proteína específica: a) reducción del nitrato a nitrito por la nitrato reductasa; b) reducción del nitrito a amoníaco por la nitrito reductasa. Las propiedades fundamentales de estos dos enzimas, donadores de electrones, inhibidores, etc., han sido estudiados, habiéndose conseguido también la reducción completa de nitrato a amoníaco en un sistema reconstruido de cloroplastos (PANEQUE, DEL CAMPO y LOSADA, 1963; LOSADA, PANEQUE, RAMÍREZ y DEL CAMPO, 1963; RAMÍREZ, DEL CAMPO, PANEQUE, y LOSADA, 1964; PANEQUE, RAMÍREZ, DEL CAMPO y LOSADA, 1964; PANEQUE, DEL CAMPO, RAMÍREZ y LOSADA, 1965; LOSADA, RAMÍREZ, PANEQUE y DEL CAMPO, 1965; RAMÍREZ, DEL CAMPO, PANEQUE y LOSADA, 1966).

Al contrario de lo que ocurre en plantas superiores, el mecanismo de la asimilación del nitrato por las algas es poco conocido, si bien existen algunos trabajos que es interesante destacar. WARBURG y NEGELEIN (1920) pusieron de manifiesto que una suspensión iluminada de células de *Chlorella* en presencia de nitrato desprendía oxígeno con la concomitante reducción de nitrato a amoníaco. SHAFER, BAKER y THOMPSON (1961) demostraron por primera vez, en una preparación libre de células de *Chlorella pyrenoidosa*, actividad nitrato reductásica. SYRET y MORRIS (1963) describieron en *Chlorella vulgaris* una nitrato reductasa activa con NADH* como reductor, y CZYGAN (1963) encontró que en *Ankistrodesmus braunii* la nitrato reductasa estaba localizada en una fracción soluble, en tanto que la nitrito reductasa era particulada. HATTORI y MYERS (1967) han

* Abreviaturas: NADH, nicotinamida adenin dinucleótido reducido; FMN, flavin mononucleótido; FAD, flavin adenin dinucleótido; pCMB, p-cloromercuribenzoato; Tris, tri (hidroximetil) aminometano; MV, metil viológeno; BV, bencil viológeno.

comunicado que, en *Anabaena cylindrica*, la ferredoxina es el donador inmediato de electrones de la nitrito reductasa, como ocurre en las plantas superiores (LOSADA, PANEQUE, RAMÍREZ y DEL CAMPO, 1963; HUZISIGUE, SATOH, TANAKA y HAYASHIDA, 1963), y que la ferredoxina reducida en la luz por grana o en la oscuridad por NADPH (pero no por NADH) actúa de donador de electrones en la reducción del nitrato a nitrito catalizada por una preparación particulada de nitrato reductasa, que muestra poca afinidad para los flavin nucleótidos.

En este trabajo se describe la nitrato reductasa del alga verde *Chlorella pyrenoidosa*. Nuestros resultados demuestran que el enzima purificado requiere específicamente NADH como donador de electrones y que su espectro no presenta bandas de absorción correspondientes a flavin nucleótidos. Los viológenos y los flavin nucleótidos, reducidos con hidrosulfito sódico, actúan también como donadores de electrones para la reducción del nitrato a nitrito catalizada por la nitrato reductasa. Por tanto, el enzima del alga parece ser análogo en su comportamiento al de las plantas superiores (PANEQUE y LOSADA, 1966; LOSADA, APARICIO y PANEQUE, 1969).

Agradecemos al Instituto de Estudios Nucleares, J. E. N. y a la Sociedad Española de Industrias Químicas y Farmacéuticas, S. A., División Farmacéutica Lepetit, una ayuda económica para la realización de este trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de fracciones celulares de *Chlorella*.

El alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick (211/Ba), procedente de la Culture Collection of Algae and Protozoa of the Botany School, University of Cambridge (Inglaterra), se cultivó asépticamente en el medio A según RODRÍGUEZ-LÓPEZ (1964) a 24°, con luz permanente y gaseando con una mezcla de aire y 5 % de CO₂.

Las células se recogieron por centrifugación en la fase exponencial de crecimiento y se lavaron con tampón de Tris 0,01 M pH 7,4 conteniendo 0,01 M de Mg⁺⁺ y 0,05 M de NH₄⁺. Después de lavadas se resuspendieron en otro tampón de igual composición y pH, al que se había añadido 0,005 M de Mg⁺⁺ y 15 % de sacarosa, para

romperlas en el fraccionador Ribi, modelo FR-1, a 2,1 Kg/cm². Previa separación de las células no rotas, paredes celulares, almidón, etcétera, por centrifugación a $2.000 \times g$ durante 2 minutos, se sedimentaron los cloroplastos, mediante una segunda centrifugación a $3.600 \times g$ durante 20 minutos. La fracción citoplásmica resultante tras la separación de los cloroplastos se centrifugó de nuevo a $144.000 \times g$ durante 2 horas para separar membranas, restos de paredes, ribosomas, etc., y utilizar el sobrenadante como material de partida para la preparación de la nitrato reductasa. La recolección de las células y todas las etapas de rotura y fraccionamiento se realizaron a 4°.

Reactivos.

NADH, NADPH, FMN y FAD fueron adquiridos de Sigma and Co., St. Louis Missouri, USA, y MV, BV y pCMB de Mann Research Inc., New York, USA. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

Ensayo de la nitrato reductasa.

Se valoró como previamente se ha descrito para el enzima de espinacas con $S_2O_4^{2-}$ y MV, o NADH (PANEQUE, DEL CAMPO, RAMÍREZ y LOSADA, 1965; PANEQUE y LOSADA, 1966).

La proteína se midió por el método de WARBURG y CHRISTIAN (1941). El espectro del enzima purificado se obtuvo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer con registrador automático.

RESULTADOS Y DISCUSION

Purificación de la nitrato reductasa.

Al analizar las distintas fracciones subcelulares del alga se comprobó que la nitrato reductasa se distribuía entre los cloroplastos y el citoplasma, y que éste contenía un mayor porcentaje de enzima. Por esta razón se utilizó como materia de partida para la prepara-

ción del enzima la fracción citoplásmica, obtenida como previamente se ha indicado en Material y Métodos. La técnica utilizada fue la siguiente: 50 ml. del sobrenadante de la fracción citoplásmica se trataron con 10 ml. de gel de fosfato cálcico, conteniendo 10 mg. de peso seco por ml., y después de mezclar uniformemente, se dejaron estar 10 minutos en frío, agitando ocasionalmente. Entonces se centrifugó a $4.000 \times g$ durante 5 minutos en una centrífuga Sorvall refrigerada y se desechó el sobrenadante. Después de lavar el sedimento con 10 ml. de tampón 0,03 M Tris pH 7,5 se centrifugó como anteriormente. El sedimento lavado se resuspendió en 10 ml. de pirofosfato sódico 0,1 M pH 7,0 y se dejó estar 10 minutos en frío, con agitación ocasional. Finalmente, después de centrifugar durante 10 minutos a $27.000 \times g$, se obtuvo el sobrenadante, que contenía la actividad nitrato reductásica. La preparación de esta fase poseía aún una abundante proporción de ácidos nucleicos, que se revelaban por una absorción a $260 m\mu$ que llegaba a enmascarar el pico de proteínas a $280 m\mu$. Para eliminar los ácidos nucleicos se trató la preparación con solución de protamina al 2% a pH 4,0 (0,5 volúmenes de solución de protamina por volumen de preparación enzimática). Después de dejar estar 20 minutos en frío, los ácidos nucleicos se separaron por centrifugación a $27.000 \times g$ durante 20 minutos y el sobrenadante se precipitó con sulfato amónico al 50% de saturación. El sedimento de esta precipitación, que contenía la actividad de nitrato reductasa, se disolvió en 10 ml. de Tris 0,05 M pH 8,0. Una posterior purificación se llevó a cabo por tratamiento con gel de alumina $C\gamma$, como se ha descrito para el enzima de espinacas (PANEQUE y LOSADA, 1966). Todas las operaciones indicadas se efectuaron en cámara fría, a 3° . La preparación de nitrato reductasa así obtenida no mostró actividad de nitrito reductasa al ser ensayada con MV y $S_2O_4^{2-}$ (RAMÍREZ, DEL CAMPO, PANEQUE y LOSADA, 1966).

La figura 1 muestra el espectro de absorción de la nitrato reductasa purificada de *Chlorella*. Puesto que no aparecen picos de absorción de flavin nucleótidos puede sugerirse que este enzima, como el descrito previamente en espinacas (LOSADA, APARICIO y PANEQUE, 1969), no es una flavoproteína. Por el contrario, la nitrato reductasa de hojas de soja y *Neurospora* ha sido clasificada como flavoproteína (EVANS y NASON, 1953; KINSKY y McELROY, 1958).

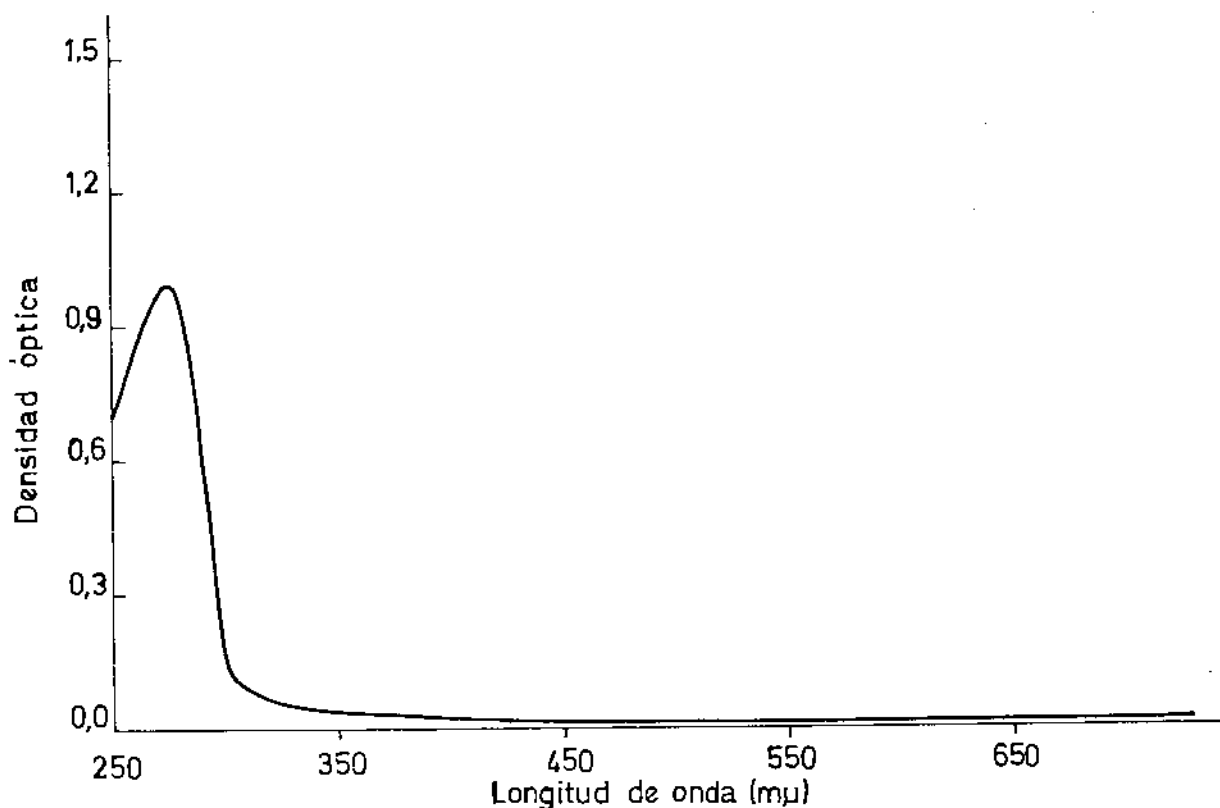


FIG. 1. Espectro de absorción de la nitrato reductasa purificada de *Chlorella pyrenoidosa*, en 0,1 M pirofosfato sódico pH 7,0. Paso de luz, 1 cm.

CUADRO 1.—Efecto de diversos donadores de electrones en la actividad de la nitrato reductasa de *Chlorella* *.

Donador de electrones	NO_3^- formado (n _μ moles)
Ninguno	1
NADH	15
NADPH	1
$S_2O_4^{2-}$ y FMN	18
$S_2O_3^{2-}$ y FAD	15
$S_2O_4^{2-}$ y MV	62
$S_2O_4^{2-}$ y BV	46

Los resultados del cuadro 1 señalan que el NADH, pero no el NADPH, era donador de electrones para la reducción del nitrato a nitrito catalizada por la nitrato reductasa de *Chlorella*. También los

* Se utilizaron 0,12 mg. de nitrato reductasa, y la reacción se llevó a cabo como previamente se ha descrito para el enzima de espinacas (PANEQUE *et al*, 1965; PANEQUE y LOSADA, 1966).

nucleótidos flavínicos, FMN y FAD, así como los viológenos, MV y BV, reducidos con hidrosulfito sódico, podían actuar como donadores efectivos.

En trabajos previos se había encontrado que, en espinacas, la transferencia de electrones desde el NADH hasta el nitrato estaba catalizada por dos actividades enzimáticas diferentes: NADH diaforásica y nitrato reductásica (PANEQUE, APARICIO Y LOSADA, 1969). Era, pues, interesante investigar si también en el caso del enzima del alga ocurría lo mismo.

Utilizando citocromo *c* como aceptor de electrones se comprobó que la preparación de nitrato reductasa contenía actividad diaforásica específica del NADH, como demuestra la figura 2.

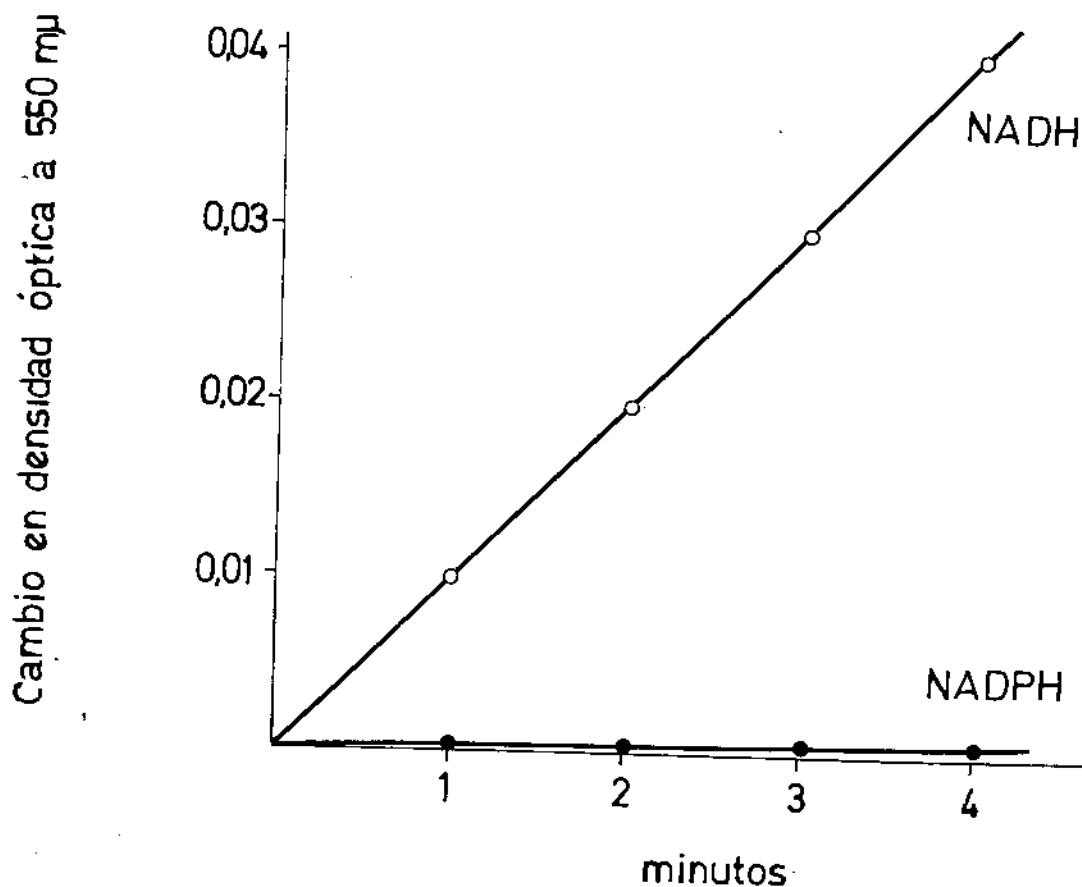


FIG. 2. Actividad diaforásica específica de NADH de la preparación de nitrato reductasa. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml., 0,06 mg. de nitrato reductasa, 2 mg. de citocromo *c* y 150 μ moles de tampón fosfato pH 7,0. Al tiempo cero, se añadieron 0,3 μ moles de NADH o NADPH. La reacción fue seguida espectrofotométricamente a 550 m μ contra un blanco que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción excepto el enzima.

Que la actividad diaforásica participaba en el transporte de electrones desde el NADH hasta el nitrato se demostró por los experimentos que recoge el cuadro 2. En efecto, mientras que utilizando hidrosulfito y MV como donador de electrones la reacción no se afectaba de manera apreciable después de calentar suavemente (45°,

CUADRO 2.— *Efecto del calentamiento y del pCMB en la actividad de la nitrato reductasa* de Chlorella ensayada con MV reducido por $S_2O_4^{2-}$ y con NADH.*

Donador de electrones	Tratamiento o adición	NO_3^- formado (nmoles)	Inhibición (por ciento)
$S_2O_4^{2-}$ y MV	Ninguno	34,5	—
$S_2O_4^{2-}$ y MV	Enzima calentado 45° 5 min.	23,0	33
$S_2O_4^{2-}$ y MV	pCMB, 0,1 mM.	28,0	20
NADH	Ninguno	14,0	—
NADH	Enzima calentado 45° 5 min.	1,0	92,9
NADH	pCMB, 0,1 mM.	0,0	100

5 minutos) la preparación de nitrato reductasa, la reacción se inhibía fuertemente después del mismo tratamiento con NADH como donador. El cuadro 2 también enseña que en tanto la transferencia de electrones desde el NADH hasta el NO_3^- se bloqueaba totalmente por pCMB a una concentración final de 0,1 mM, la nitrato reductasa propiamente dicha, ensayada con MV reducido por hidrosulfito, sólo se afectaba ligeramente por este inhibidor.

En experimentos paralelos se puso además de manifiesto que la actividad diaforásica, ensayada con citocromo c como aceptor y NADH como donador de electrones, se inhibía tanto por el tratamiento térmico como por el pCMB.

Estos resultados explican claramente cómo participan las dos actividades enzimáticas en la reducción del nitrato con NADH. En primer lugar actúa la diaforasa, que después transfiere los electrones procedentes del NADH al nitrato, en una segunda reacción catalizada por la nitrato reductasa propiamente dicha.

* Se utilizó 0,06 mg. de nitrato reductasa, y la reacción se llevó a cabo como previamente se ha descrito para el enzima de espinacas (PANEQUE *et al.*, 1965; PANEQUE y LOSADA, 1966).

REFERENCIAS

- CZYGAN, F. C.
 1963 Untersuchungen über die Nitratreduktionen der Grünalga *Ankistrodesmus braunii* *in vivo* und *in vitro*. *Planta*, **60**: 225-42.
- EVANS, H. J. and NASON, A.
 1953 Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.*, **28**: 233-54.
- HATTORI, A. and MYERS, J.
 1967 Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. II Reduction of nitrate to nitrite. *Plant and Cell Physiol.*, **8**: 327-37.
- HUZISIGUE, H., SATOH, K., TANAKA, K. and HAYASHIDA, T.
 1963 Photosynthetic nitrite reductase. II Further purification and biological properties of the enzyme. *Plant and Cell Physiol.*, **4**: 307-22.
- KYNSKY, S. C. and McELROY, W. D.
 1958 *Neurospora* nitrate reductase: The role of phosphate, flavin and cytochrome *c* reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **73**: 466-83.
- LOSADA, M., PANEQUE, A., RAMÍREZ, J. M. and DEL CAMPO, F. F.
 1963 Mechanism of nitrite reduction in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**: 298-303.
- LOSADA, M., RAMÍREZ, J. M., PANEQUE, A. and DEL CAMPO, F. F.
 1965 Light and dark reduction of nitrate in a reconstituted chloroplasts system. *Biochim. Biophys. Acta*, **109**: 86-96.
- LOSADA, M., APARICIO, P. and PANEQUE, A.
 1969 Separation of two enzyme activities in the reduction of nitrate with NADH_2 . En *Progress in Photosynthesis Research*. Vol. III, 1.504-1.509 (1969); ed. H. Metzner. Publicado por H. Laupp. Tübingen, Alemania.
- PANEQUE, A., DEL CAMPO, F. F. and LOSADA, M.
 1963 Nitrite reduction by isolated chloroplasts in light. *Nature*, **198**: 90-91.
- PANEQUE, A., RAMÍREZ, J. M., DEL CAMPO, F. F. and LOSADA, M.
 1964 Light and dark reduction of nitrite in a reconstituted enzymic system. *J. Biol. Chem.*, **239**: 1.737-1.741.
- PANEQUE, A., DEL CAMPO, F. F., RAMÍREZ, J. M. and LOSADA, M.
 1965 Flavin nucleotide nitrate reductase from spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, **109**: 79-85.
- PANEQUE, A. and LOSADA, M.
 1966 Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH_2 and NADPH_2 . *Biochim. Biophys. Acta*, **128**: 202-4.
- PANEQUE, A., APARICIO, P. J. and LOSADA, M.
 1969 Enzymatic reduction of nitrate with NADH_2 . *Agrochimica*, **XII**, 177-184.
- RAMÍREZ, J. M., DEL CAMPO, F. F., PANEQUE, A. and LOSADA, M.
 1964 Mechanism of nitrate reduction in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**: 297-302.
- 1966 Ferredoxin-nitrite from spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, **118**: 58-71.
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M.
 1964 Influence of the inoculum and the medium on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Nature*, **203**: 666-7.

SHAFER, J., BAKER, J. E. and THOMPSON, J. F.

1961 A *Chlorella* mutant lacking nitrate reductase. *Am. J. Botany*, **48**: 896-99.

SYRETT, P. J. and MORRIS, I.

1963 The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**: 566-75.

WARBURG, O. und NEGELEIN, E.

1920 Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. *Biochem. Z.*, **110**: 66

WARBURG, O. und CHRISTIAN, W.

1941 Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments enolase. *Biochem. Z.*, **310**: 384.