

# Regulace enzymů oxidujících methanol u acidotolerantního methylotrofního kmene *Candida boidinii* 2

579 663

RNDr. OLGA VOLFOVÁ, CSc., RNDr. ZDENĚK ŽIŽKA, CSc., Ing. EVA KYSLÍKOVÁ, CSc., Ing. MAREK MICHALSKÝ, Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

**Klíčová slova:** methanol, *Candida boidinii*, regulace syntézy enzymů, alkoholoxidasa, peroxizomy, xylosa

Methylotrofní kvasinky představují v současné době vysoko perspektivní zdroje řady mikrobních produktů, nejen mikrobních bílkovin, neboť představují nové a velmi výkonné expresní systémy heterologních genů a jedinečný objekt pro objasnění mechanismu regulace biogeneze peroxizomálních látek.

Výsledky studií o regulaci metabolismu methanolu a methylotrofních kvasinek jsou poměrně nedávného data a můžeme je rozdělit do dvou skupin. Týkají se:

1. Regulace syntézy a degradace specifických enzymů metabolismu methanolu, tzv.  $C_1$  specifických enzymů,

2. Regulace aktivit  $C_1$  specifických enzymů pomocí nízkomolekulárních efektorů (substrátů a produktů) a stanovení hlavního toku uhlíku při metabolismu methanolu během růstu buněk. Tento příspěvek je zaměřen na regulaci syntézy  $C_1$  specifických enzymů.

Syntéza  $C_1$  specifických enzymů je u methylotrofních kvasinek *Candida boidinii* a *Hansenula polymorpha* regulována katabolickou represí, derepresí a indukcí specifickou na methanol. Tato regulace probíhá na úrovni transkripce [1, 2]. Navíc hladina některých  $C_1$  specifických enzymů v buňce je ovlivňována katabolickou inaktivací vedoucí k přímé degradaci molekul enzymů [3]. Interakce mezi uvedenými regulačními mechanismy určuje odpověď methylotrofních kvasinek na měnící se kultivační podmínky.

Metodickým přístupem při studiu regulace syntézy  $C_1$  specifických enzymů u methylotrofních kvasinek se stalo studium hladin klíčových enzymů při růstu buněk na směsných methanol-víceuhlíkatých substrátech, především na methanol-sacharidových, jak v jednorázových tak v chemostatových kulturních, a dále studium ultrastrukturálních změn kvasničné buňky.

Jelikož z literatury vyplývá, že jednotlivé methylotrofní kmény mohou vykazovat určité rozdíly v odpovědi na měnící se kultivační podmínky, studovali jsme regulaci syntézy methanol-oxidujících enzymů u našeho acidotolerantního kmene *Candida boidinii* 2 [4]. Tento kmen roste s optimálními růstovými parametry v jednorázových i kontinuálních kultivacích za konstantních kultivačních podmínek při pH 3,0.

## MATERIÁL A METODY

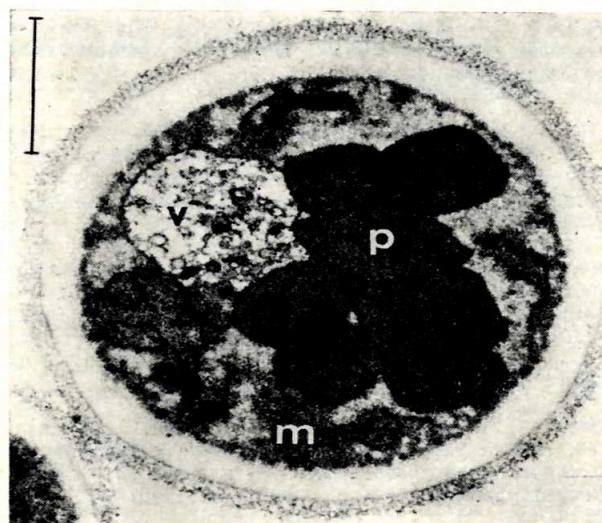
**Organismus:** acidotolerantní kmen kvasinky *Candida boidinii* 2 [4]. Kultivace kmene probíhaly v laboratorním 3 l fermentoru za konstantního pH 3,0 a teploty 30 °C při míchání 600 .min<sup>-1</sup> a vzdušnění 0,3 až 1,0 l .min<sup>-1</sup>. Koncentrace O<sub>2</sub> byla 40 až 50% nasycení. Methanol v médiu [5] byl v koncentraci 5 g .l<sup>-1</sup> nebo ve směsi s manosou nebo xylosou (poměr 1:1) v koncentraci 3 g .l<sup>-1</sup>.

**Analytické metody:** stanovení suché hmotnosti buněk, aktivity alkoholoxidasy a methanolu v médiu je uvedeno v předešloží publikaci [6]. Xylosa, manosa a glukosa byly stanoveny jako redukující látky [7].

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Během růstu na methanolu syntetizuje *C. boidinii* 2 vysokou hladinu alkoholoxidasy a katalasy, prvních oxidačních enzymů zahajujících utilizaci methanolu. Alkoholoxidasa, též zvaná methanoloxidasa (dále jen AOX), oxiduje methanol na formaldehyd a peroxid vodíku. Katałasa peroxid vodíku ihned rozkládá na kyslík a vodu a pravděpodobně se podílí i na peroxidasové oxidaci methanolu. Oba enzymy jsou v kvasničné buňce lokalizovány v mikrotěliscích, v tzv. peroxizomech. Těchto peroxizomů vytváří buňka při některých podmínkách kultivace, jako při limitaci růstu buněk methanolem, ke které dochází při přechodu buněk z logaritmické fáze růstu do fáze stacionární nebo při nízkých zřeďovacích rychlostech v chemostatu, velká množství. Současně za těchto kultivačních podmínek objem peroxizomů značně roste, až zaplní převážnou část objemu buňky. Enzym AOX vytváří v peroxizomu krystaloid. Při zřeďovací rychlosti  $D = 0,03 \text{ h}^{-1}$  v chemostatu při limitaci růstu buněk *C. boidinii* 2 methanolem se tvoří krystaloidy, které ovlivní tvar peroxizomů (obr. 1).

Peroxizomy jsou obalenы jednoduchou membránou. Nové peroxizomy vznikají odštěpováním ze starých zralých peroxizomů. Do buněčných pupenů se dostávají při dělení buněk spolu s částí materiálu mateřské buňky.



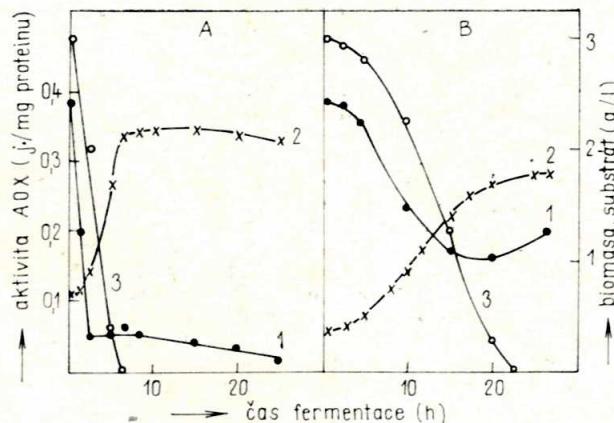
Obr. 1. Elektronoptický snímek řezu kvasinkou *C. boidinii* 2 rostoucí na methanolu

Peroxizomy (p), vakuola (v) a mitochondrie (m). Fixace  $\text{KMnO}_4$ , zalití do Vestopalu W, krájení na ultramikrotomu LKB Ultrotom 1, kontrastování uranylacetátem, a citrátom olova. Elektronový mikroskop JEOL JEM 100 B. Úsečka odpovídá 0,5  $\mu\text{m}$ .

Na médiu s glukosou nebo manosou většinou kvasničné buňky peroxizomy budou postrádají, nebo nalézáme ojediněle jen malá okrouhlá tělíska, která po přenesení buněk do média s methanolem se vyvinou v normální velké peroxizomy.

Lze konstatovat, že kmen *C. boidinii* 2 rostoucí při pH 3,0, vykazuje obdobnou strukturu a vlastnosti peroxizomů jako jiné methylotrofní kvasničné kmény kultivované při pH 4,0 až 5,5 [8, 9].

Při přenosu kvasničných buněk *C. boidinii* 2 vyrostly na médiu s methanolem do média, kde methanol je nahrazen manosou, pozorujeme prudký pokles hladiny aktivit obou peroxizomálních enzymů. Během 2 až 4 h kultivace klesne hladina AOX v buňkách (stanovená *in situ*) až na jednu desetinu výchozí hladiny (obr. 2A). Tento jev, který byl popsán při přenosu kvasničných buněk *Hansenula polymorpha* do média s glukosou [3], není výsledkem jen represe syntézy peroxizomálních enzymů, ale i katabolické inaktivace. Dochází jak k destrukci molekul enzymů, tak i celých peroxizomů. Autofágovní způsob degradace peroxizomů pomocí vakuolárního systému buňky podroběně popsali u kvasinek *H.*

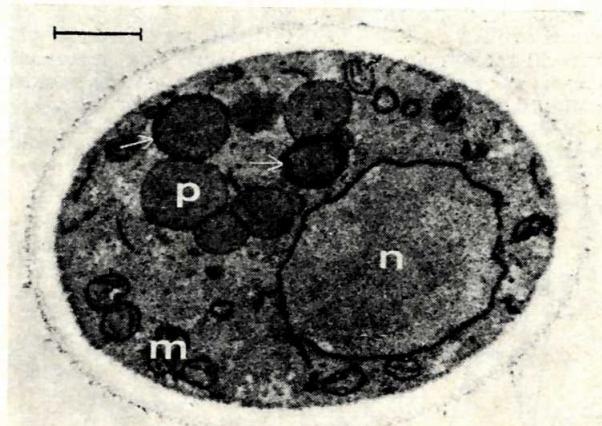


Obr. 2. Růst buněk *C. boidinii* 2 a aktivita AOX na médiu s A: manosou, B: xylosou

(1) specifická aktivita methanoloxidasy (AOX) *in situ*, (2) hmotnost suchých buněk, (3) zbytkový sacharid v mediu.

*polymorpha* přenesených z methanolového média do média s glukosou Veenhuis et al. [10].

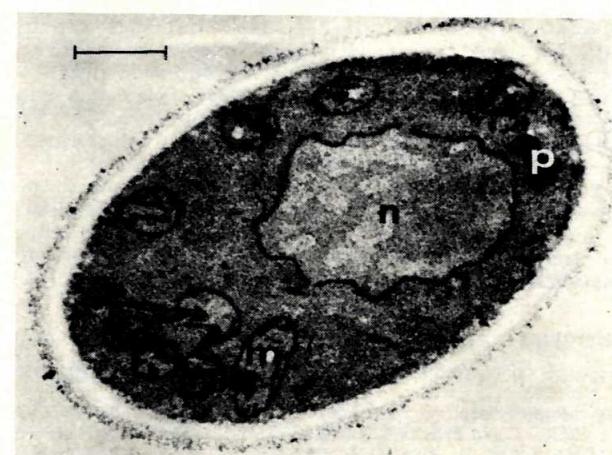
Degradační proces začíná vývojem elektron-densních membrán okolo peroxizomů. Tyto membrány, které se nově tvoří (složené z několika vrstev), jsme pozorovali u peroxizomů v buňkách *C. boidinii* 2 přenesených do



Obr. 3. Degradace peroxizomů (p) při růstu kvasinky *C. boidinii* 2 na médiu s manosou

Bílé šipky označují vyvíjející se elektron-densní membrány okolo peroxizomů, (n) jádro, (m) mitochondrie. Úsečka odpovídá 0,5  $\mu\text{m}$ .

média s manosou po 1 h kultivace (obr. 3). Membrány postupně obklopují celý peroxizom. Po 4 h kultivace buňek na médiu s manosou velké peroxizomy z buněk zmizí. V buňkách nalézáme jen 1 až 2 velmi malé peroxizomy a výrazně zvětšené mitochondrie (obr. 4).



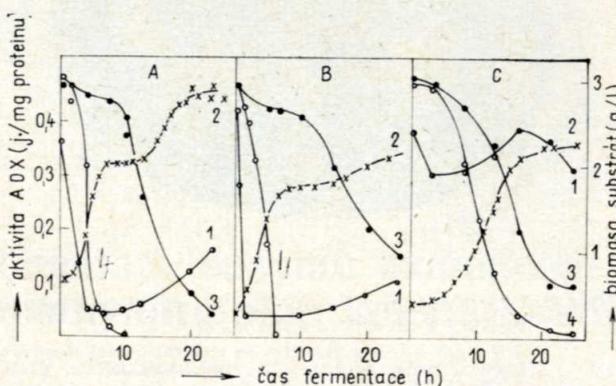
Obr. 4. Ultratenký řez kvasinkou *C. boidinii* 2 po 4hodinové kultivaci na médiu s manosou

Peroxizomy (p), mitochondrie (m), jádro (n), úsečka odpovídá 0,5  $\mu\text{m}$ .

K obdobné katabolické represi a inaktivaci peroxizomálních enzymů AOX a katalasy dochází po přenesení buněk vyrostlých na methanolu do média se směsí methanol-manosa nebo methanol-glukosa (obr. 5 AB). Po vyčerpání sacharidu z média, který je kvasinkou利用ován přednostně před methanolem, dojde k derepresi a de novo syntéze obou peroxizomálních enzymů, přičemž katalasa je dereprimována rychleji než AOX. Také na médiu s methanol-manosou směsí dochází k rychlejší derepresi obou enzymů než na methanol-glukosové směsi. Výsledkem je diauxický růst buněk.

Zcela odlišně se chová náš kmen při přenosu buněk vyrostlých na médiu s methanolem do média s xylosou.

Na médiu se samotnou xylosou dochází jen k represi peroxizomálních enzymů (obr. 2B). Hladina AOX v průběhu 20 h růstu buněk klesne maximálně na 40 % výchozí hladiny. Po vyčerpání převážného množství xylosy z média hladina AOX v buňkách opět vzroste o 10 až 15 %. Dochází, na rozdíl od manosy a glukosy, k de-represi syntézy AOX i v nepřítomnosti methanolu. V přítomnosti methanolu, tj. při růstu buněk na methanol-xylosových směsích, zaznamenáme jen mírný pokles hladiny AOX v buňkách během lag fáze (obr. 5C), který je zcela identický jako pokles AOX v buňkách přenesených do nového média se samotným methanolem.



Obr. 5. Růst buněk *C. boidinii* 2 a aktivita AOX na médiích se směsi methanol-sacharid 1:1. A: methanol-manosa, B: methanol-glukosa, C: methanol-xylosa.

(1) specifická aktivita AOX, (2) hmotnost suchých buněk, (3) methanol, (4) sacharid.

V tomto případě jde pravděpodobně o pokles aktivity AOX v důsledku působení vyšší koncentrace substrátu na enzym na počátku kultivace. K represi syntézy peroxizomálních enzymů však nedochází, neboť oba substráty ze směsi jsou využívány buňkou současně. Výsledkem je růst buněk bez diauxie a aditivní přírůstek buněk z obou substrátů během celé kultivace.

Toto odlišné chování acidotolerantního kmene *C. boidinii* 2 vůči různým sacharidům se zajímavě nejen z teoretického hlediska, ale i z hlediska aplikace. Methanol-xylosových směsí lze s výhodou použít k produkci C<sub>1</sub> specifických produktů [11].

#### Literatura

- [1] ROA, M., BLOBEL, G.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 1983, S. 6872
- [2] ROGGENKAMP, R., JANOWICZ, Z., STANIKOWSKI, B., HOLLENBERG, C. P.: Mol. Gen. Genet., **194**, 1984, S. 489
- [3] VEENHUIS, M., ZWART, K., HARDER, W.: FEMS Microbiol. Lett. **3**, 1978, S. 21
- [4] Pat. ČSSR PV 7618-87
- [5] VOLFOVÁ, O., PILÁT, P.: Folia Microbiol., **19**, 1974, S. 249
- [6] VOLFOVÁ, O.: Folia Microbiol., **20**, 1975, S. 307
- [7] MILLER, G. L.: Anal. Biochem. **31**, 1959, S. 426
- [8] VEENHUIS, M., VAN DIJKEN, J. P., PILON, S. A. F., HARDER, W.: Arch. Microbiol., **117**, 1978, S. 153
- [9] TANAKA, A., YASUHARA, S., KAWAMOTO, S., FUKUI, S., OSUMI, M.: J. Bacteriol., **126**, 1976, S. 919
- [10] VEENHUIS, M., DOUMA, A., HARDER, W., OSUMI, M.: Arch. Microbiol., **134**, 1983, S. 193
- [11] Pat. ČSSR PV 3445-88

Lektoroval doc. Ing. D. Halama, CSc.

**Volfová, O. - Žižka, Z. - Kyslíková, E. - Michalský, M.: Regulace enzymů oxidujících methanol u acidotolerantního kmene *Candida boidinii* 2.** Kvas. prům., **34**, 1988, č. 12, s. 360—362.

Buňky kmene *Candida boidinii* 2 při růstu na médiu s methanolem vykazují vysokou hladinu peroxizomálních enzymů alkoholoxidasy a katalasy. Po přenosu buněk do média s manosou nebo se směsi methanol-manova dochází jak ke katabolické represi syntézy, tak i ke katabolické inaktivaci obou peroxizomálních enzymů. Studium ultrastruktury buněk prokázalo autofágii způsob degradace peroxizomů. Naopak na xyloso-methanolových směsích nedochází ani k represi ani k inaktivaci enzymů. Xylosa a methanol jsou utilizovány současně, buňky nerostou diauxicky a přírůstek biomasy v průběhu růstu je aditivní.

**Вольфова, О. — Жижка, З. — Кисликова, Е. — Михалски, М.: Регулирование энзимов, окисляющих метанол в случае ацидотolerантного метилотрофного штамма *Candida boidinii* 2.** Квас. прум., **34**, 1988, № 12, стр. 360—362.

Клетки штамма *Candida boidinii* 2 при размножении в среде с метанолом показывают высокий уровень пероксизомальных энзимов алкоголовидазы и катализы. При переносе клеток в среду с манозой или со смесью метанол-манозы происходит как кatabolическая репрессия синтеза, так и кatabolическая инактивация обоих пероксизомальных энзимов. Исследование ультраструктуры клеток доказало автофагический способ деградации пероксизом. Наоборот, на ксилоzo-метанольных смесях не происходит ни репрессия, ни инактивация энзимов. Ксилоza и метанол утилизуются одновременно, клетки не растут diauxически и прирост биомассы в течение роста является аддитивным.

**Volfová, O. - Žižka, Z. - Kyslíková, E. - Michalský, M.: Regulation of Methanol Oxidizing Enzymes in Acidotolerant Methylotrophic Strain *Candida boidinii* 2.** Kvas. prům., **34**, 1988, No. 12, pp. 360—362.

The cells of *Candida boidinii* 2 have a high level of alcohol oxidase and catalase in peroxisomes during the growth in presence of methanol. After the cells are transferred into the medium with mannose or with a mixture of methanol-mannose the catabolic repression of the synthesis and the catabolic inactivation of both the peroxisomal enzymes start to affect. The autophagy manner of peroxisome degradation has been proved by the ultrastructure study. On the other hand, with xylose-methanol mixtures no repression as well as no inactivation of the enzymes occurred. Xylose and methanol are simultaneously utilized, no diauxie occurs and overall growth yield is additive.

**Volfová, O. - Žižka, Z. - Kyslíková, E. - Michalský, M.: Regulation der Methanol-oxidierenden Enzyme bei dem säuretoleranten methylotrophen Stamm *Candida boidinii* 2.** Kvas. prům., **34**, 1988, Nr. 12, S. 360—362.

Die Zellen des Stammes *Candida boidinii* 2 weisen beim Wachstum auf Methanol-haltigem Medium ein hohes Niveau der peroxisomalen Enzyme Alkoholoxidase und Katalase auf. Bei der Übertragung der Zellen in ein Medium mit Manose oder mit dem Gemisch Methanol-Mannose erfolgt nicht nur die katabolische Repression der Synthese, sondern auch die katabolische Inaktivierung beider peroxisomaler Enzyme. Das Studium der Zellen-Ultrastruktur bestätigte den Autophag-Charakter der Degradation der Peroxisome. Dagegen wurde auf Gemischen Xylose-Methanol weder die Repression noch die Inaktivierung der Enzyme festgestellt. Xylose und Methanol werden zugleich utilisiert, die Zellen wachsen nicht diauxisch und der Biomassezuwachs im Verlauf des Wachstums ist additiv.