

УДК 556.31 + 57: 012.4 + 017.7 + 052 + 086.3 + 577. 121

ІНДУКЦІЯ БІОГЕНЕЗУ ПЕРОКСИСОМ У ДРІЖДЖІВ *CANDIDA PSEUDOTROPICALIS* ЗА УМОВ УТИЛІЗАЦІЇ ОЛЕАТУ Й ЕТИЛАМІНУ

І. Русин, О. Мороз, С. Гудзь, С. Гнатуш, О. Кулачковський

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна

Дріжджі *C.pseudotropicalis* здатні утилізувати олеат і етиламін за наявності глюкози як джерела вуглецю. Оптимальним для нагромадження біомаси в разі додавання 0,1% глюкози виявилось внесення олеату концентрацією 0,5 і 1,0%. Оптимальними для росту клітин концентраціями етиламіну є 1,0% – без додавання глюкози й 0,5% у разі додавання 1,0% глюкози. Активність амінооксидази була вищою в клітин, вирощених та інкубованих у середовищі з 0,5% етиламіном і 1,0% глюкозою, порівняно з клітинами, для яких етиламін був єдиним джерелом і азоту, і вуглецю. Вперше в клітинах дріжджів *C.pseudotropicalis* виявлено пероксисоми під час утилізації олеату й етиламіну – відомих індукторів біогенезу цих мікротілець.

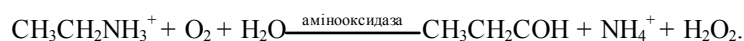
Ключові слова: пероксисоми, біогенез, амінооксидаза, олеат, етиламін.

Пероксисоми, або мікротільця, – це органели, що виявлені практично в усіх еукаріотичних клітинах [16, 21]. Вони мають круглу чи овальну форму, діаметр – 0,1–1,0 мкм, оточені одинарною мембраною. Назва органели (пероксисома) відображає те, що тут є оксидази (амінооксидаза, алкогольоксидаза, ацетил-КоА оксидаза тощо), які генерують пероксид водню, та каталазу, що розкладає цю токсичну сполуку на кисень і воду [11]. У дріжджів мікротільця виконують низку метаболічних функцій, зокрема, окиснення жирних кислот, *n*-алканів, а також дво- (етанол, ацетат, етильовані аміни) та одновуглецевих (метанол, метильовані аміни) сполук [17–19].

Утворення мікротілець описане для кількох видів дріжджів під час їхнього росту на різних сполуках, які індукують утворення пероксисом. Для *Saccharomyces cerevisiae* такою сполукою є олеат [6, 15]; для *Yarrowia lipolytica* – олеат, етиламін, ацетат [7]; для *Candida utilis* – метиламін, етаноламін, холін [8, 23]; для *Candida tropicalis* – *n*-алкани і вищі жирні кислоти [22]; для *Kluveromyces fragilis* – метил-, етиламін [4]; для *Hansenula polymorpha* – метанол, метиламін, етаноламін, холін [8, 23]; для *Candida boidinii* – олеат, метиламін, метанол, D-аланін [8, 14]; для

Pichia pastoris – олеат, метиламін, метанол [10, 16]; для *Pichia methanolica* – метанол [4].

Нашою метою було виявлення пероксисом у клітинах лактозозасвоюючих дріжджів *C. pseudotropicalis*, які здатні синтезувати етанол та використовувати його як джерело вуглецю. Біогенез пероксисом у дріжджів *C. pseudotropicalis* індукували шляхом вирощування їх на олеаті й етиламіні. Олеат – це ненасичена жирна кислота, яка містить вісімнадцять атомів вуглецю з подвійним зв'язком між дев'ятим і десятим атомами [3]. Олеїнова кислота катаболізується у циклічних реакціях β-окиснення з утворенням дев'яти молекул ацетил-КоА [3]. Перший крок пероксисомного β-окиснення олеату каталізований ацетил-КоА оксидазою [20]. АТФ синтезується у мітохондріях внаслідок окиснення НАДН і ФАДН₂, що утворилися в реакціях β-окиснення жирної кислоти й ЦТК [2]. Етиламін належить до амінів – продуктів заміщення атомів водню в молекулі аміаку на вуглеводневі радикали [5]. Перший фермент утилізації етиламіну амінооксидаза каталізує утворення оцтового альдегіду, амонію і пероксиду водню згідно з рівнянням [10]



Клітини дріжджів під час утилізації первинних амінів продукують дві різні амінооксидази – метиламінооксидазу й бензиламінооксидазу [10]. Метиламінооксидаза окиснює переважно коротколанцюгові, а бензиламінооксидаза – довголанцюгові аліфатичні й ароматичні первинні аміни [8].

Більшість видів дріжджів використовують етильовані (й метильовані) аміни тільки як джерело азоту, але не вуглецю [8], хоч у їхніх клітинах наявні ферменти подальшої утилізації оцтового альдегіду (і формальдегіду), що утворюються під час окиснення цих амінів [4]. Це можна пояснити тим, що синтез амінооксидази сильно репресується амонієм [23]. Крім цього, первинні аміни не можуть бути використані як єдине джерело вуглецю з огляду на підвищений вміст азоту в цих сполуках співвідносно до вуглецю [23]. Тому дріжджі потребують додаткового внесення у середовище культивування джерела вуглецю – глюкози [8].

Вивчення біогенезу пероксисом у *C. pseudotropicalis* має важливе практичне значення для підвищення нагромаджень етанолу в разі утилізації лактози в аеробних умовах. Цього можна досягти за допомогою селекції мутантів із пошкодженим біогенезом пероксисом. Як відомо, такі мутанти мають також пошкоджену деградацію мікротілець [9]. Уважають, що пероксисоми й гліоксисоми є різновидами одного й того ж типу органел. Тому ми припускаємо, що в мутантів із пошкодженим біогенезом і деградацією пероксисом будуть пошкоджені ті ж самі процеси стосовно й гліоксисом. У мутантних штамів за відсутності гліоксилатного циклу етанол, утворений під час збродження лактози, буде повільніше утилізуватись.

Дослідження біогенезу пероксисом може мати важливе значення для вивчення пероксисомного розщеплення нерозчинних високомолекулярних компонентів нафти

та інших сполук, що забруднюють довкілля, системами, створеними на базі іммобілізованих клітин дріжджів *C. pseudotropicalis*.

Для дослідів використано дріжджі *C. pseudotropicalis* ВКМ У-209.

З метою дослідити утилізацію олеату клітини вирощували на середовищі Беркгольдера при 30°C на круговій качалці (200 об./хв). До середовища додавали: дріжджовий екстракт – 600 мг/л; глюкозу – 1 г/л (або не додавали зовсім). Після автоклавування до середовища додавали стерильний олеат. Стерилізацію олеату виконували за допомогою бактеріального фільтра. Для якісної оцінки росту клітини вирощували на агаризованому середовищі.

Під час вирощування клітин на етиламіні середовище Беркгольдера не містило джерел азоту (сульфату амонію, дріжджового екстракту). До 1 л середовища додавали: тіамін – 400 мкг, біотин – 5 мкг, глюкозу – 10 г (або не додавали зовсім). Стерильний етиламін додавали після автоклавування середовища.

Біомасу визначали фотоелектроколориметрично ($\lambda = 540$ нм, довжина оптичного шляху 3 мм). Активність аміноксидази [23] досліджували в безклітинних екстрактах клітин, вирощених та інкубованих із етиламіном, і виражали в нмоль/хв·мг білка (Од/мг білка). Для цього отримували добовий інокулят після культивування клітин у рідкому середовищі YEPD при 30°C на круговій качалці [1]. Клітини двічі стерильно відмивали дистильованою водою, осаджували центрифугуванням при 3000 об./хв протягом 10 хв, переносили в середовище Беркгольдера з етиламіном із глюкозою чи без глюкози, інкубували протягом 18 год при 30°C на круговій качалці.

Концентрацію білка в безклітинних екстрактах визначали за методом Лоурі [12]. Для одержання безклітинних екстрактів клітини двічі відмивали дистильованою водою й осаджували центрифугуванням при 3000 об./хв протягом 10 хв. Клітини ресуспендували в 50 мМ калій-фосфатному екстрагуючому буфері (10^{-5} М ЕДТА; 10^{-5} М ФМСФ), рН 7,5, до концентрації клітин 50–100 мг/мл, додавали до 1/3 об'єму кульок Баллотіні й заморожували. Клітини руйнували на планетарному вібраторі при 1000 об./хв протягом 3 хв при 4°C. Уламки клітин осаджували при 15000 об./хв протягом 45 хв при 4°C. Отримані безклітинні екстракти зберігали при 0°C і відразу використовували.

Для електронномікроскопічних досліджень клітини дріжджів, вирощені протягом двох діб, двічі відмивали дистильованою водою й осаджували центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Інтактні клітини фіксували в 1,5 % розчині KMnO_4 протягом 15–20 хв при кімнатній температурі. Фіксовані клітини промивали, збезводнювали у зростаючих концентраціях етанолу, окису пропілену та поміщали в епоксидну смолу Епон-812. Ультратонкі зрізи отримували за допомогою алмазного ножа на ультрамікротомі УМТП-6 і контрастували солями свинцю за Рейнольдсом [13]. Переглядали і фотографували зразки на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 з прискорювальною напругою 75 кВ.

Для дослідження здатності клітин дріжджів *C. pseudotropicalis* засвоювати індуктори біогенезу пероксисом культуру вирощували в середовищі з олеатом концентрацією від 0 до 3% з додаванням 0,1% глюкози або без неї. Як видно з табл. 1, додавання глюкози стимулювало ростові процеси. Оптимальними для нагромадження біомаси (індукції біогенезу й проліферації пероксисом) виявились концентрації олеату 0,5 і 1,0% за наявності 0,1% глюкози. За цих умов ріст близький до максимального, що простежується під час вирощування клітин на 2% глюкозі. Отже, дріжджі *C. pseudotropicalis*, подібно до *Saccharomyces cerevisiae* [6], здатні утилізувати олеат, за умови, коли ще одне джерело вуглецю – глюкоза, наявне у середовищі в лімітованих кількостях.

Таблиця 1

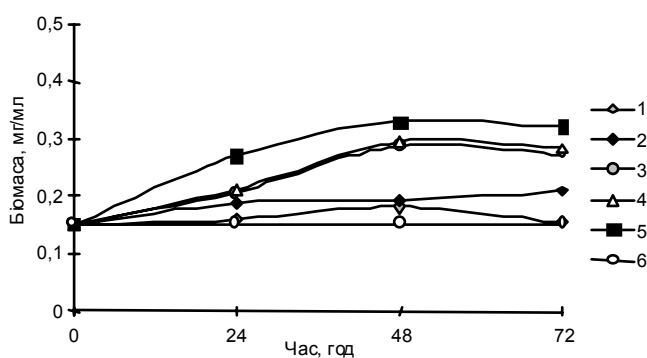
Ріст клітин дріжджів *C. pseudotropicalis* у середовищі з олеатом

| Олеат, % | Глюкоза, % | Час вирощування, год | | |
|----------|------------|----------------------|-----|-----|
| | | 24 | 48 | 72 |
| 0,5 | 0 | + | + | + |
| 1,0 | 0 | + | + | + |
| 1,5 | 0 | + | + | + |
| 2,0 | 0 | + | + | + |
| 2,5 | 0 | + – | + – | + – |
| 3,0 | 0 | + – | + – | + – |
| 0,5 | 0,1 | ++ | +++ | +++ |
| 1,0 | 0,1 | ++ | +++ | +++ |
| 1,5 | 0,1 | + | ++ | ++ |
| 2,0 | 0,1 | + | ++ | ++ |
| 2,5 | 0,1 | + | ++ | ++ |
| 3,0 | 0,1 | + | ++ | ++ |
| 0 | 0,1 | + | ++ | ++ |
| 0 | 2,0 | ++ | +++ | +++ |

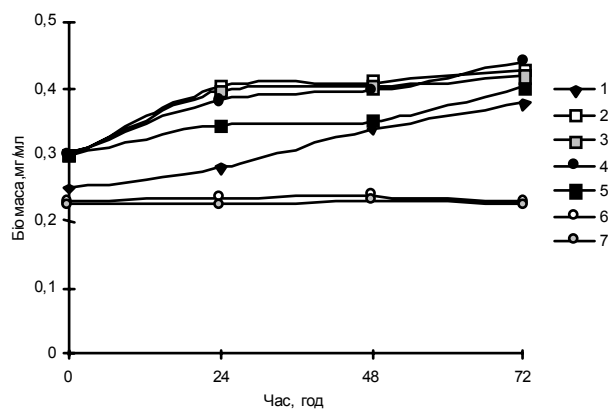
Примітка: + – дуже слабкий ріст; + слабкий ріст; ++ помірний ріст; +++ сильний ріст.

Вивчали також здатність клітин дріжджів *C. pseudotropicalis* засвоювати етиламін із середовища концентрацією від 0 до 3% з 1% глюкозою або без неї. Ріст клітин у середовищі з етиламіном як єдиним джерелом вуглецю й азоту виявився незначним (рис. 1, А, Б). На 72 год культивування біомаса не перевищувала 0,32–0,44 г/л за утилізації клітинами 1% етиламіну. На рис. 2, А, Б показано ріст дріжджів у середовищі, яке містило, крім етиламіну, 1% глюкозу. Як видно з рис. 1, А і 2, А, зі збільшенням концентрації етиламіну від 0 до 1% збільшується і нагромадження біомаси. Збільшення концентрації етиламіну в середовищах без глюкози (рис. 1, Б) не сприяє інтенсифікації росту культури й за максимальної концентрації

– 3%; у цьому разі як і без додавання етильованого аміну, росту практично немає. У середовищі з 1% глюкозою зі зростанням концентрації етиламіну від 1 до 3% простежували зниження біомаси в кінці логарифмічної фази росту; при 3% біомаса на 72 год культивування була найнижчою, як і в середовищі без джерела азоту (рис. 2, Б). Як бачимо, оптимальною концентрацією етиламіну для росту клітин є 1% без додавання глюкози й 0,5% – з 1% глюкозою.



А



Б

Рис.1. Ріст дріжджів *C. pseudotropicalis* у середовищі з етиламином різної концентрації, %: 1 – 0,2; 2 – 0,4; 3 – 0,6; 4 – 0,8; 5 – 1; 6 – 0 (А); 1 – 0,5; 2 – 1; 3 – 1,5; 4 – 2; 5 – 2,5; 6 – 3; 7 – 0 (Б).

Отже, дріжджі *C. pseudotropicalis*, як і більшість видів дріжджів [8], у тому числі *H. polymorpha*, *C. boidinii*, *C. utilis* [4], використовують етильовані аміни лише як джерело азоту, але не вуглецю, на відміну від *K. fragilis* [4], яка засвоює первинні аміни, що є єдиним джерелом як азоту, так і вуглецю. Оскільки ріст на олеаті та етиламіні без додаткового джерела вуглецю виявився обмеженим, то ми зробили висновок, що клітини для електронномікроскопічних і біохімічних досліджень доцільно інкубувати за наявності цих сполук після їхнього культивування на багатих поживних середовищах (YEFD).

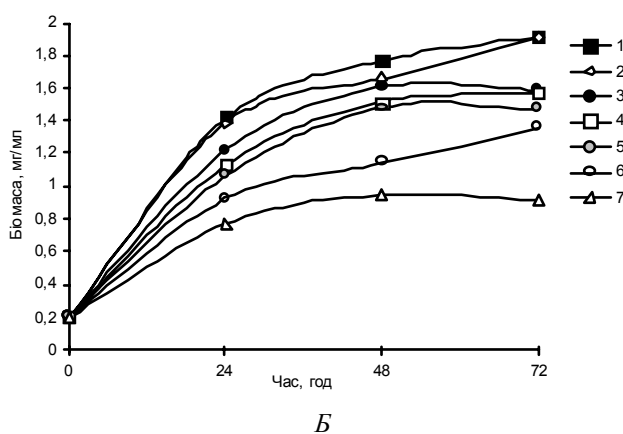
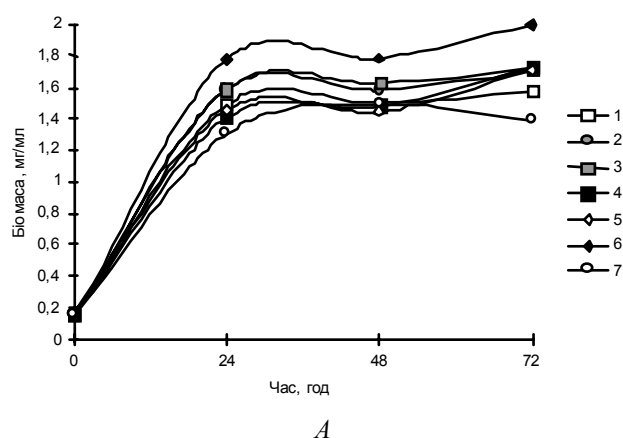


Рис.2. Ріст дріжджів *C. pseudotropicalis* у середовищі з глюкозою (1%) та етиламіном концентрацією, %: 1 – 0,2; 2 – 0,4; 3 – 0,6; 4 – 0,8; 5 – 1; 6 – 1,2; 7 – 1,4.

6 – з сульфатом амонію; 7 – без джерела азоту (А); 1 – 0,5; 2 – 1; 3 – 1,5; 4 – 2; 5 – 2,5; 6 – 3; 7 – 0 (Б).

Крім того, визначали активність амінооксидази клітин дріжджів *C. pseudotropicalis*, вирощених та інкубованих у середовищі з етиламіном, з 1% глюкозою або без глюкози (табл. 2). Клітини мали вищу активність фермента за наявності глюкози, оскільки за умов, коли етиламін є єдиним джерелом як азоту, так і вуглецю, енергетичне забезпечення клітин недостатнє як для росту, так і для синтезу амінооксидази.

Під час росту дріжджів *C. pseudotropicalis* на олеаті як єдиному джерелі вуглецю, і на олеаті за наявності глюкози в лімітованих кількостях [6], а також під час утилізації етиламіну в разі додавання глюкози, у клітинах виявлено пероксисоми (рис. 3, 4).

Таблиця 2

Активність амінооксидази в безклітинних екстрактах дріжджів *C. pseudotropicalis* за різних умов культивування

| Умови | Джерело азоту, % | Глюкоза, % | Амінооксидаза, нмоль/хв·мг білка |
|-------------|----------------------|------------|----------------------------------|
| Вирощування | Етиламін, 0,5 | 1 | 25,7 |
| | Етиламін, 1,0 | 0 | 16,8 |
| | Сульфат амонію, 0,35 | 1 | 0,0 |
| Інкубація | Етиламін, 0,5 | 1 | 31,5 |
| | Етиламін, 1,0 | 0 | 17,3 |
| | Сульфат амонію, 0,35 | 1 | 0,0 |

Рис.3. Ультраструктура клітин дріжджів *C. pseudotropicalis* за умов утилізації олеату (0,5%): А – без глюкози ($\times 15750$); Б – з глюкозою (0,1%) ($\times 6359$). П – пероксисома.

Рис.4. Ультраструктура клітин дріжджів *C. pseudotropicalis* при утилізації: етиламіну (0,5%) і глюкози (1%): А – $\times 15391$, Б – $\times 15143$. П – пероксисома.

Отже, дріжджі *C. pseudotropicalis* здатні утилізувати олеат і етиламін за наявності глюкози як джерела вуглецю. Вперше в клітинах цього виду дріжджів виявлено пероксисоми після росту на відомих індукторах біогенезу цих мікротілець – олеаті й етиламіні.

1. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Русин І.Б. та ін. Морфофункціональні зміни клітин дріжджів *Candida pseudotropicalis* за різних умов культивування// Вісник Львів. ун-ту. Сер.біол. 2001. Вип. 26.
2. Квасников Е.И., Щелекова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. Киев: Наук.думка, 1991. 328 с.
3. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т. 1–3.
4. Сибирный А.А., Титоренко В.И. Молекулярные механизмы катаболической регуляции у дрожжей. М., 1990. 215 с.
5. Шретер В., Лаутеницгер К.-Х., Бибрак Х. и др. Химия: Справ. изд./ Пер. с нем. М.: Химия, 1989. 648 с.
6. Evers M.E., Hohfeld J., Kunau W.H. et al. Physiological studies on the utilization of oleic acid by *Saccharomyces cerevisiae* in relation to microbody development// FEMS Microbiol. Lett. 1991. Dec.15; 69(1). P. 73–78.
7. Gunkel K., van der Klei I.J., Barth G., Veenhuis M. Selective peroxisome degradation in *Yarrowia lipolytica* after a shift of cells from acetate/oleate/ ethylamine into glucose/ammonium sulfate-containing media// FEBS Lett. 1999. N 14; 451(1). P. 1–4.
8. Haywood G.W., Large P.J. Microbial oxidation of amines// Biochem. J. 1981. N 199. P. 187–201.
9. Klionsky D.J., Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1999. N 15. P. 1–32.
10. Large P.J., Haywood G.W. Amine oxidases from methylotrophic yeasts // Methods in Enzymology. 1990. N188. P. 427–435.
11. Lazarow P.B., Fujiki Y. Biogenesis of peroxisomes// Annu.Rev. Cell Biol. 1985. N 1. P. 498-530.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.Y., Farr A.L., Randall R.I. Protein determination with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol.193. N2. P.265-275.
13. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. Vol.17. P.208-212.
14. Sakai Y., Yurimoto H., Matsuo H., Kato N. Regulation of peroxisomal proteins and organelle proliferation by multiple carbon sources in the methylotrophic yeasts, *Candida boidinii* // Yeast. 1998. Sep.30, Vol.14 (13). P.1157-1187.
15. Small G.M., Karpichev I.V., Luo Y. Regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*// Adv. Exp. Med. Biol. 1997. N422. P.157-166.
16. Subramani S. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle// Annu. Rev. Cell Biol. 1993. N9. P.445-478.
17. Tanaka A., Fukui S. Metabolism of n-alkanes // The Yeast. Ed. by A.H.Rose, J.S.Harrison: 2nd ed. London, Academic Press, 1991. N4. P.601-653.

18. Veenhuis M., van Dijken J.P., Harder W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one carbon compounds in yeasts// *Adv. Microb. Physiol.* 1983. N24. P.1-82.
19. Veenhuis M., Harder W. Microbodies// *The Yeast*. Ed. by A.H.Rose, J.S.Harrison: 2nd ed. London, Academic Press, 1991. N4. P.601-653.
20. Wang H., Le Dall M.T., Wache Y., et al. Cloning, sequencing and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*// *Cell Biochem. Biophys.* 1999. N31(2). P.165-174.
21. Waterham H.R., Cregg J.M. Peroxisome biogenesis// *BioEssays.* 1997. N19. P.57-66.
22. Yamada T., Tanaka A., Fukui S. Properties of catalase purified from whole cells and peroxisomes of n-alkane-grown *Candida tropicalis*// *Eur. J. Biochem.* 1982. Jul.; 125(3). P.517-521.
23. Zwart K.B., Veenhuis M., Harder W. Significance of yeast peroxisomes in the metabolism of choline and ethanolamine// *Antonie van Leeuwenhoek.* 1983. N49. P. 369-385.

PEROXISOMES BIOGENESIS INDUCTION IN CANDIDA PSEUDOTROPICALIS YEASTS DURING OLEATE AND ETHYLAMINE UTILIZATION

I.Rusyn, O.Moroz, S.Gudz, S.Gnatush, O.Kulachkovsky

*Ivan Franko National University of L'viv,
Hrushevskoho st.4, L'viv 79005, Ukraine*

Yeasts *C. pseudotropicalis* are capable to utilize oleate and ethylamine in the presence of glucose as carbon source. Oleate concentrations 0.5% and 1% with addition of glucose revealed optimal to cells growth. Concentrations for cells growth of ethylamine – 1% without glucose in cultivation medium and 0.5% with 1% glucose was optimal. Aminooxidase activity revealed high in cells cultivated and incubated in growth medium with 0.5% ethylamine and 1% glucose, when compare with cells, to which ethylamine was accessible as sole nitrate and carbone source. Appearance of peroxisomes in *C.pseudotropicalis* cells during utilization of known inductors of this microbody biogenesis – oleate and ethylamine, was demonstrated first.

Keywords: peroxisome, biogenesis, aminooxidase, oleate, ethylamine.

Стаття надійшла до редколегії 16.07.2001

Прийнята до друку 21.07.2001