

La inducción de alcohol oxidasa en levaduras metilotróficas

G. FERBEYRE¹, J. AGUIAR¹, A. VILLARREAL¹, I. TORRENS¹, C. SANTIZO² Y J. MORALES¹

¹ División de Proteínas y Hormonas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

² Unidad Analítica CIGB, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en mayo de 1990

Aprobado en septiembre de 1990

RESUMEN

Se reporta el desarrollo de un micrométodo para la determinación de la actividad de la alcohol oxidasa en levaduras metilotróficas, basado en la gran cantidad de enzima que se acumula en estos microorganismos al crecerlos en presencia de metanol. El método es una modificación del anteriormente reportado por Ellis *et al.* (1985).

La proporción de alcohol oxidasa en extractos celulares de *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* resultó ser muy alta: 32% y 34% de la proteína total respectivamente. La inducción de la enzima ocurre como parte de una respuesta fisiológica general al metanol, que incluye la inducción de otras proteínas y un aumento en el número y tamaño de los peroxisomas.

Para obtener una alta actividad de alcohol oxidasa es necesario considerar tres parámetros sencillos: el tiempo de crecimiento en condiciones de represión, la densidad óptica en el momento de la inducción y la duración de la inducción.

SUMMARY

Based on the large amount of alcohol oxidase that accumulates in methylotrophic yeasts upon growth on methanol, a micromethod was developed to determine the enzyme activity by modification of the method of Ellis *et al.* (1985).

The amount of the enzyme in cell extracts of *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha* was very high: 32% and 34% of the cellular protein respectively. Enzyme induction occurred as part of a more general physiological mechanism of response to methanol that includes other induced proteins and an increase in the size and number of peroxisomes.

The induction process was also studied. Three necessary parameters to get a high yield of alcohol oxidase are the growing time in repressing conditions, the optical density at the moment of induction and the duration of induction.

INTRODUCCION

Las levaduras metilotróficas constituyen un grupo de microorganismos de creciente interés en biotecnología, fundamentalmente por los recientes reportes sobre alta expresión de genes heterólogos haciendo uso de su eficiente sistema de inducción por metanol. Varios grupos han estudiado las proteínas inducidas por metanol en estas levaduras (Gleeson y Sudbery, 1988; Sreekrishna *et al.*, 1988). Cualquiera de dichas proteínas puede servir como modelo para realizar estudios fisiológicos del proceso de inducción. Nosotros seleccionamos la alcohol oxidasa, enzima

que cataliza el primer paso de la oxidación del metanol, en una reacción donde se desprende peróxido de hidrógeno (Couderec y Baratti, 1980), lo cual se aprovecha para la determinación de la actividad enzimática (Ellis *et al.*, 1985).

Esta enzima posee un peso molecular de 675 000 Da y está compuesta por ocho subunidades, cada una con un peso molecular de 80 000 Da (Couderec y Baratti, 1980).

En el presente trabajo se reporta el desarrollo de un micrométodo para la determinación de la actividad de la alcohol oxidasa y su uso para el estudio del fenómeno de inducción por metanol en levaduras metilotróficas.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

Se emplearon las siguientes cepas de levaduras: *P. pastoris* BKMY-884 (salvaje), *H. polymorpha* BKMY-2559 (salvaje) y *S. cerevisiae* SEY-2202 (*alfa*, ura3-52, leu2-3, leu2-112, his 3-519) donadas por Jeremy Thorner.

Los cultivos se incubaron en medio YP (Sherman *et al.*, 1986), o medio mínimo GO (Wickerham, 1951), con una de las siguientes fuentes de carbono a las concentraciones en el medio de cultivo en porcentajes p/v que se señalan: glucosa 2%, glicerol 2%, metanol 0,5% o sin fuente de carbono. La temperatura de crecimiento fue de 30°C, excepto para la *H. polymorpha* que se creció a 37°C. Las células se colectaron por centrifugación, a diferentes tiempos de cultivo según el experimento. El número de células por unidad de volumen se estimó por mediciones de la densidad óptica (DO) a 660 nm y se plaqueó en medio YPG (Sherman *et al.*, 1986).

Preparación de extractos libres de células

Muestras de 0,3 g de células (peso húmedo), se lavaron con tampón de lisis (62,5 mM Tris HCl pH 8,7, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF) y se rompieron usando perlas de vidrio (0,25 a 0,5 mm de diámetro) a razón de 0,3 g de células (peso húmedo): 0,3 g de perlas de vidrio; 0,3 ml de solución tampón

de lisis, en vortex a velocidad máxima por un minuto, con un minuto de reposo en hielo. Este procedimiento se repitió en tres ciclos más. El extracto se separó de las perlas por centrifugación a 500 rpm durante un minuto en centrífuga Eppendorf y se centrifugó a 12 000 g, 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en 200 ml de tampón de lisis.

Métodos de análisis de proteínas

La concentración de proteínas se determinó según el procedimiento descrito por Lowry *et al.* (1951), y la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12%, se realizó según Laemmli (1970).

Determinación de alcohol oxidasa

Se hicieron modificaciones a partir del ensayo colorimétrico reportado por Ellis *et al.* (1985). A 0,5 ml de una mezcla colorante buffer (o-dianisidina 1%, Sigma, en 12 ml de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,5 aireado) se añaden 10 ml de metanol, 2 ml de peroxidasa (Boehringer) y 5 ml de extractos de levaduras diluidos 1:100 con tampón de lisis. La mezcla se incubó a 25°C en microcubetas y se midió el aumento en la absorbancia a 420 nm durante tres minutos.

El blanco fue la misma mezcla, sin metanol. Una unidad de alcohol se define como la cantidad de enzima que produce la liberación de 1 nmol de H₂O₂ por minuto, a 30°C.

Microscopia electrónica

Con vistas a la caracterización morfológica de las levaduras crecidas en metanol se prepararon protoplastos de *H. polymorpha* a partir de células crecidas en glucosa y metanol según Sherman *et al.*, (1986). Las muestras fueron fijadas en mezcla de glutaraldehído 0,1% y paraformaldehído 10% y preincluidas en gelatina 10%, completándose la fijación a las 24 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en concentraciones ascendentes de alcoholes e incluidas en resinas de Lowicryl K4 según el método de Carlemalm *et al.*, (1982). Finalmente, secciones ultrafinas de cada muestra, montadas sobre rejillas de cobre y contrastadas con solución de acetato de uranilo-citrato de plomo, fueron analizadas a magnificaciones entre 20 000 y 25 000 aumentos empleando un microscopio de transmisión Jeol 2 000 EX a una aceleración de voltaje de 120 kV.

RESULTADOS Y DISCUSION

Actividad de alcohol oxidasa en levaduras metilotróficas crecidas en diferentes condiciones

Los niveles de alcohol oxidasa en las levaduras metilotróficas *P. pastoris* y *H. polimorpha* se muestran en la tabla 1. Estos valores elevados de actividad enzimática en los extractos celulares coinciden con los reportados por otros autores (Couderec y Baratti, 1980). Basados en este hecho, pensamos que era posible modificar el método original descrito por Ellis *et al.* (1985), utilizando volúmenes y cantidades de reactivos menores, con el objetivo de disminuir el costo de las determinaciones. Además, se determinó la concentración mínima de peroxidasa, incluso con diluciones de 100 veces en los extractos que mantenían la misma sensibilidad del método original.

Los resultados que se muestran son los obtenidos después de 48 horas de inducción. La duplicación de la concentración de metanol o mayores tiempos de crecimiento en metanol, no condujeron a un aumento de la actividad enzimática.

Los niveles de alcohol oxidasa dependen de las condiciones de crecimiento como se muestra en la tabla 1. Al parecer, existen variaciones en los mecanismos que regulan la expresión de esta enzima según la especie.

En *H. polimorpha* es evidente un mecanismo de represión y un efecto de derrepresión, pues el crecimiento en glicerol, o incluso solo en YP, sin fuente de carbono adicional, basta para que se induzca la actividad enzimática reprimida durante el crecimiento en glucosa. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores (Egli *et al.*, 1980). Características semejantes muestra la *Candida methylca* (Trostenko y Bystrykh, 1985). En cambio la *P. pastoris* depende del metanol para la inducción de la enzima.

La figura 1 muestra claramente cómo la alcohol oxidasa, cuyo peso molecular es de 80 000 dalton por subunidad, llega a ser la proteína mayoritaria de los extractos celulares de levaduras metilotróficas crecidas en metanol. Sin embargo, en las levaduras crecidas en glucosa no es visible dicha banda. Nótese que se inducen otras proteínas como parte de un mecanismo fisiológico que permite a estos microorganismos el crecimiento en metanol.

Tabla 1
ACTIVIDAD DE ALCOHOL OXIDASA EN LEVADURAS METILOTRÓFICAS

Levadura	Fuente de carbono	Actividad específica* U/mg proteína	% Expresión
<i>P. pastoris</i>	Glucosa	0,00	-
	Glicerol	0,56	1
	No	0,00	-
	Metanol	3,58	32
<i>H. polimorpha</i>	Glucosa	0,00	-
	Glicerol	1,50	12
	No	0,23	2
	Metanol	3,28	34
<i>S. cerevisiae</i>	Glucosa	0,00	-

* La inducción duró 48 horas.

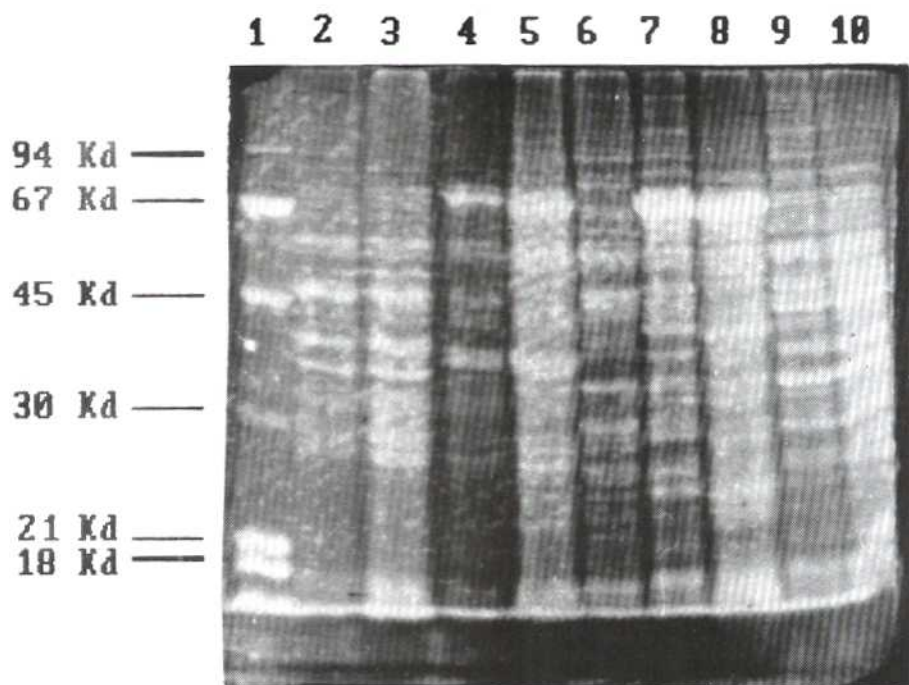


FIG. 1. Comparación del patrón de polipéptidos del sedimento y sobrenadante de ruptura de diferentes levaduras crecidas en glucosa o metanol: columna 1) patrón de pesos moleculares; columnas 2 y 3) pellet y sobrenadante de *H. polimorpha*, crecida en glucosa; columnas 4 y 5) pellet y sobrenadante de *H. polimorpha* crecida en metanol; columna 6) pellet de *P. pastoris* crecida en glucosa; columnas 7 y 8) pellet y sobrenadante de *P. pastoris* crecida en metanol; columnas 9 y 10) pellet y sobrenadante de *S. cerevisiae* crecida en glucosa.

Inducción de peroxisomas en levaduras metilotróficas

Como parte de la caracterización del proceso de inducción enzimática por metanol en levaduras metilotróficas, se realizaron técnicas de microscopía electrónica para visualizar los cambios estructurales que ocurren en las levaduras metilotróficas cuando se cultivan con

metanol. En la figura 2 puede notarse cómo en las levaduras crecidas en metanol el citoplasma se llena de cuerpos ovoideos, que no se distinguen en las levaduras crecidas en glucosa o glicerol. Estos cuerpos son los peroxisomas y es en su interior donde ocurre la asimilación del metanol por intermedio de las enzimas alcohol oxidasa y dihidroxiacetona sintetasa (Kato *et al.*, 1974; Tani, 1984).

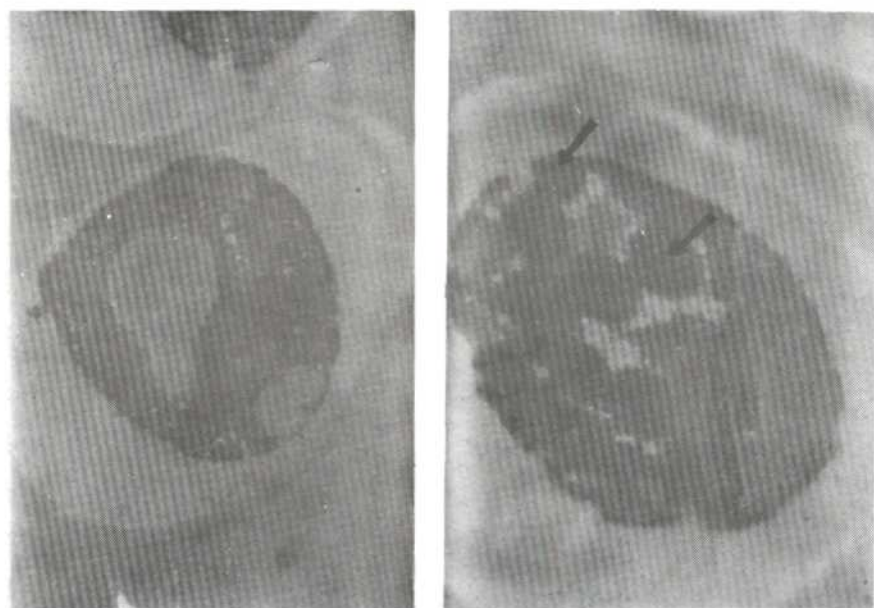


FIG. 2. Microfotografía electrónica de esferaplastos de *H. polymorpha* en Lowicril. Los esferaplastos fueron obtenidos de células crecidas en medio YP con glucosa (A), o metanol (B), a 37°C, durante toda la noche.

Estudio de la inducción de alcohol oxidasa en *P. pastoris*

Las estrategias de expresión de genes heterólogos utilizando promotores regulados, involucran una fase de crecimiento inicial en condiciones de represión seguida de una fase de inducción que comienza con la adición del agente inductor.

Para conocer el momento más adecuado para añadir dicho inductor y qué parámetro sencillo puede usarse como guía en los esquemas posibles de producción, se creció la *P. pastoris* en fermentadores de 5 l en medio mínimo G0 con glucosa y a diferentes tiempos de crecimiento, se colectaron las células, se lavaron y se transfirieron a medio mínimo G0 fresco con metanol, a una

concentración final de 0,5%. Los resultados se muestran en la tabla 2. Se encontró que la mayor actividad se obtenía realizando la inducción a partir de las 24 horas de crecimiento en glucosa.

Tabla 2
ACTIVIDAD ALCOHOL OXIDASA EN *P. pastoris*
EN FUNCION DEL TIEMPO DE COMIENZO
Y/O DO DE INDUCCION

Tiempo (horas)	DO _{λ660}	Actividad específica ^a U/mg proteína
12	12	2,6
24	40	3,8
36	80	3,5

^a La inducción duró 48 horas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los doctores Alejandro Silva, Julio Delgado y Luis Herrera las sugerencias.

REFERENCIAS

- CARLEMALM, E.; R. M. GARAVITO y W. VILLIGER (1982). Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *J. Microscopy* **126**: 123-143.
- COUDEREC, R. y J. BARATTI (1980). Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 2279-2289.
- EGLI, T.; J. P. VAN DYKEN; M. VEENHUIS; W. HARDEN y A. FIECHLER (1980). Methanol metabolism in yeasts: Regulation of the synthesis of the catabolite enzymes. *Arch Microbiol.* **124**: 115-121.
- ELLIS, S. B.; P. F. BRAUST; P. J. KOUTZ; A. F. WATERS; M. M. HARPOLD y T. R. GINGERAS (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1111-1121.
- GLEESON, M. A. y E. SUDBERY (1988). The methylotrophic yeasts. *Yeast* **4**: 1-15.
- KATO, N.; Y. TANI y K. OGATA (1974). Enzyme system for methanol oxidation in yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 675-680.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LOWRY, O. H.; N. J. ROSENBROUGH; A. L. FARR y R. K. RANDALL (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-269.
- SHERMAN, F.; G. R. FINK y J. B. HICKS (1986). *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Lab.
- SREEKRISHNA, K.; R. H. B. POTENZ; J. A. CRUZE; W. R. MC COMBIE; K. A. PARKER; L. NELLES; P. K. MAZZAFERRO; K. A. HOLDEN; R. G. HARRISON; P. J. WOOD; D. A. PHELPS; C. E. HUBBARD y M. FUKU (1988). High level expression of heterologous protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Basic. Microbiol.* **28**: 265-278.
- TANI, Y. (1984). "Microbiology and biochemistry of methylotrophic yeasts". En: *Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry and Genetics*. Eds. C.T. Hou, CRC Pres. Inc., pp. 55-85.
- TROSTENKO, Y. A. y L. V. BYSTRYKH (1985). "Regulation of primary pathways of methanol metabolism in methylotrophic yeasts". En: *Environmental Regulation of Microbial Metabolism*. Eds: I.S. Kulaev, E.A. Dawes, D.W. Tempest, Acad Press, pp. 113-120.
- WICKERHAM, L. J. (1951). *Technical Bulletin 1029*, United States Department of Agriculture, Washington, D.C.