

Biochemické vlastnosti kmeňa *S. cerevisiae* nadprodukujúceho invertázu

MARGITA OBERNAUEROVÁ – JÚLIUS ŠUBÍK

S ú h r n . Štúdiom biochemických vlastností vyšľachteného kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae* CCY 22-15-11 sa zistila jeho silná flokulácia, schopnosť nadprodukcie invertázy, znížená citlivosť na represný účinok glukózy, ako aj zvýšená aktivita konštitutívne syntetizovanej maltózo-permeázy a α -glukozidázy. Tieto vlastnosti predurčujú využitie kmeňa pri rekombinačnom šľachtení priemyselných kvasiniek, priemyselnej hydrolýze sacharózy, ako aj pri príprave enzýmových koncentrátov invertázy.

Schopnosť kvasiniek *S. cerevisiae* utilizovať sacharózu alebo rafinózu je podmienená prítomnosťou invertázy β -D-fruktofuranozidázy, EC 3.2.1.26) [1]. Invertázu kvasiniek tvorí interná neglykozylovaná a externá glykozylovaná forma enzýmu [2-4]. Jej štruktúra je špecifikovaná rodinou *SUC* génov, ktoré sa môžu vyskytovať na 6 odlišných chromozómoch [5-8]. Individuálne kmene môžu obsahovať nijaký, jeden alebo niekoľko aktívnych *SUC* génov [7, 9]. Rôzne *SUC* gény sú podobné, ale nie identické v svojej nukleotidovej sekvencii [7, 10] a sú exprimované do rôzneho stupňa [11]. Každý *SUC* lokus kóduje dve mRNA, prekladané do internej a externej invertázy [12-14]. Kým interná invertáza je syntetizovaná konštitutívne v nízkej hladine [12], expresiu externej invertázy reguluje glukózová represia na transkripčnej úrovni [15].

Špecifická aktivita invertázy v rôznych kmeňoch kvasiniek je odlišná a pohybuje sa v rozmedzí od 1 do 5 U.mg⁻¹ suchej hmotnosti buniek [11, 16]. Indukovanou mutagenézou sa podarilo pripraviť kmene kvasiniek nadprodukujúce invertázu (špecifická aktivita vyššia ako 10 U.mg⁻¹ suchej hmotnosti), ktorej syntéza bola naviac i menej citlivá na represný účinok glukózy [17-21]. Výrazná nadprodukcia invertázy v kvasinkách sa dosiahla i klonovaním a expresiou invertázových génov na vektoroch vyskytujúcich sa vo viacerých kó-

Ing. Margita Obernauerová, CSc., RNDr. Július Šubík, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

piách v bunkách transformantov [16, 22]. Mnohé z týchto hyperprodukčných kmeňov sa významne osvedčili pri štúdiu regulácie syntézy invertázy a stali sa zdrojom pre purifikáciu a biochemickú charakterizáciu oboch foriem enzýmu [4, 13, 21, 22].

Predmetom tejto práce je štúdium biochemických vlastností kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae* CCY 22-15-11 nadprodukujúceho invertázu [23]. Tento kmeň vznikol meiózou priemyselného kmeňa pekárskych kvasiniek [24] a vyznačuje sa i zníženou citlivosťou syntézy invertázy, α -glukozidázy a mitochondriálnych cytochrómov na glukózovú represiu.

Materiál a metódy

Mikroorganizmy a rastové podmienky. V práci sa použili kvasinky *S. cerevisiae* kmeň M2A (CCY 22-16-11) [23], ktorý vznikol meiózou priemyselného kmeňa pekárskych kvasiniek *S. cerevisiae* M [24], ako aj štandardné laboratórne kmene *S. cerevisiae* DTXII (diploid, prototrof) [25, 26] a X2180A (MATa 2, *SUC* 2, *CUP* 1) [11].

Kmene rástli pri 30 °C v polosyntetickej pôde obsahujúcej v 1 litri: 5 g kvasničného autolyzátu, 5 g peptónu, 1 g KH_2PO_4 , 1,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g KCl, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g NaNO_3 , 0,01 g FeCl_3 a 5, resp. 100 g glukózy za de-represných, resp. represných podmienok rastu.

Flokulácia buniek a rastové výťažky. Flokulácia buniek v kultivačnom médiu sa sledovala ako sedimentácia zhlukov buniek v 100 ml odmernom valci výšky 18 cm v závislosti od času a je vyjadrená ako percento objemu kultivačného média obsahujúceho bunky. Rastové výťažky kvasiniek sa stanovili gravimetricky.

Meranie metabolických kvocientov. Fermentačná aktivita vyrastených buniek sa stanovila za anaeróbných podmienok manometricky Warburgovým prístrojom v reakčnej zmesi obsahujúcej citrátovo-fosfátový tlmivý roztok (25 mmol.l⁻¹) pH 4,5, bunky kvasiniek (0,75–1,5 mg suchej hmotnosti) a sacharid (10 mmol.l⁻¹).

Spotreba kyslíka sa sledovala kyslíkovou elektródou v reakčnej zmesi obsahujúcej glutarát draselný (50 mmol.l⁻¹), bunky kvasiniek (0,75–1,5 mg suchej hmotnosti) a glukózu (20 mmol.l⁻¹), resp. etanol (20 mmol.l⁻¹).

Meranie aktivity maltózo-permeázy. Aktivita maltózo-permeázy v reakčnej zmesi obsahujúcej citrátovo-fosfátový tlmivý roztok (62 mmol.l⁻¹) pH 4,5, ¹⁴C-maltózu (20 mmol.l⁻¹, 40 MBq.l⁻¹) a bunky kvasiniek (8–13 mg suchej hmotnosti) a glukózu (20 mol.l⁻¹), resp. etanol (20 mmol.l⁻¹).

Meranie aktivity α -glukozidázy. Aktivita α -glukozidázy sa stanovila v re-

akčnej zmesi obsahujúcej 20–100 μ l supernatantu mechanicky rozbitých buniek a 0,5 mg *p*-nitrofenyl- α -D-glukopyranozidu v 0,5 ml fosfátového tlmivého roztoku (50 mmol.l⁻¹) pH 6,8 postupom opísaným v [26]. Bielkoviny sa stanovili metódou podľa Lowryho a kol. [28] hovädzím sérumalbumínom ako štandardom.

Meranie aktivity invertázy. Invertáza sa stanovila v acetátovom tlmivom roztoku (25 mmol.l⁻¹) pH 4,5 so sacharózou (100 mmol.l⁻¹) a bunkami kvasiniek (10–20 μ g suchej hmotnosti). Reakčná zmes sa inkubovala 5 minút pri 30 °C. Reakcia sa zastavila vloženíím skúmaviek na 2 minúty do vriaceho vodného kúpeľa. Bunky sa oddelili sedimentáciou a glukóza sa stanovila komerčným glukóza-oxidázovým testom firmy Lachema (1 U = μ mol glukózy.min⁻¹).

Termálna inaktivácia invertázy. Termálna inaktivácia enzýmu sa sledovala v bezbunkových extraktoch 10-krát zriedených v citrátovom tlmivom roztoku (50 mmol.l⁻¹) pH 4,5 a inkubovaných 5 hodín pri 50, 55, 60 a 65 °C. Vzorky sa odoberali následne v jednohodinových intervaloch a uložili sa do ľadu. Špecifické aktivity invertázy sa stanovili a vyjadrili ako percento kontrolnej aktivity.

Meranie cytochrómových spektier. Diferenčné cytochrómové spektrá buniek vyrastených za rôznych podmienok sa zaznamenávali pri koncentrácii buniek 35 mg suchej hmotnosti.ml⁻¹ na spektrofotometri Perkin-Elmer 557 pri laboratórnej teplote. Cytochrómy sa oxidovali peroxidom vodíka (10 mmol.l⁻¹) a redukovali zrnkami Na₂S₂O₄.

Elektroforéza v polyakrylamidovom géli. Bunky kvasiniek (2.10⁸ buniek) sa rozbili sklenými guľôčkami [26] a bezbunkový extrakt sa upravil na objem 1 ml pridaním Tris-fosfátu (50 mmol.l⁻¹), EDTA (1 mmol.l⁻¹) a fenylmetylsulfonylfluoridu (1 mmol.l⁻¹), konečné pH 6,8. Zvyšky buniek sa oddelili sedimentáciou (5 minút pri 1500 g) a 52, μ l supernatantu sa podrobilo elektroforéze za nedenedurujúcich podmienok v polyakrylamidovom géli (7,5 g/100 ml) podľa Grossmana a Zimmermana [11]. Elektroforéza prebiehala 5 hodín pri 4 °C s konštantným prúdom 15 mA na gél.

Elektroforéza za prítomnosti SDS (dodecylsulfátu sodného, 1 g/100 ml) v polyakrylamidovom geli (6 g/100 ml) sa uskutočnila podľa Laemmliho [29].

Aktivita invertázy sa detegovala inkubáciou gélov v roztoku sacharózy (0,1 mol.l⁻¹) a acetátu sodného (0,1 mol.l⁻¹) pH 4,5, 20 minút pri 30 °C a ich následným vyfarbením 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridom (0,2 g/100 ml) v NaOH (0,5 mol.l⁻¹) pri 100 °C [30].

Použitie chemikálie. Maltóza, sacharóza, Tris, dodecylsulfát sodný (SDS), *p*-nitrofenyl- α -D-glukopyranozid (PNPG), persulfát, akrylamid, bis-akrylamid, *N,N,N',N'*-tetrametyléndiamín a tunicamycín sa získali zo Servy, Heidelberg. ¹⁴C-maltóza pochádza z Ústavu pre výskum, výrobu a využitie rádio-nuklidov v Prahe. Ostatné chemikálie pochádzali z Lachemy Brno.

Výsledky a diskusia

Kmeň rekombinanta kvasiniek *S. cerevisiae* M2A (CCY 22-15-11) je meiotický produkt polyploidného kmeňa pekárskych kvasiniek *S. cerevisiae* M [24]. Na rozdiel od tohto kmeňa, ako aj rôznych iných priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek [24], resp. štandardného laboratórneho kmeňa *S. cerevisiae* DTXII sa bunky kmeňa M2A vyznačovali výraznou hyperprodukciou invertázy, konštitutívnou syntézou α -glykozidázy a maltózo-permeázy a zníženou citlivosťou ich syntézy na glukózovú represiu (tab. 1). Bunky kmeňa M2A sú pohlavne aktívne, párovacieho typu MATa a nesporulujúce. Bunkový obsah DNA (52 pg DNA/10⁶ buniek), ako aj výsledky tetrádovej analýzy hybridu M2A x DPI-1B/514 [24] indikujú, že bunky kmeňa M2A sú aneuploidné alebo diploidné.

Kmeň M2A bol schopný pre svoj rast využívať ako zdroj uhlíka a energie glukózu, sacharózu, maltózu a etanol. V porovnaní so štandardným kmeňom DTXII však jeho bunky rástli v polosyntetickej pôde s glukózou relatívne pomalšie (obr. 1) a silne aglutinovali (obr. 2). Táto skutočnosť umožňuje využiť

Tabuľka 1. Aktivita glukozidáz a maltózo-permeázy kmeňa *S. cerevisiae* M2A a štandardného kmeňa *S. cerevisiae* DTXII vyrastených za represných (glukóza 100 g.l⁻¹) a derepresných (glukóza 5 g.l⁻¹) podmienok

Table 1. Glucosidase and maltose-permease activities of the strain *S. cerevisiae* M2A and the standard strain *S. cerevisiae* DTXII which both were grown under repressive (glucose 100 g l⁻¹) and derepressive (glucose 5 g l⁻¹) conditions

Enzým ¹	Spôsob rastu kvasiniek ²	Špecifická aktivita	
		DTXII	M2A
Invertáza (μ mol glukózy/min/mg suchej hmotnosti) ⁴	derepresia ⁷	3,51	16,75
	represia	0,13	8,58
α -glukozidáza (μ mol PNPG/min/mg bielkovín) ⁵	derepresia ⁷	0,05	1,26
	represia ⁸	0,02	0,44
Maltóza-permeáza (μ mol maltózy/min/g suchej hmotnosti) ⁶	derepresia ⁷	2,9	21,5
	represia ⁸	0,1	1,6

¹Enzyme; ²Mode of the yeast growth; ³Specific activity; ⁴Invertase (μ mol glucose/min/mg of d.w.); ⁵ α -Glucosidase (μ mol maltose/min/g of d.w.); ⁷Derepression; ⁸Repression.

prirodzenú flokuláciu rekombinanta na rýchlu separáciu jeho buniek od kultivačného média.

Bunky kmeňa M2A v porovnaní so štandardným kmeňom kvasiniek napriek pomalšej rastovej rýchlosti aktívnejšie skvasovali glukózu, sacharózu a najmä maltózu a ich respiračná aktivita bola tiež vyššia (tab. 2). Rýchlosť

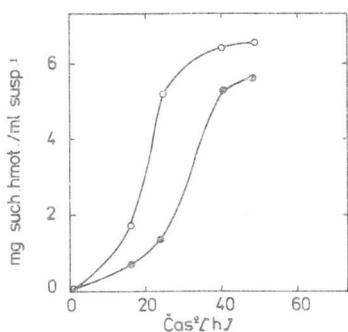
Tabuľka 2. Metabolické kvocienty kmeňa *S. cerevisiae* M2A a štandardného kmeňa *S. cerevisiae* DTXII po raste za derepresných (glukóza 5 g.l⁻¹) a represných (glukóza 100 g.l⁻¹) podmienok
Table 2. Metabolic quotients of the strain *S. cerevisiae* M2A and the standard strain *S. cerevisiae* DTXII after the growth under the derepressive (glucose 5 g l⁻¹) and repressive (glucose 100 g l⁻¹) conditions

	Q _{CO₂} ^{N₂} (μl CO ₂ /h/mg suchej hmotnosti) ¹						Q _{O₂} (μl O ₂ /h/mg suchej hmotnosti) ²	
	po derepresnom raste ³			po represnom raste ⁴			po derepresnom raste ³	
	glukóza ⁵	maltóza ⁶	sacharóza ⁷	glukóza ⁵	maltóza ⁶	sacharóza ⁷	glukóza ⁵	etanol ⁸
M2A	315	242	327	260	143	248	127	153
DTXII	266	10	283	265	10	271	103	124

¹(μl CO₂/h/mg of d.w.); ²(μl O₂/h/mg of d.w.); ³After the derepressive growth; ⁴After the repressive growth; ⁵Glucose; ⁶Maltose; ⁷Saccharose; ⁸Ethanol.

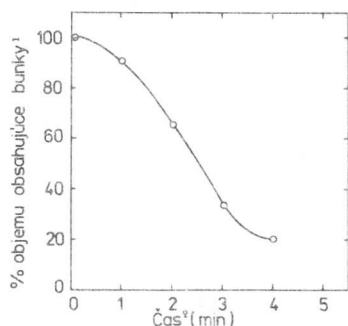
skvasovania maltózy dosahovala až 2/3 rýchlosti skvasovania glukózy a bola niekoľkonásobne vyššia ako štandardného kmeňa. Po raste buniek za represných podmienok rýchlosť skvasovania sacharidov relatívne poklesla. Kmeň M2A však i v tomto prípade skvasoval maltózu s vysokou aktivitou. Odlišná rýchlosť skvasovania maltózy bunkami kmeňa M2A a štandardného kmeňa DTXII je vcelku v súlade s ich rozdielnymi aktivitami maltózo-permeázy a α-glukozidázy (tab. 1). Takto rast kmeňa M2A nie je limitovaný aktivitou glykolýzy, resp. respiračného reťazca, ale niektorým iným krokom v anabolizme jeho buniek.

Bunky kmeňa M2A počas exponenciálnej fázy rastu za derepresných podmienok obsahovali všetky cytochrómy (obr. 3A) a ich koncentrácia v stacionárnej fáze rastu sa takmer zdvojnásobila (obr. 3B). V tejto fáze rastu mali bunky kmeňa M2A v porovnaní so štandardným kmeňom DTXII (obr. 3D) približne rovnaký obsah cytochrómu c, relatívne vyšší obsah cytochrómu b, avšak podstatne nižší obsah cytochrómu a, ktorý však dýchanie buniek kmeňa



Obr. 1. Rastová krivka rekombinanta *S. cerevisiae* M2A (●) a štandardného kmeňa *S. cerevisiae* DTXII (○) rastúceho v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g.l^{-1})

Fig. 1. Growth curves of both *S. cerevisiae* M2A recombinant (●) and standard strain *S. cerevisiae* DTXII (○) grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g.l^{-1}). (¹mg of dry weight/ml of suspension; ²Time.)



Obr. 2. Flokulácia buniek rekombinanta *S. cerevisiae* M2A vyrastených do stacionárnej fázy rastu v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g.l^{-1}). Sedimentácia zhlukov buniek v závislosti od času sa sledovala v 100 ml valci a je vyjadrená ako percento objemu kultivačného média obsahujúceho bunky rekombinanta.

Fig. 2. Flocculation of recombinant cells *S. cerevisiae* M2A grown into the stationary phase in semi-synthetic medium containing glucose (5 g.l^{-1}). Dependence of sedimentation of aggregated cell on time was studied in 100 ml cylinder. Sedimentation is expressed as the volume percentage of a cultivation medium containing the cells of recombinant. (¹% of volume containing cells; ²Time.)

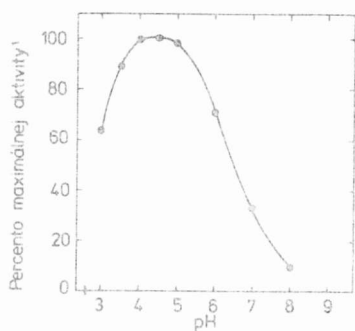
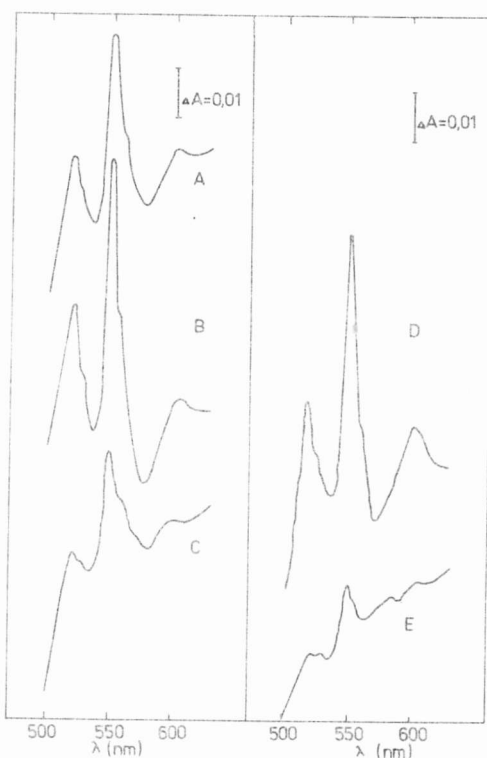
M2A nelimitoval (tab. 1). Na druhej strane po raste pri vysokej koncentrácii glukózy bunky kmeňa M2A syntetizovali signifikantne väčšie množstvo všetkých cytochrómov (obr. 3C) ako kmeň DTXII (obr. 3E). Tieto výsledky ukazujú, že rezistencia proti katabolickej represii kmeňa M2A má čiastočne pleiotropný charakter prejavujúci sa okrem syntézy invertázy a α -glukozidázy aj pri syntéze mitochondriálnych cytochrómov.

Vlastnosti nadprodukovanej invertázy a regulácia jej syntézy v bunkách kmeňa M2A sa študovali i podrobnejšie. Zistilo sa, že pH optimum (pH 4.5), Michaelisova konštanta enzýmu ($K_M = 0,030 \text{ mol.l}^{-1}$) i tepelná stabilita enzýmu (obr. 5–6) sa dajú porovnať s vlastnosťami invertázy štandardných kmeňov nesúcich *SUC* 1, resp. *SUC* 3 alely génov [20, 31, 32]. Do 55°C bola invertáza kmeňa M2A relatívne stabilná, kým pri teplotách nad 65°C dochádzalo už k prudkému poklesu jej aktivity.

Po elektroforéze invertázy kmeňa M2A v polyakrylamidovom géli za prítomnosti SDS (obr. 7A) sa pozorovali tri pásy aktivity. Jeden pri štarte, zod-

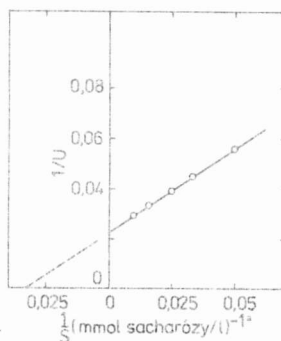
Obr. 3. Diferenčné cytochrómové spektrum buniek rekombinanta *S. cerevisiae* M2A a štandardného kmeňa *S. cerevisiae* DTXII. Bunky rástli v polosyntetickej pôde s obsahom glukózy $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (A, B, D), resp. $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (C, E). Spektrofotometrická kveta obsahovala v 1 ml 34 mg suchej hmotnosti buniek vyrastených do exponenciálnej (A, C, E), resp. stacionárnej fázy rastu (B, D). *S. cerevisiae* M2A – A, B, C a štandardný kmeň *S. cerevisiae* DTXII – D, E.

Fig. 3. Differential cytochrome spectra of both recombinant cells *S. cerevisiae* M2A and standard strain *S. cerevisiae* DTXII. The cells were grown in semi-synthetic medium containing glucose $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (A, B, D) and $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (C, E), respectively. Spectrophotometric cuvette has contain 34 mg dry weight of cells in 1 ml. Cells were grown into exponential (A, C, E) or stationary phases (B, D). *S. cerevisiae* M2A – A, B, C and standard strain *S. cerevisiae* DTXII – D, E.



Obr. 4. Vplyv pH na aktivitu invertázy kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae* M2A. Maximum špecifickej aktivity nameranej pri pH 4,5 zodpovedalo $31,45 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ bielkovín.

Fig. 4. Invertase activity of yeast strain *S. cerevisiae* M2A at different pH. Maximum of specific activity measured at pH 4.5 corresponded to the value $31.45 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ of proteins. (1 Percent of maximal activity.)

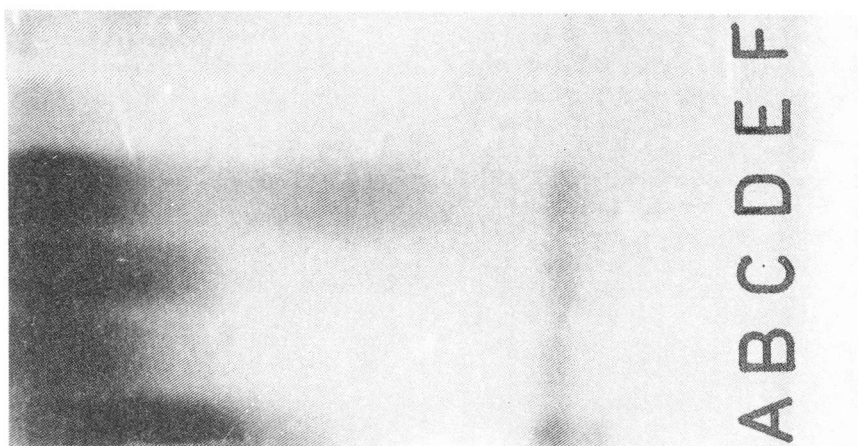
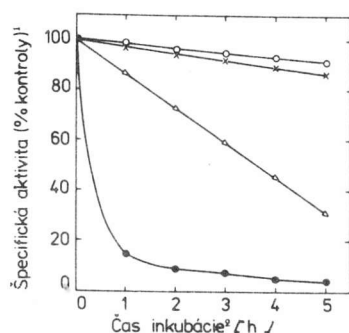


Obr. 5. Závislosť aktivity invertázy kvasiniek kmeňa *S. cerevisiae* M2A od koncentrácie sacharózy.

Fig. 5. Dependence of invertase activity of yeast strain *S. cerevisiae* M2A on sucrose concentration ($^11/S \text{ (mmol of saccharose/l)}^{-1}$).

Obr. 6. Tepelná stabilita invertázy kmeňa *S. cerevisiae* M2A. Špecifická aktivita kontrolnej vzorky v čase 0 bola $34,24 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ bielkovín. Inaktivácia sledovaná pri 50°C (o), 55°C (x), 60°C (Δ) a 65°C (●).

Fig. 6. Thermal invertase stability of *S. cerevisiae* M2A strain. Specific activity of control sample was $34.24 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ of proteins at the beginning of experiment. Inactivation observed by 50°C (o), 55°C (x), 60°C (Δ) and 65°C (●). (¹Specific activity (% of control); ²Incubation time.)



Obr. 7. Elektroforéza v polyakrylamidovom géli v prítomnosti SDS invertázy rekombinanta M2A v porovnaní so štandardným *SUC 2* kmeňom (X2180A). A – *S. cerevisiae* M2A po raste za derepresných podmienok (glukóza $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); B – *S. cerevisiae* M2A po raste za represných podmienok (glukóza $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); C – *S. cerevisiae* M2A ako v B, ale inkubovaná 1 hodinu v prítomnosti glukózy ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); D – *S. cerevisiae* M2A ako v C, ale v prítomnosti tunicamycínu ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); E – *S. cerevisiae* X2180A po raste za derepresných podmienok (glukóza $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); F – *S. cerevisiae* X2180A po raste za represných podmienok (glukóza $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoresis in presence of SDS of invertase of M2A recombinant compared with standard *SUC 2* strain (X2180A). A – *S. cerevisiae* M2A after the growth under derepressive conditions (glucose $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); B – *S. cerevisiae* M2A after the growth under repressive conditions (glucose $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); C – *S. cerevisiae* M2A the same case as in B, but incubated in presence of glucose for 1 hour ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); D – *S. cerevisiae* M2A the same as in C, but in presence of tunicamycin ($50 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$); E – *S. cerevisiae* X2180A after growth under derepressive conditions (glucose $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); F – *S. cerevisiae* X2180A after growth under repressive conditions (glucose $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).



Obr. 8. Elektroforéza invertázy v polyakrylamidovom géli bez SDS. Kmene kvasiniek *S. cerevisiae* M2A (A), *S. cerevisiae* X2180A (B) a *S. cerevisiae* M (C) rástli v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g.l^{-1}).

Fig. 8. Polyacrylamide gel electrophoresis of invertase without SDS. Yeast strains *S. cerevisiae* M2A (A), *S. cerevisiae* X2180A (B) and *S. cerevisiae* M (C) were grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g.l^{-1}).

povedajúci glykozylovanej externej invertáze a dva pásy bližšie k čelu, jeden intenzívnejší a jeden slabší, zodpovedajúce neglykozylovanej internej invertáze. Tento dublet enzýmových aktivít môže zodpovedať cytoplazmatickej zrelej forme enzýmu, resp. neglykozylovanému prekursoru externej invertázy [33]. Nie je však vylúčený ani možný výskyt dvoch cytoplazmatických foriem enzýmu, špecifikovaných odlišnými *SUC* génmi [11, 16].

Rastom kmeňa M2A za prítomnosti koncentrovanej glukózy (100 g.l^{-1}) bola syntéza invertázy reprimovaná, čo sa odrazilo v nižšej aktivite všetkých troch foriem enzýmu (obr. 7B), pričom najrýchlejšie migrujúci pás sa stal takmer nedetegovateľným. Následnou inkubáciou (1 h) reprimovaných buniek pri nízkej koncentrácii glukózy (1 g.l^{-1}) došlo k dereprimovanej syntéze intracelulárnej i externej invertázy (obr. 7C), pričom táto syntéza bola citlivá na inhibičný účinok tunicamycínu (obr. 7D). Tunicamycín ako ihibítor glykozylačných reakcií a tým i exportu invertázy z buniek [34] mal za následok objavenie sa intenzívneho difúzneho pásu aktivity v géli, čo odráža neúplnú glykoryláciu syntetizovaného enzýmu prejavujúcu sa v relatívne rýchlejšej migrácii takýchto molekúl invertázy v porovnaní s extracelulárnym enzýmom (obr. 7D). Aktivita internej invertázy štandardného *SUC 2* kmeňa v géli za tých istých podmienok analýzy bola takmer nedetegovateľná (obr. 7E, F).

Dublet internej invertázy kmeňa M2A sa pozoroval i po nedenaturujúcej elektroforéze v polyakrylamidovom géli bez SDS (obr. 8). Elektroforetická pohyblivosť neglykozylovaného enzýmu štandardného *SUC 2* kmeňa *S. cerevisiae* X2180A [11] bola intermediárna vzhľadom na dva pásy dubletu a rýchlejšia v porovnaní s rodičovským kmeňom *S. cerevisiae* M.

Je známe, že za tých istých podmienok analýzy tvorí *SUC 1* kmeň kvasiniek elektroforeticky najpomalšie sa pohybujúcu internú invertázu, kým jej pohyblivosť *SUC 2* a *SUC 4* kmeňov bola najrýchlejšia. Migrácia enzýmov *SUC 3*

a *SUC* 5 kmeňov bola intermediárna [11, 16]. Znamená to, že genetický pôdov invertázy priemyselného kmeňa *S. cerevisiae* M a jeho meiotického produktu M2A je zrejme odlišný od *SUC* 2, resp. *SUC* 4 alely génu. Výskyt internej invertázy s elektroforetickou pohyblivosťou väčšou ako najrýchlejšie migrujúceho enzýmu *SUC* 2 kmeňa je ojedinelý a jeho príčina je neobjasnená. Nepozoroval sa zatiaľ ani v hyperprodukčnom kmeni FH4C, ani u transformantov s aplikovanou dávkou *SUC* génov [16, 22].

Obe komponenty internej invertázy kmeňa M2A sa navzájom nelíšili iba rozdielnou elektroforetickou pohyblivosťou, ale aj citlivosťou na vysolovanie síranom amónnym. Pri 35 % nasýtení cytosolu vzniknutého pri sedimentácii bunkových stien a jadier mechanicky dezintegrovaných buniek síranom amónnym boli v supernatante detegovateľné ešte obidve formy cytoplazmatickej invertázy, avšak pri 55 % nasýtení už iba pomalšie migrujúca forma (obr. 9).

Výsledky biochemických analýz invertázy kmeňa M2A naznačujú, že za



Obr. 9. Vplyv stupňa nasýtenia cytosolu síranom amónnym na vysolovanie invertázy rekombinanta M2A. Elektroforéza v polyakrylamidovom géli bez SDS supernatantu získaného bez (A. kontrola) a po vysolení bielkovín síranom amónnym (B, 35 %; C, 55 %; D, 75 % nasýtenie) z cytosolovej frakcie mechanicky dezintegrovaných buniek.

Fig. 9. The effect of cytosol saturation by ammonium sulfate on precipitation of recombinant M2A invertase. The polyacrylamide gel electrophoresis without SDS of the supernatant obtained without (A, control) and after precipitation of proteins by ammonium sulfate (B, 35%, C, 55%, D, 75% saturation) in cytosol fraction of the mechanical disintegrated cells.

zvýšenú špecifickú aktivitu enzýmu v tomto kmeni je zodpovedná nadprodukcia invertázy a nie zmena jej kinetických vlastností. Nadprodukcia invertázy je spojená so zvýšenou koncentráciou externej i intracelulárnej formy enzýmu. Neglykozylovaná invertáza kmeňa M2A má dva komponenty líšiace sa elektroforetickou pohyblivosťou, ako aj stupňom vysolenia s rastúcimi koncentraciami síranu amónneho. Ich vzájomná súvislosť a genetická špecifikácia nie sú zatiaľ objasnené.

Význačné vlastnosti kmeňa M2A (*S. cerevisiae* CCY 22-15-11), ako sú nadprodukcia invertázy, konšitutívna syntéza α -glukozidázy a maltózo-permeázy, znížená citlivosť na glukózovú represiu, ako aj výrazná flokulácia jeho buniek predurčujú využitie tohto kmeňa a jeho genetickej informácie pri hybridizačnom šľachtení pekárskych, pivovarských alebo liehovarských kvasiniek i pri priemyselnej príprave vysokoaktívnych biokatalyzátorov hydrolyzujúcich sacharózu [35].

Literatúra

- [1] MYRBÄCK, K., In: The Enzymes. Part A. Invertases. Eds. J.B. Summer, K. Myrbäck. New York, Academic Press 1960, s. 379.
- [2] SUTTON, P.D. – LAMPEN, J.O., Biochim. Biophys. Acta, 56, 1962, s. 303.
- [3] GASCON, S. – LAMPEN, J.O., J. Biol. Chem. 243, 1968, s. 1567.
- [4] NEUMANN, N.P. – LAMPEN, J.O., Biochemistry, 6, 1967, s. 468.
- [5] WINGE, O. – ROBERTS, C., Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 25, 1952, s. 141.
- [6] MORTIMER, R.K. – HAWTHORNE, D.C., In: The Yeast. Vol. 1. Eds. A.M. Rose, J.S. Harrison. New York, Academic Press 1969, s. 358.
- [7] CARLSON, M. – BOTSTEIN, D., Mol. Cell. Biol. 3, 1983, s. 351.
- [8] TAUSSIG, R. – CARLSON, M., Nucl. Acid Res., 11, 1983, s. 1943.
- [9] CARLSON, M. – OSMOND, B.C. – BOTSTEIN, D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45, 1980, s. 799.
- [10] SAROKIN, L. – CARLSON, M., Nucl. Acid Res., 13, 1985, s. 6089.
- [11] GROSSMANN, M.K. – ZIMMERMANN, F.K., Mol. Gen. Genet., 175, 1979, s. 223.
- [12] CARLSON, M. – BOTSTEIN, D., Cell, 28, 1982, s. 145.
- [13] PERLMAN, D. – HALVORSON, H.O., Cell, 25, 1981, s. 525.
- [14] KAISER, C.A. – BOTSTEIN, D., Mol. Cell. Biol., 6, 1986, s. 2382.
- [15] CARLSON, M. – TAUSSIG, R. – KUSTU, S. – BOTSTEIN, D., Mol. Cell. Biol., 3, 1983, s. 439.
- [16] HOFMANN, S. – ZIMMERMANN, F.K., Curr. Genet., 11, 1986, s. 217.
- [17] MONTENECOURT, E.S. – KUO, S.C. – LAMPEN, J.O., J. Bacteriol., 114, 1973, s. 233.
- [18] SCHAMHART, D.H.J. – ten BERGE, A.M.A. – van de POLL, K.W., J. Bacteriol., 121, 1975, s. 747.
- [19] ZIMMERMANN, F.K. – SCHEEL, I., Mol. Gen. Genet., 154, 1977, s. 75.
- [20] HACKEL, R.A. – KHAN, N.A., Mol. Gen. Genet., 164, 1978, s. 295.
- [21] ABRAMS, B.B. – HACKEL, R. – MIZUNAGA, T. – LAMPEN, J.O., J. Bacteriol., 135, 1978, s. 809.

- [22] WILLIAMS, R.S. – TRUMBLY, R.J. – MacCOLL, R. – TRIMBLE, R.B. – MALEY, F., J. Biol. Chem., 260, 1985, s. 13334.
- [23] OBERNAUEROVÁ, M. – ŠUBÍK, K., Aut. osv. 252991-87.
- [24] OBERNAUEROVÁ, M. – ŠUBÍK, J., Bull. PV 26 (6), č. 3-4, 1987, s. 235.
- [25] ŠUBÍK, J. – BEHŮŇ, M. – ŠMIGÁŇ, P. – MUSÍLEK, V., Biochim. Biophys. Acta, 343, 1974, s. 363.
- [26] LEŠKOVÁ, Z. – DUDÍKOVÁ, E. – ŠUBÍK, J., Biochim. Biophys. Acta, 673, 1981, s. 10.
- [27] ŠUBÍK, J. – OBERNAUEROVÁ, M. – GBELSKÁ, Y., Sborník ÚVTIZ, Potravn. Vědy, 1 (19), 1983, č. 2, s. 87.
- [28] LOWRY, O.U. – ROSENBOROUGH, N.J. – FARR, A.L. – RANDALL, R.J., J. Biol. Chem., 193, 1951, s. 265.
- [29] LAEMMLI, U.K., Nature, 227, 1970, s. 680.
- [30] GABRIEL, O. – WANG, S.F., Anal. Biochem., 27, 1969, s. 545.
- [31] LAMPEN, J.O., In: The Enzymes. Ed. P.D. Boyer. New York Academic Press 1971, s. 291
- [32] MIZUNAGA, T. – TKACZ, J.S. – RODRIGUEZ, L. – HACKEL, R.A. – LAMPEN, J.O., Mol. Cell. Biol., 1, 1981, s. 460.
- [33] ROTHBLATT, J.A. – MEYER, D.I., Cell, 44, 1986, s. 619.
- [34] ROTHMAN, J.E. – KATZ, F.N. – LODISH, H.F., Cell, 15, 1978, s. 1447.
- [35] OBERNAUEROVÁ, M.: Vplyv biochemického a genetického pozadia priemyselných kmeňov na kvalitu pekárskeho droždia a aditív z neho pripravených. Kandidátska dizertačná práca. Bratislava, 1987 Výskumný ústav potravinársky.

Биохимические свойства штамма *S. cerevisiae* перепроизводящего инвертазу

Резюме

В работе оказалось, что у клеток дрожжей *S. cerevisiae* CCY 22-15-11 сильная флокуляция, перепроизводство инвертазы, пониженная чувствительность к действию глюкозы и повышенная активность конститутивно синтезированной мальтозо-пермеазы и α -глюкозидазы. Эти свойства предопределяют применение штамма к рекомбинационному облагораживанию промышленных дрожжей, к промышленному гидролизу сахарозы и тоже к приготовлению ферментативных концентратов инвертазы.

Biochemical properties of the strain *S. cerevisiae* overproducing the invertase

Summary

It was determined that cells of the yeast strain *S. cerevisiae* CCY 22-15-11 are highly flocculating, able to overproduce the invertase, resistant to carbon catabolite repression and having high activity of constitutively synthesized maltose-permease and α -glucosidase. These properties of the strain can be utilized in cross-breeding of industrial yeast, as well as in industrial sucrose hydrolysis and in invertase production. The utilization of this strain is predetermined for the recombinant cultivation of industrial yeast, industrial sucrose hydrolysis as well as for the preparation of enzyme concentrates of invertase. This kind of *S. cerevisiae* CCY 22-15-11 utilization is possible according to the above described properties of the strain.