



Doctoral Thesis

Untersuchungen an Plasmamembranen von *Candida tropicalis* bei Glucose- und Alkanwachstum

Author(s):

Schneider, Heinz

Publication Date:

1977

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000199604> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss ETH 6057

UNTERSUCHUNGEN AN PLASMAMEMBRANEN VON

CANDIDA TROPICALIS

BEI GLUCOSE - UND ALKANWACHSTUM

ABHANDLUNG

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften

der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE

ZUERICH

vorgelegt von

HEINZ SCHNEIDER

Dipl. Natw. ETHZ

geboren am 26. September 1950

von Thalheim (Kt. Aargau)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. A. Fiechter, Referent

Prof. Dr. H. Moor, Korreferent

1977

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass die Hefeplastamembran wichtige Funktionen beim Transport von löslichen Substraten erfüllt. Verschiedene Autoren vermuten, dass die Plasmamembran von Alkan-assimilierenden Hefen ebenfalls für die Aufnahme und Oxidation dieser wasserunlöslichen Substrate verantwortlich ist. Biochemische und enzymatische Untersuchungen an isolierten Plasmamembranen sollten zum besseren Verständnis solcher Prozesse führen.

Als Organismus wurde die Hefe Candida tropicalis ATCC 32 113 gewählt, welche sowohl auf Glucose als auch auf Kohlenwasserstoffen wachsen kann. Zu vergleichenden Studien wurde die Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae beigezogen, eine Hefe, die n-Alkane nicht verwerten kann.

Plasmamembranen von S. cerevisiae wurden nach einer von FUHRMANN et al. (1976) beschriebenen Methode isoliert, welche auf der unterschiedlichen Oberflächenladungsdichte von Mitochondrien und Plasmamembranen beruht. Für C. tropicalis wurde diese Methode leicht modifiziert.

Nach mechanischem Aufschluss der Zellen wurde durch differentielle Zentrifugation ein Sediment, bestehend aus Mitochondrien und Plasmamembranvesikeln erhalten. Die Mitochondrien wurden nahe ihrem isoelektrischen Punkt aggregiert und absedimentiert. Die Plasmamembranvesikel verblieben im Ueberstand und wurden durch Filtration und Osmolyse weiter gereinigt. Anhand enzymatischer Bestimmungen ergab sich ein Reinheitsgrad von 95 % für die isolierte Plasmamembranfraktion. Elektronenoptische Untersuchungen bestätigten die hohe Reinheit.

Die Membranen von S. cerevisiae enthielten 50 %, diejenigen von C. tropicalis 60 % Protein. In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erscheinen zwischen 15 und 20 verschiedene Proteinbanden im Bereich von 10'000 bis 200'000 Dalton.

Die dünnschichtchromatographische Bestimmung der Lipide ergab einen hohen Gehalt an Sterolen. Ein eher geringer Anteil an

Phospholipiden wurde bei S. cerevisiae festgestellt (9 % der Totallipide), während bei C. tropicalis der Phospholipidgehalt sogar weniger als 2 % betrug. Mikroviskositätsmessungen mit Hilfe der Fluoreszenz-Polarisationstechnik stimmen mit den Analysenresultaten überein. Es resultierte eine extrem niedrige Fluidität für Hefeplasmamembranen.

Die gaschromatographische Analyse der Fettsäuren zeigte eine signifikante Zunahme an C₁₆-Fettsäuren in der cytoplasmatischen Membran von C. tropicalis bei Wachstum auf Hexadecan. Dies unterstützt die Annahme der Direktinkorporation von oxidiertem Substrat in die Membransysteme der Zelle.

Anhand von Differenzspektren (reduziert-oxidiert) liess sich die Vermehrung eines b-Typ Cytochromes in der Plasmamembran von Kohlenwasserstoff-assimilierenden Zellen nachweisen. In der cytoplasmatischen Membran von S. cerevisiae wurde ebenfalls ein Cytochrom des gleichen Typs mit leicht abweichenden Adsorptionsmaxima.

Eine Vermehrung von plasmamembrangebundenen Enzymen, die an der Oxidation von Alkanen zu den korrespondierenden Fettsäuren beteiligt sind, wurde festgestellt. Die Aktivität der Dehydrogenasen für langkettige Alkohole und Aldehyde war zehnmal höher bei Alkan-assimilierenden Zellen als bei Wachstum auf Glucose. Eine Oxidation von Alkanen durch isolierte Plasmamembranen von C. tropicalis konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Resultate deuten auf ein unvollständiges System für die Alkanoxidation in der Plasmamembran hin. Eine mögliche Inaktivierung von Enzymen oder deren Verlust bei der Präparierung der Plasmamembranen wird diskutiert.

6. SUMMARY

The yeast Candida tropicalis grows on hydrocarbons. However, the uptake and oxidation of this water insoluble substrate is poorly understood. It is possible that the yeast plasma membrane, known to be involved in many solute transport functions, is responsible for these processes. Therefore plasma membranes of C. tropicalis were isolated according to a method of FUHRMANN et al. (1976). The isolated plasma membrane fraction was estimated to be 95 % pure.

The membranes were found to contain 60 % of protein and SDS-gelelectrophoresis revealed between 17 and 20 different protein bands. Lipid determination showed a high amount of sterols and a rather low content of phospholipids. Microviscosity measurements confirmed these findings. An extremely low membrane fluidity was determined.

Reduced-oxidized difference spectra demonstrated an increase of a b-type cytochrome in the plasma membrane when C. tropicalis was grown on hydrocarbons. An increase of membrane-bound enzymes involved in the oxidation of n-alkanes was indicated, as the activity of long chain alcohol and aldehyde dehydrogenase was ten times higher in plasma membranes of hydrocarbon grown cells than in those grown on glucose. However, an activity of a mixed function oxygenase was not observed.

Nevertheless, these results indicate that the plasma membrane represents the membrane system responsible for alkane oxidation.