

BBA 66211

OXYDATION DES ALCOOLS SUPÉRIEURS CHEZ *CANDIDA TROPICALIS* CULTIVÉ SUR HYDROCARBURES

J. M. LEBEAULT, F. MEYER, B. ROCHE ET E. AZOULAY

Laboratoire de Chimie Bactérienne, C.N.R.S., Marseille (France)

(Reçu le 22 juin, 1970)

(Manuscrit révisé reçu le 7 septembre, 1970)

## SUMMARY

*Oxidation of higher alcohols in Candida tropicalis cultivated on hydrocarbons*

A soluble  $\text{NAD}^+$ -linked alcohol dehydrogenase (alcohol: $\text{NAD}^+$  oxidoreductase, EC 1.1.1.1) induced by hydrocarbon has been studied in cell-free extract of *Candida tropicalis* cultivated on *n*-tetradecane. Kinetic properties, such as the variation of  $K_m$  and  $v_{\max}$  as a function of chain length, and substrate specificity might involve hydrophobic interactions between the substrate and the enzyme.

This inducible enzyme is different from the particulate previously described.

## INTRODUCTION

Les études récentes sur le mécanisme enzymatique de la dégradation des alcanes ont montré l'existence de plusieurs voies métaboliques qui diffèrent essentiellement entre elles par l'attaque primaire du substrat, mais qui aboutissent toutes à la formation de l'alcool primaire correspondant. À partir de l'alcool ces voies métaboliques se poursuivent par une série de déshydrogénases à pyridines nucléotides<sup>1-4</sup> jusqu'à l'acide gras correspondant qui est ensuite dégradé par  $\beta$ -oxydation<sup>5</sup>. Chez *Pseudomonas aeruginosa* l'alcool-déshydrogénase  $\text{NAD}^+$ -dépendante (alcohol: $\text{NAD}^+$  oxidoreductase, EC 1.1.1.1) impliquée dans ce métabolisme est de nature constitutive<sup>1</sup>; par ailleurs chez ces mêmes microorganismes VAN DER LINDEN ET HUYBREGTSE<sup>4</sup> ont pu mettre en évidence une autre alcool-déshydrogénase  $\text{NAD(P)}^+$ -indépendante spécifiquement induite par les hydrocarbures. De même chez les levures, les hydrocarbures induisent des alcool-déshydrogénases actives à l'égard des alcools supérieurs. Chez *Saccharomyces cerevisiae* elles sont au nombre de deux l'une particulaire<sup>6</sup> et l'autre soluble<sup>7</sup>, chez *C. tropicalis* l'alcool-déshydrogénase particulaire a été mise en évidence et son étude nous a permis de conclure à la présence d'activité enzymatique de nature soluble.

La question que l'on peut se poser après l'étude de la spécificité de substrat et en particulier l'activité de ces enzymes à l'égard des  $\alpha,\omega$ -diols est de savoir si ce substrat est oxydé par le même enzyme que l'alcool primaire correspondant, ou s'il est impliqué dans une chaîne métabolique différente et ce d'autant plus que ces

activités enzymatiques étant intégrées dans des structures particulières n'ont jamais été purifiées. Les mêmes arguments peuvent être invoqués à propos de l'activité de ces enzymes à l'égard de l'éthanol. Nous sommes donc amenés à poser le problème de la nature du nombre et du rôle physiologique de ces enzymes chez les levures et ce d'autant plus que de nombreux auteurs<sup>8-10</sup> en ont déjà souligné l'importance. Nous nous proposons donc après l'étude chez *C. tropicalis* de l'alcool-déshydrogénase particulière de préciser la nature de l'alcool-déshydrogénase soluble chez ce même microorganisme, et de vérifier dans quelle mesure les mécanismes d'oxydation des  $\alpha,\omega$ -diols et de l'éthanol se dissocient de celui des alcools primaires dérivant métaboliquement de l'oxydation des hydrocarbures.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### *Organisme*

*Candida tropicalis* souche 101 de notre collection.

##### *Cultures et mesure de l'activité enzymatique*

Les cellules sont cultivées et recueillies dans les conditions déjà décrites<sup>6</sup>. L'activité déshydrogénasique à l'égard des alcools est déterminée à partir de la mesure de réduction du  $\text{NAD}^+$  ( $7 \cdot 10^{-3}$  M) à 340 nm en présence de solutions d'alcools dans la diméthylformamide dans les conditions déjà indiquées<sup>11</sup>.

##### *Préparation et purification de l'extrait enzymatique*

L'extrait surnageant<sup>11</sup> obtenu par centrifugation à  $220\,000 \times g$  est filtré sur une colonne (40 cm  $\times$  2 cm) de Sephadex G-10 équilibrée avec un tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 7.7, les fractions actives exclues du gel sont réunies et appliquées sur une colonne (3 cm  $\times$  15 cm) de DEAE-cellulose équilibrée avec ce même tampon, l'élu-tion est réalisée par un gradient linéaire de NaCl (0 à 0.8 M) en tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 7.7. Les fractions actives éluées entre 0.20 et 0.22 M NaCl sont réunies et précipitées par  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 80% de saturation, le précipité obtenu est redissous dans 5 ml de tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 7.7, puis filtré sur une colonne (2.5 cm  $\times$  70 cm) de Sephadex G-200 équilibrée avec le même tampon, l'activité enzymatique est éluée dans la première fraction suivant le volume d'exclusion.

##### *Mise en évidence des produits de la réaction*

Les produits d'oxydation des alcools primaires aldéhydes et acides sont identifiés d'après les méthodes déjà décrites<sup>6</sup>.

Les produits d'oxydation des  $\alpha,\omega$ -diols et en particulier du 1,10-décandiol sont analysés soit par chromatographie sur gel de silice solvant benzène-dioxane acide acétique (200:25:10, v/v/v), les  $R_F$  du 1,10-décandiol de l' $\omega$ -hydroxyacide et du diacide correspondant sont respectivement de 0.3, 0.37 et 0.43, soit après chromatographie sur colonne (1 cm  $\times$  10 cm) d'alumine en milieu méthanol suivant la méthode décrite par Kusunose *et al.*<sup>12</sup> dans ces conditions le 1,10-décandiol est élué par le méthanol et la fraction acide par le mélange méthanol-acide acétique (3:1, v/v). Cette fraction acide analysée par chromatographie sur gel de silice présente une tache correspondant à l' $\omega$ -hydroxydécanoïque acide, l'oxydation au permanganate conduit au diacide correspondant.

## RÉSULTATS

*Mise en évidence et purification d'une alcool-déshydrogénase soluble chez C. tropicalis cultivé sur hydrocarbures*

Les extraits surnageant de *C. tropicalis* cultivé sur *n*-tétradécane catalysent l'oxydation du 1-décanol et du 1,10-décanediol en présence de NAD<sup>+</sup> et possèdent une activité endogène égale à 80% de l'activité mesurée en présence de substrat. La filtration de ces extraits surnageants sur colonne de Bio gel P<sub>10</sub> élimine totalement cette activité endogène. L'analyse des produits de la réaction par chromatographie sur gel de silice dans les conditions déjà indiquées montre que le 1-décanol est transformé comme dans le cas déjà décrit<sup>11</sup> en décanol et acide décanoïque.

L'oxydation dans les mêmes conditions du 1,10-décanediol conduit à la formation de l'*o*-hydroxyacide correspondant.

L'examen du Tableau I montre que l'alcool-déshydrogénase a été purifiée en-

TABLEAU I

## PURIFICATION DE L'ALCOOL-DÉSHYDROGÉNASE

Fraction	Activité spécifique*	Activité totale	Rendement (%)	$A_{S_1}$ ** — $A_{S_2}$ ***
Sephadex G-10 DEAE-cellulose (après précipitation par (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 80%)	82	108 000	100	1,69
Sephadex G-200	1530	38 000	35	1,58
	2340	22 000	20	1,64

\* L'activité spécifique est exprimée en nmoles de NAD<sup>+</sup> réduit par min et par mg de protéine.

\*\*  $A_{S_1}$  activité spécifique à l'égard du 1-décanol.

\*\*\*  $A_{S_2}$  activité spécifique à l'égard du 1,10-décanediol.

viron 30 fois avec un rendement de l'ordre de 20%. Il est important de noter que tout au long de la purification le rapport des activités mesurées en présence de 1-décanol et de 1,10-décanediol reste constant.

*Étude cinétique de l'oxydation des alcools et des diols*

La fraction purifiée catalyse l'oxydation du 1-décanol et du 1,10-décanediol en présence de NAD<sup>+</sup> avec un  $K_m$  à l'égard de ce coenzyme identique pour les deux  $K_m$  (NAD<sup>+</sup>) = 0.4 mM. Les constantes de Michaelis déterminées à l'égard des alcools ou des diols sont rassemblées dans le Tableau II. Il est facile de voir que les  $K_m$  sont d'autant plus efficaces que la longueur de chaîne augmente et que pour un même nombre d'atomes de carbone elles sont plus efficaces pour les alcools que pour les diols; les  $v_{max}$  suivent une loi identique. Ces résultats différencient cette activité enzymatique de l'alcool-déshydrogénase particulière de *C. tropicalis* précédemment étudiée. Cependant l'étude comparative de l'oxydation des alcools et des diols permet deux constatations:

TABLEAU II

 DÉTERMINATION DES  $K_m$  ET  $v_{max}$  DE L'ALCOOL-DÉSHYDROGÉNASE POUR LES ALCOOLS PRIMAIRES ET LES DIOLS

Substrat	$K_m$ (mM)	$v_{max}$
1-Décanol	0.24	1750
1-Dodécanol	0.15	1850
1-Tétradécanol	0.12	2125
1,10-Décanediol	0.86	860
1,11-Undécane-1,11-diol	0.72	940
1,12-Dodécanediol	0.60	1120

(1) L'activité déshydrogénasique à l'égard des alcools primaires croît en fonction de la concentration en substrat, atteint une valeur limite et pour des concentrations supérieures le substrat devient rapidement inhibiteur (Fig. 1), ce phénomène se retrouve quelque soit la longueur de la chaîne hydrocarbonée à ceci près que la valeur limite est de plus en plus élevée lorsque la longueur de chaîne augmente, et que parallèlement le degré d'inhibition pour une même concentration est de plus en plus fort. Ce qui est conforme au calcul de  $K_m$  et  $v_{max}$  (Fig. 2).

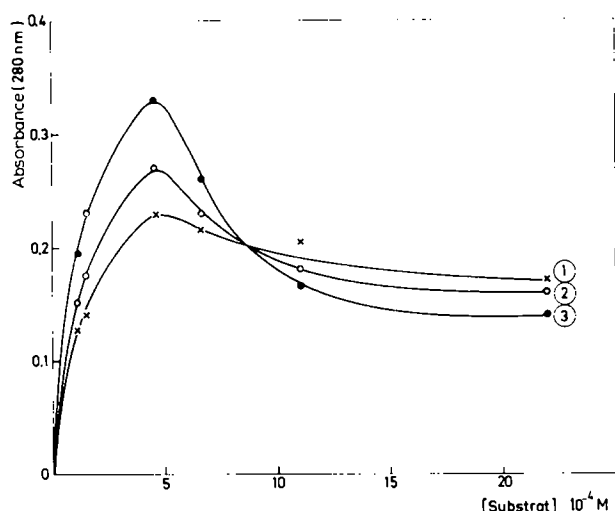


Fig. 1. Influence de la concentration du substrat sur la vitesse d'oxydation initiale de différents alcools avec des systèmes expérimentaux  $7 \cdot 10^{-3}$  M en  $NAD^+$  et contenant 0.2 mg de protéine, substrat: (1) 1-décanol; (2) 1-dodécanol; (3) 1-tétradécanol.

(2) À l'égard des diols aucune inhibition par excès de substrat n'est constatée (Fig. 3).

Ces observations peuvent apparemment laisser penser à l'existence de deux activités enzymatiques, cependant l'inactivation thermique mesurée avec le 1-décanol et le 1,10-décanediol est identique; les cinétiques d'inactivation thermique (Fig. 4, Courbes 1 et 2) sont identiques pour les deux substrats. De plus on peut constater (Fig. 4, Courbes 3 et 4) que cet enzyme diffère de l'alcool-déshydrogénase particulaire

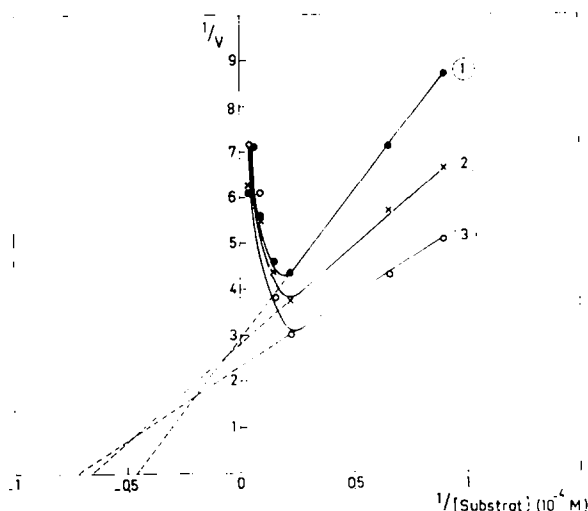


Fig. 2. Inhibition par excès de substrat de l'activité alcool-déshydrogénase soluble: représentation graphique suivant la méthode de Lineweaver-Burk. Systèmes expérimentaux identiques à ceux de la Fig. 1: les activités alcool-déshydrogénases sont déterminées à l'égard du 1-décanol (1) du 1-dodécanol (2) et du 1-tétradécanol (3).

qui pour un même temps d'incubation à la même température donne un taux d'activation 10 fois plus élevé.

#### Propriétés générales

Avec les extraits purifiés l'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration en protéines, elle est spécifique du NAD et en aucun cas le NADP, ou un colorant, ne peut remplacer ce coenzyme.

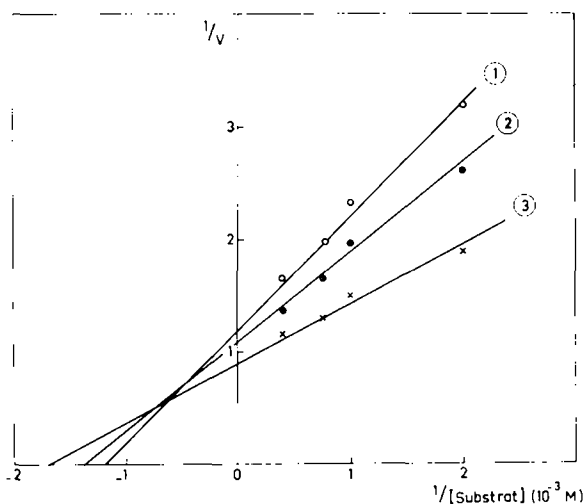


Fig. 3. Influence de la concentration en  $\alpha,\omega$ -diol sur la vitesse initiale d'oxydation de ce substrat: les activités sont déterminées à l'égard du 1,10-décandiol (1) du 1,11-undécandiol (2) et du 1,12-dodécandiol (3). Systèmes expérimentaux identiques à ceux de la Fig. 1.

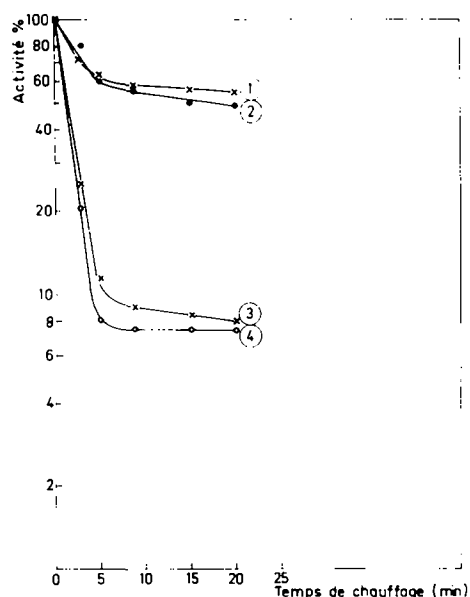


Fig. 4. Cinétique d'inactivation thermique des activités alcool-déshydrogénases solubles (1,2) et particulaire (3,4) de *C. tropicalis* cultivées sur *n*-tétradécane. Les mélanges contenant les préparations enzymatiques (1 mg de protéine) sont incubés à 51°. Les activités alcool-déshydrogénases sont déterminées à l'égard du décanol (2,4) et du décanediol (1,3).

En fonction du pH elle présente un optimum entre pH 8.8 et 9 en tampon Tris-HCl 0.05 M. L'enzyme est thermolabile et presque totalement inactivé après une incubation de 10' à 50°.

L'enzyme est par ailleurs stable et peut se conserver à 0° pendant 4 jours sans perte notable d'activité. Les résultats rassemblés dans le Tableau III montrent que l'enzyme purifié est actif à l'égard du 2-décanol et non du 5-décanol. Le 9-décène-1-ol est deshydrogéné de même que le 1,10-décanediol.

Pour les alcools primaires, l'activité spécifique croît avec la longueur de chaîne (Fig. 5) la détermination de ses valeurs réalisée pour des concentrations en substrat inférieures à la concentration inhibitrice. Il est important de souligner que cet enzyme est incapable de catalyser les oxydations des alcools inférieurs et en particulier de l'éthanol.

TABLEAU III

SPÉCIFICITÉ DE SUBSTRAT DE L'ALCOOL-DÉSHYDROGÉNASE SOLUBLE À L'ÉGARD DE DIFFÉRENTS ALCOOLS

Substrat	Activité (%)
1-Décanol	100
2-Décanol	80
5-Décanol	0
9-Décène-1-ol	42
1,10-Décanediol	50

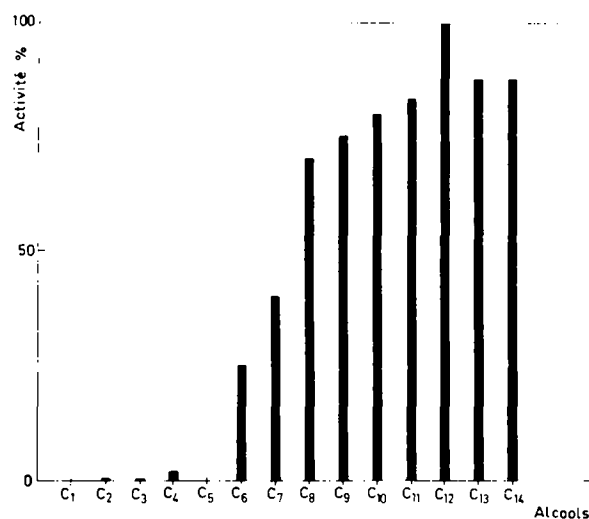


Fig. 5. Activité alcool-déshydrogénase soluble à l'égard des différents alcools primaires. L'activité est exprimée en % de l'activité mesurée avec le 1-dodécanol.

#### *Inhibition de l'activité enzymatique*

Les résultats rassemblés dans le Tableau IV montrent que l'activité enzymatique est insensible au KCN et au  $\text{NaN}_3$  et cette observation rapproche cet enzyme de l'alcool deshydrogénase de *S. cerevisiae* et le différencie de l'alcool-déshydrogénase particulière de *C. tropicalis* déjà étudiée.

TABLEAU IV

INFLUENCE DE DIFFÉRENTS INHIBITEURS SUR L'ACTIVITÉ ALCOL-DÉSHYDROGÉNASE SOLUBLE, MESURÉE AVEC LE 1-DÉCANOL ET LE 1,10-DÉCANDIOL

	Inhibition (%)	
	1-Décanol	1,10-Décandiol
<i>Inhibiteur (1 mM)</i>		
Iodoacétate	21	20
Hydroxylamine	53	55
KCN	15	13
$\text{NaN}_3$	18	19
$\text{HgCl}_2$	100	100
<i>p</i> -chloromercuribenzoate	100	100
$\text{Fe}^{2+}$	55	50
$\text{Cu}^{2+}$	65	63
<i>Inhibiteur (6 mM)</i>		
<i>n</i> -Décane	46	50
Phényldécane	0	0
Fluorodécane	59	59
Chlorodécane	39	39
Bromodécane	31	31
Iododécane	23	23

Le *n*-décane et ses dérivés halogénés ou sulfonés inhibent à la concentration de  $6 \cdot 10^{-3}$  M l'activité enzymatique à l'égard du 1-décanol. Ces observations rapportées dans le Tableau V montrent que l'inhibition augmente avec l'électronégativité de l'halogène, il est important de souligner que le phényldécane contrairement au décane n'a aucune action inhibitrice.

#### Essais de régulation

L'activité enzymatique n'apparaît que pour des cellules de *C. tropicalis* cultivées sur hydrocarbure avec un niveau de 350 à 500 unités/mg de protéines cultivées sur les intermédiaires métaboliques c'est-à-dire l'alcool et l'aldéhyde l'enzyme est induit dans les mêmes conditions. Enfin les extraits obtenus à partir de cellules cultivées sur glucose n'ont aucune activité enzymatique, ce dernier phénomène différencie cette activité enzymatique de celle de nature particulière qui présente toujours un niveau de base non négligeable.

#### DISCUSSION

Les extraits de *C. tropicalis* cultivé sur hydrocarbure possèdent deux activités alcool-déshydrogénases actives à l'égard des alcools supérieurs et des  $\alpha,\omega$ -diols, l'une a été localisée dans les particules probablement d'origine mitochondriale de ces cellules et l'autre de nature soluble a été partiellement purifiée ce qui nous a permis de préciser la spécificité à l'égard du substrat. En particulier, deux constatations s'imposent :

(1) L'enzyme soluble est incapable de catalyser l'oxydation de l'éthanol. Cette observation lève l'ambiguïté rencontrée au cours de l'étude de l'alcool-déshydrogénase de *S. cerevisiae* induite par les hydrocarbures et qui possédait une activité à l'égard de l'éthanol non négligeable et peut ainsi s'expliquer par une contamination en éthanol-déshydrogénase classique.

(2) Les résultats obtenus lors de la purification montrent que le 1-décanol et le 1,10-décane-1,10-diol sont déshydrogénés par une même enzyme, de plus les cinétiques d'inactivation thermique identiques pour les deux substrats le confirment.

La question que l'on peut se poser est de savoir pourquoi le 1,10-décane-1,10-diol est transformé en  $\omega$ -hydroxyacide et non en diacide.

La détermination expérimentale des  $K_m$  de cette enzyme pour des substrats insolubles dans l'eau a été rendue possible grâce à l'utilisation de solutions d'alcools et d' $\alpha,\omega$ -diols dans la diméthylformamide, en particulier dans de telles conditions il a été possible d'établir des comparaisons pour des substrats différents.

L'étude cinétique de l'oxydation des alcools montre qu'il y a une inhibition par excès de substrat qui ne se retrouve pas dans le cas de la déshydrogénation des  $\alpha,\omega$ -diols. Pour ces deux types de substrats cependant l'affinité augmente avec la longueur de la chaîne hydrocarbonée. Ces deux observations rejoignent celles décrites par VAN DER LINDEN ET HUYBREGTSE<sup>4</sup> et peuvent s'expliquer par l'existence de deux sites d'attachement du substrat sur la molécule d'enzyme, l'un des sites fixerait le groupement hydroxyl dans les conditions étudiées par SUND ET THEORELL<sup>13</sup> et l'autre site correspondrait probablement à une région ayant une très forte affinité pour les chaînes et capable de former des liaisons hydrophobes avec cette chaîne. Dans ces conditions l'influence de la longueur de chaîne sur l'affinité de l'enzyme



pour son substrat s'expliquerait, et serait directement liée à la distance entre ces deux sites, ce qui permettrait de comprendre pourquoi l'éthanol, le propanol et le butanol ne sont pas des substrats de l'enzyme. Un modèle avait déjà été proposé par BARDLEY *et al.*<sup>14</sup> pour expliquer la spécificité du substrat de la diamine-oxydase. L'existence de ce dernier site d'attachement pourrait expliquer l'effet inhibiteur du *n*-décane et de ses dérivés halogénés, de plus dans le cas du 1,10-décanediol l'oxydation d'une des fonctions alcool en acide conduit à l' $\omega$ -hydroxyacide dont la polarité empêche la fixation sur le site d'attachement. La présence d'un tel site d'attachement peut être décrite en des termes d'effet solvant et expliquerait la grande affinité de cet enzyme pour les alcools supérieurs.

La comparaison des propriétés de cet enzyme (inactivation thermique, sensibilité aux inhibiteurs et comportement à l'égard du substrat) avec celles déjà décrites<sup>11</sup> de l'enzyme particulaire de ce même organisme nous permet d'affirmer qu'ils sont de nature différentes et que l'enzyme soluble ne peut en aucun cas résulter d'une solubilisation de l'enzyme particulaire au cours de la préparation des extraits acellulaires. Et l'on peut se demander si ces différences sont le résultat de l'intégration de cet enzyme dans une structure de nature membranaire, qui entraînerait des modifications sur les sites d'attachement du substrat, ou si vraiment ces deux enzymes sont liés à deux fonctions physiologiques différentes. Effectivement l'étude de leur régulation montre une différence puisque l'enzyme soluble est spécifiquement induit par l'hydrocarbure.

#### RÉSUMÉ

Une alcool-déshydrogénase soluble NAD<sup>+</sup>-dépendante (alcool:NAD<sup>+</sup> oxido-réductase, EC 1.1.1.1) induite par les hydrocarbures, a été mise en évidence dans les extraits acellulaires préparés à partir de cellules de *Candida tropicalis* cultivée sur *n*-tétradécane.

Les propriétés cinétiques étudiées avec l'enzyme partiellement purifiée, telles que les variations de  $K_m$  et  $v_{max}$  en fonction de la longueur de chaîne, permettent de penser à des interactions de nature hydrophobe entre le substrat et l'enzyme. Il a été par ailleurs montré que cette enzyme inductible est différente de l'alcool-déshydrogénase particulaire précédemment décrite.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions la Société Française des Pétroles B.P. pour son aide financière, et Mme M. C. Villemot pour son assistance.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. AZOULAY ET M. T. HEYDEMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 73 (1963) 1.
- 2 M. T. HEYDEMAN ET E. AZOULAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 77 (1963) 545.
- 3 J. N. BAPTIST, R. K. GOLSON ET M. J. COON, *Biochim. Biophys. Acta*, 69 (1963) 40.
- 4 A. C. VAN DER LINDEN ET R. HUYBRECHTSE, *Antonie van Leeuwenhoek*, 35 (1969) 344.
- 5 Z. DUVNJAK, J. M. LEBEAULT, B. ROCHE ET E. AZOULAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 202 (1970) 447.
- 6 J. M. LEBEAULT, B. ROCHE, Z. DUVNJAK ET E. AZOULAY, *Arch. Mikrobiol.*, 72 (1970) 140.
- 7 B. ROCHE ET E. AZOULAY, *European J. Biochem.*, 8 (1969) 426.

- 8 L. SCHIMPFESSEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 151 (1968) 317.
- 9 R. MEGNET, *Arch. Biochem. Biophys.*, 121 (1967) 194.
- 10 U. LUTSTORF ET R. MEGNET, *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 (1968) 933.
- 11 J. M. LEBEAULT, B. ROCHE, Z. DUVNJAK ET E. AZOULAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 220 (1970) 373.
- 12 M. KUSUNOSE, E. KUSUNOSE ET M. J. COON, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1374.
- 13 H. SUND ET H. THEORELL, in P. D. BOYER, H. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 7, Academic Press., New York, 1963, p. 25.
- 14 W. G. BARDLEY, C. M. HILL ET R. W. LOBLEY, *Biochem. J.*, 117 (1970) 169.

*Biochim. Biophys. Acta*, 220 (1970) 386-395