Změny respirační aktivity a energetického stavu populace buněk *Candida utilis* v průběhu dlouhodobého hladovění

Ing. JAN PÁCA, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

Klíčová slova: *Candida utilis*, hladovění buněk, endogenní respirace, exogenní spotřeba kyslíku, intracelulární koncentrace adeninnukleotidů a pyruvátu

Úvod

V literatuře bylo doposud publikováno málo výsledků týkajících se změn fyziologického a energetického stavu populace kvasinkových buněk v průběhu hladovění na zdroj uhlíku v prostředí vodné suspenze. V případě pekařského droždí se hladovění v nepřítomnosti živin provádí a sleduje hlavně ve formě liberek lisovaného pekařského droždí [1–4].

Tato práce je zaměřena na sledování změn respirační aktivity a intracelulárních hladin adeninnukleotidů a pyruvátu v průběhu hladovění populace kvasinek *Candida utilis* ve vodné suspenzi. Získané výsledky by měly posloužit k upřesnění možností skladování kvasničného mléka při výrobě krmné biomasy a při uchovávání inokula.

Materiál a metody

Při experimentech bylo použito kvasinky *Candida utilis* č. 136 ze sbírky katedry kvasné chemie a bioinženýrství VŠCHT v Praze. Tento kmen byl adaptován na ethanol jako jediný zdroj uhlíku a energie. Postup přípravy inokula a složení kultivačního média bylo popsáno

v předchozí práci [5]. Buňky byly získány jednorázovou kultivací prováděnou při teplotě 30 °C, pH 4.6 s počáteční koncentrací ethanolu 20 g.l⁻¹. Po dosažení stacionární fáze růstu byly buňky odstředěny, dvakrát promyty a resuspendovány v 50 mmol citrát-fosfátového pufru o pH 4.6. Hladovění probíhalo při 4 °C při koncentraci buněk 8 g.l⁻¹. Spotřeba kyslíku buňkami byla měřena kyslíkovou elektrodou Pt—Ag/AgCl krytou polypropylenovou membránou tloušťky 12 μm při 30 °C připojenou k analyzátoru rozpuštěného kyslíku Oxymetr (VD ČSAV Praha). Signál byl registrován zapisovačem typu OH-814/1 (Radelkis, Maďarsko). Zpracování buněk pro stanovení intracelulární koncentrace pyruvátu, ATP, ADP a AMP bylo provedeno postupem popsaným *Doležalem a Kaprálkem* [6]. Koncentrace ATP byla stanovena ATP testem UV (Boehringer, Mannheim, Kat. č. 123897). Koncentrace ADP, AMP a pyruvátu byly určeny ADP/AMP testem UV (Boehringer, Mannheim, Kat. č. 123820).

Výsledky a diskuse

Obrázek 1 ukazuje změny v hodnotách endogenní respirace (q^{eO_2}) a exogenní spotřeby kyslíku (q_{O_2}) na

Obr. 1. Změny endogenní (1) a exogenní (2) respirace buněk v průběhu hladovění

Obr. 2. Změny intracelulárních koncentrací ATP (1), ADP (2), AMP (3) a pyruvátu (4) v průběhu hladovění

disimilaci 100 mg ethanolu l^{-1} . Na počátku hladovění byla hodnota endogenní respirace nízká v důsledku malé aktivity endogenního metabolismu podmíněné přítomností vnějšího zdroje energie v průběhu kultivace buněk. Ihned po začátku hladovění dochází k využívání živin nahromaděných uvnitř buněk, což dokumentuje prudký pokles hladiny pyruvátu (obr. 2). Již asi po 24 h hladovění dochází k výraznému vzrůstu endogenní respirace. Tento vzrůst q_{O_2} znamená počátek utilizace makromolekulárních rezervních látek (převážně glykogen).

V průběhu hladovění se mění též schopnost buněk oxi-

dovat přidaný ethanol. Z obr. 1 je patrné, že časový průběh změn exogenní respirace je přibližně zrcadlovým obrazem změn endogenní respirace. Po 9 dnech hladovění se mění fyziologická charakteristika buněčné populace. Schopnost buněk oxidovat exogenní ethanol postupně klesá, ale naopak vzrůstá aktivita endogenního metabolismu, tzn. rychlost disimilace vlastních zásobních látek. Zajímavé je zjištění, že s růstem aktivity endogenního metabolismu vzrostla i prakticky na dvojnásobek postupně hodnota intracelulárního obsahu pyruvátu (obr. 2). Pokles schopnosti využívání exogenního zdroje energie v průběhu hladovění potvrzuje zjištění Strange [7], který při hladovění bakteriální populace pozoroval postupnou ztrátu schopnosti syntetizovat induktivní enzymy. Bez ohledu na předchozí adaptaci buněk na ethanol jako jediný zdroj uhlíku a energie pro růst, ztratily buňky tuto schopnost asi po 15 dnech hladovění, kdy hodnoty endogenní respirace dosáhly hodnot vyšších než byly hodnoty q_{O_2} . Tento fakt tedy potvrzuje, že vysoké hodnoty endogenní respirace potlačují oxidaci exogenního ethanolu. Podobné výsledky s bakteriální populací zjištěli i Ribbons a Dawes [8].

Obrázek 2 ukazuje změny intracelulární koncentrace ATP, ADP, AMP a pyruvátu. Během prvních 9 dnů hladovění zůstala hladina ATP přibližně konstantní. Podobný průběh vykazovala i koncentrace AMP. Naopak v koncentracích ADP a pyruvátu se v této době objevily určité oscilace. V průběhu dalšího hladovění došlo k postupnému poklesu hladiny ATP, což dobře souhlasí s výsledky pozorovanými u bakterií [9]. Pokles ATP byl doprovázen současným vzrůstem koncentrací ADP a AMP. Porovnání jednotlivých průběhů na obr. 2 ukazuje, že zřejmě existuje určitá souvislost mezi intracelulárními hladinami nukleotidů a pyruvátu v průběhu hladovění buněk.

Obr. 3. Změny energetického náboje (1), poměru ATP/ADP (2) a celkového obsahu adeninnukleotidů (3) v průběhu hladovění

Pro lepší ilustraci změn energetického stavu buněčné populace jsou na obr. 3 vyneseny vypočtené veličiny z naměřených hladin adeninnukleotidů. Je to jednak hodnota energetického náboje [10] vypočtená ze vztahu

$$EC = \frac{ATP + 1/2 ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

dále poměr ATP/ADP a celková suma koncentrací všech nukleotidů $\Sigma A = ATP + ADP + AMP$. Z průběhu hodnot

energetického náboje je zřejmé, že ztráta schopnosti buněk tvořit kolonie byla při nízkých teplotách malá a činila asi 0,8 % po 18 dnech hladovění. Pokles energetického náboje pod hodnotu 0,8 byl pozorován teprve po 11 dnech hladovění. Poměr ATP/ADP , charakterizující jak aktivitu katabolických, tak i anabolických drah, byl také téměř konstantní během prvních 11 dnů hladovění. Další hladovění pak vedlo k poklesu poměru ATP/ADP , což ukazuje na vzrůst katabolické aktivity buněčné populace [11]. Potvrdil to i vzrůst koncentrace pyruvátu (obr. 2). Celkový obsah adeninnukleotidů ΣA charakterizuje zásobu fosfátu a energie v buněčné populaci. Přestože pokles schopnosti buněk tvořit kolonie byl i po 18 dnech hladovění velmi malý, charakterizuje pokles obsahu adeninnukleotidů, pozorovaný po 9 dnech hladovění, změny katabolické aktivity plynoucí ze změn fyziologického stavu buněčné populace.

Získané výsledky ukazují, že při uchovávání kvasničného mléka při vhodné hodnotě pH média a nízké teplotě neztrácí během 9 dnů skladování buňky *Candida utilis* nejen na životaschopnosti, avšak nemění se příliš ani jejich schopnost využít přidaný ethanol jako zdroj energie.

Literatura

- [1] SUOMALAINEN, H., OURA, E., NEVALAINEN, P.: 2nd Meeting FEBS Vienna, Abstr. Commun. 1965, s. 67.
- [2] PARKKINEN, E., OURA, E., SUOMALAINEN, H.: J. Inst. Brew. Lond. **82**, 1976, s. 283.
- [3] PARKKINEN, E., GRBA, S., OURA, E., SUOMALAINEN, H.: Proc. 2nd Congr. of Yugoslav Microbiol., Zagreb: Soc. Croatian Microbiol. 1972, s. 317.
- [4] BERGELIN, R., OURA, E., SUOMALAINEN, H.: J. Inst. Brew. Lond. **82**, 1976, s. 266.
- [5] PÁCA, J., GRÉGR, V.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 539.
- [6] DOLEŽAL, J., KAPRÁLEK, F.: Folia Microbiol. **21**, 1976, s. 188.
- [7] STRANGE, R. E.: Nature, Lond. **209**, 1966, s. 428.
- [8] RIBBONS, D. W., DAWES, E. A.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **102**, 1963, s. 564.
- [9] STRANGE, R. E.: Microbial Response to Mild Press, Durham. Meadowfield Press Ltd. 1976.
- [10] ATKINSON, D. E.: Ann. Rev. Microbiol. **23**, 1969, s. 47.
- [11] HARRISON, D. E. F., MAITRA, P. K.: Biochem. J. **112**, 1969
- Páca, J.: Změny respirační aktivity a energetického stavu populace buněk *Candida utilis* v průběhu dlouhodobého hladovění.** Kvas. prům. **30**, 1984, č. 10, s. 225—227.
- Byly sledovány změny katabolické aktivity exogenního a endogenního metabolismu spolu se změnami intracelulární koncentrace adeninnukleotidů a pyruvátu v průběhu dlouhodobého hladovění při nízké teplotě.
- Паца, Я.: Изменения респирационной активности и энергетического состояния клеток *Candida utilis* в течение долговременного голодания.** Квас. прум. **30**, 1984 № 10, стр. 225—227.
- Исследовались изменения кatabолической активности экзогенного и эндогенного метаболизма вместе с изменениями внутриклеточной концентрации адениннуклеотидов и пирувата в течение долговременного голодания при низкой температуре.
- Páca, J.: Changes in Respiration Activity and Energetics of *Candida utilis* During Long-Term Starvation.** Kvas. prům. **30**, 1984, No. 10, pp. 225—227.
- Changes in catabolic activity of exogenous and endogenous metabolism were studied with respect to changes in the intracellular level of adenine nucleotides and pyruvate during long-term yeast starvation at low temperature.
- Páca, J.: Änderungen der Respirations-Aktivität und des energetischen Zustandes der Zellenpopulation von *Candida utilis* in Verlauf langdauernder Hungerung.** Kvas. prům. **30**, 1984, No. 10, S. 225—227.
- Es wurden die Änderungen der katabolischen Aktivität des exogenen und endogenen Metabolismus zusammen mit den Änderungen der intrazellulären Konzentration der Adeninnukleotide und des Pyruvats im Verlauf langdauernder Hungerung bei niedriger Temperatur verfolgt.