

# Vliv deficiencie růstových faktorů na intracelulární hladinu enzymů

577.15 663.15

RNDr. VLADIMÍR JIRKŮ, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha  
Ing. ALENA ČEJKOVÁ, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

**Klíčová slova:** deficiencie růstových faktorů, intracelulární hladina, fruktosa-1,6-difosfátaldolasa, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, isocitrátlyasa, NADH-dehydrogenasa, intracelulární proteolytická aktivita, zdroj uhlíku

## ÚVOD

V této práci jsou shrnuty výsledky experimentů, které byly zaměřeny na získání informací o změně intracelulární hladiny čtyř klíčových enzymů a celkové intracelulární hladiny proteolytické aktivity, která byla indukována nepřítomností biotinu nebo thiaminu, nebo snížením koncentrace inositolu, Ca-pantothenu a pyridoxinu, v kultivačním prostředí kvasinkové buňky. Volba enzymů v tomto případě představuje jeden z možných orientačních pohledů na biochemický potenciál buňky. Sledování změny celkové intracelulární proteolytické aktivity bylo zvoleno z toho důvodu, že tato enzymová aktivita ukazuje mimo jiné možné změny buněčných kompartmentů s biodegradační funkcí. V tomto směru byla sledována změna hladiny kyselých a alkalických proteas. Jinými slovy jde o poznání důležitých změn biochemické aktivity jako důsledku deficiencie růstových faktorů, které mohou ovlivnit významné vlastnosti kvasinkových kmenů. V této souvislosti práce navazuje na již publikovaná sdělení [1–6].

## MATERIÁL A METODY

**Kmen.** *Saccharomyces cerevisiae* 92 — droždářská rasa Union (sbírka pracoviště) — byl uchováván při teplotě 4 °C na šikmém agaru (Malt Extract Agar, Oxoid), při pravidelném pasážování v intervalu 21 dnů.

**Médium.** Kultivace a příprava deficientních populací byly provedeny v syntetickém médiu [7] modifikovaném úplným vynecháním biotinu nebo thiaminu, nebo jednotlivým snížením koncentrace pyridoxinu, pantothenu a inositolu na 60 % optimální koncentrace (v textu dále označováno jako 40 % deficiencie). Sledované zdroje C byly přítomny v 1 % výchozí koncentraci. Výchozí hodnoty pH média byly v rozmezí 3,8–4.

**Příprava inokula.** V experimentech sledujících důsledky deficiencie růstových faktorů byla jako inokula použita výhradně buněčná populace pozdní exponenciální fáze získaná kultivací v nepřítomnosti biotinu nebo thiaminu

nebo v přítomnosti snížených koncentrací inositolu, pantothenu nebo pyridoxinu. Způsob kultivace těchto kultur se nelišil od kultivací použitých ve vlastních experimentech.

**Kultivace.** Objemy 100 ml média byly inokulovány při dodržení standardní optické density (OD 0,08) a kultivovány za aktivní aerace při 30 °C na třepacím stroji (88 kyvůl · min<sup>-1</sup>) kombinovaném s vodní lázní.

**Fruktosa-1,6-difosfátaldolasa** (EC 4.1.2.13). Stanovení provedeno podle Brunse a Bergmeyer [8]. Jednotka aktivity U byla definována podle Brunse [9]. Stanovená aktivita byla vyjádřena v U · mg<sup>-1</sup> bílkovin.

**Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa** (EC 1.1.1.49). Stanovení bylo provedeno podle Löhra a Wallera [10]. Aktivita byla vyjádřena v U · mg<sup>-1</sup> bílkovin.

**Isocitrátlyasa** (EC 4.1.3.1). Stanovení bylo provedeno podle Dixon a Kornberga [11]. Aktivita byla vyjádřena v U · mg<sup>-1</sup> bílkovin.

**NADH-dehydrogenasa** (EC 1.6.99.3). Stanovení bylo provedeno podle Kinga a Howarda [12]. Aktivita byla vyjádřena v U · mg<sup>-1</sup> bílkovin.

**Intracelulární proteolytická aktivita.** Proteolytická aktivita rozpustné frakce bezbuněčných extraktů s optimem pH 4,0 a pH 8,0 byla stanovena podle Ansona [13]. Jednotka aktivity je definována jako množství enzymu v 1 ml rozpustné frakce bezbuněčného extraktu, které za daných podmínek uvolní v intervalu 10 min 0,1 μg tyrosinového ekvivalentu. Aktivita byla vyjádřena v jednotkách specifické aktivity (U · mg<sup>-1</sup> bílkovin).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

**Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa.** Změnu hladiny glukosa-6-fosfátdehydrogenasy podmíněnou deficiencí růstových faktorů v kultivačním prostředí různých zdrojů C u exponenciálních a stacionárních buněk shrnuje tab. 1.

Z této tabulky vyplývá, že kultivační prostředí s glukosou podmiňuje v případě obou sledovaných růstových



Tabulka 1. Změna hladiny glukosa-6-fosfátdehydrogenasy indukovaná v přítomnosti různých zdrojů C v exponenciálních (A) a stacionárních (B) buňkách *Saccharomyces cerevisiae* deficiencí růstových faktorů

Zdroj C	Kontrolní <sup>a</sup> pokus	Deficiencí <sup>b</sup> [%]				
		Biotin [100]	Thi-amin [100]	Inosi-tol [40]	Panto-thenát [40]	Pyri-doxin [40]
A						
Glukosa	9,24	132	118	149	142	86
Sacharosa	7,36	169	168	106	156	79
Maltosa	5,55	144	103	159	200	113
B						
Glukosa	13,05	363	133	172	201	138
Sacharosa	9,57	229	128	109	132	91
Maltosa	9,53	314	114	205	253	134

<sup>a</sup> Hladina glukosa-6-fosfátdehydrogenasy je vyjádřena v U na 10<sup>-5</sup> g bílkovin

<sup>b</sup> Změna hladiny enzymu v deficientních buňkách je vyjádřena jako % jeho specifické aktivity stanovené v kontrolní buněčné populaci

Tabulka 2. Změna hladiny fruktosa-1,6-difosfátaldolasy indukovaná v přítomnosti různých zdrojů C v exponenciálních (A) a stacionárních (B) buňkách *Saccharomyces cerevisiae* deficiencí růstových faktorů

Zdroj C	Kontrolní <sup>a</sup> pokus	Deficiencí <sup>b</sup> [%]				
		Biotin [100]	Thi-amin [100]	Inosi-tol [40]	Panto-thenát [40]	Pyri-doxin [40]
A						
Glukosa	9,17	110	154	90	68	169
Sacharosa	4,93	62	28	102	108	19
Maltosa	3,05	136	48	148	183	242
B						
Glukosa	8,13	114	176	78	43	190
Sacharosa	3,68	70	25	111	106	15
Maltosa	3,52	136	43	146	159	247

<sup>a</sup> Hladina fruktosa-1,6-difosfátaldolasy je vyjádřena v U na mg bílkovin

<sup>b</sup> Změna hladiny enzymu v deficientních buňkách je vyjádřena jako % jeho specifické aktivity stanovené v kontrolní buněčné populaci

fází výrazné zvýšení hladiny zmíněného enzymu. Výjimkou jsou pouze exponenciální buňky kultivované za nepřítomnosti thiaminu, kde hladina enzymu je zvýšena jen nevýrazně, a deficiencie pyridoxinu, která za těchto podmínek indukuje dokonce nepříliš výrazný pokles hladiny enzymu.

Exponenciální i stacionární buňky kultivované v prostředí sacharosy jsou charakterizovány výrazným zvýše-

ním hladiny glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (deficiencie biotinu, thiaminu a pantothenátu), nebo nevýrazným zvýšením (deficiencie inositolu) až poklesem (deficiencie pyridoxinu) hladiny sledovaného enzymu.

V kultivačním prostředí s maltosou indukují jednotlivé deficiencie výrazné zvýšení hladiny sledovaného enzymu v obou fázích růstu. Výjimkou je deficiencie thiaminu (exponenciální i stacionární buňky) a deficiencie pyridoxinu (exponenciální buňky), které podmiňují jen mírné zvýšení hladiny enzymu.

Tabulka 3. Změna hladiny isocitrátlyasy indukovaná v přítomnosti různých zdrojů C v exponenciálních (A) a stacionárních (B) buňkách *Saccharomyces cerevisiae* deficiencí růstových faktorů

Zdroj C	Kontrolní <sup>a</sup> pokus	Deficiencí <sup>b</sup> [%]				
		Bio-tin [100]	Thi-amin [100]	Ino-sitol [40]	Panto-thenát [40]	Pyri-doxin [40]
A						
Glukosa	43,52	114	135	143	126	126
Sacharosa	52,91	64	50	114	129	71
Maltosa	29,43	100	100	100	109	105
B						
Glukosa	59,19	26	92	98	95	96
Sacharosa	52,66	25	70	188	200	175
Maltosa	29,45	35	110	110	100	109

<sup>a</sup> Hladina isocitrátlyasy je vyjádřena v U na mg bílkovin

<sup>b</sup> Změna hladiny enzymu v deficientních buňkách je vyjádřena jako % jeho specifické aktivity stanovené v kontrolní buněčné populaci

Tabulka 4. Změna hladiny NADH-dehydrogenasy indukované v přítomnosti různých zdrojů C v exponenciálních (A) a stacionárních (B) buňkách *Saccharomyces cerevisiae* deficiencí růstových faktorů

Zdroj C	Kontrolní <sup>a</sup> pokus	Deficiencí <sup>b</sup> [%]				
		Biotin [100]	Thi-amin [100]	Ino-sitol [40]	Panto-thenát [40]	Pyri-doxin [40]
A						
Glukosa	1,84	200	112	130	97	99
Sacharosa	2,95	146	98	108	94	95
Maltosa	2,22	157	102	81	93	92
B						
Glukosa	1,53	222	109	126	93	93
Sacharosa	2,73	152	101	110	95	93
Maltosa	2,11	176	103	83	92	93

<sup>a</sup> Hladina NADH-dehydrogenasy je vyjádřena v U na mg bílkovin

<sup>b</sup> Změna hladiny enzymu v deficientních buňkách je vyjádřena jako % jeho specifické aktivity stanovené v kontrolní buněčné populaci



**Fruktosa-1,6-difosfátaldolasa.** Vliv sledovaných deficiencí na hladinu fruktosa-1,6-difosfátaldolasy v prostředí tří sledovaných zdrojů C u exponenciálních a stacionárních buněk je zachycen v tabulce 2.

Je zřejmé, že kultivační prostředí glukosy indukuje v případě obou různých fází obdobné změny, a to výrazné zvýšení hladiny enzymu (deficience thiaminu a pyridoxinu) a výrazné snížení této hladiny (deficience pantothenátu).

Hladina sledovaného enzymu v případě kultivace na pozadí sacharosy rovněž není ovlivněna fází růstu. Zde se hladina buď výrazně snižuje (deficience biotinu, thiaminu, inositolu), nebo zůstává téměř beze změn.

Kultivace v prostředí maltosy vyvolává v případě obou růstových fází jednak výrazné zvýšení hladiny sledovaného enzymu (deficience biotinu, inositolu, pantothenátu a pyridoxinu) a jednak výrazné snížení této hladiny (deficience thiaminu).

**Isocitrátlyasa.** Tabulka 3 shrnuje změny hladiny isocitrátlyasy, ke kterým dochází při deficienci růstových faktorů během kultivace v prostředí glukosy, sacharosy a maltosy u exponenciálních a stacionárních buněk.

Prostředí glukosy indukuje u exponenciálních buněk méně výrazné až výrazné zvýšení (deficience inositolu) hladiny isocitrátlyasy, na rozdíl od stacionárních buněk, které jsou charakterizovány nevýrazným až výrazným (deficience biotinu) snížením této hladiny.

Kultivace v prostředí sacharosy indukuje u exponenciálních buněk výrazné snížení (deficience biotinu, thiaminu, pyridoxinu) nebo nevýrazné zvýšení (ostatní deficience) hladiny sledovaného enzymu. U stacionárních buněk je hladina enzymu opět výrazně zvýšena (deficience inositolu, pantothenátu, pyridoxinu) nebo výrazně snížena (deficience biotinu, thiaminu).

Při kultivaci na pozadí maltosy zůstává hladina isocitrátlyasy téměř nezměněna nebo je jen nevýrazně zvýšena, a to v obou růstových fázích. Výjimkou jsou pouze stacionární buňky v prostředí neobsahujícím biotin, kde dochází k silnému snížení hladiny sledovaného enzymu.

**NADH-dehydrogenasa.** Vliv deficiencie růstových faktorů na pozadí různých zdrojů C na hladinu NADH-dehydrogenasy u exponenciálních a stacionárních buněk shrnuje tab. 4.

Je zřejmé, že i v tomto případě se příliš neprojevuje vliv růstové fáze. Kultivace v prostředí glukosy indukuje méně výrazné (deficience thiaminu, inositolu) až výrazné (deficience biotinu) zvýšení hladiny sledovaného enzymu, popř. tuto hladinu neovlivňuje (ostatní deficience).

Prostředí sacharosy v případě sledovaných deficiencí vyvolává jen velmi nevýrazné změny v hladině NADH-dehydrogenasy, pouze za nepřítomnosti biotinu je hladina tohoto enzymu výrazně zvýšena.

Kultivační prostředí obsahující maltosu podmiňuje odpovídající změny jako v případě kultivace se sacharosou, a to pouze s tím rozdílem, že deficience inositolu indukuje pokles hladiny sledovaného enzymu.

**Intracelulární kyselá proteolytická aktivita.** Změny zmíněné proteolytické aktivity indukované v přítomnosti různých zdrojů C v exponenciálních a stacionárních buňkách deficiencí růstových faktorů jsou zahrnuty v tab. 5.

Kultivační prostředí glukosy indukuje v případě obou růstových faktorů výrazné snížení hladiny proteolytické aktivity u všech sledovaných deficiencí s výjimkou stacionárních buněk kultivovaných v nepřítomnosti thiaminu, které jsou charakterizovány zvýšením hladiny kyselých proteolytických enzymů.

Přítomnost sacharosy v kultivačním prostředí podmiňuje u exponenciálních buněk nevýrazné (deficience

Tabulka 5. Změna intracelulární proteolytické aktivity (pH 4) indukovaná v přítomnosti různých zdrojů C v exponenciálních (A) a stacionárních (B) buňkách *Saccharomyces cerevisiae* deficiencí růstových faktorů

Zdroj C	Kontrolní pokus	Deficience <sup>b</sup> [%]				
		Biotin (100)	Thi-amin (100)	Ino-sitol (40)	Panto-thenát (40)	Pyri-doxin (40)
A						
Glukosa	4,45	22	59	75	57	41
Sacharosa	2,49	108	168	118	178	120
Maltosa	2,09	202	88	115	122	67
B						
Glukosa	8,30	67	123	53	64	87
Sacharosa	6,05	121	75	39	49	60
Maltosa	7,23	103	108	108	45	163

a Proteolytická aktivita je vyjádřena v U na mg bílkovin

b Změna hladiny kyselých proteas v deficiencích buněk je vyjádřena jako % specifické proteolytické aktivity stanovené v kontrolní buněčné populaci

Tabulka 6. Změna intracelulární proteolytické aktivity (pH 8) indukovaná v přítomnosti různých zdrojů C v exponenciálních (A) a stacionárních (B) buňkách *Saccharomyces cerevisiae* deficiencí růstových faktorů

Zdroj C	Kontrolní pokus	Deficience <sup>b</sup> [%]				
		Biotin (100)	Thi-amin (100)	Ino-sitol (40)	Panto-thenát (40)	Pyri-doxin (40)
A						
Glukosa	3,94	103	161	89	147	120
Sacharosa	2,95	24	62	76	74	61
Maltosa	1,97	40	111	126	122	32
B						
Glukosa	9,13	53	102	52	31	69
Sacharosa	6,97	122	68	55	48	61
Maltosa	7,14	82	87	89	42	116

a Proteolytická aktivita je vyjádřena v U na mg bílkovin

b Změna hladiny alkalických proteas v deficiencích buněk je vyjádřena jako % specifické proteolytické aktivity stanovené v kontrolní buněčné populaci

biotinu, inositolu, pyridoxinu) až výrazné (deficience thiaminu, pantothenátu) zvýšení hladiny těchto enzymů. U stacionárních buněk ve zmíněném kultivačním prostředí dochází pak s výjimkou deficience biotinu k výraznému potlačení zmíněné enzymové aktivity.

Exponenciální buňky kultivované v přítomnosti maltosy jsou charakterizovány jednak potlačením (deficience pyridoxinu, thiaminu) jednak nevýrazným (deficience inositolu, pantothenátu) až výrazným (deficience biotinu) zvýšením uvedené enzymové aktivity.



Sledované deficiencie stacionárních buněk kultivovaných v přítomnosti maltosy hladinu kyselých proteas většinou neovlivňují. Výjimku tvoří pouze deficiencie pantothenátu, která za těchto podmínek indukuje výrazné snížení této enzymové aktivity, a deficiencie pyridoxinu, která naopak vyvolává její výrazné zvýšení.

**Intracelulární alkalická proteolytická aktivita.** Výsledky tohoto experimentu jsou shrnuty v tab. 6. Je zřejmé, že kultivace na pozadí glukosy vyvolává u exponenciálních buněk výraznější změny při deficienci thiaminu, pantothenátu a pyridoxinu, kdy se zvyšují hladiny alkalických proteas. Jednotlivé deficiencie s výjimkou thiaminu indukují pak v případě stacionárních buněk výrazné snížení enzymové aktivity.

Obraz změn, indukovaných na pozadí sacharosy u deficientních exponenciálních a stacionárních buněk, je jednotný, v tomto případě se projevuje výrazné potlačení hladiny alkalických proteas. Výjimku tvoří pouze stacionární buňky kultivované v nepřítomnosti biotinu, u kterých je tato enzymová aktivita nevýrazně zvýšena.

Prostředí maltosy se u experimentálních buněk projevuje buď výrazným snížením (deficiencie biotinu, pyridoxinu), nebo nevýrazným zvýšením (ostatní sledované deficiencie) hladiny alkalických proteas. K výraznějšímu ovlivnění hladiny těchto enzymů u stacionární populace, a to snížení, nastává pouze v případě deficiencie pantothenátu.

Zjištěné důsledky deficiencí lze v tomto případě konfrontovat se skutečností, že sledované enzymy fungují v primárním metabolismu.

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa je prvním enzymem při štěpení glukosy dráhou pentosového cyklu, přičemž zmíněný enzym katalyzuje Warburgovu oxidaci glukosy. Enzym je allostericky inhibován redukovanou formou NAD a ATP.

Fruktosa-1,6-difosfátaldolasa je druhým klíčovým enzymem glykolytické dráhy katalyzujícím štěpení vzniklého fruktosa-1,6-difosfátu na dvě triosy. Tento enzym je rovněž významným enzymem v neoglukogenesi.

Isocitrátlyasa je prvním enzymem kontrolujícím funkci glyoxalátového cyklu. Význam této metabolické dráhy u kvasinkových buněk rostoucích v prostředí s glukosou byl prokázán u kmene *Candida tropicalis* [14]. V tomto případě bylo zároveň zjištěno, že deficiencie biotinu podmiňuje zvýšení hladiny isocitrátlyasy. Se stejnými důsledky je popsána deficiencie thiaminu u kmene *Candida lipolytica* [15].

NADH-dehydrogenasa katalyzuje dehydrogenační reakci podmiňující oxidaci redukované formy NAD.

Zjištěný pohyb v intracelulární hladině kyselých a alkalických proteas ukazuje na vliv sledovaných deficiencí na biodegradační potenciál intracelulárního prostředí (buněčných kompartmentů). Tyto změny mohou ovlivnit biochemickou aktivitu buňky, její stabilitu i regulační mechanismy.

Je zřejmé, že zjištěné změny v hladinách sledovaných enzymů mohou být interpretovány jako důkaz toho, že metabolismus deficientní kvasinkové buňky může mít v dílčím nebo i celkovém aspektu odlišný charakter, který nemusí být nutně provázen změnou její růstové charakteristiky. I v tomto případě jde tedy o skryté změny biochemické aktivity kvasinkové buňky, jejichž potenciální nebezpečí je především aktuální při použití přiro-

zených substrátů se značně variabilní hladinou růstových faktorů.

## Literatura

- [1] JIRKŮ, V., ČEJKOVÁ, A., PÁČA, J.: *Experientia*, **37**, 1981, s. 39.
- [2] JIRKŮ, V., ČEJKOVÁ, A.: *Z. Allg. Mikrobiol.*, **21**, 1981, s. 423.
- [3] JIRKŮ, V., LUDVÍK, J., ČEJKOVÁ, A., KRUMPHANZL, V.: *Z. Allg. Mikrobiol.*, **22**, 1982, s. 389.
- [4] JIRKŮ, V., ČEJKOVÁ, A., PÁČA, J.: *Sborník VŠCHT E55*, 1983, s. 143.
- [5] JIRKŮ, V., ČEJKOVÁ, A.: *Kvas. prům.*, 1984 (v tisku).
- [6] JIRKŮ, V., ČEJKOVÁ, A.: *Kvas. prům.*, 1984 (v tisku).
- [7] OLSON, B. H., JOHNSON, M. J.: *J. Bacteriol.*, **57**, 1949, s. 235.
- [8] BRUNS, F. H.: V „*Methods of Enzymatic Analysis*“, Bergmeyer, H. V. (Ed.), Academic Press, 1963, s. 724.
- [9] BRUNS, F. H.: *Biochem. Z.*, **325**, 1954, s. 156.
- [10] LÖHR, G. W.: V „*Methods in Enzymatic Analysis*“, Bergmeyer, H. V. (Ed.), Academic Press, 1974, s. 636.
- [11] DIXON, G. H., KORNBERG, H. L.: *Biochem. J.*, **72**, 1959, s. 3.
- [12] KING, T. E., HOWARD, R. L.: V „*Methods in Enzymology*“, Colowick, S. P., Kaplan, N. D. (Eds.), Academic Press, Vol. 10, 1967, s. 275.
- [13] ANSON, M. L.: *J. Gen. Physiol.*, **22**, 1938, s. 79.
- [14] NABESHIMA, S., TANAKA, A., FUKUI, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **41**, 1977, s. 281.
- [15] ERMAKOVA, I. T., FINOGENOVA, T. V.: *Mikrobiologia*, **40**, 1971, s. 223.

**Jirků V., Čejková A.: Vliv deficiencie růstových faktorů na intracelulární hladinu enzymů.** *Kvas. prům.*, **31**, 1985, č. 5, s. 111–114.

Interakce deficiencie růstových faktorů s intracelulární hladinou fruktosa-1,6-difosfátaldolasy, glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, isocitrátlyasy, NADH-dehydrogenasy a hladinou proteolytické aktivity byla potvrzena, a to ve vztahu k účinku růstu fáze a různým zdrojům uhlíku.

**Иирку, В., Чейкова, А.: Влияние дефиции факторов роста на интрацеллюлярный уровень энзимов.** *Квас. прум.* **31**, 1985, № 5, стр. 111–114.

Взаимодействие дефиции факторов роста и с интрацеллюлярным уровнем фруктоза-1,6-дифосфатальдозы, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы, изокитратлиазы, NADH-дегидрогеназы и уровнем протеолитической активности было подтверждено, и то в отношении к действию фазы роста и разным источникам углерода.

**Jirků V., Čejková A.: Effect of growth factor deficiency on intracellular level of enzymes.** *Kvas. prům.*, **31**, 1985, No. 5, pp. 111–114.

The interaction of growth factor deficiency with intracellular level of fructose-1,6-bisphosphate aldolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and intracellular level of proteolytic activity was studied. The effect of growth phase and different carbon sources.

**Jirků, V. - Čejková, A.: Einfluß der Defizienz der Wachstumsfaktoren auf das intrazelluläre Niveau der Enzyme.** *Kvas. prům.* **31**, 1985, Nr. 5, S. 111–114.

Die Interaktion der Defizienz der Wachstumsfaktoren mit dem intrazellulären Niveau der Fruktose-1,6-Diphosphataldolase, Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, Isozitratlase, NADH-Dehydrogenase und dem Niveau der proteolytischen Aktivität wurde bestätigt, und zwar in der Beziehung zu der Wirkung der Wachstumsphase und verschiedenen Kohlenstoffquellen.