

Změny metabolismu glukosy při hladovění pekařského droždí

664.662 663.149 664.162

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

Klíčová slova: kvasinky, pekařské droždí, *respirace*, *metabolismus*, *kyselina octová*, *glukosa*

1. ÚVOD

V předchozím článku [1] byl sledován vztah mezi degradací rezervních polysacharidů, přežíváním buněk a akumulací ethanolu a acetátu v médiu v průběhu aerobního hladovění pekařského droždí. Tato práce je pokračováním předchozí studie a je zaměřena na sledování změn ve schopnosti buněk disimilovat přidanou glukosu a konvertovat ji na metabolické produkty v průběhu aerobního hladovění pekařského droždí.

2. MATERIÁLY A METODY

2.1 Mikroorganismus a podmínky hladovění

K pokusům bylo použito expediční lisované pekařské droždí z n. p. Labena, závodu 01 v Krásném Březně. Čerstvé lisované droždí bylo resuspendováno ve fyziologickém roztoku (9 g NaCl v 1 litru redestilované vody). Počáteční hodnota pH fyziologického roztoku byla pH₀ 4,4.

Hladovění buněčné suspenze se provádělo za aerobních podmínek v míchané a větrané nádobě opatřené zpětným chladičem, aby se zabránilo odparu vody. Počáteční koncentrace buněčné sušiny byla zvolena 100 g. l⁻¹. Pro urychlení degradačních procesů bylo hladovění prováděno při zvýšené teplotě 35°C. Postupná lýze buněk v průběhu pokusu působila značné pění a proto se k suspenzi přidávalo 0,05 ml. l⁻¹ odpěňovacího oleje Struktol J633 (Schill-Seilacher, Hamburg, NSR) ihned na počátku hladovění. Rychlost dodávky kyslíku byla nastavena stejně jako v předchozí práci [1].

2.2 Příprava buněk pro testování

V průběhu hladovění se odebíraly vzorky o objemu 35 ml. Suspenze kvasinek se odstředila při 7000 g po dobu 2 min při 2°C a dvakrát se promyla fyziologickým roztokem. Promyté buňky byly resuspendovány ve fyziologickém roztoku s hodnotou pH 5,5. Tato suspenze byla převedena do aerované a míchané skleněné nádoby opatřené chladičem, kombinovanou pH elektrodou a vzorkovacím zařízením. Po vytemperování suspenze na 35°C byl přidán roztok glukosy tak, aby výsledná koncentrace činila 200 mmol. l⁻¹. Po přidávku glukosy byly v určitých intervalech odebrány vzorky po 1 ml. Vzorky byly rychle ochlazeny a odstřeďovány při 8000 g po dobu 30 s. Supernatant byl použit pro stanovení glukosy, ethanolu a acetátu. Po dalším promytí byly buňky re-

suspendovány ve fyziologickém roztoku a bylo provedeno měření rychlosti respirace [1].

2.3 Analytické metody

Koncentrace glukosy byla stanovena pomocí glukoso-oxidázy a peroxidázy metodou popsanou *Bergmeyerem a Berntem* [2]. Ethanol a kyselina octová byly stanoveny metodou plynové chromatografie [3].

Koncentrace sušiny biomasy byla stanovena gravimetricky. Odebrané vzorky se odstředily a po dvojnásobném promytí v destilované vodě se sušily 1 h při 70°C a 2,5 h při 105°C.

2.4 Měření pH

Měření pH bylo prováděno pH-metrem typu PHA 5 (Vývojové dílny ČSAV, Praha). K registraci byl použit zapisovač typu TZ 21S (Laboratorní přístroje, Praha). Časové závislosti změny pH média byly použity k vyhodnocení celkového rozdílu mezi počáteční a konečnou hodnotou pH média, počáteční a maximální rychlosti acidifikace média. Postup a způsob vyhodnocování je uveden v předchozí práci [4].

Každý pokus hladovění byl třikrát opakován a uvedené výsledky jsou průměrnými hodnotami všech stanovení.

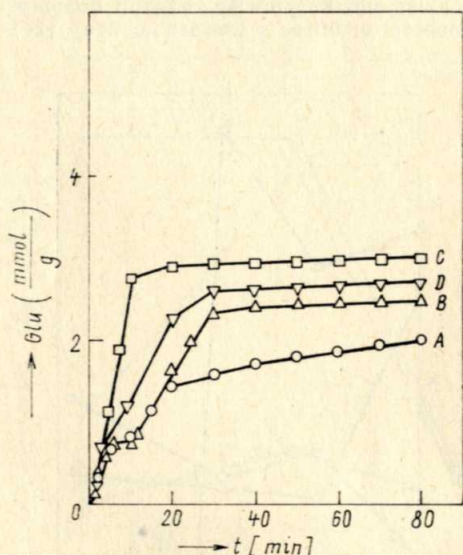
3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Metabolické změny probíhající v pekařském droždí byly testovány ve stejných intervalech jako v předchozí práci [1], kde byla sledována degradace glykogenu, změny v počtu buněk schopných tvořit kolonie a buněčná lýze. Měření byla prováděna: na počátku hladovění, ve 28. h, tj. ve fázi rychlého úbytku anaerobně degradovatelného glykogenu [5] a v 54. h, tj. po vyčerpání anaerobně degradovatelného glykogenu, kdy ztráta schopnosti buněk tvořit kolonie byla ještě velmi malá a v 96. h, tj. před úplným vyčerpáním glykogenu, kdy docházelo k velmi rychlé ztrátě schopnosti buněk tvořit kolonie a velmi rychlé lýzi buněk.

3.1 Charakteristika úbytku glukosy a produkce ethanolu a kyseliny octové

Na obr. 1 jsou uvedeny průběhy úbytku glukosy suspenzí kvasinek různě dlouhou dobu hladověných ve fyziologickém roztoku za aerobních podmínek. Ve všech sledovaných případech byl úbytek glukosy z média ihned

po jejím přidání velmi rychlý. U buněk hladověných 28 h se objevila po počátečním rychlém úbytku glukosy stagnace, trvající asi od 5. do 10. min po přidavku glukosy. Tato stagnace v úbytku glukosy z média je zřejmě výsledkem dosažení určité rovnovážné koncentrace glukosy v buňkách plynoucí z poměru rychlosti úbytku glukosy z média a rychlosti její disimilace v metabolických dráhách. Podobné chování bylo pozorováno již v předchozí práci [6]. Naopak buňky hladověné delší dobu vykazovaly stejnoměrný odběr glukosy z média — bez zmíněné stagnace. Na základě předpokladu, že glukosa vstupuje do buněk *Saccharomyces cerevisiae* usnadněnou difuzí (7–10) lze spojitý pokles koncentrace glukosy z média přičíst zvýšené rychlosti disimilace glukosy. Uvedené vysvětlení potvrzuje výsledek Watsona [11], že pro udržení určité rychlosti úbytku glukosy je potřeba v přítomnosti NaCl vyšší koncentrace glukosy v médiu. Během



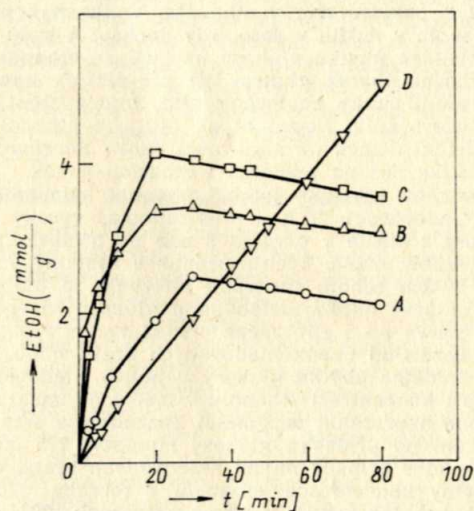
Obr. 1. Časový průběh úbytku glukosy po různé době hladovění buněk. (A) 0 h, (B) 28 h, (C) 54 h, (D) 96 h.

hladovění buněk ve fyziologickém roztoku docházelo také k lýzi buněk [1]. Jelikož přidavek glukosy k hladovějícím buňkám byl vždy konstantní (výsledná koncentrace činila $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) vzrůstala koncentrace glukosy vztažená na jednotkovou hmotnost buněk v průběhu hladovění. Nicméně ani zvýšená rychlost úbytku glukosy (obr. 4) plynoucí z její vyšší koncentrace nepřesáhla rychlost disimilace glukosy u buněk vystavených delšímu hladovění. Dalším důkazem vlivu NaCl na rychlost úbytku glukosy je porovnání těchto výsledků s výsledky publikovanými v předchozí studii [6]. Zatímco v médiu bez NaCl, bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost K^+ iontů, docházelo ke stagnaci v průběhu úbytku glukosy z média kolem 2. min po přidavku, v přítomnosti NaCl se tento interval prodloužil na 5. min.

Rychlý úbytek glukosy trvající prvních asi 20 až 30 min byl vystřídán úbytkem značně zpomaleným. Výsledky na obr. 1 ukazují, že s výjimkou buněk hladověných 96 h lze říci, že čím déle jsou buňky hladověny, tím většího úbytku glukosy z média vztaženého na jednotkovou hmotnost buněk lze dosáhnout. Naopak však celkové množství glukosy utištěvané buňkami klesá s rostoucí dobou hladovění.

Na obr. 2 jsou uvedeny časové průběhy tvorby ethanolu. Přidavek glukosy k aerobně hladověným buňkám vede k významné tvorbě ethanolu. S ohledem na množství přidávané glukosy ($200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) docházelo k tvorbě ethanolu v důsledku Crabtreeho efektu [12–14]. Čím déle byly buňky aerobně hladověny, tím menší množství ethanolu se objevilo v médiu, přestože naopak tvorba

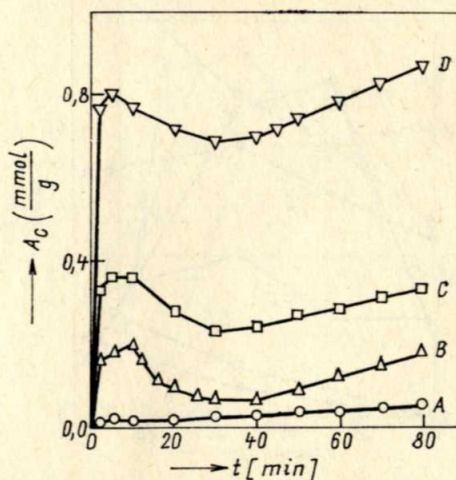
ethanolu vztažená na jednotkovou hmotnost buněk vzrůstala. Vysvětlení tohoto jevu zřejmě souvisí s růstem koncentrace glukosy na jednotkové množství buněk, ke kterému dochází v důsledku lýze buněk. Je třeba vzít



Obr. 2. Časový průběh tvorby ethanolu po přidavku glukosy po různé době hladovění buněk. (A) 0 h, (B) 28 h, (C) 54 h, (D) 96 h.

v úvahu i výraznější vliv glukosy na metabolismus buněk adaptovaných na proces aerobní respirace. Podobně zvýšená produkce ethanolu byla pozorována u rostoucích buněk v neustáleném (transientním) stavu jakožto odezva na zvýšenou koncentraci glukosy v přítoku živného média [15, 16].

Fáze rychlené tvorby ethanolu z přidávané glukosy končila po asi 20 až 30 min. Podle Polakise a Bartleye [17] je ukončení tvorby ethanolu podmíněno změnou poměru NADH/NAD^+ plynoucí z nedostatečné aktivity respiračního řetězce. Tento předpoklad potvrzují křivky tvorby acetátu (obr. 3). Lze očekávat i zvýšenou tvorbu glycerolu, zvláště v přítomnosti NaCl [11]. Maximální koncentrace glycerolu byla skutečně v médiu dosažena 30 min po přidání glukosy k buňkám hladověným aerobně 3 h [6], což je v soulase s body zlomu na křivkách tvorby ethanolu získaných s buňkami, které byly hladověny po dobu kratší než 96 h (obr. 2).



Obr. 3. Časový průběh tvorby acetátu po přidavku glukosy po různé době hladovění buněk. (A) 0 h, (B) 28 h, (C) 54 h, (D) 96 h.

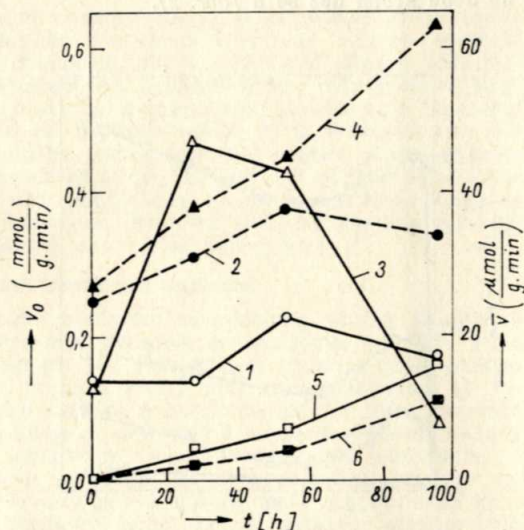
Dalším důvodem pro ukončení tvorby ethanolu by mohl být nedávno zjištěný inhibiční účinek ethanolu na transport glukosy do buněk [18]. Porovnáme-li doby, kdy došlo k bodu zlomu na křivkách úbytku glukosy (obr. 1) s body zlomu na křivkách tvorby ethanolu (obr. 2) je patrné, že k poklesu úbytku glukosy došlo dříve než k poklesu tvorby ethanolu. Velikosti koncentrace ethanolu v médiu v čase, kdy dochází k bodu zlomu na křivkách úbytku glukosy ukazují, že ethanol počiná inhibovat úbytek glukosy již při nižších koncentracích, jsou-li buňky hladověny déle. Toto zjištění souhlasí s pozorováním Dayea et al. [19], že ethanol má vyšší inhibiční účinek na nerostoucí buňky *Saccharomyces cerevisiae* než na populaci rostoucích buněk.

Zcela odlišná závislost tvorby ethanolu byla zjištěna u buněk hladověných 96 h. I přes relativně vysoký úbytek glukosy z média v prvních 5 min po přidavku byla tvorba ethanolu nízká. Rychlá produkce kyseliny octové (obr. 3) během tohoto časového intervalu je důkazem toho, že nejprve buňky metabolizují glukosu hlavně na acetát a teprve po 5 min začne převažovat tvorba ethanolu. Na rozdíl od buněk hladověných kratší dobu, projevila se inhibice úbytku glukosy u buněk hladověných 96 h již při koncentraci ethanolu v médiu 50 mmol. l⁻¹. Kromě toho nepřesáhla maximální koncentrace ethanolu v médiu ani po přidavku glukosy množství 125 mmol. l⁻¹, zatímco v případě buněk hladověných kratší dobu byly zjištěny koncentrace ethanolu v rozsahu 170 až 230 mmol. l⁻¹. Jak zjistili Maitra a Estabrook [20] je při nižších koncentracích ethanolu větší spotřeba kyslíku na oxidaci ethanolu na acetát. Výsledkem pak je velmi rychlá tvorba acetátu, ke které dochází ihned po zahájení disimilace glukosy. V průběhu této oxidace jsou H⁺ ionty vylučovány do média a naopak Na⁺ ionty vstupují z média do buněk [21]. To je příčinou, proč během prvních 5 min po přidavku glukosy dosáhne acidifikace média 85 % celkové hodnoty.

Vliv doby hladovění za aerobních podmínek se projevila zvýšením tvorby acetátu z přidané glukosy. Výsledky provedených experimentů bohužel nemohou dát prozatím odpověď, zda doba hladovění ovlivňuje vlastní tvorbu acetátu nebo zda se jedná o ztrátu schopnosti další disimilace acetátu buňkami [22, 23].

3.2 Vliv doby hladovění na rychlost úbytku glukosy a tvorbu produktu

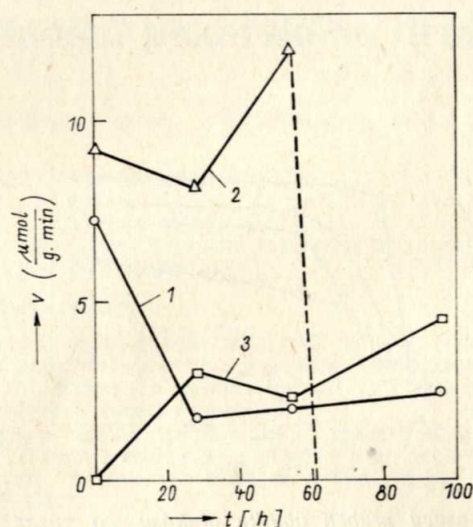
Na obr. 4 jsou uvedeny změny rychlostí úbytku glukosy a tvorby ethanolu a acetátu buňkami hladověnými různě dlouhou dobu. Počáteční rychlost úbytku glukosy (v_0) zůstane konstantní během prvních 28 h hladovění.



Obr. 4. Počáteční (prázdné symboly) a průměrné (plné symboly) rychlosti úbytku glukosy (1, 2), produkce ethanolu (3, 4) a acetátu (5, 6) po různé době hladovění.

vení. Počáteční rychlost tvorby ethanolu v tomto intervalu výrazně vzrostla. Počáteční rychlost úbytku glukosy vzrostla teprve během dalšího hladovění. Po 96 h hladovění poklesla počáteční rychlost tvorby ethanolu pod hodnotu zjištěnou na počátku hladovění. Také v případě úbytku glukosy došlo k určitému poklesu. Počáteční rychlosti tvorby acetátu trvale vzrůstaly s dobou hladovění.

Průměrné rychlosti (v) byly vypočteny ze všech hodnot intervalu měření trvajícího 80 min. Průběhy těchto rychlostí jsou odlišné od průběhů počátečních rychlostí. Rychlost úbytku glukosy vzrůstala s dobou hladovění buněk až do 50. h. Rychlost jak tvorby ethanolu, tak kyseliny octové trvale vzrůstala v průběhu hladovění. Z výsledků je dále patrné, že počáteční rychlosti jsou ve srovnání s hodnotami průměrných rychlostí jak pro úbytek substrátu, tak pro tvorbu produktů vyšší. S výjimkou tvorby ethanolu buňkami hladověnými 96 h lze říci, že s růstem doby hladovění roste i rozdíl mezi hodnotami v_0 a v . Rychlosti úbytku glukosy vykazují hodnoty, které jsou v dobrém souhlase s literárními údaji [24].



Obr. 5. Rychlosti úbytku glukosy (1), úbytku ethanolu (2) a produkce acetátu (3) vyhodnocené z intervalu od 40. do 80. min po přidavku glukosy po různé době hladovění.

Rychlost tvorby ethanolu z glukosy vztažená na 1 g buněčné sušiny vypočtená z intervalu prvních 10 min po přidavku glukosy byla porovnána s výsledky nedávno publikovanými Israelstamem [25]. K tomuto porovnání byl použit poměr

$$R = \frac{EtOH}{Glu}$$

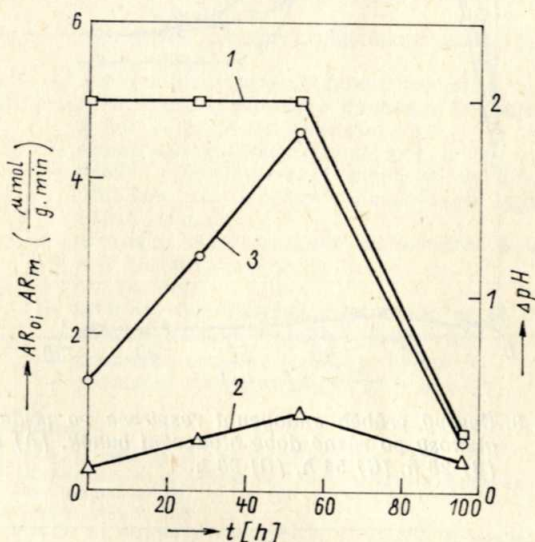
Zjištěná hodnota tohoto poměru byla téměř čtyřikrát menší než hodnota uvedená Israelstamem [25]. Příčina je pravděpodobně v odlišné rychlosti úbytku glukosy způsobené nepřítomností K⁺ a Mg²⁺ iontů [26, 27] a naopak přítomností Na⁺ iontů. Přítomnost či naopak nepřítomnost určitých iontů souvisí se zvýšenou tvorbou organických kyselin, které jsou spojeny s nezbytnou regulací poměru NAD⁺/NADH v buňkách [11]. Naopak vyšší koncentrace ethanolu zjištěné v této studii jsou důsledkem vyšší použité koncentrace glukosy [28–30].

Lineární části závislosti úbytku glukosy, úbytku ethanolu a tvorby acetátu zjištěné mezi 40. až 80. min po přidavku glukosy byly také použity k výpočtu rychlostí, aby se dosáhlo podrobnějšího vyhodnocení sledovaných dějů. V tomto časovém intervalu vykazovaly všechny sledované veličiny lineární průběh bez ohledu na délku hladovění buněk (obr. 1–3). Výsledky těchto rychlostí jsou uvedeny na obr. 5. Zjevný pokles rychlosti úbytku glukosy byl pozorován již po 28 h hladovění. Další hladovění však již tuto rychlost neovlivnilo. Rychlost

úbytku ethanolu vzrůstala od 54. h hladovění. Negativní hodnota získaná v 96. h hladovění je důkazem změny metabolismu glukosy plynoucí z trvalé tvorby ethanolu po přidavku glukosy. Naopak závislost rychlosti tvorby kyseliny octové na době hladovění, vypočtená tímto způsobem, má průběh podobný závislostem v_0 a $v = f(t)$ (obr. 4).

3.3 Rychlosti acidifikace média

Na obr. 6 jsou uvedeny změny extracelulární hodnoty pH a hodnoty počáteční a maximální rychlosti acidifikace média po přidavku glukosy k suspenzi buněk. Uvedené rychlosti acidifikace jsou měřítkem toku protonů z buněk do okolního média. Během prvních 54 h hladovění činila hodnota ΔpH dvě jednotky bez ohledu na vzrůst AR_0 a AR_m . Porovnáním těchto výsledků získaných při hladovění ve fyziologickém roztoku s výsledky z předchozí práce [6] je zřejmé, že přítomnost Na^+ iontů způsobuje nejen dosažení vyššího množství vylučovaných



Obr. 6. Změny extracelulární hodnoty pH (1), počáteční (2) a maximální (3) rychlosti acidifikace média v průběhu hladovění.

protonů (ΔpH bylo v destilované vodě 1,3 a v přítomnosti K^+ iontů 1,6), ale také mnohem rychlejší acidifikace média. V přítomnosti Na^+ iontů byla acidifikace ukončena do 20 min, v destilované vodě pak trvala 50 min a v přítomnosti K^+ iontů dokonce 65 min. Tyto výsledky potvrzují zjištění Norkranse a Kyliana [21] o účinku Na^+ iontů na acidifikaci média vyvolanou přidavkem glukosy.

Hodnoty AR_0 byly vypočteny z poklesu pH v průběhu první minuty po přidavku glukosy. Nižší hodnoty AR_0 ve srovnání s hodnotami AR_m jsou zřejmě způsobeny časovým zpožděním, které vyplývá z transportu glukosy na aktivní místa glykolytických enzymů lokalizovaných v cytosolu. Maximální rychlost acidifikace byla pozorována během prvních 10 min po přidavku glukosy. Tato hodnota je v dobré korelaci s časovou závislostí tvorby kyseliny octové na obr. 3. Konstantní hodnoty pH média, kterých se dosáhlo 20 min po přidavku glukosy ukazují, že neměnný poměr $(H^+_{in})/(H^+_{out})$ o který buňky usilují, může být dosažen a dále je pak udržován systémem, který reguluje tok protonů z buněk, což ovlivňuje extracelulární hodnotu pH. Kromě toho zde hraje roli i dereprese respiračních enzymů, jakmile koncentrace glukosy poklesne pod asi 50 mmol.l⁻¹ (postupná eliminace Crabtreeho efektu) [30].

Podobně jako tvorba kyseliny octové (obr. 4), také hodnoty AR_0 a AR_m vzrůstají s prodlužující se dobou hladovění. Odlišnost byla pozorována pouze u buněk hladověných 96 h, kdy rychlost acidifikace poklesla. Tato odlišnost stejně jako kvantitativně nižší rychlost AR_m

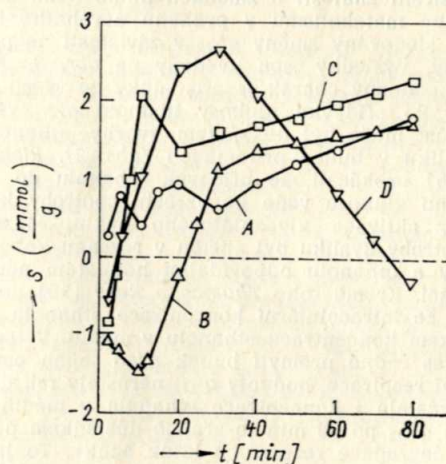
ve srovnání s rychlostmi tvorby kyseliny octové uvedené v obr. 4 jsou zřejmě důsledkem poklesu výměny $Na^+ - H^+$ iontů přes plasmatickou membránu [31]. Změny vlastností membrány vyvolané vzrůstající koncentrací ethanolu [18, 32] mohou ovlivnit schopnost buněk regulovat extracelulární hodnotu pH. V této souvislosti je vhodné uvést nedávno publikovanou hypotézu [33], že některé protony přenesené přes cytoplasmatickou membránu se mohou hromadit v blízkém okolí buněk a způsobit zde vyšší (nerovnovážnou) koncentraci protonů ve srovnání s koncentrací v ostatním kapalném médiu — energizovaný stav membrány, jak uvádí Hamilton [34].

3.4 Hmotová bilance konverze glukosy

Pro lepší ilustraci odezvy metabolismu hladovějících buněk na přidavek glukosy byla vyhodnocena též hmotová bilance za předpokladu, že glukosa je přeměňována pouze na ethanol, kyselinu octovou, vodu a oxid uhlíčitý. Hodnota S vynesená na obr. 7 charakterizuje molární množství triosy vytvořené z disimilované glukosy, která nebyla konvertována na ethanol, resp. na acetylát.

Na počátku hladovění, kdy rezervní polysacharidy nejsou ještě štěpeny, je přidávaná glukosa disimilována převážně na ethanol (obr. 2 a 3). Během prvních 5 min po přidání glukosy je úbytek glukosy buňkami vyšší než odpovídá množství vytvořeného ethanolu a acetylátu. Pokles hodnoty S mezi 5. a 10. min vyplývá ze stagnace úbytku glukosy (obr. 1) a je výrazný proto, že rychlost tvorby ethanolu zůstává v tomto časovém intervalu konstantní (obr. 2). Další pokles hodnoty S po 20 min je důsledkem inhibice úbytku glukosy (obr. 1). Po 30 min hodnoty S trvale rostou, což vyplývá ze zastavení tvorby ethanolu a malé tvorby kyseliny octové.

Rezervní polysacharidy v buňkách jsou v průběhu aerobního hladovění degradovány těmi katabolickými cestami, které dovolují dosáhnout maximální účinnosti uvolňování energie. Jelikož pekařské droždí je dopravováno ve formě lisovaných liberek, kde převažují anaerobní podmínky, je třeba určitého časového intervalu pro adaptaci buněk na proces aerobní respirace. Tuto adaptaci vyžadující energii dokazuje pokles v obsahu glykogenu a trehalosy prezentovaný v předchozí studii [1]. Negativní hodnoty S zjištěné u vyhladovělých buněk během prvních 20 min po přidavku glukosy jsou dokladem toho, že ethanol a acetylát vznikají nejen z přidávané glukosy, nýbrž také degradací rezervních polysacharidů v důsledku represe respiračních enzymů [35]. Negativní hodnota S je také důkazem toho, že i přes vysokou rychlost úbytku glukosy využívané k tvorbě energie, potřebují buňky určitou dobu na zastavení, resp. snížení rychlosti degradace vlastních rezervních látek. Délka tohoto intervalu je zřejmě závislá na ener-



Obr. 7. Množství triosy vytvořené z disimilované glukosy, která nebyla přeměněna na ethanol nebo acetylát po různé době hladovění buněk. (A) 0 h, (B) 28 h, (C) 54 h, (D) 96 h.

getickém stavu buněk [36], na koncentraci přidané glukosy a na množství vytvořeného ethanolu. Grba et al. [37] zjistili, že přidavek glukosy o velikosti 110 mmol. l^{-1} k suspenzi nerostoucích buněk vede k výraznému vzrůstu intracelulárního množství ATP po dobu asi 20 min po přidání glukosy. Podobné chování zjistili i Ball a Atkinson [38], Chapman et al. [39], Leps a Ensign [40]. Čím déle byly buňky hladověny, tím méně negativní hodnoty S vyplývaly z hmotové bilance. Vysvětlení této skutečnosti plyne ze zvýšené rychlosti úbytku glukosy a z dřívějšího zpomalování degradace rezervních látek [41].

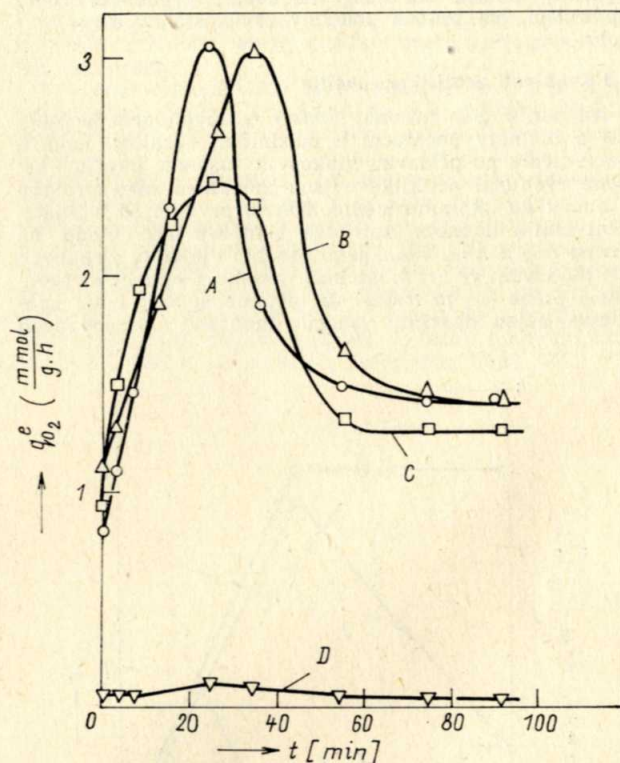
Body zlomu na S -křivkách pozorované u různě dlouho hladověných buněk jsou v dobré korelaci s body zlomu na křivkách úbytku glukosy (obr. 1) a tvorby ethanolu (obr. 2). Rostoucí trend asi od 30. min po přidavku glukosy vykazovaly S -křivky u čerstvého droždí i u buněk hladověných 28 h a 54 h. Pro vysvětlení tohoto chování je nezbytné vzít v úvahu i úbytek ethanolu, ke kterému v tomto intervalu dochází. Jak prokázali Rickard a Hogan [42], ani přítomnost v médiu nezabránila inhibici procesu aerobní respirace, která byla způsobena vysokou koncentrací glukosy. Je zajímavé, že podle těchto autorů byla při koncentraci glukosy 104 mmol. l^{-1} inhibice respirace kolem 20 %. Pokles koncentrace ethanolu po 30. min po přidavku glukosy (obr. 2) je tedy dokladem toho, že při nižších koncentracích glukosy v médiu (pod 50 mmol. l^{-1}) jsou buňky schopny oxidovat přítomný ethanol. Kvantitativní porovnání spotřeby ethanolu (obr. 2) s tvorbou kyseliny octové (obr. 3) spolu s výše zmíněnou konstantní hodnotou pH média dokazuje, že ethanol je hlavním dílem buňkami za těchto podmínek totálně disimilován na H_2O a CO_2 . Menší množství degradované glukosy asi po 30. min dovolují předpokládat, že na rozdíl od výsledků Grby et al. [37] ztrácí hladověné buňky postupně schopnost vytvářet si rezervní polysacharidy z přidané glukosy. Jedná se zřejmě o již zmíněnou represí glukosou. Tento předpoklad je v souladu s výsledky Haarasiltty a Oury [43] a Maitry a Lobo [44] a potvrzuje jej i celkový vzrůst hodnot S -křivek v buňkách hladověných po dobu kratší než 96 h. S -křivka získaná s buňkami hladověnými po dobu 96 h má zcela odlišný průběh. Tyto buňky jsou ve srovnání s buňkami hladověnými kratší dobu již zcela fyziologicky odlišné, jak je patrné z akumulace finálních metabolických produktů (obr. 2 a 3). Pokles hodnot S po 30 min lze vysvětlit inhibicí transportu glukosy do buněk v důsledku zvýšené citlivosti na ethanol. Negativní hodnoty S , zjištěné 80 min po přidavku glukosy, jsou zřejmě důsledkem zrychleného odumírání buněk vyvolaného přidavkem zdroje energie. Tento jev popsal u bakterií Strange [45].

3.5 Změny v endogenní respiraci

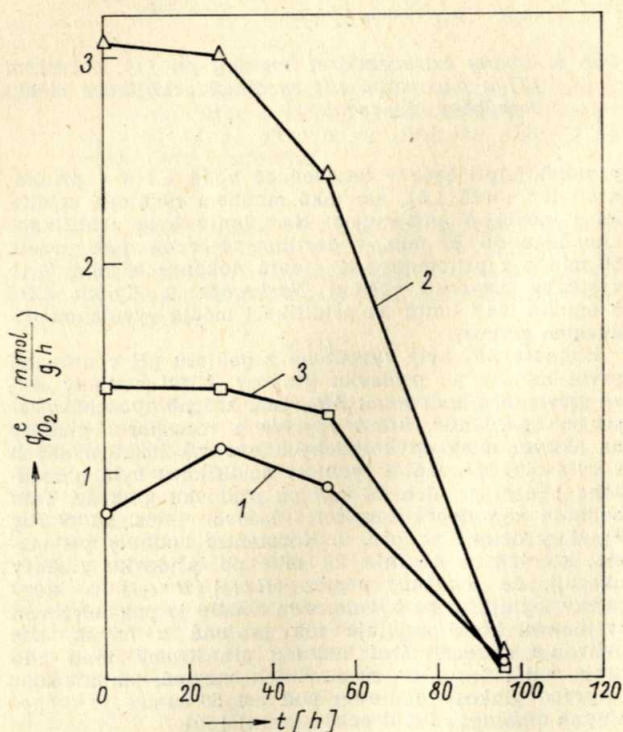
Pro rozšíření znalostí o změnách katabolické aktivity endogenního metabolismu v průběhu aerobního hladovění, byly sledovány změny $q_{O_2}^e$ v závislosti na přidavku glukosy. Výsledky jsou uvedeny na obr. 8. Křivky $q_{O_2}^e$ mají podobný charakter pro buňky ze všech stadií hladovění. Po přidavku glukosy hodnota $q_{O_2}^e$ vzrůstá. Tento vzrůst může být důsledkem tvorby ethanolu ze zdrojů uhlíku v buňce přítomných (obr. 2). Rickard a Hogan [46] prokázali, že přidavek ethanolu do média obsahujícího glukosu vede ke vzrůstu spotřeby kyslíku plynoucí z aktivace glyoxalátového cyklu. Maximální vzrůst spotřeby kyslíku byl zjištěn v rozsahu koncentrací glukosy a ethanolu odpovídající hodnotám použitým v této práci. Kromě toho Thomas a Rose [18] nedávno prokázali, že intracelulární koncentrace ethanolu je asi pětinašobkem koncentrace ethanolu v médiu. V tom případě i přes řádné promytí buněk před jejich použitím pro měření respirace, hodnoty $q_{O_2}^e$ narůstaly tak dlouho, dokud vzrůstala i koncentrace ethanolu v médiu (obr. 2). Pokles $q_{O_2}^e$ po 30 min je zřejmě důsledkem poklesu rychlosti degradace rezervních látek buňky. To je podmiňováno zvýšením energetického potenciálu v buňkách plynoucím z procesu disimilace glukosy. Uvedené výsledky potvrzují hodnoty získané přímým měřením změn intracelulární hladiny ATP [37].

Kromě účinku hladovění na změny $q_{O_2}^e$ je též třeba

brát v úvahu účinek doby expozice buněk na přidanou glukosu. Oba zmíněné efekty ovlivňují výšku píku, jejich časovou polohu i výslednou hodnotu $q_{O_2}^e$. Změny



Obr. 8. Časový průběh endogenní respirace po přidavku glukosy po různé době hladovění buněk. (A) 0 h, (B) 28 h, (C) 54 h, (D) 96 h.



Obr. 9. Změny endogenní respirace v průběhu hladovění. (1) před přidavkem glukosy, (2) maximální hodnota po přidavku glukosy, (3) konečná hodnota po ukončení spotřeby glukosy.

těchto parametrů jsou uvedeny na obr. 9 v závislosti na době hladovění. Po startu hladovění za aerobních podmínek adaptují buňky své respirační enzymy, což se projeví vzrůstem q^{eO_2} . Poloha píků na časové ose odpovídá době, kdy se v médiu dosahuje maximální koncentrace ethanolu. S růstem doby hladovění výška píků q^{eO_2} klesá. Může to být způsobeno ztrátou schopnosti transportu glukosy do buněk. Podobně závislost hodnot píků (maximálních hodnot) i konečných hodnot q^{eO_2} klesá s prodlužující se dobou hladovění. Nízké hodnoty q^{eO_2} po 96 h hladovění jsou pak důkazem jak nízké katabolické aktivity degradace rezervních látek procesem aerobní respirace, tak i výrazně snížené schopnosti buněk utilizovat přidanou glukosu s cílem získání energie pro účely sebezáchovy.

Použité symboly

Ac	— koncentrace kyseliny octové v médiu (mmol. g^{-1})
AR_0	— počáteční rychlost acidifikace média (μ mol. $g^{-1} \cdot min^{-1}$)
AR_m	— maximální rychlost acidifikace média (μ mol. $g^{-1} \cdot min^{-1}$)
Glu	— koncentrace glukosy v médiu (mmol. g^{-1})
ΔpH	— rozdíl mezi počáteční a konečnou hodnotou pH média po přidávku glukosy (—)
q^{eO_2}	— endogenní respirace (mmol. $g^{-1} \cdot h^{-1}$)
R	— poměr charakterizující množství vytvářeného ethanolu na množství disimilované glukosy (mmol. mmol $^{-1}$)
S	— množství triosy vztažené na jednotkové množství buněk (mmol. g^{-1})
t	— čas (h; min)
v	— rychlost vyhodnocená z intervalu od 40. do 80. min po přidávku glukosy (μ mol. $g^{-1} \cdot min^{-1}$)
\bar{v}	— průměrná rychlost (μ mol. $g^{-1} \cdot min^{-1}$)
v_0	— počáteční rychlost (mmol. $g^{-1} \cdot min^{-1}$)

Literatura

- [1] PÁČA, J.: Kvas. prům. 29, č. 2, 1983, s. 32
- [2] BERGMAYER, H. U., BERNT, E.: Methods of Enzymatic Analysis, (Ed. Bergmayer, H. U.). 2. edition, Vol. 3, Weinheim: Verlag Chemie, 1974, s. 1205
- [3] UNGER, P., VONÁKOVÁ, Z., PÁČA, J.: Journal of Applied Chemistry and Biotechnology, 27, 1977, s. 150
- [4] SIGLER, K., KNOTKOVÁ, A., KOTYK, A.: Folia Microbiologica 23, 1978, s. 409
- [5] EATON, N. R.: Annals of the New York Academy of Sciences 102, 1963, s. 678
- [6] SIGLER, K., KNOTKOVÁ, A., PÁČA, J., WURST, M.: Folia Microbiologica 25, 1980, s. 311
- [7] CIRILLO, V. P.: Journal of Bacteriology 95, 1968, s. 603
- [8] KOTYK, A.: Folia Microbiologica 12, 1967, s. 121
- [9] KOTYK, A., MICHALJANIČOVÁ, D.: Folia Microbiologica 13, 1968, s. 212
- [10] KOTYK, A., MICHALJANIČOVÁ, D.: Biochemica et Biophysica Acta 332, 1974, s. 104
- [11] WATSON, T. G.: Journal of General Microbiology 64, 1970, s. 91
- [12] DE DEKEN, R. H.: Journal of General Microbiology 44, 1966, s. 149
- [13] POLAKIS, E. S., BARTLEY, W., MEEK, G. A.: Biochemical Journal 97, 1995, s. 298
- [14] SLONIMSKI, P. P.: Proceedings of the 3rd International Congress of Biochemistry, 1956, s. 242
- [15] REGAN, D. L., ROPER, G. H., MOSS, F. J.: Biotechnol. Bioeng. 13, 1971, s. 815
- [16] WELLES, J. B., BLANCHE, H. V.: Biotechnol. Bioeng. 18, 1976, s. 129
- [17] POLAKIS, E. S., BARTLEY, W.: Biochemical Journal 97, 1965, s. 284
- [18] THOMAS, D. S., ROSE, A. H.: Archives of Microbiology 122, 1979, s. 49
- [19] DAY, A., ANDERSON, E., MARTIN, P. A.: Proceedings of the European Brewery Convention Congress, 1975, s. 377
- [20] MAITRA, P. K., ESTABROOK, R. W.: Archives of Biochemistry and Biophysics 121, 1967, s. 117
- [21] NORKRANS, B., KYLIN, A.: Journal of Bacteriology 100, 1969, s. 836
- [22] BROWN, C. S., KLINE, E. L., UMBARGER, H. E.: Isoenzymes (ed. Markert, C. L.), Academic Press New York 2, 1974, s. 249
- [23] KLEIN, H. P., JAHNKE, L.: Journal of Bacteriology 137, 1979, s. 179
- [24] BARNETT, J. A., SIMS, A. P.: Archives of Microbiology 111, 1976, s. 185
- [25] ISRAELSTAM, G. T.: Folia Microbiologica 24, 1979, s. 449
- [26] PENA, A.: Archives of Biochemistry and Biophysics 187, 1975, s. 397

- [27] RINK, H.: Proceedings of the IVth International Symposium on Yeast, Vienna 1, 1975, s. 33
- [28] BROWN, C. M., JOHNSON, B.: Journal of General Microbiology 64, 1970, s. 279
- [29] OURA, E.: Biotechnol. Bioeng. 16, 1974, s. 1197
- [30] RÖHR, M., WÖHRER, W.: Proceedings of the 1st European Congress on Biotechnology, Interlaken 1978
- [31] ARMSTRONG, W. McH., ROTHSTEIN, A.: Journal of General Physiology 48, 1964, s. 61
- [32] SUOMALAINEN, H., NURMINEN, T.: Journal of the Institute of Brewing 82, 1976, s. 218
- [33] GOULD, J. M.: Journal of Bacteriology 138, 1979, s. 176
- [34] RÖHR, M., WÖHRER, W.: Microbial Energetics (eds. Haddock, B. A., Hamilton, W. A.), London Cambridge University Press 1977, s. 185
- [35] LLOYDS, D.: The Mitochondria of Microorganisms academic Press New York 1974, s. 39
- [36] KNOWLES, C. J.: Microbial Energetics (eds. Haddock, B. A., Hamilton, W. A.), London: Cambridge University Press 1977, s. 241
- [37] GRBA, S., OURA, E., SUOMALAINEN, H.: European Journal of Applied Microbiology 2, 1975, s. 29
- [38] BALL, W. J., ATKINSON, D. E.: Journal of Bacteriology 121, 1975, s. 975
- [39] CHAPMAN, A. G., FALL, L., ATKINSON, D. E.: Journal of Bacteriology 108, 1971, s. 1072
- [40] LEPS, W. T., ENSIGN, J. C.: Archives of Microbiology 122, 1979, s. 69
- [41] DAWES, E. A.: Survival of Vegetative Microbes (eds. Gray, T. R., Postgate, J. R.) Society of General Microbiology Symposium, London: Cambridge University Press 26, 1976, s. 19
- [42] RICKARD, P. A. D., HOGAN, G. B. J.: Biotechnol. Bioeng. 20, 1978, s. 1111
- [43] HAARASILTA, S., OURA, E.: European Journal of Biochemistry 52, 1975, s. 1
- [44] MAITRA, P. K., LOBO, Z.: Archives of Biochemistry and Biophysics 185, 1978, s. 535
- [45] STRANGE, R. E.: Microbial Response to Mild Stress, Durham: Meadowfield Press Ltd., 1976, s. 23
- [46] RICKARD, P. A. D., HOGAN, G. B. J.: Biotechnol. Bioeng. 20, 1978, s. 1105

Páča, J.: Změny metabolismu glukosy při hladovění pekařského droždí. Kvas. prům. 31, 1985, č. 10, s. 236—242.

Byly sledovány změny v rychlosti úbytku glukosy a tvorby ethanolu a acetátu, acidifikace média vyvolané přidáním glukosy a endogenní respirace v průběhu aerobního hladovění pekařského droždí. Uvedená měření byla prováděna s čerstvým lisovaným expedičním droždím a dále s populací buněk aerobně hladověných 28, 54 a 96 h ve fyziologickém roztoku při teplotě 35 °C. S výjimkou hladovění po dobu 96 h většina sledovaných parametrů vykazovala vzrůst hodnoty s rostoucí dobou hladovění. Přechodný vzrůst hodnoty endogenní respirace pozorovaný po přidávku glukosy s dobou hladovění klesal. U populace buněk hladověných 96 h byla zjištěna změna kinetiky tvorby ethanolu, prudký vzrůst tvorby kyseliny octové a naopak výrazná redukce rychlosti acidifikace média i endogenního metabolismu.

Паца, Я.: Изменения метаболизма глюкозы при проголождении хлебопекарных дрожжей. Квас. прум. 31, 1985, № 10, стр. 236—242.

Исследовались изменения скорости убытка глюкозы и образования этанола и ацетата, ацидификации среды, вызванной добавкой глюкозы и эндогенной респирации в течение аэробного проголодания хлебопекарных дрожжей. Приведенные измерения проводились с свежими прессованными дрожжами и далее с набором клеток после аэробного проголодания 28, 54 и 96 ч в физиологическом растворе при температуре 35 °C. За исключением времени проголодания 96 ч большинство параметров показывало повышение величины с растущим временем проголодания. Переходный рост величины эндогенной респирации, наблюдающийся после добавки глюкозы с временем проголодания падал. В случае клеток, голодающих в течение 96 ч было установлено изменение кинетики образования этанола, резкий рост возникновения уксусной кислоты и, наоборот, выражительное уменьшение скорости ацидификации среды и эндогенного метаболизма.

Páča, J.: Changes of Glucose Metabolism During Starvation of Baker's Yeast. Kvas. prům. 31, 1985, No. 10, pp. 236—242.

The kinetics and extent of glucose uptake, ethanol and acetate production, glucose-induced medium acidifi-

fication and endogenous respiration were studied in baker's yeast starved aerobically for 0, 28, 54 and 96 h in salt solution (9 g per litre NaCl) at 35 °C. Except for the last interval, prolonged starvation brought about an overall increase in most parameters. The transient increase in endogenous respiration observed after glucose addition was lowered with proceeding starvation. A 96 h starvation brought about a change in the kinetics of ethanol production, sharp increase in acetate production and a strong reduction of both the extent and the rate of glucose-induced acidification and of endogenous metabolism.

Páca, J.: Änderungen des Glukosemetabolismus bei dem Hungern der Backhefe. Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 10, S. 236—242.

Es wurden die Änderungen in der Geschwindigkeit der Glukoseabnahme und Äthanol- und Azetatbildung

verfolgt, sowie auch die Azidifikation des Mediums, die durch Glukosezugabe hervorgerufen wurde und weiter die endogene Respiration im Verlauf der aeroben Hungern von Backhefe. Die erwähnten Messungen wurden mit frischer gepreßter Expeditionshefe durchgeführt und weiter mit Population von Zellen, die 28, 54 und 96 Stunden in physiologischer Lösung bei der Temperatur von 35 °C aerob hungerten. Mit Ausnahme der 96 stündiger Hungern wies die Mehrzahl der verfolgten Parameter mit Verlängerung der Hungernsdauer einen Wertanstieg auf. Der vorübergehende Anstieg der Werte der endogenen Respiration, der nach der Glukosezugabe beobachtet wurde, nahm mit der Dauer der Hungern ab. Bei der Zellenpopulation, die 96 Stunden hungerte, wurde eine Veränderung der Kinetik der Äthanolbildung, ein steiler Anstieg der Essigsäurebildung und eine markante Reduktion der Azidifikationsgeschwindigkeit des Mediums sowie auch des endogenen Metabolismus festgestellt.