

U N I V E R Z I T E T U N O V O M S A D U
TEHNOLOŠKI FAKULTET

D O K T O R S K A D I S E R T A C I J A

PROMENE KOJE NASTAJU U ČELIJAMA KVASCA SACCHAROMYCES
CEREVISIAE KADA SE UZGAJA NA RAZLIČITIM KONCENTRACI-
JAMA ETANOLA KAO JEDINOZ IZVORA UGLJENIKA I UTICAJ
ACETONA NA TAJ METABOLIZAM

Mr. DUŠANKA J. BABIN-PEJIN

NOVI SAD, septembar, 1974.

Eksperimentalni deo ove disertacije radjen je na Tehnološkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu.

Smatram za svoju prijatnu dužnost da se na ovom mestu najsrdačnije zahvalim Prof. Dipl. Ing. habil. VOJISLAVU KRAJOVANU, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, za iscrpnu i svesrdnu pomoć u postavljanju problematike, vodjenju eksperimentalnog dela i korisne savete koje mi je dao u toku izrade ove disertacije.

Za svesrdnu pomoć i usmeravanju obrade podataka duboko se zahvaljujem Dr. Dipl. Ing. IVKI KALAČEVIĆ-KRAJOVAN, prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Za tehničku pomoć u toku izrade eksperimentalnog dela rada zahvaljujem se JOVANKI RAKIĆ, laborantu na predmetu Tehnologija špirita i kvasca, na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu

Ovu disertaciju delimično je finansirala Pokrajinska zajednica za naučni rad SAP Vojvodine, pa se na ovom mestu želim zahvaliti na pruženoj materijalnoj pomoći.

S A D R Ź A J

	Strana
U V O D	1
I RAZMATRANJE LITERATURNIH PODATAKA	1
II MEHANIZAM RASTA KVASCA <u>SACHAROMYCES CEREVISIAE</u> NA ETANOLU	3
III PUTEVI KOJIMA NASTAJU SASTAVNI DELOVI ĆELIJA KVASCA <u>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</u> IZ ETANOLA	23
1. Energetske potrebe mikroorganizama	23
2. Energetske potrebe ćelija kvasca	26
3. Opšti principi	
4. Upotrebljene skraćenice	31
5. Reakcije od etanola - supstrata do prekursora	31
6. Nastajanje polisaharida o-d etanola	33
7. Formiranje proteina iz etanola kao supstrata	34
8. Energija potrebna za održanje	38
9. Energija potrebna za druge svrhe	38
IV ZAVISNOST ENERGETSKIH POTREBA MIKROBNIH ĆELIJA OD IZVORA UGLJENIKA	38
V ZAVISNOST AKTIVNOSTI ENZIMA KVASCA OD USLOVA RASTA	42
1. Efekat glukoze na aktivnost enzima kvasca	42
2. Efekat kiseonika na aktivnost enzima kvasca	48

	strana
POSTAVKA ZADATKA	55
MATERIJAL I METODE	
RADA	58
A. Radni mikroorganizam	58
- Dobijanje matičnog kvasca	58
B. Hranljiva podloga	58
- Uslovi kultivacije	62
C. Analitičke metode	62
- Glukoza i etanol	62
- Metabolička aktivnost	63
- Sadržaj citohroma	63
- Odredjivanje suve materije	64
- Odredjivanje <u>enzimskih</u> aktivnosti	65
- Odredjivanje rastvorljivog kiseonika u progeneratoru	65
- Izračunavanje Y_{ATP}	67
REZULTATI I DISKUSIJA	
POSTIGNutih REZULTATA	68
ZAKLJUČCI	170
LITERATURA	172

U V O D I R A Z M A T R A N J E
L I T E R A T U R N I H P O D A T A K A

U V O D

I RAZMATRANJE LITERATURNIH PODATAKA

Kvasci medju koje spada vrsta Saccharomyces cerevisiae su miksotrofni mikroorganizmi koji mogu da koriste šećere i čitav niz drugih organskih jedinjenja kao izvor energije i ugljenika. Odavno je poznato da Saccharomyces cerevisiae ima sposobnost da asimiluje jedinjenja sa dva ugljenikova atoma i da ih koriste u svom metabolizmu kao izvor energije i ugljenika. Medju ova jedinjenja sa dva ugljenikova atoma spadaju: acetat, acetaldehid, etanol, glicin, glioksilna kiselina i glikolna kiselina (LINDNER i CZISER, 1912 ; PERPIER, 1910).

U toku aerobnog rasta na glukozu SWANSON i CLIFTON (1948) su pokazali da kada je podloga sadržala 10 g po litru glukoze dolazi do stvaranja etanola. Ovo je podstaklo mnoge istraživače da ispituju rast kvasca Saccharomyces cerevisiae na glukozu pod aerobnim uslovima. MONOD (1942) je dokazao da rast kvasca Saccharomyces cerevisiae u aerisanoj glukoznoj podlozi treba posmatrati kao glukozno - etanolni dioksi-rast. U toku ovoga rasta glukoza se najpre metabolizira preko EMP puta do etanola i ta faza se naziva prva faza eksponencijalnog rasta. Za vreme ove "fermentativne" faze rasta, ćelije kvasca imaju veliku brzinu rasta koja ukazuje na veliku proizvodnju energije. Tako su MAXON i JOHNSON (1953) objavili podatke o generacionom vremenu od 1,7 časova, dok su BECK i VON MEYENBURG (1963) objavili rezultate za brzinu rasta od $0,42 \text{ h}^{-1}$ što odgovara vrednosti od 1,6 časova za vreme udvostručavanja. Druga faza rasta na glukoznoj podlozi počinje kada je glukoza u hranljivoj podlozi potpuno utrošena. Ova faza je odvojena od prve "fermentativne" faze jednom prilično uočljivom "lag" fazom. U toku ove druge faze, brzina rasta ćelija je manja nego u prvoj fazi rasta. MAXON i JOHNSON (1953) su dali rezultate o generacionom vremenu za vreme ove faze od 8,5 časova, a BECK i VON MEYENBURG (1968) su pronašli kraće vreme u svojim kulturama, koje iznosi oko 5 časova. U industrijskoj proizvodnji pekarskog



kvasca, pri intenzivnom stvaranju etanola, generaciono vreme iznosi 3 - 4 časa, dok u podlogama u kojima nije bilo etanola ovo vreme iznosi 5 - 6 časova (BUTSCHEK i KAUTZMAN, 1962).

Ovi izneti podaci jasno ističu da se u toku rasta kvasca Saccharomyces cerevisiae na glukoznoj podlozi uvek stvara odredjena količina etanola. Rast kvasca je potpuno aeroban, nema stvaranja etanola, ako je koncentracija glukoze u podlozi 15 - 20 mg/l (LEUEMBERGER, 1972). Postavlja se pitanje, ako je etanol prisutan u toku rasta kvasca Saccharomyces cerevisiae, kako će njegova koncentracija uticati na ćeliju koja ga je stvorila, u prisustvu glukoze, koju nije mogla da celokupnu iskoristi za stvaranje biomase. Ovo pitanje staro je koliko i proizvodnja kvasca.

U klasičnim udžbenicima proizvodnje pekarskog kvasca iz melase propisuje se da se matični kvasac proizvodi tako, da koncentracija stvorenog etanola ne bude veća od 3,0 vol.% (MEREKER - DELBRÜCK (1908); FOTH (1929) MACHER (1936). Ta koncentracija se smatrala graničnom za dalje umnožavanje kvasca i još je i danas postulat u klasičnoj industrijskoj proizvodnji, gde se koristi kao radni mikroorganizam Saccharomyces cerevisiae.

KONOVALOV (1962) je izvršio oglede kontinualne fermentacije pomoću kvasca Saccharomyces cerevisiae i pokazao da se ovaj radni mikroorganizam razmnožava i kod koncentracije etanola od 7,0 vol. %. On je dalje pokazao da brzina razmnožavanja kvasca ne zavisi od koncentracije etanola nego od brzine dovoda komine.

U tehnologiji proizvodnje pekarskog kvasca postoji postupak po DE-LOFRE-u (1962). Ovaj postupak se sastoji iz dva dela. U prvom delu matični kvasac, usled neznatne aeracije, stvara velike količine etanola koji se u stadijumu dobijanja prodajnog kvasca asimiluje pomoću kvasnih ćelija zajedno sa šećerom iz melase.

Iako se znalo da kvasac može da asimiluje etanol i da ga uključuje u svoje metaboličke puteve, dugo nije bio poznat mehanizam koji omogućuje izgradnju ćelijskih jedinjenja iz etanola. Medju prvima to su pokušali da objasne WIELAND i THUNBERG (1920) pretpostavljajući da postoji mogućnost sinteze ćilibarne kiseline

direktnim dehidrogenacionim kuplovanjem dva molekula sirćetne kiseline.

Medjutim, diskusije o postojanju ovoga najjednostavnijeg mehanizma sinteze ni do danas nisu okončane. U prilog postojanja ovog mehanizma idu ogleđi koje su izveli SEAMAN i DELNASCHKE (1955). Njima je pošlo za rukom da ekstraktima "Tetrahymena pyroformis" izvedu reverzibilnu sintezu ćilibarne kiseline iz dva molekula acetyl-CoA. Napredak enzimologije je dokazao da za najveći deo biohemije ne egzistira reakcija direktnog spajanja dva molekula sirćetne kiseline koja dovodi do stvaranja nekog od ćlanova ciklusa trikarbonskih kiselina, a prema tome, i do sinteze belanćevina i ugljenih hidrata u ćelijama mikroorganizama.

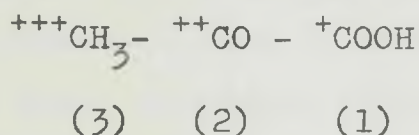
II MEHANIZAM RASTA KVASCA SACCHAROMYCES CEREVISIAE NA ETANOLU

KORNBERG i KREBS (1957) su dokazali da postoji modifikovani put ciklusa limunske kiseline tzv. glioksilatni put. Ovim otkrićem dat je dokaz da se acetat ugradjuje, ne samo kao acetyl CoA pomoću "kondenzacionih enzima" u ciklus limunske kiseline, nego da postoji mehanizam koji omogućava sintezu supstanci koje ulaze u sastav ćelijskog materijala. Postojanje glioksilatnog ciklusa (koji je u krajnjem bilansu odgovara postulatu WIELAND-a i THUBERGA) dokazano je najpre izolovanjem oba enzima: izocitrat lijaze i malat sintetaze kod radova Pseudomonas-sp., E. coli i Penicillium-sp. Radovima koje su objavili OLSON (1959); DARON i GUNSALUS (1962) i DIXON i KORNBERG (1962) dokazano je da glioksilatni put postoji i u kvasnim ćelijama.

Problemom iskorišćenja etanola u naućnom smislu bavili su se DONTCHHEFF i sar. (1958). Njihova istraživanja su pokazala da se etanol, kada stoji na raspolaganju kvasnim ćelijama kao jedini izvor ugljenika u minimalnim koncentracijama, troši bez ostatka na dišanje, dok se kod većih koncentracija oksidiše nepotpuno. Oni su smatrali da ovaj supstrat služi samo kao energetska supstanca, a ne i kao izvor ugljenika za ćelijski sastav.

MILHARD i AUBERG (1955) su proućavali mehanizam asimilacije etanola upotrebom markiranog etanola sa - ^{14}C . Rezultati

koje su dobili, pokazali su da se metaboliziranjem markiranog etanola dobijaju najpre intermedijeri ciklusa limunske kiseline. Smatrali su da je za razjašnjenje sinteze ćelijskog sadržaja potrebno postojanje potpune reverzije Embden-Meyerhofovog puta, to jest postojanje karboksilacije acetaldehida u jedinjenje sa tri ugljenikova atoma tj. pirogroždjanu kiselinu. Dalje su, ispitivanjem vremenske zavisnosti prenošenja radioaktiviteta, dokazali da se nakon stvaranja intermedijera ciklusa limunske kiseline stvaraju amino kiseline. Nakon isteka jednog do dva časa, pojavila se radioaktivnost i na pojedinim članovima Embden-Meyerhor-ovog puta sve do rezervne materije trehaloze. Autori su, dalje, utvrdili raspored aktivnosti na karakterističnim članovima metabolizma kvasca: trehalozi, pirogroždjanjoj kiselinu i proizvodima koji se iz nje dobijaju, na primer na alaninu. Što se tiče rasporeda aktivnosti, došli su do zaključka da je za pirogroždjanu kiselinu ta aktivnost sledeća:



Znak "+" treba slikovito da prikaže intenzitet radioaktivnosti na datom ugljenikovom atomu. Ova raspodela aktivnosti objašnjena je od strane autora tako, da najpre dolazi do homogenog rasporedjivanja markacije (++) na ugljenikovim atomima $\text{C}_{(2)}$ i $\text{C}_{(3)}$ ugradnjom supstrata u ciklus limunske kiseline i obrnutim tokom Wood-Werkmanove reakcije, jer kod ugradnje uz pomoć "condensing-enzyme" nakon jednog obrta ciklusa, drugi i treći ugljenikov atom se ugradjuju u oksal sirćetnu kiselinu i, prema tome, drugi i treći ugljenikov atom u pirogroždjanjoj kiselinu moraju biti podjednako markirani. Autori smatraju da pojava malog aktiviteta na prvom ugljenikovom atomu i daleko najjačeg intenziteta na trećem ugljenikovom atomu pirogroždjane kiseline predstavlja dokaz direktne reverzije glikolize, pri čemu se slaba aktivnost na prvom ugljenikovom atomu objašnjava ugradnjom (aktivnog) CO_2 koji je oslobodjen procesom disanja.

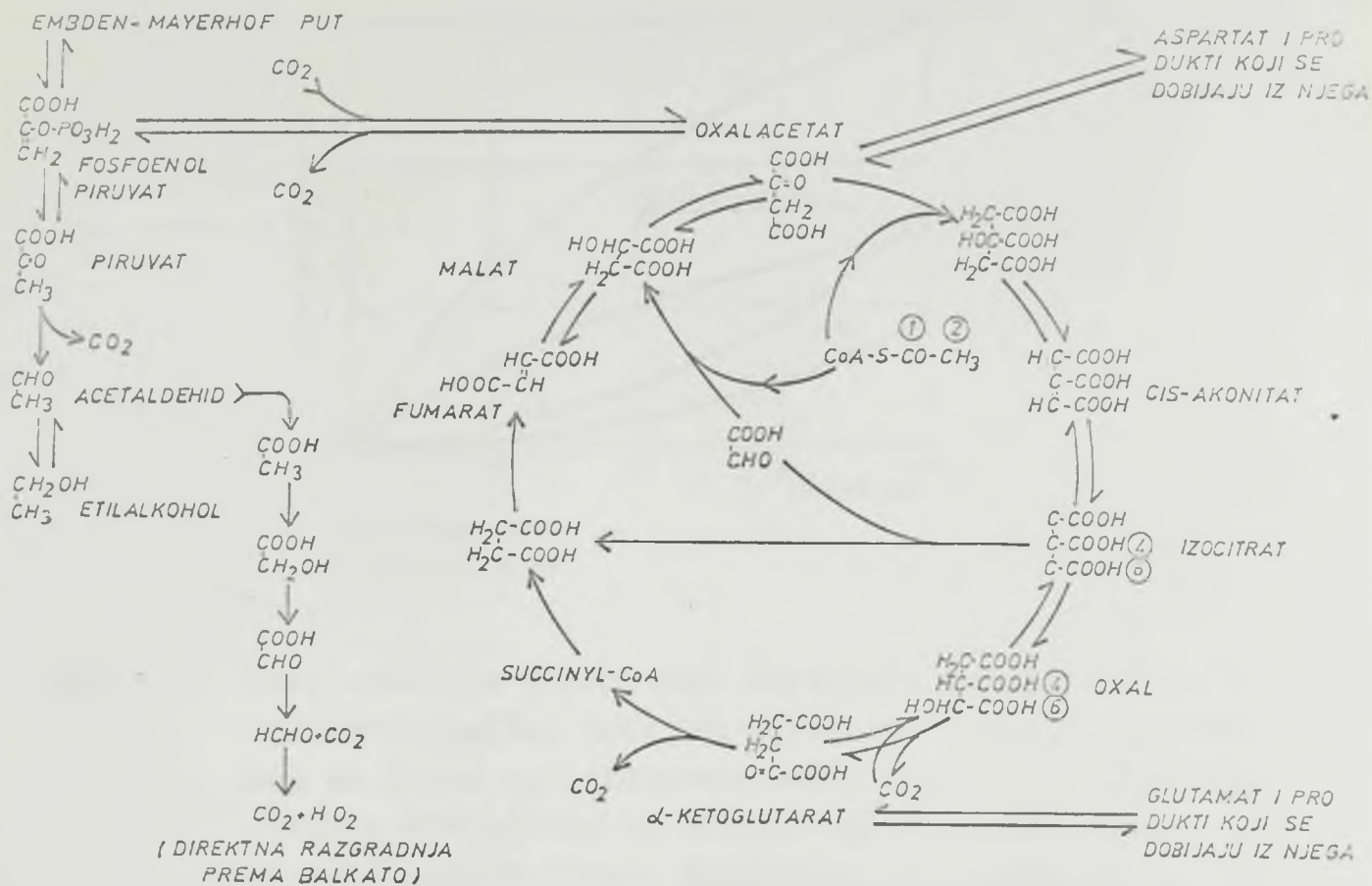
Na osnovi šema reakcija prikazanih na slici 1, koja

služi za bolje razumevanje pomeranja ugljenika, pokazano je da pored obeležavanja na drugom i trećem ugljenikovom atomu pirogroždjane kiseline, putem TCA ciklusa, mora doći do pojačanog obeležavanja u položaju trećeg ugljenikovog atoma delovanjem glioksilatnog ciklusa. Razlog ovoga je u tome što kod nastajanja malata iz glioksilata i acetil-CoA (iz 2-¹⁴C- etanola) markirano mesto predstavlja metil grupu malata i, prema tome, metil grupu oksalsirćetne kiseline. Iz oksalacetata se, dekarboksilacijom, može dobiti fosfoenol piruvat obeležen na trećem ugljenikovom atomu, pri čemu ništa više ne stoji na putu ponovnoj izgradnji rezervnih materija kvasca-trehalozi i glikogenu - iz jedinjenja sa tri ugljenikova atoma putem reverzivnih reakcija Embden-Meyerhof-ovog puta.

Ponovnim ulaskom oksalacetata u TCA ciklus dolazi do pojave sukcinata, oksalacetata i piruvata obeleženih na karboksilnoj grupi, pri čemu sadržaj izotopa postaje relativno mali pošto se on ugrađuje tek u daljem toku reakcije (nakon 2 ciklusa), a u medjuvremenu dolazi do razblaživanja izotopa.

Prema tome, raspodela aktivnosti kod piruvata ne predstavlja specifičnost ni za reverziju glikolize, ni za sintezu glioksilatnog ciklusa. Zbog toga se, uz pomoć etanola markiranog na drugom ugljenikovom atomu, teško može dobiti direktan dokaz glioksilatnog ciklusa "in vivo" i bez izmene fiziološke ravnoteže, jer se korišćenje supstrata odvija i preko TCA ciklusa tako, da svi članovi ciklusa postaju markirani. Pored toga, obrt ciklusa traje nekoliko delića sekunde, tako da se odgovor na pitanje da li, na primer, sukcinat ili malat nastaju preko TCA ciklusa ili preko glioksilatnog ciklusa, ne može dati.



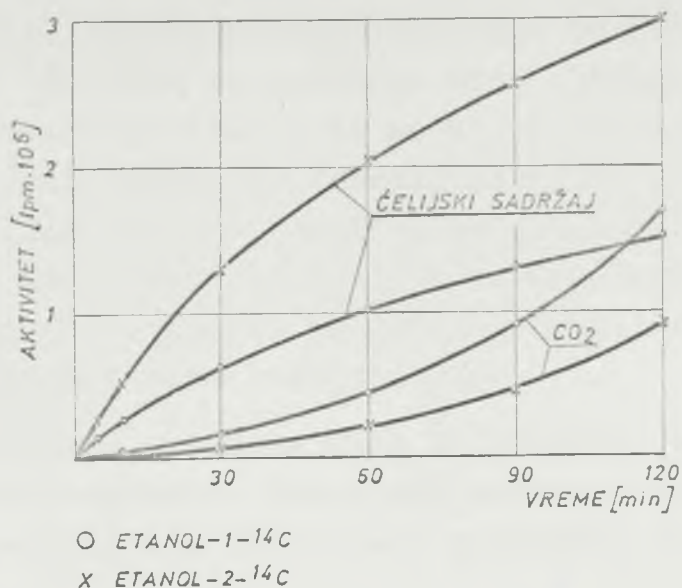


Slika 1: Veza TCA ciklusa, glioksilatnog ciklusa i glikolize (DREWS i HESSLER, 1967).

DREWS i HESSLER (1967) su upotrebljavali etanol koji je obeležen na prvom ugljenikovom atomu, etanol obeležen na drugom ugljenikovom atomu, etanol koji je obeležen na oba ugljenikova atoma i ugljen-dioksid sa obeleženim ugljenikovim atomom. Rezultate ugradnje ovako obeleženih supstrata iznećemo u narednih nekoliko slika. Na slici 2 prikazani su rezultati broja otkućaja rastvornih sastojaka ćelija kvasca i disanjem oslobođenog ugljenikovog atoma (u obliku ugljen-dioksida) kod ugradnje etanola obeleženog na prvom ugljenikovom atomu (o---o) i etanola obeleženog na drugom ugljenikovom atomu



(x--x) u kvascu Saccharomyces cerevisiae koji je prethodno uzgajan na hranljivoj podlozi koja je sadržala glukozu.



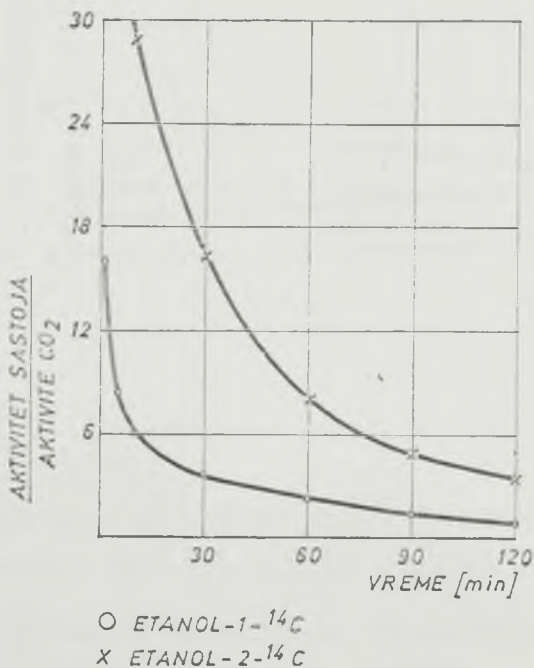
Slika 2: Broj otkucaja rastvornih sastojaka ćelija kvasca i ugljen-dioksida, dobijen ugradnjom etanola obelježnog na prvom ugljenikovom atomu (o---o) i ugradnjom etanola obelježnog na drugom ugljenikovom atomu (x---x) pomoću kvasca Saccharomyces cerevisiae.

Iz rezultata datih na slici 2 može se videti da je broj otkucaja rastvorljivih sastojaka kvasca, sa ugradjenim etanolom, markiranim na drugom ugljenikovom atomu, približno dva puta veći nego što je broj sastojaka ćelija kada je upotrebljen etanol obelježen na prvom ugljenikovom atomu. Objašnjenje za ovu pojavu je u tome, da se disanjem oslobadja dva puta više CO₂ sa markiranim prvim ugljenikovim atomom, nego sa markiranim drugim ugljenikovim atomom.

Objašnjenje za različitu ugradnju pojedinih ugljenikovih atoma etanola moguće je samo ugradnjom preko TCA ciklusa, jer se samo disanjem preko ovog ciklusa atom C₍₁₎ lakše izdvaja u obliku CO₂ nego atom C₍₂₎, jer, ako bi atom C₍₂₎ tek nakon jednog obrta ciklusa došao u položaj oksalacilubarne i alfa-ketoglutarne kiseline, potrebno je da dodje do dekarboks-

silacije. Tačnije iskazano: atom $C_{(1)}$ koji je ugrađen u tolu sinteze u limunsku kiselinu iz etanola - zbog delovanja asimetrije limunske kiseline, koju je opisao OGSTON (1948), u toku drugog obrta ciklusa TCA troši se na disanje sa 100%, dok se atom $C_{(2)}$ tek kod trećeg obrta oslobadja sa 50% (šema prikazana na slici 1). Kako se povećava broj obrtaja TCA ciklusa, tako se povećava verovatnoća da se ugljenikovi atomi etanola putem ravnotežnih reakcija, transaminacijama ili novim aminacijama ketokiseline nadju u "pool"-u aminokiseline ili da se preko Wood-Werkmanove reakcije nadju u Embden-Meyerhof-ovom putu i na taj način da se pomoću poznatih metaboličkih puteva, nadju u sastavnim delovima kvasne ćelije.

Grafičkim prikazom može se učiniti jasnijom neusaglašenost porasta aktivnosti sastojaka kvasca i CO_2 putem predstavljanja koeficijenta aktivnosti sastojaka kvasca (aktivnost CO_2 slika 3).

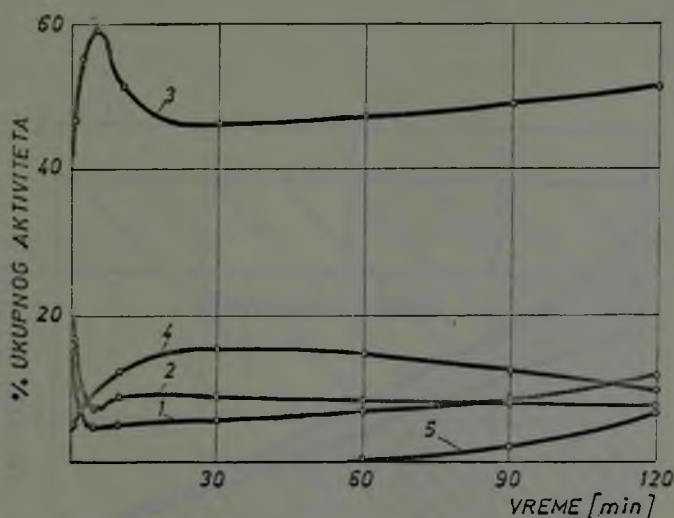


Slika 3: Odnos ugljenikovih atoma ugrađenih u sastavne delove kvasne ćelije i oslobodjenih disanjem (CO_2)

Specijalno visoka vrednost ovog koeficijenta na početku ogleđa, objašnjava se reakcijama izmene članova ciklusa i "pool"-a anino kiseline. Velika zaliha glutaminske kiseline, asparaginske kiseline i proizvoda koji iz njih nastavju, usled malih zaliha alfa-keto glutarne kiseline i oksal sirćetne ki-

seline, smanjuju specifičnu aktivnost ovih pojedinih kiselina u tolikoj meri, da oslobodjena ugljena kiselina, u svakom slučaju, ima malu specifičnu aktivnost. Tek nakon povećanja specifične aktivnosti amino kiselina, povećava se i specifična aktivnost oslobodjenog ugljen-dioksida.

Nakon proračuna pojedinih proba, dobijen je procentualni udeo pojedinih supstanci iz razmene materija u ukupnoj aktivnosti kod ugradnje etanola $-l-^{14}C$ u funkciji vremena. Grafički prikaz ovih rezultata dat je na slici 4.



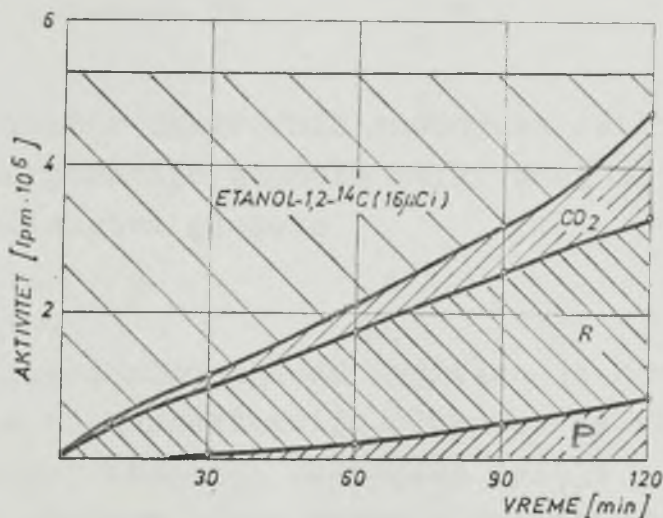
Slika 4: Raspodela aktivnosti na pojedine proizvode razmene materija kod ugradnje etanol $-l-^{14}C$ u kvascu

1. Limunska kiselina, 2- ćilibarna kiselina,
- 3- glutaminska kiselina, 4- asparaginska kiselina
- 5- trehaloza.

Ugradnja (na ovom mestu etilalkohola markiranog na $C_{(1)}$ i kod $C_{(2)}$ nema nikakvih principijelnih razlika) se odvija preko intermedijera TCA ciklusa, jer se primarno pojavljuju markirana limunska kiselina, ćilibarna kiselina, fumarna kiselina i jabučna kiselina. Istovremeno se pretežni deo ^{14}C prenosi na "pool" amino kiselina, koje mogu nastati procesom transaminacije iz keto kiselina. Nasuprot tome, asparaginska kise-

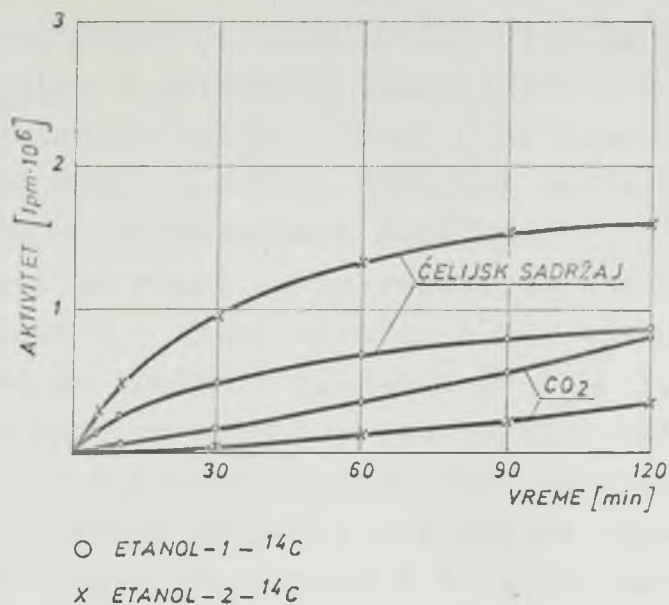
lina, kao stabilni proizvod koji nastaje iz oksal-sirćetne kiseline, markira se znatno sporije, što je dokaz da se ugradnja aktiviteta u ciklus odigrava preko alfa-ketoglutarne kiseline, dakle, preko acetil-CoA (glioksilatni ciklus). Kombinovanjem oglada sa različito markiranim supstratima, može se doći do zaključka o upotrebi "uniformno" markiranog etanola.

Na slici 5 data je odgovarajuća predstava raspodele aktivnosti etanola na četiri frakcije (supstrat, disanjem dobijen CO_2 , rastvoreni sastojci ćelije -R i proteinska frakcija -P).



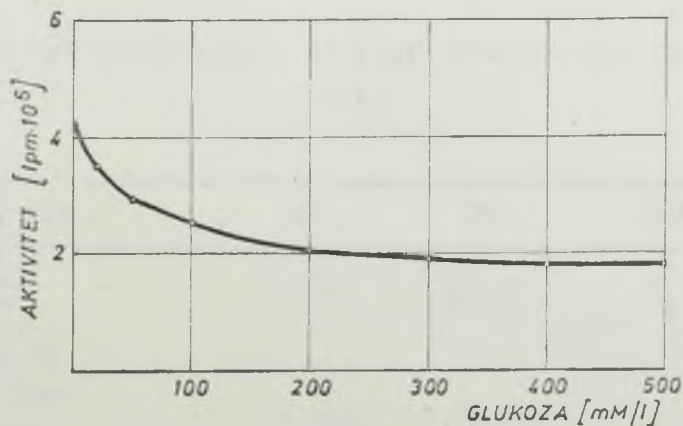
Slika 5. Bilansiranje raspodele aktivnosti kod ugradnje "uniformno" markiranog etanola u kvascu. (markirana oba ugljenikova atoma)

DREWS i HESSLER (1967) su dalje ispitivali iskorišćenje etanola u prisustvu glukoze, kao drugog inaktivnog supstrata (slika 6). Ako se uporedi porast aktiviteta sa rezultatima datim na slici 2, zapaža se opadanje specifične aktivnosti, jer u toku ovog oglada dolazi do razblaživanja markiranog etanola, etanolom koji se javlja u toku vrenja iz glukoze.



Slika 6: Aktivitet rastvornih sastojaka ćelije i CO₂ kod inkorporacije etanola markiranog na C₍₁₎ i C₍₂₎ u prisustvu glukoze

U drugom nizu oglada ispitana je zavisnost asimilacije etanola od koncentracije glukoze. Na slici 7 prikazan je intenzitet zračenja sastojaka ćelije u zavisnosti od koncentracije glukoze nakon vremena inkorporacije od 10 minuta. Ugradjivan je "uniformno" markirani etanol.



Slika 7: Ugradnja aktiviteta etanola -1,2 -¹⁴C u sastojke kvasne ćelije u zavisnosti od koncentracije inaktivne glukoze

Ispitivana je asimilacija etanola pomoću Saccharomyces cerevisiae u prisustvu hidrolizata kazeina. Hidrolizat kazeina predstavlja veliki višak amino kiselina. U prisustvu velikog viška amino kiselina dobijaju se rezultati koji se znatno razlikuju od rezultata dobijenih u ogledima čiji su rezultati dati na slici 1. Iz rezultata datih na slici 1 vidi se, da je odnos C - atoma utrošenih na ugradnju u sastojke ćelije u odnosu na trošenje disanjem je 2:1; kod ovih ogleda sa hidrolizatom kazeina utvrđene su razlike aktivnosti u ugljen-dioksidu od 1,2:1 i odgovarajuće tome aktivnosti sastojaka ćelija od 1:1,2. Druga primetna razlika se zapaža u odnosu koeficienta aktiviteta ugradjenog u ćelijski sadržaj i aktiviteta oslobodjenog u obliku ugljen-dioksida disanjem.

Znači, da se u prisustvu kazeina, znatno više etanola oslobadja kao CO_2 nego u ogledima gde nije dodavan kazein.

U tabeli 1 dati su koeficienti: aktivitet sastojaka ćelija/ aktivitet CO_2 u toku asimilacije etanola (kvascem uz prisustvo viška amino kiselina). Kod toga je zbir zračenja ogleda izvedenih sa $C_{(1)}$ i $C_{(2)}$ markiranim etanolom služio kao osnova, tako da se vrednosti u tabeli 1 mogu posmatrati kao vrednosti za "uniformno" obeleženi etanol.

Tabela 1.

Aktivitet sastojaka ćelija kvasca prema aktivitetu u CO_2

Vreme merenja min.	10	20	30	40
Etanol-1,2- ^{14}C	17,4	12,8	9,9	5,2
Etanol-1,2- ^{14}C i 2% hidrolizat kazeina	1,85	1,83	1,80	1,80

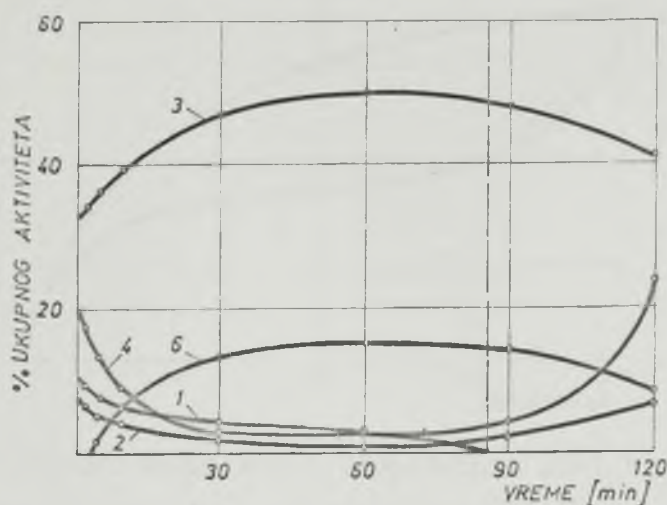
Kako se iz vrednosti, datih u tabeli 1 vidi, u slučaju kada se u supstratu nalaze "uniformno" markiran etanol i 2% hidrolizat kazeina, odnos aktiviteta sastojaka ćelija kvasca i CO_2 je mnogo niži nego kada se u supstratu nalazi samo "uniformno" markirani etanol.

Da bi se razjasnila ova odstupanja može se pretpostaviti da se uz dodatak viška amino kiselina reakcije izmene kojima se puni rezervoar amino kiselina iz ciklusa TCA slabe, jer se ne odvođe intermedijeri koji služe za dobijanje amino kiselina tako, da dolazi do ujednačenja razlika upotrebe ugljenika i do povećanja udela ugljenika etanola, koje se pojavljuju kao ugljen-dioksid oslobođen disanjem.

Iz rezultata koje su dobili opisanim ogledima DREWS i HESSLER (1967) zaključili su, da u kvasnim ćelijama, kada se uzgajaju na etanolu, funkcioniše gliksilatni ciklus ali su želeli da to nedvosmisleno dokažu, pa su zbog toga izvršili i seriju ogleda sa ugradnjom markiranog ugljen-dioksida ($^{14}\text{C O}_2$). Glavna ugradnja $^{14}\text{CO}_2$ u intermedijerna jedinjenja ide preko Wood-Werkman-ove reakcije. Ovom reakcijom se oksalsirćetna kiselina markira u položaju "4" i uspostavlja se ravnoteža oksalsirćetna kiselina \rightleftharpoons jabučna kiselina \rightleftharpoons fumar-
na kiselina takodje u položaju "4".

U ciklusu trikarbonskih kiselina oba se ova markirana ugljenikova atoma ("4" i "6" slika 1) na osnovu enzimske, aktivne asimilacije limunske kiseline sve do sukcinil CoA, izdvajaju kao CO_2 . Isto važi i za reverziju glikolize prema MILHAUD-u (1955). Pod pretpostavkom da je reakcija ćilibarna kiselina - fumar-
na kiselina pod fiziološkim uslovima ireverzibilna - što važi za Krebsov ciklus (LEUTHARDT, 1961), jedini član ciklusa koji ne može biti markiran je ćilibarna kiselina. Ako ćilibarna kiselina odmah na početku rada sa etanolom i $^{14}\text{CO}_2$ kao supstratima postane markirana, ovo tada predstavlja nepobitan dokaz cepanja izocitronske kiseline markirane u položajima "4" i "6" na gliksilat -1- ^{14}C i ćilibarnu kiselinu-1,4- ^{14}C . U toku ogleda mogla bi se još jedino preko ciklusa pentoza fosfata pojaviti aktivnost, ali se ova sekundarna reakcija može lako razlikovati od primarne na početku

ogleda na osnovu uvođenja obeležavanja medjuproizvoda reakcija. Na slici 8 dati su rezultati raspodele aktiviteta na pojedine proizvode razmene materija kod ugradnje $^{14}\text{CO}_2$, u kvascu, uz etanol kao supstrat.

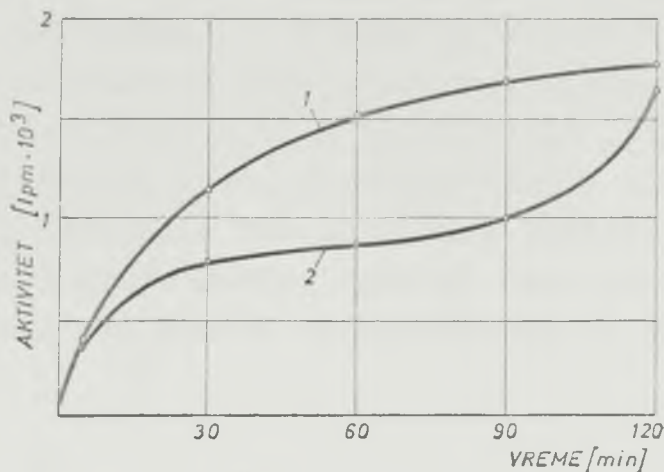


Slika 8: Raspodela aktiviteta na pojedine proizvode razmene materija kod ugradnje $^{14}\text{CO}_2$ kod pekarskog kvasca uz etanol kao supstrat

- 1 - limunska kiselina, 2- ćilibarna kiselina,
3- glutaminska kiselina, 4- asparaginska kiselina i 5- arginin.

Na slici 8 vidi se da se već na početku ogleda može dokazati znatno markiranje ćilibarne kiseline, što je jasan dokaz egzistencije gliksilatnog ciklusa kod kvasca koji je adaptiran na etanol kao izvor ugljenika. Početno intenzivno funkcionisanje Wood-Werkmanove reakcije počinje nakon 10 do 20 minuta da "izgladnjava" jer se, razumljivo, moraju iz rezervnih materija pribaviti di i trikarbonske kiseline za ponovno otpočinjanje ciklusa limunske kiseline i gliksilatnog ciklusa. U toku rasta kvasnih ćelija preko gliksilatnog ciklusa Wood-Werkman-ova reakcija se potiskuje viškom dikarbonskih kiselina suprotnom reakcijom dekarboksilacije, što omogućava sintezu rezervnih supstanci trehaloze i glikogena.

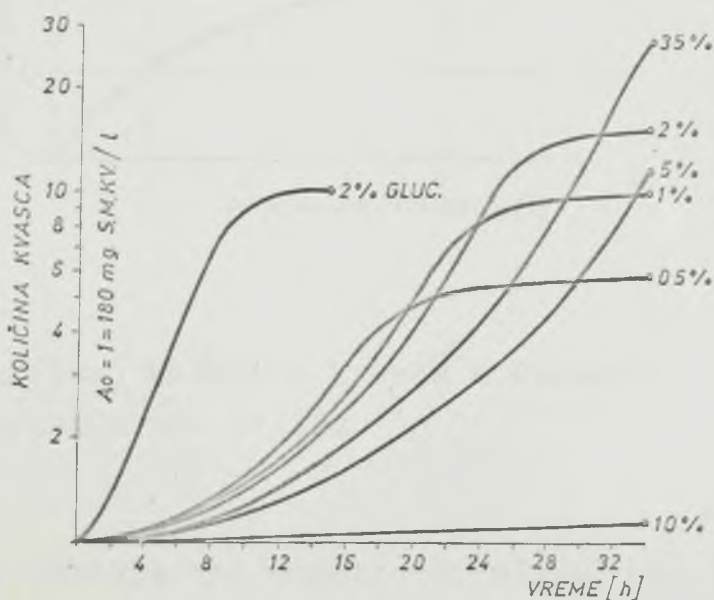
Dalji dokaz sinteze dobija se, kada se kvasac gaji na glukozu uz prisustvo etanola a dodaje se podlozi još i markirani ugljen-dioksid ($^{14}\text{CO}_2$). Ugljena kiselina stvorena procesom vrenja iz glukoze razblažuje specifičnu aktivnost (kriva 1) ali se i uprkos toga zapaža stalni porast aktivnosti.



Slika 9: Aktivnost ćelijskih supstanci kod ugradnje $^{14}\text{CO}_2$ sa glukozom kao supstratom (1) i sa etanolom kao supstratom (2).

Pored toga, što su utvrdili put asimilacije etanola kao izvora ugljenikovih atoma i energije za kvasne ćelije, DREWS i HESSLER (1967) su u svojim eksperimentima, sa etanolom koji nije markiran, ispitivali sistematski uslove rasta koji su neophodni kod ocene etanola kao izvora ugljenika. Oni su varirali sledeće parametre: koncentraciju supstrata-etanola, koncentraciju ćelija, pH i aeraciju, da bi mogli utvrditi ekonomski najpovoljnije uslove kultivacije kvasca. Pored toga, izvršili su utvrđivanje toksičnosti etanola na kvasne ćelije manometrijskim praćenjem razmene materija. Da bi utvrdili podatke o toku razmnožavanja kvasca Saccharomyces cerevisiae na etanolu kao izvoru ugljenika, ogledi su izvodjeni uz mešanje u tikvicama po Erlenmayer-u od 1 litra uz dodatak etanola u koncentracijama od 0,5 do 10 vol. % sve do potpunog utroška etanola. Rezultati koji su dobijeni pod ovim uslovima dati su na slici 10. Uporedjenja radi, prva kriva pokazuje priraštaj količine kvasca u hranljivoj podlozi sa glukozom, pod

identičnim uslovima, sve do trenutka iscrpljenja glukoze. Nasuprot razmnožavanju u hranljivoj podlozi sa glukozom, koja nakon kratkotrajne "lag" faze počinje strogo logaritamski, očigledno je da kvasac u supstratu sa etanolom nije u stanju da jedinjenja sa dva ugljenikova atoma ugradjuje u odgovarajućoj količini u svoje sastojke i da ih time koristi za razmnožavanje. Tek nakon 6 - 8 sati dolazi do izgradnje - sinteze enzimskih sistema koji omogućuju sintezu viših jedinjenja iz etanola. Kako se vidi na slici 10, brzina rasta i početak razmnožavanja veoma izrazito zavise od koncentracije etanola: kod najmanjih koncentracija etanola i kod potpune adaptacije pri kraju svakog ogleada, dostignuta je brzina razmnožavanja kao kod kvasca razmnožavanog na glukozu.

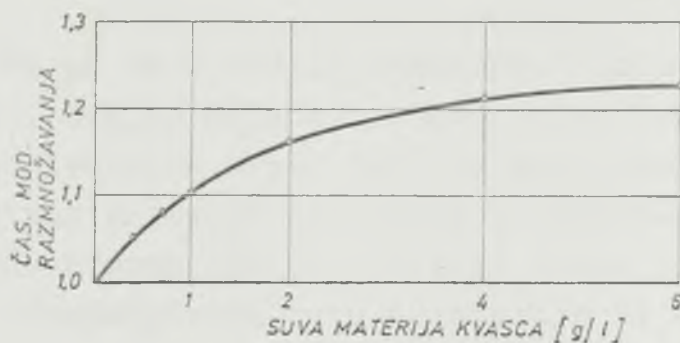


Slika 10: Priraštaj količine kvasca kultivacijom pri raznim koncentracijama etanola kao izvora ugljenika.

Pored koncentracije etanola, koncentracija ćelija na početku kultivacije takođe utiče, na brzinu razmnožavanja ćelija kvasca. Kod svih ostalih konstantnih parametara kultivacije, povećavanjem količine matičnog kvasca povećava se faktor razmnožavanja kvasca (dobijeni kvasac/matični kvasac) u datim ogleadima.

Na slici 11 prikazano je časovno razmnožavanje kvasca kod kultivacije uz mućkanje, kod raznih gustina kvasca i kod konstantnog pH od oko 5. Da bi se u ovim jednostavnim ogledima održala i približno konstantna koncentracija etanola, (jer se kod velikih koncentracija ćelija ovaj parametar brzo menja) kvasac je zasejan u potrebnim koncentracijama u hranjivu podlogu sa 2% etanola i zatim kultivisan dva sata.

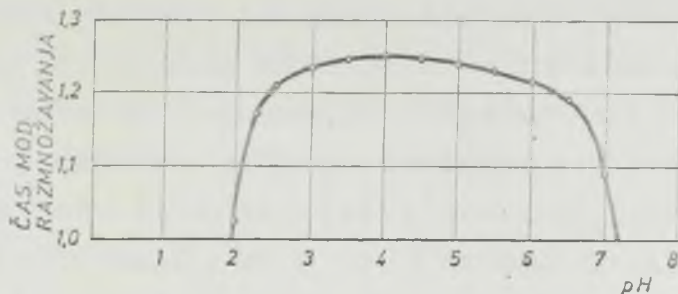
Nakon ove nove adaptacije, i nakon utvrđivanja i korekcije gubitaka supstrata, moglo se izvršiti merenje količine kvasca u funkciji vremena u trajanju od jednog časa.



Slika 11: Priraštaj količine kvasca u funkciji koncentracije ćelija

Kod etanola kao supstrata, slično kao i kod rada sa glukozom kao supstratom, pH - oblast u kojoj se rast i razmena materija kvasca Saccharomyces cerevisiae odbija optimalno, nije veoma usko ograničena.

Na slici 12 prikazan je niz ogleda sa raznim pH vrednostima u oblasti 2,5 do 6,5 pri čemu u ovoj oblasti priraštaj količine kvasca sa izuzetkom malog optimuma na pH 4 ostaje praktično konstanta.



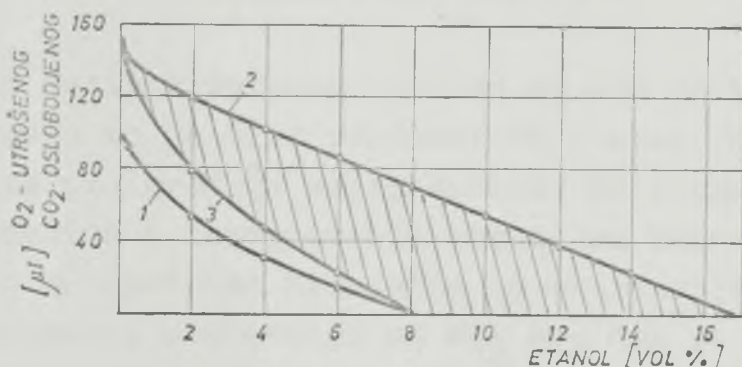
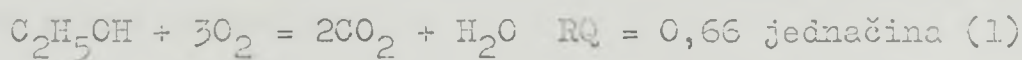
Slika 12: Brzina razmnožavanja u zavisnosti od pH

Da bi se utvrdila zavisnost brzine rasta kvasca od pH supstrata, u nizu oglada radjeno je sa kulturama uz mućkanje sa koncentracijom kvasca od 1 g suve materije po litru u 2% hranljivom rastvoru sa etanolom. Početak merenja priraštaja količine kvasca bio je pet sati nakon početka kultivacije, što je obezbedjivalo punu adaptaciju na datu vrednost pH.

Ispitivanje uticaja aeracije je pokazalo da se sa povećanjem količine vazduha dolazi do smanjenja brzine razmnožavanja, kao i do znatnog smanjenja sveukupnog iskorišćenja. Ovo očigledno potiče zbog gubitka egzogenog acetaldehida kod povećanih brzina strujanja vazduha. Količine acetaldehida koji se izvodi iz hranljive podloge povećava se sa protokom vazduha.

Da bi ispitali uticaj različitih koncentracija etanola na disanje kvasnih ćelija Saccharomyces cerevisiae, DREWS i HESSIER (1967) su merili intenzitet disanja Warburg-ovom tehnikom. Iz datih rezultata (slika 13) vidi se da se najveća količina izdvojenog ugljen-dioksida dobija kada je koncentracija etanola beskonačno mala. Kako raste količina etanola u hranljivoj podlozi tako se smanjuje količina stvorenog ugljen-dioksida da bi dostigla vrednost nula, kada je koncentracija

etanola 8,0 vol. % (kriva 1 na slici 13). Kriva 2 prikazuje odgovarajući utrošak kiseonika. Kako se vidi na slici, izgleda da potrošnja kiseonika manje zavisi od koncentracije etanola jer ona potpuno iščezava kod koncentracije od oko 15 vol. % etanola. Iz utroška kiseonika i količine stvorenog ugljen-dioksida, može se izračunati respiratorni koeficijent koji se dobija iz jednačine potpune oksidacije (jednačina 1) preko koje se za datu količinu razvijenog ugljen-dioksida može izračunati količina O_2 koja je potrebna za disanje do krajnjih proizvoda (kriva 3 na slici 13).



Slika 13: Disanje ćelija kvasca u zavisnosti od koncentracije etanola kao supstrata; kriva 1- razvijena količina CO_2 ; kriva 2- utrošena količina O_2 ; 3- teorijska količina O_2 potrebnog za potpunu oksidaciju do CO_2 ; šrafirana površina - utrošak O_2 na oksidaciju do acetaldehida.

U toku oglada čiji su rezultati dati na slici 10, vidi se da potpuno sagorevanje prema jednačini 1 zaostaje usled nedostatka mogućnosti ugradnje etanola na početku adaptacije. Preostala količina utrošenog kiseonika koja se nalazi iz razlike krivih 2 i 3 na slici 13, predstavlja, prema tome, količinu kiseonika utrošenu za oksidaciju do egzogenog acetal-



dehida, i prema tome, ona predstavlja kriterijum za ocenu viška nastalog acetaldehida. Kod najmanje koncentracije etanola ne dolazi do stvaranja acetaldehida u višku i na taj način odvija se potpuna oksidacija ($RQ = 0,66$). Na slici 13 prikazano je slikovito ponašanje ćelija kvasca u podlogama sa etanolom. Kod malih koncentracija etanola (0,2 vol.%) sav se etanol troši bez ostatka na disanje, bez pojave egzogenog acetaldehida: koeficijent respiracije ima teorijsku vrednost 0,66. Polaganije opadanje vrednosti RQ počiva na postupnoj adaptaciji, prema tome na korišćenju etanola za sintezu ćelijskih supstanci, a mogu se u idealnim uslovima predstaviti bruto formulom prema jednačini 2.

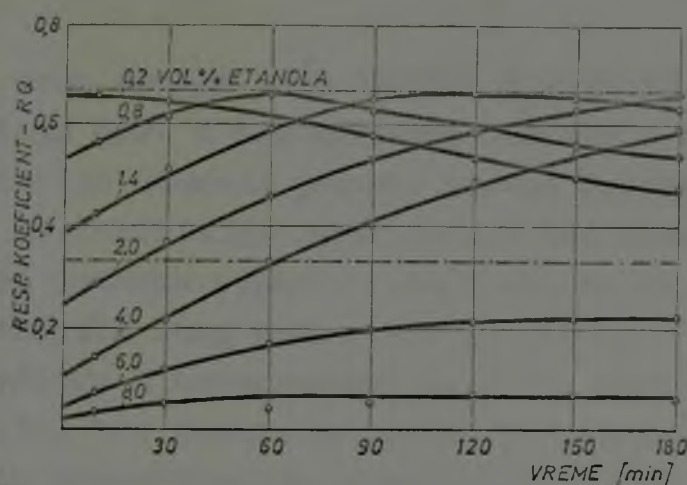


$$\text{vrednost } RQ = 0,33$$

Iz datih rezultata vidi se da što je viša koncentracija etanola to je niža vrednost RQ i zbog relativno većeg utroška O_2 za proizvodnju acetaldehida. Sa porastom koncentracije acetaldehida i istovremenim opadanjem koncentracije etanola, pomera se upotreba kiseonika od oksidacije do acetaldehida ka potpunoj oksidaciji do CO_2 sve dok se nakon uspostavljanja ravnotežnog stanja ne dostigne teorijska vrednost $RQ = 0,66$. Kod većih koncentracija etanola ovo ravnotežno stanje uspostavlja se kasnije. Dalje se može zaključiti da etanol u svakoj koncentraciji pokazuje neko određeno toksično dejstvo. Porastom koncentracije etanola u supstratu razmena materije opada i kod koncentracije od oko 8,0 vol. %, sagorevanje disanjem do CO_2 približava se nuli. Podnošljivost kvasca za etanol leži negde u granicama od 16 - 17 vol. %. Sve do ove koncentracije - koja predstavlja graničnu vrednost za bilo kakve oksidativne promene supstrata, kvasac može razgradjivati etanol do prvog stepena oksidacije, do acetaldehida koga ne može da upotrebi u sintezi.

Ova se oksidacija prema DREWS-u i sar., (1967) može smatrati kao sigurnosni ventil pomoću koga kvasac kod velikih koncentracija može izazvati smanjenje koncentracije etanola.

U otvorenom aerisanom sistemu aerobne kulture kvasca Saccharomyces cerevisiae postoji, dakle, mogućnost, da usled velike isparljivosti acet-aldehida (tačka ključanja $21,0^{\circ}\text{C}$) ne može doći do uspostavljanja ravnoteže ovih dvaju supstrata (etanola i acetaldehida), pa ćelije mogu izazvati smanjenje koncentracije supstrata do povoljnijih koncentracija etanola. Nakon dostizanja granice od oko 8 vol. % etanola u podlozi može otpočeti normalna razmena materija u kvasnim ćelijama.



Slika 14: Promene respiratornog koeficienta kod kvasnih ćelija Saccharomyces cerevisiae za razne koncentracije etanola kao supstrata.

Kod koncentracije etanola od 0,2 vol. % i 0,8 vol. % dolazi do opadanja vrednosti RQ jer dolazi do sinteze građivnih supstanci ćelije. Uzlazne krive RQ vrednosti, bez izuzetka, znače proizvodnju acetaldehida u višku, dok silazne krive predstavljaju adaptaciju na optimalno korišćenje supstrata.

MAITRA i ESTRABROOK (1967 a) ispitivali su metabolizam kvasca Saccharomyces cerevisiae u toku oksidacije etanola. U svom radu ispitivali su redukciju piridin nukleotida i korišćenje kiseonika u toku oksidacije etanola pomoću kvasca. Rezultati koje su dobili pokazuju da u toku oksidativne

asimilacije etanola dolazi do smanjenja sadržaja redukovanih piridin nukleotida u kvasnim ćelijama. Iz rezultata merenja količine stvorenog ugljen-dioksida zapaža se da u prisustvu etanola dolazi do usporenog disanja kvasnih ćelija. Autori su takodje odredjivali stvaranje acetaldehida iz etanola i utvrdili da se acetaldehid stvara već nakon 5 minuta od početka asimilacije etanola. Ovako brzo stvaranje acetaldehida sugerira da se 70% kiseonika koji se utroši na oksidaciju utroši na stvaranje acetaldehida, a da se samo 30% utroši na oksidaciju etanola do acetata.

U svom drugom radu MAITRA i ESTRABROOK (1967 b) ispitivali su ulogu NAD^+ i neorganskog fosfora u kontroli disanja u toku oksidacije etanola pomoću kvasca Saccharomyces cerevisiae. Utvrdili su da inhibicija respiracije kod kvasca nastupa nakon 40 sekundi od dodatka etanola. Smatrali su da je inhibicija respiracije nastupila zbog nekorišćenja ADP-a u ćelijama. Dodatkom glukoze u podlogu i neorganskog fosfata, uspeali su da poboljšaju respiraciju, bez obzira na prisustvo etanola. Ovo navodi na zaključak, da koncentracije etanola od 1,2 mM nije u stanju da ireverzibilno inhibira respiraciju kvasnih ćelija.

Da bi utvrdili na koji način se može izvesti oksidacija acetaldehida pomoću kvasnih ćelija, MAITRA i ESTRABROOK (1967 c) su postavili oglede sa različitim koncentracijama acetaldehida. Koncentracija od 0,11 mM acetaldehida izazvala je smanjenje intenziteta respiracije kvasnih ćelija na polovinu, a veće koncentracije acetaldehida izazivale su ireverzibilnu inhibiciju respiracije.

JANKI i sar. (1971) su ispitivali različite vrste kvasca roda Saccharomyces i to Sacch. oviformis, Sacch. carlsbergensis i Sacch. cerevisiae. Medju navedenim kvascima najbolje iskorišćenje etanola pokazao je pivarski kvasac, slabije iskorišćenje etanola pokazao je vinski kvasac, a najslabije iskorišćenje etanola je dobijeno pomoću pekarskog kvasca. U toku rasta na glukozu svaki od ovih kvasaca pokazivao je dioksidrast koji je već ranije opisan kod kvasca Saccharomyces cerevisiae.

SMAINL i ALI (1971) su pokušali da objasne zbog čega jedni kvasci mogu da stvaraju, podnose i asimiluju velike količine etanola a drugi ne. Njihovo mišljenje je da je alkoholna toleranca genetski kontrolisan sistem. Segregacijom haploidnih vrsta od diploidnih i ukrštanjem različitih kombinacija između visoko rezistentnih vrsta i niskorezistentnih vrsta dobijen je najverovatnije poligenetski sistem. Autori, takodje, smatraju da je u toku oglada došlo i do interakcije gena ili modifikacije gena što je omogućilo dobijanje soja koji je bio vrlo tolerantan na velike količine etanola u hranljivoj podlozi.

Do sada je izneta problematika (i njeno rešavanje) asimilacije etanola pomoću kvasnih ćelija Saccharomyces cerevisia.

III PUTEVI KOJIMA NASTAJU SASTAVNI DELOVI ĆELIJA KVASCA SACCHAROMYCES CEREVISIAE IZ ETANOLA

1. Energetske potrebe mikroorganizama

Jedan od prvih radova koji se bavio problematikom energetike mikrobnog rasta je rad MONODA (1942). On je dao osnovne jednačine rasta koje su kasnije poslužile ostalim istraživačima koji su se bavili problematikom rasta i energetikom mikrobnog rasta. U vreme kada se počela izučavati energetika mikrobnog rasta nisu bili poznati biohemijski mehanizmi prenosa energije i detalji sinteze makromolekula (SENEZ, 1962). BAUCHOP i ELSDEN (1960) su prvi jasno opisali rast raznih mikroorganizama uključujući i Saccharomyces cerevisiae putem energije koja nastaje u reakcijama oslobadjanja energije tokom procesa rasta. Radom pod anaerobnim uslovima u delimično definisanoj podlozi u kojoj je kao supstrat upotrebljavana glukoza (kao praktično jedini izvor ugljenika), oni su došli do rezultata da nastajanje 100 g suve materije kvasca odgovara 9,5 molova ATP-a nastalog kod fermentacije glukoze (koeficient prinosa $Y_{ATP} = 10,5$ g suve materije/ mol nastalog ATP-a u metabolizmu koji oslobadja energiju). U ovoj podlozi ćelije imaju najveći deo

neophodnih monomera na raspoloženju, i utrošak energije može se najvećim delom smatrati kao energija potrebna za polimerizaciju monomera.

GUNSALUS i SCHUSTER (1961) su izračunali teorijsku potrošnju ATP-a za polimerizaciju, pretpostavljajući stvaranje polimera bakterijskih ćelija iz amino kiselina, purinskih i pirimidinskih baza, sirćetne kiseline i heksoze. Oni su našli da teorijski po svakom molu ATP-a može nastati 33,3 g ćelijske mase, to jest, za 100 g novo nastalih ćelija potrebno je 3,0 mola ATP-a. Slični se proračuni mogu postaviti sa vrednostima koje daje LEHNINGER (1971) za biosintetski kapacitet bakterijskih ćelija. Na ovaj način se dobija vrednost od 1,9 molova ATP-a/100 g suve materije. Primenjujući LEHNINGER-ove principe proračuna u svojim radovima FUKUI i HIRATA (1968) su dali vrednost 1,56 molova ATP-a potrebnih za nastajanje 100 g ćelija Agrobacterium tumefaciens-a iz raspoloživih prekursora. Slično je THAUER (1968) izračunao vrednost od 2,3 mola ATP-a/ 100 g materija bakterijskih ćelija.

Za kvasac ovakav proračun dao je NORDSTRÖM (1967). Sastav kvasca koji je služio kao osnova za njegov proračun dat je u daljem tekstu u tabeli 2. NORDSTRÖM je izveo proračune prema principima GUNSALUS-a i SCHUSTER-a (1961) i našao da je kod nastajanja polimera, za 100 g kvasca od monomera potrebno ukupno 2,36 molova ATP-a. Prema svemu ovome, vrednosti za energiju potrebnu za nastajanje 100 g materija ćelija mikroorganizama (s.m.) od monomera kreću se između 1,56 i 3,75 molova ATP-a. Razlog ovoga delom leži u različitim sastavima ćelija, a delom i u metodama proračuna. Svi ovi rezultati jako odstupaju od eksperimentalno dobijene vrednosti (9,5 molova ATP-a/100 g suve materije ćelija), što ukazuje da potrebna energija za nastajanje ćelijskog materijala iz formiranih monomera iznosi samo 15 - 40% od ukupne količine energije potrebne za rast.

Prema STOUTHAMERU (1973), odnos između formiranog ATP-a i formiranog ćelijskog materijala može se proučavati na dva načina. Prvi način sastoji se u eksperimentalnom utvrđivanju formiranog ćelijskog materijala u toku razgradnje izvesne

količine supstrata. Ako je pri tome poznato koliko se formira ATP-a prilikom razgradnje ove utrošene količine supstrata, tada se može računati vrednost Y_{ATP} . Po drugom postupku, kao osnova se uzimaju makromolekulska jedinjenja koja ulaze u sastav ćelijskog materijala, i izračunava se koja je količina ATP-a potrebna da se utroši da bi se ti makromolekuli sintetizovali iz monomera. Računajući po drugom principu GUNSALES i SCHUSTER (1962) izračunali su da je potrebno 0,03 g molova ATP-a za formiranje ćelijskog materijala iz prethodno pripremljenih monomera. FORREST i WALKER (1971) korigovali su ovu vrednost na 0,036 g molova ATP-a po gramu formiranog ćelijskog materijala iz prethodno pripremljenih monomera. Manja vrednost za Y_{ATP} koju su dobili GUNSALES, SCHUSTER (1962) je zbog toga, što su oni smatrali da je za ugradjivanje jedne amino kiseline u protein potrebno 3 mola ATP-a, dok su FORREST i WALKER (1971) utvrdili da je potrebno 5 molova ATP-a da se ugradi jedna amino kiselina u proteinski lanac.

Velika razlika koja nastaje izmedju eksperimentalno dobijenih vrednosti za Y_{ATP} i teorijski izračunatih vrednosti, nastaje, prema STOUTHAMER-u (1973), zbog toga što nije uzeto u obzir da je mikroorganizmima potrebna odredjena količina energije za održanje. Na ovu činjenicu ukazali su, takodje, i PIRT (1965) i VAN UDEN (1969). Zbog toga je definisan nov termin Y_{ATP}^{max} koji predstavlja količinu proizvedene suve materije mikroorganizma po g molu ATP-a nakon korekcije vrednosti ATP-a za energiju koja je potrebna za održavanje mikroorganizma. Medjutim, do sada ima samo vrlo malo odredjenih vrednosti za Y_{ATP}^{max} . Vrednosti dobijene za Y_{ATP}^{max} se razlikuju od vrednosti koje se dobijaju izračunavanjem. Imajući ovo u vidu STROUTHAMER (1973) izražava mogućnost da je ova vrednost Y_{ATP}^{max} biološka konstatna, i da razlike za vrednost Y_{ATP} za različite mikroorganizme nastaju zbog različitog koeficienta energije potrebne za održanje i različitih specifičnih brzina rasta. STROUTHAMER (1973), dalje, smatra da postoji bezbroj grešaka u prethodnim teorijskim izračunavanjima. Te greške su po njemu činjene u sledećem:

- a) nije se računalo trošenje ATP-a za proces transporta jer se skoro svi hranljivi sastojci uzimaju u ćeliju iz spoljašnje sredine pomoću aktivnog transporta (proračuni utroška ATP-a za procese transporta ocenjeni su na sledeće vrednosti: 0,5 molova ATP-a potrebno je da se asimiluje 1 g jon kalijuma ili amonijum jon; 1 mol ATP-a potreban je da se asimiluje 1 mol fosfata, amino kiseline, acetata, malata itd.);
- b) u ranijim proračunima nije uzimano u obzir da je potrebno utrošiti određenu količinu ATP-a za polimerizacione reakcije koje se odigravaju u toku sinteze ćelijskih makromolekula. Na primer, potrebno je prema STOUTHAMERU (1973) 4 mola ATP-a da se utroši da se jedna amino kiselina ugradi u protein;
- c) kada se do sada izračunavala količina potrebnog ATP-a za sintezu monomera iz glukoze poznatim biosintetskim putevima, nije uziman u obzir ATP koji se stvara prilikom razgradnje glukoze;
- d) do sada se nije uračunavala potrošnja ATP-a za formiranje NADPH_2 od NADH_2 procesom fosforilacije.

2. Energetske potrebe ćelija kvasca

Da bismo mogli sagledati koliko je potrebno energije za metabolizam kvasnih ćelija, potrebno je znati koliko se troši energije za: formiranje polimera iz monomera; izvršenje transporta hranljivih sastojaka, energije održanja i druge energetske potrebe. Prvo ćemo dati u tabeli 2 pregled prosečnog sastava ćelija kvasca Saccharomyces cerevisiae prema literaturnim podacima (OURA, 1972).

Tabela 2

Sastav pekarskog kvasca

Komponenta	Grylls (1961)	Nordström (1967)	Harrison (1967)	Suomalainen (1958) Oura i Suomalainen (1967) Oura (1972)
Ugljeni hidrati	37	35	46	39,1
Proteini	40,5	48	38,4	39,0
Nukleinske kiseline	8,5	3	8,2	10,8
Neutralni lipidi	-	-	-	2,5
Glicerolni fos- folipidi	2	5	2	4,5
Poli fosfati	-	3	-	-
Amonijak	0,8	-	0,85	-
Pepeo	11,2	6	4,55	4,1

Neke od prikazanih količina izračunate su na osnovu elementarnih podataka. Sadržaj pepela obračunat je tako, da dopunjuje razliku do 100%. Vrednosti u tabeli 2 su date u procentima na suhu materiju.

Proračuni koji će biti izvedeni u tabeli 3 (u daljem tekstu) zasnivaju se na podacima prema poslednjoj koloni.

Na slici 15 prikazane su reakcije glukoneogeneze iz etanola. U ovom putu mogu se videti ključne komponente od kojih mogu da nastanu pojedini monomeri. Ove komponente su: glukoza, glukoza-1-P, 3-P-glicerat, PEP, piruvat, acetil -CoA, oksalacetat, 2-oksoglutarat i glicerol koji predstavljaju prekursori. Na slici 16 mogu se pratiti reakcije koje dovode do obrazovanja monomera od kojih je izgradjena ćelijska masa kvasca od glukoze. Na šemi se može videti na koji način iz glukoze mogu nastati pojedine amino kiseline, a isto tako se može sag-

ledati veza prekursora polisaharida i komponenata masti sa metabolitima glukoze.

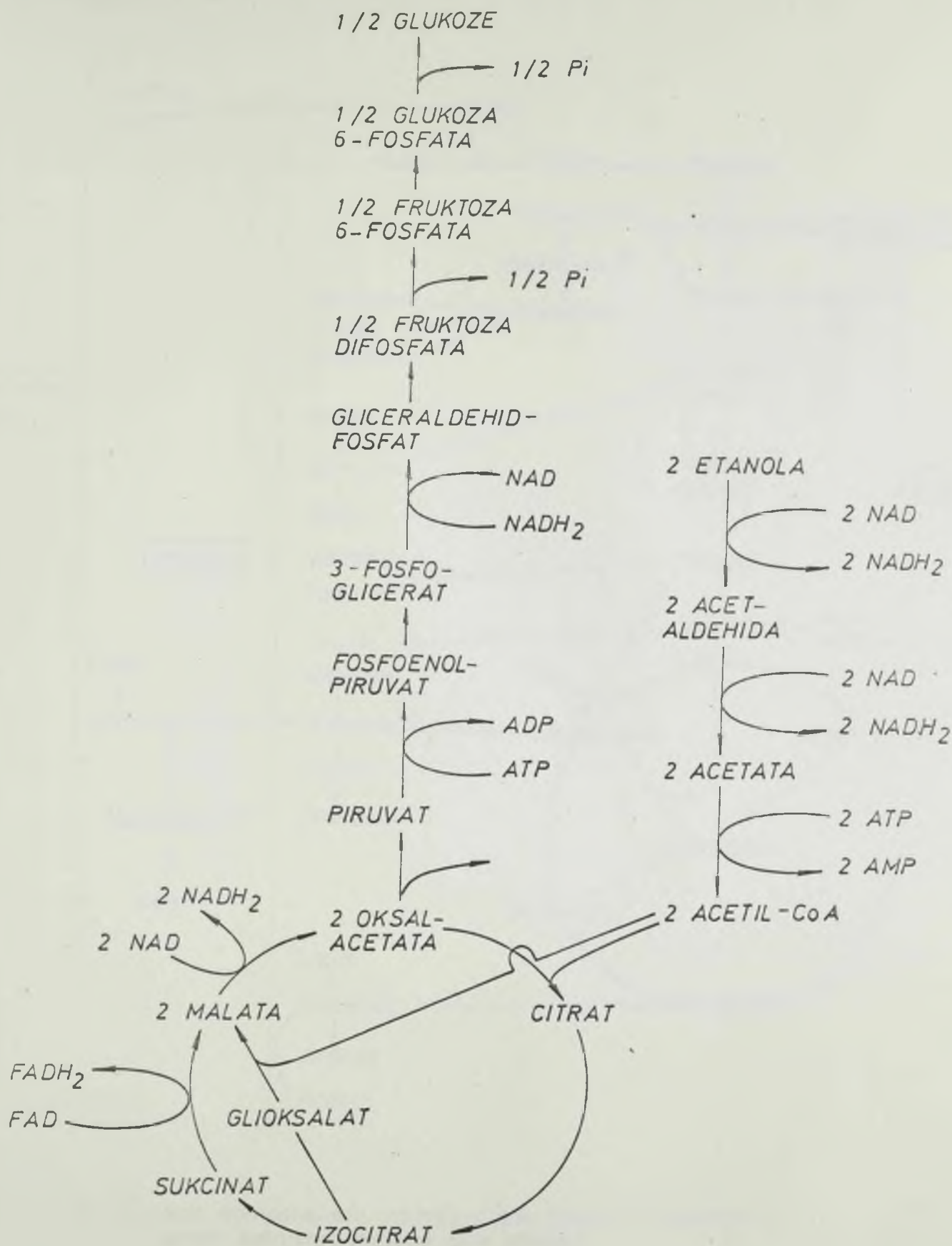
Za ovaj rad interesantno je navesti reakcije koje vode

- od etanola do prekursora

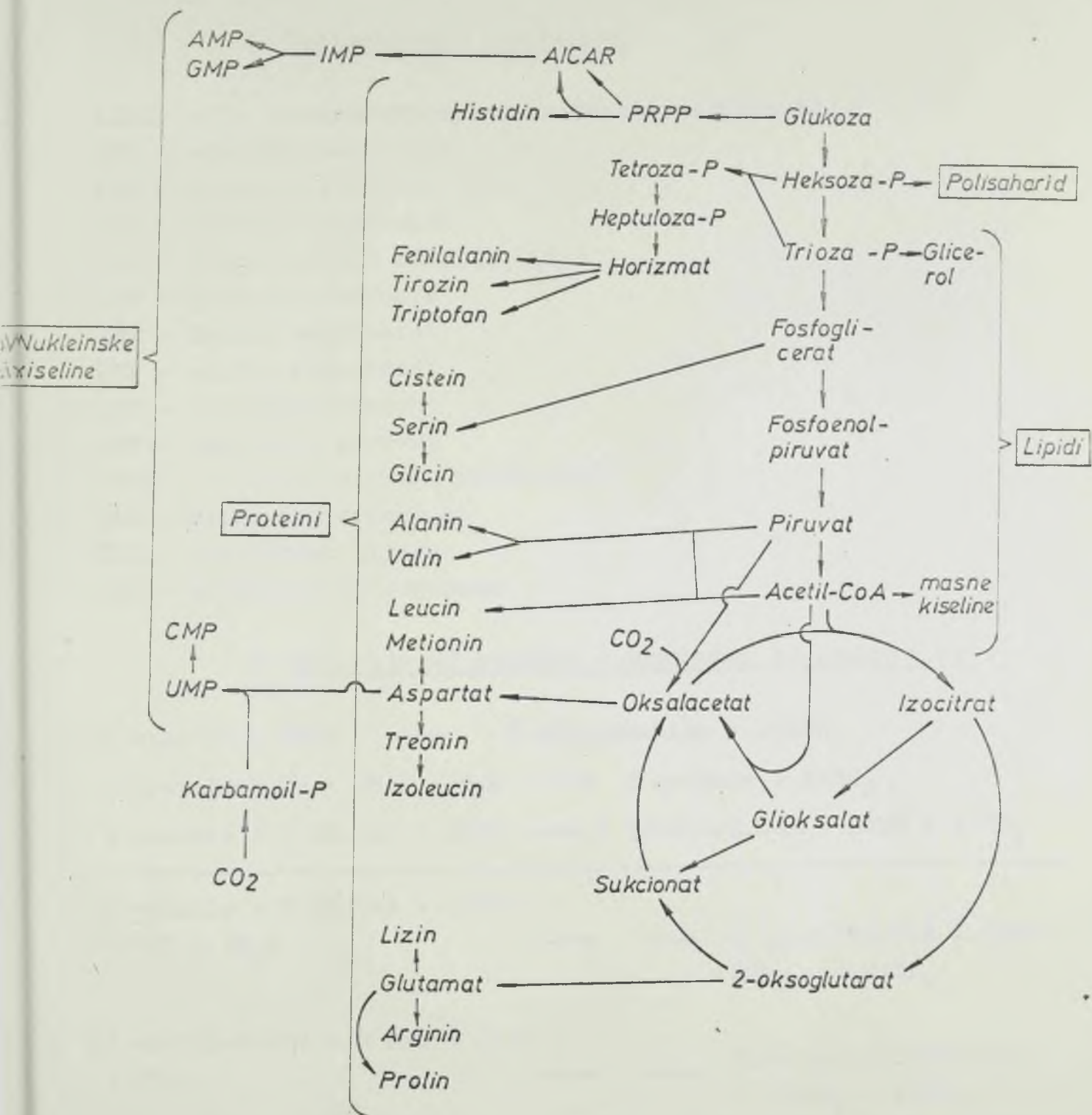
- reakcije od prekursora do monomera.

3. Opšti principi

Treba naglasiti da će se u daljem tekstu umesto kiselina uzeti nazivi solii kiselina; tako acetat i sukcinat označavaju sirćetnu i ćilibarnu kiselinu i slično za druge kiseline. Korišćene su takodje skraćenice koje je preporučio "Biochemical Journal". Kod prikaza jednačina reakcija, puna strelica znači direktnu reakciju, a dve strelice zbirnu reakciju mnogih reakcija.



Sl. 15: Glukoneogeneza iz etanola u kvascu

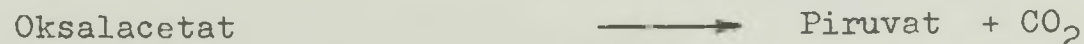
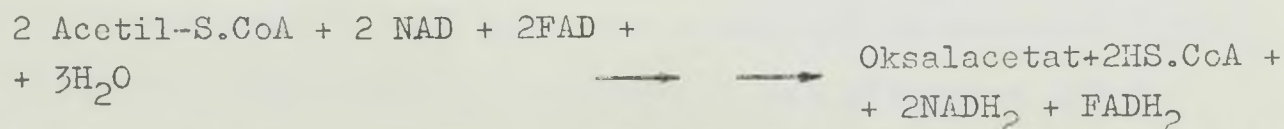
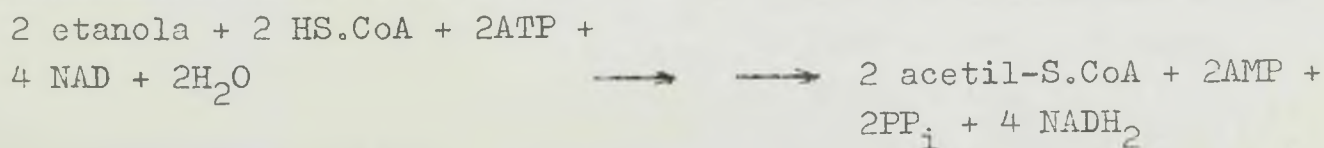
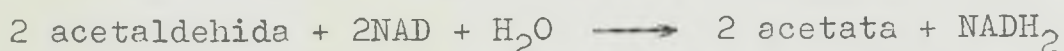
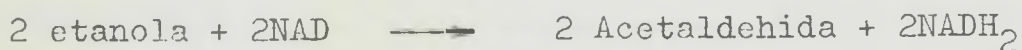


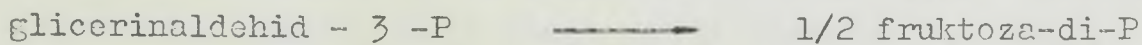
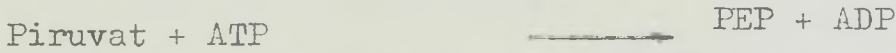
Sl. 16: Veza komponenta materije čelija kvasca i intermedijarnih jedinjenja metabolizma glukoze

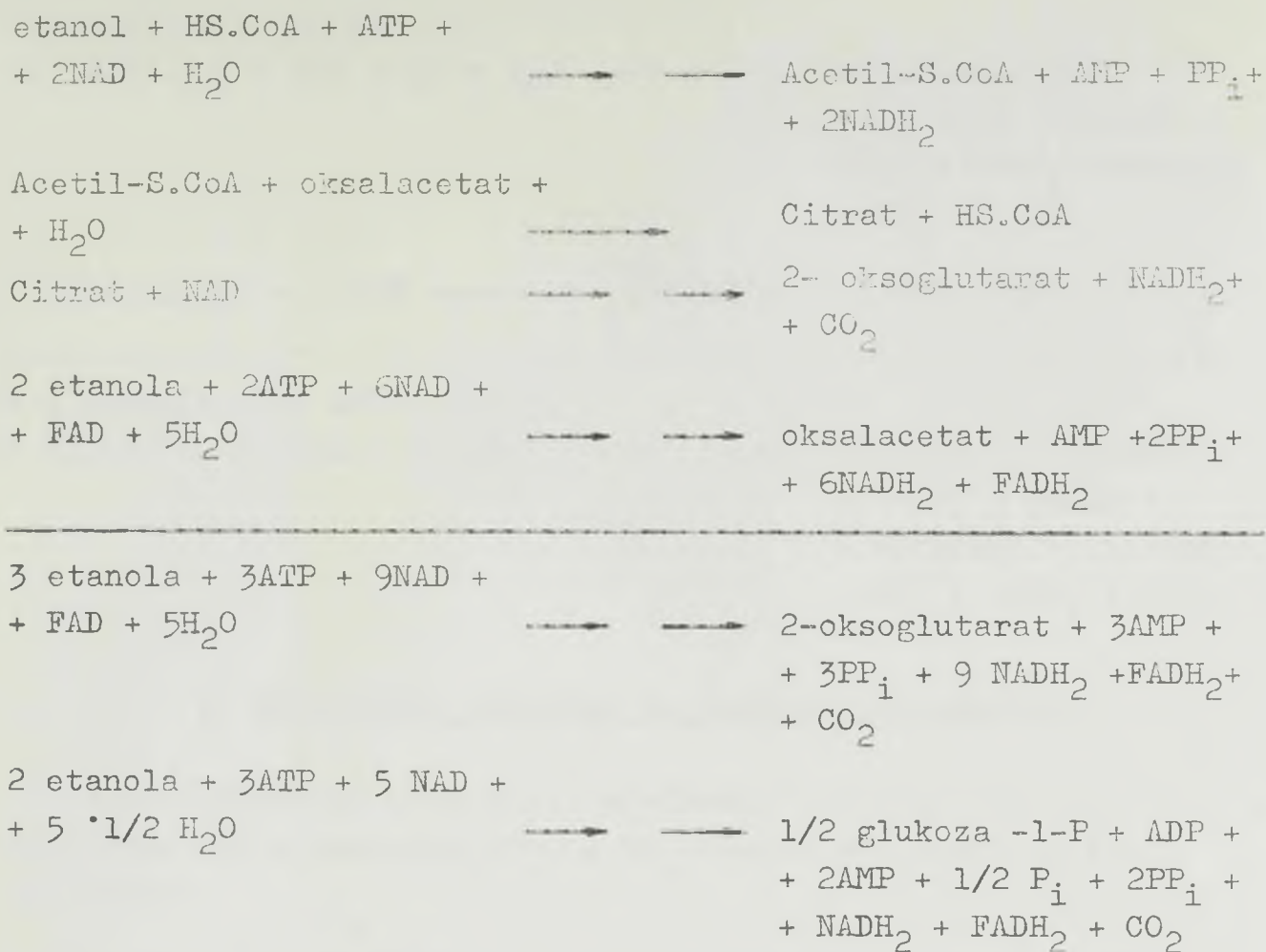
4. Upotrebljene skraćenice

AICAR - 5 - phosphorybosyl-5-imidazole-carboxamide
AMP - adenzin monofosfat
ADP - adenzin difosfat
ATP - adenzin trifosfat
FAD - flavin adenin dinukleotid
GMP - gvanozinmonofosfat
IMP - imidin monofosfat
UMP - uridin monofosfat
CPM - citidinmonofosfat
PEP-- fosfoenol piruvat
PRPP - - 5-fosforibozil pirofosfat
MDH - malat dehidrogenaze
ICL - izo-citrat lijaza
ADH - alkohol hedidrogenaza

5. Reakcije od etanola - supstrata do prekursora



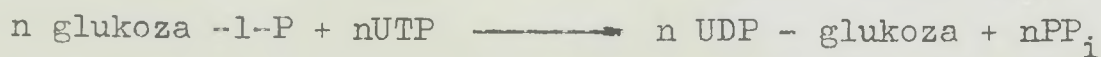




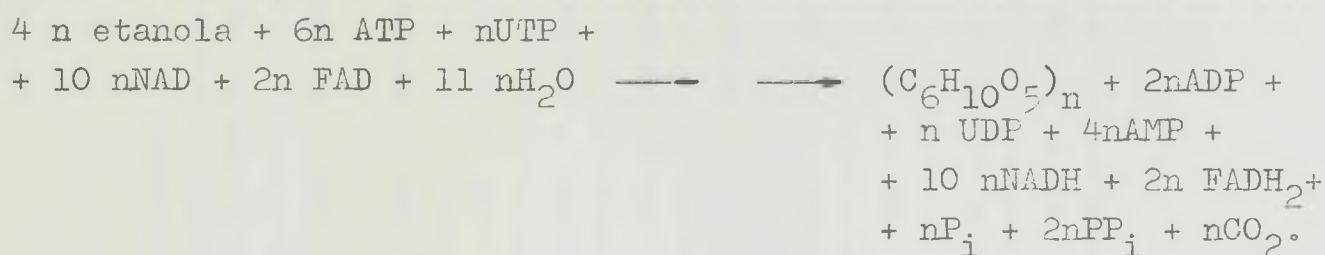
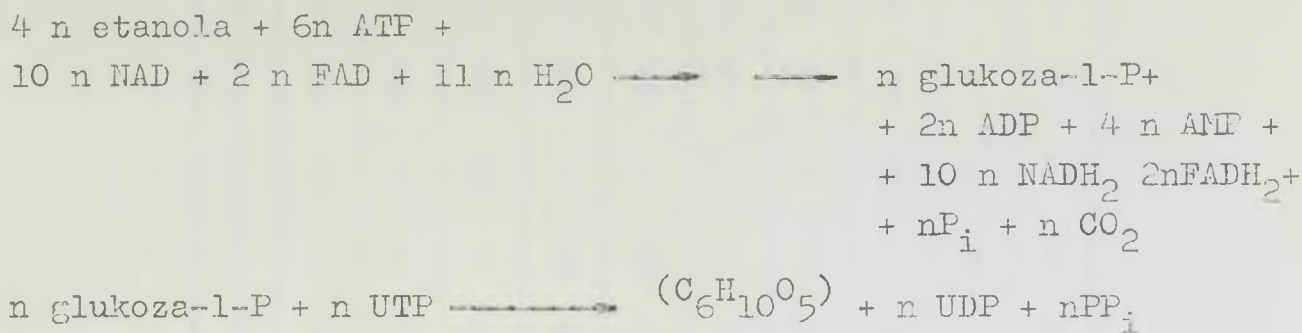
Ovim nizom jednačina pokazano je kako se iz etanola može dobiti glukoza.

6. Nastajanje polisaharida od etanola

Usvojeno je da jednačine predstavljaju nastajanje polisaharida kvasca, koji imaju opštu formulu $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$:

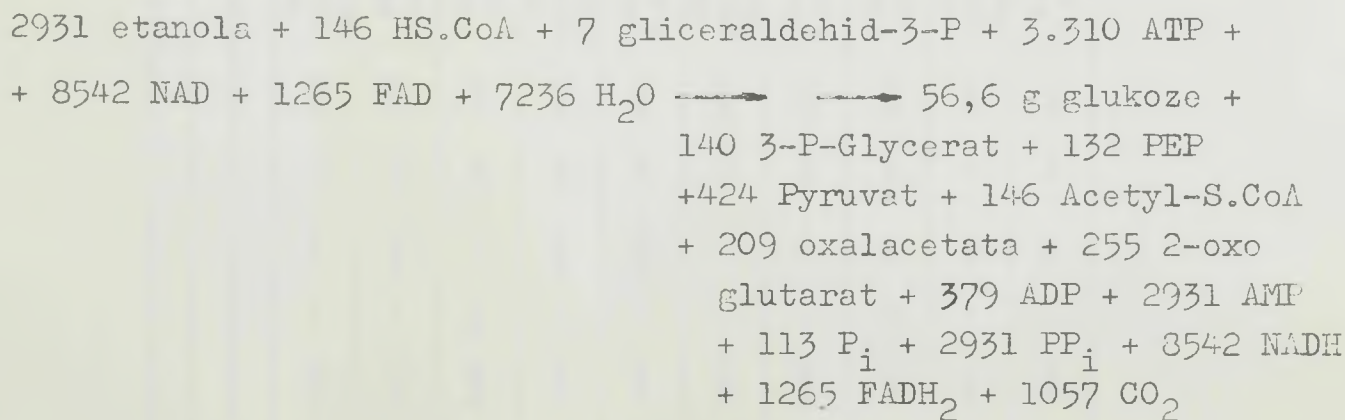


Ako se kao supstrat koristi etanol nastajanje polisaharida odvijace se prema sledecim reakcijama:



7. Formiranje proteina iz etanola kao supstrata

Jednačina koja sledi predstavlja zbirnu formulu za dobijanje 100 g proteina kvasca iz etanola kao jedinog izvora ugljenika:



U tabeli 3 date su kompletno izračunate jednačine za nastajanje pojedinih komponenata kvasne ćelije. U prvih pet rubrika date su jednačine nastajanja 100 g ugljenih hidrata iz etanola, 100 g proteina iz etanola, 100 g RNA iz etanola, 100 g neutralnih lipida i 100 g fosfolipida. Nakon toga sledi potreba etanola da se stvori 39,1 g ugljenih hidrata, 39 g proteina, 10,8 g RNA, 2,5 g neutralnih lipida i 4,5 fosfolipida koliko je nadjeno da prosečno sadrži ovih jedinjenja 100 g suve materije

TABELA 3

OPŠTE REAKCIJE OD ETANOLA DO FORMIRANJA GLAVNIH SASTOJAKA PEKARSKOG KVASCA

Et OH • Form • NH ₃ • H ₂ SO ₄ • ATP • GTP • UTP • CTP • NAD • NADP • NADPH ₂ • FAD • H ₂ O → JEDINJENJE • Form • ADP • GDP • UDP • AMP • CMP • P _i • PP _i • NADH ₂ • NADP • NADPH ₂ • FADH ₂ • CO ₂ • H ₂ O																												
2467	—	—	—	3701	—	617	—	6168	—	—	1234	6785	100g ugljenih hidrata	—	1234	—	617	2467	—	618	3094	6168	—	—	1234	1234	—	
2931	—	1205	14	5022	934	—	—	8722	—	1692	1265	7195	100g proteina	43	938	934	—	4034	—	1872	4094	8722	1692	—	—	1265	1374	—
1872	146	1135	—	5522	73	—	—	5304	531	—	936	6200	100g RNA	—	3336	73	—	2186	—	2341	2569	5304	—	531	936	936	—	
3223	—	—	—	5927	—	—	—	6446	—	4874	130	3743	100g neutralnih lipida	—	2704	—	—	3223	—	2704	3223	6446	4874	—	—	130	130	—
2873	—	98	—	5188	—	—	125	5641	—	4013	308	3710	100g P-lipida	—	2315	—	—	2873	125	2189	2999	5641	4013	—	—	308	308	—
965	—	—	—	1447	—	241	—	2412	—	—	482	2653	31,9g ugljenih hidrata	—	482	—	241	965	—	241	1206	2412	—	—	—	482	482	—
1142	—	470	6	1957	364	—	—	3399	—	659	493	2804	39,0g proteina	17	366	364	—	1591	—	729	1591	3399	659	—	—	493	536	—
202	16	122	—	596	8	—	—	572	57	—	101	636	10,8g RNA	—	370	8	—	236	—	253	277	572	—	57	101	101	—	
81	—	—	—	148	—	—	—	161	—	122	3	94	2,5g neutralnih lipida	—	68	—	—	81	—	68	81	161	122	—	—	3	3	—
129	—	4	—	233	—	—	6	254	—	181	14	167	4,5g P-lipida	—	104	—	—	129	6	99	135	254	181	—	—	14	14	—

kvasca (tabela 2 četvrta kolona).

Treba pomenuti da se promene energetske važnih jedinjenja datih u tabeli 3, odnose samo na formiranje primarnih struktura polimera.

U tabeli 4 prikazane su energetske promene koje se dešavaju u toku sinteze ćelijskog sadržaja kvasca iz različitih glavnih jedinjenja formiranih iz glukoze i etanola.

Tabela 4

Energetske promene (izražene u molovima ATP-a) u toku sinteze 100 g svake od glavnih komponenata i 100 g suve materije kvasca

Komponenta	Formiranje iz	Formiranje iz
	glukoze	etanola
	<u>mola ATP-a/100 g</u>	<u>mola ATP-a/100 g</u>
	<u>komponente</u>	<u>komponente</u>
Ugljeni hidrati	- 1,23	+ 7,28
Proteini	- 1,95	+ 5,72
Ribonukleinske kiseline	- 1,07	+ 5,08
Neutralni lipidi	+ 2,01	- 5,92
Glicerol fosfatidi	+ 0,04	- 4,63
Kvasac	- 1,18	+ 5,26
Polimerizacija	- 2,36	- 2,36

Kako se iz tabele 4 vidi - za stvaranje - sintezu 100 g suve materija kvasca iz glukoze kao supstrata potrebno je 1,18 molova ATP-a, dok je za sintezu 100 g suve materije iz etanola kao supstrata potrebno da stoji na raspolaganju 5,26 molova ATP-a.

Medjutim, ove vrednosti su samo teorijske, izračunate iz jednačina materijalnog i energetskog bilansa. Ako bi se iz ovih vrednosti izračunao Y_{ATP} za kvasac Saccharomyces cerevisiae dobila bi se vrednost $Y_{ATP} = 19,01$ g suve materije kvasca po g molu ATP-a, ako se kao supstrat koristi etanol.

Vrednosti koje je dobio VON MEYENBURG (1969) za oksidativni rast kvasca Saccharomyces cerevisiae na etanolu kao jedinom izvoru ugljenika za $Y_{ATP} = 6,8 - 7,2$ g suve materije/g molu ATP-a. Njegovi rezultati pokazuju da je etanol manje efikasan izvor ugljenika nego što je glukoza, jer je za Y_{ATP} na glukozu dobio vrednost od $Y_{ATP} = 12$. Razlog tome je, prema VON MEYENBURGU (1969), što je, verovatno, potrebno više energije za put glukoneogeneze iz etanola. Dalje smatra da je potrebno aktivirati svaku molekulu etanola uz učešće ATP-a posle oksidacije etanola do acetata i pre ulaska u TCA ciklus putem sporednog gliksilatnog metaboličkog puta. VON MEYENBURG (1969) smatra da je u ovom slučaju upotrebe etanola kao izvora ugljenika tri puta veći "gubitak energije" za aktivaciju supstrata, nego kada se kao izvor ugljenika upotrebljava glukoza.

Istim problemom ispitivanja efikasnosti različitih supstrata bavila se LUGANAS (1973) i došla je do rezultata za Y_{ATP} upotrebom etanola kao izvora energije i ugljenika za kvasac Saccharomyces cerevisiae $Y_{ATP} = 4,0$ g suve materije kvasca po g molu ATP-a, dok je za kvasac uzgajan na glukozu pod aerobnim uslovima, dobila vrednosti za $Y_{ATP} = 7,5 - 12$ g suve materije kvasca po g molu ATP-a (što je zavisilo od starosti kulture kvasca).

HERNANDES i JOHNSON (1967) uzgajali su kvasac Candida utilis, pod aerobnim uslovima, na etanolu i acetatu, i iskorišćenje kiseonika je bilo niže nego kada je ovaj kvasac uzgajan na glukozu kao izvoru ugljenika. Najvišu vrednost koju su dobili za Y_{ATP} , pod pretpostavkom da je $P/O = 3$, je bila $Y_{ATP} = 5$. Oni su protumačili ovako nisku vrednost za Y_{ATP} kao posledicu toga da je prilikom upotrebe ovih supstrata potrebno mnogo više energije nego što se dobija potreba izračunata iz poznatih puteva biosinteze.

8. Energija potrebna za održanje

Prema STOUTHAMER-u i BETTENLAUSSEN-u (1973) smatra se da je energija potrebna za održanje jednog mikroorganizma karakteristična za taj mikroorganizam. Prema VON MEYENBURG-u (1969) energija potrebna za održanje kod kvasca Saccharomyces cerevisiae iznosi 1,57 m mola ATP-a po g suve materije i času. HARRISON (1967; 1969) je definisao ovu energiju za kvasac koji se uzgaja aerobno kao 0,1 g šećera/g s.m./h, dok je VAN UDEN (1971) ovu energiju definisao kao specifičnu brzinu održanja koja ima vrednost $0,012^{-1}$ za Saccharomyces cerevisiae.

9. Energija potrebna za druge svrhe

Pokazalo se da je razlika vrednosti eksperimentalno utvrđenih za Y_{ATP} i vrednosti koje se dobijaju izračunavanjem Y_{ATP}^{max} može objasniti činjenicom da je energija potrebna ćeliji i za druge svrhe osim za stvaranje nove ćelijske mase. Ako se uzmu u obzir potrebe energije za procese transporta supstrata i energije potrebne za održanje života, još uvek se dobije velika razlika. Ova razlika u potrebi energije može se objasniti kao potreba ćelije za organizovanje struktura unutar ćelija i čini se da je za ove potrebe potrebno utrošiti veliki deo energije (OURA, 1972).

IV ZAVISNOST ENERGETSKIH POTREBA MIKROBNIH ĆELIJA OD IZVORA UGLJENIKA

STOUTHAMER (1973) se bavio izučavanjem (između ostalog) i problema energetskih promena do kojih dolazi u toku rasta mikroorganizama na supstratima kao što su na primer: laktat, malat i acetat. Za naša istraživanja interesantni su zaključci do kojih je došao u vezi uzgajanja ćelija na acetatu. Da bi se jedan supstrat izučavao potrebno je poznavati puteve njegovog metaboliziranja. Kako se etanol asimiluje na taj način što se oksidiše preko acetaldehida do acetata, značajno je

navesti zaključke koje je izneo STOUTHAMER za primenu acetata kao izvora energije i ugljenikovih atoma za mikrobnu ćeliju. Formiranje jednog mola dikarbonske kiseline sa četiri ugljenikova atoma odvija se iz dve molekule acetil-CoA za šta je potrebno da se utroši 4 mola ATP-a, i to dva mola za transport acetata u m. ćeliju, i dva mola za prevodjenje acetata u acetil-CoA. Rezultate izračunavanja STOUTHAMER-a (1973) dajemo u tabeli 5.

Tabela 5

Utrošak ATP-a za formiranje mikrobnih ćelija iz laktata, malata, acetata i neorganskih soli

Makromolekule	Utrošeni ATP (molax 10^{-4} /g ćelija)		
	Laktat	Malat	Acetat
Polisaharidi:			
G -6-P formiranje	61	41	82
polimerizacija	10	10	10
Proteini:			
formiranje amino kiselina	148	94	236
polimerizacija	191	191	191
Lipidi	27	25	50
RNA			
formiranje nukleozidmonofosf.	62	47	78
polimerizacija	9	9	9
DNA			
formiranje deoksi nukleozid fosfata	14	11	17
polimerizacija	2	2	2
"turnover" mRNA	14	14	14
Ukupno:	538	444	689

Utrošak ATP-a za procese
transporta:

Izvor ugljenika	148	148	254
Amonijum joni	42	42	42
Kalijumovi joni	2	2	2
Fosfat	8	8	8
<hr/>			
Ukupni utrošak ATP-a	738	644	995
$Y_{ATP}^{max} = \frac{10.000}{\text{ukupno utrošeni ATP}}$	13,4	15,4	10,0

Kako se iz izračunatih vrednosti, datih u tabeli 5 vidi, potrebno je mnogo više utrošiti ATP-a da se formira ćelijski materijal iz laktata, a slično je potrebno i za formiranje ćelijskog materijala iz acetata i laktata. Za glukozu je, naime, STOUTHAMER (1973) izračunao da je po gramu suve materije potrebno utrošiti $347,1 \times 10^{-4}$ mola ATP-a. Imajući ovo u vidu autor je zaključio da, između ostalog, ova razlika u utrošku ATP-a potiče od potrebe laktata, malata i acetata da budu transportovani u ćeliju i da se pri tome troši velika količine energije. Međutim, da bi se znale potrebne količine utroška ATP-a za procese transporta, potrebno je da se znaju još mnogi podaci. Kada ti podaci budu poznati moći će da se izvrši korekcija izračunatih vrednosti datih u tabeli 5.

STOUTHAMER (1973) je izračunavao vrednosti za P/O za različite supstrate koji stoje na raspolaganju mikrobnj ćeliji kao izvor energije i ugljenika. U respiratornom lancu su prisutna tri mesta fosforilacije: to su mesta za oksidaciju $NAD-H_2$, ali za oksidaciju malata i sukcinata postoje samo dva mesta za oksidaciju. U toku oksidacije glukoze radi uporedjenja, oksidiše se više $NADH_2$ nego u toku oksidacije intermedijera ciklusa trikarbonskih kiselina. To znači da će odnos P/O za oksidaciju glukoze biti viši nego za oksidaciju intermedijera ciklusa trikarbonskih kiselina. Treba još jednom naglasiti, da je potrebno količinu utroška ATP-a za transport jedinjenja u ćeliju oduzeti od količine stvorenog ATP-a oksidativnom fosfo-

rilacijom. Prilikom upotrebe acetata kao izvora ugljenika, potrebno je, takodje, oduzeti količinu ATP-a koja je potrebna da prevede acetat u acetyl-CoA. Inajući sve ovo u vidu, ukupna količina proizvedenog ATP-a predpostavljajući puno energetske vezivanje na svakom mestu fosforilacije i deleći ovu vrednost sa vezivanjem kiseonika, dobija se P/O za glukozu: 3,00, za malat P/O = 2,50, za sukcinat P/O = 2,43 a za acetat P/O = 2,25. HERNANDEZ i JOHNSON (1967) su u svome radu dali interesantnu zavisnost izmedju brzine rasta, uslova rasta i vrednosti Y_0 za kvasac Candida utilis. Njihovi rezultati dati su u tabeli 6.

Tabela 6

Uticaj brzine rasta i uslova rasta na vrednost Y_0
kod Candida utilis

Uslovi rasta	Y_0 g ćelija/g atomu O	(h ⁻¹)
Glukoza	21,1	0,30
Glukoza + amino kiseline	21,4	0,68
Acetat	11,2	0,30
Acetat + amino kiseline	13,0	0,43
Etanol	9,8	0,20
Etanol + amino kiseline	14,4	0,38

Znajući sve ove okolnosti koje utiču na parametre rasta prilikom njihovog izračunavanja, moraju se svi navedeni uticaji uzeti u razmatranje.

V ZAVISNOST AKTIVNOSTI ENZIMA KVASCA OD USLOVA RASTA

1. Efekat glukoze na aktivnost enzima kvasca

Mehanizam koji kontroliše tip metabolizma u kvasnim ćelijama naziva se Pasterov efekat (OURA, 1972). Pasterov efekat se objašnjava na nekoliko različitih načina. SCLC, CANCERO i DELA FUENTE (1971) su objavili da je Pasterov efekat uslovljen prisustvom kiseonika u hranljivoj podlozi u kojoj se uzgaja kvasac. Medjutim, OURA (1972) je dokazao, da su istraživanja povezana sa ovim efektom dobijena sa ćelijama kvasaca koji se ne razmnožavaju (nije neophodan kiseonik).

U toku aerobne razgradnje šećera (glukoze, veliki deo hemijske energije se troši na eliminaciju etanola iz ćelije, ili drugih nizprodukata). Očigledno je da bi ćelija, ukoliko bi mogla da oksidiše glukozu do ugljen-dioksida i vode, stvarala znatno više energije po jedinici utrošenog šećera. Posledica toga je, da kad god je moguća oksidacija, ćelija koristi glukozu manjom brzinom nego pod anaerobnim uslovima. Ovo smanjenje brzine iskorišćenja glukoze je najosnovniji i vrlo složen problem regulacije metabolizma, koji se uopšte naziva "Pasterov efekat". Nasuprot potpunog razumevanja svrhe Pasterovog efekta, dugo se nije postiglo razumevanje ove pojave.

Da bi se mogao razumeti Pasterov efekat, potrebno je znati da postoji negativni Pasterov efekat ("Crabtree" - efekat; 1929). Do pojave ovoga efekta dolazi pod aerobnim uslovima kada se u hranljivoj podlozi nalaze velike koncentracije glukoze. Pod tim uslovima, metabolizam ćelija kvasca je anaeroban, i odvija se najvećim delom preko neoksidativnog formiranja etanola.

Ako je koncentracija glukoze veća od 1%, kod vrsta Saccharomyces, Pasterov efekat nije više efikasan. Čak i u prisustvu vazduha degradacija glukoze, kod povećanih koncentracija ide skoro potpuno putem alkoholne fermentacije. Neke vrste Saccharomyces razgradjuju glukozu glikolitskim putem do etanola, a zatim se adaptiraju na aerobnu asimilaciju etanola. Ovaj efekat povećane koncentracije glukoze na kvasac naziva se "negativni

Pasterov efekat" ili "Crabtree efekat".

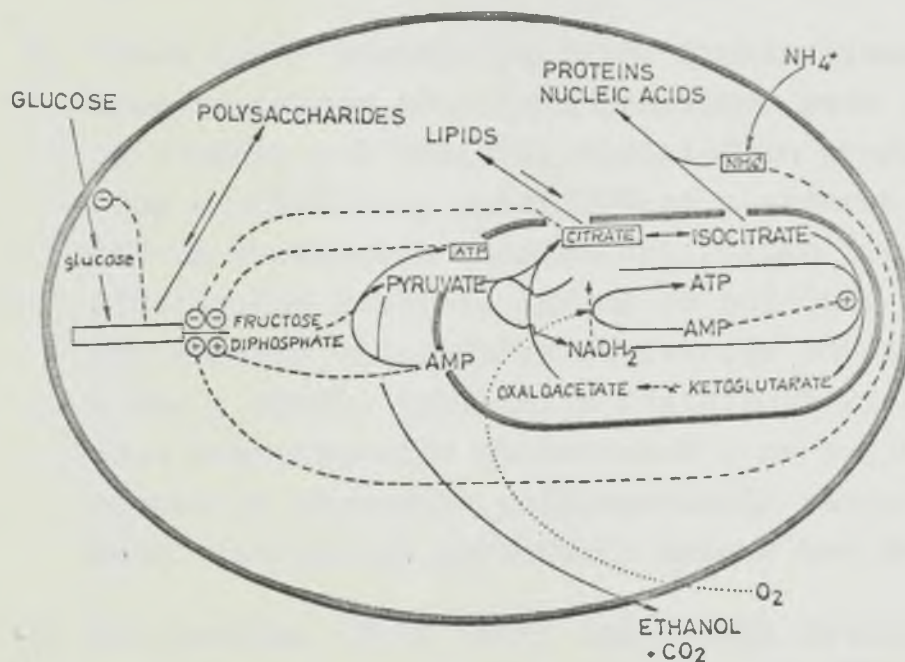
"Crabtree efekat" kod kvasca izgleda da je u korelaciji sa inhibicijom terminalne oksidacije i restrikcijom sinteze citohroma. U prisustvu povećanih koncentracija glukoze normalne mitohondrijalne strukture polagano iščezavaju, a naročito unutrašnje membrane i kriste. Nakon što aerobni metabolizam smeni anaerobnu fermentaciju, degenerisane mitohondrije dobijaju ponovo normalnu strukturu. Svaki gubitak strukture mitohondrija ćelije, ima posledicu u metabolizmu, što zajedno sa delimičnim gubitkom citohroma, može biti razjašnjenje za "Crabtree - efekat". Od velikog broja ispitivanih kvasaca, oko polovina je pokazivala "Crabtree efekat", medju kojima većina pripada rodu Saccharomyces. Ovaj efekat važi za glukozu i za fruktozu, ali je mnogo manje izrazit kod manoze i galaktoze na koji kvasci rastu sporije.

Najprihvatljivije objašnjenje za Pasterov efekat dao je SOLS i sar., (1971) bazirajući svoja objašnjenja "na trećoj dimenziji" enzimologije, odnosno razjašnjenju mehanizma specifične regulacije enzimske aktivnosti, heterotrofnim alosteričnih efekata koji uključuju povezivanje izvesnih metabolita za ključne enzime na mestima različitim od aktivnog centra (ili centara). Pored toga, posebno kod kvasaca, potpuno razumevanje ne bi bilo moguće bez razjašnjenja, koje je postignuto u poslednjoj deceniji, da je kataliziran (aktivni) transport kroz ćelijsku membranu prvi korak u iskorišćenju najvećeg broja makromolekula u ishrani ćelije, što može biti ključni podatak.

Pasterov efekat se danas može objasniti kao posledica regulatornog mehanizma, koji uključuje različite ključne enzime metabolizma glukoze. Preko ovog mehanizma moguće je precizno i momentalno prilagodjavanje brzine korišćenja glukoze metaboličkim potrebama ćelije za energijom i ugljenikovim atomima. Za razumevanje regulacije metabolizma u celom sistemu odlučujuća je činjenica da se dug put razgradnje glukoze uglavnom sastoji od dva osnovna pravca u anaerobiozi i tri u aerobiozi. Ovi putevi su sledeći:

1. od ekstracelularne glukoze do glukoza -6-P;
2. od glukoza -6-P do ATP-a i nuzprodukata ugljenika u anaerobiozi ili do ATP-a i citrata u aerobiozi i
3. od citrata do više ATP-a, CO_2 i vode.

Svaki od ovih metaboličkih puteva može biti kontrolisan alosteričnim "feed back" mehanizmom koji deluje, bilo na prvu reakciju u ciklusu, ili na prvu ireverzibilnu reakciju u svakom od ovih puteva. Pasterov efekat uključuje u sebe integrisanu seriju "feed back" mehanizama koji deluju jedan na drugog (SOLS, 1967).



Slika 17: Alosterična "feed back" regulacija metabolizma glukoze u kvascu i Pasterov efekat.

Mitochondrijsko cepanje ciklusa TCA i izvesnih metabolita je, takodje, prikazano na slici 17 "-" označava inhibiciju a "+" označava aktivaciju. Specifični regulatorni mehanizam, koji je uključen u Pasterov efekat u pekarskom kvascu, sastoji se od sledećih regulatornih stupnjeva i regulatornih metabolizama:

1. "Feed back" kontrola izocitrat dehidrogenaze koja zavisi od NAD-a, prvi je ireverzibilni stupanj u putu oksidacije citrata u TCA ciklusu, njenom zavisnošću u aktivnosti u fiziološkim uslovima od alosterične aktivacije AMP-a (HARHAWEY i ATKINSON, 1963).

Kada je nivo energije u ćeliji visok -- sa vrlo malim količnikom AMP/ATP, smanjenje aktivnosti izocitratdehidrogenaze omogućuje povećanje koncentracije citrata u ćeliji i njeno korišćenje za stvaranje rezervnih masti ili povećanje "feed back" inhibicije prenosnim putevima, kao što sledi,

2. "feed back" inhibicija fosfo frukto kinaze, prvog ireverzibilnog stupnja u normalnom putu glukolize od flukoze - 6 fosfata, fiziološkim produktima ovog metaboličnog puta; ATP-om u anaerobiczi, ATP-om i citratom u aerobiozi (SALAS i sar., 1965). Alosterična kontrola ATP-om je pojačana vrlo jakim efektom alosterične aktivacije AMP-a (SALAS i sar., 1968). Inhibicija fosfofruktokinaze povećava koncentraciju glukoza-6-P i na taj način pospešuje stvaranje polisaharidnih rezervi i "feed back" inhibiciju prethodnih puteva kao što sledi;
3. Alosterična "feed back" inhibicija kataliziranog transporta flukoze (heksoza) kroz ćelijsku membranu, prvi je korak u putu od ekstracelularne glukoze do glukoza - 6 -P (put fosfolilacije glukoze), ovim produktom navedenog puta (SOLS, 1967; HEREDIA i sar., 1968, ADAM I KOTYK, 1969).

Varijacije unutar ovog glavnog okvira za objašnjenje Pasterovog efekta mogu se razjasniti dvema karakteristikama po kojima se tkiva životinja razlikuju od kvasaca. Te karakteristike su:

- a) mitohondrijska izocitratdehidrogenaza u tkivima životinja se aktivira ADP-om pre nego sa AMP-om,

- b) "feed back" kontrola puta fosforilacije glukoze u najvećem broju životinjskih tkiva odigrava se na nivou prvog ireverzibilnog stupnja, heksokinaze, koja je u životinjskim tkivima osetljiva na alosteričnu inhibiciju glukoza -6-P (SOLS, 1968).

U aerobiozi je najveći deo piruvata usmeren ka potpunoj oksidaciji preko acetil-CoA. Do skretanja dolazi uz smanjenje stepena potrošnje glukoze. Očigledna promena količine stvorenog ugljen-dioksida se povezuje sa fundamentalnim smanjenjem stepena degradacije glukoze.

Represivni efekat glukoze ne zaustavlja se samo na enzimatskom nivou nego, takodje, utiče i na strukturu ćelije delujući represivno na formiranje mitohondrija (ROODYN i WILKIE, 1968; LINNANE i HALSAM, 1970; SCHATZ, 1970). Pored toga, glukoza vrši represiju na formiranje mitohondrijalne DNA (BLEEG i sar., 1972; NAGLEY i LINNANE, 1972) i promitohondrijalnu sintezu proteina (GROOT, ROUSLIN i SCHATZ, 1972).

Promene koje se dešavaju u aktivnostima enzima TCA ciklusa kada jedan fakultativni mikroorganizam, kao što je kvasac, biva adaptiran na aerobnu formu metabolizma su već dobro potvrđene. Značajno povećanje aktivnosti dokazano je, na primer, na enzimima koji vrše kondenzaciju citrata u izocitrat dehidrogenazi, koja je povezana sa NAD-om, fumarazi, malat dehidrogenazi i glutamat dehidrogenazi, koja je takodje povezana sa NAD-om (POLAKIS i BARTLEY 1965; WITT, KRONAU i HOLZER 1966; GOTS, 1967; CHAMPAN i BARTLEY, 1968; BECK i VON MEYENBURG, 1968). Ovo povećanje aktivnosti navedenih enzima pokazuje, da za vreme prve faze eksponencijalnog rasta najveći broj enzima TCA ciklusa do nivoa 2-keto glutarata je prilično aktivno, dok ostali enzimi ovog ciklusa nisu prisutni (POLAKIS i BARTLEY, 1965). Ovo se slaže sa anaboličkom prirodom ovog ciklusa i ukazuje da se on u ovom slučaju, pre svega, koristi za stvaranje intermedijernih jedinjenja za sintetske procese (NURMIMEN I SUOMALAINEN, 1968).

Kada se kultura kvasca adaptira na aerobni metabolizam, dolazi do pojave aktivnosti enzima gliksilatnog puta (poprečnog metaboličkog puta (POLAKIS i BARTEY, 1965; WITT i sar.,

1966 a; GOS, 1967; BECK i VON MEYENBURG, 1968; CHAPMAN i BARTEY, 1968), što ukazuje da ovaj put služi za regeneraciju oksalacetata i spreman je da dalje funkcioniše.

Pretpostavlja se da su glikolitski enzimi kvasca konstitutivne prirode, uglavnom sa visokom aktivnošću i da pokazuju male varijacije u aktivnosti, sa promenama u okolnoj sredini, u odnosu na respiratorne enzime. Međutim, pokazalo se da aktivnost ovih enzima zavisi u izvesnoj meri od količine glukoze i brzine glikolize.

Interesantno je proučavanje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze. Alkohol dehidrogenaza prema HEICK-u (1972) igra centralnu ulogu u metabolizmu kvasca. Proizvodnja etanola, krajnjeg proizvoda glikolize, zavisi od prisustva aktivnosti ovoga enzima, slično kao i korišćenje etanola kao izvora energije i ugljenika za rast.

U pekarskom kvascu postoje najmanje tri izo enzima alkohol dehidrogenaze koje zavese od nikotin adenin dinukleotida. Alkohol dehidrogenaza I je prisutna u toku eksponencijalne faze rasta na glukozi. Tokom dugog rasta na glukozi, ili tokom rasta na etanolu, pojavljuje se aktivnost drugoga enzima alkohol dehidrogenaze II. Oba ova navedena enzima su ekstra mitohondrijalna. Alkohol dehidrogenaza III sreće se u mitohondrijama, kako u ćelijama koje rastu na glukozi, tako i u ćelijama koje rastu na etanolu (HEICK i sar., 1969. HEICK (1972) je ispitivao uticaj nedostatka respiracije na aktivnost alkohol dehidrogenaze kod pekarskog kvasca. Autor je dobijao respiratorne deficijente reverzibilno (dodavanjem hloranfenikola u hranljivu podlogu) i uslovljene mutacijom izazvanom pomoću akriflavina. Ove ćelije sa nedostatkom respiracije, kao izvora ugljenika za rast, nisu mogle da koriste etanol. Znači, došlo je do inaktivacije alkohol dehidrogenaze II. Pored toga što su ovi antibiotici negativno delovali na alkohol dehidrogenazu II, smanjili su aktivnost i izocitrat lijazi, enzimu glioksilatnog ciklusa. Nakon izvršenih eksperimenata, HEICK je zaključio, da se ni jedna od dehidrogenaza etanola koje zavise od NAD^+ ne mogu posmatrati kao konstitutivni enzimi kod kvasca Saccharomyces cerevisiae. Dalje je

zaključio, da faktori, koji utiču na aktivnost alkohol dehidrogenaze II, utiču i na aktivnost izocitrat-lijaze.

YOTOSUYANAGI (1962) je zapazio da tokom rasta na glukozu dolazi do razvitka mitohondrija u ćelijama pekarskog kvasca pre nego što nastupi sekundarna faza rasta na nakupljenom etanolu. Rezultati HEICK-a (1972) ukazuju da do formiranja alkohol dehidrogenaze II i izocitrat lijaze dolazi tek nakon što kvasac stekne sposobnost respiracije. Ovo obavezno razvijanje izvesnih mitohondrijalnih funkcija pre pojave sistema glukoneogenaze, takodje je pretpostavljeno i na osnovu rada koga su objavili SZABO i AVERS (1969).

Znači da aktivnost alkohol dehidrogenaze II i izocitrat lijaze znatno varira zavisno od stanja razvitka mitohondrija.

Izvestan broj drugih radova MAITRA i LABO, 1971; HOMMES, 1966) ukazuju da alkohol dehidrogenaza u kvascu biva represirana glukozom.

2. Efekat kiseonika na aktivnost enzima kvasca

Teško je oceniti stepen do koga prisustvo kiseonika, ili odsustvo glukoze utiče na indukciju respiratornih enzima.

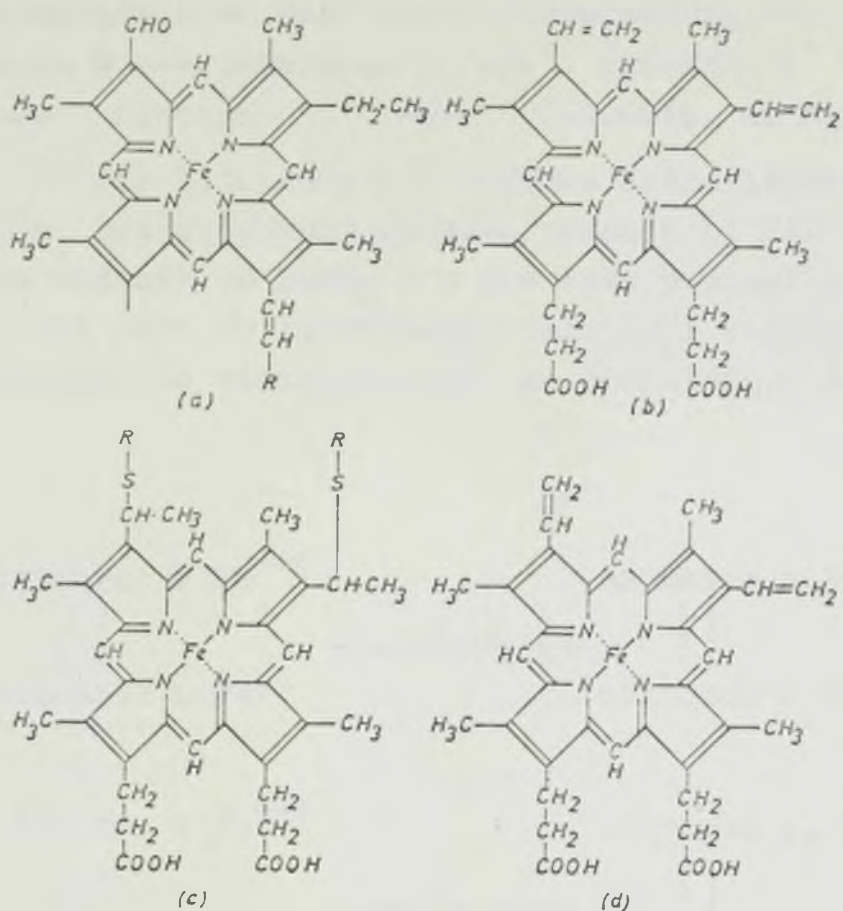
CHAPMAN i BARTLEY (1968) su ispitivali efekat kiseonika na glikolitsku adaptaciju. Oni su zasejali kvasac i uzgajali ga aerobno i anaerobno sa visokom koncentracijom glukoze. Pri ovakvim uslovima ogleda, deo enzima TCA ciklusa i glioksi-latnog metaboličkog puta pokazivao je sličnu aktivnost. Najveće razlike su pronadjene u aktivnosti enzima koji su najbliže povezani sa sistenom za transport elektrona. Glukoza, čak i pri visokim koncentracijama (30%), nije u stanju da blokira formiranje citohroma u potpunosti (REILLY i SHERMAN, 1965).

Kiseonik nije uključen u stvarne reakcije TCA ciklusa ili u druge reakcije koje su opisane. Vodonik koji se uklanja iz intermedijernih proizvoda na nivou dehidrogenaza u ovom procesu se prenosi na molekularni kiseonik putem respiratornih nosača, flavoproteina, hinona i citohroma.

SLONIMSKI (1953) je objavio, da kada se Saccharomyces cerevisiae uzgaja pod striktno anaerobnim uslovima, tada nema znatnu respiratornu aktivnost i nedostaju mu citohromi aa_3 , b, i c. Normalan sistem respiratornih enzima se sintetise kada kvasac biva aerobno kultivisan.

Prema TOT-u i DAMSSCHK-u (1957) postoji odredjena koncentracija kiseonika u hranljivoj podlozi iznad koje ne dolazi do povećanja respiratorne aktivnosti. BROWN i JOHNSON (1971) su objavili podatke da je ta granica 1,5 - 5 mikromola kiseonika, a prema drugim autorima TERUI, KANNO i SASE (1960), brzina respiracije je skoro zasićena pri koncentraciji od 1 mikromola rastvorljivog kiseonika po litru hranljive podloge.

Citohromni pigmenti, porfirinska jedinjenja sa gvoždjem, srodna hemoglobinu, koja je otkrio KEILIN (1925) i dao im imena, predstavljaju esencijalne članove niza respiratornih enzima. Na slici 18 prikazana su citohromna jedinjenja sa gvoždjem iz citohroma a, b i c i hemina iz hemoglobina.



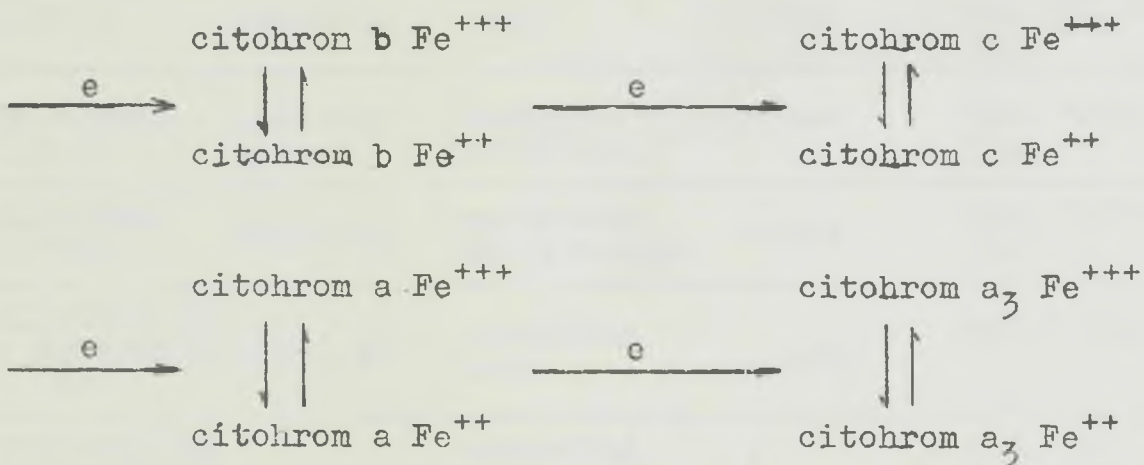
Slika 18: (a), (b) i (c) su porfirinska jedinjenja sa gvoždjem iz citohroma a, b i c; (d) je porfirin sa gvoždjem iz hemina hemoglobina.

Strukturu porfirina citohroma ispitaio je THEORELL (1958).

Na osnovu radova KEILIN-a i SLATERA (1953) i SHAN-CE (1952) poznato je, da se u toku biološke oksidacije vodonik transformiše duž lanca respiratornih jedinjenja na sledeći način:

Vodonik supstrata \longrightarrow NAD^+ \longrightarrow flavoprotein \longrightarrow (\longrightarrow ubihinon - vitamin Q \longrightarrow citohrom b \longrightarrow citohrom c \longrightarrow citohrom a \longrightarrow citohrom a_3 \longrightarrow kiseonik, uz nastajanje vode.

Učešće citohroma b i njegova tačna lokacija još uvek su u pitanju. Dehidrogenaza prenosi vodonik na NAD^+ . Flavoprotein prihvata vodonik od NADH_2 i u dve faze prenosi elektrone na citohrome, pri čemu se istovremeno oslobadja vodonični jon. Opšti put od citohroma do kiseonika može se predstaviti na sledeći način:



Prenos elektrona omogućuje promena valetnosti centralnog atoma gvoždja - porfirina citohroma. Kinetika respiratornih enzima i specifična uloga koju igraju metaloflavoproteini, porfirinska jedinjenja, hinoni, tokoferoli i metali, kod prenosa vodonika, i kod reakcije fosforilacije, još uvek su predmet mnogih istraživanja. U toku ovoga rada odabrali smo citohrome kao članove respiratornih enzima, jer je poznato da pokazuju jake apsorpcione linije u vidljivom delu spektra, što omogućuje da se promene citohromnih jedinjenja prate kod celih ćelija kvasca upotrebom spektrofotometra.

Tabela 7

Spektri citohroma kvasca

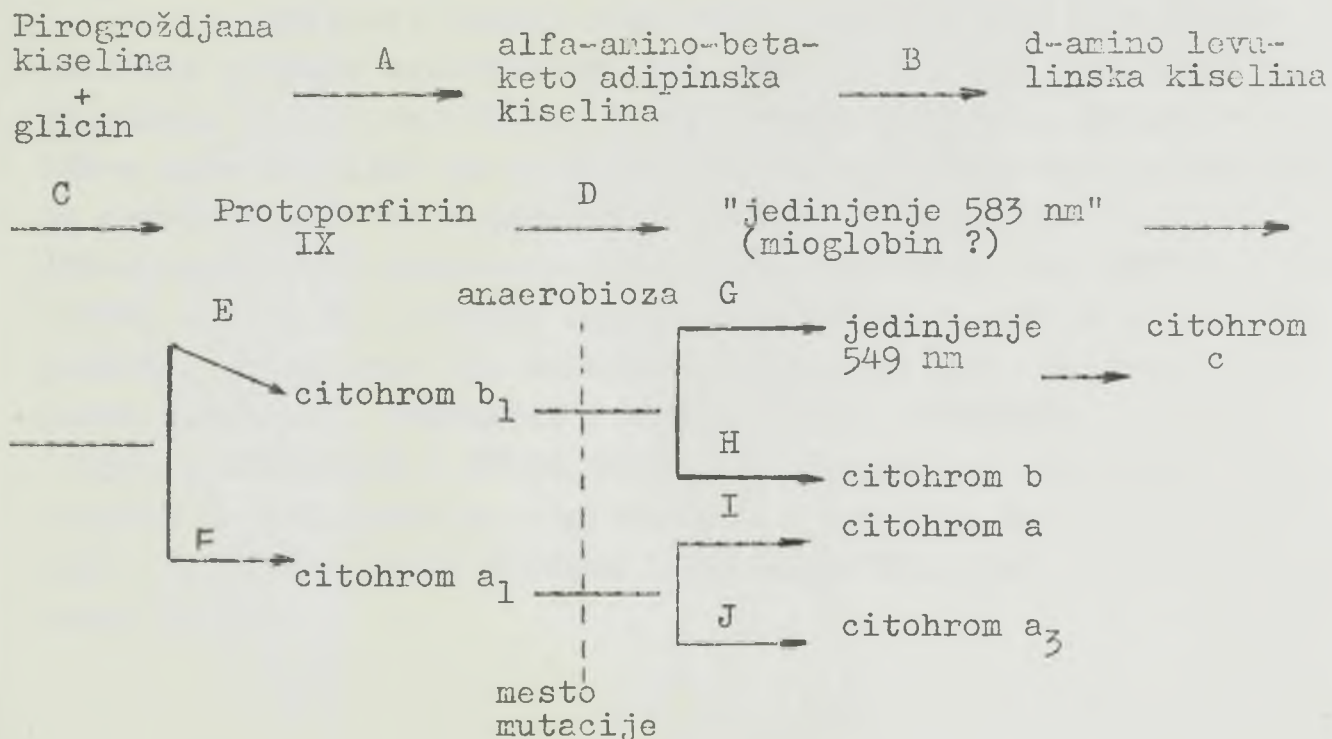
Autori	kvasac	Prethodni tretman kvasca	Temperatura ispitivanja	Apsorpcione trake talasna dužina nm
KEILIN (1953)	pekarski	bez	sobna	603, 565, 550, 523
SLONIMSKI (1953)	pekarski	bez	sobna	603, 563-564, 550-551, 532, 521
SLONIMSKI (1953)	pekarski mutant	anaerob. kultivac.	sobna	580, 549-550, 520
SLONIMSKI (1953)	pekarski	anaerobna kultivacija	sobna	580, 557-559, 530
LINDENMAYER i ESTABROOK (1958)	pekarski	anaerobni rast	-170°C	557,5 551
LINDENMAYER i ESTABROOK	pekarski	anaerobni rast i aeracija	- 170°C	603, 560, 551, 549, 525
CHAIX i HEYMAN-BLANCHET (1959)	pekarski	anaerobni rast i sakupljanje u eksponencijalnoj fazi	- 170°C	547,5; 558, 552
CHAIX i HEYMAN-BLANCHET	pekarski	anaerobni rast i sakupljanje na kraju rasta	- 170°C	630, 585, 574,5
CHAIX i HEYMAN-BLANCHET	pekarski	kao prethodni, ali nekoliko minuta aeracije	- 170°C	605, 565, 552, 550

Kako se iz tabele vidi, pod anaerobnim uslovima nema a_3 na 603 nm a apsorpciona traka ovog citohroma pojavljuje se

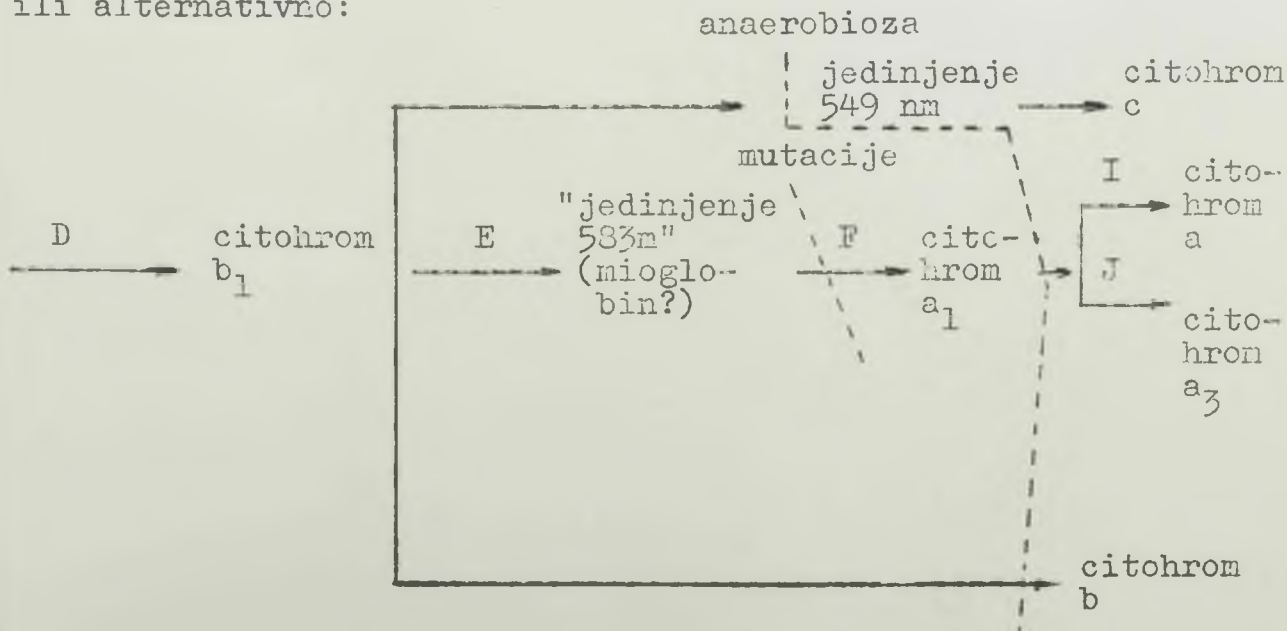
već nakon nekoliko minuta aeracije što pokazuje tok sinteze tog jedinjenja pod aerobnim uslovima.

HENNESSY (1962) je postavio sledeću radnu hipotezu puta sinteze citohroma u kvasnim ćelijama:

(1)



ili alternativno:



Mutacije mogu dovesti do blokiranja enzima na mestu F kod biosinteze citohroma aa_3 koga nema u respiratornim mutantima. U prilog ovoj pretpostavci ide i činjenica, da se kod respiratornih mutanata posle neprekidne kultivacije u prisustvu vazduha, može detektovati prisustvo citohroma b, što ukazuje da odsustvo citohroma b kod respiratornih mutanata može biti posledica male količine vezanog kiseonika izazvane odsustvom citohroma aa_3 .

Pekarski kvasac može rasti i razmnožavati se i pod uslovima potpune anaerobioze, pri čemu mu je rast ograničen raspoloživim količinama ATP-a, i može sasvim prestati ako količina ATP-a nije dovoljna za obezbedjenje energije potrebne za reakcije metabolizma. Ovo ograničenje energije raspoložive (u vidu ATP-a) može biti zamenjeno drugim izvorima energije. STIER i sar., (1950, a i b) su u svojim ogledima pokazali da ako je u podlozi prisutan ergosterin ili neka masna kiselina (kao na primer oleinska kiselina). ANDREASAN i STIER (1953); ANDREASAN i STIER (1954) i ANDREASAN i STIER (1956) su pokazali da pekarski kvasac uzgajan na podlogama sa ergosterinom i kvasnim ekstraktom može rasti približno istom brzinom u odsustvu kiseonika kao i u aerisanoj podlozi.

P O S T A V K A Z A D A T K A

P O S T A V K A Z A D A T K A

Polazeći od klasičnih postulata tehnologije proizvodnje pekarskog kvasca da se ne sme prekoračiti koncentracija etanola od 3 vol. % u toku proizvodnje matičnog kvasca, i znajući do kojih rezultata je došao DREWS i HESSLER (1967), želeli smo u ovom radu da ispitanu do kakvih promena dolazi u kvasnim ćelijama kada se uzgajaju na etanolu kao jedinom izvoru ugljenika. Tu zavisnost smo ispitali postepenim povećavanjem koncentracije etanola u hranljivoj podlozi, u kojoj smo uzgajali pekarski kvasac Saccharomyces cerevisiae pod aerobnim uslovima. U našim ranijim istraživanjima utvrdili smo (KRAJOVAN, Pejin 1972) da se etanol direktno dodat u hranljivu podlogu (egzogeni) daleko teže asimiluje pomoću ćelija kvasca (enzimske aktivnosti su niže, intenzitet disanja je smanjen) nego etanol koga su stvorile same ćelije pod anaerobnim uslovima iz glukoze.

Da bismo utvrdili kako povećanje količine stvorenog etanola utiče na metabolizam kvasnih ćelija, kada one koriste taj etanol kao izvor ugljenika i energije, izvršili smo u toku ogleđa sledeća odredjivanja:

- u toku anaerobne faze pojedinih ogleđa stvorene su odredjene koncentracije etanola koje su nam u aerobnim uslovima služile kao izvor ugljenika za kvasne ćelije,
- u toku aerobne faze ogleđa uzimali smo uzorke kvasca i vršili smo sledeće analize:
 - a) odredjivali smo metaboličku aktivnost intaktnih kvasnih ćelija na glukozi i etanolu kao supstratu Warburgovom tehnikom (UMBERT, 1970). Ovo odredjivanje imalo je za cilj da nam pokaže koji metabolički put preovladjuje u kvasnim ćelijama.
 - b) Pored toga, odredjivali smo sadržaj citohroma (respiratornih pigmenata) da bismo utvrdili zavisnost njihovog sadržaja od različitih koncentracija etanola koji se koristi kao izvor ugljenika i energije za kvasne ćelije,
 - c) da bismo konkretno mogli da utvrdimo da li je intenzitet delovanja enzima glioksilatnog ciklusa podložan uticaju koncentracije etanola u hranljivoj podlozi, odredjivali smo u toku aerobne faze ogleđa specifičnu aktivnost izocitrat lijaže enzima koji razgradjuje izocitrat. Produkt ove razgradnje,

glioksilat služi kao baza malat sintetazi da uz prisustvo acetil-CoA i glioksilata sintetiše malat koji je intermedijer TCA ciklusa.

Da bismo utvrdili da li povećanje koncentracije etanola u hranljivoj podlozi utiče na aktivnost enzima TCA ciklusa, odredjivali smo u toku svih oglada(aerobne faze) specifičnu aktivnost malat dehidrogenaze. Znajući da alkohol dehidrogenaza ima tri izoenzima (HEIK, 1971) postavili smo, iz medju ostalog, sebi zadatak da ispitamo kako zavisi specifična aktivnost ovoga enzima od koncentracije etanola u polaznoj hranljivoj podlozi, jer ovaj enzim treba da u toku anaerobne faze oglada stvori odredjene količine etanola, a zatim da ga u toku aerobne faze oglada uputi u metaboličke puteve preko acetil-CoA koji se ugradjuje preko malat sintetaze u malat (intermedijer TCA ciklusa).

U toku rada došli smo do rezultata da se sa povećanjem koncentracije etanola u polaznoj hranljivoj podlozi smanjuje respiratorna aktivnost intektnih ćelija /metabolička aktivnost (na glukozu i etanolu) i sadržaj citohroma/ što se oglada u smanjenju sposobnosti kvasnih ćelija da proizvode ugljen-dioksid iz glukoze i sposobnost da vezuju kiseonik. Pored toga smanjene su specifične aktivnosti izocitrat lijaze, alkohol dehidrogenaze i malat dehidrogenaze. Najmanje smanjenje je utvrdjeno kod enzima alkohol dehidrogenaze, što je i razumljivo, s obzirom na činjenicu da se aktivnošću ovoga enzima i stvorila visoka koncentracija etanola. Možemo, dakle, zaključiti da je primenom etanola u visokim koncentracijama (oko 11,5 vol. %) došlo do kompletnog poremećaja u metabolizmu kvasnih ćelija. Zbog toga smo, u drugom delu ovoga rada, želeći da na neki način ublažimo inhibiciju visokih koncentracija etanola, proučili skoro svu nama dostupnu literaturu o specifičnom ponašanju kvasca Saccharomyces cerevisiae, pa smo pronašli i neke rezultate oglada koje je izvršio HERING (1967).

HERING (1967) je, naime, dokazao svojim radom da kada je 6% rastvor kazeina inkubiran na 37°C uz dodatak 1 ml pljuvačke (pH sredine je bio 7,0) i nakon 24 časa, pri datim uslovima, kazein se dejstvom proteolitskih enzima pljuvačke razgradio i kao rezultat razgradnje odredjena je koncentracija nastalog tirozina (pomoću

Folin testa). Pored toga, u paralelne probe postavljene su sa dodatkom rastvoru kazeina po 1 ml acetona (u drugu probu), a u treću probu u rastvor kazeina dodato je 1 ml rastvora tripsina. Aceton u drugoj probi i tripsin u trećoj probi dodati su kao aktivatori proteolitskih enzima. Nakon isteka 24 časa, odredjen je sadržaj tirozina u sve tri probe. U uzorku u kome je dodata samo pljuvačka kao izvor proteolitskih enzima oslobodjeno je 1703 ± 152 gama tirozina, u drugoj probi (gde je uz pljuvačku dodan aceton) oslobodjeno je 2121 ± 137 gama tirozina, a u trećoj probi (gde je pored pljuvačke dodan tripsin) oslobodjeno je 2128 ± 206 gama tirozina. Kako se vidi iz iznetih rezultata HERING-a, aceton ima značajan efekat u smislu aktivacije proteolitskih enzima. Ovaj efekat je vrlo sličan efektu dodavanja tripsina.

Još veće interesovanje o primeni acetona kao jednog aktivatora u smislu proteolize ili nekog drugog efekta izazvale su konstatacije nadjene u knjizi izdatoj od BARNE (1972). BARNA je eksperimentalno dokazao da aceton pogodno davan čoveku uništava umnožavanje normalnih ćelija (manje), a maligne - blastonske ćelije potpuno rastvara. Odgovarajući potvrdni rezultati dobijeni su i kod primene acetona na životinje (GAVEZ, 1973 lično saopštenje). BARNA (1972) je ovo razaranje ćelija pripisao delovanju acetona na važni lipoproteidni kompleks svih ćelija, a GAVEZ (1973) je taj efekat acetona tumačio aktiviranjem celog kompleksa disanja.

Uzevši sve ovo o acetonu u obzir i znajući:

- da se stvara u dioksi obliku u glikolitskom ciklusu,
- da se pojavljuje u glukoneogenezi (tehničko dobijanje glicerina),
- da može odgovarajućim mehanizmima (direktno dodat kao supstrat) da se metabolizira u pirogroždjanu kiselinu ili u sirćetnu kiselinu i mravlju kiselinu

mi smo u ovom radu želeli da ispitamo, da li će, možda, aceton aktivirati i enzime disanja ćelija kvasca koje rastu na visokim koncentracijama etanola. Da bismo to utvrdili, postavili smo ceo niz ogleđa u kojima smo kvasac Saccharomyces cerevisiae pod aerobnim uslovima uzgajali u hranljivoj podlozi u kojoj je pod anaerobnim uslovima stvorio određene količine etanola. Na početku aerobne faze, kada smo davali potrebne količine hranljivih soli, vitamina i biosa, davali smo i različite količine acetona.

M A T E R I J A L I M E T O D E R A D A

A. Radni mikroorganizam

U svim eksperimentima upotrebljavan je kvasac Saccharomyces cerevisiae. Čista kultura uzeta je iz jedne fabrike pekarskog kvasca, a fabrika je dobila ovu čistu kulturu iz zbirke Instituta za istraživanja "Mautner-Markoff" iz Beča. Čista kultura čuvana je na sladnom agaru, a pre početka eksperimenta, uzgajana je na podlozi koja je korišćena u daljim eksperimentima.

Dobijanje matičnog kvasca

Kultura kvasca je umnožena do potrebne količine za ogled pod aerobnim uslovima na podlozi koja je korišćena u eksperimentima. Svi eksperimenti su vodjeni pod sterilnim uslovima, a kvasna kultura nakon završenog ogleada upotrebljavana je kao matična kultura za drugi ogled. Na ovaj način, kvasac se postepeno adaptirao na sve veće koncentracije etanola. Nakon završenog ogleada, da bi se obezbedilo da se u sledeći ogled unose samo žive ćelije, kultura je pod sterilnim uslovima zasejavana u odredjenom razredjenju na petri ploče i 48 časova inkubirana na 30°C. Sa ploča su pod sterilnim uslovima prenošene kolonije u hranljivu tečnu podlogu i tako dobijeni kvasac je služio kao matični kvasac za sledeći ogled.

B. Hranljiva podloga

Prilikom odabiranja podloge vodili smo računa da upotrebimo hranljivu podlogu koja obezbedjuje minimum svih neophodnih faktora za rast i razmnožavanje kvasca. Pregledom literature koja je proučavala sastav pekarskog kvasca, izračunate su potrebe za fosforom i azotom, a izvršenim analizama pepela kvasca,

izračunate su potrebe za mineralnim elementima (WHITE, 1954; BARTTLEY, 1960). Isto tako, izvršena odredjivanja sadržaja pojedinih vitamina u kvasnim ćelijama (WHITE, 1954; KERÄNEN, 1962) dal su potrebe za vitaminima. U tabeli 8, dat je pregled nekih hranljivih podloga koje su opisane u literaturi i korišćene za uzgajanje kvasca, do sada.

U istoj tabeli su količine neorganskih soli i faktora rasta dati tako da su dovoljne za dobijanje 100 g kvasca. Pored ovih soli i faktora rasta za 100 g kvasca, potrebno je 200 g glukoze (OURA, 1972). Na ovaj način dozirane količine faktora rasta su bliske procentualnom sastavu suve materija kvasca. Iz navedenih vrednosti (tabela 8) se vidi da i sastav hranljivih podloga varira u prilično širokim granicama. Tako, na primer, sadržaj azota se kreće od 2 - 47 g/l, gvoždja 0,83 do 372 mg/l, bakar od 10 do 21 mg. U nekim podlogama potpuno je izostavljen kalcijum, mangan i cink za koje se smatra da su neophodni (OURA, 1972).

Tabela 8

Elementi i vitamini kod nekoliko podloga koje se koriste za uzgoj kvasaca

	Olson i Johnson (1949) standar. podloga	Wikerhamova (1951)	Maxon i Johnson (1953)	White (1954)	Mc.Murr-ough and Rose (1967)	Fichter 1968 Media Bhod.+ asparag.	Kautzmann (1969)	Von Meyen Burg (1969a)	Rikard i sar. 1969. podloga za kvasac sa malim i vis. sadržajem
C - nešećeri	g 24	-	4,9	8	-	5,5	-	6,6	240 - 13,5
N neorganski	g 14,6	21	14,6	3,22	8,5	8,2	6,75	11,4	46,6 - 2,58
N organski	" 10,6	-	-	-	-	3,2	-	1,9	68 - 3,79
P	" 33	4,55	33,2	1,32	2,73	2,64	1,16	2,45	103 - 5,7
K	" 1,15	5,8	1,15	6,9	3,45	1,00	3,04	3,09	117 - 6,5
Mg	mg 494	990	490	390	395	296	137	354	2030 - 113
Na	" 5	0,79	5,34	0,98	-	-	59	-	153 - 0,85
Ca	" -	550	-	137	183	122	360	79	267 - 14,8
Fe	" 3	0,83	3,00	3,04	0,41	31	7,6	12,3	372 - 21,7
Cu	" 0,50	0,20	0,49	0,01	0,10	7,9	0,76	1,82	21 - 1,20
Zn	" 8,0	1,82	8,0	0,31	-	-	1,51	9,8	107 - 6,0
Mn	" -	2,6	-	-	1,49	-	0,52	-	102 - 5,7
B	mg -	1,75	-	-	-	-	380	-	3500 - 194
I	" -	1,5	-	-	-	-	3,8	-	-
Ni	" -	-	-	-	-	-	3,8	-	-
Mo	" -	1590	-	-	-	-	-	-	-
Co	" -	-	-	-	-	-	3,9	-	20 - 1,10
Al	" -	-	-	-	-	-	380	-	-
Sr.	" -	-	-	-	-	-	380	-	-
Thiamin (HCl)	mg 80	8,0	88	0,76	4,00	40	-	100	3,33 - 0,19
Riboflavine	" -	4,0	-	0,38	-	0,04	-	0,11	6,7 - 0,37
Piridoxine (HCl)	" 20	8,0	24	3,73	4,00	10	-	22	8,3 - 0,46
Nicotinska kis.	" -	8,0	-	19	8,0	0,80	-	2,15	133 - 7,4
P-aminob.kis.	" -	4,0	-	1,14	-	-	-	-	-
Folna kisel.	" -	0,04	-	-	-	-	-	-	-
Biotin	" 0,40	0,04	0,4	0,04	0,04	0,14	0,15	0,72	0,33 - 0,02
Pantoteinet	" 10	8,0	10	1,89	4,0	20	30	11	17 - 0,93
Inozitol	" 200	40	200	190	40	403	608	438	500 - 28

Podloga koju smo koristili u ovome radu, imala je sledeći sastav:

Glukoza	varirala je od ogle-- da i njena vrednost data je u toku svakog ogle--da
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12,0 g/l
H_3PO_4 (85%)	1,6 ml/l
KCl	0,12 g/l
NaCl	0,06 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,09 g/l
$\text{Mg Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,52 g/l
$\text{Fe SO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,035 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,8 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5 ml/l
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,3 µg/l
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,3 µg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,3 µg/l
H_3BO_2	7,3 µg/l
KJ	1,7 µg/l
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5 µg/l
Thiamin HCl	5,0 mg/l
Pyridoxine ·HCl	6,25 mg/l
Nikotinska kiselina	5,0 mg/l
D- biotin	0,125 mg/l
Ca- D- Pantoteinat	6,25 mg/l
meso - inositol	125,0 mg/l
kvašček ekstrat	0,75 g/l
KH_2PO_4	1,5 g/l

Uslovi kultivacije

Ogledi su vršeni na konstantnoj temperaturi 30°C pri pH od 4,2 do 4,6. Korekcija pH je vršena dodavanjem 10% rastvora amonijaka. Ukupna zapremina hranljive podloge bila je 5 litara. Progenerator u kome su izvodjeni ogledi ima ugradjenu mešalicu sa 1.000 obrta u minutu. Mešalica je takve konstrukcije da se kroz nju uduvava sterilan vazduh što omogućava bolje rastvaranje vazduha u hranljivoj podlozi. Pre početka ogleada progenerator je pripremljen tako da se obezbedi sterilan rad. U pripremljen progenerator ulivana je podloga koja je sadržala odredjenu količinu glukoze, hranljivih soli, faktora rasta i matični kvasac. Bez uvođenja vazduha, iz glukoze se stvarala odredjena količina etanola koja je naznačena na početku aerobne faze svakog ogleada. Kada je u podlozi stvorena željena količina etanola, uključivan je kompresor i dodate su odredjene količine hranljivih soli i vitamina, koji su potrebni kvascu u toku aerobne faze ogleada. Na ovaj način, pod anaerobnim uslovima, stvoreni etanol služio je u aerobnoj fazi ogleada kao izvor ugljenika i energije. Izvođenje obe faze ogleada u istom progeneratoru imalo je za cilj i da obezbedi sterilne uslove rada. Količina dovedenog vazduha 80 l/1,h je dovoljno da obezbedi pravilnu progneraciju kvasca.

C. ANALITIČKE METODE

Glukoza i etanol

Sadržaj glukoze odredjivan je po metodi BERTRANA (1964), a sadržaj etanola metodom pomoću piknometra. Procentualni gubici etanola, uzrokovani intenzivnim provetravanjem hranljivog medijuma, odredjeni su na taj način, što je izlazeži gas prolazio u toku 1 časa kroz 100 ml vode, koja se nalazila u boci smeštenoj u ledenom kupatilu. Nakon isteka ovog vremena odredjivan je sadržaj alkohola u ovom rastvoru pomoću piknometra.

Metabolička aktivnost

Metaboličke aktivnosti intaktnih ćelija kvasca određivana je uobičajenom Warburg-ovom tehnikom.

Suspencija koja je unošena u reakcione posude sadržala je 10 mg svežeg kvasca u 2,5 ml 0,02 M citrat/fosfatnom puferu na pH = 4,5 (Mc Ilwaine, 1921) koji je sadržao 2,5 mg glukoze. Temperatura određivanja je bila 30°C. Aktivnost kvasca u oksidaciju etanola, određivana je merenjem iskorišćenja kiseonika od strane 20 mg svežeg kvasca u 0,025 M rastvoru etanola koji je napravljen u 0,02 M citrat/fosfatnom puferu pH = 4,5. Metabolička aktivnost na acetonu kao supstratu, određivana je u 0,025 M citrat/fosfatnom puferu koji je sadržao 0,001 ml acetona po ml i 10 mg svežeg kvasca po ml.

Svi rezultati su izračunati u mililitrima gasa koji se oslobadja, ili troši, u toku 30 minuta po 10 g suve materije kvasca.

Sadržaj citohroma

Sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama kvasca određivan je metodom koju su predložili i razradili OURA i SUOMALAINEN (1970). Metoda se sastoji u sledećem: 1 g kvasca suspenduje se u 0,02 M fosfatnom puferu (pH 5,6) koji je sadržao 0,01 M KCl na litru i 0,04% MgSO₄. Kvasac se, zatim, redukuje dodavanjem male količine čvrstog natrijum ditionata u suspenciju. Nakon 15 minuta suspencija je filtrirana na "Pyrex-glass" filtru No 4 (koji ne propušta kvasne ćelije). Dobijena ćelijska pasta prenetu je u kivetu sa optičkim putem od 0,1 cm. Držać uzorka u spektrofotometru treba da je podešen što je moguće bliže fotomultiplikatoru. Kao referenca za apsorpciju upotrebljena je određena količina transparentnog papira koji je utisnut između stakala druge kivete koja služi kao slepa proba. Apsorpcioni spektar uzorka kvasca određen je podešavanjem pisača na 0 pri talasnoj dužini od 650 milimikrona i snima se spektar od 650 talasne dužine do 400 milimikrona. Sadržaj citohroma u kvascu se izračuna-

va umanjivanjem vrednosti ukupne apsorpcije za vrednost apsorpcije nespecifičnog porekla kod apsorpcione trake koja se posmatra:

$$E - E_b = E_c = e_c \times d \times C$$

gde je:

e_c - moralni ekstincioni koeficient za citohrom

d - optički put kivete u cm

C - koncentracija citohroma, mola/litru kvasca.

U odredjivanju sadržaja citohroma u intaktnoj ćeliji kvasca upotrebljavali smo molarne ekstincione koeficiente koje su za odredjivanje sadržaja citohroma predložili autori metode. Sadržaj citohroma aa_3 (citohrom c oksidaze) izračunavali smo iz očitane razlike u visini i molarnog ekstincionog koeficienta " e_{mM} " = 18,8 na talasnoj dužini 605 nm (alfa traka) i sa molar-
nim ekstincionim koeficientom od " e_{mM} " = 100 za talasnu dužinu od 444 - 445 nm (gama traka). Za odredjivanje citohroma b koristili smo apsorpcione trake na 560 nm i 532 nm. Molarni apsorpcioni koeficijent za talasnu dužinu 560 nm " e_{mM} " = 20,8, a na talasnoj dužini 532 " e_{mM} " = 13,9. Citohrom c odredjivali smo na trakama koje se nalaze 520 nm gde je molarni ekstincioni koeficijent " e_{mM} " = 17,0 i na apsorpcionoj traci na 550 nm gde je molarni ekstincioni koeficijent " e_{mM} " = 27,8. Nakon izračunavanja sadržaja pojedinih citohroma, izračunavane su vrednosti za pojedine citochrome izražene u molovina na litar kvasca sa 25% suve materije.

Odredjivanje suve materije

Sadržaj suve materije u progeneratoru je odredjivan na sledeći način: 10 ml uzorka suspenzije iz progeneratora profiltrirali smo preko guča sa azbestom, isprali smo dva puta sa po 10 ml destilovane vode i sušili guč sa uzorkom na 105°C 12 časova.

Odredjivanje enzimskih aktivnosti

Odredjivanje enzimskih aktivnosti vršeno je u dezintegratu koji je dobijen razgradnjom kvasnih ćelija pomoću kvarcnog peska na 0°C. Razaranje ćelija je vršeno pod sledećim uslovima: 3 g kvasca iz procesa (ispranih u puferu) stavljano je u hladni tarionik i trljano 10 minuta sa 6 g kvarcnog peska. Dobijena pasta prenešena je kvantitativno pomoću 3 x 5 ml pufera (0,02 M Na- fosfatni pufer pH = 7,5; POLAKIS i BARTEY, 1965) u kivetu i centrifugiranjem u toku 10 minuta na 2.000 obrtaja/min odvojen je kvarcni pesak i nerazorene ćelije od dezintegrata. Dezintegrat je dekantiran i zasićen do 80% zasićenosti sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Istaloženi proteini su centrifugisanjem (na 0°C; na 12.000 obrta); odvojeni i ponovo rastvoreni u istoj količini pufera (15 ml). Ovako dobijeni rastvor proteina korišćen je za odredjivanje enzimskih aktivnosti pod uslovima datim u tabeli 9. Količina proteina u dezintegratu odredjivana je metodom po LOWRY-a, (1951).

Odredjivanje rastvorljivog kiseonika u progneratoru

Da bismo mogli utvrditi koja količina rastvorljivog kiseonika se nalazi u hranljivoj podlozi, pre početka izvodjenja oglada izvršili smo odredjivanje rastvorljivog kiseonika po metodi COOP-ER-a i MILLER-a (1944).

Tabela 9

Odredjivanje enzimskih aktivnosti optičkim metodama

Enzim	Pufer	Drugi dodaci	Substrat	Reakcija inicirana	Merenje vršeno na talasnoj dužini nm i molar- ni ekstincioni koeficienti	Literatura
Alkohol dehidrogenaza	Natrijum pirofosfatni pufer pH = 7,4 (75 mM)	NAD ⁺ (0,4 mM) semi karba- zid 75 mM, glicin 21 mM, kvasni dezin- tegrat	Etanol 1,3 M	Kvasni de- zintegrat	340 nm 6,22.10 ³	Holzer i sar. (1954)
Malat dehidrogenaza	Kalijum fos- fatni pufer pH = 6,8 (50 mM)	NADH ₂ (0,1 mM) kvasni de- zintegrat	Oxal ace- tat (0,25 mM)	Oxalacetat	340 nm 6,22.10 ³	Ochoa (1955)
Izocitrat lijaza	Kalijum fosfatni pufer pH = 6,8 (100 mM)	Mg ⁺⁺ (50 mM) phenil nyd- razin 3,3 mM, cistein 2 mM, kvasni dezin- tegrat	Ls-izocit- rat 1,67 mM	Ls-izocit- rat	324 nm 1,7.10 ⁴	Dixon i Koknberg (1959)

Izračunavanje Y_{ATP}

U toku svih ogleda kao kriterijum da se povećava količina kvasca u progeneratoru služilo nam je određivanje suve materije. Iz rezultata sadržaja suve materije u progeneratoru može se izračunati jedan veoma važan podatak a to je Y_{ATP} koji karakteriše svaki hranljivi supstrat. Izračunavanje vrednosti Y_{ATP} vršili smo prema postupku koga primenjuje LUGANAS (1972):

$$Y_{ATP} = \frac{1}{ATP \cdot T (e - 1)} \left[\frac{\text{grama s.m. kvasca}}{\text{po molu ATP-a}} \right]$$

gde je $ATP = \frac{\text{mola ATP}}{\text{g} \times \text{min}}$

T = generaciono vreme, poznat je odnos $T = \frac{1}{k}$ (WHITE, 1954)
poznato je da je $ATP = 0,740$ m mola/g kv., min.

Ovaj jednostavni način izračunavanja omogućuje, da se, kada je poznato generaciono vreme radnog mikroorganizma, može oceniti efikasnost upotrebe hranljive podloge.

REZULTATI I DISKUSIJA
POSTIGNUTIH REZULTATA

Jedan od glavnih ciljeva ovoga rada je bio da ispita-
mo na koji način deluje etanol na ćelije kvasca koje ga stvaraju.
Pored toga, interesovalo nas je, sa kojom efikasnošću se anaerob-
no stvoreni etanol može asinilovati pomoću kvasnih ćelija pod ae-
robnim uslovima. Svi rezultati dati u ovom radu predstavljaju sred-
nju vrednost triju odredjivanja svakoga pokazatelja. Da bismo mog-
li uporediti vrednosti dobijene u toku jednog ogleada sa vrednosti-
ma dobijenim u toku drugog ogleada za svaki oglead izračunali smo
srednju vrednost svih pokazatelja koji su odredjivani u toku toga
ogleada. Tako izračunate srednje vrednosti date su na kraju svake
tabele. Da bismo mogli izvršiti uporedjenja kako deluje etanol
na kvasne ćelije, prvo smo čistu kulturu kvasca Saccharomyces
cerevisiae razmnožili do potrebnih količina za oglead, na podlozi
opisanoj ranije Kvasac smo, zatim, zasejali na hranljivu podlogu
koja je sadržala glukozu kao izvor ugljenika uz ostale potrebne
hranljive soli i biose. Rezultati koje smo dobili u toku ogleada
uzgajanja kvasca na podlozi sa glukozom dati su u tabeli 10.

Tabela 10

Razmnožavanje kvasca Saccharomyces cerevisiae na hran-
ljivoj podlozi sa glukozom i metabolička aktivnost
toga kvasca na glukozu i etanolu kao supstratu

Vre- me h	Suva mate- rija g/100 ml	Glu- koza g/100 ml	Metabolička aktivnost ml/10 g. kv., 30'				Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozu		na etanolu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0	0,711	1,35	372,77	302,09	22,01	48,57	1,97	0,88	783,01
2	1,780	0,22 1,22 ^x	584,46	319,12	21,70	45,32	1,72	0,95	1549,32
4	2,973	0,270	541,79	302,75	20,05	30,75	1,53	0,73	1408,56
Srednja vrednost			499,67	307,98	21,25	41,55	1,74	0,85	1246,96

x - nakon dva časa sadržaj glukoze se smanjio u hranljivoj podlozi pa je zbog toga dodan sterilan rastvor glukoze (određene koncentracije i zapremine da bi koncentracija glukoze bila približno konstantna u toku ispitivanja rasta kvasca na hranljivoj podlozi sa glukozom.

Količina vazduha, koja je uvedena je iznosila (30 l/1,h).

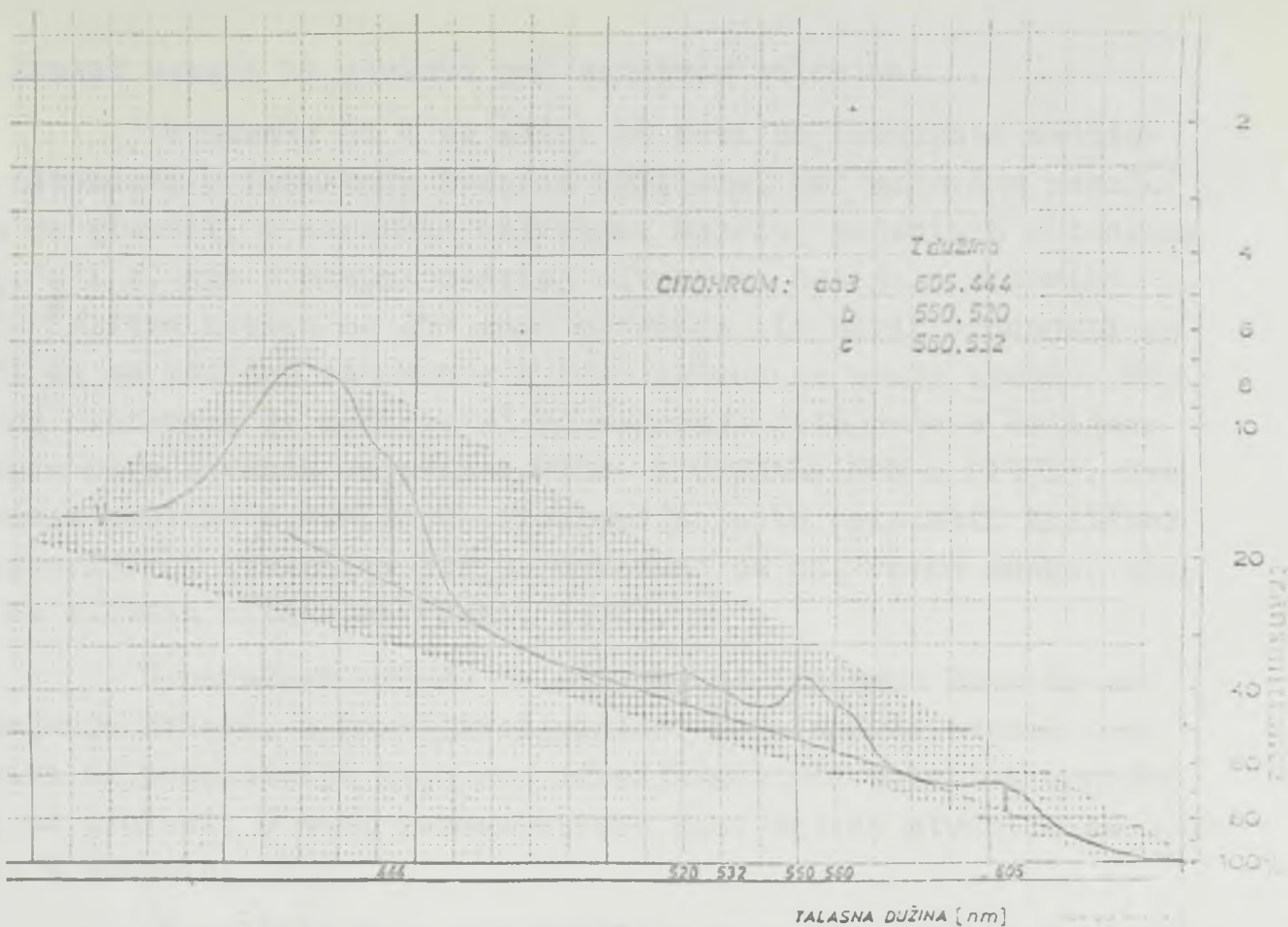
Iz vrednosti koncentracije suve materije u toku ogle-
da u hranljivoj podlozi koja sadrži glukozu (kao izvor ugljenika
i energije) datih u tabeli 10, izračunali smo vreme udvostručenja
biomase. Vreme udvostručenja za ove uslove iznosi 79 minuta. Kada
smo uvrstili ovu vrednost u formulu za izračunavanje Y_{ATP} , dobili
smo vrednost za ovu konstantu $Y_{ATP} = 9,94$ g kvasca (s.m.) se stvo-
ri po molu ATP-a. Ovaj rezultat se slaže sa rezultatima koje su
dobili za kvasac LUGANAS, (1972); HAUKELI i LIE, (1971); KORMAN-
ČIKOVA i sar., (1969) i OURA (1972).

U tabeli 11 i na slici 19 dati su rezultati sadržaja
citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama uzgajanim pod uslovima
opisanim u tabeli 10. Ovi rezultati dobijeni su u ogledu kod ko-
ga je kvasac uzgajan na hranljivoj podlozi sa glukozom.

Tabela 11

Sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama
uzgajanim na glukozu pod aerobnim uslovima

Vreme h	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l						Ukupni
	aa ₃		b		c		
Talasna du- žina nm	605	444	550	520	560	532	
0	2,84	2,49	4,46	3,08	4,27	3,51	20,64
2	2,83	2,36	4,41	3,10	4,20	3,49	20,39
Srednja vrednost	2,83	2,42	4,40	3,07	4,23	3,50	20,51
	5,25		7,49		7,73		



Slika 19: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa glukozom uz aeraciju 80 l/l, h

Ako posmatramo vrednosti za metaboličku aktivnost ćelija kvasca na glukozu (tabela 10), treba istaći, da ovaj kvasac ima znatnu sposobnost da stvara ugljen-dioksid (fermentira glukozu), što mu je, najverovatnije, genetska karakteristika (OURA, 1972). Pored toga, iz vrednosti datih u tabeli 10, može se videti da ovaj kvasac ima sposobnost da metabolizira etanol, ali ova sposobnost je daleko manja od sposobnosti da fermentira i respiriše glukozu. Interesantno je posmatrati vrednosti za enzimatsku aktivnost dezintegrata kvasnih ćelija (tabela 10). Ove vrednosti nam jasno govore, da je u toku aerobnog uzgajanja kvasnih ćelija na glukozu aktivnost enzima TCA ciklusa znatno veća (malat dehidrogenaza) od aktivnosti EMP metaboličkog puta (mala aktivnost alkohol dehidrogenaze). Specifična aktivnost alkohol dehidrogenaze u toku oglada ostaje približno konstantna. Specifična aktivnost izocitrat lijeze (enzima gliksilatnog metaboličkog puta) je znatno niža i od aktivnosti alkohol dehidrogenaze, što ukazuje da je ovaj metabolički put potisnut od strane TCA ciklusa kada

se kvasac uzgaja na glukozu pod aerobnim uslovima.

U tabeli 11 i na slici 19 dati su rezultati sadržaja citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama, pod uslovima uzgajanja na glukozu, u aerobnim uslovima. Sadržaj pojedinih citohroma aa₃, b i c, kao i ukupni sadržaj citohroma dat je u molovima $\times 10^5$ /litru kvasca sa 25% suve materije. Iz datih vrednosti se vidi da se sadržaj citohroma u toku oglada ne menja znatno. Sadržaj citohroma je nešto viši od sadržaja citohroma u ćelijama kvasca odredjivanih od strane OURA i SUOMALAINEN-a (1971). Ova nastala razlika u sadržaju citohroma može se pripisati količini rastvorljivog kiseonika jer je dokazano da on, veoma mnogo, utiče na sintezu citohroma (OURA, 1972).

U narednom ogledu želeli smo da ispitamo kako će se uzgajanje kvasca, u hranljivoj podlozi koja sadrži etanol, odraziti na pokazatelje koje smo odredjivali pod uslovima uzgajanja na glukozu. U toku fermentativne faze oglada stvorilo se 1,34 vol. % etanola.

Rezultate koje smo dobili u toku ovog oglada dali smo u tabeli 12 i 13 i na slikama 19 i 20.

Tabela 12

Uzgajanje kvasca Saccharomyces cerevisiae na hranljivoj voj podlozi koja je sadržala 1,34 vol. % etanola pod aerobnim uslovima

O ^a	Vreme h	Suva materija g/100 ml	Eta-nol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g SM, 30'				Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
				Na glukozu		Na etanolu		ADH	ICL	MDH
				Q _{CO₂}	Q _{O₂}	Q _{CO₂}	Q _{O₂}			
O ^a	0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O ^b _x	0,72	1,34	571,50	184,40	23,92	66,93	15,51	1,99	981,39	
1	1,29	0,66	581,50	324,48	90,18	67,50	15,91	3,72	825,16	
2	1,55	0,12	499,50	330,42	82,17	78,90	10,34	4,05	719,67	
Prosek			550,83	279,76	65,42	71,17	13,92	3,25	842,07	

Napomena: O^a - početak anaerobne faze ogleda u toku koje se iz 2,5 g/100 ml glukoze stvorilo za 3 časa 1,34 vol. % etanola

O^b - početak aerobne faze ogleda u toku koje je u hranljivoj podlogu uduvavan sterilan vazduh (pomoću laboratorijskog kompresora) u količini od 80 litara/1,h,

x - na početku aerobne faze ogleda dodato je u kominu i 0,75 g/l asparaginske kiseline.

Iz vrednosti sadržaja suve materije (tabela 12) izračunato je vreme potrebno da se suva materija udvostruči. Vreme potrebno da se suva materija udvostruči iznosi 80 minuta. Ako se ova vrednost uvrsti u formulu za Y_{ATP} dobija se vrednost za Y_{ATP} = 9,82. Ova vrednost je neznatno manja od vrednosti dobijene za kvasne ćelije uzgajane na glukozu (Y_{ATP} = 9,94; tabela 10).

Kada uporedimo vrednosti date u tabeli 12 za metaboličku aktivnost kvasnih ćelija na glukozu sa vrednostima datim

u tabeli 10, (uslovi za kvasac uzgajan na hranljivoj podlozi sa glukozom), zapažamo da ove vrednosti znatno odstupaju. Znatna je razlika sposobnosti kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid na glukozu. U tabeli 12 prosečna vrednost za sposobnost stvaranja ugljen-dioksida iznosi 550,83 ml CO₂ /10 g SM kvasca, 30'. U tabeli 10 prosečna vrednost iznosi 499,67 ml CO₂/10 g SM kv., 30'. Na osnovu ovoga, moglo bi se pretpostaviti da je došlo do izvesnih promena u enzimskom sadržaju kvasca, jer kvasac, uzgajan na višoj koncentraciji glukoze od 1%, ima veću fermentativnu sposobnost, jer stvara etanol. Ova sposobnost se zadržava i tokom uzgajanja na etanolu, iako su aerobni uslovi uzgajanja. Ovo se može objasniti i sposobnošću adaptacije kvasnih ćelija. Kvasne ćelije nisu izgubile svoju sposobnost fermentacije u toku aerobnog uzgajanja i zbog toga što je asimilacija ove male količine etanola (1,34 vol. %) trajala relativno kratko vreme - oko dva časa.

Ako uporedimo vrednosti utroška kiseonika, nema bitnih razlika između prosečnih vrednosti datih u tabeli 10 i tabeli 12. Upoređujući vrednosti metaboličke aktivnosti kvasnih ćelija na etanolu kao supstratu u navedene dve tabele zapazićemo da postoji razlika. Razlika je u tome, što kvasac, uzgajan na podlozi sa 1,34 vol. % etanola, ima veću sposobnost da, metabolizirajući etanol, stvori ugljen-dioksid. U tabeli 12 prosečna vrednost sposobnosti stvaranja ugljen-dioksida (na etanolu kao supstratu) iznosi 65,42 ml CO₂/10 g SM kv., 30' dok u tabeli 10 prosečna vrednost je 21,25 ml CO₂/10 g SM kv. 30'. Ovo povećanje sposobnosti može se, najverovatnije, pripisati sintetizovanju adaptivnih enzima glioksilatnog ciklusa (izocitrat lijaze i malat sintetaze) koji imaju sposobnost da ubrzaju metaboliziranje etanola kao supstrata. Da je ova pretpostavka tačna, može se potvrditi i povećanom specifičnom aktivnošću izocitrat lijaze (ICL) u dezintegratu kvasnih ćelija, koje su uzgajane u podlozi sa 1,34 vol. %. Specifična aktivnost ovoga enzima, u toku ovoga ogleda, je za oko tri puta veća (tabela 12) nego u dezintegratu kvasnih ćelija uzgajanih na glukozu (tabela 10). Treba još istaći, da se prosečne vrednosti utroška kiseonika pomoću kvasnih ćelija na etanolu kao supstratu, razli-

kuju od prosečnih vrednosti utroška kiseonika ćelija koje rastu na glukozu (tabela 10). Ćelije koje rastu u podlozi sa etanolom imaju oko dva puta veće prosečne vrednosti utroška kiseonika.

U tabeli 13 i na slikama 19 i 20 dati su rezultati sadržaja citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama uzgajanim pod uslovima opisanim u tabeli 12.

Tabela 13

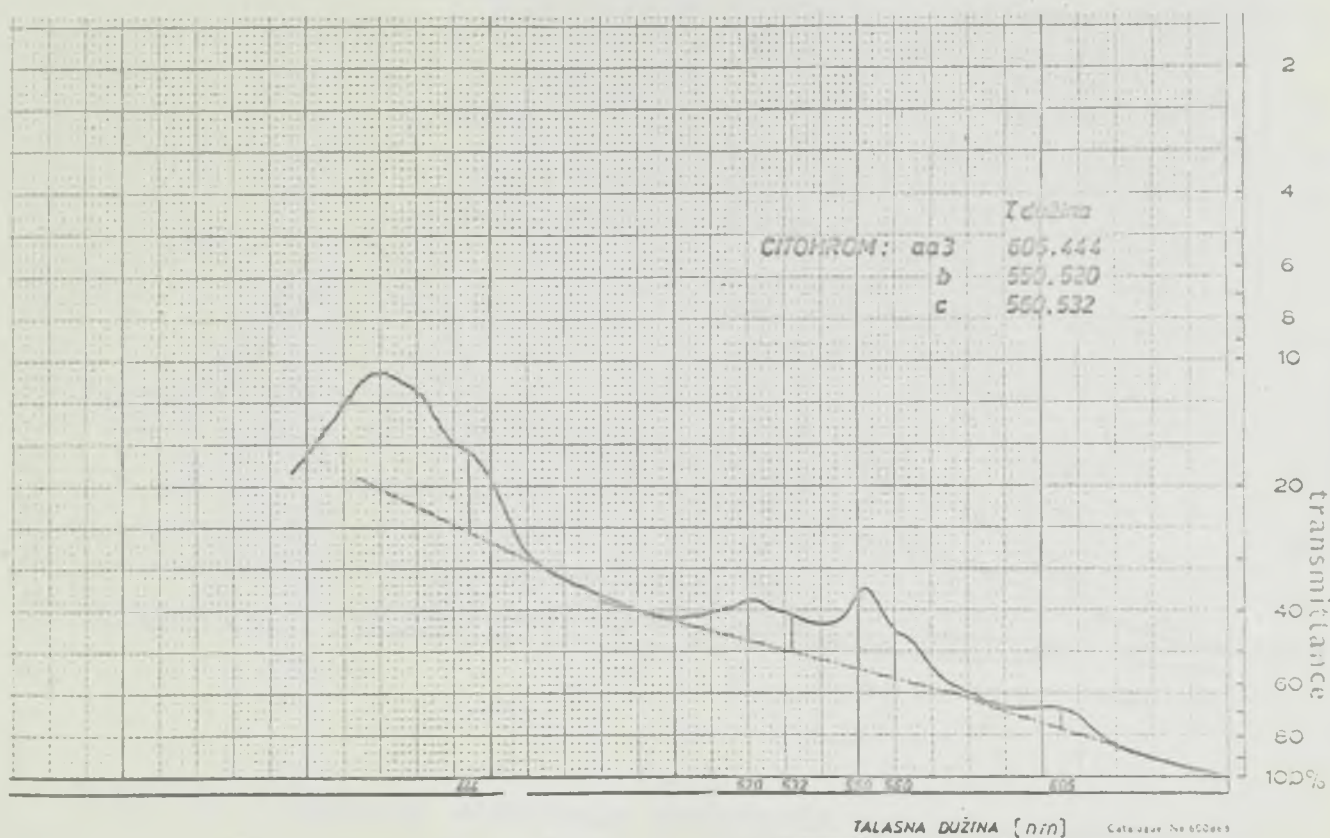
Sadržaj citohroma u kvasnim ćelijama koje su uzgajane na podlozi sa 1,34 vol. % etanola

Vreme h	C i t o h r o m i x 10 ⁵ mola/l						Ukupni
	Talaska du- žina nm	aa ₃	b	c	Ukupni	Ukupni	
	605	444	550	520	560	532	
0	2,89	1,76	4,33	3,23	4,28	3,58	20,07
1	2,92	2,31	4,29	3,26	4,30	3,57	20,65
2	2,90	2,33	4,21	3,22	4,31	3,57	20,54
Srednja vrednost	2,90	2,13	4,27	3,23	4,29	3,37	20,42
	5,03		7,50		7,66		

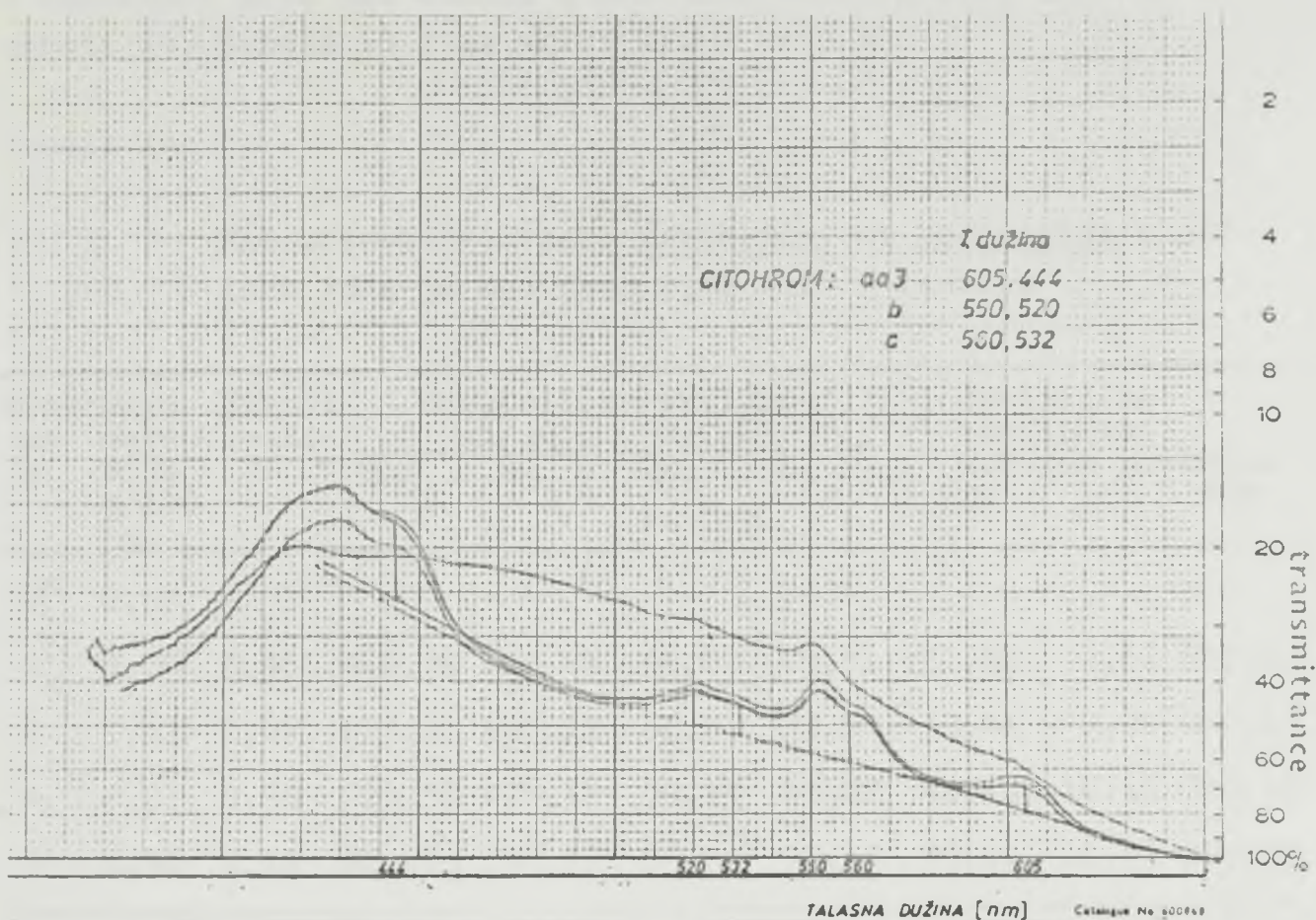
Kada uporedimo vrednosti sadržaja citohroma datih u tabeli 13 sa vrednostima sadržaja citohroma datim u tabeli 11, možemo zaključiti, da se vrednosti sadržaja pojedinih citohroma ne razlikuju bitno.

Uopšte uzevši, upoređujući rezultate iz tabele 10 sa rezultatima iz tabele 12, i rezultate tabele 11 sa rezultatima tabele 13, možemo reći, da ne dolazi do bitnijih promena u kvasnim ćelijama kada se uzgajaju na podlozi koja sadrži 1,34 vol.% etanola.

U narednom ogledu povećali smo koncentraciju etanola u hranljivoj podlozi na taj način, što smo u toku anaerobne faze ogleda povećali sadržaj glukoze u hranljivoj podlozi. U toku anaerobne faze ogleda, stvorilo se u podlozi 3,36 vol. % etanola,



Slika 19: Spektar citohroma intaktnih kvasnih ćelija uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 1,34 vol. etanola, uz aeraciju 80 l/l, h



Slika 20 : Spektar citohroma intaktnih kvasnih ćelija uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 1,34 vol. % etanola, uz aeraciju 80 l / l,h

a rezultati koje smo dobili u aerobnom delu ogleda, dati su u tabeli 14, tabeli 15 i na slici 21.

Tabela 14

Razmnožavanje kvasca Saccharomyces cerevisiae u podlozi koja je sadržala 3,36 vol. % etanola

Vreme h	Suva materija g/100 ml	Etanol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g., SM, 30'				Specifična aktivnost I.J./mg proteina			
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	ADH	ICL	MDH	
0 ^a	0,58	--	--	--	--	--	--	--	--	--
0 ^b _x	0,76	3,36	468,59	128,66	64,72	69,91	31,95	2,62	537,17	
2	1,83	2,04	653,20	165,12	66,27	73,90	38,41	8,26	662,15	
4	2,21	0,98	720,35	174,12	70,15	95,22	42,16	10,18	766,18	
6	2,36	0,16	760,73	168,17	69,30	78,15	39,17	11,15	673,18	
Srednja vrednost			650,72	159,02	67,61	79,29	37,92	9,86	659,67	

0^a - početak anaerobne faze ogleda u toku koje se iz 6,5 g/100 ml glukoze stvorilo u toku 6 časova 3,36 vol. % etanola

0^b - početak aerobne faze ogleda u toku koje je u hranljivu podlogu uduvavan sterilan vazduh u količini od 80 l/l, h,

x - na početku aerobne faze ogleda u hranljivu podlogu su dodati svi dodaci potrebni za pravilno razmnožavanje kvasca i 0,75 g/l asparaginske kiseline.

Iz vrednosti porasta suve materije (tabela 14) izračunali smo vreme potrebno za udvostručenje suve materije. Dobili smo vrednost od 85,39 minuta. Ovo vreme je duže za 5,39 minuta od vremena potrebnog za udvostručavanje biomase ćelija koje su koristile etanol iz hranljive podloge u koncentraciji od 1,34 vol. %. Za ovu vrednost udvostručenja biomase izračunali smo vrednost

$Y_{ATP} = 9,20$. Ova vrednost je nešto niža od dobijene vrednosti za kvasne ćelije koje su se razmnožavale na 1,34 vol. % etanola. Međutim, ova vrednost nije znatno manja tako da se ne može smatrati da je došlo do nekih uspore-nih procesa u kvasnim ćelijama. Sledeća kolona predstavlja koncentraciju etanola koja stalno opada kako raste koncentracija biomase u progeneratoru. Metabolička aktivnost intaktnih kvasnih ćelija u toku ovog ogleđa ne razlikuje se bitno od vrednosti koje su dobijene u toku uzgajanja kvasnih ćelija na podlozi koja je sadržala 1,34 vol. % etanola (tabela 12). Vrednosti specifičnih aktivnosti malat dehidrogenaze ne razlikuju se bitno od vrednosti datih u tabeli 12. Značajno je jedino istaći, da se specifična aktivnost alkohol dehidrogenaze povećava, što se može objasniti povećanjem koncentracije etanola u hranljivoj podlozi. Ova povećana aktivnost alkohol dehidrogenaze, utvrđena je nakon završetka anaerobne faze ogleđa i ostala skoro konstantna u toku aerobne faze ogleđa. Ova podjednaka aktivnost ovog enzima može se protumačiti poznatom činjenicom da postoje tri izoenzima ovog vrlo važnog enzima u metabolizmu kvasnih ćelija (SCHIMPFESSEL, 1968; FOLWER i sar., 1972). Paralelno sa povećanjem aktivnosti alkohol dehidrogenaze, povećava se tokom ovog ogleđa i specifična aktivnost izocitrat lijaze. Povećanje aktivnosti ovog ključnog enzima neophodnog za uključivanje etanola u metabolizam kvasnih ćelija, dokaz je delovanja gliksilatnog ciklusa u celini (WANG i sar., 1953).

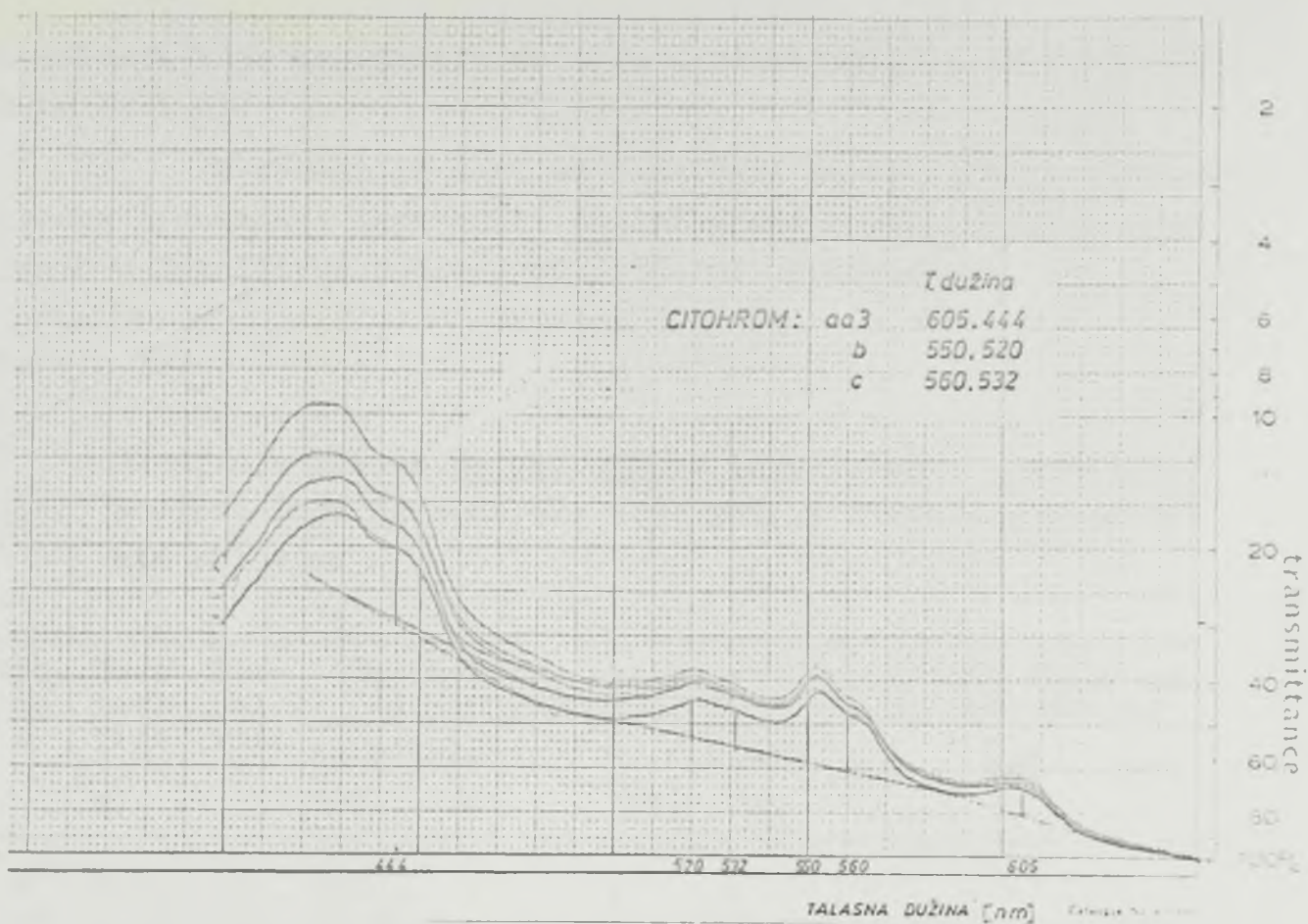
Kako utiče koncentracija etanola od 3,36 vol. % na sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama može se videti i iz rezultata datih u tabeli 15 i na slici 20.

Tabela 15

Sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama uzgajanim na hranljivoj podlozi sa 3,36 vol. % etanola

Vreme h	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l								
	Talasna du- žina nm	aa ₃	444	b	550	520	c	560	532
0	605	2,74	1,53	4,02	4,02	4,95	4,90	22,16	
2	605	2,82	2,00	3,97	4,11	4,62	4,76	22,24	
4	605	2,81	2,11	3,89	4,05	4,49	4,81	22,16	
6	605	2,80	2,10	3,91	4,00	4,36	4,87	22,04	
Srednja vrednost	605	2,79	1,93	4,04	4,04	4,60	4,83	22,15	
		4,72		8,08		9,43			

Iz datih rezultata, zapaža se, da je nakon fermentativne faze oglada u kojoj se stvorio etanol iz glukoze u ćelijama kvasca sadržaj citohroma aa₃ smanjen na gama traci (444 nm). Ovakvo smanjenje citohroma aa₃ na gama traci zapazili smo i u toku prvog oglada sa koncentracijom etanola od 1,34 vol. %. U toku aerobne faze oglada dolazi do povećanja sadržaja citohroma aa₃. Kako se iz datih rezultata može pretpostaviti, ovaj citohrom aa₃ je najviše zavisao od koncentracije kiseonika u hranljivoj podlozi. Ako uporedimo rezultate sadržaja citohroma date u tabeli 15 sa rezultatima datim u tabeli 13, vidimo da sa uzgajanjem kvasca na hranljivoj podlozi sa 3,36 vol. % etanola dolazi do izvesnog povećanja sadržaja citohroma. Povećanje se zapaža kod citohroma b i to dela na beta traci (560 nm), isto tako, zapaža se povećanje citohroma c na beta traci (532 nm). Povećanje sadržaja citohroma u kvasnim ćelijama koje rastu u prisustvu etanola, zapazili su i OURA i SUOMALAINEN (1970). U toku oglada, kako se iz rezultata datih u tabeli 15 može videti,



Slika 21: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 3,36 vol. % etanola uz aeraciju 80 l/l, h

nije došlo do bitnih promena sadržaja citohroma, što se odrazilo i na konstantnost ukupnih citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama.

Ako rezimiramo rezultate date u tabelama 12, 13, 14 i 15, možemo konstatovati da koncentracija etanola 1,34 i 3,36 vol. % u hranljivim podlogama, ne daju dokaza o inhibitornom dejstvu etanola na kvasne ćelije, jer se odredjivani pokazatelji ne razlikuju bitno od onih koji su dobijeni na glukozu kao supstratu. Zbog toga smo u narednom ogledu povećali koncentraciju glukoze u fermentativnoj fazi ogloda, kako bismo dobili veću koncentraciju etanola u hranljivoj podlozi.

Rezultati koje smo dobili dati su u tabelama 16 i 17 i na slikama 22 i 23.

U tabeli 16 dati su rezultati metaboličke aktivnosti kvasca i enzimske aktivnosti dezintegrata kvasnih ćelija uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 4,56 vol. % etanola.

Tabela 16

Uzgajanje kvasca Saccharomyces cerevisiae na hranljivoj podlozi koja je sadržala 4,56 vol. % etanola pod aerobnim uslovima

Vreme h	Suva materija g/100 ml	Etanol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g SM kv., 30'				Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozi		na etanolu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-
0 ^b _x	0,68	4,56	455,28	127,77	34,17	199,45	36,53	10,18	695,03
2	1,58	3,93	435,03	134,17	39,76	178,16	37,76	9,78	633,06
4	1,77	2,58	509,38	100,37	38,73	165,63	34,72	11,76	526,78
6	2,17	1,76	449,67	125,93	40,23	157,39	39,94	10,18	825,30
8	2,29	1,09	526,85	137,07	42,86	153,42	34,35	12,38	556,72
11	2,74	0,06	426,85	167,16	40,46	154,17	42,19	10,45	587,17
Srednja vrednost			467,17	132,08	39,37	168,03	37,08	10,78	637,34

0^a - početak anaerobne faze ogleda u toku koje se iz 7,15 g/100 ml glukoze stvorilo u toku 6 časova 4,56 vol. % etanola,

0^b - početak aerobne faze ogleda u toku koje je u hranljivu podlogu uduvavan sterilan vazduh u količini od 80 l/l, h. Pored toga dodato je 0,75 g/l asparaginske kiseline i potrebne količine hranljivih soli i biosa za pravilno razmnožavanje kvasca u toku aerobnog dela ogleda.

Prvo što se može zapaziti, kada se izračuna vreme potrebno da se udvostruči biomasa kvasca, da vrednost koja se dobije

90,66 minuta, predstavlja vrednost koja je veća od vrednosti date u ranijim ogledima. Povećanje ove vrednosti znači da je potrebno da prodje više vremena da se udvostruči biomasa kada je u podlozi prisutno više etanola. Kada smo ovu vrednost -- vremena udvostručenja biomase, uvrstili za izračunavanje vrednost Y_{ATP} dobili smo vrednost $Y_{ATP} = 8,67$. Ako uporedimo ovu vrednost sa vrednošću dobijenu za kvasac koji je uzgajan na podlozi koja je sadržala 3,36 vol. % etanola, zapazićemo da je došlo do smanjenja količine stvorenog kvasca u toku procesa po molu ATP-a. Ovo smanjenje vrednosti Y_{ATP} ukazuje, da u ovom procesu uzgajanja kvasca na hranljivoj podlozi koja je sadržala 4,56 vol. % etanola, dolazi do usporavanja razmnožavanja kvasca, što može biti uzrokovano prisustvom etanola u podlozi. Ako posmatramo vrednosti koje se dobijaju za metaboličku aktivnost na glukozi, zapazićemo da je u proseku došlo do smanjenja sposobnosti kvasnih ćelija da proizvode ugljen-dioksid iz glukoze. Isto tako se dobijaju niže prosečne vrednosti utroška kiseonika iz glukoze. Sve ovo govori, da već pri ovoj koncentraciji etanola od 4,56 vol. % etanola dolazi do izvesnog malog negativnog uticaja na sposobnost respiracije. Što se tiče sposobnosti inaktivnih ćelija da metaboliziraju etanol (metabolička aktivnost na etanolu), zapaža se, da ne dolazi ni do kakvog povećanja sposobnosti respiracije etanola sa povećanjem sadržaja etanola u hranljivoj podlozi u kojoj je uzgajan kvasac.

U dezintegratu kvasnih ćelija, kako se iz rezultata datih u tabeli 16 vidi, ne dolazi do povećanja specifične aktivnosti malat dehidrogenaze, alkohol dehidrogenaze i izocitrat li-jaze, enzima koji nam daju informaciju o intenzitetu i brzini delovanja ovih triju glavnih puteva ugradnje etanola.

U toku ovog oglada odredjivali smo i sadržaj citohroma, kako pojedinačnih: aa_3 , b i c tako i ukupnog sadržaja citohroma. Rezultati koje smo dobili dati su u tabeli 17 i na slikama 21 i 22.

Tabela 17

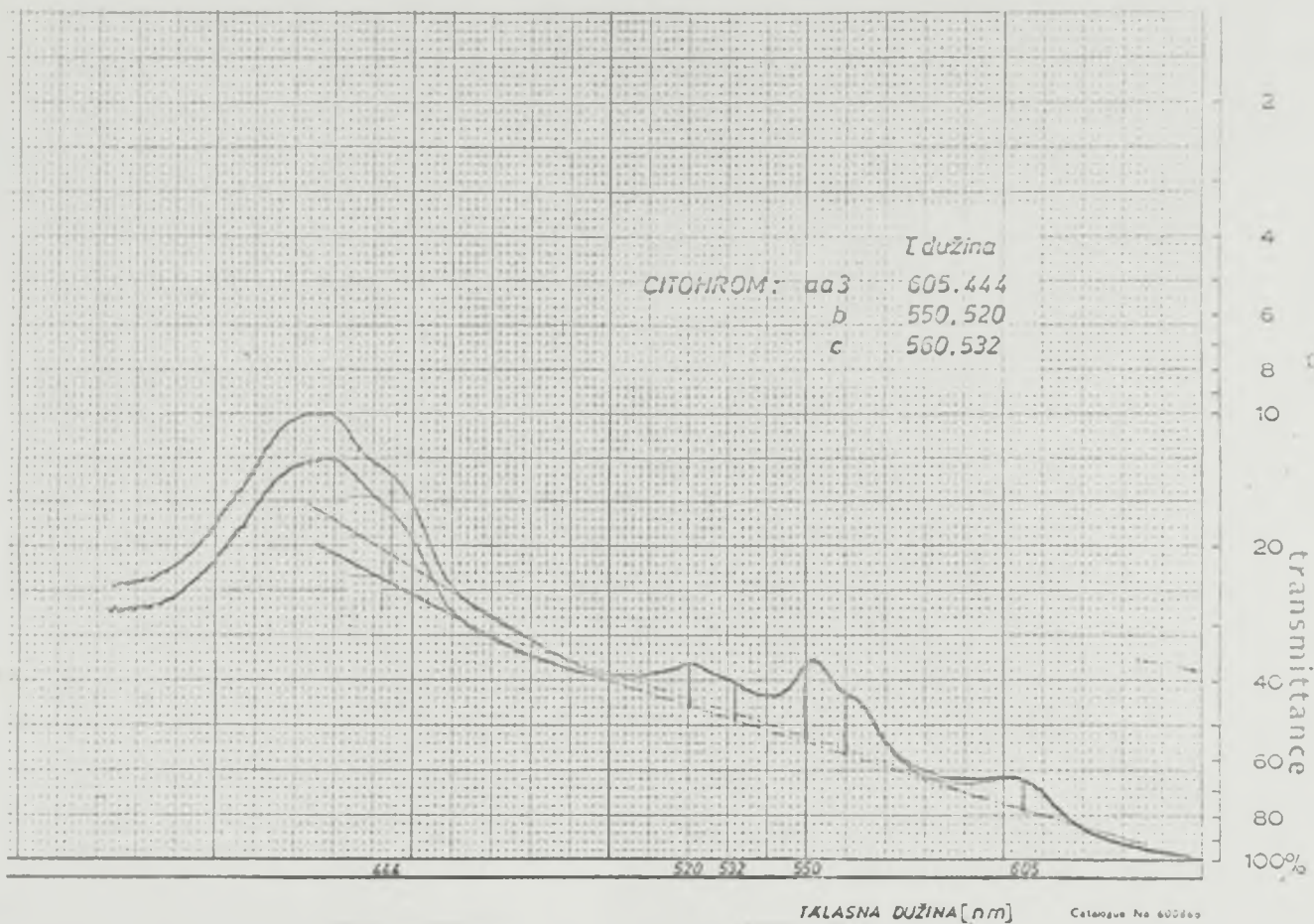
Sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama kvasca Saccharomyces cerevisiae uzgajanog u podlozi sa 4,56 vol. % etanola pod aerobnim uslovima

Vreme h	Citohromi $\times 10^5$ mola/l							Ukupni
	605	aa ₃ 444	b 550	520	560	c 532		
0	1,94	1,49	4,18	3,42	4,72	4,45	21,20	
2	2,55	2,05	3,97	3,25	4,57	4,51	21,70	
4	3,02	2,00	3,86	3,29	4,48	4,34	21,59	
6	2,98	2,46	3,75	3,45	4,50	4,29	21,53	
8	3,00	2,43	3,19	3,35	4,57	4,32	20,86	
11	2,87	2,40	3,20	3,25	4,44	4,26	20,42	
Srednja vrednost	2,72 4,85	2,13	3,69 7,02	3,33	4,50 8,86	4,36	21,21	

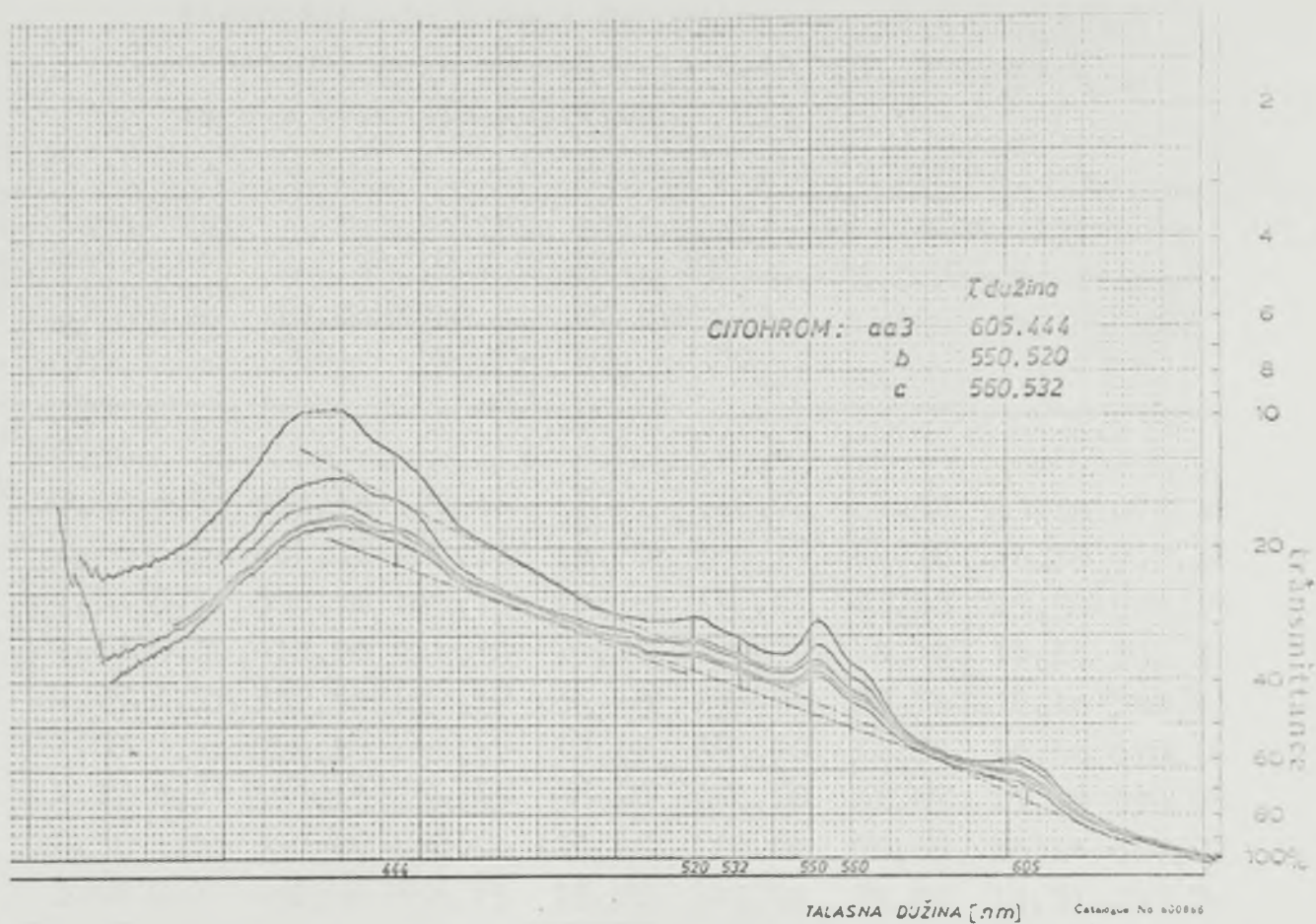
Kako se iz datih rezultata vidi, na početku aerobne faze citohrom aa₃ (na gama traci (444 nm) ima znatno nižu vrednost nego u prethodnom ogledu, ali se već nakon dva časa aeracije sadržaj citohroma aa₃ povećao i dostigao vrednost koja nije niže od vrednosti u prethodnom ogledu. Iz ovih rezultata možemo videti, da u toku uzgajanja kvasca u podlozi sa 4,56 vol. % etanola, nema značajnih promena u sadržaju citohroma.

U narednom ogledu povećali smo sadržaj glukoze u anaerobnom delu ogleda, i dobili podlogu koja je sadržala 6,33 vol. % etanola. Nakon dostizanja ovog sadržaja alkohola, počeli smo sa uduvavanjem sterilnog vazduha uz dodatak potrebnih količina hranljivih soli, biosa i asparaginske kiseline.

U tabelama 18 i 19 i na slici 23 dati su rezultati koje smo dobili u toku ovog ogleda.



Slika 22 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca
uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 4,56 vol. %
etanola uz aeraciju 80 l/l,h



Slika 23 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 4,56 vol. % etanola, uz aeraciju 80 l/l,h .

Tabela 18

Razmnožavanje kvasca Saccharomyces cerevisiae u podlozi koja je sadržala 6,33 vol. % etanola pod aerobnim uslovima

Vreme h	Suva materija g/100 ml	Etanol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g SM kv., 30'				Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozu		na etanolu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,30	--	--	--	--	--	--	--	--
0 ^b	0,48	6,33	441,40	120,00	13,11	120,76	55,88	13,10	672,16
3	1,28	5,54	436,12	127,16	18,19	124,17	43,18	16,19	717,16
5	1,51	5,20	398,16	141,78	24,16	150,45	40,56	15,30	658,19
7	1,63	4,10	418,56	110,34	24,16	176,97	43,17	14,13	567,87
9	1,85	3,75	387,64	198,17	30,18	235,85	28,30	12,10	540,16
11	1,93	3,00	456,87	145,17	32,16	254,16	30,80	10,50	678,16
13	2,17	2,34	476,13	150,45	30,67	156,78	31,45	13,45	599,78
15	2,56	1,45	367,89	108,34	26,16	167,86	30,89	14,14	634,22
21	3,48	0,14	432,86	146,75	19,76	145,16	27,89	12,51	598,76
Srednja vrednost			423,96	138,63	24,28	170,78	36,90	13,48	629,60

0^a - početak anaerobne faze u toku koje se iz 10,98 g/100 ml glukoze stvorilo 6,33 vol. % etanola

0^b - početak aerobne faze ogleada u toku koje je u hranljivu podlogu uduvan sterilan vazduh u količini od 80 l/l, h.

Iz rezultata porasta suve materije, datih u tabeli 18, izračunali smo vreme potrebno za udvostručenje biomase kvasca. Ovo vreme udvostručenja iznosi 106,66 minuta. Vrednost $Y_{ATP} = 7,36$. Kako se vidi, ova vrednost Y_{ATP} je manja nego u prethodnom ogleadu (tabela 16), što znači da je potrebno da se utroši više energije da bi se stvorila određena količina biomase.

Metabolička aktivnost na glukozu se bitno menja u odnosu na vrednosti za metaboličku aktivnost dobijene u prethodnom

ogledu (tabela 16). Iz rezultata datih u tabeli 18, vidi se da su kvasne ćelije sposobne da koriste etanol u svojim metaboličkim putevima jer se stvara znatna količina ugljen-dioksida, a takodje, se troši i znatna količina kiseonika što ukazuje da ne dolazi do nekih bitnih smanjenja aktivnosti enzima koji upućuju etanol u metabolizam kvasnih ćelija. Specifična aktivnost malat dehidrogenaze u dezintegratu je znatna u poređenju sa prethodnim ogledom (tabela 16) i ne pokazuje neko bitno smanjenje specifične aktivnosti. Kod rezultata specifične aktivnosti alkohol dehidrogenaze zapaža se povećanje, u odnosu na prethodni ogled (tabela 16). Ovo povećanje se može objasniti povećanim potrebama kvasnih ćelija -- da sintetizuje enzime koji će stvarati etanol u podlozi u kojoj ima više glukoze (u toku fermentativnog dela ogleda). U toku aerobne faze ogleda, nije došlo do smanjenja specifične aktivnosti ovog enzima koji ima višestruku ulogu u metabolizmu kvasnih ćelija. Isto tako, specifična aktivnost izocitrat lijaze je povećana u poređenju sa rezultatima datim u tabeli 16. Ovo malo povećanje specifične aktivnosti izocitrat lijaze je razumljivo, jer je povećana aktivnost ovog enzima dokaz metaboliziranja etanola poznatim metaboličkim putevima u kvasnim ćelijama.

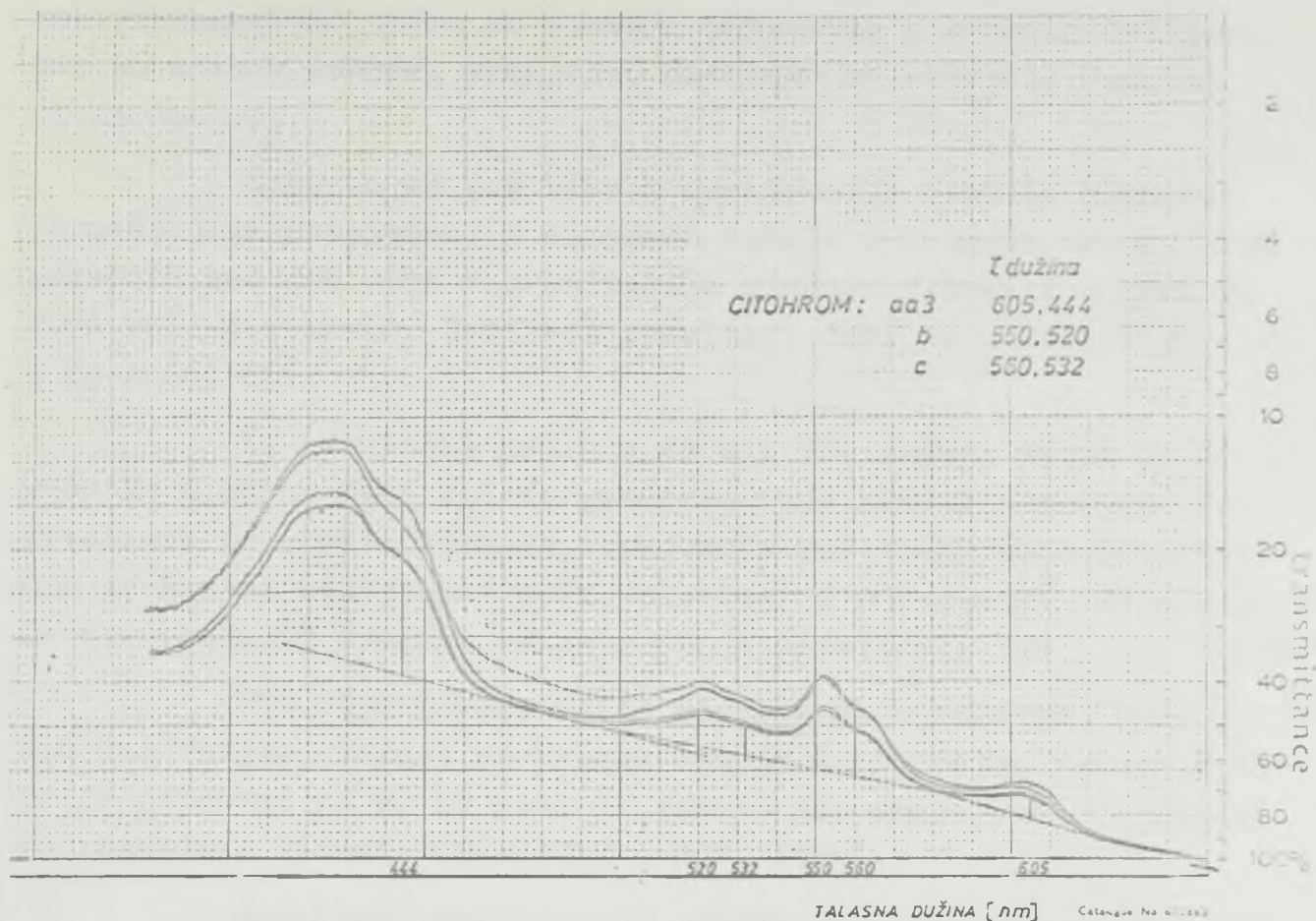
Kako utiče ova koncentracija etanola u hranljivoj podlozi na sadržaj citohroma može se videti u tabeli 19 i na slici 20.

Tabela 19

Sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama *Saccharomyces cerevisiae* uzgajanog u hranljivoj podlozi koja je sadržala 6,33 vol. % etanola pod aerobnim uslovima

Vreme h	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l							Ukupni
	Talasna du- žina	605	aa ₃ 444	550	b 520	560	c 532	
0		1,59	0,80	2,69	2,35	2,40	2,87	12,70
3		2,38	1,30	3,25	3,52	3,84	3,57	18,36
5		2,89	2,01	3,18	3,25	4,14	4,05	19,38
9		2,56	2,00	3,17	3,23	4,20	4,19	19,23
13		2,34	2,16	3,17	3,34	4,17	4,05	19,52
21		2,32	2,15	3,15	3,42	4,20	4,18	19,42
Srednja vrednost		2,32	1,82	3,10	3,18	3,82	3,81	18,10
			4,14		6,28		7,63	

Povećana koncentracija glukoze u anaerobnoj fazi ogleda najverovatnije sprečava formiranje citohroma, tako da se na početku aerobicne faze u kvasnim ćelijama nalazi znatno smanjen sadržaj citohroma u odnosu na dobijeni sadržaj citohroma u prethodnom ogledu (tabela 17). Naročito smanjenje je u sadržaju citohroma aa₃, čiji je sadržaj u toku ovog ogleda u nultom času 2,39 mola $\cdot 10^5$ /l, dok je u prethodnom ogledu, nakon fermentativne faze, sadržaj citohroma aa₃ bio 4,43 mola $\cdot 10^5$ /l. Što se tiče sadržaja citohroma b i citohroma c u toku ovoga ogleda njihov sadržaj je smanjen na početku aerobicne faze ogleda. Nakon tri časa aeracije, sadržaj citohroma aa₃ se povećao, što znači da su ga ćelije u toku ova tri časa sintetizovale, ali koncentracija ovog citohroma u toku aerobicnog dela ogleda nije dostigla sadržaj koji je imao u toku prethodnog ogleda (tabela 17). Tokom čitave aerobicne faze ogleda ne dolazi do znatnijeg povećanja sadržaja



Slika 24 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 6,33 vol. % etanola uz aeraciju 80 l/l,h

citohroma aa₃ na gama traci (444 nm). Nesposobnost ćelija da sintetizuju ovaj deo citohroma aa₃ je, najverovatnije, uslovljena negativnim delovanjem etanola u podlozi. Sadržaj citohroma b je, takodje, u toku čitave aerobne faze ogleđa niži nego u predlogodnom ogleđu (tabela 17). Interesatno je da i sadržaj citohroma c ne dostiže sadržaj koji je imao u predhodnom ogleđu (tabela 17). Iz ovako dobijenih rezultata može se pretpostaviti, da povećanje sadržaja etanola (koji služi kao izvor energije i ugljenika) do koncentracije 6,33

vol. % negativno utiče na sintezu citohroma u kvasnim ćelijama, jer se njihov sadržaj smanjuje. Naročito se smanjuje sadržaj citohroma aa_3 .

Kako će se još veća koncentracija etanola odraziti na nabrojane parametre, u narednom ogledu u fermentativnoj fazi povećali smo još više koncentraciju glukoze i dobili u podlozi 7,94 vol. % etanola. Dobijeni rezultati dati su u tabeli 20 i 21 i na slici 25.

Iz rezultata datih u tabeli 30, zapaža se, da je na početku aerobne faze ogleda razmnožavanje kvasca usporeno. Iz vrednosti povećanja biomase izračunali smo vreme udvostručavanja za kvasne ćelije pod ovim uslovima, i ono iznosi 170 minuta. Za ovu vrednost vremena udvostručanja izračunali smo $Y_{ATP} = 4,65$.

Ovo usporavanje rasta sigurno je uzrokovano inhibitornim delovanjem etanola na kvasne ćelije i, takodje, vremenom koje je potrebno da se iz etanola stvore intermedijeri, neophodni za izgradnju biomase (FLECHTER i MOR, 1970).

Rezultati metaboličke aktivnosti, na glukozi kao supstratu, pokazuju da je sposobnost stvaranja ugljen-dioksida smanjena za oko 25% (u proseku) u odnosu na prethodni ogled (tabela 18). Treba još istaći, upoređujući vrednosti utroška kiseonika, da su vrednosti za utrošak kiseonika u tabeli 20 znatno niže od vrednosti datih u tabeli 18.

Ovi rezultati metaboličke aktivnosti pokazuju da ova koncentracija etanola u hranljivoj podlozi inhibira disanje kvasnih ćelija, što je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili DREWS i HESSLER (1967). Razlika u rezultatima koje smo dobili mi, i rezultatima koje su dobili navedeni autori, je u tome, što su oni našli da pri ovoj koncentraciji od 8 vol. % nema nikakvog disanja, odnosno oslobadjanja ugljen-dioksida i utroška kiseonika.

Naši rezultati pokazuju da ćelija kvasca ima sposobnost da diše pri ovoj koncentraciji etanola, ali je intenzitet disanja znatno smanjen ako se uporedi sa intenzitetom disanja na glukozi, ili manjim koncentracijama etanola. Mogućnost disanja kvasnih ćelija očuvana je najverovatnije procesom adaptacije koji je kod

Tabela 20

Razmnožavanje kvasca Saccharomyces cerevisiae u podlozi koja je sadržala 7,94 vol. % etanola, pod aerobnim uslovima

Vreme h	Suva materija g/100 ml	Eta- nol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g SM kv., 30'				Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozu		na etanolu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-
0 ^b _x	0,68	7,94	213,37	36,68	12,21	42,98	38,21	10,18	206,86
2	1,07	2,08	273,18	46,30	12,18	56,10	36,83	12,08	403,66
4	1,76	6,25	353,19	50,20	17,30	60,17	35,42	14,17	472,20
6	1,98	5,56	342,28	60,15	18,15	55,43	32,17	15,64	450,53
10	2,10	5,00	295,17	67,43	17,89	44,17	31,23	13,87	396,45
20	2,48	3,76	324,56	72,17	19,80	87,13	35,14	11,45	350,34
24	2,73	2,16	295,17	76,15	20,18	92,16	31,17	14,13	394,80
28	2,99	1,87	299,90	98,17	26,17	96,19	25,71	12,16	305,20
38	3,24	0,20	237,18	97,58	28,91	91,98	20,45	11,18	345,67
Srednja vrednost			292,66	67,20	19,19	69,59	31,81	12,76	369,52

nas primenjen. Pored toga, mi smo kao supstrat koristili etanol koga su stvorile same ćelije, tako da su se u toku stvaranja "navikle" na ovako visoku koncentraciju etanola. Što se tiče sposobnosti kvasnih ćelija da asimiluju etanol kao supstrat, zapaža se, takodje, smanjenje sposobnosti asimilacije kiseonika na vrednosti koje su oko polovine (u proseku) niže nego vrednosti koje su dobijene za kvasne ćelije koje su uzete kao uzorci iz hranljive podloge koja je sadržala 6,33 vol. % etanola. Paralelno sa smanjenjem sposobnosti disanja, smanjena je i aktivnost malat dehidrogenaze enzima TCA ciklusa, koji je povezan sa lancem disanja, kako je to prikazano na metaboličkoj šemi povezanosti metaboličkih puteva koji se odigravaju istovremeno u kvasnim ćelijama. Specifična aktivnost alkohol dehidrogenaze je znat-

na i manje se smanjuje nego aktivnost malat dehidrogenaze. Ovo pokazuje da je alkohol dehidrogenaza aktivna, i to, najverovatnije, njen izoenzim (II) koji ima sposobnost da oksidiše etanol do acetaldehida. Pri ovoj koncentraciji etanola u hranljivoj podlozi dolazi do povećane mogućnosti gubitaka acetaldehida koji ima nisku tačku ključanja. U toku ovog ogleada smanjena je i specifična aktivnost izocitrat lijaze, enzima koji direktno uključuje acetil-CoA (metabolit etanola) u TCA ciklus. Ovo smanjenje aktivnosti razumljivo je, jer dolazi i do smanjenja aktivnosti malat dehidrogenaze enzima TCA ciklusa koji dobija intermedijerno delovanjem gliksilatnog ciklusa.

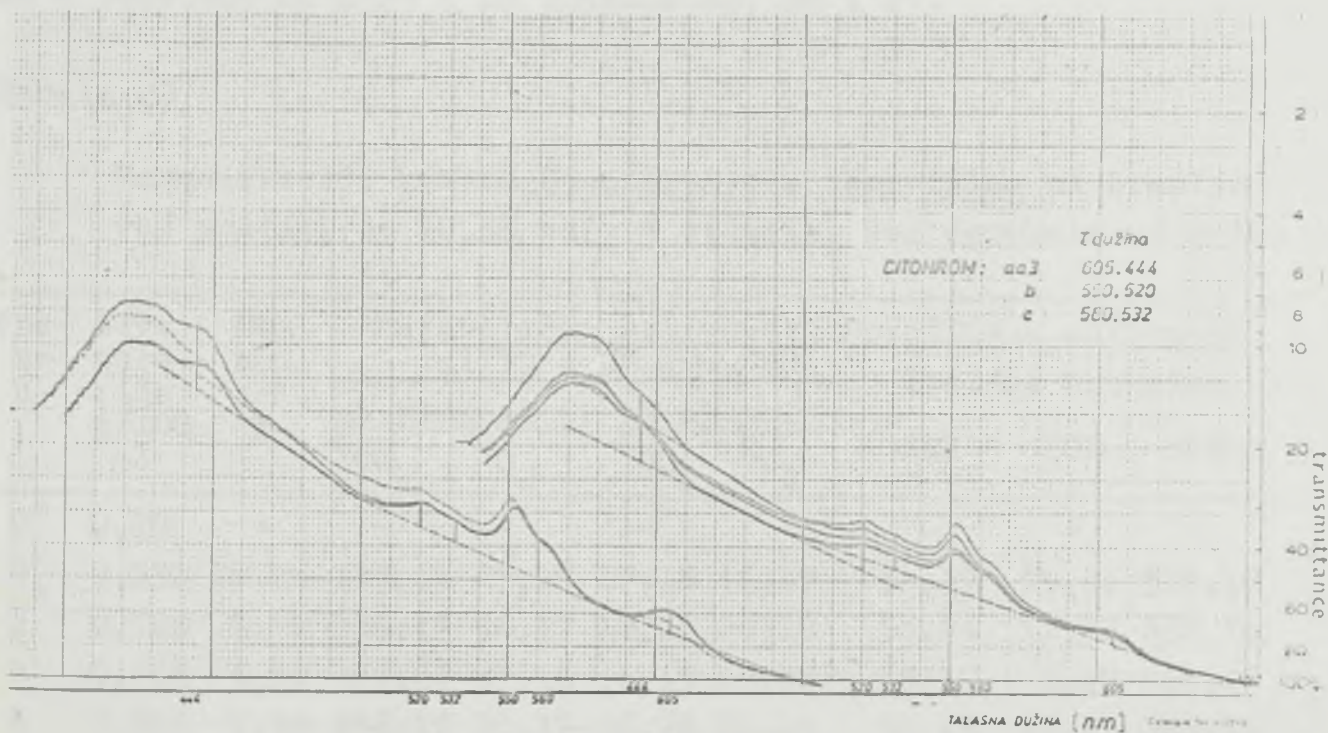
U tabeli 21 dati su rezultati sadržaja citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama koje su uzgajane pod uslovima opisanim u tabeli 20.

Tabela 21

Sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama, uzgajanim u hranljivoj podlozi koja je sadržala 7,94 vol. % etanola, pod aerobnim uslovima

Vreme h	C i t o h r o m i $\times 10^5$ nola/l						Ukupni
	605	aa- 3444	b 550	520	c 560	532	
0	1,62	0,82	2,80	2,32	2,57	2,87	13,00
2	1,86	1,40	3,59	2,94	3,36	3,02	16,17
4	2,27	2,00	3,72	2,99	3,13	3,16	17,27
10	2,30	2,01	3,56	2,86	3,14	3,20	17,07
20	2,26	1,99	3,38	2,72	3,09	3,25	16,69
28	2,18	2,19	3,35	3,92	3,11	3,27	18,02
38	2,22	2,18	3,27	3,86	3,12	3,19	18,02
Srednja vrednost	2,10	1,79	3,38	3,08	3,07	3,13	16,60
		3,89		6,46		6,20	

Rezultati sadržaja citohroma u nultom času, odnosno, nakon završetka anaerobne faze ogleada, pokazuju niže vrednosti nego u predhodnom ogleadu (tabela 19). Kao i u predhodnom ogleadu, (tabela 19) najviše se smanjuje sadržaj citohroma α_3 i to i na alfa i na gama traci (605 nm i 444 nm). Međutim, aeracijom se povećao sadržaj citohroma u kvasnim ćelijama, ali vrednosti do kojih se povećao sadržaj citohroma, nisu dostigle vrednosti sadržaja citohroma date u ranijim ogleadima (tabela 17, 19). Ako se sadržaj citohroma iz ove tabele uporedi sa



Slika 25 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 7,94 vol. % etanola uz aeraciju 80 l/l,h

sadržajem citohroma u kvasnim ćelijama koje su uzgajane na glu-kozi pod aerobnim uslovima (tabela 11), može se zaključiti da je sadržaj citohroma u kvasnim ćelijama uzgajanim na podlozi sa 7,94 vol. % etanola u proseku znatno niži, što ima za posledicu smanjeni intenzitet disanja ovih ćelija - što se vidi iz rezultata datih u tabeli 20.

U narednom ogledu povećali smo koncentraciju glukoze u anaerobnoj fazi ogleda i dobili još veći sadržaj etanola u hranljivoj podlozi. U toku fermentacije u podlozi se stvorilo 10,56 vol. % etanola. Rezultati, koje smo dobili u toku aerobnog uzgajanja kvasca na podlozi sa 10,56 vol. % etanola, dati su u tabelama 22 i 23 i na slikama 25, 26 i 27.

Tabela 22

Razmnožavanje kvasca Saccharomyces cerevisiae na hranljivoj podlozi sa 10,56 vol. % etanola, pod aerobnim uslovima

Vre- me h	Suva mate- rija g/100 ml	Eta- nol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g SM kv., 30'				Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozu		na etanolu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,29	-	-	-	-	-	-	-	
0 ^b _x	0,630	10,56	157,00	25,17	17,18	16,57	54,17	10,20	365,17
2	0,725	9,72	156,17	36,17	18,15	20,18	50,46	11,12	332,18
4	0,755	8,32	145,67	37,16	16,15	19,18	48,17	9,07	410,17
6	0,853	7,95	138,17	35,17	18,76	20,15	34,15	11,25	386,19
8	0,865	7,22	125,77	29,13	17,67	17,56	24,56	9,80	298,67
18	1,325	6,50	118,45	26,14	19,98	21,89	23,98	12,90	245,78
20	1,412	5,67	240,87	25,67	20,18	22,76	19,25	11,70	198,76
22	1,532	4,99	256,27	34,98	21,45	19,34	18,76	13,72	167,76
26	1,727	4,32	305,98	26,16	16,45	28,76	20,96	9,50	171,34
36	2,370	1,76	276,56	34,32	16,57	30,57	25,78	7,60	197,54
38	3,250	1,55	187,97	40,17	20,78	40,67	25,67	6,70	187,67
40	3,59	1,25	203,56	34,23	19,78	37,87	24,56	9,80	134,76
42	3,73	0,85	155,87	23,97	20,67	39,76	20,16	8,70	156,78
44	4,03	0,17	189,43	18,70	20,45	18,90	14,56	10,70	100,67
Sr. vredn.			189,84	30,51	18,73	25,31	28,94	10,19	238,87

- O^a - početak anaerobne faze u toku koje se iz 20,70 g/100 ml glukoze stvorilo 10,56 vol. % etanola,
- O^b - početak aerobne faze ogleđa u toku koje je u hranljivu podlogu uduvavan sterilan vazduh u količini od 80 l/l, h
- x - na početku aerobne faze ogleđa u hranljivu podlogu je dodato rastvora potrebnih količina hranljivih soli, biosa i 0,75 g/l asparaginske kiseline.

Kako se iz rezultata datih u tabeli 22 vidi, razmnožavanje kvasca na podlozi koja sadrži ovako visoku koncentraciju etanola znatno je usporeno, i vreme udvostručenja je vrlo dugo. Iz porasta biomase kvasca izračunali smo vreme udvostručavanja koje iznosi 984,37 minuta. Za vrednost ovoga vremena udvostručavanja, kad se izračuna vrednost za Y_{ATP} , dobije se vrednost $Y_{ATP} = 0,79$. Kako se iz ovoga rezultata vidi, ova koncentracija vlastitog metabolita smeta razmnožavanju samih ćelija. Ovako slabo razmnožavanje je posledica fiziološkog stanja ćelija kvasca koje, kako se iz rezultata metaboličkih aktivnosti na glukozi kao supstratu i etanolu kao supstratu vidi, ima smanjenu sposobnost respiracije. Ovako smanjena aktivnost enzima respiracije ima posledicu i na enzimatskim aktivnostima enzima koje smo odredjivali. Aktivnost malat dehidrogenaze je još više smanjena tako da dostiže oko deset puta manju vrednost od vrednosti koje imaju kvasne ćelije uzgajane na glukozi. Aktivnost alkohol dehidrogenaze se nije tako drastično smanjila što dokazuje da je to enzim čija aktivnost ne može da se smanji ovako visokim koncentracijama ovog metabolita EMP metaboličkog puta. Izocitrat lijaza, donekle, prati smanjenje specifične aktivnosti malat dehidrogenaze, što je u skladu sa brzinom odvijanja TCA metaboličkog puta u kvasnim ćelijama. Kako ovako visoka koncentracija etanola utiče na sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama, može se videti u rezultatima datim u tabeli 23, i na slikama 26 i 27.

Tabela 23

Sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama kvasca uzgajanim u podlozi 10,56 vol. % etanola, pod aerobnim uslovima

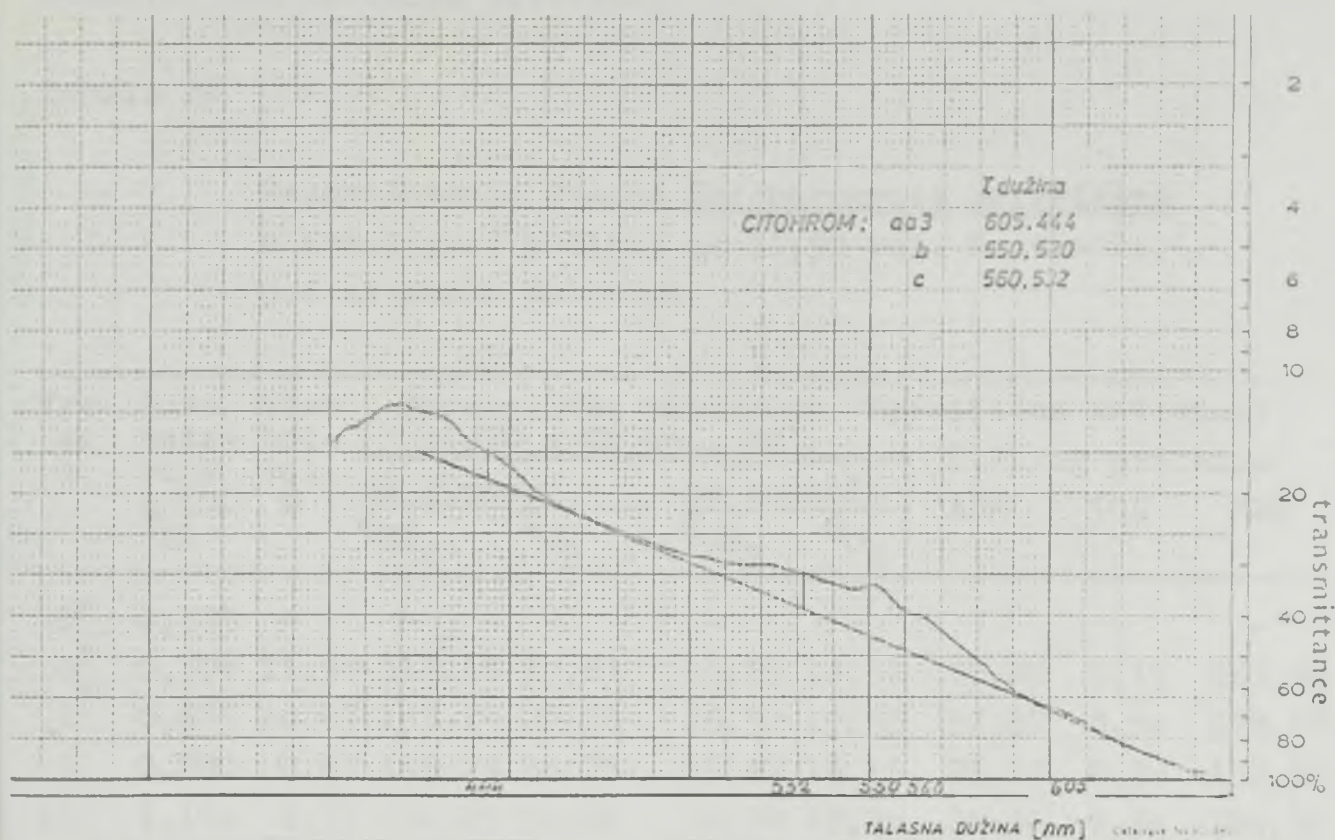
Vreme h	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l							Ukupni
	Talasna du- žina nm	^{aa₃} 605	444	550	^b 520	560	^c 532	
0		1,18	0,76	2,03	2,67	2,43	1,98	11,05
2		1,69	1,18	2,46	3,01	2,56	2,34	13,24
6		2,08	2,08	2,55	3,23	2,46	2,52	14,92
18		2,11	2,05	2,36	3,07	2,55	2,63	14,77
26		2,18	2,03	2,40	3,11	2,64	2,60	14,99
36		2,20	2,01	2,43	3,09	2,32	2,59	14,64
42		2,23	2,16	2,37	3,11	2,29	2,54	14,70
44		2,18	2,15	2,36	3,16	2,32	2,55	14,72
Srednja vrednost		1,98	1,80	2,36	3,04	2,44	2,44	14,13
		3,78		5,40		4,88		

Kako se iz rezultata datih u tabeli 23 vidi, sadržaj citohroma se sa povećanjem koncentracije etanola u hranljivoj podlozi mnogo smanjuje kada se uporedi sa ranije odredjivanim sadržajem citohroma u ćelijama kvasca uzgajanim na manjim koncentracijama etanola. Naročito se mnogo smanjuje sadržaj citohroma aa₃ koga ima najmanje od svih triju poznatih citohroma u kvasnim ćelijama. Manji sadržaj citohroma je u skladu sa smanjenim intenzitetom disanja što je konstatovano nakon razmatranja rezultata datih u tabeli 22.

Smanjenje citohroma aa₃ sa povećanjem etanola u podlozi i smanjenje intenziteta disanja sugerira da etanol može delovati kao da izaziva anaerobiozu.



Slika 26 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 10,56 vol. % etanola uz aeraciju 80 l/l,h



Slika 27 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 10,56 vol. % etanola uz aeraciju 80 l/1,h

Još u jednom ogledu povećali smo koncentraciju etanola, u želji da vidimo hoće li se ovo negativno delovanje veće koncentracije etanola i dalje povećavati.

U tabelama 24 i 25 dati su rezultati dobijeni uzgajanjem kvasca na hranljivoj podlozi koja je sadržala 11,58 vol. % etanola, pod aerobnim uslovima.

Tabela 24

Razmnožavanje kvasca Saccharomyces cerevisiae u hranljivoj podlozi sa 11,58 vol. % etanola, pod aerobnim uslovima

Vreme h	Suva materija g/100 ml	Eta- nol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g SM kv., 30'				Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozi		na etanolu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,373	-	-	-	-	-	-	-	-
0 ^b _x	0,574	11,58	112,18	37,83	13,89	10,32	35,16	9,15	167,32
2	0,875	10,67	135,19	27,76	18,32	19,45	37,87	8,50	178,43
4	0,990	9,67	145,23	30,75	15,37	19,15	23,17	8,30	132,96
14	1,130	8,55	130,23	31,86	16,98	18,20	24,34	7,80	140,34
20	1,285	7,38	161,45	27,15	12,30	19,75	25,68	7,30	123,46
22	1,310	6,56	178,56	29,83	10,35	18,20	29,50	8,70	167,19
24	1,330	5,32	189,40	26,17	15,16	17,35	21,76	10,30	186,13
32	1,678	3,99	190,32	28,56	18,30	20,67	20,00	9,70	130,25
34	1,732	3,20	176,19	25,65	17,63	17,30	28,17	8,90	128,38
36	1,750	2,75	200,46	29,15	19,20	24,87	25,70	9,90	148,19
46	1,999	1,98	203,18	30,45	21,87	28,96	20,34	10,10	198,45
48	2,030	1,45	197,86	29,34	20,56	30,48	27,50	11,12	176,34
50	2,167	1,23	205,40	32,86	19,40	28,18	26,40	9,34	168,34
62	2,852	0,32	156,32	30,16	20,38	19,19	28,96	8,56	148,93
Srednja vrednost			170,14	29,82	17,12	20,91	26,75	9,11	153,89

- 0^a - početak anaerobne faze ogleđa u toku koje se iz 21,8 g/100 ml glukoze stvorilo 11,58 vol. % etanola;
- 0^b - početak aerobne faze ogleđa u toku koje je u hranljivu podlogu uduvan sterilan vazduh u količini od 80 l/l, h,

x - na početku aerobne faze ogleada u hranljivu podlogu dodate su potrebne količine hranljivih soli, biosa i 0,75 g/l asparaginske kiseline.

Iz vrednosti sadržaja suve materije, datih u tabeli 24, izračunali smo vreme udvostručenja suve materije i ono iznosi za ove uslove 11028,8 minuta. Za ovu vrednost udvostručenja $Y_{ATP} = 0,76$. Ovaj rezultat pokazuje da ova koncentracija etanola izrazito negativno utiče na metabolizam kvasnih ćelija. Vrednosti Q_{CO_2} u tabeli 24 znatno su niže nego u ranijim ogleadima (tabela 18, 20), što je posledica negativnog delovanja ovako visokih koncentracija etanola na enzime EMP metaboličkog puta. Pored toga, i vrednosti Q_{O_2} , koje daju informaciju o sposobnosti asimilacije kiseonika, znatno su niže nego u tabelama 18 i 20. Iako su ove vrednosti znatno manje nego u prethodnim ogleadima (sa nižim koncentracijama etanola), ćelije ipak, nisu sasvim izgubile sposobnost da stvaraju ugljen-dioksid, kako iz glukoze tako i iz etanola kao supstrata, i sposobnost da asimiluju kiseonik. Naime, do sada u literaturi, (DREWS i HESSLER, 1967), nije poznato da su kvasne ćelije sposobne da rastu na ovako visokim koncentracijama etanola. Sposobnost ćelija da dišu i metaboliziraju etanol i glukozu su, najverovatnije, posledica postepene adaptacije ćelija kvasca koje stvaraju postepeno etanol i na njega se privikavaju. Rezultati specifičnih aktivnosti enzima su neznatno niži od rezultata datih u tabeli 22. Od svih ispitivanih enzimskih aktivnosti, najmanje promene se primećuju kod specifične aktivnosti alkohol dehidrogenaze, što može biti dokaz da ovaj enzim nije osetljiv na ovako visoke koncentracije etanola. Prosečna vrednost specifične aktivnosti izocitrat lijaze (9,11 I.J/ng proteina) predstavlja nižu vrednost od prosečne vrednosti dobijene u toku ogleada čiji su rezultati dati u tabeli 22 (10,19 I.J/ng proteina).

U tabeli 25 i slici 28 dati su rezultati sadržaja citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama uzgajanim u hranljivoj podlozi, pod uslovima opisanim u tabeli 24.

Kako se iz rezultata sadržaja citohroma (tabela 25) vidi, sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama je niži nego u preth-

hodnom ogledu (tabela 23). Posmatrajući ove rezultate, može se zapaziti, da u toku aerobnog dela ogleda ne dolazi do povećanja sadržaja citohroma tako, da je ukupni sadržaj citohroma znatno niži u toku čitavog ogleda. Ove vrednosti sadržaja citohroma u skladu su sa rezultatima disanja kvasnih ćelija, kako na glu-kozi, tako i na etanolu kao supstratu (tabela 24).

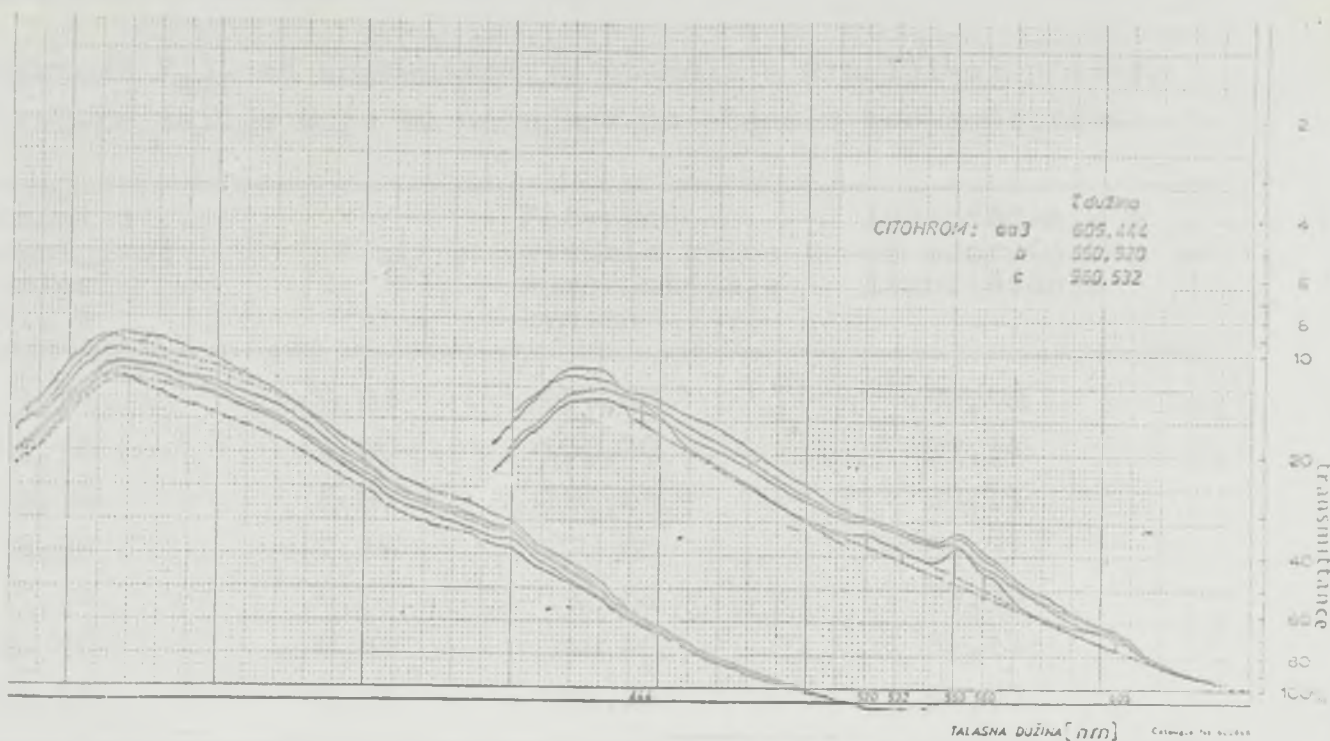
Tabela 25

Sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama kvasca uzgajanog u podlozi sa 11,58 vol. % etanola

Vreme h Talasna du- žina nm	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l						
	605 ^{aa}	444 ^b	550 ^b	520 ^c	560 ^c	532 ^c	Ukupni
0	1,09	0,60	2,20	1,76	2,20	1,70	9,55
4	2,12	0,78	2,20	1,96	2,60	1,87	11,81
20	2,10	1,00	2,20	1,90	2,70	2,80	12,80
32	2,13	1,01	2,21	1,91	2,60	2,85	12,85
46	2,10	1,05	2,20	1,90	2,50	2,90	12,47
62	2,10	1,04	2,20	1,90	2,40	2,86	12,55
Brednja vrednost	1,94 2,85	0,91	2,20 4,09	1,89	2,50 4,93	2,43	12,17

Nakon izvršenih ogleda i analize dobijenih rezultata donekle smo u stanju da okarakterišemo etanol kao izvor uglje-nika i energije za kvasne ćelije. Jedan od osnovnih pokazatelja koji će nam poslužiti u ovom ocenjivanju je količina potrebnog etanola za dobijanje 100 g suve materije kvasca. Ove vrednosti za različite koncentracije etanola izračunate su iz rezultata utrošenog etanola i količine dobijene suve materije u toku ogleda. Vrednosti koje smo dobili ovakvim izračunavanjem date su u tabeli 26.

Pored utrošene količine etanola za 100 g suve mate-rije kvasca, interesantno je posmatrati kako zavise vrednosti



Slika 28: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,58 vol. % etanola, uz aeraciju 80 l/l,h

Y_{ATP} od koncentracije etanola u hranljivoj podlozi. Da bi ta zavisnost bila pregledna, u tabeli 26 date su vrednosti Y_{ATP} dobijene za svaki ogled.

Kako se iz ovih vrednosti vidi Y_{ATP} veoma mnogo zavisi od koncentracije etanola u hranljivoj podlozi. Za niže koncentracije etanola 1,34 vol. % i 3,36 vol. %, ova vrednost ne odstupa znatno od vrednosti dobijene na glukozu kao izvoru energije i ugljenika (9,94g/molu ATP-a, tabela 10). Sa porastom koncentracije etanola opada vrednost Y_{ATP} tako, da za kon-

Tabela 26

Zavisnost Y_{ATP} od koncentracije etanola u hranljivoj podlozi za kvasne ćelije koje su uzgajane na etanolu kao supstratu

Etanol u hranljivoj podlozi vol. %	Y_{ATP}	Potrebno etanola g/100 g suve materije kvasca	Iskorišćenje % od teorijskog iskorišćenja
1,34	9,83	153,90	90,48
3,36	9,20	155,20	89,34
4,56	8,67	163,64	85,11
6,33	7,36	170,00	81,91
7,94	4,65	191,82	72,59
10,56	0,80	348,28	37,11
11,58	0,76	401,24	34,70

centraciju etanola od 7,94 vol. % $Y_{ATP} = 4,65$ što predstavlja polovinu vrednosti dobijene za glukozu kao supstrat. Za koncentracije etanola 10,56 vol. % i 11,58 vol. % dobijaju se vrednosti koje su manje od 1.

Pored navedene zavisnosti Y_{ATP} od koncentracije etanola u hranljivoj podlozi treba razmotriti i vrednosti potrebnog etanola (g) za 100 g suve materije kvasca. U našim eksperimentima količine potrebnog etanola jako zavise od koncentracije etanola u hranljivim podlogama. Tako je u hranljivoj podlozi sa 1,34 vol. % etanola potrebno za 100 g kvasca (s.m.) 153,90 g etanola. Kako se povećavala količina etanola u hranljivoj podlozi tako se i ova vrednost potrebne količine etanola za 100 g kvasca (s.m.) povećavala i za koncentraciju etanola od 11,58 vol. % za 100 g kvasca (s.m.) bilo je potrebno 401,24 g etanola. Iskorišćenje etanola (% u odnosu na teorijsko iskorišćenje) izračunato je na osnovu toga što se zna da je za 100 g s.m. kvasca potrebno teorijski utrošiti 139,26 g etanola (WHITE, 1954). Kako se iz rezultata vidi iskorišćenje veoma mnogo zavisi od koncentracije etanola u podlozi. Ove veće vrednosti utroška etanola uzrokovane su

najverovatnije guticima koji nastaju usled isparavanja, jer je poznato da acetaldehid, prvi intermedijer u koga se prevodi etanol (u slučaju glukoneogenezneze), ključa na 21°C, a ogledi su izvodjeni na 30°C jer je to optimalna temperatura za rast kvasca Saccharomyces cerevisiae. Pored toga, hranljiva podloga se aerirše kako bi se omogućilo aerobno razmnožavanje.

Uzrok smanjenja vrednosti Y_{ATP} sa porastom koncentracije etanola u hranljivoj podlozi može se najverovatnije tražiti i u potrebi energije za transport etanola u kvasnu ćeliju. Kako je već u pregledu literature dato, do sada ne postoje tačne vrednosti utroška ATP-a potrebnih za asimilaciju pojedinih izvora ugljenika za kvasne ćelije. STOUTHAMER i BETTENHAUSSEN (1973) su pretpostavili da je za transport jednog mola acetata potrebno utrošiti 1 mol energijom bogatog veza ATP-a. Kada se bude tačno znalo koje su količine energije potrebne za procese transporta, moći će se izvršiti određene korekcije i za vrednosti Y_{ATP} koje su date u ovom radu.

Kako zavise metaboličke aktivnosti kvasca od koncentracije etanola u hranljivoj podlozi, može se videti iz vrednosti datih u tabeli 27. One predstavljaju srednje vrednosti koje su dobijene u toku ogleda. Svaki ogled ponavljan je tri puta.

Iz rezultata datih u tabeli 27 se vidi da se sa povećanjem sadržaja šećera, u fermentativnoj fazi ogleda, dolazi do izvesnog povećanja sposobnosti kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid na glukozu kao supstratu. To povećanje se odnosi na ogled sa koncentracijom etanola od 1,34 vol. % i 3,36 vol. % etanola. Poredjenje sposobnosti kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid vršeno je sa sposobnošću kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid kada su uzgajane na glukoznoj hranljivoj podlozi. Koncentracija glukoze (u toku ogleda na glukozu) je bila 1,28 g/100 ml (tabela 10). U toku ogleda sa koncentracijom etanola od 4,56 vol. % (tabela 16) ova fermentativna sposobnost kvasnih ćelija se smanjuje, ali ne znatno, u odnosu na kvasne ćelije koje su uzgajane na glukozu (tabela 10). Sa povećanjem koncentracije etanola u hranljivoj podlozi smanjuje se sposobnost kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid iz glukoze kao supstrata. Pri koncentraciji

Tabela 27

Zavisnost metaboličke aktivnosti intaktnih kvasnih ćelija Saccharomyces cerevisiae od supstrata i od koncentracije etanola kao supstrata

Supstrat	Metabolička aktivnost ml/10 g SM kvasca, 30'			
	na glukozii		na etanolu	
	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}
Hranljiva podloga sa glukozom koncentracije 1,22 %	499,67	307,98	21,25	41,55
podloga sa 1,34 vol. % etanola	550,83	279,76	65,70	71,17
podloga sa 3,36 vol. % etanola	650,71	159,01	67,61	79,29
podloga sa 4,56 vol. % etanola	467,18	132,07	39,37	168,03
podloga sa 6,33 vol. % etanola	423,95	138,68	24,28	170,78
podloga sa 7,94 vol. % etanola	292,66	67,20	19,19	69,59
podloga sa 10,56 vol. % etanola	189,84	30,51	18,73	25,31
podloga sa 11,58 vol. % etanola	170,14	29,82	17,12	20,91

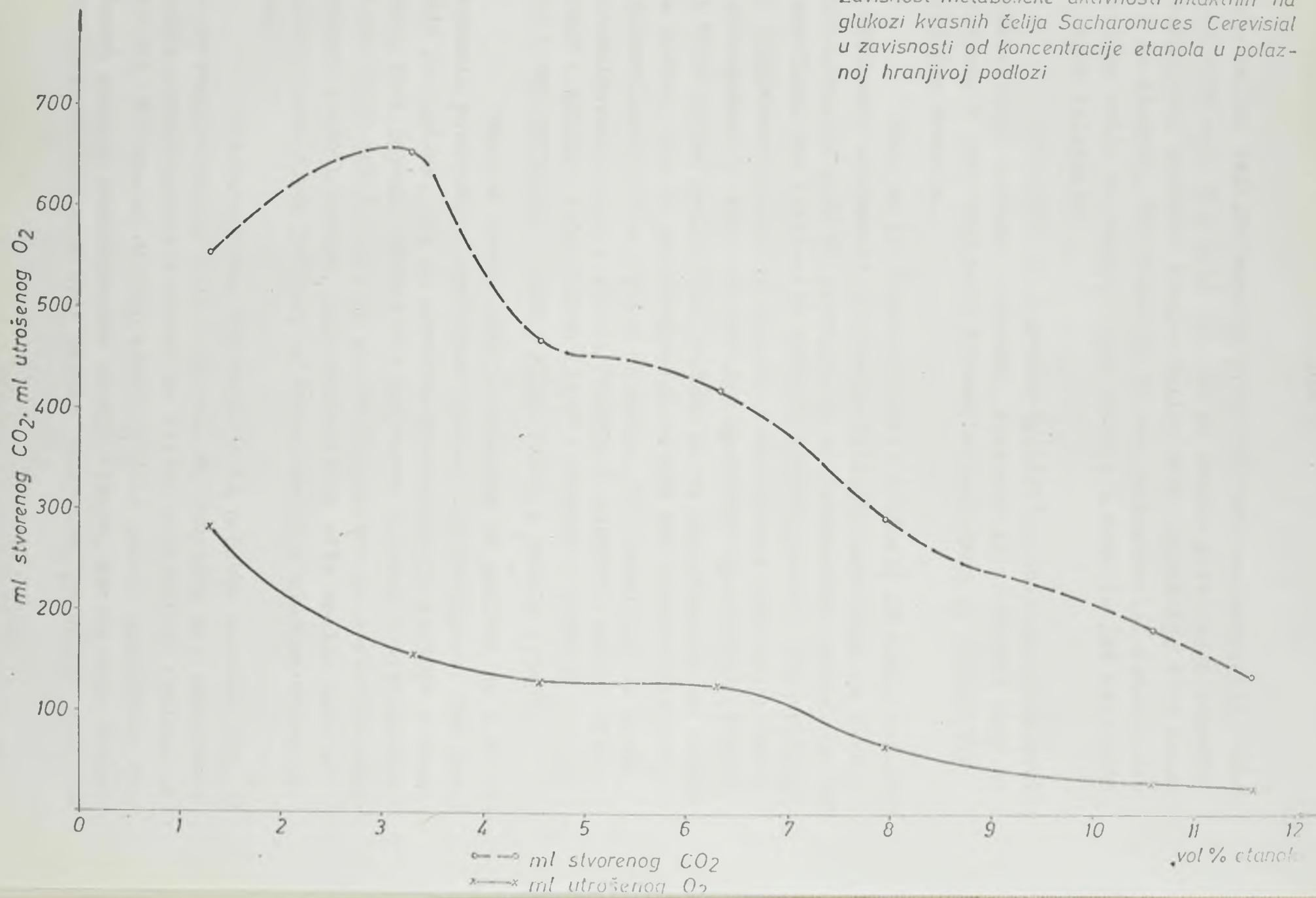
etanola 11,58 vol. % (tabela 24) sposobnost ćelija kvasca da stvaraju ugljen-dioksid iz glukoze je smanjena za 2,94 puta, dok se sposobnost ćelija da asimiluju kiseonik smanjila mnogo više za oko 10 puta. Razlog ovako nesrazmernom smanjenju je, najverovatnije, u tome što je fermentativna sposobnost kvasnih ćelija konstitutivna osobina (OURA, 1972).

Kako zavisi metabolička aktivnost kvasnih ćelija na glukozii kao supstratu, od koncentracije etanola u hranljivoj

podlozi na kojoj su uzgajane ćelije, može se videti na slici 29. Smanjenje sposobnosti kvasnih ćelija da troše kiseonik sa povećanjem koncentracije etanola predstavlja na izvestan način dokaz inhibicije disanja kvasnih ćelija sa povećanjem koncentracije etanola. Smanjenje sposobnosti asimilacije kiseionika je proporcionalno sa povećanjem koncentracije etanola u hranljivoj podlozi.

Metabolička aktivnost ćelija kvasca na etanolu kao supstratu ukazuje na to koliko su kvasne ćelije sposobne da metabolizirajući etanol stvore ugljen-dioksid, reakcijama opisanim ranije. Kvasne ćelije koje su uzgajane na glukozu poseduju izvesnu sposobnost da stvaraju ugljen-dioksid iz etanola, kao supstrata, što je dokaz istovremenog delovanja glioksilatnog metaboličkog puta, EMP metaboličkog puta i TCA ciklusa. Kako se povećava koncentracija etanola u hranljivom supstratu, povećava se i sposobnost kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid iz etanola, a takodje i sposobnost da troše kiseonik. To je dokaz adaptacije kvasnih ćelija na etanol kao izvor energije i ugljenika. Ovo povećanje prestaje kada koncentracija etanola predje 3,36 vol. % da bi, pri koncentraciji od 6,33 vol. %, sposobnost kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid iz etanola bila na nivou ćelija koje se uzgajaju na glukozu. Ostale vrednosti sposobnosti stvaranja ugljen-dioksida iz etanola opadaju sa povećanjem koncentracije etanola u hranljivom supstratu, ali ne znatnije, tako da i pri koncentraciji od 11,58 vol. %, kvasne ćelije imaju sposobnost da stvore 17,12 mililitara ugljen-dioksida u toku pola sata pomoću 10 g kvasnih ćelija. Sposobnost kvasca da asimiluje kiseonik, iz etanola kao supstrata, raste sa koncentracijom etanola u hranljivoj podlozi. Medjutim, tu sposobnost ne prati sposobnost za stvaranjem ugljen-dioksida što ukazuje na to, da dolazi do izvesne disproporcije izmedju stvorenog acetaldehida iz etanola i acetaldehida koji je uključen u metaboličke putceve. Ovu pojavu objasnili su DREWS i HESSLER (1967). Oni smatraju da je relativno mala sposobnost stvaranja ugljen-dioksida iz etanola, uz istovremeni veliki utrošak kiseonika, posledica stvaranja acetaldehida koji negativno utiče na kvasne ćelije.

Zavisnost metaboličke aktivnosti intaktnih na
glukozi kvasnih čelija *Sacharouces Cerevisial*
u zavisnosti od koncentracije etanola u polaz-
noj hranjivoj podlozi



Ovako velike razlike mogu se primetiti pri koncentraciji etanola od 4,56 vol. % i 6,33 vol. %. Sa daljim povećanjem etanola u hranljivoj podlozi, kvasne ćelije dišu usporenije i na etanolu i na glukozu, što pokazuje da ove koncentracije etanola nepovoljno utiču na respiratorne enzime, o čemu će još biti reči u daljem izlaganju.

Vrednosti za pojedine specifične enzimске aktivnosti, predstavljaju srednje vrednosti, dobijene iz vrednosti koje su određene u toku uzgajanja kvasca na podlogama sa različitim sadržajem etanola.

Kako se iz vrednosti datih u tabeli 28 vidi, rezultati enzimskih aktivnosti u kvasnim ćelijama uzgajanim na glukozu (koncentracije 1,22 %) pokazuju da se istovremeno odigravaju EMP metabolički put (aktivnost alkohol dehidrogenaze), glioksilatni put (aktivnost izocitrat lijaze) i TCA ciklus (aktivnost malat dehidrogenaze je vrlo velika). Ako uporedimo specifične aktivnosti ovih enzima međusobno, vidimo da se najintenzivnije odvija TCA ciklus, dok se znatno sporije odvija EMP metabolički put, a glioksilatni put se odvija najmanje. Ovi rezultati se slažu sa rezultatima koje su dobili POLAKIS i BARTLEY (1965); WITT, KRONAU i HOLZER (1966); GOTS (1967); CHAMPAN i BARTLEY (1968); BECK i VON MEYENBURG (1968); MAIN, FENCL i PROKOP (1969).

Kada su kvasne ćelije uzgajane na podlozi sa 1,34 vol. % etanola povećana je aktivnost alkohol dehidrogenaze. Ovo povećanje je logično, jer je povećana koncentracija glukoze u anaerobnoj fazi ogleđa. Specifična aktivnost alkohol dehidrogenaze u toku ovoga ogleđa veća je za oko 8 puta, što je posledica adaptivnosti kvasnih ćelija, koje sintetizuju više enzima kada se uzgaja u hranljivoj podlozi sa koncentracijom glukoze većom od 2,0%.

U toku ogleđa, kod koga je na početku aerobne faze koncentracija etanola bila 3,35 vol. %, povećava se i aktivnost alkohol dehidrogenaze u odnosu na ćelije uzgajane na podlozi sa 1,34 vol. % etanola. U toku aerobnog dela ogleđa specifična aktivnost alkohol dehidrogenaze ostaje visoka, što se može objasniti složenim sastavom ovog enzima. Medjutim, povećanje specifi-

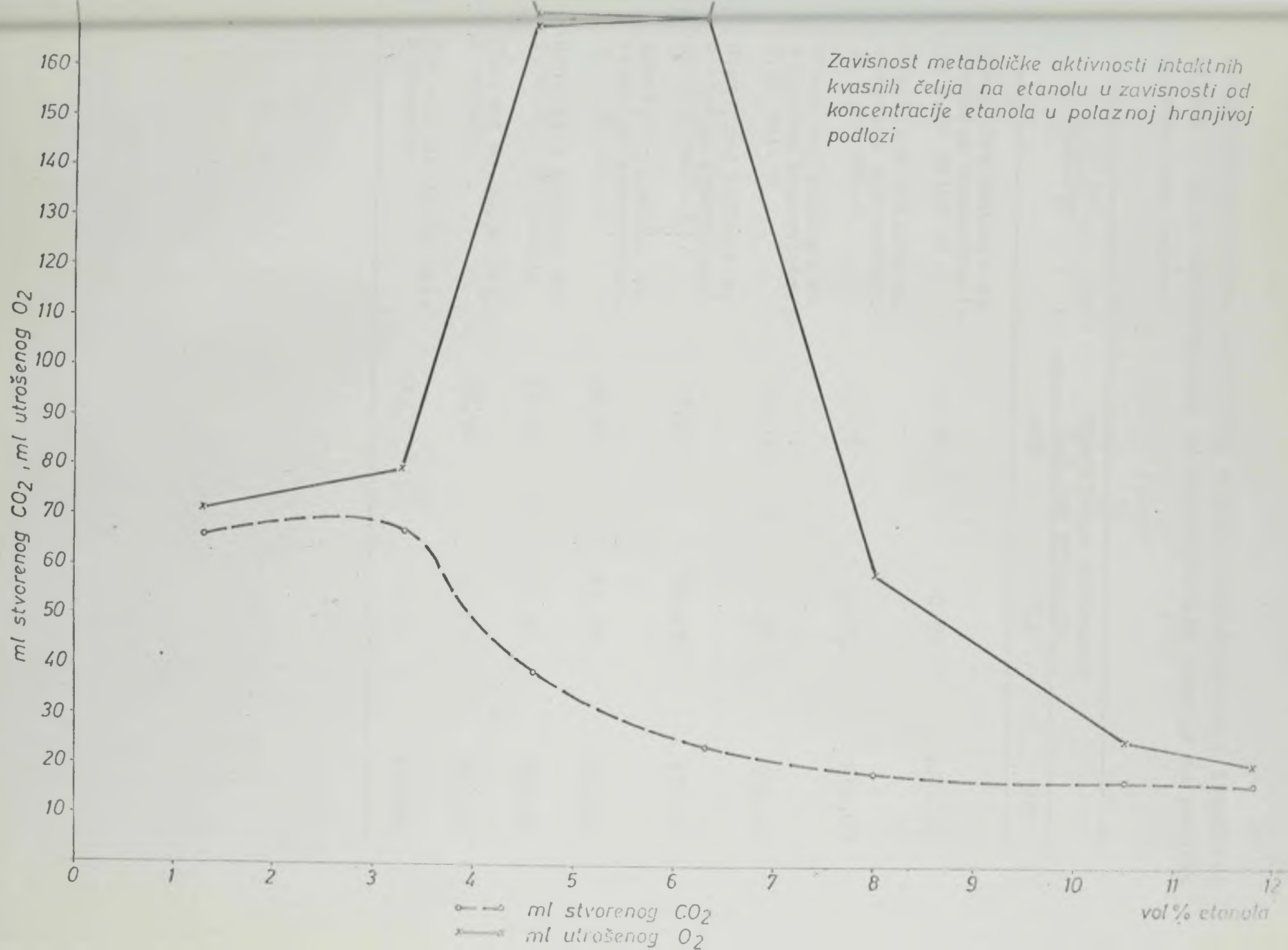


Tabela 28

Zavisnost specifične aktivnosti alkohol dehidrogenaze, izocitrat lijaze i malat dehidrogenaze od koncentracije etanola na početku aerobne faze ogleada.

Podloga	Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
	ADH	ICL	MDH
Hranljiva podloga sa glukozom koncentraci- je 1,22 g/100 ml	1,74	0,85	1246,95
Hranljiva podloga sa etanolom koncentraci- je 1,34 vol. %	13,95	3,92	842,07
Hranljiva podloga sa etanolom koncentracije 3,36 vol. %	37,92	9,85	659,67
Hranljiva podloga sa etanolom koncentraci- je 4,56 vol. %	37,08	10,78	637,34
Hranljiva podloga sa etanolom koncentraci- je 6,36 vol. %	36,90	13,48	629,60
Hranljiva podloga sa 7,94 vol. % etanola	31,81	12,76	369,52
Podloga sa 10,56 vol. % etanola	28,94	10,19	238,87
Podloga sa 11,53 vol. % etanola	26,76	9,11	153,89

čne aktivnosti alkohol dehidrogenaze nije paralelno sa povećanjem glukoze u toku anaerobne faze ogleđa. Kada je koncentracija glukoze prešla 15% (tabela 20), specifična aktivnost alkohol dehidrogenaze se nije više povećavala. Razlog ovome je, najverovatnije, u tome što oksidativni izoenzim alkohol dehidrogenaze biva represiran glukozom što su zapazili i opisali SCHIMPFESSEL, 1968) i FOLWER i sar., (1972).

Drugi važan enzim za ugradjivanje etanola, kao izvora ugljenika, je izocitrat lijaza. Kako se iz rezultata datih u tabeli 28 vidi, sa porastom sadržaja alkohola u hranljivim podlogama raste i specifična aktivnost ovoga enzima. Povećanje specifične aktivnosti izocitrat lijaze dokaz je intenzivnijeg delovanja glioksilatnog ciklusa. Ovo povećanje specifične aktivnosti izocitrat lijaze zapaža se do koncentracije etanola od 7,94 vol. % u podlozi. Kada je koncentracija etanola, u hranljivoj podlozi bila 10,56 vol. % došlo je do smanjenja specifične aktivnosti izocitrat lijaze, što pokazuje da se sa povećanjem koncentracije etanola povećava i negativan uticaj etanola na specifičnu aktivnost ovog enzima.

Kako se može videti iz vrednosti datih u tabeli 28 specifična aktivnost malat dehidrogenaze zavisi od koncentracije etanola u hranljivoj podlozi. Sa porastom koncentracije etanola opada aktivnost ovoga enzima na vrednost manju za oko polovinu od vrednosti dobijene za uzgajanje na glukozi kod koncentracije od 6,38 vol. %. Sa daljim povećanjem sadržaja etanola specifična aktivnost malat dehidrogenaze pada intenzivnije da bi pri koncentraciji etanola od 11,58 vol. % imala vrednost za oko deset puta manju od vrednosti koju je imala pri uzgajanju kvasca na podlozi sa glukozom. Ovo smanjenje može se objasniti smanjenjem intenziteta disanja što smo zaključili nakon razmatranja rezultata datih u tabeli 27.

U tabeli 29 dati su rezultati koji predstavljaju srednje vrednosti sadržaja citohroma u kvasnim ćelijama koje su uzgajane na podlogama sa različitim koncentracijama etanola (stvorenih pomoću kvasnih ćelija pod anaerobnim uslovima od različitih količina glukoze).

Tabela 29

Zavisnost sadržaja citohroma u kvasnim ćelijama od koncentracije etanola koji je služio ćelijama kao izvor energije i ugljenika pod aerobnim uslovima.

Podloga	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l			Ukupni
	Citohrom aa_3	Citohrom b	Citohrom c	
Hranljiva podloga sa glukozom koncentracije 1,22 g/l	5,25	7,49	7,73	20,51
Hranljiva podloga sa etanolom koncentracije 1,34 vol. %	5,03	7,50	7,86	20,42
Hranljiva podloga sa etanolom koncentracije 3,36 vol. %	4,72	8,08	9,43	22,15
Hranljiva podloga sa etanolom koncentracije 4,56 vol. %	4,85	7,02	8,80	21,21
Hranljiva podloga sa etanolom koncentracije 6,36 vol. %	4,14	6,28	7,63	18,10
Hranljiva podloga sa 7,94 vol. % etanola	3,89	6,46	6,20	16,60
Hranljiva podloga sa 10,56 vol. % etanola	3,78	5,40	4,88	14,13
Hranljiva podloga sa 11,58 vol. % etanola	2,85	4,09	4,93	11,87
Smanjenje pojedinih citohroma	1,84	1,83	1,56	1,72

Kako se iz prosečnih vrednosti (tabela 29) vidi, sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama vrlo mnogo zavisi od koncentracije etanola u hranljivoj podlozi. Ako posmatramo vrednosti ukupnog sadržaja citohroma aa_3 zapazićemo da se sadržaj ovoga citohroma (koji direktno prenosi vodonik na kiseonik) smanjuje sa povećanjem koncentracije etanola za 1,84 puta. Isto tako i

sadržaj citohroma b se smanjuje za oko 1,83 puta, dok se sadržaj citohroma c smanjuje samo za oko 1,56 puta. Iz ovih odnosa smanjenja sadržaja pojedinih citohroma možemo zaključiti da se najmanje smanjuje citohrom c.

Ukupni sadržaj citohroma u kvasnih ćelijama uzgajanim u podlozi sa 11,58 vol. % etanola smanjuje se za 1,72 puta, što predstavlja razlog smanjenja intenziteta disanja kvasnih ćelija (tabela 27).

Iz iznetih rezultata se može videti da se sa povećanjem koncentracije etanola smanjuje sadržaj citohroma u ćelijama što ima za posledicu smanjenje intenziteta disanja. Smanjenje intenziteta disanja uzrokuje smanjenje metaboličke aktivnosti uopšte, što se takodje vidi u rezultatima specifičnih enzimskih aktivnosti: alkohol dehidrogenaze, izocitrat lijaze i malat dehidrogenaze (tabela 28).

Ako se još jednom osvrnemo na rezultate date za vrednosti Y_{ATP} možemo zaključiti da uzgajanje kvasca u hranljivim podlogama sa većom koncentracijom etanola od 8,0 vol. % nije ekonomično, jer se sa povećanjem koncentracije etanola jako smanjuje vrednost Y_{ATP} , čak ispod vrednosti koje su nadjene u literaturi. Nagli pad vrednosti Y_{ATP} prouzrokovan je, kako smo iz rezultata videli, smanjenjem metaboličke aktivnosti, kako na glukozi, tako i na etanolu kao supstratu. Najveće promene nastaju u sadržaju citohroma čiji se sadržaj naglo smanjuje kada se koncentracija etanola poveća iznad 7,94 vol. %.

Iz svega napred navedenog vidimo da je glavna i najbitnija razlika u osobinama kvasnih ćelija uzgajanim na etanolu i ćelija koje se uzgajaju na glukozi ta, - da sa porastom sadržaja etanola u podlozi opada sposobnost disanja i sadržaj citohroma. Ovo smanjenje intenziteta disanja ima za posledicu malo iskorišćenje sirovine (etanola) i zbog toga je etanol nepovoljan za uzgajanje kvasca u podlogama koje sadrže više od 7,94 vol. % etanola. Zbog toga, kao i zbog u zadatku postavljenih razloga, počeli smo da u već ustaljene ogledne dodajemo aceton.

Da bismo ispitali na koji način aceton deluje na ćelije kvasca koje imaju smanjenu sposobnost disanja i smanjeni sadr-

žaj citohroma, dodavali smo u naredna tri ogleđa različite količine acetona na početku aerobne faze zajedno sa potrebnim količinama hranljivih soli i vitamina.

U tabeli 30 dati su rezultati koji su dobijeni kada je u hranljivu podlogu dodato 0,25 ml acetona/l hranljive podloge.

Od dobijenih rezultata najinteresantnije je posmatrati kako deluje dodatak acetona na sposobnost disanja kvasnih ćelija. Iz rezultata sadržaja suve materije možemo zaključiti da se postiže bolje iskorišćenje u odnosu na etanol jer se dobija više suve materije nego što je dobijeno u toku ogleđa čiji su rezultati dati u tabeli 24.

Vrlo je interesantno, da kvasne ćelije u toku ovog ogleđa (tabela 30) imaju veću sposobnost disanja kako na glukozu tako i na etanolu kao supstratu, što se jasno može videti iz rezultata metaboličke aktivnosti intaktnih ćelija (tabela 30).

Rezultati metaboličke aktivnosti razlikuju se od rezultata datih u tabeli 24 po sposobnosti kvasnih ćelija da troše kiseonik. Pored toga, postoji razlika u količini stvorenog ugljen-dioksida iz etanola kao supstrata. Ćelije koje su uzgajane uz dodatak acetona imaju znatno veću sposobnost obrazovanja ugljen-dioksida iz etanola.

Kako zavisi sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama od dodatka acetona, može se videti iz rezultata datih u tabeli 31 i slikama 31, 32 i 33.

Iz rezultata datih u tabeli 31 se vidi da dolazi do povećanja sadržaja citohroma u odnosu na ogleđ u kome nije dodavan aceton, a čiji su rezultati dati u tabeli 25. Zapaža se (tabela 30) da se povećava sadržaj citohroma aa_3 što se može povezati sa povećanjem sposobnosti disanja kvasnih ćelija naročito na etanolu kao supstratu.

Tabela 30

Razmnožavanje kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u hranljivoj podlozi koja sadrži 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,25 ml acetona/litru hranljive podloge

Vreme h	Suva mate- rija g/100 ml	Etanol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g. SM kvasca, 30'				Specifična enzimatska aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozu		na etanolu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,326	--	--	--	--	--	--	--	
0 ^x b	0,615	11,60	142,62	62,64	46,86	46,84	25,17	8,28	186,28
2	0,762	11,10	123,11	111,88	120,44	130,56	24,96	8,93	192,19
4	0,953	10,50	170,81	125,32	129,30	145,35	28,19	10,72	243,59
6	0,999	9,40	166,00	133,76	130,96	140,28	29,36	14,26	245,31
16	1,385	8,25	196,25	156,70	128,32	139,17	30,18	15,28	244,73
18	1,420	7,63	205,17	132,18	133,18	135,29	31,19	15,13	235,29
24	1,598	6,25	276,25	145,19	128,17	129,35	32,16	16,28	248,72
34	1,998	3,65	350,73	160,36	140,26	133,97	31,38	18,24	251,38
38	2,116	2,76	345,18	170,15	120,44	140,17	32,17	16,27	250,26
42	2,453	1,68	375,26	173,19	132,15	135,68	33,94	17,26	252,93
46	2,638	1,25	276,90	165,19	127,19	137,95	32,99	18,28	253,92
56	3,380	0,68	346,80	176,90	118,95	143,17	33,76	17,25	260,73
58	3,560	0,22	360,80	138,76	130,36	152,18	34,68	16,37	276,18
Sred. vred.			256,61	134,79	122,05	131,53	30,65	14,84	241,65

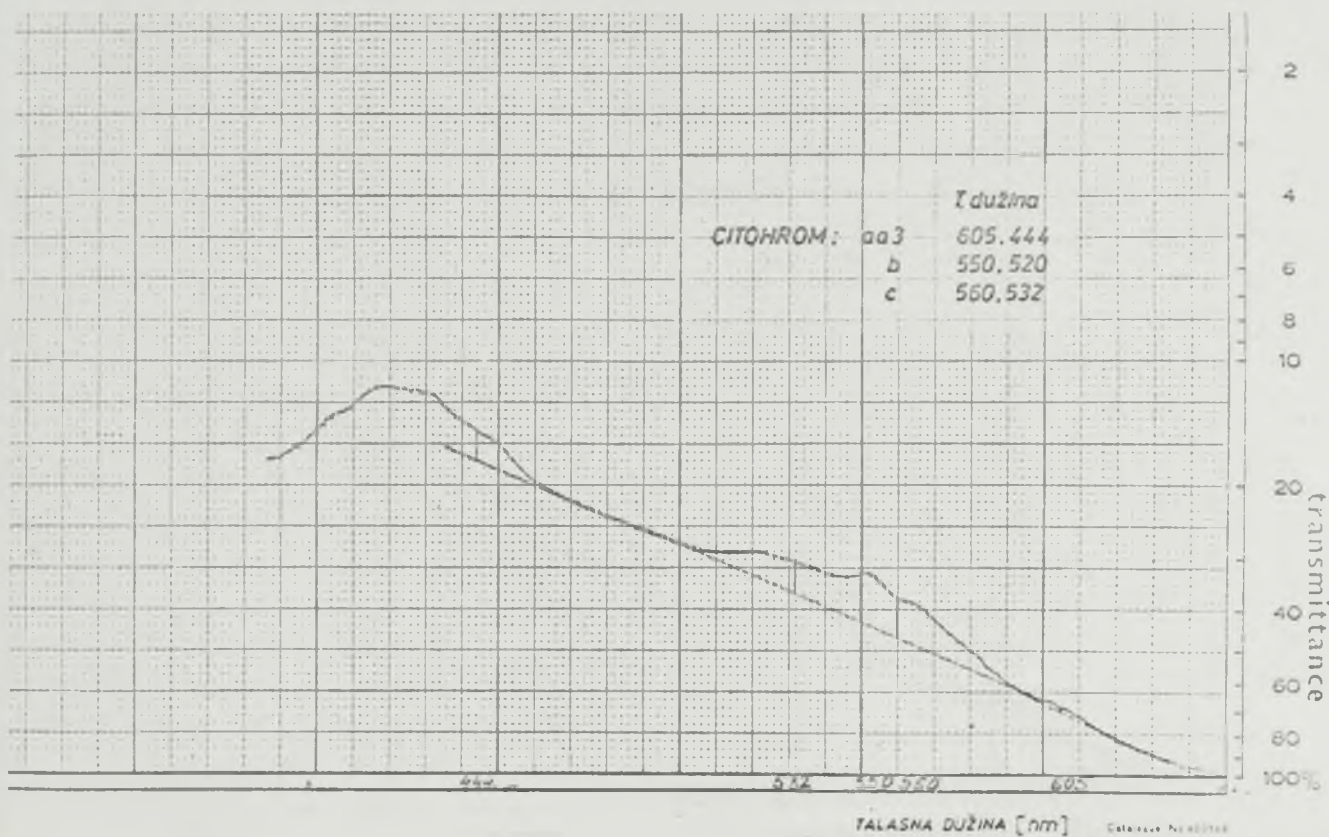
- O^a - početak anaerobne faze u toku koje se iz 22,5 g/100 ml hranljive podloge glukoze - koja je dodavana postepeno kako se i fermentirala do etanola i ugljen-dioksida - ova fermentativna faza oglada trajala je oko 18 časova.
- O_b^x - nakon završene fermentativne faze oglada - kada je stvoreno u hranljivoj podlozi etanola koliko smo želeli otpočelo se sa uduvavanjem sterilnog vazduha u količini od 80l/1, h.
- x - na početku aerobne faze oglada u hranljivu podlogu je uz dodatak hranljivih soli, biosa, acetona 0,25 ml/1 dodano i 0,5 g/1 asparaginske kiseline.

Tabela 31

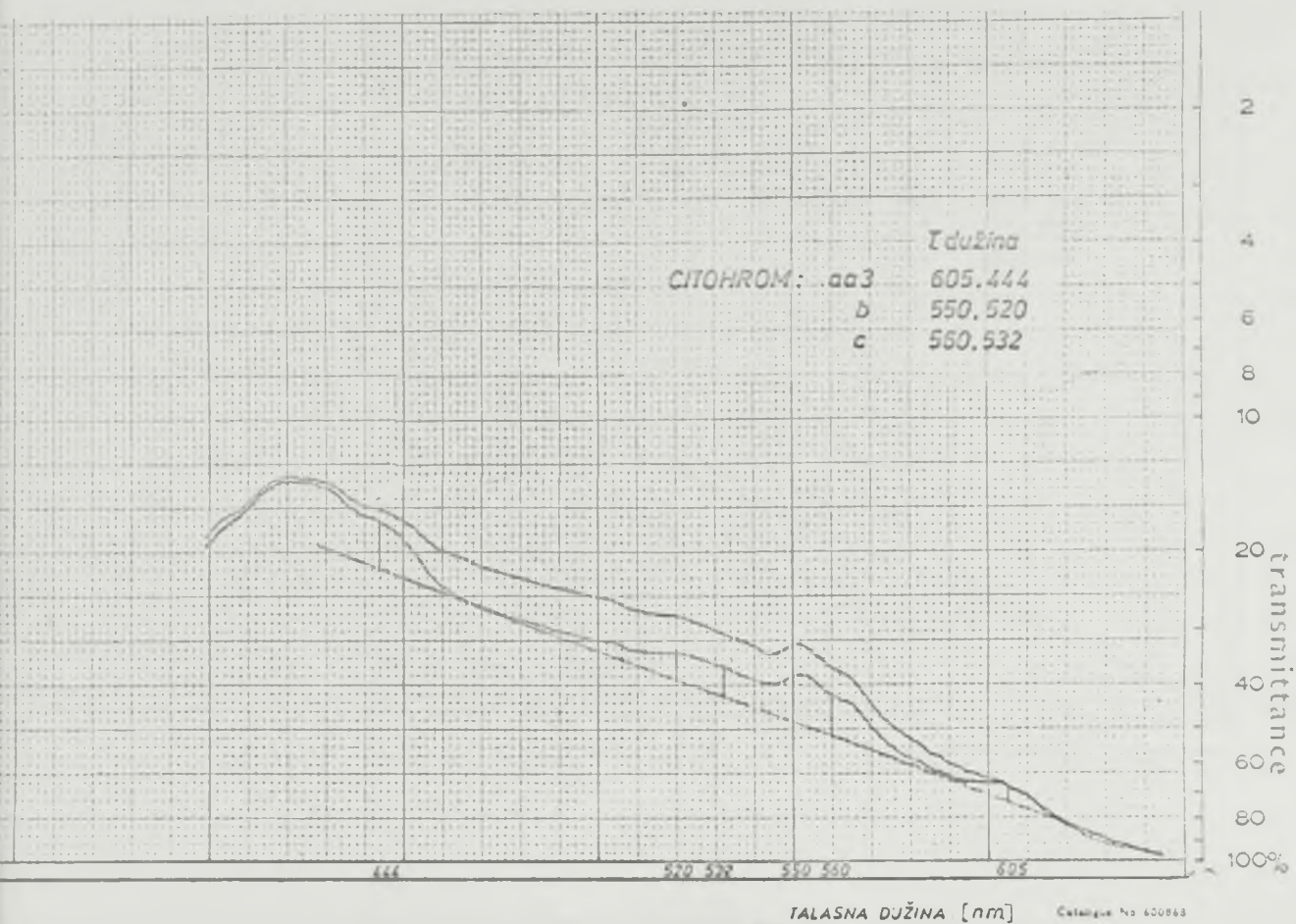
Sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama kada se kvasac uzgaja na hranljivoj podlozi koja sadrži 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,25 ml acetona po litru hranljive podloge

Vreme h	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l							
	Talasna du- žina nm	605^{aa}	444^z	550^b	520	560^c	532	Ukupni
0		1,05	0,63	2,31	2,50	2,20	2,37	11,06
2		1,55	0,95	2,42	2,50	2,25	2,43	12,10
4		2,05	1,10	2,53	2,63	2,50	3,00	13,78
16		2,12	1,10	2,70	2,75	2,69	3,45	14,81
34		2,13	1,11	2,90	2,70	2,70	3,62	15,16
46		2,15	1,13	2,90	2,70	2,70	3,70	15,28
Srednja vrednost		1,84	1,00	2,62	2,63	2,50	3,09	13,68
		2,84		5,25		5,59		

Da bismo ispitali da li povećanje dodatka acetona može izazvati povećanje intenziteta disanja i sadržaja citohroma u intaktnim ćelijama dodavali smo u narednom ogledu 0,75 ml acetona po litru hranljive podloge.



Slika 31 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,25 ml / l acetona, uz aeraciju 80 l /1,h



Slika 32 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,25 ml / l acetona, uz aeraciju 80 l/l,h



Slika 33 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,25 ml/l acetona, uz aeraciju 80 l/l,h

U toku ovog oglada odredjivali smo i metaboličku aktivnost kvasnih ćelija u puferu koji je sadržao odredjenu količinu acetona da bismo utvrdili da li ćelije mogu da koriste acetone kao izvor ugljenika i da li ga uključuju u svoje metaboličke puteve. Proučavanjem literature iz podataka utvrdili smo da niko do sada nije ispitivao i potvrdio da kvasac Saccharomyces cerevisiae može da koristi acetone kao izvor energije i ugljenika u svom metabolizmu. Rezultati koje smo dobili pod navedenim uslovima dati su u tabeli 32 i 33 i slikama 34, 35, 36, 37, 38, 39 i 40.

Iz rezultata datih u tabeli 32 se vidi da se sposobnost kvasnih ćelija da metaboliziraju glukozu razlikuje u tome od prethodnog oglada (tabela 30), što se povećavaju vrednosti za utrošak kiseonika. Prosečna vrednost utroška kiseonika u tabeli 32 iznosi 206,02 ml/10 g SM, 30', dok prosečna vrednost za utrošak kiseonika data u tabeli 30 iznosi 134,79 ml/10 g SM kv., 30'. Ako uporedimo ove dve prosečne vrednosti možemo predpostaviti da dodati acetone ima sposobnost da aktivira respiratorne enzime kao što ima sposobnost da aktivira proteolitske enzime (HERING, 1967). Što se tiče vrednosti za metaboličku aktivnost ćelija na etanolu kao supstratu, ne zapažaju se znatne razlike u odnosu na prethodni ogled (tabela 30). Medjutim, interesantno je videti rezultate metaboličkih aktivnosti na acetoneu kao supstratu. Kako se iz rezultata vidi, acetone se može vrlo dobro metabolizirati pomoću kvasnih ćelija. Kvasne ćelije imaju veliku sposobnost da stvaraju ugljen-dioksid iz acetona kao supstrata, jer je dobijena prosečna vrednost od 125,52 ml/10 g SM kv., 30'.

Razmnožavanje kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u hranljivoj podlozi koja je sadržala 11,50 vol. % etanola (stvorenog pomoću kvasnih ćelija) uz dodatak acetona u količini od 0,75 ml/l hranljive podloge i 0,5 g/l asparaginske kiseline

Vreme h	Suva materia rijal	Eta- nol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g. SM kv., 30'								Specifična aktivnost I.J./mg proteina			
			na glukozi		na etanolu		na acetonu		na acetonu + asparag.kis.		ADH	ICL	MDH	
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{CO_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}				
0 ^a	0,350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 ^x b	0,590	11,50	189,34	102,05	55,21	71,76	34,93	58,96	62,55	93,39	27,32	8,29	178,26	
2	0,953	10,27	198,36	126,13	76,51	83,18	52,62	109,12	53,15	65,49	30,27	11,36	192,18	
4	1,025	10,03	208,56	145,17	100,36	111,01	108,36	118,36	74,66	101,66	32,45	14,28	253,76	
6	1,136	9,74	238,80	176,13	99,28	142,68	115,19	130,26	125,19	148,52	33,74	16,39	245,29	
16	1,662	8,06	238,90	205,17	96,58	128,17	120,36	135,19	130,28	150,29	35,28	20,36	252,96	
20	1,736	7,36	275,30	238,17	108,17	135,19	138,52	129,18	145,18	175,18	34,17	21,29	264,29	
24	1,893	6,03	268,38	248,66	120,53	132,56	148,76	136,95	130,19	163,56	35,28	20,80	259,27	
28	1,995	5,26	272,25	236,17	127,62	130,77	171,13	175,88	140,27	150,19	36,33	22,18	260,31	
38	2,40	3,45	252,18	240,51	110,73	125,19	152,16	169,29	136,17	165,19	37,17	26,36	265,28	
42	2,735	2,76	296,15	239,62	120,17	140,27	148,17	172,19	135,19	170,56	35,27	25,27	270,29	
46	2,938	1,27	243,19	243,76	130,17	146,28	155,28	179,80	126,72	180,15	34,13	23,18	302,19	
50	3,245	0,32	236,88	240,58	126,18	139,43	160,19	185,26	128,19	195,17	35,26	24,19	301,34	
54	3,582	0,19	246,43	206,02	107,66	125,52	128,52	145,81	130,17	187,15	36,28	25,36	297,56	
Sred. vred.			246,43	206,02	107,66	125,52	128,52	145,81	116,76	150,11	34,07	19,94	257,15	

O^a- početak anaerobnog dela oglada u toku koga se iz glukoze koncentracije 22,5 g/100 ml hranljive podloge, ova faza trajala je 13 časova

O^b- početak aerobne faze oglada u toku koje je uduvavan sterilan vazduh u količini od 80 l/l, h,

x - na početku aerobne faze oglada dodano je u hranljivu podlogu pored hranljivih soli, biosa, 0,5 g/asparaginske kiseline/l i 0,75 ml acetona/l.

Kvasne ćelije imaju sposobnost i da troše kiseonik, kada je supstrat aceton, i prosečna vrednost utroška kiseonika iznosi 145 ml O₂/10 g SM kv., 30'. Ako se vrednosti Q_{CO₂} podelo sa Q_{O₂} dobija se poznati odnos RQ koji za aceton (pod uslovima naših²ogleda) iznosi RQ = 0,88. Pored ovih triju metaboličkih aktivnosti ispitali smo i metaboličku aktivnost na acetonu uz dodatak asparaginske kiseline. Asparaginsku kiselinu smo dodali zbog toga, jer je poznato njeno pozitivno delovanje na brzini razmnožavanja kvasca (FICHTER i VON MEYENBURG, 1966). Međutim, vrednosti dobijene za metaboličku aktivnost uz dodatak asparaginske kiseline ne razlikuju se bitno od vrednosti dobijene za metaboličku aktivnost na acetonu. Razlog ovoga je, najverovatnije, u tome što je ovo vreme odredjivanja (30 minuta) kratko da bi moglo doći do nekog vidnijeg uticaja asparaginske kiseline na matabolizam kvasca.

Kako povećana količina dodatog acetona utiče na sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama kvasca može se videti u tabeli 33.

Nakon završene fermentativne faze oglada sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama je približno isti kao i u prethodnom ogledu (tabela 31). U toku aerobne faze oglada sadržaj citohroma se povećao u toku 24 časa na 14,20 mola x 10⁵/l. Ovo povećanje sadržaja citohroma se nastavlja tokom oglada i dostiže vrednost od 15,30 x 10⁵ mola/l. Ako se ovaj sadržaj citohroma uporedi sa sadržajem citohroma dobijenim u toku oglada sa manjim dodatkom acetona (tabela 31), vidi se da se sa povećanjem dodatka acetona

u hranljivu podlogu ne može povećati sadržaj citohroma.

Tabela 33

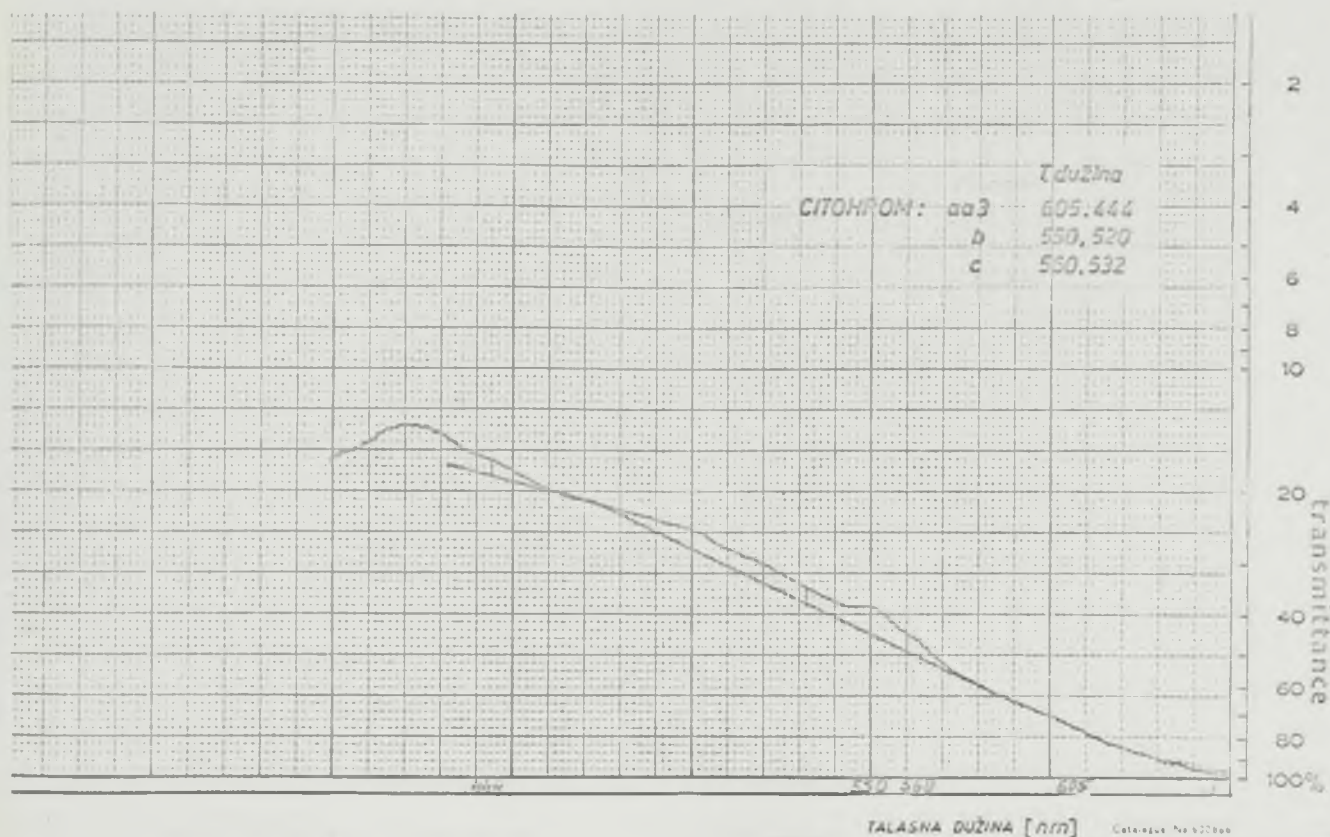
Sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama kvasca uzgajanog na hranljivoj podlozi sa 11,50 vol. % etanola uz dodatak 0,75 ml acetona/l i 0,5 g/l asparaginske kiseline

Vreme h	C i t o h r o m i mola x 10 ⁵ /l						
	605	aa ₃ 444	550	b 520	560	c 532	Ukupni
0	0,97	0,72	2,18	2,05	2,00	2,10	10,02
2	1,10	0,99	2,38	2,25	2,38	2,56	11,66
4	1,23	1,07	2,39	2,40	2,48	2,86	12,43
6	1,55	1,09	2,48	2,50	2,65	2,98	13,25
24	2,09	1,20	2,62	2,49	2,72	3,08	14,20
42	2,20	1,21	2,80	2,60	2,70	3,26	14,77
50	2,19	1,20	3,05	2,62	2,72	3,49	15,27
54	2,20	1,20	2,95	2,65	2,72	3,58	15,30
Srednja vrednost	2.20	1,20	2,95	2,65	2,72	3,58	15,30
	3,40		5,60		6,30		

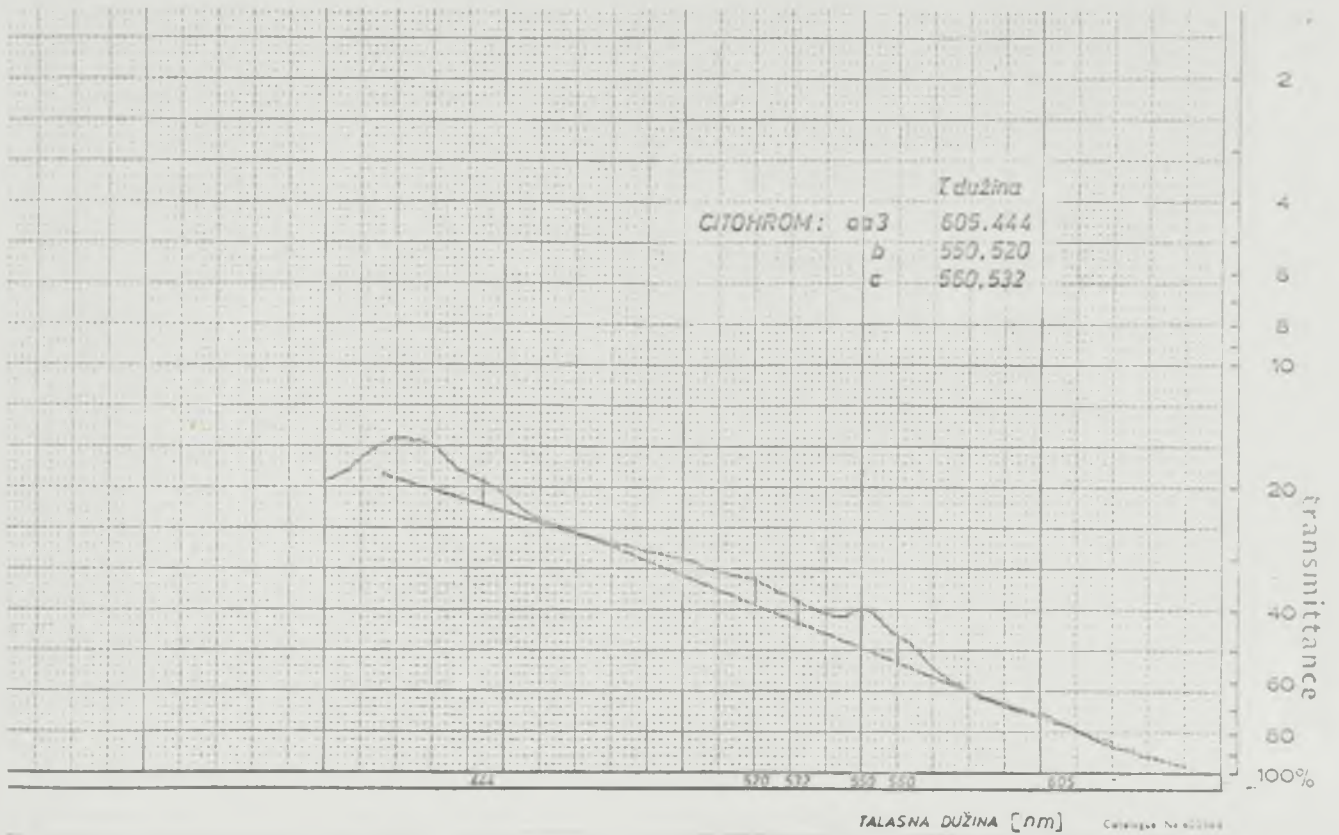
Iz rezultata datih u tabeli 33 se vidi da se sadržaj citohroma ne razlikuje bitno, ako se uporedi sa sadržajem citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama koje su uzgajane u hranljivoj podlozi sa 11,50 vol. % etanola u kojoj je dodano 0,25 ml acetona/l.

Da bismo ispitali uticaj dodatka većih količina acetona u narednom ogledu dodali smo 1,25 ml acetona/l. Rezultati koje smo dobili u toku ovog ogleda dati su u tabeli 34 i 35 i slikama 41, 42, 43, 44 i 45.

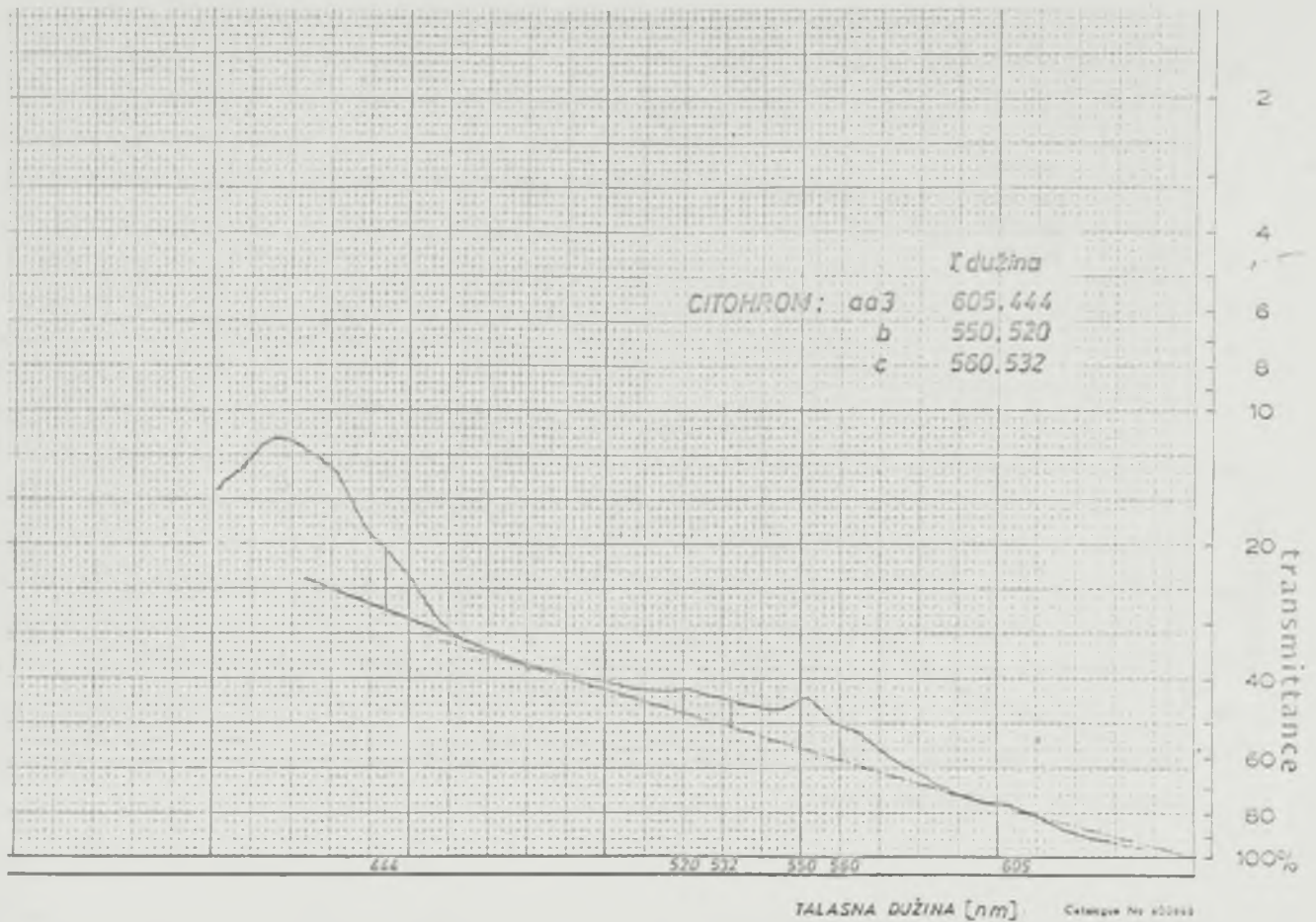
Iz rezultata datih u tabeli 34 i iz izračunatih prosečnih vrednosti sposobnosti kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid iz glukoze kao supstrata iznosi 255,36 ml/10 g SM kv., 30'.



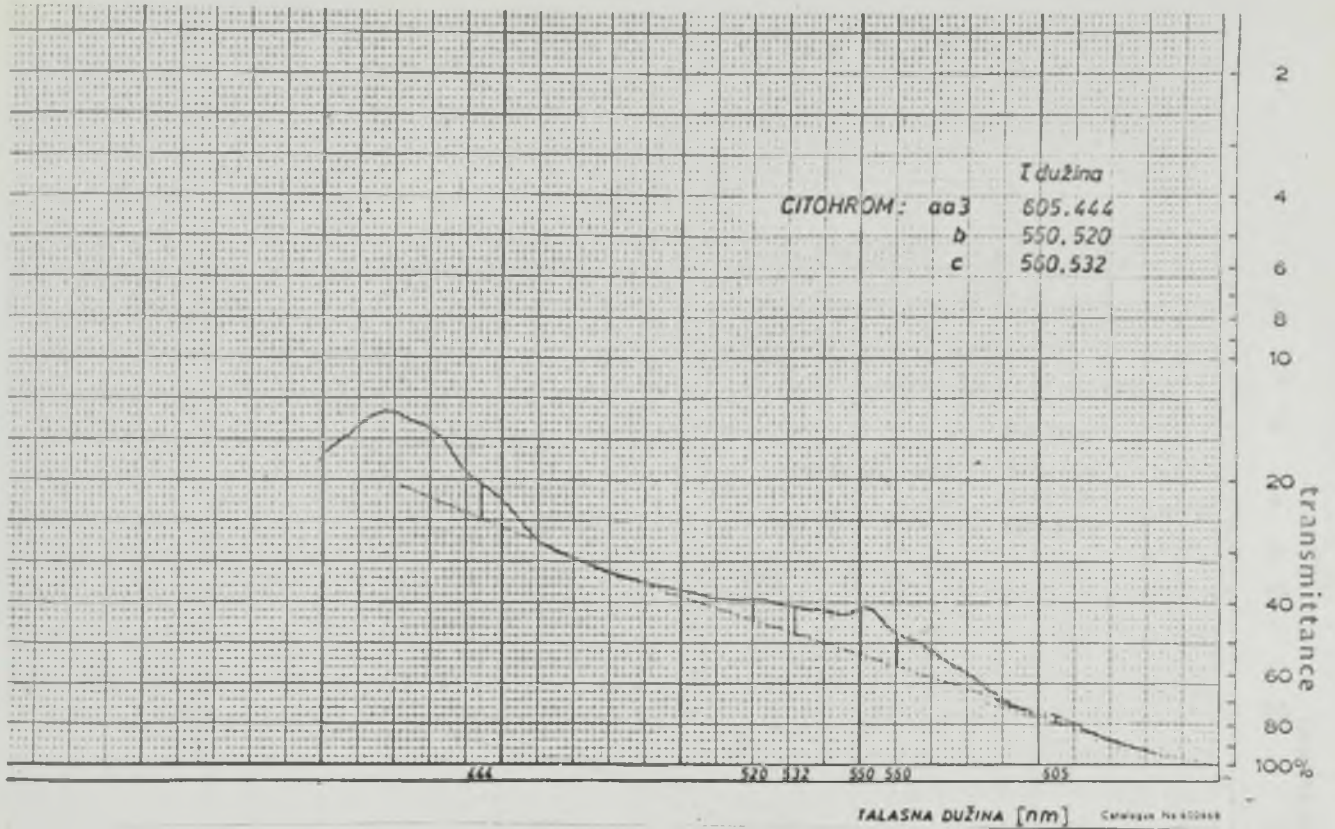
Slika 34 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,75 ml acetona / l , uz aeraciju 80 l/l,h



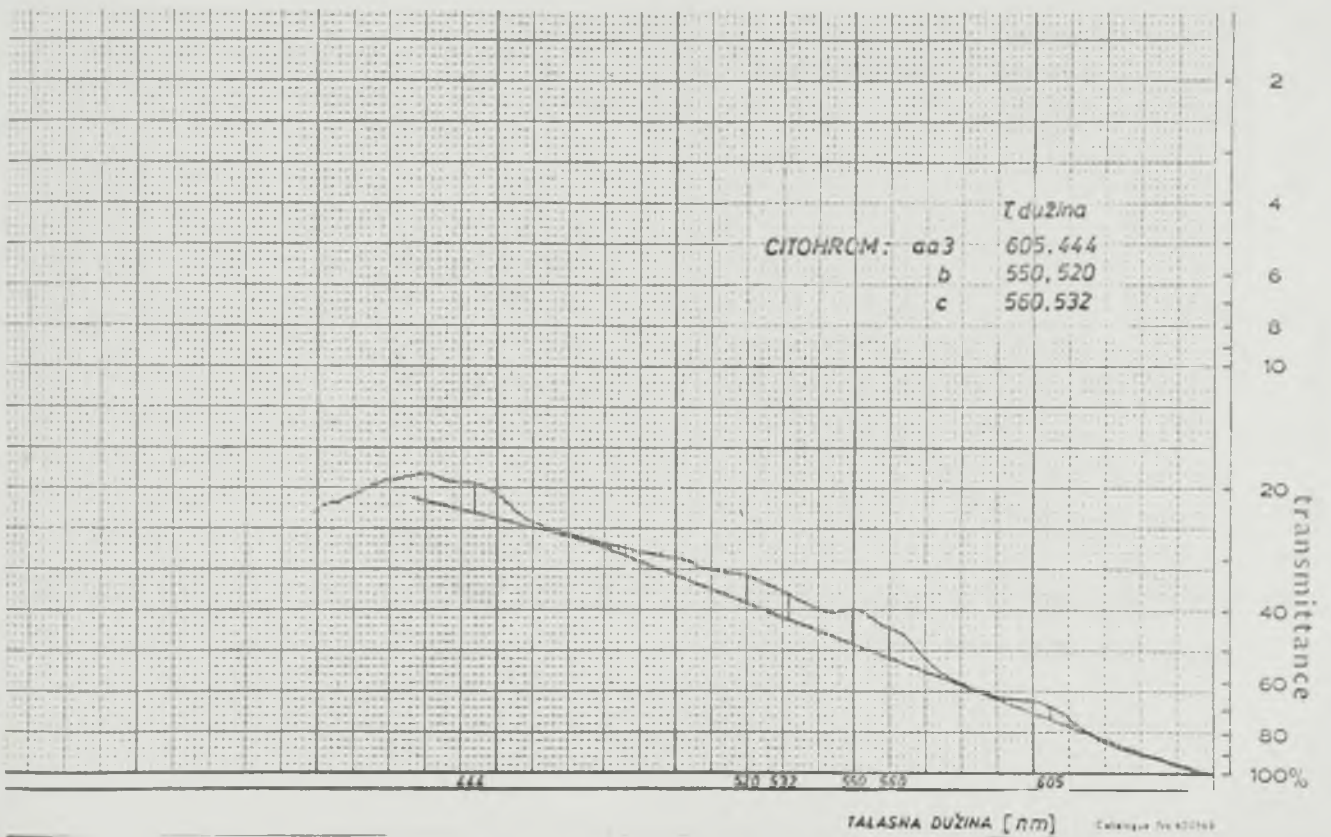
Slika 35 : Spekar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,75 ml acetona /l, uz aeraciju 80 l/l,h



Slika 36: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,75 ml acetoma/l, uz aeraciju 80 l/l, h



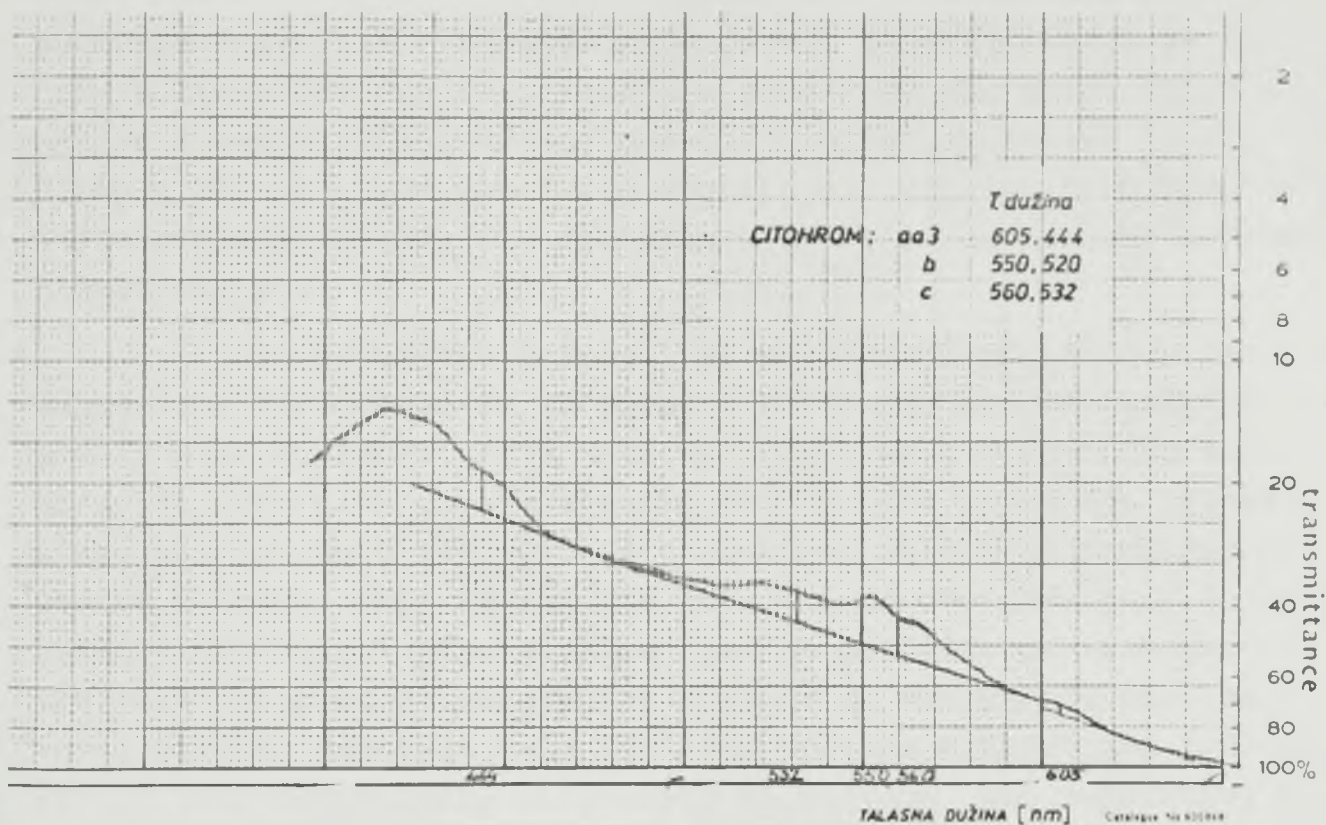
Slika 37 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,75 ml acetona/l, uz aeraciju 80 l/l,h



Slika 38 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,75 ml acetona/l, uz aeraciju 80 l/l,h



Slika 39 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. etanola uz dodatak 0,75 ml / l acetona , uz aeraciju 80 l/l,h



Slika 40 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,60 vol. % etanola uz dodatak 0,75 ml / l acetona, uz aeraciju 80 l/l,h

Ova prosečna vrednost ne razlikuje se bitno od srednje vrednosti za sposobnost stvaranja ugljen-dioksida od 246,43, koja je dobijena pod uslovima kada je u hranljivu podlogu dodano 0,75 ml/1 acetona. Nepostojanje razlike metaboličke aktivnosti u sposobnosti da se stvori ugljen-dioksid iz glukoze pokazuje da se ne menja ništa bitno u aktivnosti enzima EMP metaboličkog puta. Ako posmatramo srednje vrednosti sposobnosti kvasnih ćelija da asimiluju kiseonik, ona se povećava u odnosu na prethodni ogled sa manjom dodatkom količinom acetona (0,75 ml/1), i iznosi 13,92 ml/10 g SM, 30'. Ovo povećanje sposobnosti utroška kiseonika je najverovatnije uslovljeno dodatkom veće količine acetona u hranljivu podlogu.

Iz rezultata metaboličke aktivnosti na etanolu kao supstratu, vidi se da se sposobnost stvaranja ugljen-dioksida povećava za 60,69 ml. Isto tako, povećava se i sposobnost asimilacije kiseonika pomoću kvasnih ćelija. Ovo povećanje utroška kiseonika je manje nego što je sposobnost obrazovanja ugljen-dioksida i iznosi samo 10 ml. Ovo pokazuje da ovo povećanje metaboličke aktivnosti nije sinhrono jer se znatnije povećavaju aktivnosti EMP metaboličkog puta, a manje se aktiviraju respiratorni enzimi, dodatkom veće količine acetona u hranljivu podlogu. Što se tiče metaboličke aktivnosti na acetonu kao supstratu, i acetonu sa dodatkom asparaginske kiseline, vrednosti su nešto niže nego u prethodnom ogledu. Uzrok toga smanjenja može biti možda u tome, što povećana količina dodatog acetona (1,25 ml/1) oštećuje neke enzime koji učestvuju u ugradnji acetona u metaboličke puteve kvasnog metabolizma.

Kako utiče dodatak veće količine acetona (1,25 ml/1) na sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama može se videti iz vrednosti datih u tabeli 35 i slikama 41, 42, 43, 44 i 45.

Iz rezultata datih u tabeli 35, se vidi da sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama raste u toku ogleda sa dodatkom većom količinom acetona (1,25 ml/1). Vrednosti do kojih raste sadržaj pojedinih citohroma ne razlikuju se bitno od vrednosti sadržaja citohroma koje su dobijene u prethodnom ogledu sa dodatkom 0,75 ml/1 acetona.

Tabela 34

Razmnožavanje kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u hranljivoj podlozi koja je sadržala 11,46 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml/l acetona i 0,5 g/l asparaginske kiseline

Vreme h	Suva materija g/100 ml	Eta- nol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g. SM, kv., 30'								Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			Na glukozi		na etanolu		na acetonu		na acetonu+ aspar.kisel.		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,321	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 ^b	0,730	11,46	202,81	111,33	100,37	105,76	49,92	64,38	54,98	72,10	-	-	-
2	0,822	10,56	241,14	156,23	145,28	120,73	89,73	61,05	96,87	99,76	28,17	9,25	196,32
4	0,854	9,99	257,42	206,32	176,92	139,26	102,30	79,28	99,17	101,20	29,96	12,26	205,27
6	1,345	8,73	245,27	227,16	139,73	150,28	95,19	102,73	100,76	103,20	32,18	18,24	245,26
16	1,995	6,21	252,18	253,76	148,26	149,76	110,28	104,17	101,25	100,00	34,28	19,25	263,26
20	2,360	4,80	263,19	236,39	143,17	150,26	103,75	100,26	95,28	99,76	36,27	20,29	245,23
24	2,456	2,28	245,27	169,19	195,16	138,96	99,17	102,38	101,25	103,20	37,19	22,73	267,26
30	3,054	1,36	231,18	198,17	199,37	142,19	105,32	107,45	103,72	105,20	35,62	21,86	252,19
40	3,243	0,92	243,19	226,36	195,18	113,19	100,32	100,27	97,63	98,70	35,28	22,34	250,37
44	3,521	0,62	275,18	276,18	210,17	176,28	96,73	103,26	100,26	105,70	36,24	23,17	297,36
46	3,650	0,13	352,18	358,24	198,25	148,59	108,86	106,37	105,38	108,20	34,76	20,32	302,27
Srednja vrednost			255,36	219,94	168,35	135,57	96,50	93,78	96,05	99,72	30,97	18,05	229,53

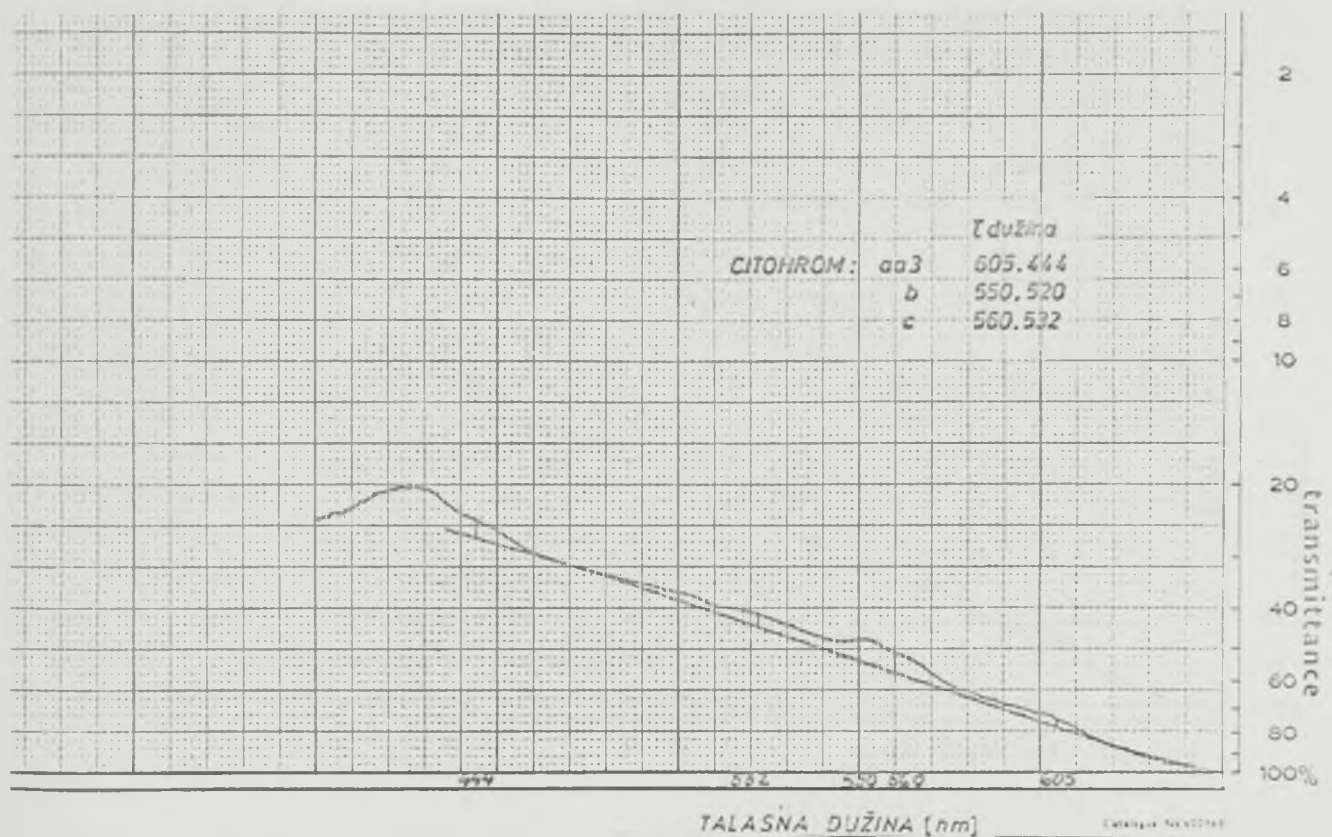
U narednoj seriji oglada hteli smo da ispitamo, kako će povećanje količine dovedenog vazduha uticati na pokazatelje koje smo do sada ispitivali. Količina vazduha, koja je uduvavana u toku naredna četiri oglada, bila je 180 l/l, h.

Tabela 35

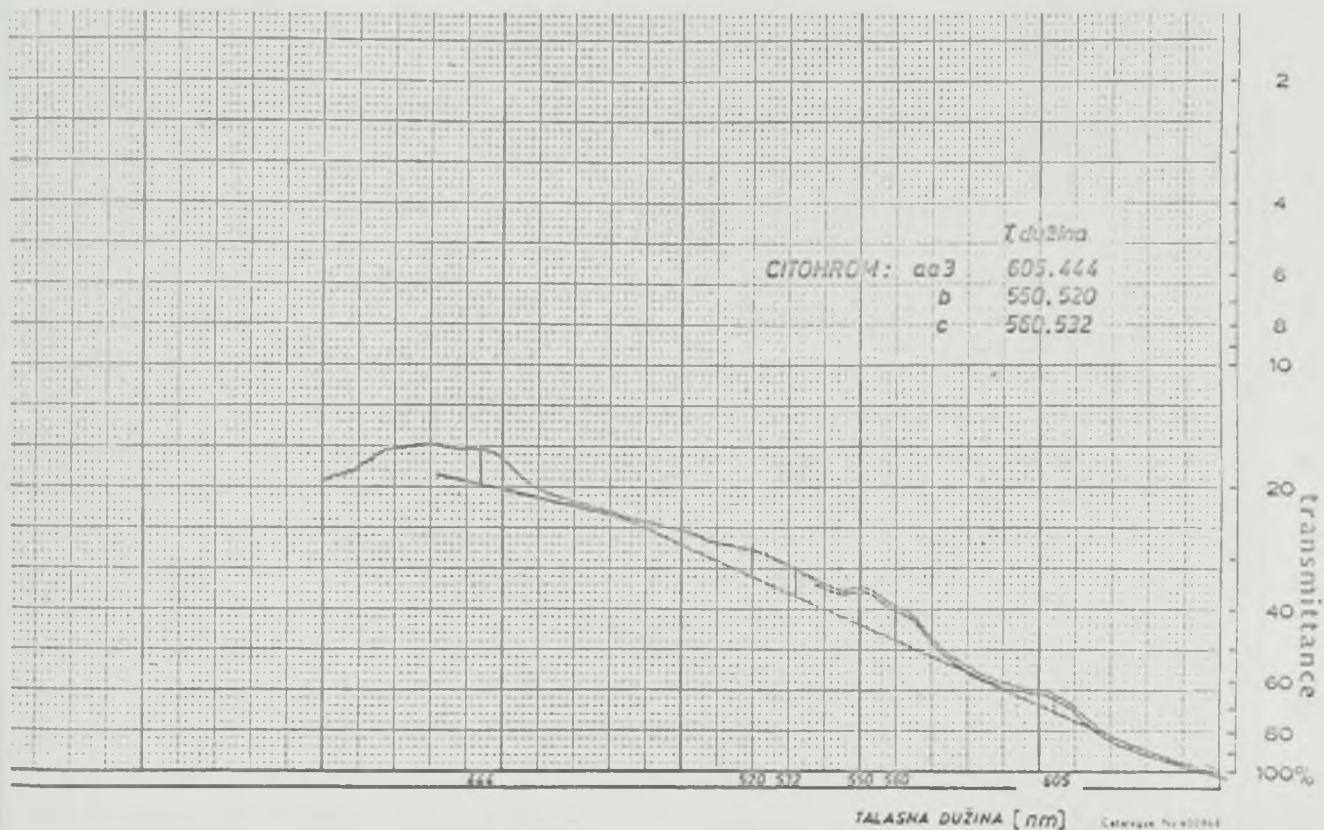
Sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama, uzgajanim u hranljivoj podlozi koja je sadržala 11,46 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml/l acetona, pod aerobnim uslovima (aeracija 80 l/l, h vazduha).

Vreme h	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l kvasca						
	aa ₃		b		c		Ukupni
Talasna du- žina nm	605	444	550	520	560	532	
0	0,85	0,57	2,20	2,28	1,96	2,20	10,06
2	1,10	0,82	2,38	2,34	2,38	2,75	11,77
4	1,15	0,93	2,50	2,75	2,65	2,82	12,82
24	2,28	1,10	2,99	2,82	2,91	3,48	15,58
30	2,30	1,15	2,86	2,90	2,90	3,52	15,01
40	2,29	1,17	3,05	2,91	2,90	3,57	15,89
46	2,30	1,70	3,07	2,86	2,90	3,56	16,39
Srednja vrednost	2,30	1,70	3,07	2,86	2,90	3,56	16,39
	4,00		5,93		6,46		

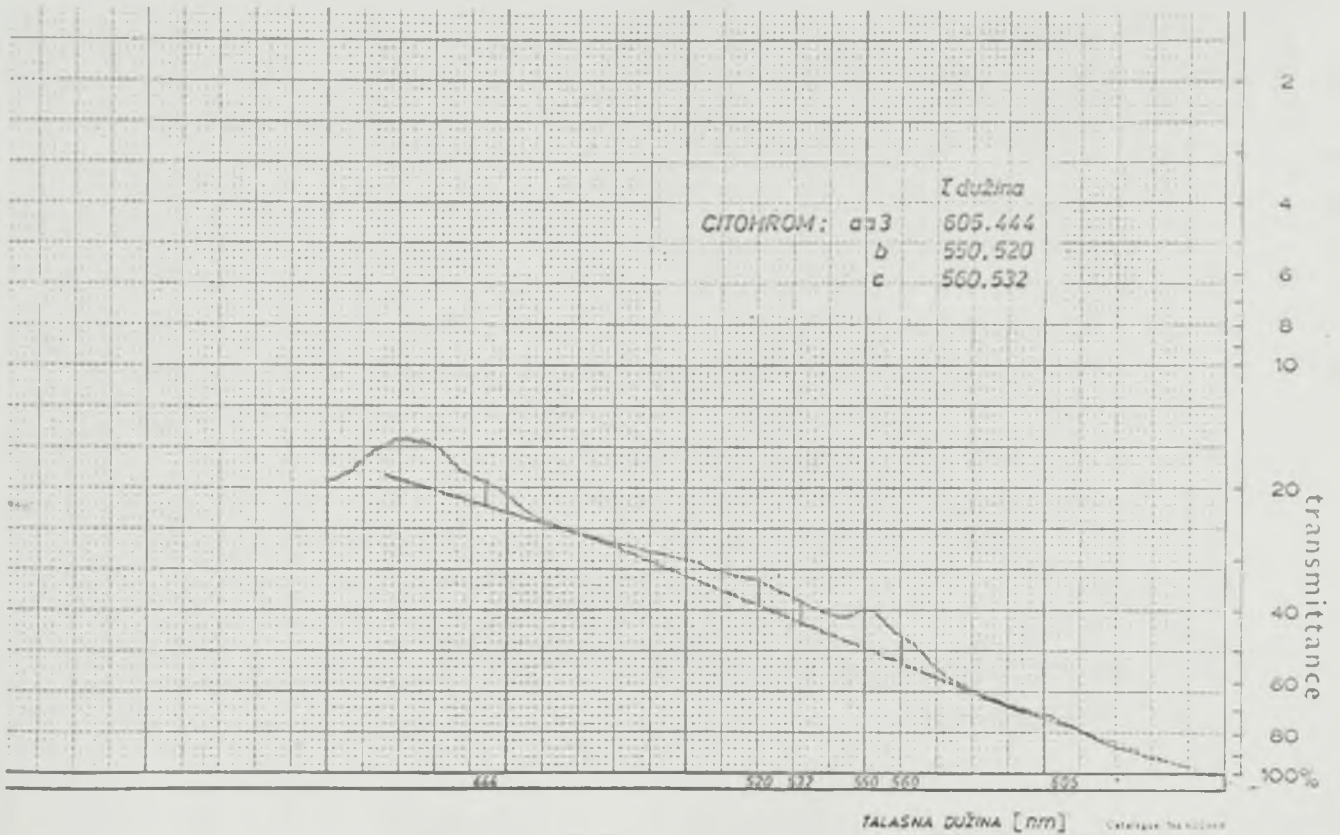
Rezultati koje smo dobili sa većim količinama vazduha, bez dodatka acetona dati su u tabeli 36 i 37.



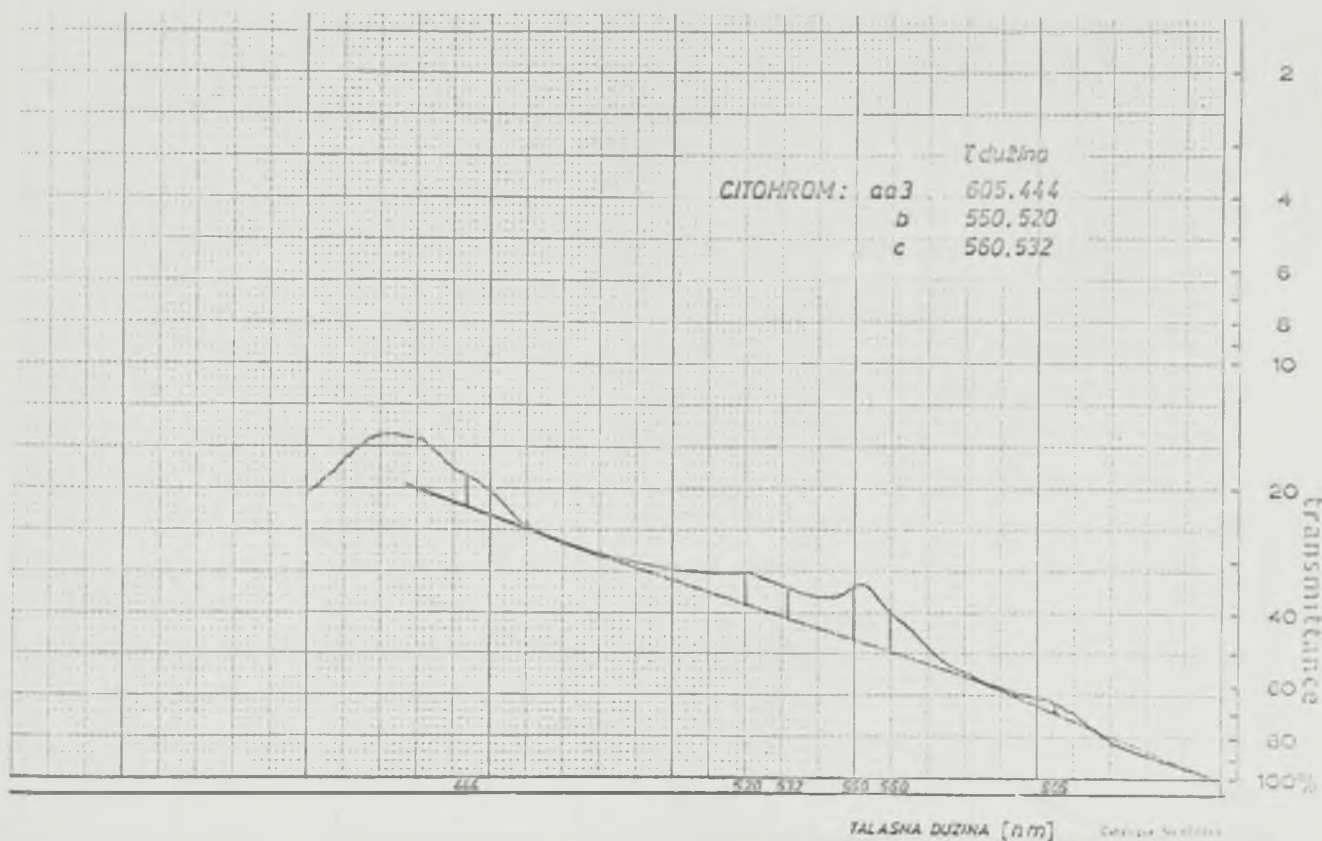
Slika 41 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,46 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml/l acetona, uz aeraciju 80 l/l,h



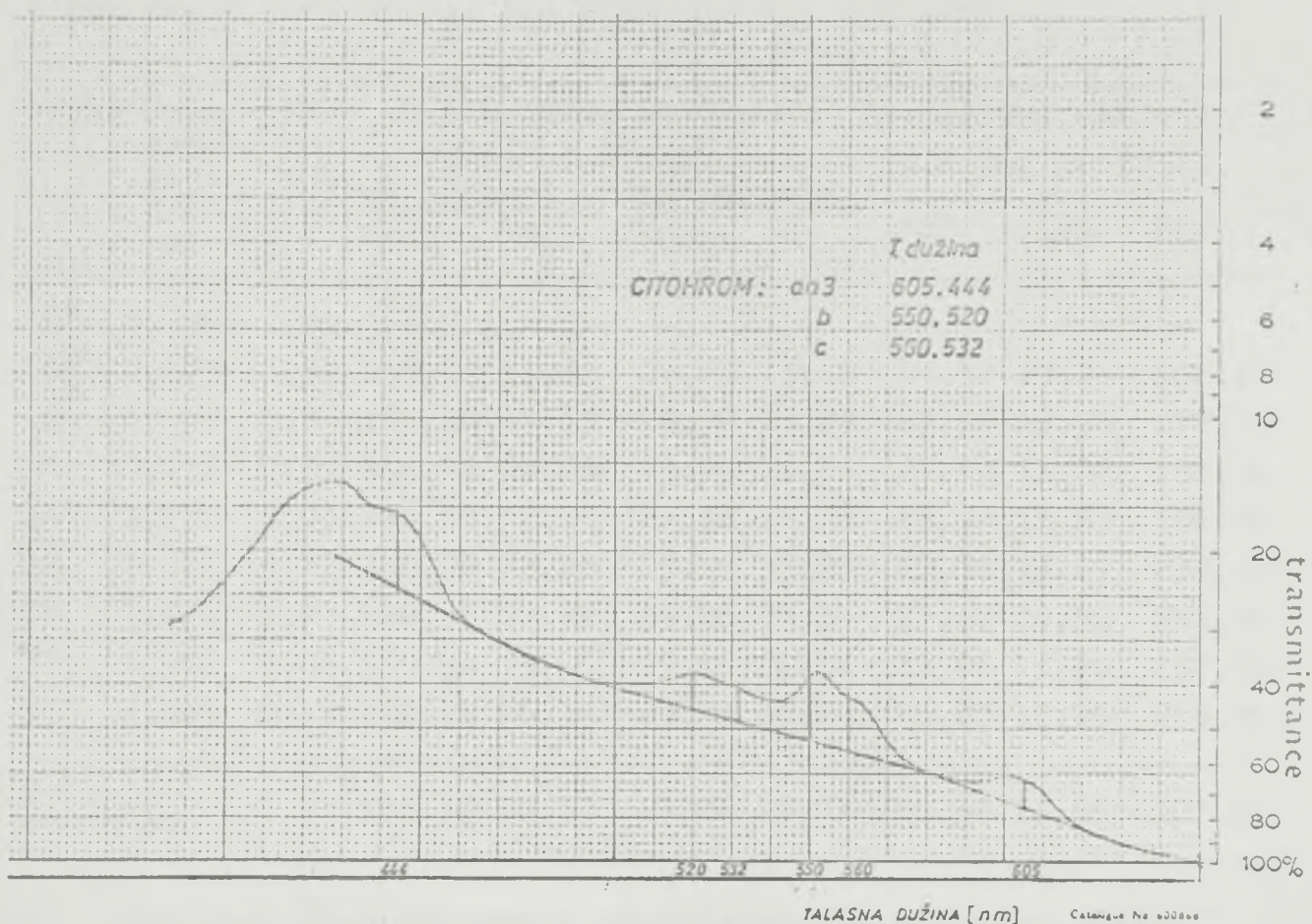
Slika 42 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,46 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml acetona/l, uz aeraciju 80 l/l,h



Slika 43 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,46 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml / l acetona, uz aeraciju 80 l / l , h



Slika 44: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,46 vol. % etanola uz sadatak 1,25 ml / l acetona, uz aeraciju 80 l / l, h



Slika 45 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,46 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml / l acetona uz aeraciju 80 l / 1,h

Tabela 36

Razmnožavanje kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, uzgajanog pod aerobnim uslovima (180/1/1 i h), u podlozi sa 11,52 vol. % etanola, uz dodatak 0,5 g/l asparaginske kiseline

Vreme h	Suva materija g/100 ml	Etanol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g SM, 30'				Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozu		na etanolu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,297	-	-	-	-	-	-	-	-
0 ^b _x	0,673	11,52	135,32	53,18	17,25	13,26	24,32	9,21	168,17
2	0,732	9,25	130,26	64,13	18,72	15,29	25,38	10,36	172,38
4	0,992	7,97	140,28	70,26	19,76	16,38	24,19	11,22	180,76
14	1,076	6,03	140,38	72,83	20,38	18,76	25,92	11,89	186,34
18	1,396	4,23	156,78	75,28	25,36	35,29	27,96	13,67	238,45
28	1,632	3,20	158,55	77,32	25,86	35,34	27,02	13,88	242,38
32	1,973	1,05	155,96	73,96	27,19	28,16	28,96	13,26	237,35
36	2,203	0,13	156,78	76,19	29,99	43,19	26,87	12,26	235,26
Srednja vrednost			146,79	70,39	23,06	25,71	26,32	11,97	207,63

0^a-- anaerobna faza stvaranja etanola pomoću matičnog kvasca, trajala je 13 časova u toku koje se iz 22,5 g/100 ml glukoze stvorilo 11,52 vol. % etanola

0^b-- početak aerobne faze ogleđa

x - na početku aerobne faze ogleđa dodavane su u hranljivu podlogu pod sterilnim uslovima hranljive soli, vitamini i 0,5 g/litru asparaginske kiseline.

Kako se iz datih rezultata vidi, pri uslovima intenzivnije aeracije, dobijaju se vrednosti koje se znatno razlikuju od onih koje su dobijene pod uslovima manje intenzivne aeracije (tabela 21). Jedna od razlika koje se mogu zapaziti je smanjenje sposobnosti ćelija kvasca da stvaraju ugljen-dioksid (146,79 ml). Dalje se može videti da je sposobnost kvasnih ćelija da asimiluju

kiseonik povećana za oko 2 puta, u odnosu na rezultate date u tabeli 24. Interesantno je da je povećana metabolička aktivnost na etanolu, kao supstratu, jer se stvara više ugljen-dioksida i asimiluje više kiseonika. Što se tiče rezultata enzimskih aktivnosti, svih triju ispitivanih enzima, zapaža se povećanje specifičnih aktivnosti, ali to povećanje nije toliko da bi moglo dati zadovoljavajuće rezultate.

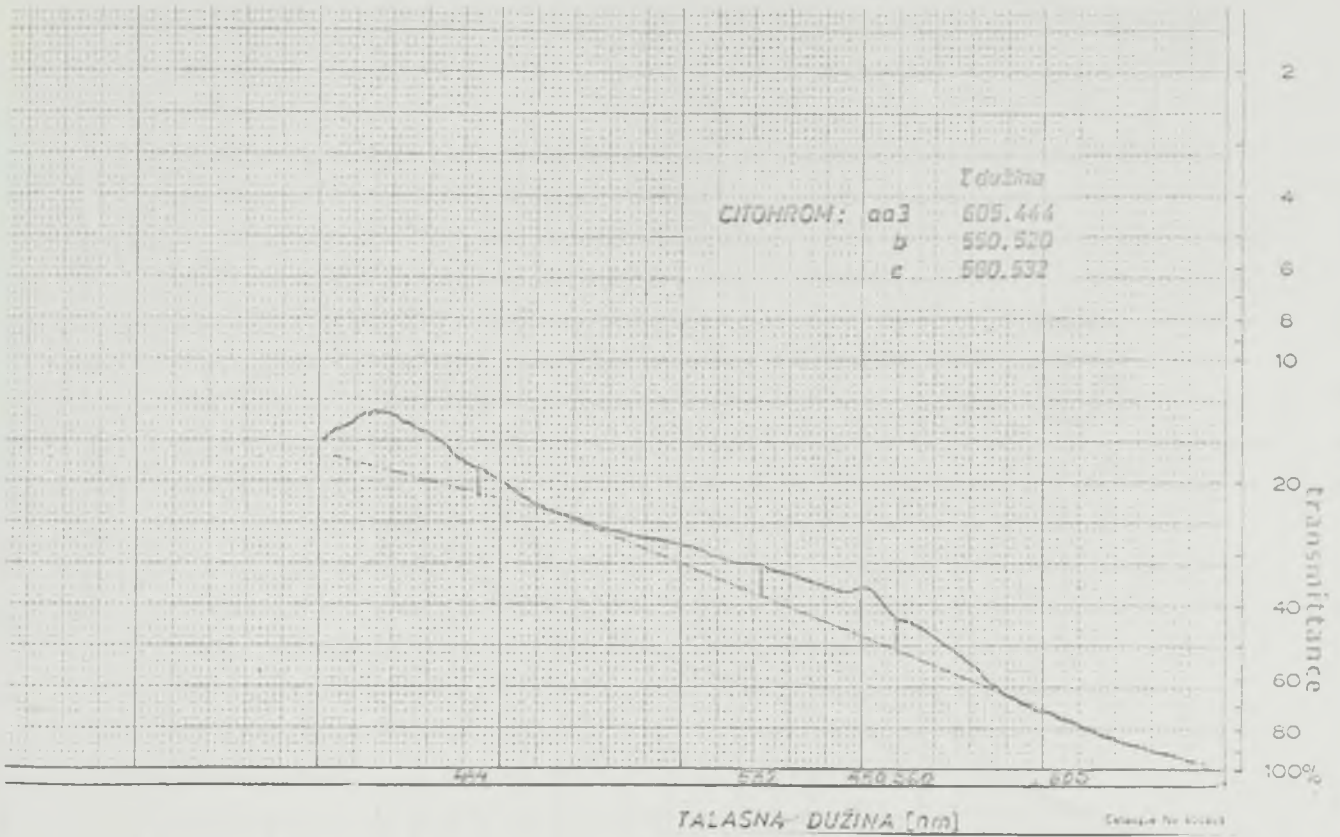
U toku ovoga ogleda odredjivali smo i sadržaj citohroma i rezultati koje smo dobili dati su u tabeli 37 i na slikama 46, 47 i 48.

Tabela 37

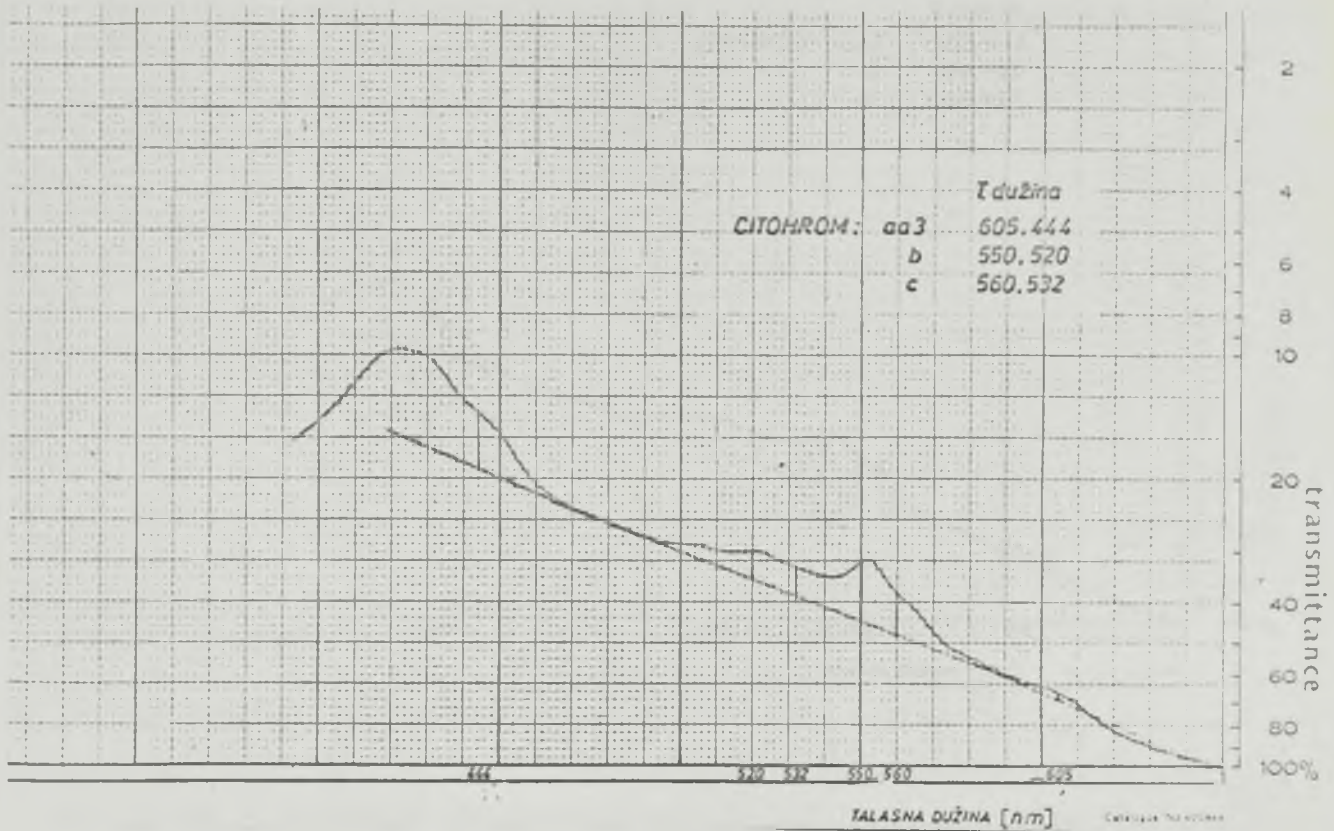
Sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama kvasca, uzgajanog pod aerobnim uslovima (180 l/l, h) u podlozi sa 11,52 vol. % etanola, uz dodatak 0,5 g/l asparaginske kiseline

Vreme h	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l							Ukupni
	605 ^{aa} ₃	444	550 ^b	520	560 ^c	532		
0	0,99	0,61	2,23	1,92	2,18	1,73	9,66	
2	1,22	0,76	2,31	1,92	2,21	1,93	11,35	
4	1,99	0,98	2,33	1,97	2,34	2,18	11,75	
14	2,20	1,07	2,34	2,18	2,40	2,20	12,39	
28	2,21	1,17	2,40	2,22	2,41	2,25	12,66	
Srednja vrednost	2,21 3,38	1,17	2,40 4,62	2,22	2,41 4,66	2,25	12,66	

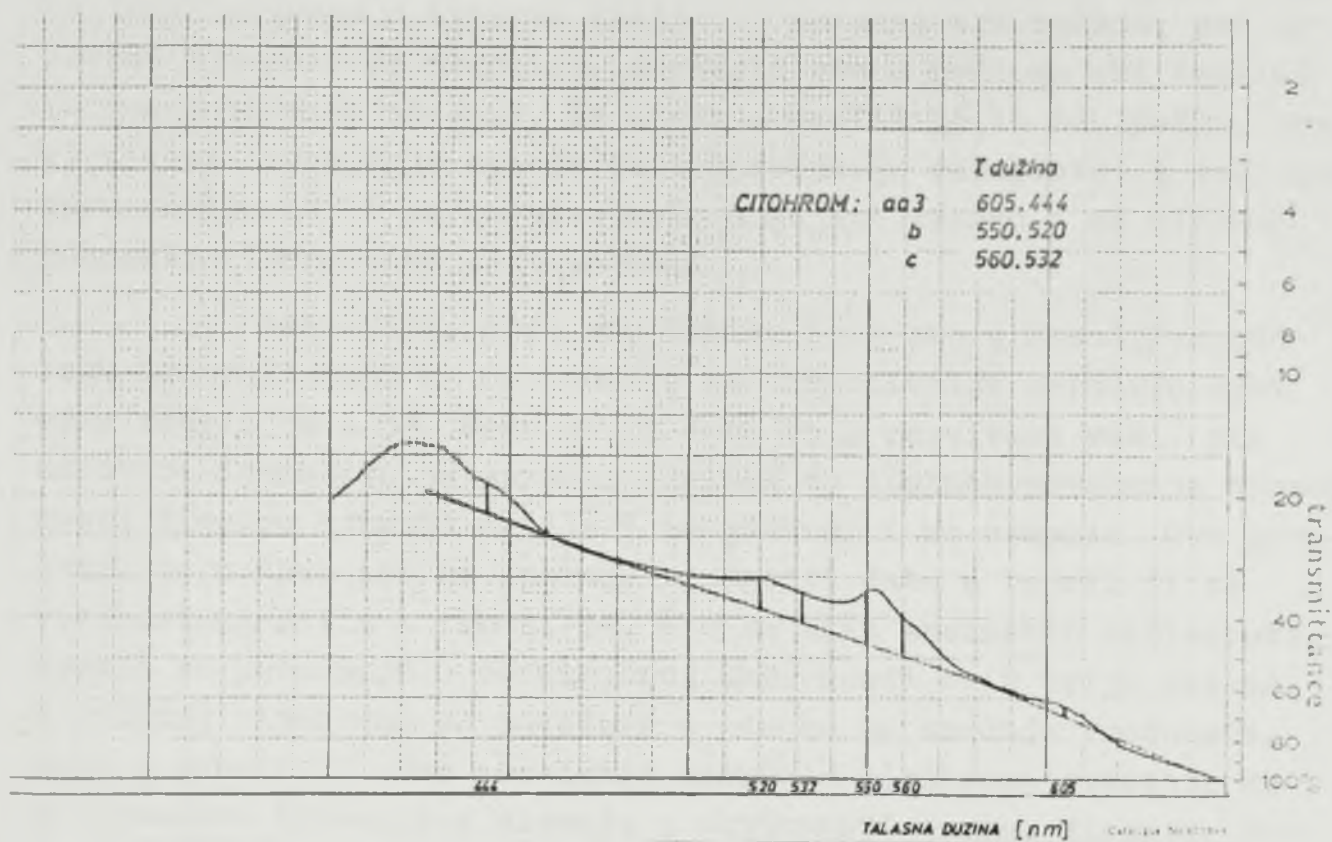
Ako uporedimo rezultate sadržaja citohroma (date u tabeli 37) dobijene pod uslovima intenzivnije aeracije, sa rezultatima sadržaja citohroma pri slabijoj aeraciji (tabela 25), zapazićemo da nema bitnijih razlika koje bi ukazale da se u ćelijama nalazi znatno veći sadržaj citohroma pri uslovima intenzivnije aeracije.



Slika 46: Spekar citohroma intaktnih ćelija kvasca
uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,52 vol. %
etanola uz aeraciju 180 l/l, h



Slika 47 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,52 vol. % etanola uz aeraciju 180 l/1,h



Slika 48 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca
uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,52 vol. %
etanola uz aeraciju 180 l/l,h

Kako intenzivnijom aeracijom nismo dobili rezultate koji ukazuju da dolazi do znatnijih poboljšanja i ubrzanja metaboličkih procesa u kvasnoj ćeliji, u naredna tri ogleda, pod uslovima intenzivije aeracije, dodavali smo u podlogu tri različite koncentracije acetona, da bismo utvrdili da li će, možda, ovakvi uslovi izvodjenja ogleda dati povoljnije rezultate, i dati nam informaciju da li se uspešno može uzgajati kvasac i na visokim koncentracijama etanola u podlozi.

Rezultati, koje smo dobili kada smo u hranljivu podlogu dodavali 0,25 ml acetona/l, uz intenzivniju aeraciju dati su u tabeli 38 i 39. Kako se iz dobijenih rezultata vidi, pri uslovima intenzivnije aeracije dolazi do znatnog povećanja sposobnosti disanja kvasnih ćelija i na glukozu i na etanolu. Ovo povećanje se uočava ako se uporede vrednosti date u tabeli 31 sa vrednostima datim u tabeli 39. Što se tiče enzimskih aktivnosti, zapaža se povećanje u specifičnoj aktivnosti svih triju enzima, a sadržaj citohroma se povećava u odnosu na srednje vrednosti, date u tabeli 32. Ovo povećanje sadržaja citohroma pokazuje da se povećava intenzitet disanja u aktivnosti enzima disanja, što se uklapa u povećane specifične aktivnosti triju odredjivanih enzima (alkohol dehidrogenaze enzima EMP metaboličkog puta, izocitrat lijaze enzima glioksilatnog poprečnog puta i malat dehidrogenaze enzima TCA ciklusa.

Tabela 38

Razmnožavanje kvasca Saccharomyces cerevisiae na podlozi koja je sadržala 11,68 vol. % etanola, pod aerobnim uslovima, uz dodatak 0,25 ml/l acetona i 0,5 g/l asparaginske kiseline

Vreme h	Suva materija g/100 ml	Etanol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g. SM, 30'						Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozi		na etanolu		na acetonu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,425	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 ^b _x	0,696	11,68	241,40	181,65	106,40	109,73	132,59	128,67	30,72	7,32	179,26
2	0,823	10,10	211,45	173,63	109,76	113,95	117,16	125,37	32,56	10,35	205,36
4	0,937	8,74	185,93	228,17	110,38	128,73	136,95	136,27	33,76	13,38	246,39
6	1,342	6,32	199,96	236,18	185,72	210,38	145,83	140,83	34,29	14,29	328,56
16	1,673	4,27	228,17	252,93	196,37	186,96	128,73	142,28	35,65	25,38	339,42
20	1,893	2,36	237,18	240,76	199,86	205,19	126,73	137,26	39,42	26,45	425,37
24	2,536	1,03	252,19	239,82	176,25	228,19	126,73	135,34	40,28	25,76	407,29
28	2,842	0,18	260,18	241,72	185,12	232,18	143,86	140,56	42,75	24,29	403,52
Srednja vrednost			227,05	223,98	158,73	176,91	132,32	135,83	36,18	18,40	316,89

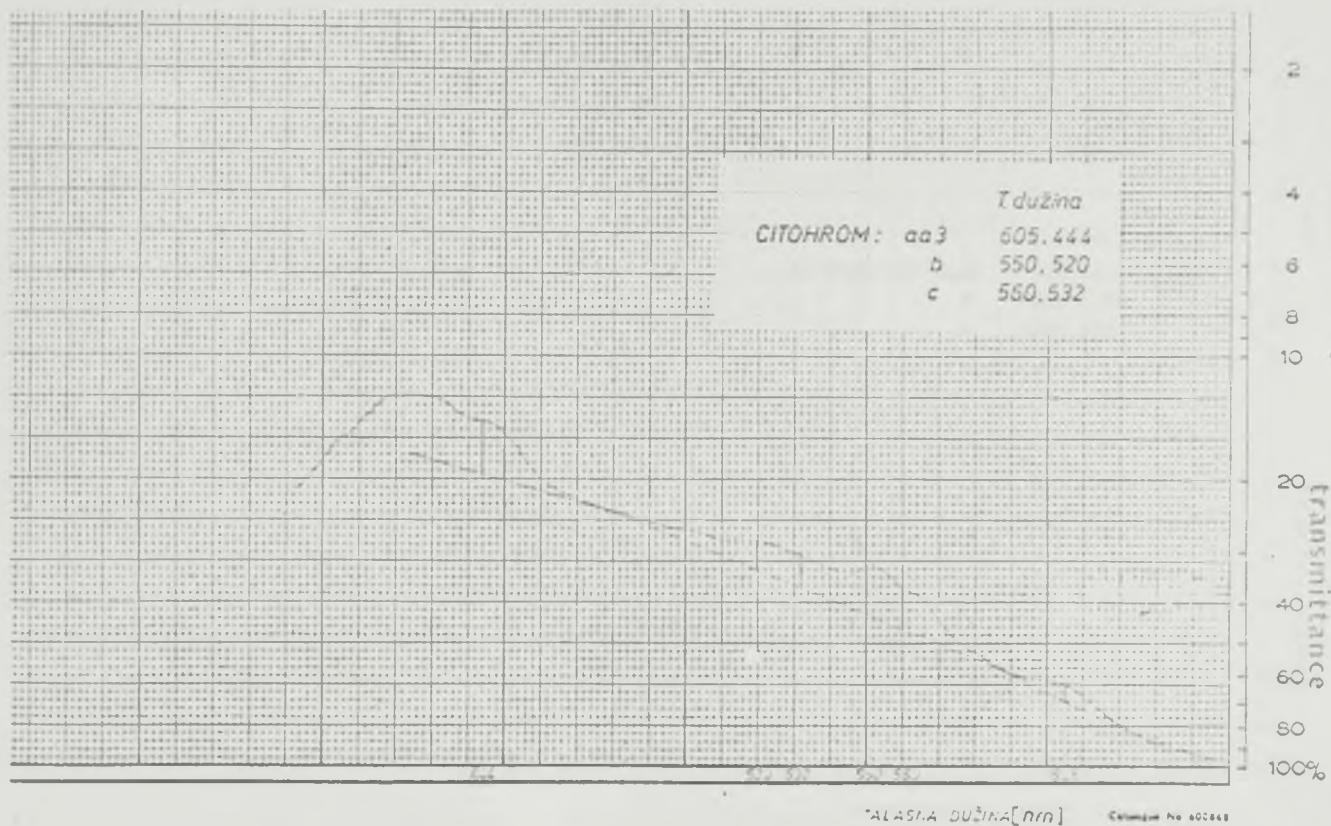
- 0^a - početak anaerobne faze u toku koje se iz 22,8 g glukoze po 100 ml hranljive podloge stvorilo u toku 19 časova 11,68 vol. % etanola
- 0^b - početak aerobne faze u toku koje se u hranljivu podlogu uduvavao sterilan vazduh u količini od 180 litara po litru hranljive podloge
- x - na početku aerobne faze u hranljivu podlogu sa 11,68 vol. % etanola dodati su pod sterilnim uslovima rastvori koji su sadržali određene količine hranljivih soli, vitalnih supstanci, 0,25 ml acetona po litru hranljive podloge i 0,5 g/litru asparaginske kiseline.

Pored odredjivanja, čiji su rezultati dati u tabeli 38, odredjivali smo u toku ovoga oglada i sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama i dobili rezultate koji su dati u tabeli 39 i slikama 49, 50 i 51.

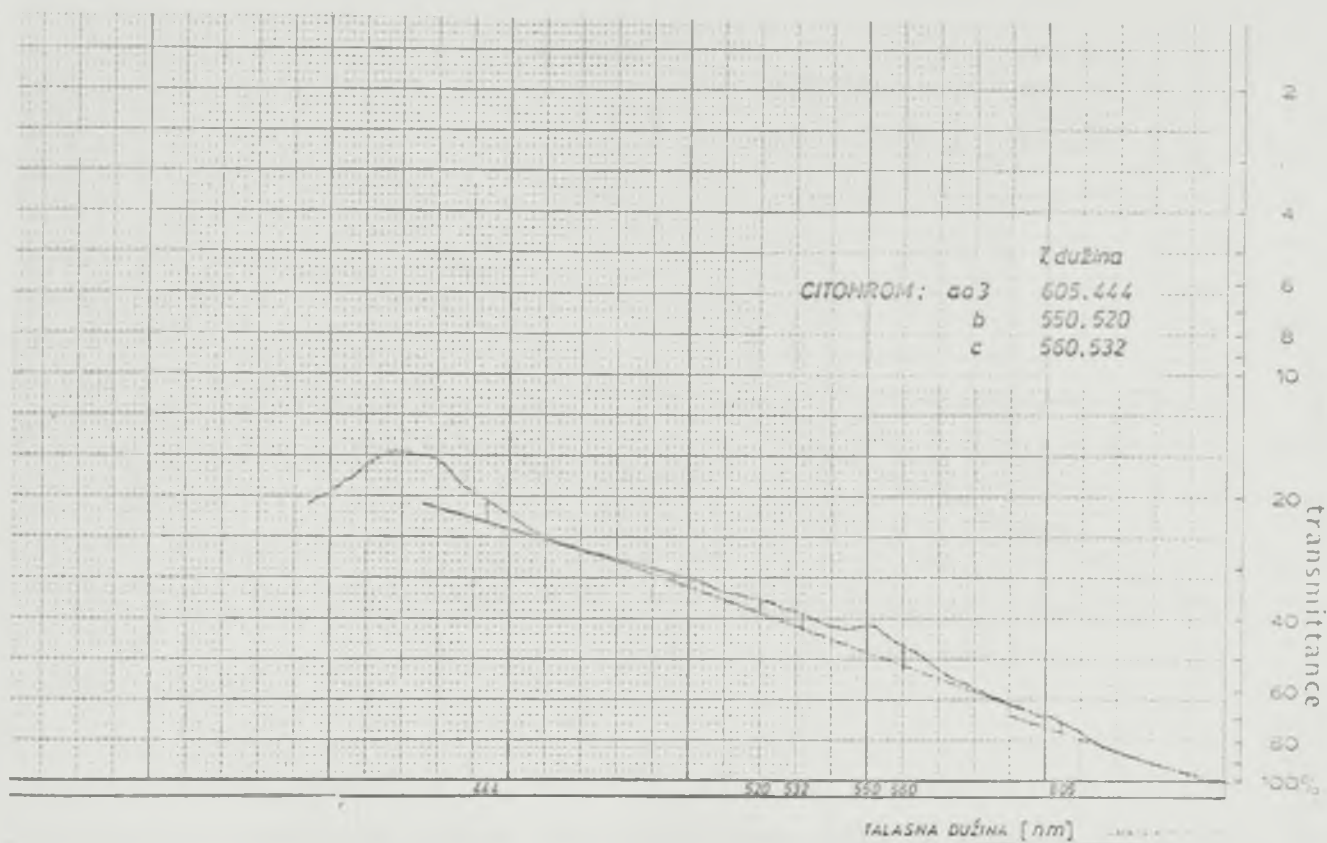
Tabela 39

Sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama, uzgajanim u hranljivoj podlozi sa 11,68 vol. % etanola, 0,25 ml/l acetona i intenzivnijoj aeraciji (180 l/l, h).

Vreme h	C i t o h r o m i x 10 ⁵ mola/l						
	aa		b		c		Ukupni
Plasna du- žina mm	605	3444	550	520	560	532	
0	0,85	0,52	2,25	2,48	2,35	2,20	10,56
2	1,28	0,99	2,90	2,70	2,38	2,30	12,25
4	1,99	1,28	3,28	2,99	3,55	2,38	15,41
6	2,20	1,55	4,00	3,27	3,90	2,40	17,32
16	2,39	1,60	4,30	3,53	4,30	2,87	19,00
20	2,35	1,61	4,30	3,50	4,30	2,88	18,98
28	2,40	1,60	4,30	3,50	4,30	2,88	18,98
Srednja vrednost	2,40	1,60	4,30	3,50	4,30	2,88	18,98
	4,00		7,80		7,18		



Slika 49: Spekar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,68 vol. % etanola, uz dodatak 0,25 ml / l acetona, uz aeraciju 180 l/1,h



Slika 50 : Spektar citochroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,68 vol. % etanola, uz dodatak 0,25 ml / l acetona, uz aeraciju 180 l/l,h



Slika 51 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanim u hranljivoj podlozi sa 11,68 vol. % etanola uz dodatak 0,25 ml / l acetona, uz aeraciju 180 l / l, h

Kako se iz rezultata datih u tabeli 39 može videti, sadržaj citohroma u kvasnim ćelijama se povećava ali ne dostiže sadržaj citohroma u ćelijama kada se uzgajaju na glukozu (tabela 11).

U tabeli 40 dati su rezultati koji su dobijeni dodavanjem u hranljivu podlogu 0,75 ml/l acetona pod uslovima intenzivnije aeracije. Iz datih rezultata se vidi da kvasne ćelije uzgajane pod ovim uslovima imaju veću sposobnost da fermentišu i respirišu glukozu, što je utvrđeno odredjivanjem metaboličke aktivnosti na glukozu. Ovo povećanje fermentativne aktivnosti može biti uzrokovano intenzivnijom glukoneogenezom zbog prisustva acetona u podlozi. Što se tiče metaboličke aktivnosti na etanolu, povećava se sposobnost kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid, a takodje i sposobnost kvasnih ćelija da asimiliraju kiseonik. Povećani intenzitet stvaranja ugljen-dioksida, i povećani utrošak kiseonika, mogu se objasniti ubrzanjem metabolizma kvasnih ćelija, što je potvrđeno povećanim specifičnim enzimskim aktivnostima odredjivanih triju enzima. Što se tiče sposobnosti kvasnih ćelija da asimilišu aceton, (pri intenzivnijoj aeraciji), utvrđeno je da pri ovim uslovima ćelije imaju veću sposobnost da asimiliraju kiseonik, što se takodje, može objasniti ubrzanjem metabolizma u ćelijama.

U tabeli 41 i na slikama 52, 53, 54 i 55, dati su rezultati sadržaja citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama kada su uzgajane pod uslovima opisanim u tabeli 40. Ako uporedimo rezultate sadržaja citohroma, koje smo dobili pri intenzivnijoj aeraciji, možemo videti da se sadržaj citohroma povećava.

U tabeli 42 i 43 i na slikama 56, 57, 58, 59 i 60 dati su rezultati koji su dobijeni kada se u hranljivu podlogu dodalo 1,25 ml/l acetona. Ogljed je izvodjen pod uslovima intenzivnije aeracije.

Tabela 40.

Razmnožavanje kvasca Saccharomyces cerevisiae na podlozi koja je sadržala 11,56 vol. % etanola, 0,75 ml/l acetona i 0,5 g asparaginske kiseline

Vreme h	Suva materija g/100 ml	Etanol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g. SM. kvasca, 30 ^o						Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozi		na etanolu		na acetonu		ADH	ICL	MDH
			CO ₂	Q _{O₂}	Q _{CO₂}	Q _{O₂}	Q _{CO₂}	Q _{O₂}			
0 ^a	0,346	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 ^b _x	0,628	11,56	437,06	110,23	86,80	96,84	71,88	90,25	30,96	6,36	159,26
2	0,921	9,27	352,75	114,90	90,75	110,07	124,92	108,23	38,76	10,03	256,72
4	1,230	8,03	452,61	429,35	147,24	170,48	151,93	153,84	40,29	13,28	272,86
6	1,512	6,52	280,75	255,91	164,95	191,22	215,48	186,79	42,52	13,76	299,73
16	2,136	2,36	298,77	376,18	195,36	210,76	210,76	220,61	43,76	23,78	339,46
20	2,825	1,27	375,29	369,37	208,79	229,38	208,76	210,80	45,82	25,39	358,26
26	2,996	0,16	276,33	295,82	240,25	250,68	200,28	200,99	46,93	27,86	373,92
Srednja vrednost			353,36	278,82	162,02	179,92	169,44	167,35	41,29	17,92	294,31

0^a - početak anaerobne faze u toku koje se iz 22,5 g/100 ml komine stvorilo 11,56 vol. % etanola u toku 19 časova;

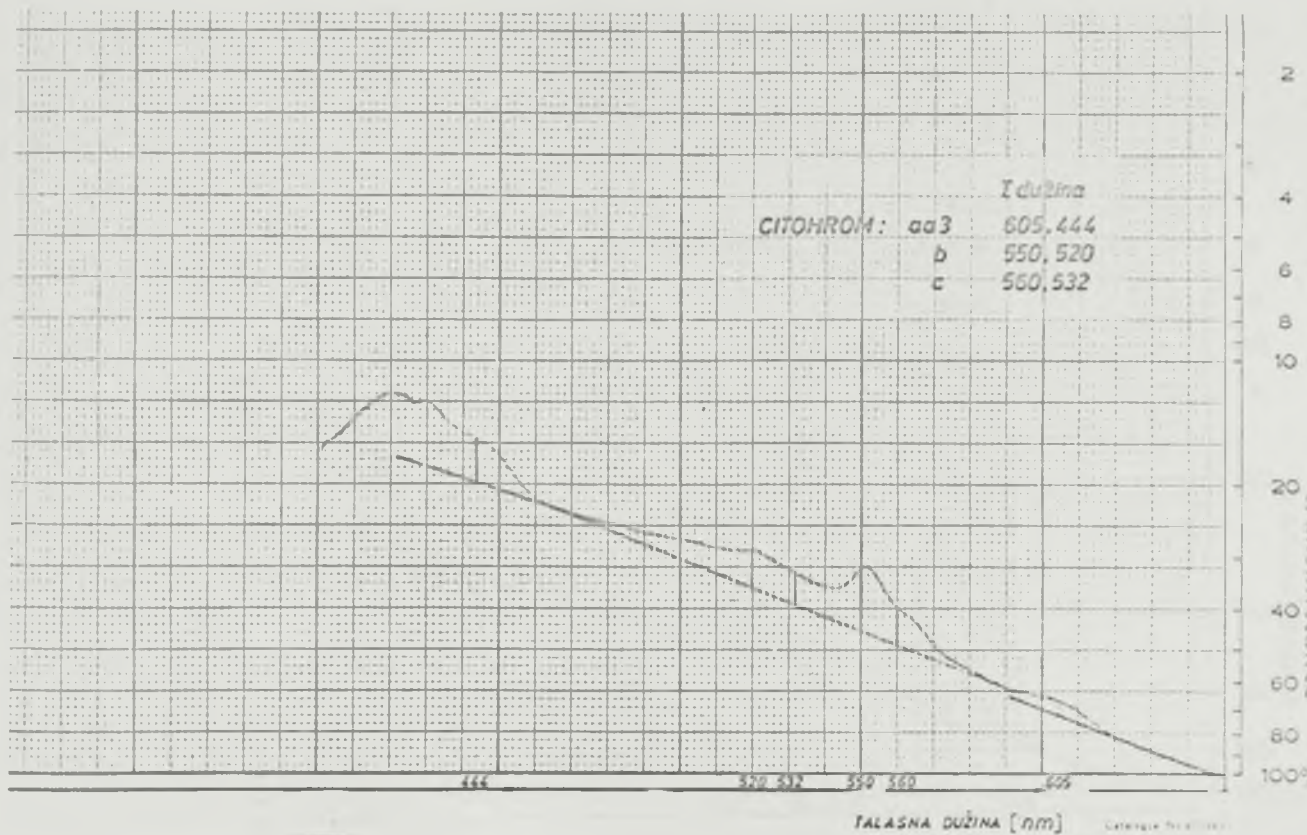
0^b - početak aerobne faze u toku koje se u hranljivu podlogu uduvavao sterilan vazduh u količini od 180 litara po litru hranljive podloge;

x - na početku aerobne faze u hranljivu podlogu koja je sadržala navedenu količinu etanola dodati su rastvori koji su sadržali određene količine hranljivih materija, vitalnih supstanci, acetona 0,75 ml po litru hranljive podloge i 0,5 g po litru asparaginske kiseline

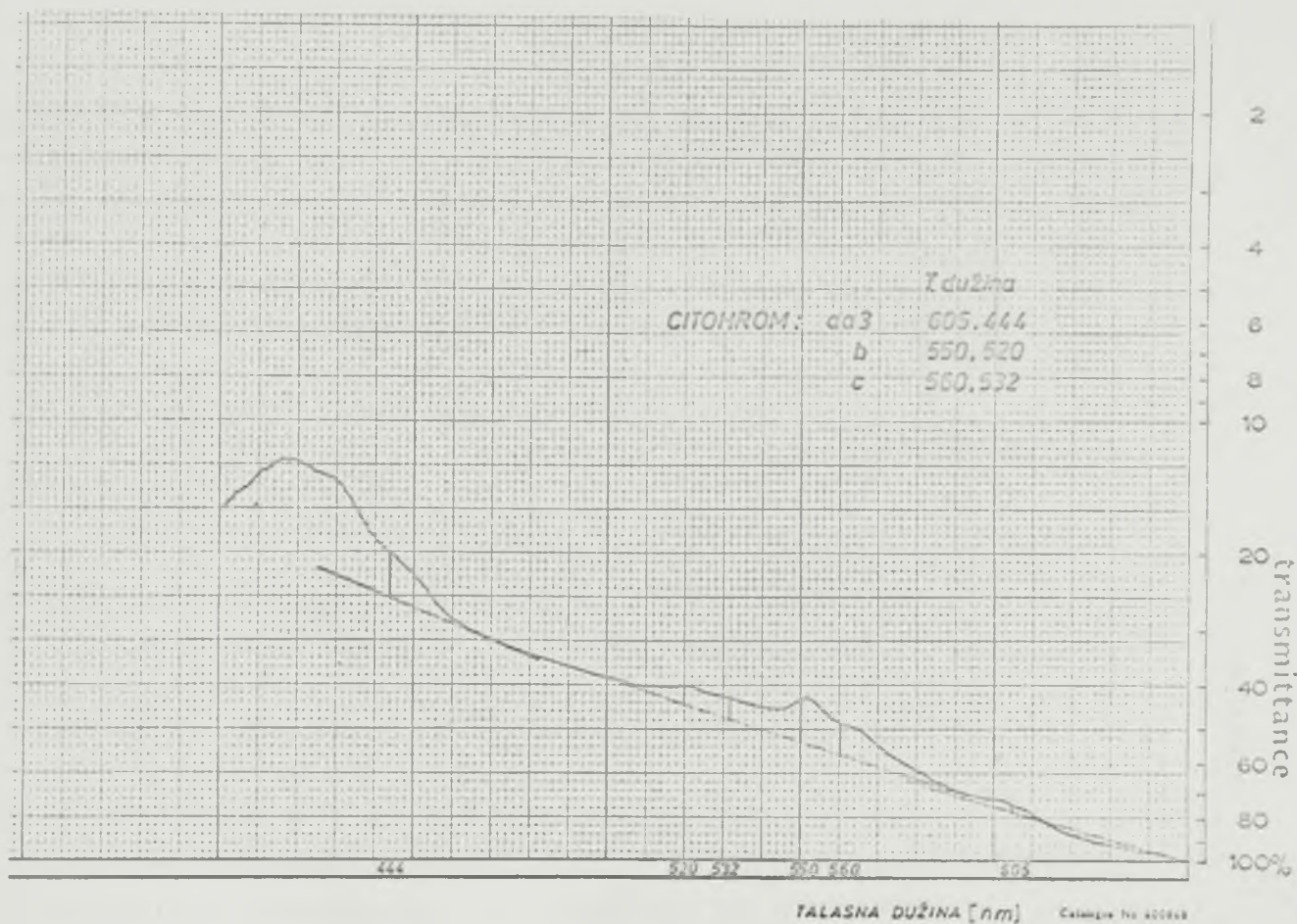
Tabela 41

Sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama, uzgajanim na hranljivoj podlozi, koja je sadržala 11,56 vol. % etanola, uz dodatak 0,75 ml/1 acetona, uz aeraciju od 180 l/h

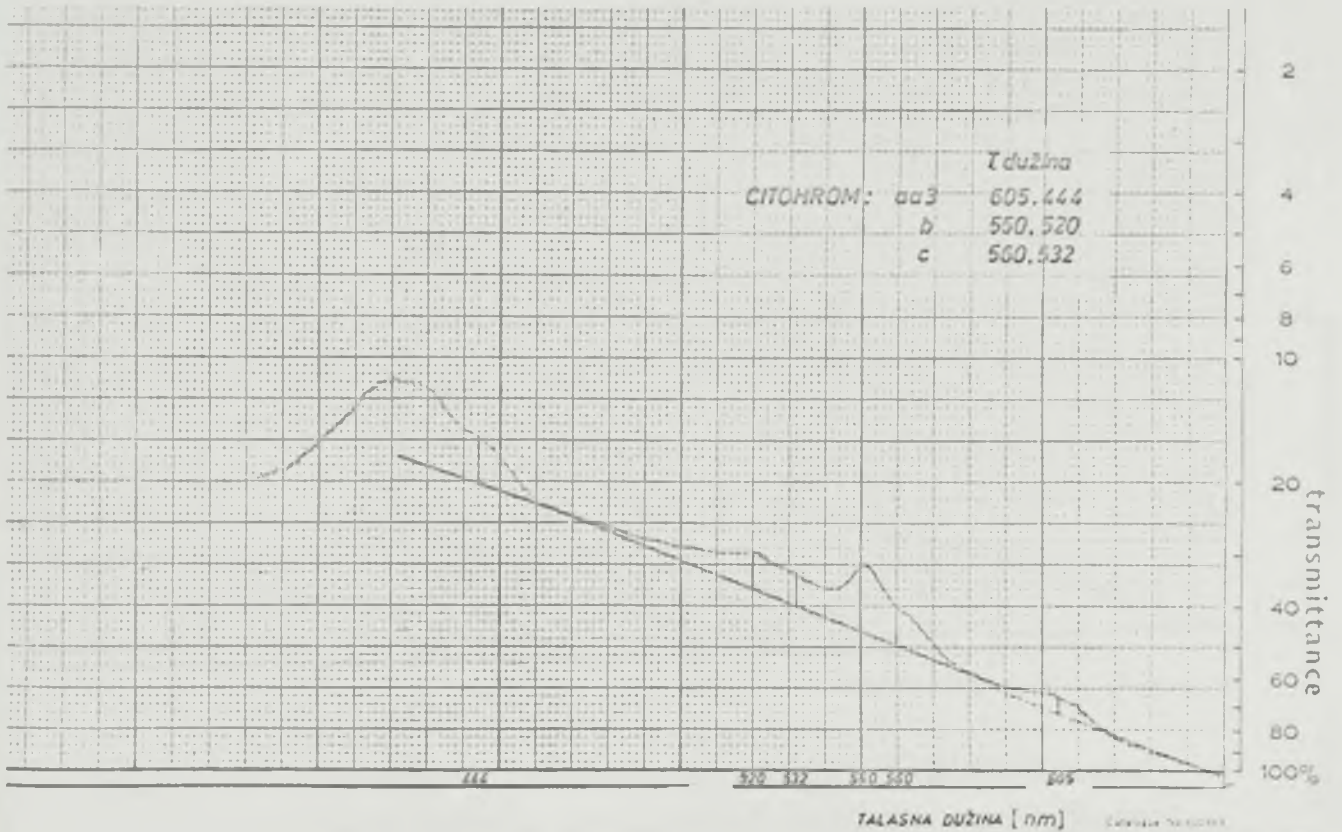
Vreme h	C i t o h r o m i $\times 10^5$ mola/l						Ukupni
	605 ^{aa}	3444 ^a	550 ^b	520	560 ^c	532	
0	0,75	0,53	2,18	2,38	2,30	2,20	10,34
2	1,37	0,99	2,38	2,67	2,99	2,38	12,73
4	1,95	1,00	3,28	2,95	3,29	2,41	14,88
16	2,26	1,35	4,05	3,27	4,06	2,59	17,58
20	2,30	1,40	4,10	3,38	4,10	2,68	17,96
26	2,35	1,45	4,20	3,50	4,25	2,76	18,51
Srednja vrednost	2,35 3,70	1,45	4,20 7,70	3,50	4,25 7,01	2,76	18,51



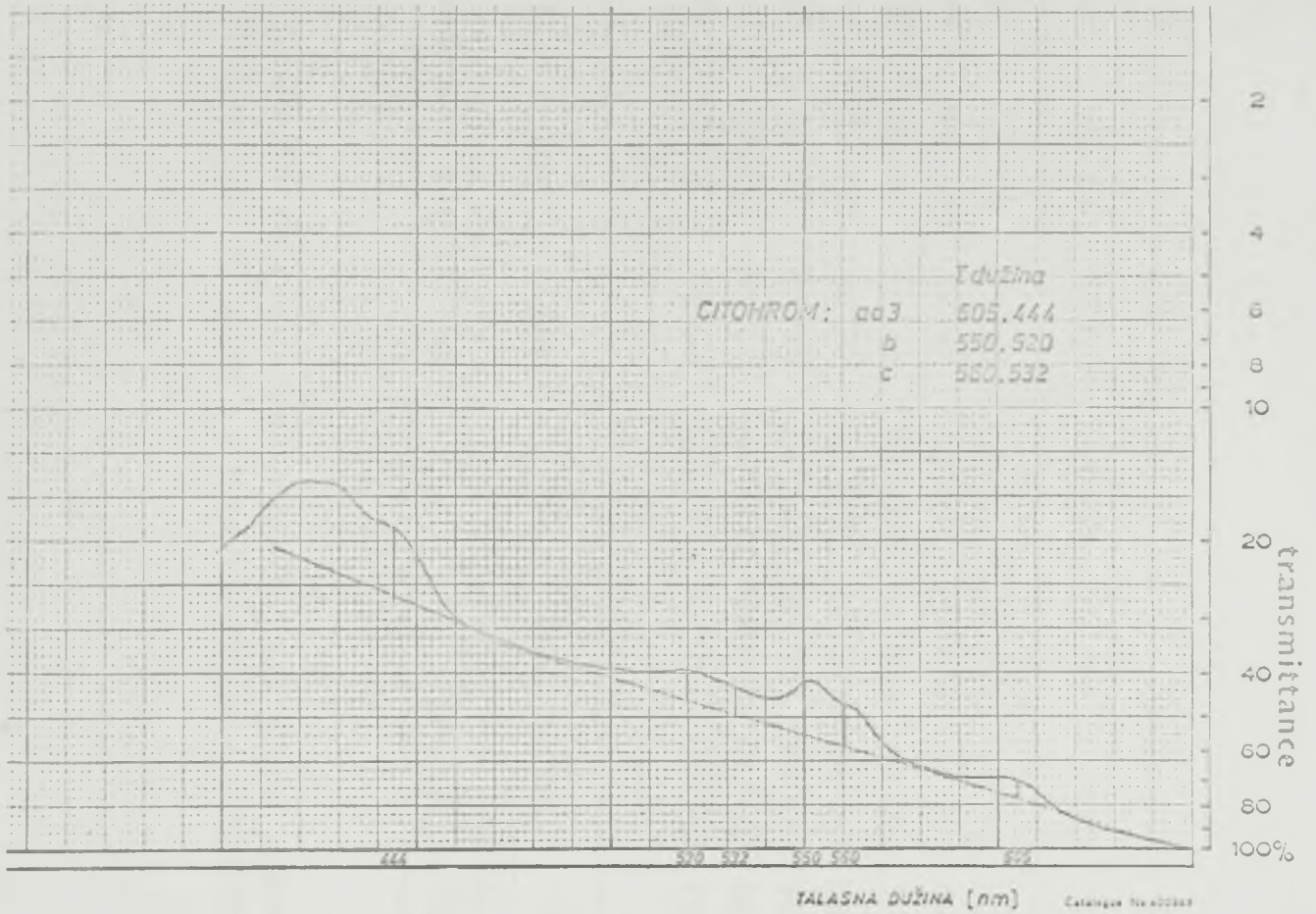
Slika 52 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,52 vol. % etanola, uz dodatak 0,75 ml / l acetona, uz aeraciju 180 l/l, h



Slika 53: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,52 vol. % etanola, uz dodatak 0,75 ml / l acetona , uz aeraciju 180 l / l , h



Slika 54 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,52 vol. % etanola, uz dodatak 0,75 ml acetona/l, uz aeraciju 180 l/l,h



Slika 55 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,52 vol. % etanola, uz dodatak 0,75 ml acetona/l, uz aeraciju 180 l/l, h

Tabela 42

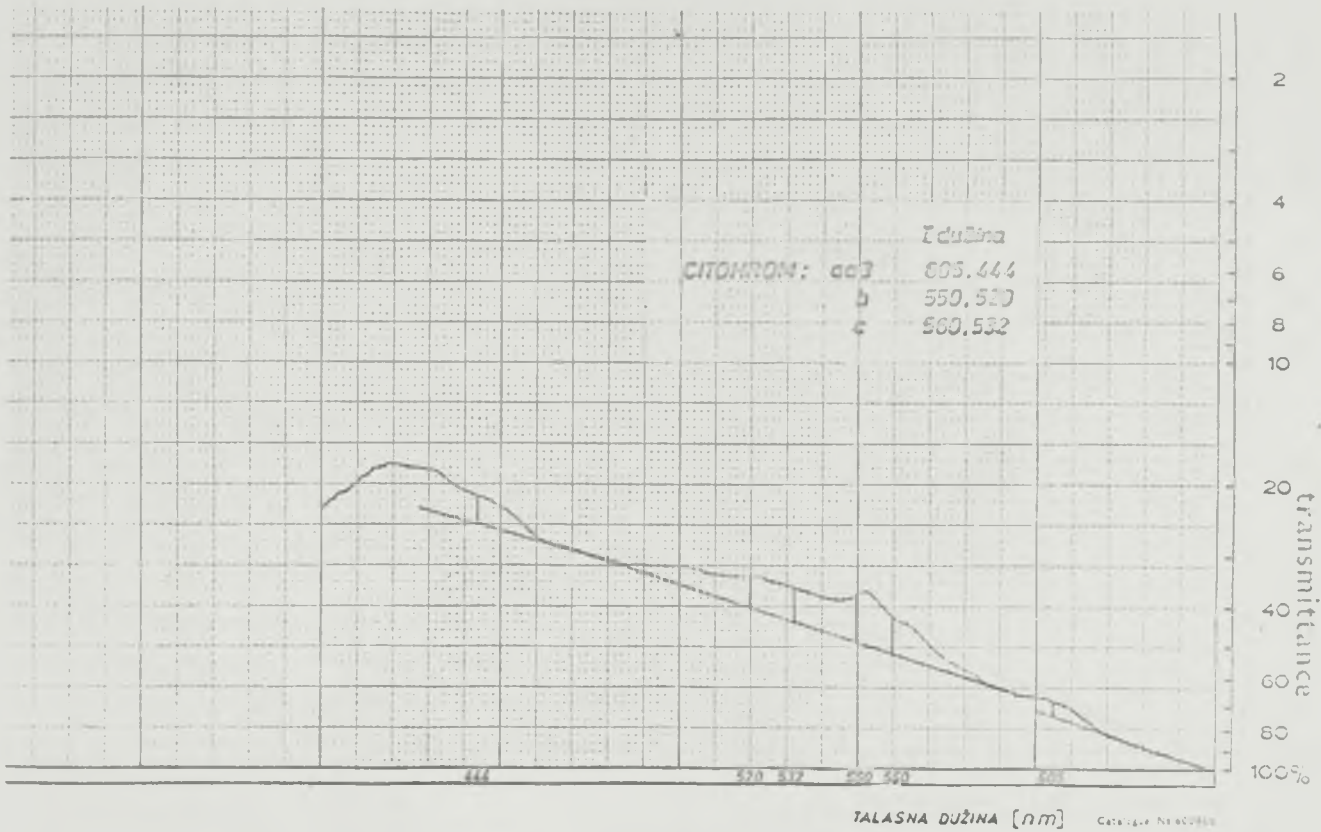
Razmnožavanje kvasca Saccharomyces cerevisiae u hranljivoj podlozi koja je sadržala 11,45 vol. % etanola, uz dodatak 1,25 ml/l acetona i 0,5 g/l asparaginske kiseline uz aeraciju od 180/l/h

Vreme h	Suva mate- rija g/100 ml	Eta- nol vol. %	Metabolička aktivnost ml/10 g. SM, 30'						Specifična aktivnost I.J./mg proteina		
			na glukozu		na etanolu		na acetonu		ADH	ICL	MDH
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}			
0 ^a	0,374	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 ^b _x	0,736	11,45	316,10	144,29	104,21	150,27	130,97	112,99	29,82	6,32	145,18
2	0,996	10,03	475,57	163,85	144,78	159,36	112,00	117,26	32,46	13,46	236,72
4	1,120	8,26	317,76	190,05	159,36	197,38	160,06	170,83	34,29	18,53	240,86
6	1,560	6,29	376,57	124,42	187,22	202,47	172,35	128,75	36,75	20,75	246,38
16	2,470	3,75	372,80	148,53	170,78	192,80	148,76	142,89	37,85	24,39	252,96
20	2,527	1,27	347,52	197,38	160,29	179,36	150,22	139,65	34,74	27,38	343,80
26	3,004	0,12	367,28	199,67	159,50	190,43	165,27	172,18	33,28	24,73	339,75
Srednja vrednost			367,66	166,88	155,16	181,72	148,52	161,06	34,17	19,36	257,95

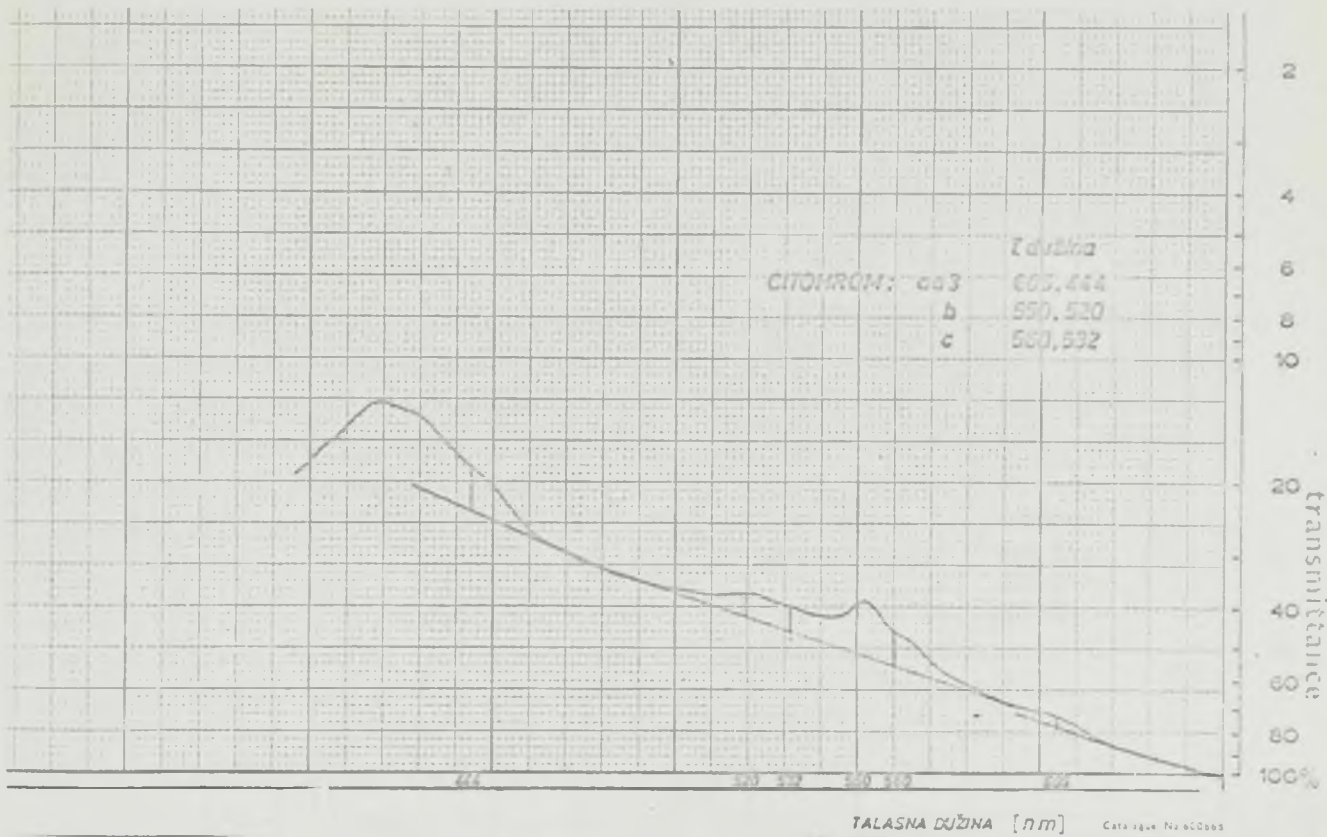
Tabela 43

Sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama, uzgajanim na podlozi koja je sadržala 11,45 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml/l acetona i 0,5 g/l asparaginske kiseline uz aeraciju od 180 l/h vazduha

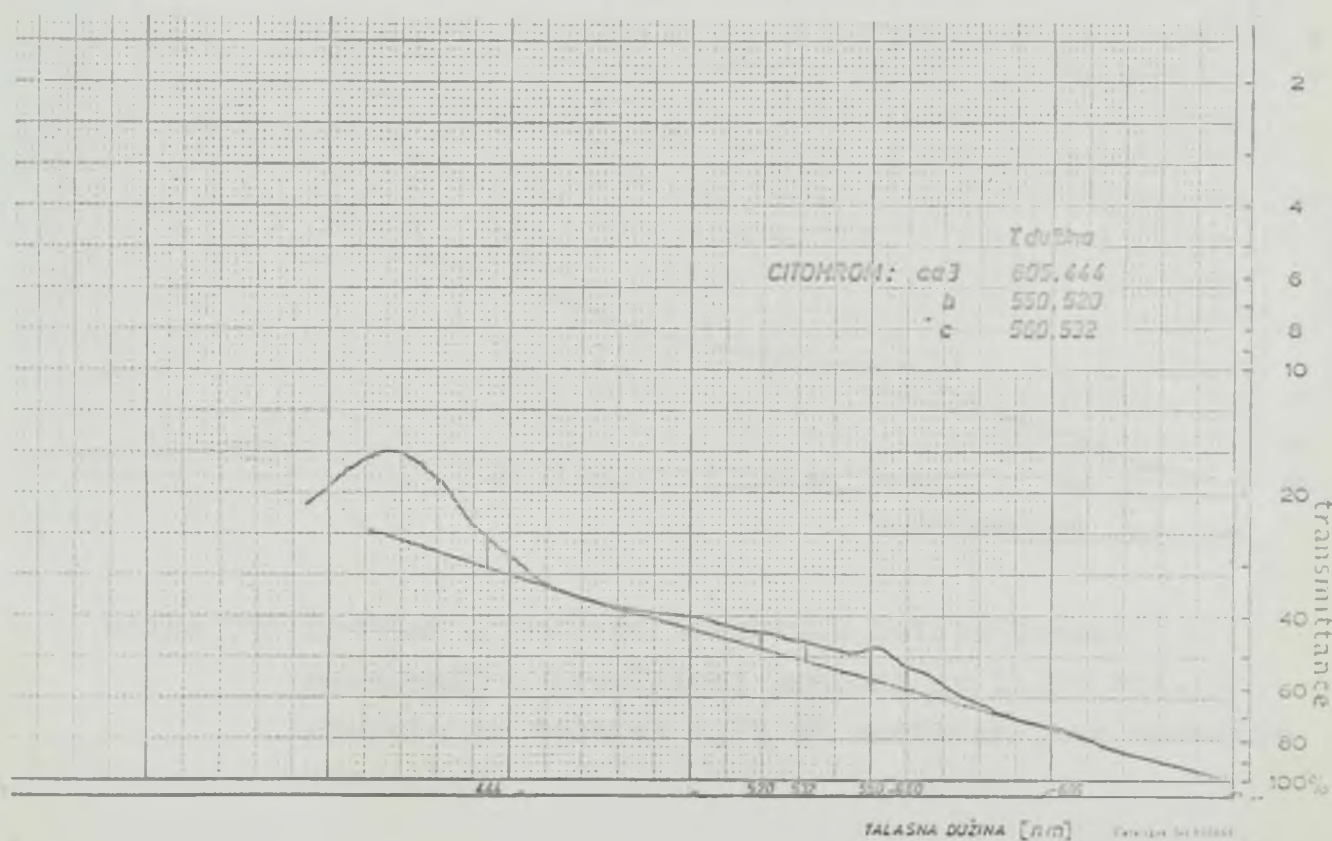
Vreme h	C i t o h r o m i x 10 ⁵ mola/l							
	Talasna du- žina nm	aa ₃ 605	444	550	b 520	560	c 532	Ukupni
0		0,77	0,46	2,19	2,10	2,30	2,03	9,85
2		0,99	0,73	2,37	2,50	2,65	2,26	13,14
4		1,75	1,02	2,52	2,60	2,99	2,26	13,04
6		2,00	1,30	3,00	2,75	3,26	2,26	14,50
16		2,28	1,49	4,15	3,50	4,20	2,65	18,27
20		2,30	1,40	4,18	3,50	4,23	2,68	18,39
26		2,30	1,50	4,20	3,50	4,25	2,70	18,45
Srednja vrednost		1,77	1,17	3,23	2,92	3,41	2,40	14,90
		2,94		6,15		5,81		



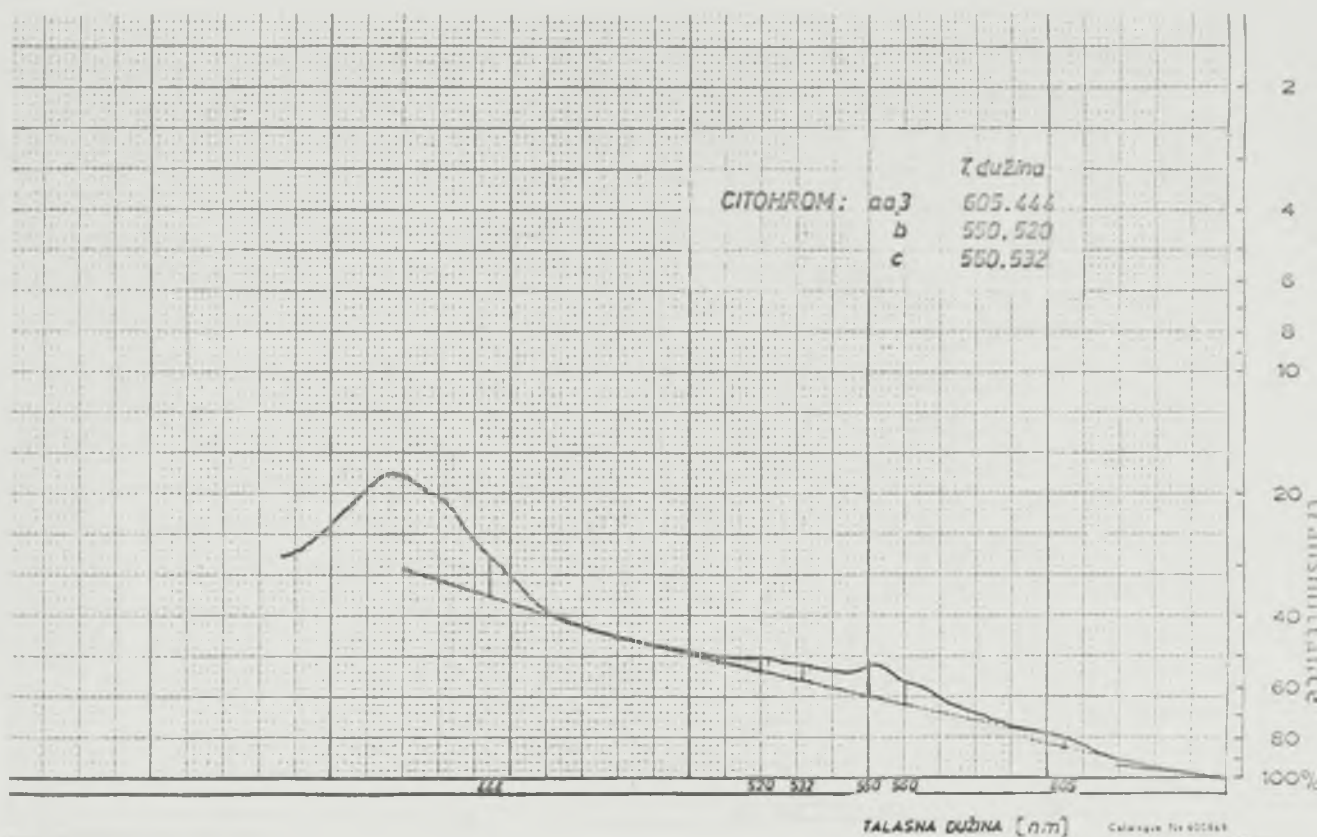
Slika 56 : Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,45 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml acetona /l uz aeraciju 18o 1/1,h



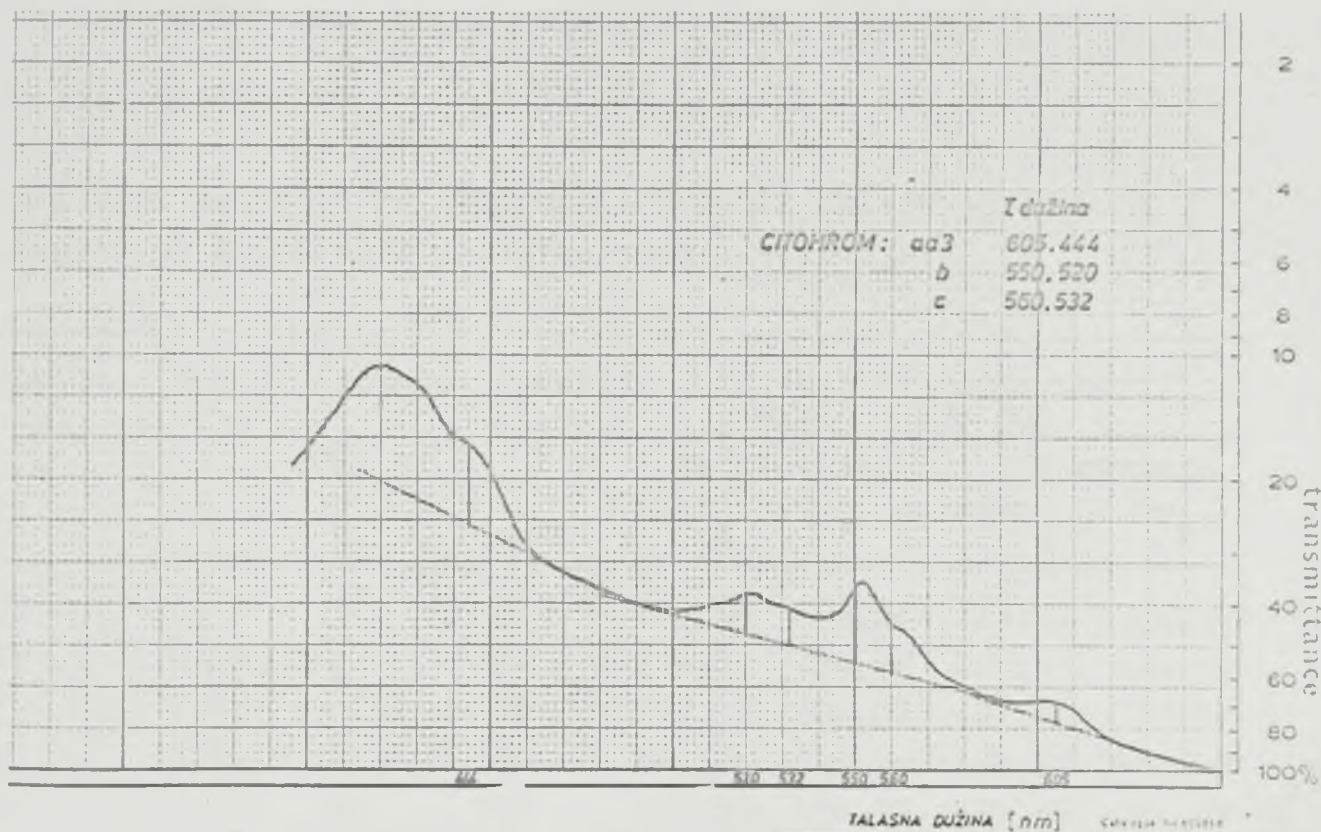
Slika 57: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,45 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml acetona /l uz aeraciju 180 l/1,h



Slika 58: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,45 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml acetona / l , uz aeraciju 180 l/1,h



Slika 59: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,45 vol. % etanola uz dodatak 1,25 ml acetona/l, uz aeraciju 18o 1/1,h



Slika 60: Spektar citohroma intaktnih ćelija kvasca uzgajanih u hranljivoj podlozi sa 11,45 vol.% etanola uz dodatak 1,25 ml acetona/l, uz aeraciju 180 l/l,h

Da bismo mogli pregledno da sagledamo kako utiče do-
datak acetona na navedene pokazatelje koje smo odredjivali u to-
ku ogleđa, u tabeli 44 dati su rezultati koji pokazuju kako za-
visi metabolička aktivnost od količine dodavanja acetona u hran-
ljivu podlogu.

Tabela 44

Zavisnost metaboličke aktivnosti kvasnih ćelija na glukozi i
etanolu od količine dodatog acetona i aeracije

Tabela broj	Dodato acetona ml/l	Aeracija l/l, h	Metaboličke aktivnosti ml/10 g SM, 30'			
			Na glukozi		Na etanolu	
			Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}
25	-	80	170,14	29,82	17,12	20,19
31	0,25	80	256,61	134,79	122,05	131,53
33	0,75	80	246,43	206,02	107,66	125,52
35	1,25	80	255,36	219,94	168,35	135,57
37	-	180	146,79	70,39	23,06	25,71
39	0,25	180	227,05	223,98	158,73	176,91
41	0,75	180	353,36	278,82	162,02	179,92
43	1,25	180	367,66	166,88	155,16	181,72

Rezultati dati u ovoj tabeli jasno pokazuju da se res-
piratorna aktivnost kvasnih ćelija povećava i na glukozi i na eta-
nolu kao supstratu. Pored toga, povećava se i sposobnost kvasnih
ćelija da stvaraju ugljen-dioksid na oba navedena supstrata. Ovo
ukazuje da dolazi do promene celokupnog metabolizma ćelija, koji
uključuje TCA ciklus, lanac disanja i EMP put. Povećanje sposob-
nosti kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid, najverovatnije,
je posledica aktivacije enzima EMP metaboličkog puta koji služi,
u ovom znači da se dobija više suve materije kvasca po utrošenom
molu ATP-a. Isto tako i aeracija uz dodatak acetona poboljšava
ovaj odnos, tako da se dodatkom 1,25 ml/l acetona i intenzivnijom

aeracijom dobija vrednost za $Y_{ATP} = 1,93$ što predstavlja veću vrednost za 2,54 puta od vrednosti, koja se dobija bez dodatka acetona i sa smanjenom aeracijom. Isto tako se i utrošak etanola kao supstrata za jednu te istu količinu kvasca smanjuje kada se u hranljivu podlogu dodaje aceton.

Ako na isti način uporedimo rezultate ostalih odredjivanja dobijenih uz uslove dodavanja acetona sa rezultatima dobijenim bez dodavanja acetona dobijamo rezultate koji su dati u tabelama 45 i 46.

Rezultati dati u tim tabelama jasno ukazuju na to da se respiratorna aktivnost kvasnih ćelija povećava kako na glukozu tako i na etanolu kao supstratu. Pored toga, povećava se i sposobnost kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid iz glukoze i etanola kao supstrata. Ovo ukazuje da dolazi do promene celokupnog metabolizma kvasnih ćelija koji uključuje u sebe TCA ciklus, lanac disanja i EMP metabolički put. Povećana sposobnost kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid najverovatnije je posledica aktivacije enzima EMP metaboličkog puta koji služi u ovom slučaju za glukoneogenezu jer je utvrđeno da je EMP metabolički put reverzibilan. Da je ova pretpostavka tačna govore i podaci (tabela 44) koji se odnose na rezultate količine stvorenog ugljen-dioksida iz glukoze i etanola pri intenzivnijoj aeraciji.

Povećana sposobnost kvasnih ćelija, uz dodatak acetona i intenzivnije aeracije, da troše kiseonik iz glukoze i etanola kao supstrata posledica su intenzivnijeg funkcionisanja enzima TCA ciklusa a takodje i lanca disanja.

povećava sa dodatkom acetona i uz intenzivniju aeraciju, ali se ne povećava sa tolikim intenzitetom kao ranije nabrojana dva druga enzima. Razlog ovoga bi mogao biti u tome da ovaj enzim je najmanje podložan delovanju spoljašnjih faktora što je donekle potvrđeno i eksperimentima koje je izveo JANKI i sar. (1971). Autori su utvrdili da izoenzim alkohol dehidrogenaze koji upućuje etanol u metaboličke puteve ne gubi znatno svoju aktivnost i nakon tretmana na 62°C u toku 1 časa.

U prilog iznetih zaključaka u vezi povećanih sposobnosti kvasnih ćelija da stvaraju ugljen-dioksid iz navedenih supstrata i povećana sposobnost da troše kiseonik, idu i rezultati dati u tabeli 46. U toj tabeli dati su rezultati sadržaja citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama, koje su uzgajane na hranljivoj podlozi sa dodatkom acetona. Dati rezultati jasno govore, da se sadržaj citohroma povećava sa količinom dodatog acetona, što predstavlja, po našem mišljenju, samo posledicu povećanja metaboličke aktivnosti kvasnih ćelija uopšte.

Tabela 46

Zavisnost sadržaja citohroma u intaktnim ćelijama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* od aeracije količina dodatog acetona u hranljivoj podlozi

Tabela broj	aceton ml/l	aeracija l/vazduha l, h	Citohromi x 10 ⁵ mola/l			
			aa ₃	b	c	Ukupni
26	-	80	2,85	4,09	4,93	12,17
32	0,25	80	2,84	5,25	5,59	13,68
34	0,75	80	3,40	5,60	6,30	15,30
36	1,25	80	4,00	5,93	6,46	16,39
38	-	180	3,38	4,66	4,65	12,66
40	0,25	180	4,00	7,80	7,18	18,98
42	0,75	180	3,70	7,70	7,01	18,51
44	1,25	180	3,30	7,70	6,95	18,45

Iz ovih rezultata zapaža se da je sadržaj citohroma aa₃ veći pri intenzivnijoj aeraciji hranljive podloge. Ovaj citohrom je najosetljiviji na promenu koncentracije kiseonika u podlozi, što je potvrđeno radovima SINGER-a i sar., (1966) i ogleđima koje su izveli OURA i SUOMALAINEN (1970). Zapaženo je da je ovaj citohrom najosetljiviji na koncentraciju kiseonika i represiju glukozom ako se uporedi sa osjetljivošću citohroma b i c (RICKARD, MOSS, PHILIPS i MOK, 1971).

MOSS i sar., (1971) su, takodje, pokazali da se sadržaj citohroma aa₃ povećava sa povećanom količinom kiseonika u podlozi. RICKARD, MOSS i GANEZ (1971) su zapazili da su sva tri tipa citohroma imala maksimum kada se kvasac uzgaja pri niskim koncentracijama glukoze, sa minimalnom aeracijom. Dalje su ovi autori zapazili da se sva tri tipa citohroma smanjuju sa povećanjem sadržaja glukoze.

U tabeli 47 dati su rezultati konstante Y_{ATP} dobijene u toku ogleđda pri kojima je u hranljivu podlogu dodavan acetone.

Tabela 47

Zavisnost Y_{ATP} , količine potrebnog etanola za 100 g suve materije kvasca i iskorišćenja od količine dodatog acetona i aeracije

Etanol u hranljivoj podlozi vol. %	Dodato acetona ml/l	Količina vazduha l/l,h	Y_{ATP}	Potreban etanol g za 100 g SM kvasca	Iskorišćenje % od teorijskog iskorišćenja
11,56	-	80	0,76	401,24	34,77
11,60	0,25	80	1,05	313,14	44,46
11,50	0,75	80	1,22	305,48	45,58
11,46	1,25	80	1,42	305,22	45,62
11,52	-	180	0,87	390,74	35,64
11,68	0,25	180	1,15	284,25	48,99
11,56	0,75	180	1,57	265,00	52,15
11,48	1,25	180	1,93	262,66	53,01

Kako se iz rezultata datih u tabeli 47 vidi dodatak acetona u hranljivu podlogu ima pozitivan uticaj na sva tri izračunata tehnološka pokazatelja. Dodatkom acetona dobija se više suve materije kvasca po utrošenom molu ATP-a. Ovaj odnos poboljšava i intenzivnija aeracija (180 l/l,h) tako da se sa dodatkom 1,25 ml/l acetona dobija vrednost za Y_{ATP} 1,93 što predstavlja vrednost veću za 2,54 puta od vrednosti koja se dobija bez dodatka acetona sa slabijom aeracijom. Sa dodatkom acetona, uz uslove intenzivnije aeracije poboljšava se odnos potrebne količine etanola za 100 g s.m. kvasca. Tako je, uz dodatak 1,25 ml acetona (pri intenzivnijoj aeraciji) utrošeno za 100 g s.m. kvasca manje 138,58 g etanola (401,24 - 262,66). Iskorišćenje (% od teorijskog iskorišćenja) izračunato je na osnovu toga što je poznato da je teorijski potrebno utrošiti za 100 g suve materije kvasca 139,26 g etanola (WHITE, 1954). Kako se iz datih rezultata vidi sa dodatkom acetona 1,25 ml/l (uz intenzivniju aeraciju) postiže se veće iskorišćenje etanola kao sirovine za 18,24%.

Z A K L J U Č C I

Z A K L J U Č C I

Iz dobijenih rezultata i iznete diskusije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Klasične tehnološke postavke, da se kod progneracije pekar-skog kvasca Saccharomyces cerevisiae mora početi anaerobnom fazom do stvaranja oko 3,0 vol. % etanola, zadržavaju se još i danas iako je KONOVALOV (1962) dokazao da se kvasac normalno razmnožava kod koncentracije etanola od oko 7,0 vol. %.
2. Postavljanjem Pasteur-ovog efekta (MEYERHOF, 1936) i kasnijim ispitivanjem CRABTREE-a i drugih napred pomenutih istraživača, dokazana je multikauzalnost uzroka aerobnog i anaerobnog vida metabolizma kvasca.
3. Već ranije smo došli do zaključka da se kvasac razmnožava i u hranljivoj podlozi koja sadrži 11,60 vol. % etanola sa umanjnim iskorišćenjem. Ti zaključci su nas naveli da izvršimo analizu celog niza fizioloških promena koje nastaju u kvasnim ćelijama kada im se kao izvor ugljenika daju razne koncentracije etanola.

Da bismo ispitali te promene odredjivali smo: metaboličku aktivnost intaktnih kvasnih ćelija (tehnikom Warburg-a); enzimatske aktivnosti alkohol dehidrogenaze, izocitrat lijaze i malat dehidrogenaze - glavnih enzima koji upućuju etanol u metabolizam kvasca - i sadržaj citohroma, radi ispitivanja aktivnosti lanca disanja.

4. Ispitujući zavisnost fizioloških karakteristika kvasnih ćelija od koncentracije etanola u hranljivoj podlozi, došli smo do zaključka, da se sa povećanjem koncentracije etanola smanjuje metabolička aktivnost kvasnih ćelija. Takodje se smanjuju i enzimske kativnosti u dezintegratu kvasnih ćelija,

a i sadržaj citohroma u intaktnim kvasnim ćelijama (što ukazuje da je aktivnost enzima lanca disanja smanjena).

5. Uzimajući u obzir negativno delovanje etanola u koncentracijama većim od 8 vol. %, za industrijske svrhe ne može se preporučiti uzgajanje pekarskog kvasca u podlogama sa većim sadržajem etanola od 8 vol. %.
 6. Utvrdili smo da se smanjena metabolička aktivnost (zbog povećane koncentracije etanola) može poboljšati dodavanjem acetona, jer aceton, kao dobar organski rastvarač najverovatnije oslobadja aktivne centre pojedinih enzima, tako da je celokupni metabolizam u kvasnim ćelijama ubrzan.
 7. Optimalna doza dodavanja acetona, pod uslovima izvedenih ogleda, je 1,25 ml/l.
 8. Ovim radom nije obuhvaćeno ispitivanje uzroka pozitivnog delovanja acetona na metabolizam kvasnih ćelija.
- Dobijeni rezultati daju veliku mogućnost daljim istraživanjima primene acetona u tehnologiji proizvodnje kvasca i medicini.

L I T E R A T U R A

L I T E R A T U R A

1. ANDREASAN, A.P. i STIER, T.J.B. (1953), J. cell. comp. Physiol., 41, 23.
2. ANDREASAN, A.P. i STIER, T.J.B., (1954), J. cell. comp. Physiol., 43, 271.
3. ANDREASAN, A.P. i STIER, T.J. B., (1956), J. cell. comp. Physiol., 48, 317.
4. AZAM, F. i KOTYK, A., (1969) FEBS, LETTERS, 2, 333.
5. BARNA, D. J. (1972), Rak pred porazom, Zemun 1972.
6. BARTEY, E. H., (1960), Physiol. Plant., 13, 192.
7. BAUCHOP T. i ELSDEN, R.S., (1960) J. gen. microbiology, 23 457.
8. BECK, C. i VON MEYENBURG, H.K., (1968), J. Bacteriol. 96, 479.
9. BERTRAND, G., (1952) preko cit.lit. 18, strana 146.
10. BLEEG, H.S., BAK, A.K., CHRISTIANSEN, C., SMITH, K.E. i STENDERUP, A. (1972), Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 524.
11. BROWN, C.M. i JOHNSON, B. (1971) Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 37, 477.
12. CHAIX, P. i HEYMAN - BLANCHET, T., (1959) Biochim. biophys. Acta, 35, 85.
13. CHAPMAN, C. i BARTLEY, W. (1968), Biochem.J. 107, 455.
14. CRABTREE, H.G. (1929), Biochem. J. 23, 536.
15. CHEN, L.S. (1964) Nature (London) 202, 1135.
16. DARON, H.H. i GUNSALUS, J.C., (1962) Methods in Enzymol. 5, 633.
17. DE CLERCK, J., (1964), Lehrbuch der Brauerei, band II, 2 izdanje, Berlin, 1964.
18. DE - LOFFRE (1962) preko cit.lit. 58, strana 113.
19. DIXON, M. i WEBB, E.C., (1958), Enzymes, London; Longmans,

Green i Co., strana 411.

20. DIXON, G.H. i KORNBERG, H.L. (1959), Biochem. J. 72, 3.
21. DONTCHHEFF, L., (1955) C.R. Soc. Biol. 152, 566.
22. DREWS, B. i HESSLER, K., (1967) Monatschrift für Brauerei, 3, 224.
23. FIECHTER, A. (1966) Untersuchung an Wachsenden Zellen von Saccharomyces cerevisiae; Habilitationsschrift Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, unpublished, preko cit.lit. 86, strana 72.
24. FICHTER, H. (1968) Mitt. Versuchsst. Garungs-gewerbe Wien, Inst. Angew. Microbiol. 22, 1.
25. FICHTER, A. i von Meyenburg, H. K. (1969), In Yeast, Proc. 2 nd Symp. Yeasts, Bratislava 1966; Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava; strana 387.
26. FOLWER, P.W., BALL, A. J.S. i GRIFFITHS, D.E. (1972), Can. J. Biochem. 50, 35.
27. FORREST, W.W. i WALKER, D.J. (1971) Advan. Microbial. Physiol. 5, 213 preko cit. lit. 86 strana 152.
28. FOTH, H. (1929) preko cit. lit 58 strana 100.
29. FUKUI, S. i HIRATA, A. (1968), J. Gen. Appl. Microbiol. 14, 47.
30. GAVEZ, E. (1973), Sarajevo, lično saopštenje.
31. GÖTS, C.P.M. (1967), Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 37, 161.
32. GRYLLES, F.S.M. (1961) in Biochemists Handbook, ed. by C. Long, E. i N.F. Spon. Ltd. London strana 1050.
33. GROOT, G.S. ROUSLIN, W. i SCHATZ, G. (1972) I. biol. Chem. 274, 1735.
34. GUNSALUS, I.C. i SCHUSTER, C.W., (1961) The Bacteria, 2, Academic Press, New York, London, 1961, strana 1.
35. HARRISON, J.S. (1967), Process Biochem. 2, 41.

36. HARRISON, J.S. (1971) Progr. Ind. Microbiol. 10, 129.
37. HATHAWAY J.A. i ATKINSON, D.E. (1963) J. Biol Chem. 238, 2875.
38. HAUKELI, A.D. i LIE, S. (1971), J. Gen. Microbiol. 69, 135.
39. HEICK, H.M.C.; WILLEMOT i BEGIN - HEICK, Biochem Biophys. Acta 191, 493.
40. HEICK, H.M.C. (1971), Can. J. Microbiol. 18, 23.
41. HERING, H.J., (1967) Stoma, 1, 20.
42. HENNESSY, J.P. (1962), J. Inst. Brew. 68, 332.
43. HEREDIA, C.F., SOLS, A. i DELA FUENTE (1968) Eur. J. biochem. 5, 321.
44. HERNANADES, E. i JOHNSON, M.J. (1967) J. of Bacterial., 94, 996.
45. HOLZER, H., GOLDSMIDT, S., LAMPRECHT, W. i HELMREICH, E.(1954), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 297, 1. preko cit.lit. 86 strana 32.
46. HOMMES, F.A. (1966), Arch. Biochem. Biophys. 114, 231.
47. JANKI, J.S., TUSTANOFF, R.M. i RENO, E., (1971) Can.J. Microbiol. 17, 1125.
48. KAUTZMANN, R. (1969), Branntweinwirtschaft 109, 193.
49. KEILIN, D., (1925) Proc. Roy. Soc. Biol. 98, 312 preko cit. lit. 41 strana 333.
50. KEILIN, D. i SLATER, E.C., (1953) Brit. med.Bull., 9, 89 preko cit.lit. 41 strana 336.
51. KERANEN, A.J.A. (1962) Alkon Keskuslaboratorio, Report 6022 unpublished. preko cit.lit. 84.
52. KONOVALOV, C.P.(1962) Biohemia drožži, Pisće promizdat, Moskva 1962.
53. KORMANČIKOVA, V., KOVAČ, L. i VIDOVA, M. (1969), Biochim. Biophys. Acta 180, 91.
54. KORNBERG, H.L. i KREBS, H.A. (1957) Nature, 179, 988.

55. KRAJOVAN, V. i PEJIN, D. (1972) materijal II. Jugoslovenskog kongresa mikrobiologa strana 326.
56. KRETSCHMAR, H. HEFE UND ALKOHOL, Spring - Verlag, 1955.
57. LEHNINGER, A.L., (1971) Bioenergetics, 2 end ed.; W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park.
58. LEUNENBERGER, H.G.W. (1972) Arch. Microbiol. 83, 347.
59. LEUTHARDT, F., Physiologische Chemie, 14 Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 1961, 263.
60. LINDNER, P. i CZISER, S., (1912) Braenrei, 29, 1 preko cit. lit. 23 strana 226.
61. LINDENMAYER, A. i ESTABROOK, R.W., (1958) Arch. Biochem. Biophys., 78, 66.
62. LINNAN, A.W. i HALSAM, J.M. (1970) Current Topics in Cellular Regulation, ed. by. Horecker, vol. 2 Academic Press, New York, London strana 101.
63. LUGANAS, R. (1973) materijal THIRD INTERNATIONAL SPECIALIZED SYMPOSIUM ON YEAST, Helsinki, juna, 1973, strana 42.
64. MACHER (1936) preko cit.lit. 58 strana 8.
65. MAITRA, P.K. i ESTRABROOK, R.W. (1967a) Arch. Biochim. Biophys. 121, 117.
66. MAITRA, P.K. i ESTRABROOK, R.W. (1967b) Arch. Biochim. Biophys. 121, 129.
67. MAITRA, P.K. i ESTRABROOK, R.W. (1967c) Arch. Biochim. Biophys. 121, 140.
68. MAITRA, P.K. i LABO, Z. (1971) J. Biol. Chem. 246, 475.
69. MAXON, W.D. i JOHNSON, M.J. (1953) Ind. Gng. Chem. 45, 2554.
70. MC ILWAINE, T.C. (1921) J. Biol. Chem. 49, 183.
71. MC MURROUGH, I. i ROSE, A.H. (1967), Biochem. J. 105, 189.
72. MERECKER; DELBRUCK (1908) preko cit.lit. 23 strana 9.
73. MILHARD, G. i AUBERG, J.P., C.R. held. Seances. Aoadem. Sci. 241, 525, 1955, preko cit.lit 23 strana 246.

74. MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes (Librairiescientifique), Paris, 1942 preko cit.lit 84.
75. MOR, J. i FIECHTER, A. (1968), Biotechnol. Bioeng. 10, 159.
76. MOSS, F.J., RICKARD, P.A.D., BUCH.F.E. i CAIGER, P. (1971), Biotechnol.Bioeng. 13, 63.
77. NAGLEY, P. i LINNANE, A.W. (1972), Cell. Differentiation, 1, 143.
78. NÖRDSTROM, K. (1967), Sv. Kem. Tidskr. 79, 16.
79. NURMINEN, T. i SUOMALAINEN, H. (1968), J. Gen. Microbiol. 53, 275.
80. OCHOA, S. (1955), Methods Enzymol. 1, 735.
81. OGSTON, A. G. (1948) Nature, 162, 963.
82. OLSON, B.H. i JOHNSON, M.J. (1949), J. Bacteriol. 57, 235.
83. OLSON, J.A., (1959) J. biol. 234, 5.
84. OURA, E. (1972) THE EFFECT OF AERATION ON THE GROWTH ENERGETICS AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF BACKER S YEAST, doktorska disertacija, Univerzitet u Helsinkiju.
85. OURA E. i SUOMALALINEN, H. (1970), I. inst.brew. London, 76, 536.
86. OURA, E. i SUOMALALINEN, H. (1972), Szeszipan, 19, 5.
87. FERRIER, C.R. held (1910) Seances Acad Sci., 151, 163 preko cit.lit. 23 strana 228.
88. PIRT, S.J. (1965), The maintence energy of bacteria in growing cultures, Proc. Roy.Soc. London 163, 224.
89. POLAKIS, E.S. i BARTLEY, W. (1965), Biochem. J. 97, 284.
90. REILLY, C. i SHERMAN. F. (1965) Biochem. Biophys. Acta, 95, 640.
91. RICKARD, P.A.D., MOSS, F.J. i SAM, C.T. (1969), Aust.J. Exp. Biol. Med. Sci. 47, 521.
92. RICKARD, P.A.D., MOSS, F.J., PHILLIPS, D. i MOK, T.C. (1971), Biotechol. Bioeng. 13, 169.
93. RICKARD, P.A.D., MOSS, F.J. i GANEZ, M. (1971a), Biotechnol.

- Bioeng. 13, 1.
94. ROODYN, D.B. i WILKIE, D. (1968), The Biogenesis of Mitochondria; Methuen i Co LTD, London,
95. ROSE, A.H. i HARRISON, J.S. vol. 2, Academic Press, London, New York.
96. SALAS, M; VINNELA, E., i SOLS, A. (1965) J. biol. Chem. 240, 561.
97. SALAS, M.L.; SALAS, J. i SOLS A. (1968) Biochem. biophys. Res. Commun, 31, 461.
98. SCHATZ, G. (1970) "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts" ACS Monograph, ed. by E. Racker; Van Nostrand Reinhold Co., New York, strana 251.
99. SCHIMPFESSEL, L. (1968), Biochim. Biophys. Acta 151, 317.
100. SEAMAN, G. R. i DELNASCHAKE, M. (1955) J. biol. Chem. 217, 1.
101. SENEZ, J.C. (1962), Bacteriol. Rev. 26, 95.
102. SLONIMSKI, P.P., (1953) La Formation des Enzymes Respiratoires Chez la Levure; Masson et Cie, Paris preko cit.lit. 84.
103. SMAIL, A.A. i ALI, A.M.M. (1971) Folia microbiol. 16, 350.
104. SOLS, A. (1967) "ASPECTS OF YEAST METABOLISM" Blackwell Scientific Publications, Oxford strana 47.
105. SOLS, A; CANCERO, C. i DELA FUENTE, G. (1971) The YEASR preko cit.lit. 95.
106. STIER, T.J.B., SCHALF, R.E. i BROCKMAN, M.C., (1950) J. Bact., 59, 45.
107. STIER, T.J.B., SCHALF, R.E. i PRETER, C.J., (1950) J. cell. comp. Physiol., 76, 159.
108. STOUTHAMER, A.H. i BETTENHAUSSEN, C. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 310, 53.
109. STOUTHAMER, A.H. (1973) Antonie van Leeuwenhoek, 39, 537.
110. SUOMALAINEN, H. (1958) Suom. Kemi. Stilehti A-31, 215 preko cit.lit. 84 strana 36.

112. SWANSON, W.H. i CLIFTON, C.E. (1948) J. bac eriol, 56, 115.
113. SZABO, A.S.i AVERS, C.J. Ann. N.Y. Acad. Sci, (1968),168, 302, preko cit.lit. 38 strana 495.
114. THAUER, R.K. (1968) Dissertation, Universitat Freiburg; ref. DECKER, K., JUNGERMANN, K. i THAUER, R.K. Angew. Chem. 82, 1953.(1970).
115. TERUI, G., KANNO, N. i SASE, M. (1960) Tehnol. Rep. Osaka Univ. 10, 527 preko cit.lit. 84 strana 39.
116. UMBERT, W.W. (1972) Manometric and biochemical techniques, Burgess Publishing Company, mineapolis.
117. VAN UDEN, N. (1969) Kinetics of nutriend limited growth, Anu. Rew. Microbiol. 23, 476.
118. VON MEYENBURG, H.K. (1969) Archiv für Microbiol. 66, 289.
119. VON MEYENBURG, H.K. (1969a) in Continuous Cultivation of Microorganisms, Proc. 4 th Symp., Prague 1968; Academia, Prague strana 129.
120. WANG, C.H., STERN, I., GILMOUR, V.H., KLUNGSOUYR, S., REDD, D.J., BIALY, J.J. i CHRISTENSES, B.E. (1958), J. Bacteriol. 76, 207.
121. WHITE, J. (1954), Yeast Technology; Chapman and Hall, London
122. WICKERHAM, L.J. (1951) U.S.Dep. Agr.Techn. Bull. No. 1029 preko cit.lit. 84 strana 28.
123. WIELAND, H., THUNBERG, F. (1920) Skand. Arch. Physiol. 40, 1 preko cit.lit. 23 strana 250.
124. WITT, I., KRONAU, R. i HOLZER, H. (1966), Biochim. Biophys. Acta 128, 63.
125. YOTSUYANAGI, Y. (1962) J. Ultrastruct. Res. 7, 121 preko cit.lit. 38 strana 495.

