



Doctoral Thesis

Characterization of the respirative and respiro-fermentative glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

Author(s):

Arreguin Görz de Lorencez, Maria Mónica

Publication Date:

1986

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000413145> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 8089

CHARACTERIZATION OF THE RESPIRATIVE
AND RESPIRO-FERMENTATIVE GLUCOSE
METABOLISM IN SACCHAROMYCES cerevisiae

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
María Mónica Arreguín Görz de Lorencez
BSc. Biochem. Eng.
born 30 March 1956
citizen of Mexico

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. A. Fiechter, examiner
Prof. Dr. G. F. Fuhrmann, co-examiner

Zürich 1986

4. SUMMARY

The metabolism of glucose respiratively assimilating cells of Saccharomyces cerevisiae was investigated and compared with that of glucose respiro-fermentatively and ethanol utilizing cells. Continuous culture technique was employed to study the different metabolic states, since glucose respirative metabolism can be observed in feed controlled cultivation systems only.

Early observations of the glucose metabolism of yeast indicated that the key gluconeogenic enzymes (FBPase and PEPCK), MDH and CAT are strongly repressed in the presence of glucose in batch culture. The levels of these enzymes were found to be highest in ethanol growing cells and lowest in cells growing respiro-fermentatively. Cells with respirative glucose metabolism exhibited activities in the range between these two extremes. This effect was ascribed to induction by ethanol, which is produced and consumed in some phases of the cell cycle. The higher expression of such enzymes means that the metabolic states of glucose respiratively degrading cells and ethanol assimilating cells are similar. The degree of expression of these enzymes did not depend on the presence of glucose but rather depends on metabolic rates.

Early studies of m- and c-MDH isoenzymes in batch culture indicated that c-MDH was inactivated by glucose. These isoenzymes were studied in the different metabolic states. The results suggested that both enzymes are present under aerobic conditions.

The cytochrome content of ethanol utilizing cells was slightly higher than that of cells consuming glucose respiratively. The relation between cellular content of mitochondria and cytochromes was determined. Ethanol utilizing cells had significantly more mitochondrial protein as compared to cells grown on glucose respiratively at the same dilution rate. The portion of mitochondrial protein remained constant under glucose respirative and respiro-fermentative conditions.

The effect of ethanol production on the respiratory capacity of the cells was investigated. Ethanol produced by the cells had a strong inhibitory effect on the oxygen uptake rate when the ethanol concentration was higher than 10 g l^{-1} .

The strain of S. cerevisiae used in this work had the tendency to synchronize spontaneously during oxidative glucose metabolism. The study of the cell cycle contributed some evidence to the overflow hypothesis. This mechanism has been proposed to explain ethanol production. Ethanol formation coincided with the bud emergence. Before ethanol is produced, the pyruvate levels increased which is in agreement with the overflow hypothesis. The variation of the gluconeogenic enzymes activities was parallel to the changes in ethanol concentration. The addition of ethanol to synchronous culture as pulse or substrate shift from glucose to ethanol did not produce an uniform pattern in the variation of the enzyme activities studied. This suggests different regulation mechanisms. It was concluded that ethanol induced the synthesis of gluconeogenic enzymes in the respirative metabolism whereas the role of pyruvate was not significant. The activities determined in asynchronously growing cells represented an average value of the activities measured in synchronous culture. This indicated that synchronous culture yields a more differentiated picture of enzyme regulation than asynchronous culture.

5. ZUSAMMENFASUNG

Der Stoffwechsel von Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die Glucose respirativ assimilieren, wurde untersucht und mit demjenigen von Zellen, die Glucose respiro-fermentativ verwerten, sowie solchen, die auf Ethanol wachsen, verglichen. Die verschiedenen Stoffwechselltypen wurden anhand von kontinuierlichen Kulturen studiert, da der respirative Stoffwechsel von Glucose nur in Systemen mit kontrollierter Mediumszuführung beobachtet werden kann.

Frühere Untersuchungen des Glucose-Stoffwechsels in Hefen haben gezeigt, dass die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese (FBPase und PEPCK), MDH und CAT in Batchkulturen durch Glucose stark reprimiert werden. Die Aktivitäten dieser Enzyme waren in den kontinuierlichen Kulturen am höchsten bei Ethanol verwertenden Zellen und am niedrigsten bei respiro-fermentativ wachsenden Zellen. Zellen die Glucose respirativ verwerteten, zeigten Enzymaktivitäten zwischen den beiden Extremen. Die Erklärung dieses Effekts lag bei der Induktion durch Ethanol, der während dem Zellzyklus produziert und verbraucht wird. Die erhöhten Aktivitäten dieser Enzyme in Zellen, die Glucose respirativ verwendeten und in Zellen, die mit Ethanol als Substrat wuchsen, deutet darauf hin, dass diese beide Stoffwechselltypen einander ähnlich sind. Die Aktivität der Enzyme in Zellen, die Glucose respirativ verbrauchten, war abhängig von der Wachstumsrate und nicht ausschliesslich vom Substrat.

Frühere Untersuchungen der Malatdehydrogenase Isoenzyme in Batch Kulturen haben gezeigt, dass mindestens zwei Formen vorliegen (c-MDH und m-MDH) und, dass c-MDH durch Glucose inaktiviert wird. Die Isoenzyme wurden in kontinuierlichen Kulturen untersucht. Die Expression der zwei Isoenzyme war bei allen drei Stoffwechselltypen electrophoretisch nachweisbar.

Zellen, die auf Ethanol wuchsen, hatten einen leicht höheren Cytochromgehalt als Zellen, die bei entsprechender Verdünnungsrate mit Glucose als Substrat wuchsen. Die Beziehung zwischen Mitochondriengehalt der Zellen

und Cytochromen wurde untersucht. Dabei zeigte sich, dass Zellen, die Ethanol bei gleicher Verdünnungsrate als Substrat verwerteten, bedeutend mehr Mitochondrien-Protein enthielten als Zellen, die Glucose respirativ abbauten. Bei der Überführung der Zellen von respirativem zu respiro-fermentativem Stoffwechsel blieb der Gehalt an Mitochondrien-Protein konstant.

Der Einfluss von intrazellulär gebildetem Ethanol auf die Atmung der Zellen wurde untersucht. Der von den Zellen produzierte Ethanol bewirkte eine starke Hemmung der Sauerstoffaufnahme, wenn die Konzentration höher als 10 g l^{-1} war. Die spezifische Substrataufnahmerate von Saccharomyces cerevisiae war unempfindlich gegenüber Ethanol im Bereich der verwendeten Glucosekonzentrationen.

Bei Wachstumsraten unter 0.25 h^{-1} hat S. cerevisiae H 1022 die Tendenz spontan zu synchronisieren (Synchronwachstum). Die Untersuchung des Sprossungszyklus bestätigte die Richtigkeit der Überlaufreaktion auf Stufe Pyruvat als primäre Ursache der aeroben Ethanolbildung. Die Ausscheidung von Ethanol erfolgte parallel zur Sprossbildung. Bevor Ethanol produziert wurde, stieg die intrazelluläre Pyruvatkonzentration an. Dies stimmt mit den Annahmen der Überlaufhypothese überein. Die Veränderungen der spezifischen Aktivitäten der gluconeogenetischen Enzyme verliefen parallel mit der Änderung der Alkoholkonzentration im Sprossungszyklus. Eine unterschiedliche Regulation der Aktivitäten verschiedener Enzyme konnte beobachtet werden, als Ethanol zu synchron wachsenden Zellen gepulst wurde oder wenn ein Substratwechsel von Glucose zu Ethanol im Verlaufe des Zellzyklus erfolgte. Ethanol wirkte offenbar als Induktor für die Bildung der gluconeogenetischen Enzyme im respirativen Stoffwechsel, während der Einfluss von Pyruvat nicht bedeutsam war. Die spezifischen Aktivitäten der entsprechenden Enzyme von asynchron wachsenden Zellen, stellten einen mittleren Wert der spezifischen Aktivitäten in Synchronkultur dar. Damit wurde gezeigt, dass Synchronkulturen ein differenzierteres Bild der Enzymregulation zeigen als asynchrone Kulturen.