
nepotpuna oksidacija izvora ugljika
(fiziologija bakterija octene kiseline) i
acetogeneza

nepotpuna oksidacija izvora ugljika

- nepotpuna oksidacija: izvor C se ne oksidira do CO_2 i H_2O , relativno niske vrijednosti $Y_{X/S}$
- industrijska primjena: nepotpune oksidacije supstrata membranskim dehidrogenazama do produkta koji se nakuplja u podlozi (prehrambena industrija - hrana i pića, industrijske kemikalije)
- oksidacija supstrata povezana s respiratornim lancem: e^- pridobiveni oksidacijom supstrata prenose se do terminalne oksidaze tj. kisika kao konačnog akceptora i tako se pridobiva energija
- citosolne NAD(P)-zavisne dehidrogenaze ne sudjeluju u oksidativnom pridobivanju energije

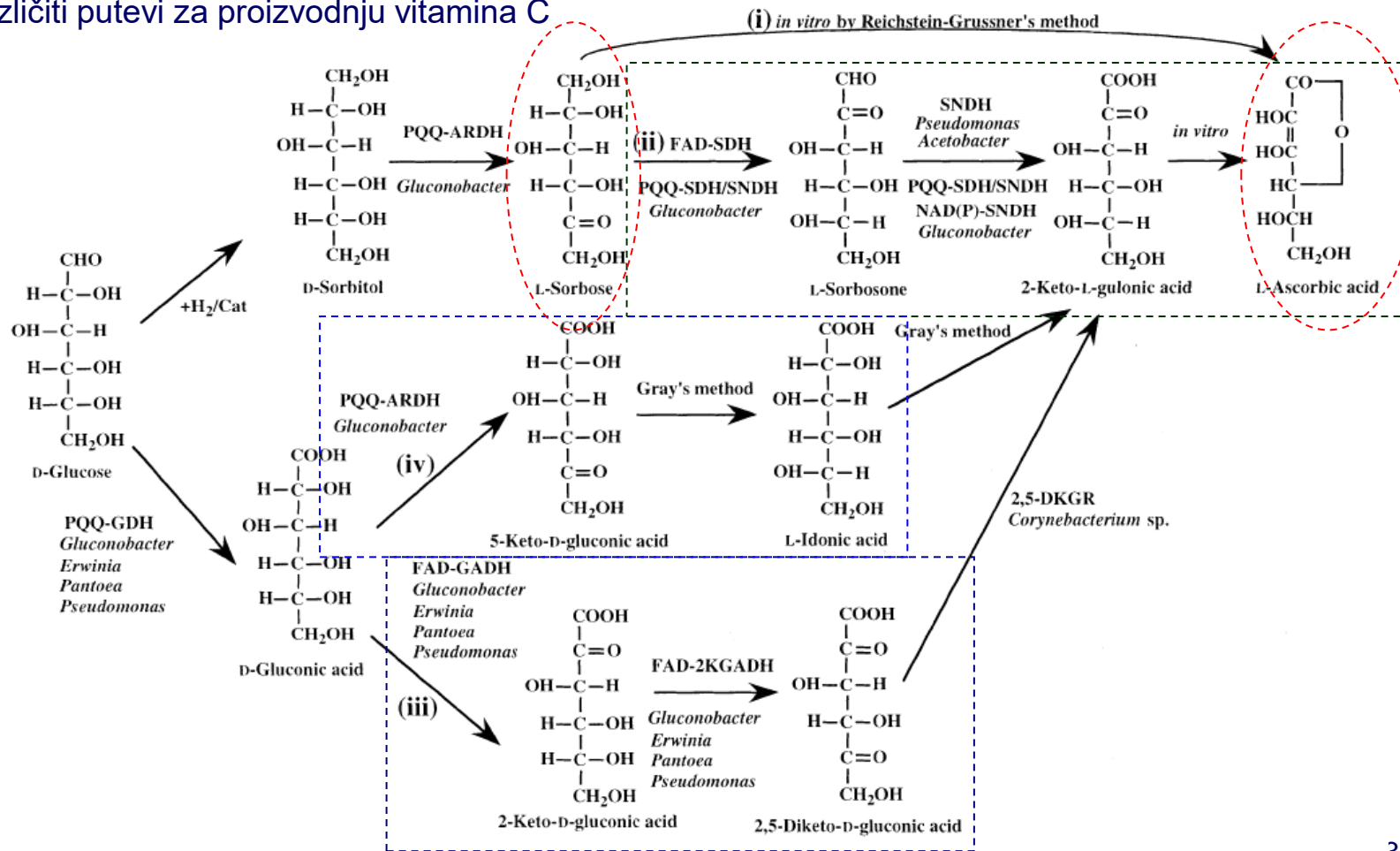
PQQ-zavisne dehidrogenaze	flavoprotein dehidrogenaze
octena kiselina	2-keto-D-glukonat (2KGA)
L-sorboza	2,5-diketo-D-glukonat
D-glukonat	5-keto-D-fruktoza

(PQQ, eng. pyrroloquinoline quinone - kinonski koenzim)

nepotpuna oksidacija izvora ugljika

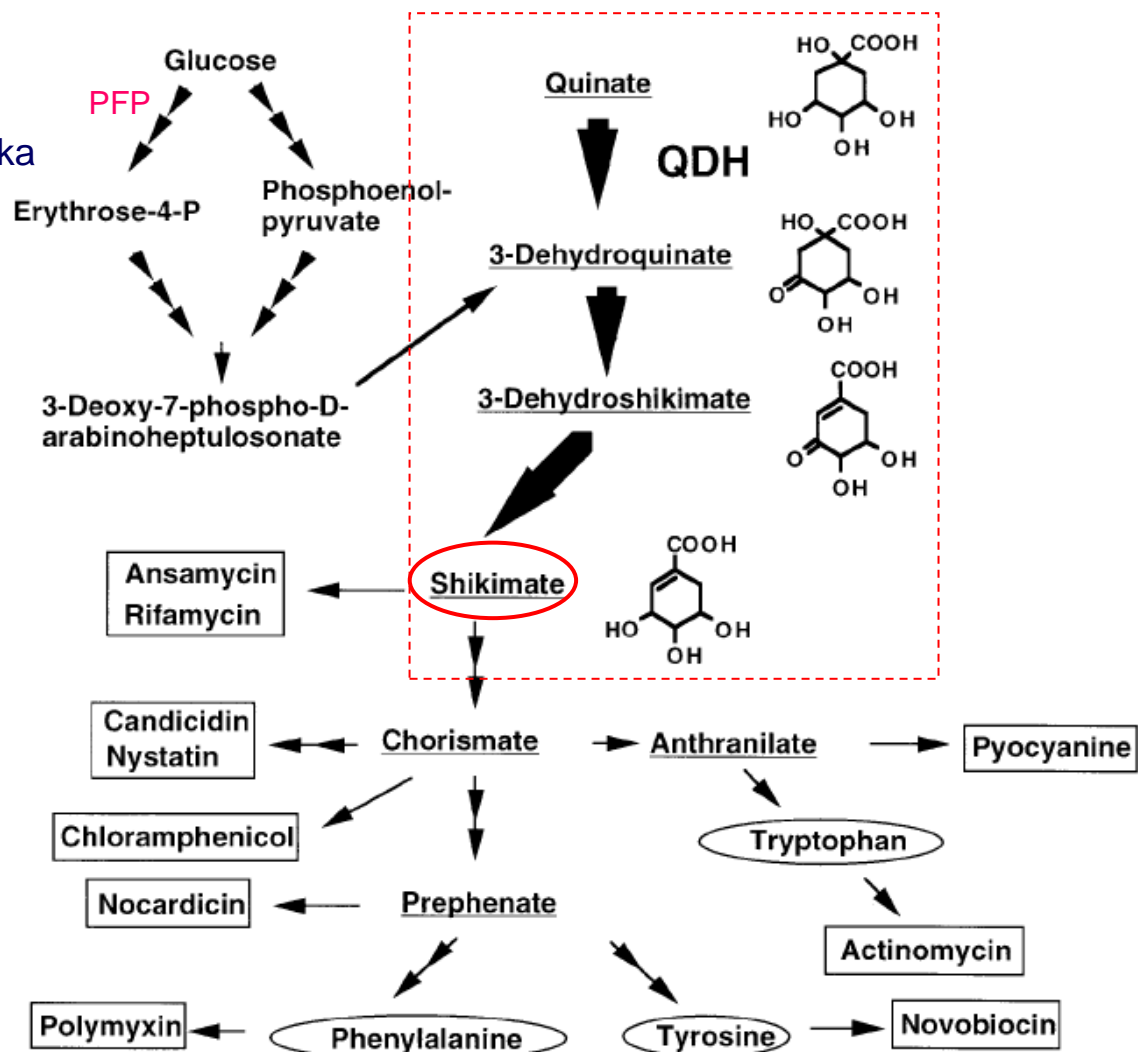
ARDH	D-arabitol dehidrogenaza
SDH	L-sorboza dehidrogenaza
SNDH	L-sorbose dehidrogenaza
2KGADH	2-keto-D-glukonat dehidrogenaza

· različiti putevi za proizvodnju vitamina C



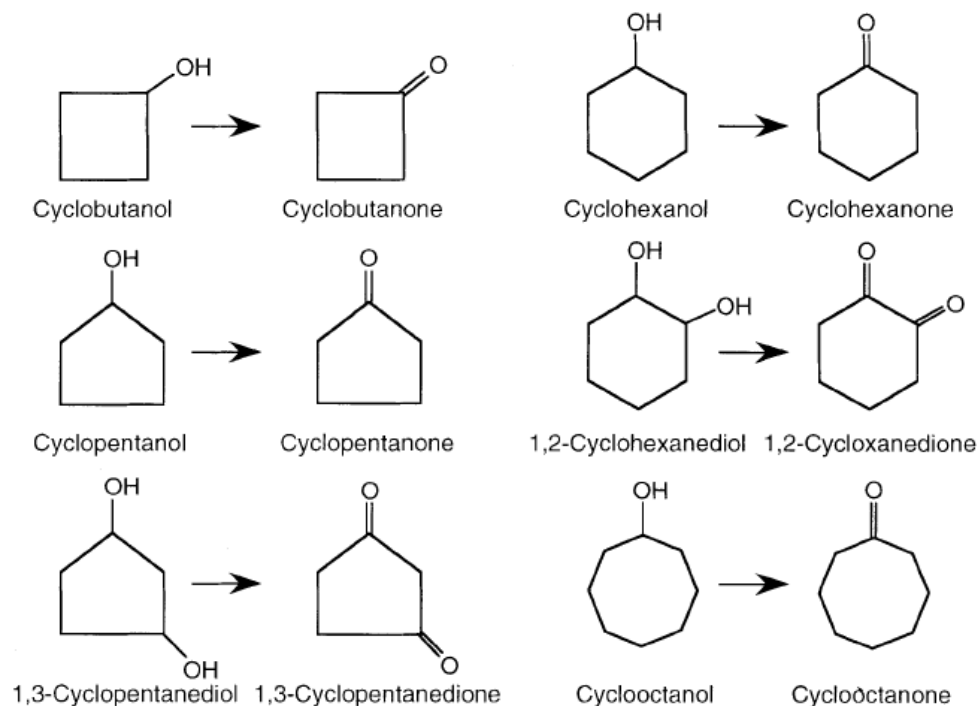
nepotpuna oksidacija izvora ugljika

- shikimatni put - proizvodnja antibiotika
(bakterije octene kiseline i dr.)



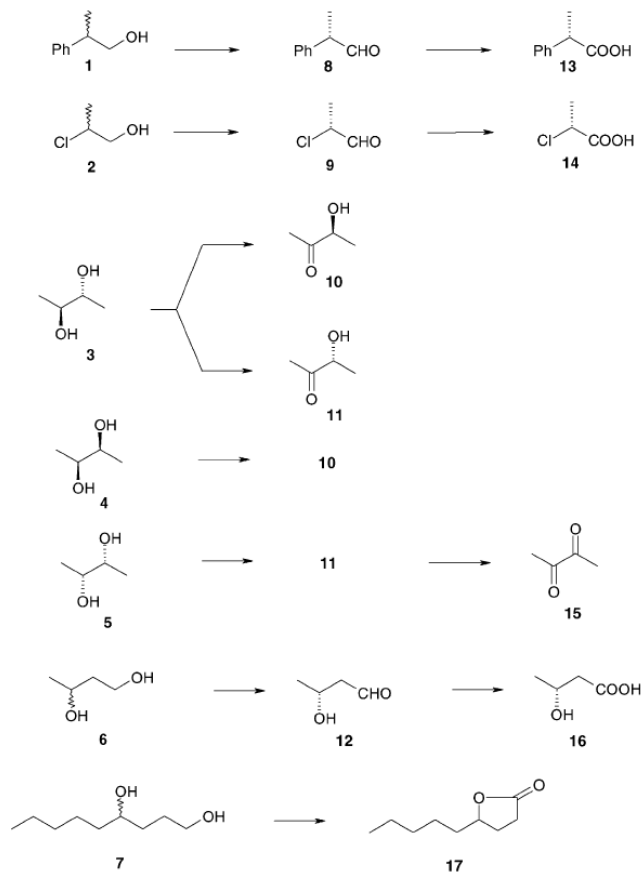
biotransformacija (nepotpuna oksidacija) s pomočju bakterija octene kiseline

- enantioselektivna oksidacija **cikličkih alkohola** (oksidacija potencialno toksičnih spojeva u periplazmatskom prostoru), bicikličkih alkohola, *rac*-primarnih alkohola i alifatskih sekundarnih alkohola do odgovarajućih ketona (prirodni spojevi npr. feromoni) i karboksilnih kiselina membranskom ADH



biotransformacija (nepotpuna oksidacija) s pomoću bakterija octene kiseline

- enantioselektivna oksidacija cikličkih alkohola (oksidacija potencijalno toksičnih spojeva u periplazmatskom prostoru), bicikličkih alkohola, *rac*-primarnih alkohola i alifatskih sekundarnih alkohola do odgovarajućih ketona (prirodni spojevi npr. feromoni) i karboksilnih kiselina membranskom ADH



bakterije octene kiseline

- porodica *Acetobacteraceae* (*Alphaproteobacteria*) (nepotpuna sekvenca 16S rDNA)

rodovi *Acetobacter* (grupe *A. aceti* i *A. pasteurianus*)

Gluconobacter

Acidomonas

Gluconacetobacter (grupe *G. liquefaciens* i *G. xylinus*)

Asai

Kozakia

Swaminathania

Saccharibacter

Neoasaia

Granulibacter

- *Granulibacter bethesdensis* / metanol / pH 3.5 / octena kiselina

bakterije octene kiseline

- respiratorni metabolizam s karakterističnom nepotpunom oksidacijom supstrata (1)

Differential characteristics	<i>Gluconobacter</i>	<i>Gluconacetobacter</i>		<i>Asaia</i>		<i>Swaminathania</i>		<i>Neoasaia</i>		
Characteristic		<i>Acetobacter</i>		<i>Acidomonas</i>		<i>Kozakia</i>		<i>Saccharibacter</i>	<i>Granulibacter</i>	
Production of acetic acid	+	+	+	+	-	+	+	v (w/-)	+	v (w/-)
Oxidation of:										
Acetate to CO ₂ and H ₂ O	-	+	+	+	w	w	w	-	-	W
Lactate to CO ₂ and H ₂ O	-	+	+	v (-/w)	w	w	w	w	-	+
Growth in the presence of 0.35% acetic acid (pH 3.5)	+	+	+	+	-	+	+	-	+	Nd
Growth in the presence of 1% KNO ₃ ^a	-	-	-	+	-	-	+	Nd	-	Nd
Production of keto-D-gluconic acid from d-glucose:										
2,5-diketo-D-gluconic acid	v	-	v	-	-	-	nd	nd	nd	Nd
5-keto-D-gluconic acid	+	v	v	-	+	+	nd	+	+	Nd
2-keto-D-gluconic acid	+	v	v ^b	-	+	+	nd	+	+	Nd
Production of hydroxyacetone from glycerol	+	v	v	-	v	+	+	-	w	-
Growth on methanol as carbon source	-	v ^c	-	+	-	-	-	-	-	+
Production of water soluble brown pigment(s)	v	-	v	- ^a	-	-	+	-	-	Nd
Production of γ -pyrones from:										
D-glucose	v	-	v	nd	-	-	nd	nd	nd	Nd
D-fructose	+	-	-	nd	v (+/w)	v	nd	nd	nd	nd
Acid production from:										
L-arabinose	+	v	v	+	+	+	+	+	+	nd
D-arabinose	+	-	-	v	+	v	nd	-	w	nd

v - variable; w - weak

bakterije octene kiseline

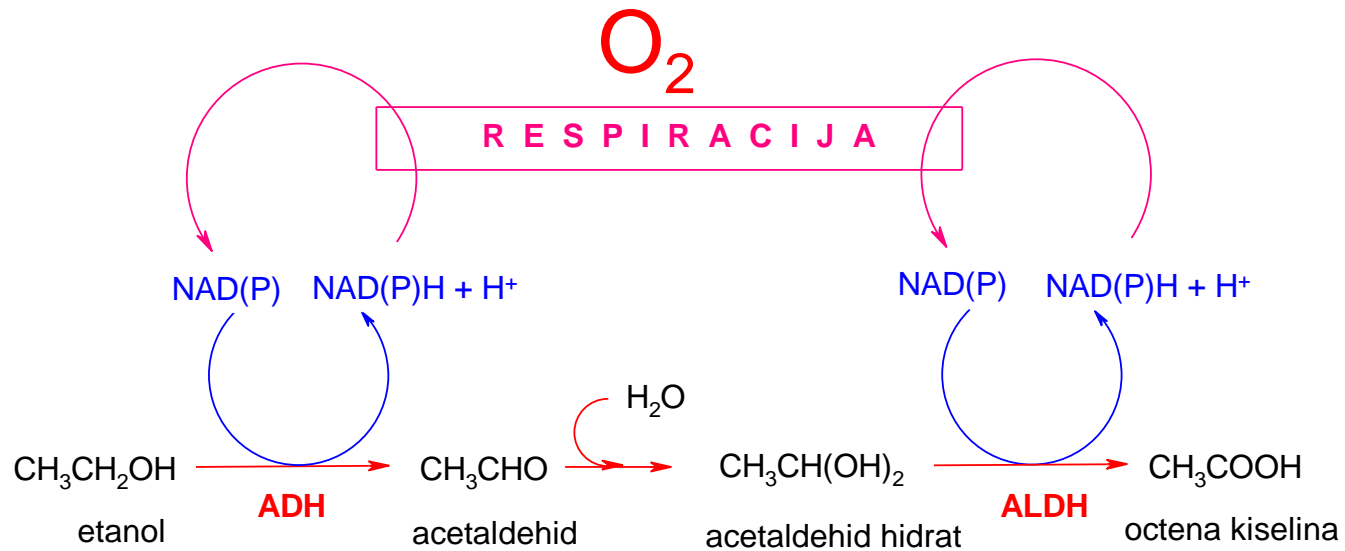
- respiratorni metabolizam s karakterističnom nepotpunom oksidacijom supstrata (2)

	<i>Gluconobacter</i>	<i>Gluconacetobacter</i>		<i>Asaia</i>		<i>Swaminathania</i>		<i>Neoasaia</i>		
		<i>Acetobacter</i>		<i>Acidomonas</i>		<i>Kozakia</i>		<i>Saccharibacter</i>		<i>Granulibacter</i>
D-xylose	+	v	v	+	+	+	v	+	+	-
L-rhamnose	-	-	-	-	v	-	-	-	w	nd
D-glucose	+	v	+	+	+	+	+	+	+	w
D-galactose	+	v	+	+	+	+	+	+	+	nd
D-mannose	+	v	v	+	+	+	+	+	+	nd
D-fructose	+	-	+	-	+	-	v	v	+	nd
L-sorbose	+	-	v	nd	+	-	nd	-	-	nd
Melibiose	+	-	-	v	+	+	nd	+	+	nd
Sucrose	+	-	-	-	+	v	nd	+	+	-
Raffinose	-	-	-	-	-	+	nd	-	+	nd
D-mannitol	+	-	v	-	v	-	-	+	w	-
D-sorbitol	+	-	-	-	v	-	+	-	+	-
Dulcitol	-	-	-	-	v	-	v ^g	-	w	-
Glycerol	+	-	+	+	+	+	+	-	+	v (w/-)
Ethanol	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Production of cellulose	-	-	v	-	-	-	nd	-	nd	nd
Production of levan-like mucous substance(s) from sucrose	-	v	-	-	-	+	nd	-	-	nd
Growth in the presence of 30% D-glucose	-	v ^d	v	+	+	-	nd	+	+	nd
Motility and flagellation	Non-motile (mostly) or polar ^e	Non-motile or peritrichous	Non-motile or peritrichous	Non-motile or polar	Non-motile or peritrichous	Non-motile	Peritrichous	Non-motile	Non-motile	Non-motile
Major ubiquinone	Q10	Q9	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	nd
G+C content (mol%) ^f	54-64	52-64	56-67	62-63	59-61	56-57	57-60	52-53	63.1	59

v - variable; w - weak

bakterije octene kiseline

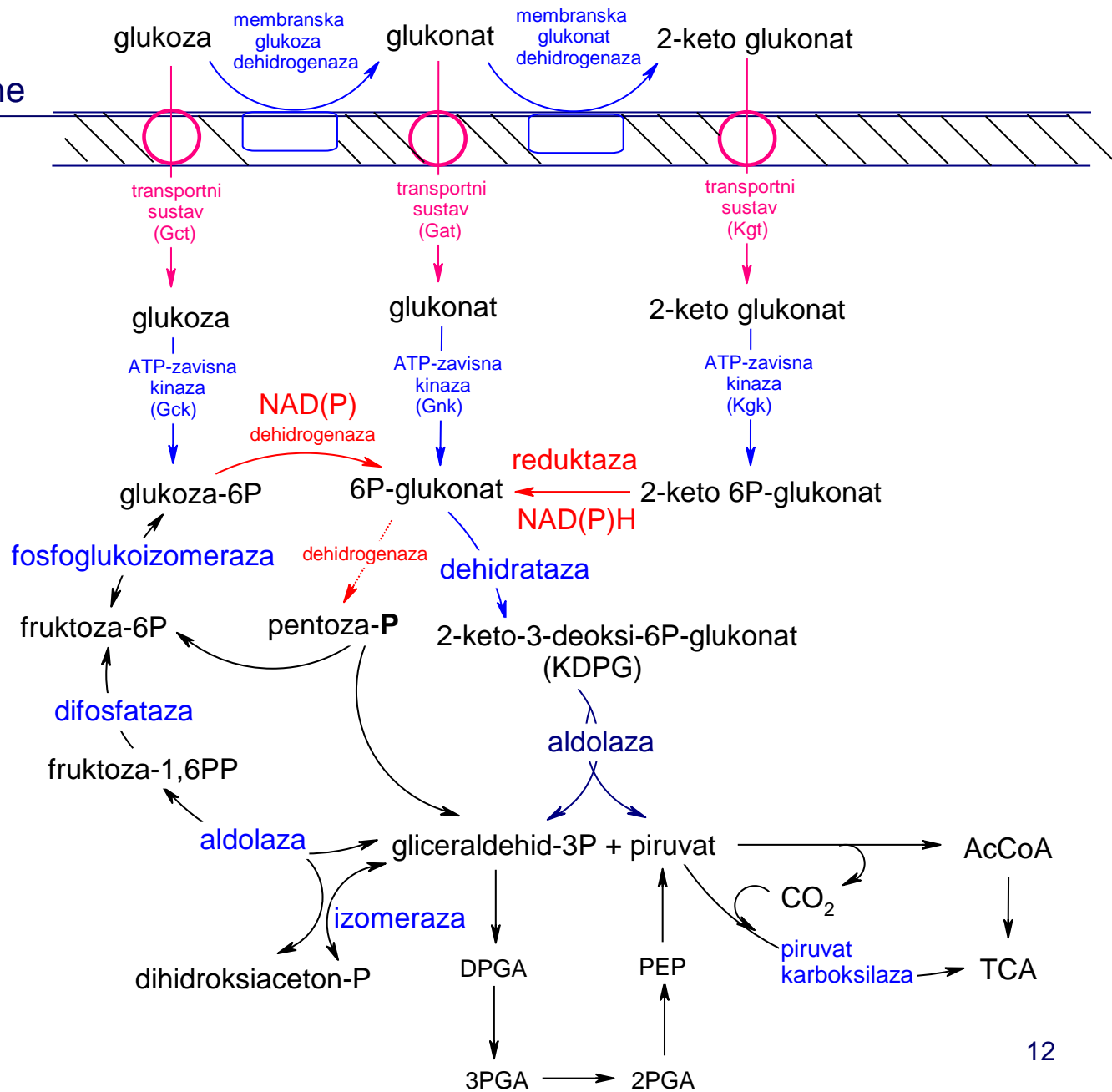
- respiratorni metabolizam s karakterističnom nepotpunom oksidacijom supstrata (3)
- oksidacija etanola do octene kiseline s pomoću bakterije *Acetobacter aceti*



bakterije octene kiseline

- kod proizvodnje octa ove bakterije koriste acetat kao jedini izvor ugljika, a etanol kao izvor energije
- acetat se transportira u stanicu gdje se fosforilira u energijom bogati acetyl-fosfat (enzim acetat kinaza), koji može acetylnu skupinu prenositi na acetyl-CoA (enzim fosfotransacetylaza)
- acetyl-CoA ulazi u TCA, koji ovdje služi isključivo za biosintezu aminokiselina i drugih makromolekula za izgradnju stanice
- ugljikohidrati se sintetiziraju glukoneogenezom

bakterije octene kiseline



- rast u podlogama s UH
- kod vrsta iz roda *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*)

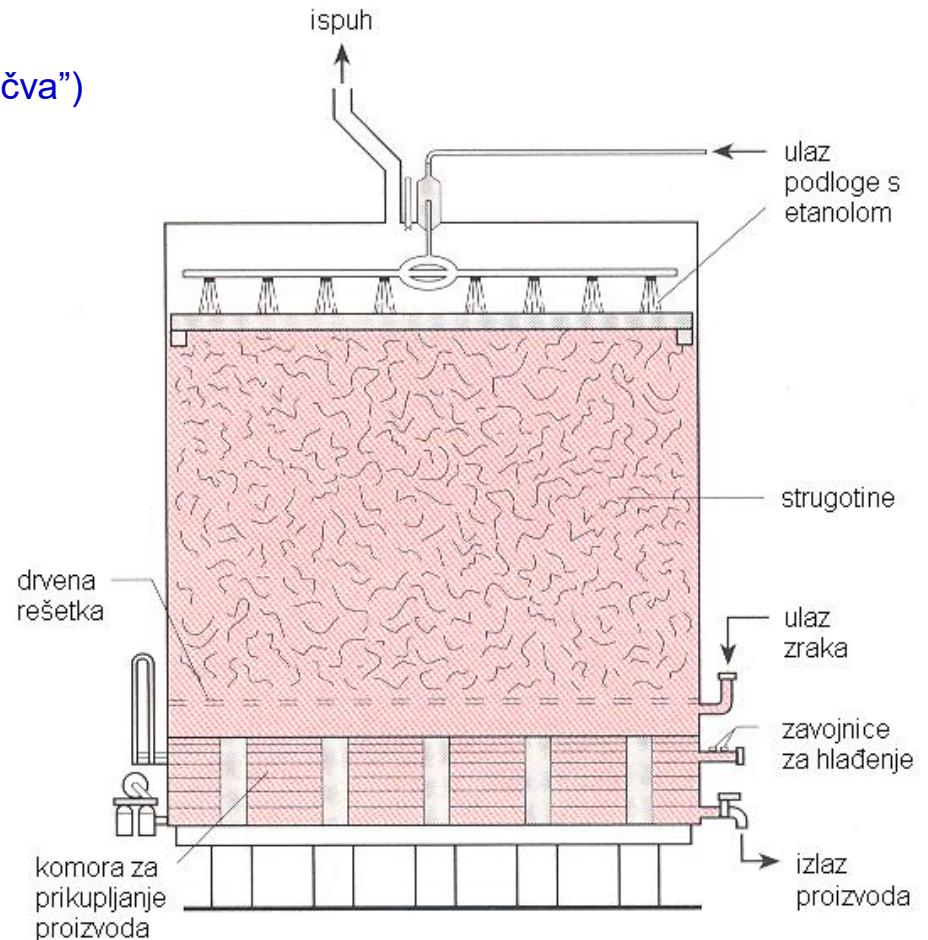
bakterije octene kiseline

- proizvodnja octa (vodena otopina octene kiseline) iz razrijeđenih otopina etanola (i octene kiseline) s pomoću bakterija octene kiseline

Orlean metoda (“otvorena bačva”)

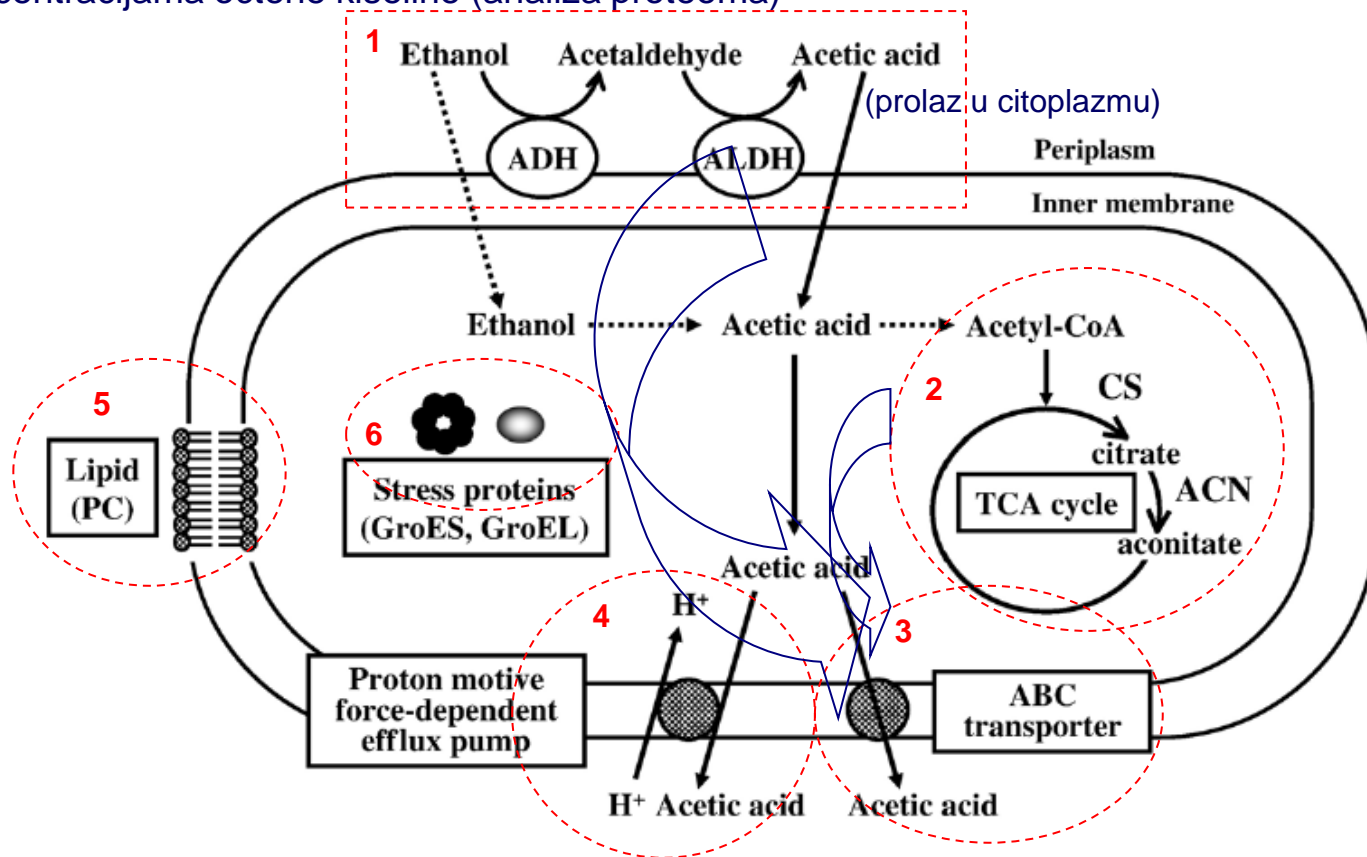
prokapni generator

Fringsov generator



bakterije octene kiseline

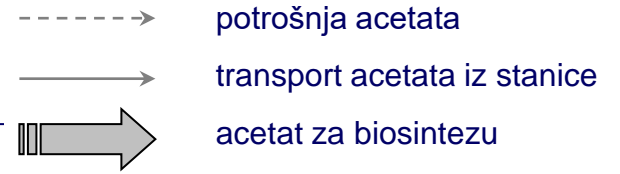
- hipoteza o rezistenciji bakterija iz rodova *Acetobacter* i *Gluconoacetobacter* prema relativno visokim koncentracijama octene kiseline (analiza proteoma)



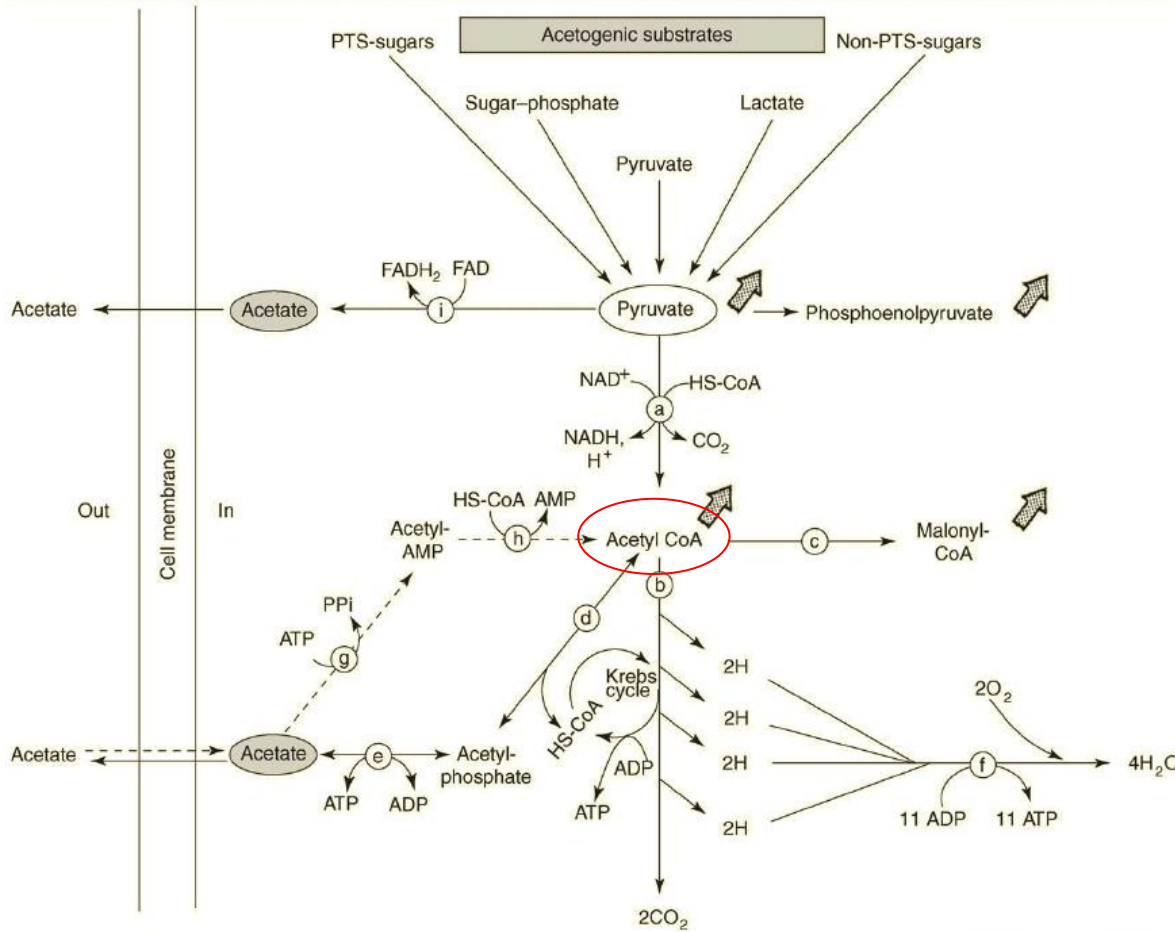
bakterije octene kiseline

- hipoteza o rezistenciji bakterija iz rodova *Acetobacter* i *Gluconoacetobacter* prema relativno visokim koncentracijama octene kiseline (analiza proteoma)
- mehanizmi rezistencije (> 130-140 g L⁻¹ octene kiseline)
 - ¹mehanizam oksidacije alkohola (membranske ADH i ALDH)
 - ²mehanizam asimilacije acetata (geni *aarA*, *aarC*, gen za akonitazu)
 - ³ABC transport (transport octene kiseline iz stanice)
 - ⁴ATP-nezavisan proton-antiport
 - ⁵specifična metil-transferaza koja katalizira reakciju fosfatidil-etanolamin → fosfatidil-kolin (PC)
 - ⁶GroES i GroEL “chaperon” (stres) proteini

bakterije octene kiseline i druge bakterije koje koriste acetat



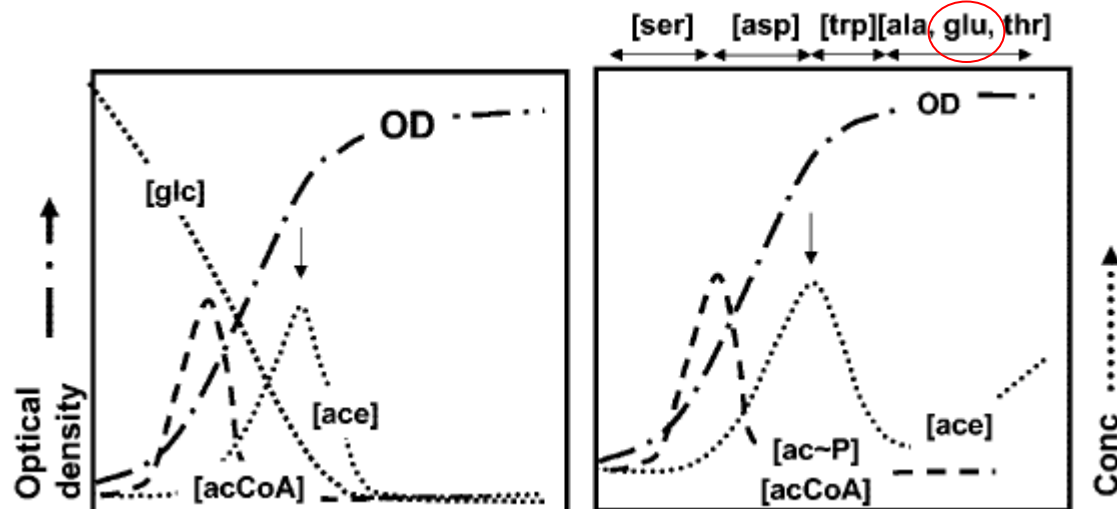
· acetogeni metabolizam kod *E. coli*



- a** piruvat dehidrogenaza
- b** citrat sintaza
- c** acetil-CoA karboksilaza
- d** PTA-, fosfotransacetilaza
- e** AK, acetat kinaza
- f** lanac za transport elektrona
- g i h** ACS, acetil-CoA sintetaza
- i** piruvat oksidaza

bakterije octene kiseline i druge bakterije koje koriste acetat

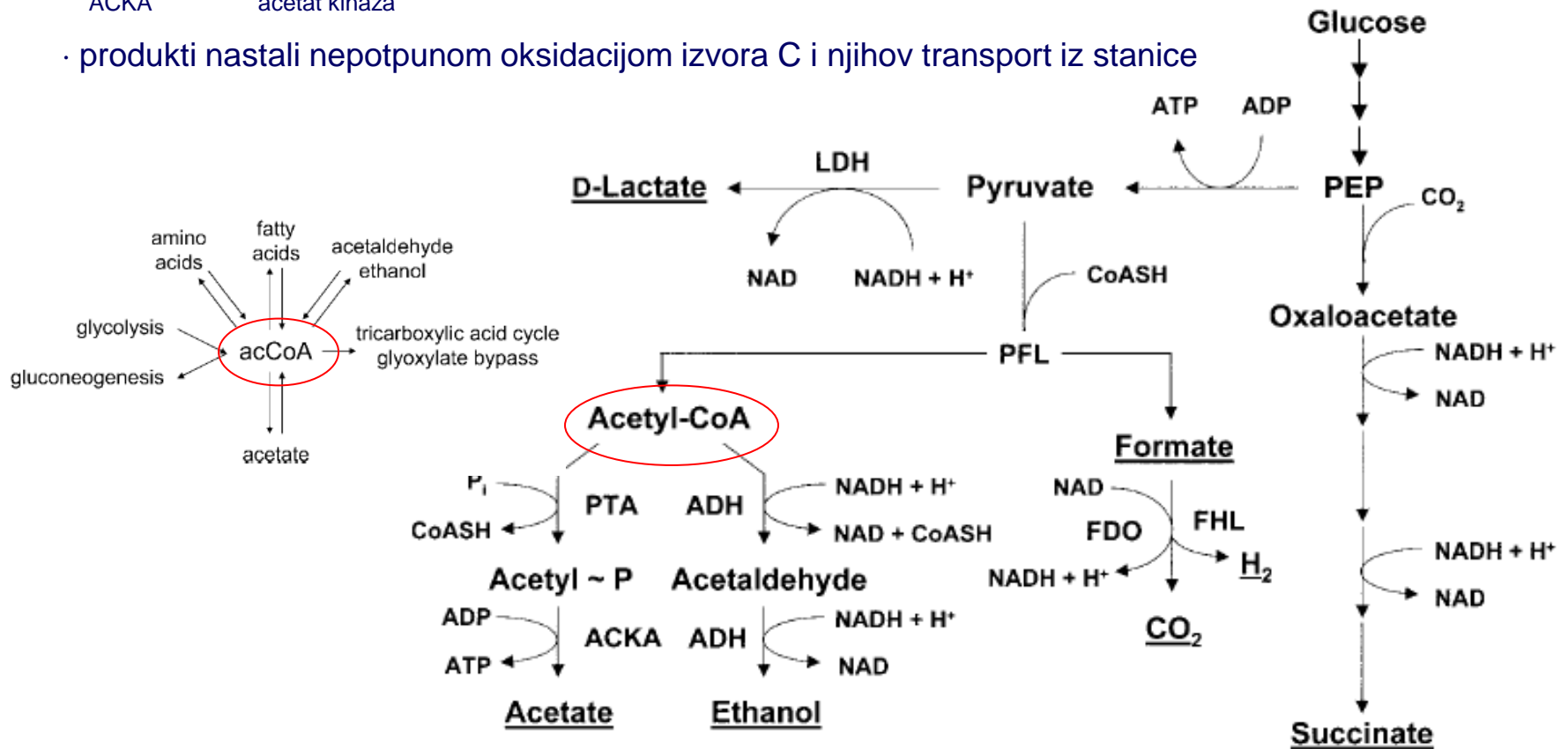
- stanica “ima problem” - transportira acetat
- acetat u stanici lako prolazi kroz stanične membrane i “remeti” gradijent protona
- acetatni proton snižava pH vrijednost u citoplazmi, a anion povećava osmotski tlak u stanici i utječe na biosintezu Met
- acetat je djelomično oksidiran spoj i kao takav predstavlja izvor C i energije
- “acetate switch”(↓): uklanjanje potencijalnog toksina koristeći ga kao izvor C i energije
neacetogena a.k.



bakterije octene kiseline i druge bakterije koje koriste acetat

LDH	laktat dehidrogenaza	ADH	alkohol dehidrogenaza
PFL	piruvat-formijat liaza	FDO	aerobna formijat dehidrogenaza
PTA	fosfotrans-acetilaza	FHL	formijat-hidrogen liaza
ACKA	acetat kinaza		

· produkti nastali nepotpunom oksidacijom izvora C i njihov transport iz stanice



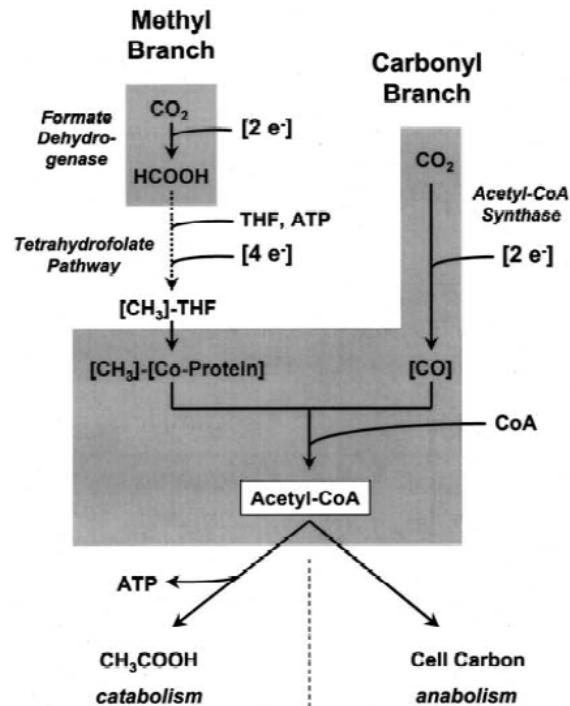
bakterije octene kiseline i druge bakterije koje koriste acetat

- acetyl-P djeluje kao globalni signal i utječe na različite procese u stanici
 - npr. asimilaciju dušika
 - osmoregulaciju
 - biogenezu flagela
 - organizaciju pilusa
 - biosintezu kapsule
 - formiranje i organiziranje biofilma
 - patogenost mikroorganizama

acetogeneza

acetogene bakterije

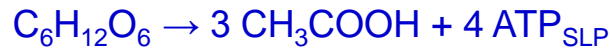
- neki su autotrofi (CO_2 i H_2), provode reduktivnu sintezu acetata iz CO_2 (Wood-Ljungdahl put)
- acetogeneza je jako važan dio kruženja ugljika u prirodi (10^{12} kg godišnje)
- acetyl-CoA put



- bilanca H_2 -zavisne acetogeneze: $4 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O}$

acetogene bakterije

- drugi supstrati: ugljikohidrati, alkoholi, dikarboksilne kiseline, aldehidi, i dr.
- homoacetogena konverzija glukoze



SLP eng. substrate-level phosphorylation

- vrlo raznolika grupa Gram-pozitivnih bakterija s niskim udjelom G + C (npr. *Clostridium* sp., *Acetobacterium* sp., *Sporomusa* sp., *Moorella* sp., *Ruminococcus* sp., *Eubacterium* sp., itd.)
- alternativni akceptori elektrona

fumarat → sukcinat

nitrat → nitrit

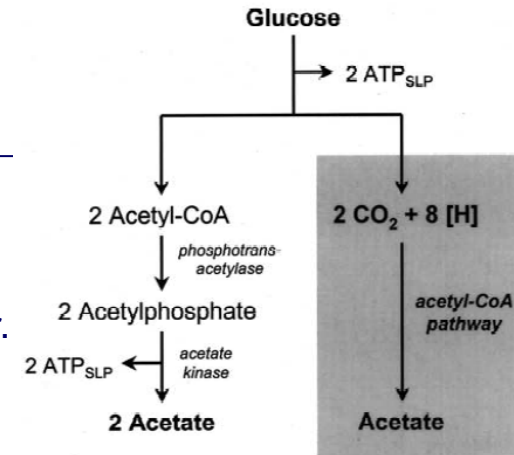
nitrit → amonijak

tiosulfat → sulfid

piruvat → laktat

acetaldehid → etanol

proton → vodik (g)



literatura (1)

1. O. Adachi, D. Moonmangmee, H. Toyama, M. Yamada, E. Shinagawa, K. Matsushita (2003) New developments in oxidative fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 643-653.
2. I. Cleenwerck, P. De Vos (2008) Polyphastic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology, *International Journal of Food Microbiology* **125**, 2-14.
3. M. Cocaign-Bousquet, C. Garrigues, P. Loubiere, N.D. Lindley (1996) Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*, *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 253-267.
4. H.L. Drake, K. Küsel, C. Matthies (2002) Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens, *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 203-213.
5. M. El-Mansi, A.J. Cozzone, J. Shiloach, B.J. Eikmanns (2006) Control of carbon flux through enzymes of central and intermediary metabolism during growth of *Escherichia coli* on acetate, *Current Opinion in Microbiology* **9**, 173-179.
6. Grupa autora: *Acetic Acid*, H. Ebner, H. Follmann (eds.) Blackie Academic & Professional, Glasgow , UK (1995).
7. Grupa autora: *The Genera of Lactic Acid Bacteria* , U: *The Lactic Acid Bacteria*, B.J.B. Wood, W.H. Holzapfel (eds.) Blackie Academic & Professional, Glasgow , UK (1995).
8. S. Nakano, M. Fukaya (2008) Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: Molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology* **125**, 54-59.
9. A.R. Neves, W.A. Pool, J. Kok, O.P. Kuipers, H. Santos (2005) Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* – The input from *in vivo* NMR, *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 531-554.
10. W.M. de Vos (1996) Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 223-242.

kvasac *Saccharomyces cerevisiae*
regulacija transporta i metabolizma ugljikohidrata

transport ugljikohidrata i regulacija metabolizma ugljikohidrata (1)

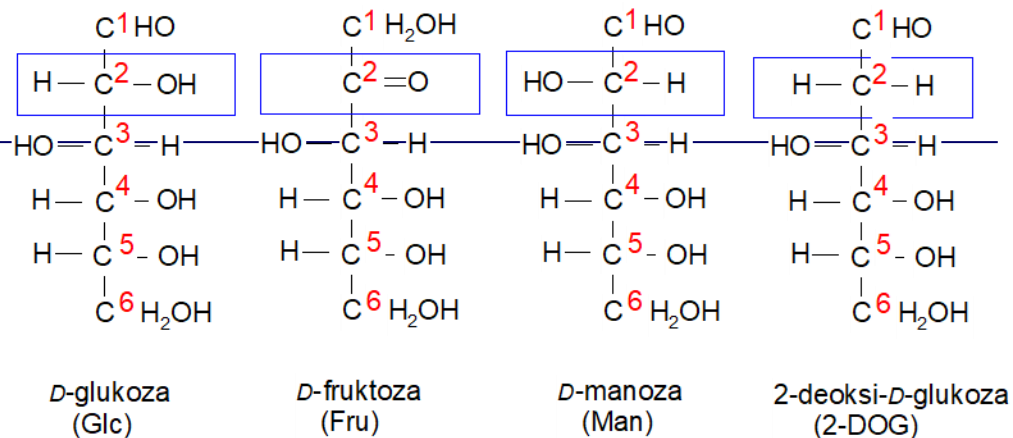
- da bi neki mikroorganizam mogao koristiti određeni ugljikohidrat mora imati funkcionalni sustav za transport tog ugljikohidrata u stanicu i odgovarajuće enzime kojima će transportirani supstrat pregraditi do glc-6-P ili nekog drugog međuspoja glikolize
- kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ima transportne sustave za ove ugljikohidrate:
 1. glukozu, fruktozu, manozu
 2. galaktozu
 3. maltozu
 4. α -metil glukozide

transport ugljikohidrata i regulacija metabolizma ugljikohidrata (2)

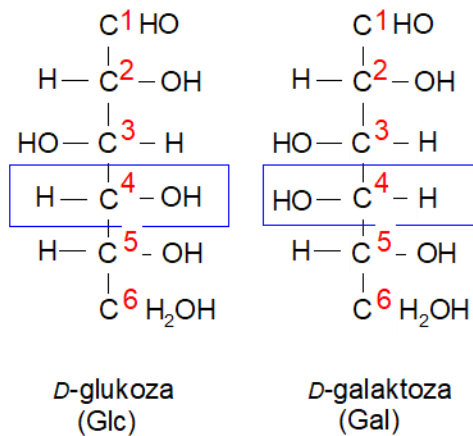
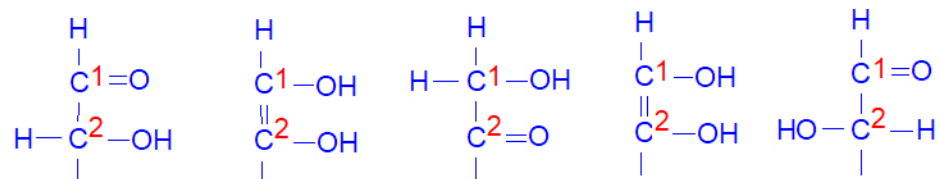
· kvasac *Saccharomyces cerevisiae* može koristiti ove izvore ugljika:

samo aerobno	aerobno i anaerobno
etanol	glukoza, fruktoza, manoza
glicerol	galaktoza
acetat	maltoza
piruvat	saharoza
laktat	maltotrioza, trehaloza, melibioza, rafinoza, dekstrini

podsjetimo se ...



keto-enolna tautomerija



neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (1)

1. Pasteur-ov efekt

- kvasac anaerobno brzo fermentira UH u etanol i CO₂ pri čemu nastaje relativno malo biomase

$$Y_{X/S} = 0.02 \text{ g g}^{-1}; Y_{P/S} = 0.45 \text{ g g}^{-1}$$

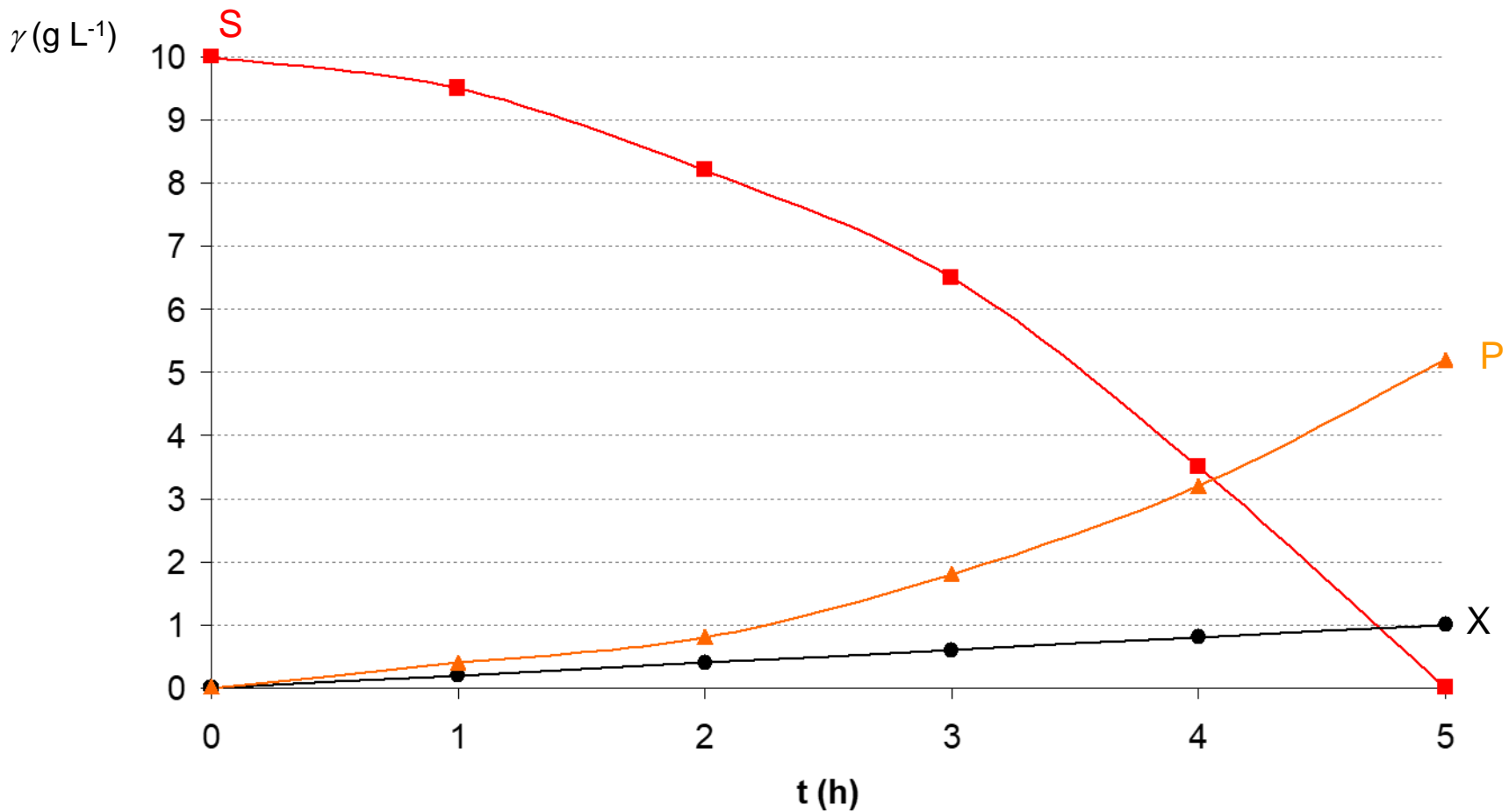
- u aerobnim uvjetima UH se potpuno oksidiraju do CO₂ i H₂O, potrošnja UH je sporija, ne nastaje etanol, a sintetizira se biomasa

$$Y_{X/S} = 0.5 \text{ g g}^{-1}; Y_{P/S} = 0 \text{ g g}^{-1}$$

- netočna interpretacija ovog efekta: kisik inhibira fermentaciju UH tako što usporava transport supstrata u stanicu kvasca

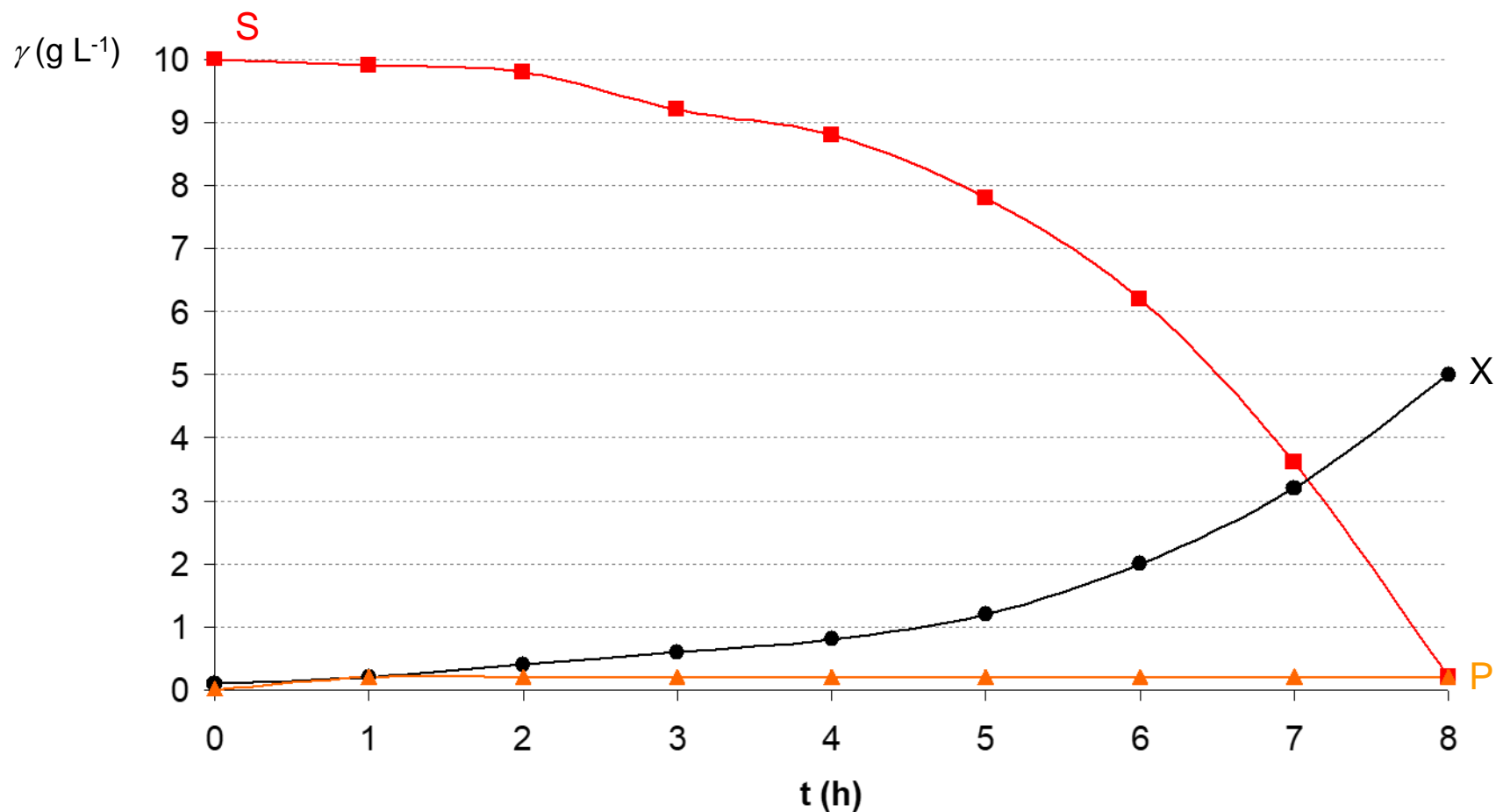
neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (2) - Pasteurov efekt (1)

· anaeroban uzgoj



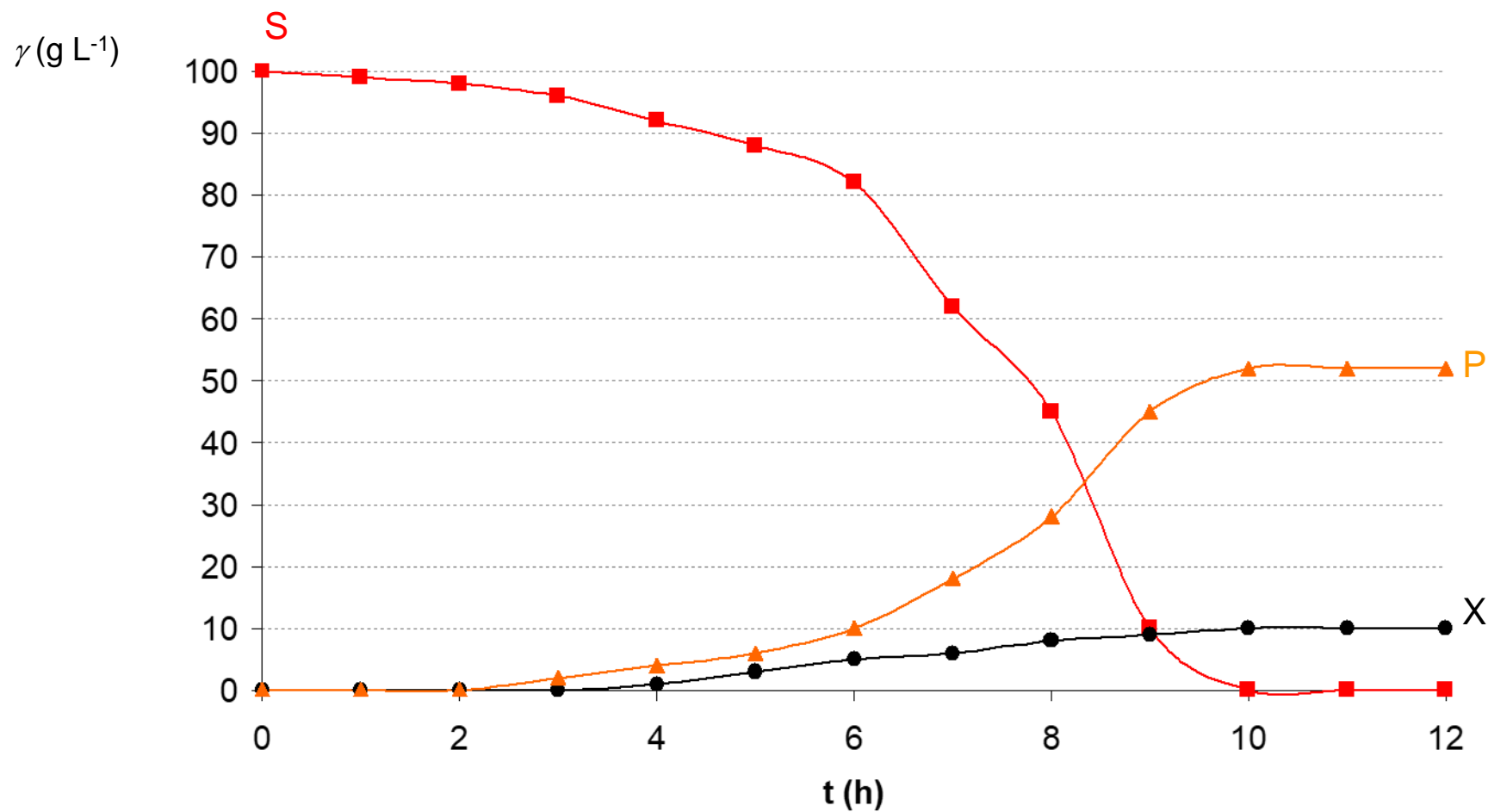
neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (3) - Pasteurov efekt (2)

· aeroban uzgoj



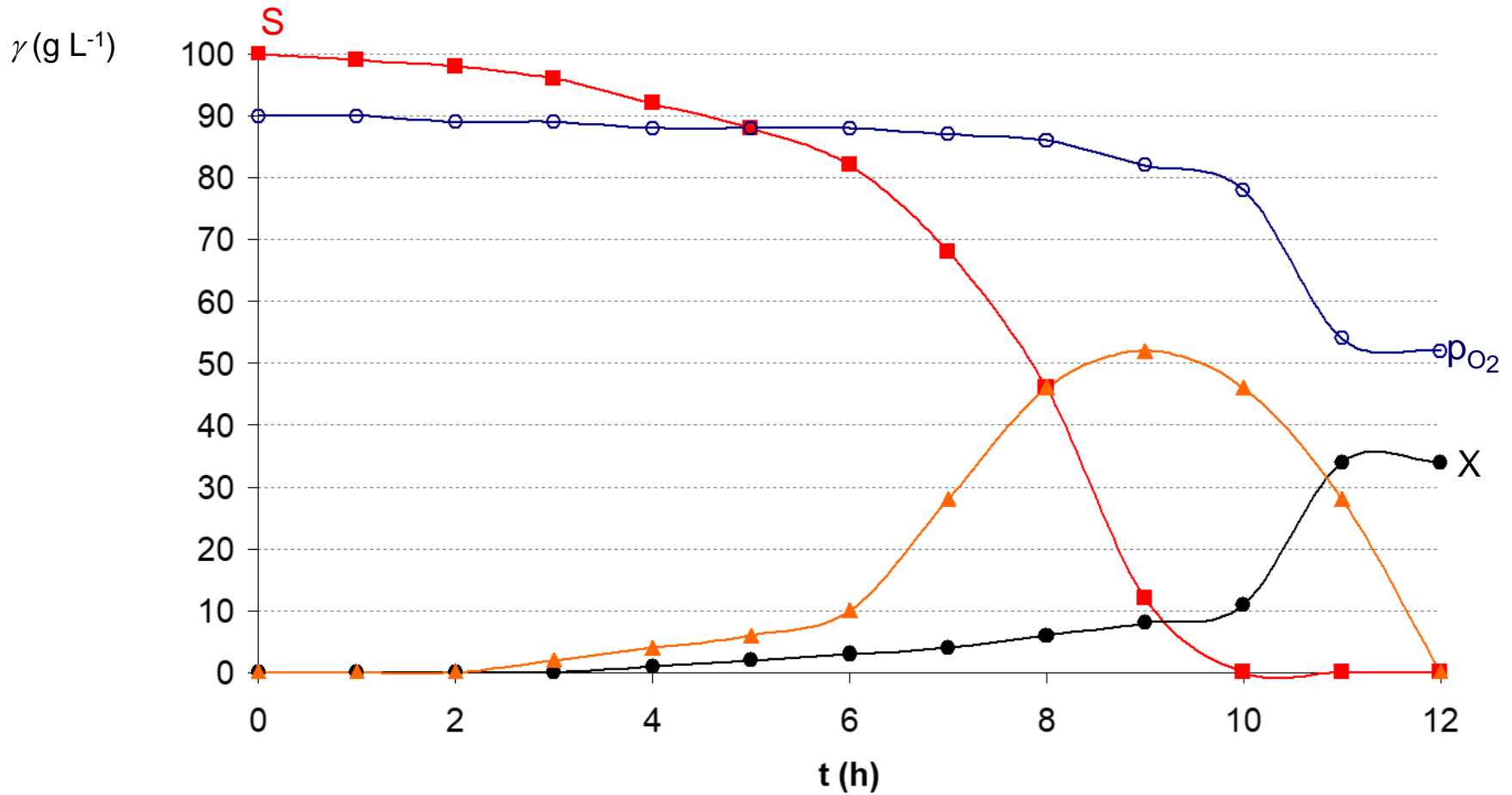
neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (4) – Crabtree-jev efekt (1)

· anaeroban uzgoj

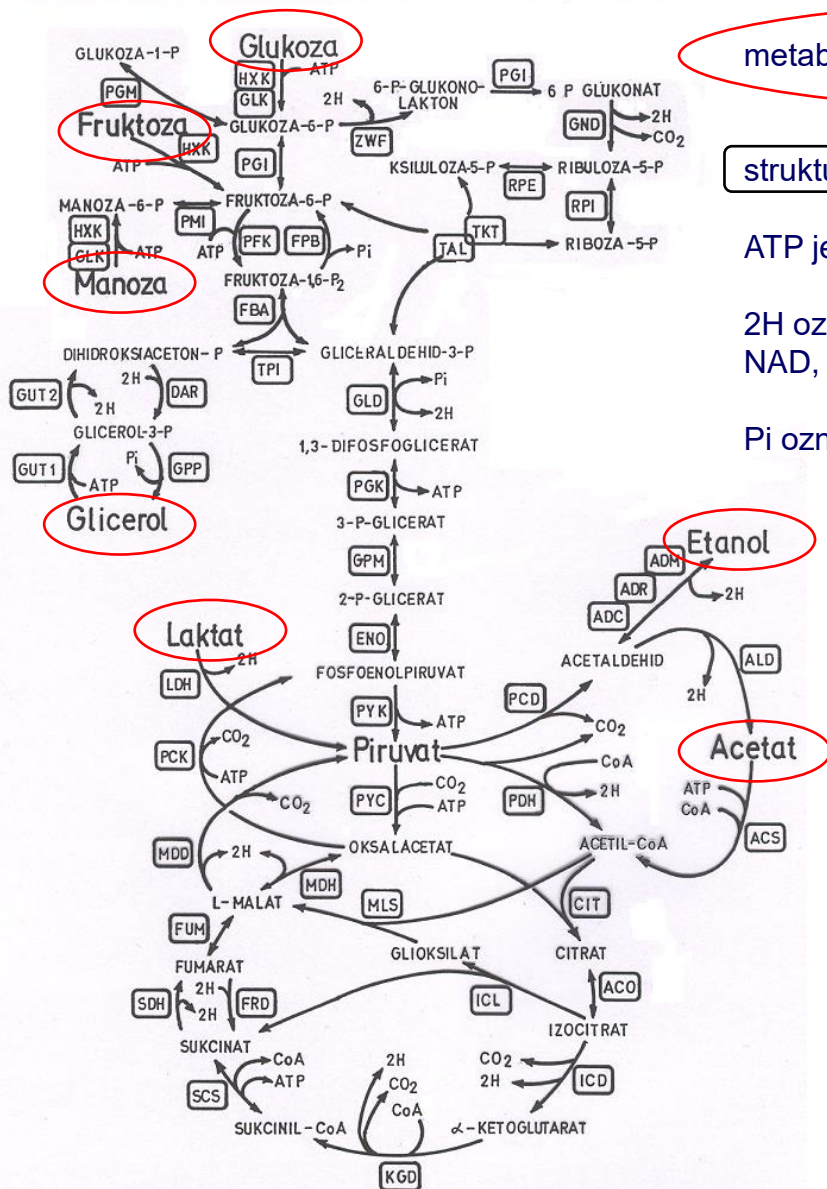


neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (5) – Crabtree-jev efekt (2)

· aeroban uzgoj



neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (6)



metabolizam ugljikohidrata koje stanica može koristiti kao izvore C

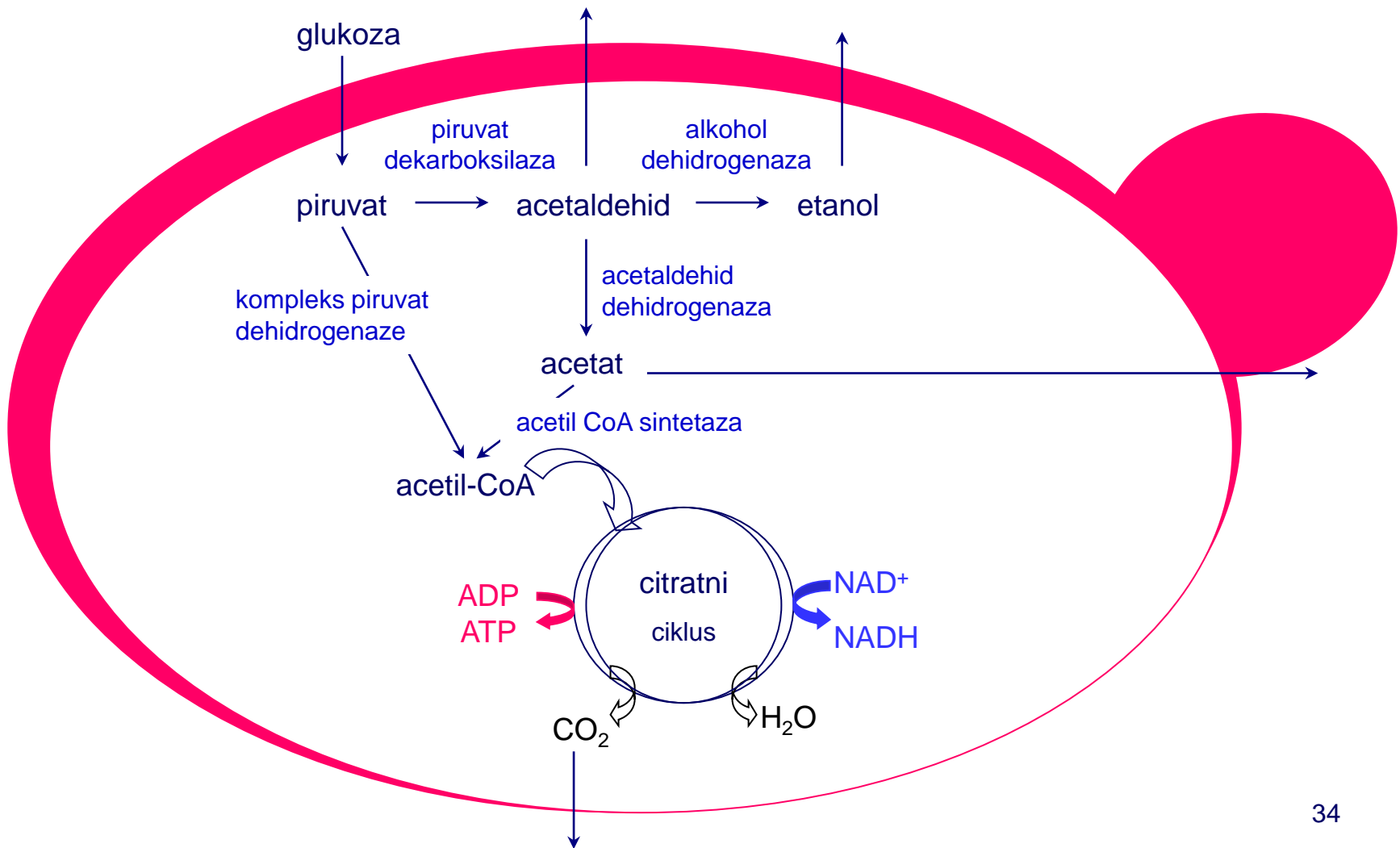
strukturni geni enzima koji kataliziraju određene reakcije

ATP je istaknut, ali ADP nije

2H označava reakcije koje kataliziraju dehidrogenaze, obuhvaća NAD, NADP, FAD ili FMN

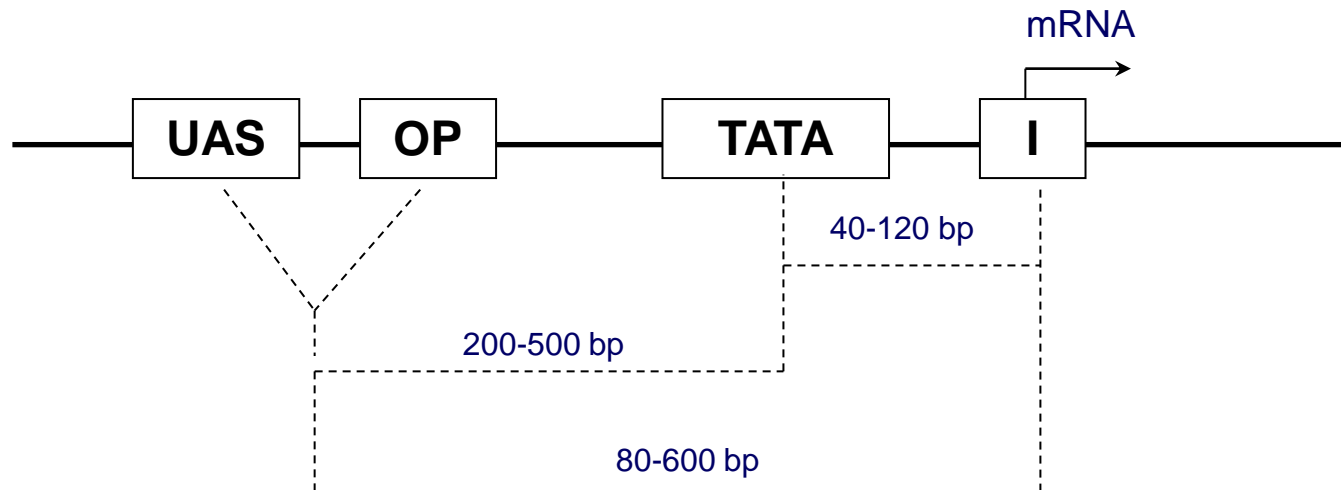
Pi označava anorganski fosfat

neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (7) – katabolizam piruvata



neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (8) – indukcija i represija sinteze enzima (1)

- regulacija glikolize i glukoneogeneze u stanicama kvasca *S. cerevisiae*
- raspored elemenata promotora transkripcije kod kvasca *S. cerevisiae*



- regulacija glikolize i glukoneogeneze u stanicama kvasca *S. cerevisiae*
- dio DNA odgovoran za inicijaciju i regulaciju transkripcije kod stanice kvasca je PROMOTOR
- promotor se sastoji od nekoliko regulacijskih elemenata:

UAS element (eng. upstream activating sequence)

određuje regulacijska svojstva promotora;

mjesto na DNA na koje se vežu proteini - regulatori transkripcije;

sadrže ga geni koji su pod kontrolom zajedničkog kontrolnog mehanizma;

ne aktivira se transkripcija ako se nalazi iza mjesta inicijacije;

djeluje u oba smjera na velikoj udaljenosti od mjesta inicijacije sinteze mRNA;

djeluje na varirajućoj udaljenosti “uzvodno” od mjesta inicijacije sinteze mRNA.

· regulacija glikolize i glukoneogeneze u stanicama kvasca *S. cerevisiae*

· promotor se sastoji od nekoliko regulacijskih elemenata:

TATA element (TATA “box”)

redosljed nukleotida TATAAA;

40 do 120 bp “uzvodno” od mjesta inicijacije transkripcije;

mjesto vezanja generalnog transkripcijskog faktora tzv. TATA-proteina.

INICIJATOR ELEMENT (I)

element smješten blizu mjesta gdje započinje transkripcija;

nema utjecaja na količinu sintetizirane mRNA;

određuje gdje će započeti transkripcija.

· neki promotori sadrže i regulacijski element odgovoran za represiju transkripcije, a naziva se operator ili OP ili se još naziva URS (eng. upstream reupression seuquence).

neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (11) - represija glukozom (katabolička represija) (1)

- prisutnost glukoze u okolini stanice izaziva represiju sinteze brojnih enzima i transportnih proteina koji sudjeluju u transportu i metabolizmu drugih izvora ugljika
- ovo je univerzalna pojava kod svih živih bića

- kod Gram-negativnih bakterija je dokazano da cAMP djeluje kao signalna molekula za represiju
- zbog toga je ova pojava nazvana KATABOLIČKA REPRESIJA
- kataboličku represiju ne izaziva glukoza sama, već jedan od (među)proizvoda katabolizma glukoze

- kod eukariota, pa i kod kvasaca, mehanizam represije je znatno složeniji i nedovoljno razjašnjen (cAMP je važan kod **kataboličke inaktivacije**)

neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (12) - represija glukozom (katabolička represija) (2)

- represija glukozom djeluje na sintezu tri osnovne skupine proteina:
 1. enzimi i transportni proteini odgovorni za metabolizam drugih ugljikohidrata
 2. enzimi glukoneogeneze i gliksilatnog ciklusa
 3. enzimi Krebsovog ciklusa i respiracijskog lanca
- drugi UH izazivaju represiju enzima glukoneogeneze
- hijerarhija preferencije izvora ugljika:

glukoza → drugi ugljikohidrati → glukogeni supstrati (etanol, acetat, piruvat, laktat)

neke regulacijske pojave kod kvasca *S. cerevisiae* (13) - represija glukozom (katabolička represija) (3)

· represija glukozom proučava se na mutantima kojih ima dvije vrste

1. ne-represibilni mutanti – usporedo troše glukozu i druge izvore ugljika
2. ne-derepresibilni mutanti – metabolizam nekih izvora ugljika im je pod stalnom represijom, pa na njima ne mogu rasti iako imaju funkcionalne strukturne gene

glukoza, fruktoza, manoza

glukoza, fruktoza i manozna (1)

- transport ova tri UH odvija se OLAKŠANOM DIFUZIJOM i to pomoću **istog** transmembranskog transportera

- kinetička istraživanja upućuju na postojanje dva transportna sustava

1. sustav I

sustav niskog afiniteta ($K_m = 20$ mM),
neovisan o kinazama,
konstitutivan,
dominira pri visokim koncentracijama glc;

2. sustav II

sustav visokog afiniteta ($K_m = 1-2$ mM),
ovisan o kinazama,
pod glukoznom represijom i inaktivacijom,
dominira kod niskih koncentracija glc;

glukoza, fruktoza i manozna (2)

- za transport sustavom II potreban je proizvod *SNF3* (kodira membranski protein) i/ili porodica *HXT2* gena (komplementira defekt u transportu glukoze)
- nakon toga se ova tri UH fosforiliraju **kinazama**, koje su zajedničke za ova tri supstrata
- heksoze se fosforiliraju na C6 pomoću jednog od tri fosforilacijska enzima
- enzimi koji mogu katalizirati fosforilaciju heksoza su:
 - heksokinaza A (PI) (gen *HXK1*) (konstitutivna; fosforilira glc, fru, man)
 - heksokinaza B (PII) (gen *HXK2*) (rast na glc; fosforilira glc, fru, man)
 - glukokinaza (gen *GLK*) (rast na etanolu; fosforilira glc, man)
- glc-6-P i fru-6-P su međuspojevi glikolize, man-6-P izomerizira u fru-6-P
- heksokinaza B (PII) je bifunkcionalni protein: osim katalitičke ima i regulatornu funkciju kod glukozne represije tj. *hvk2* mutanti su ne-represibilni mutanti; heksokinaza B djeluje i kao **protein kinaza**, na čemu se temelji njena regulacijska funkcija

maltoza

maltoza (1)

- maltoza (glukozil- α -1-4-glukoza) nepromijenjena se transportira u stanicu pomoću specifičnog transmembranskog prijenosnika
- pomoću unutarstaničnog enzima **maltaze** (α -glukozidaze ili α -D-glukozid glukohidrolaze, EC 3.2.1.20) se hidrolizira dajući dvije molekule glukoze
- ovako nastala glukoza se fosforilira i razgrađuje se u glikolizu
- metabolizam maltoze zahtijeva prisutnost barem jednog od pet nepovezanih *MAL* lokusa: *MAL1*, *MAL2*, *MAL3*, *MAL4* i *MAL6*
- *MAL6* lokus (najbolje proučen) sastoji se iz tri gena:
 - MAL61* kodira transportni protein za maltozu
 - MAL62* kodira **maltazu**
 - MAL63* je pozitivni regulacijski protein potreban za indukciju transkripcije

maltoza (2)

- kinetička istraživanja upućuju na postojanje dva transportna sustava:
 - sustav I sustav niskog afiniteta ($K_m = 70 \text{ mM}$)
 - sustav II sustav visokog afiniteta ($K_m = 4 \text{ mM}$)
- metabolizam maltoze kod kvasca *S. cerevisiae* pod kontrolom je regulacijskih mehanizama:
 - indukcije,
 - kataboličke represije i
 - kataboličke inaktivacije.
- da bi došlo do indukcije sinteze maltaze i proteina za transport maltoze, neophodna je prisutnost maltoze u okolini stanice
- dodatkom glukoze u podlogu s maltozom, dolazi do gotovo potpune inaktivacije **oba** transportna sustava za maltozu i to u roku od 90 min, pri čemu se aktivnost maltaze kroz ovo vrijeme ne mijenja

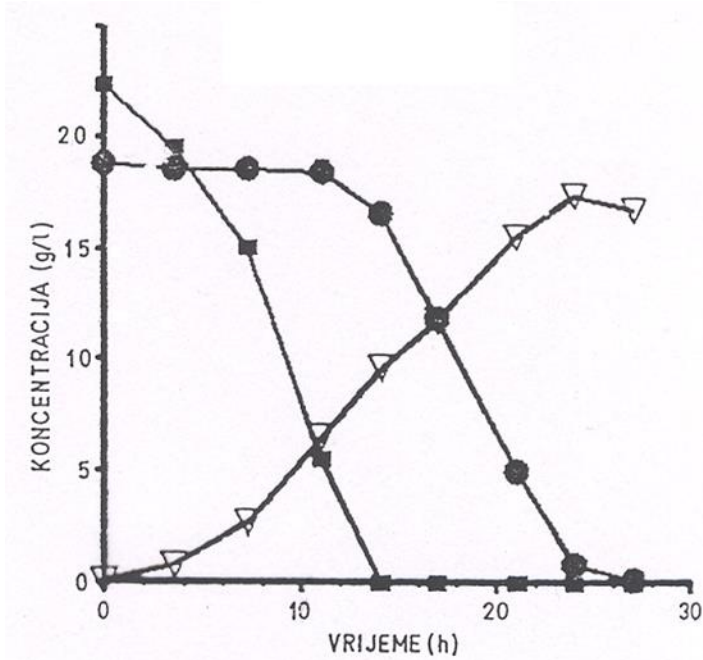
maltoza (3)

- glukoza reprimira sintezu maltaze i transportnog sustava za maltozu te trenutno inaktivira transportni sustav za maltozu
- protein *MAL63*
 - pripada skupini proteina s “cinkovim prstom”, kao i Gal4
 - za razliku od Gal4 ovaj je protein dimer i kada nije vezan na DNA
 - djeluje kao aktivator transkripcije gena za maltoza permeazu i maltazu (geni *MAL61* i *MAL62*)
 - vjerojatno aktivira i transkripciju vlastitog gena (*MAL63*)
 - još nije potvrđena pretpostavka po kojoj se maltoza veže na protein Mal63 i tako formira kompleks, koji aktivira transkripciju *MAL* gena

maltoza (4)

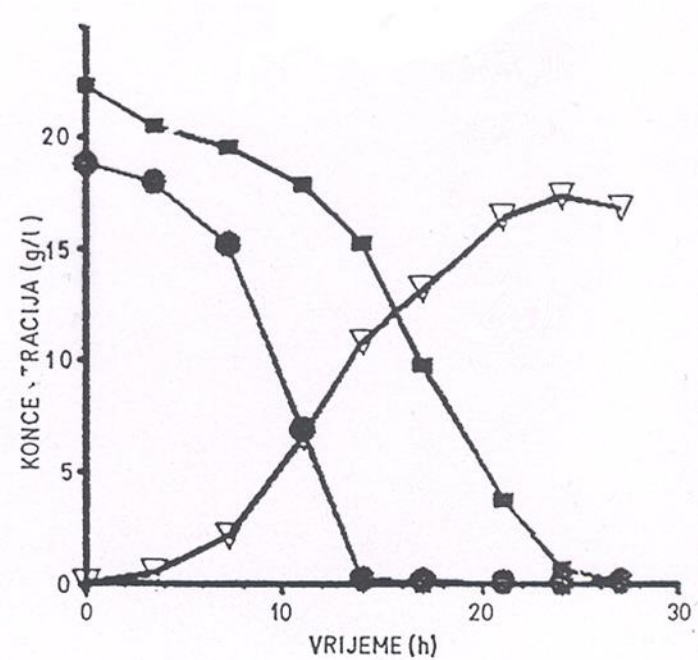
- utrošak glukoze (■) i maltoze (●) i proizvodnja etanola (▽) tijekom fermentacije

A - soj 1190



A

B - mutant 1620 (ne-represibilni)



B

galaktoza

galaktoza (1)

- za metabolizam galaktoze kod kvasca *S. cerevisiae* neophodni su:

transportni protein za galaktozu (*GAL2*, strukturni gen; kromosom XII, centromera),
funkcionalni enzimi Leloirovog biokemijskog puta:

galaktokinaza (*GAL1*, strukturni gen)

transferaza (*GAL7*, strukturni gen)

epimeraza (*GAL10*, strukturni gen)



kromosom II

fosfoglukomutaza (*GAL5 = PGM1*, strukturni gen)

- centromera - GAL7 - GAL10 - GAL1 -

- metabolizam galaktoze pod kontrolom je regulacijskih mehanizama

indukcije,

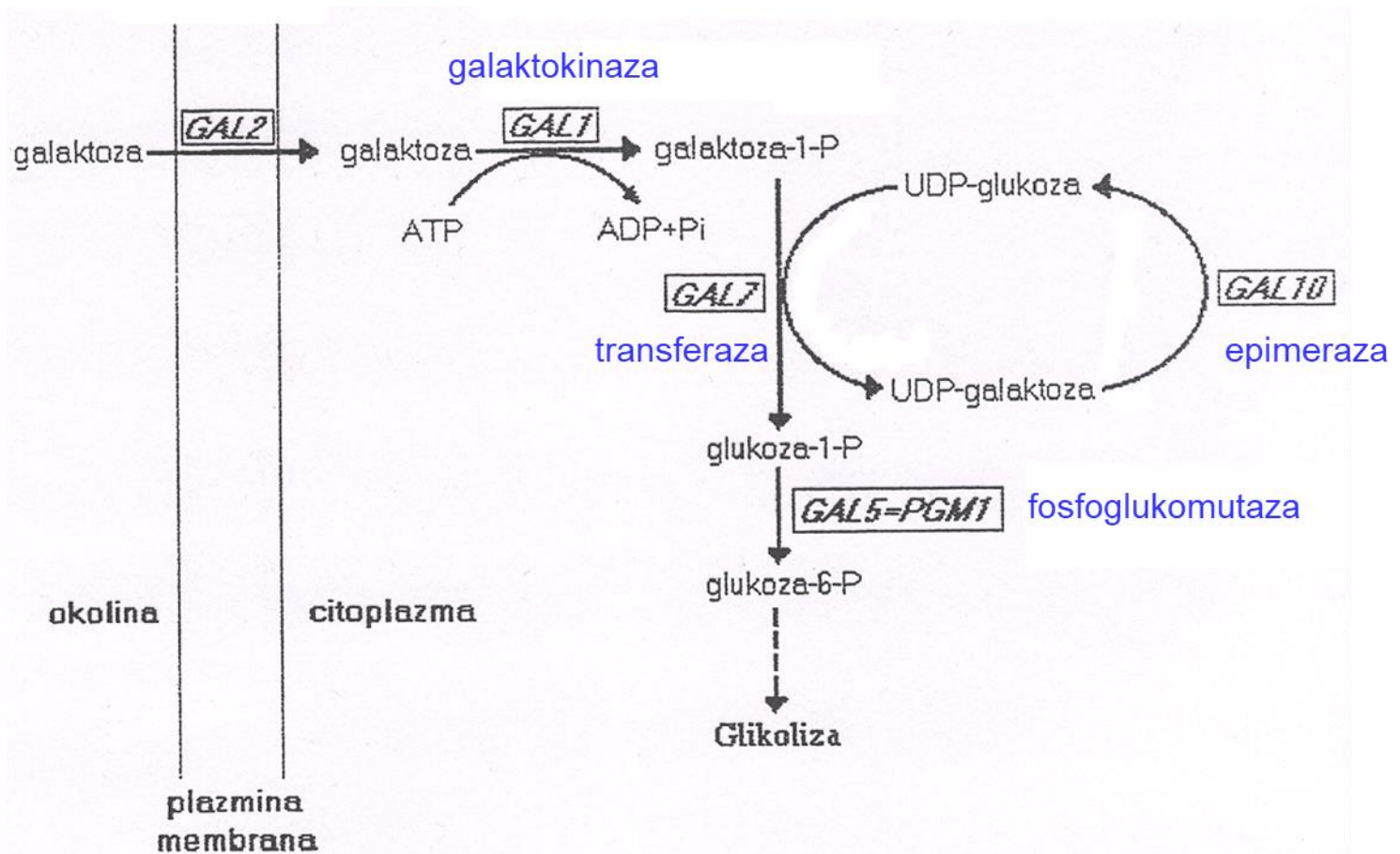
kataboličke represije i

kataboličke inaktivacije

- transportni protein za galaktozu je reguliran indukcijom, represijom i inaktivacijom, a svi geni za enzime metabolizma galaktoze regulirani su indukcijom i represijom

galaktoza (2)

- Leloir-ov put (transport i metabolizam galaktoze i strukturni **GENI** enzima)



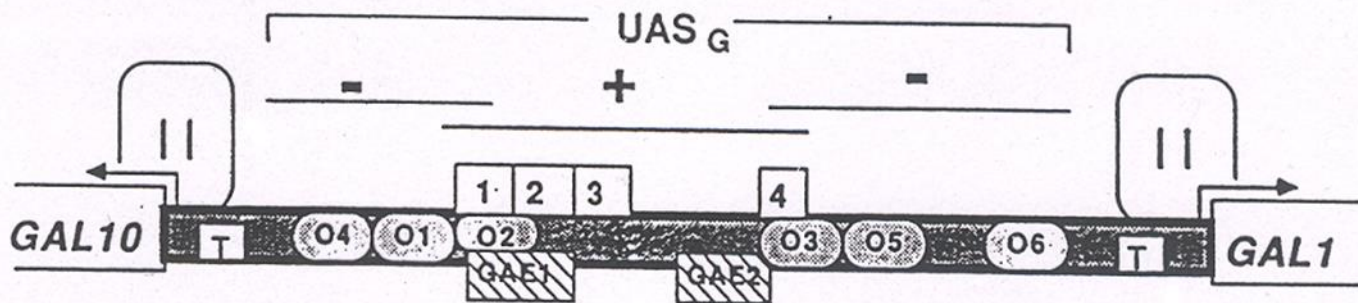
galaktoza (3)

·specifični geni odgovorni za regulaciju metabolizma galaktoze:

GAL3 potreban za brzu indukciju (aktivator transkripcije *GAL* gena)

GAL4 kodira pozitivan regulacijski protein (aktivator transkripcije *GAL* gena)

GAL80 kodira negativan regulacijski protein (represor transkripcije strukturnih *GAL* gena)



Divergentni promotor *GAL1-10* (prema Finley i sur., 1990).

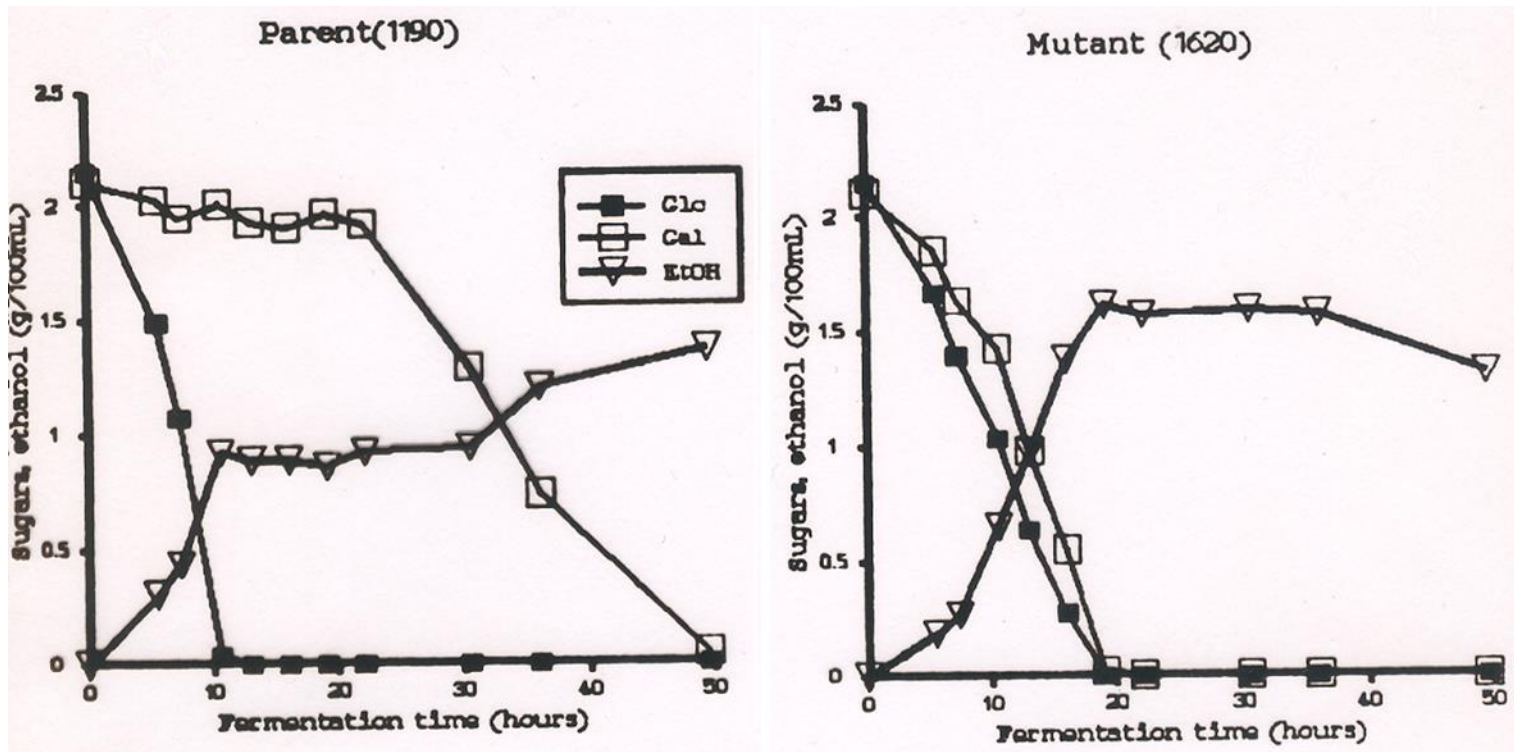
Segment UAS_G veličine je 365 bp. Sa + i - označena su područja pozitivne i negativne kontrole transkripcije.

Četverokutima su označeni aktivirajući elementi GAE_1 i GAE_2 .

TATA elementi (T), kao i mjesta vezanja GAL4 proteina (1 do 4). Ovalne površine (O_1 do O_6) označavaju lokaciju negativnih kontrolnih elemenata - operatora $GALO_7$ do $GALO_6$ a II označava kompleks polimeraze II koji transkribira strukturne gene *GAL1* i *GAL10*.

galaktoza (5)

- fermentacija podloge sa 2% Glc i 2% Gal s pomoću divljeg tipa ("parent" soja 1190) i mutanta 1620



galaktoza (6)

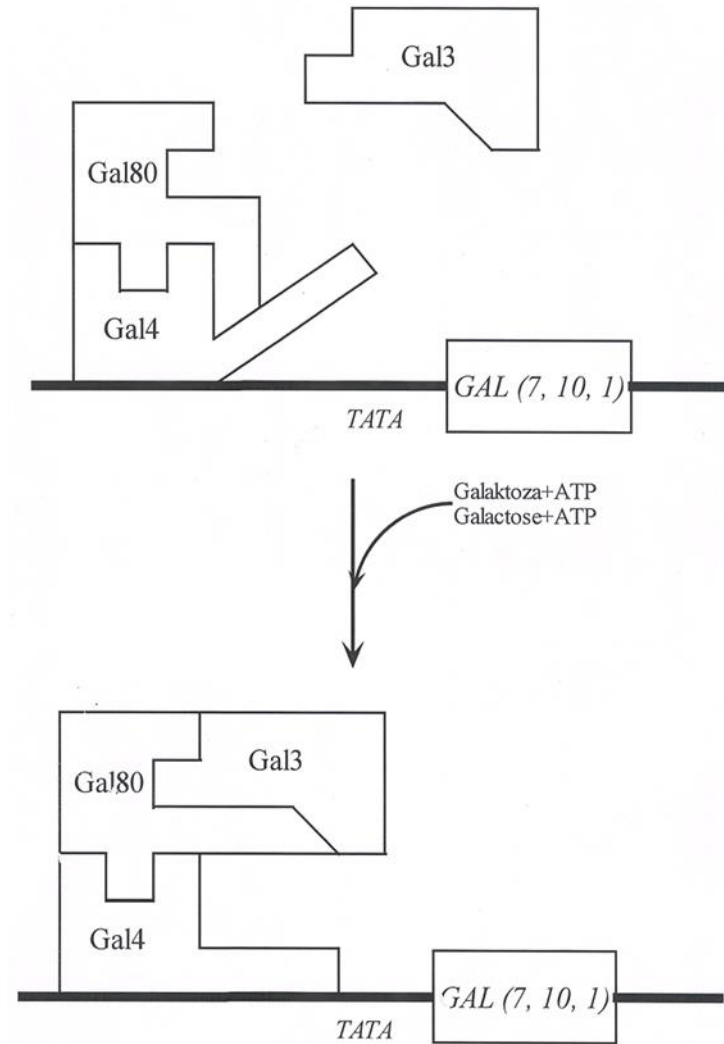
- indukcija metabolizma galaktoze
 - fragmentacijom *GAL4* gena identificirani su dijelovi Gal4 proteina potrebni za transport ovog proteina u jezgru, vezanje za DNA, aktivaciju transkripcije te za interakciju s negativnim regulacijskim proteinom Gal80
 - aktivnost Gal4 proteina i ekspresija *GAL* gena strogo je regulirana u prisutnosti galaktoze i glukoze
 - galaktoza inducira *GAL* gene, dok glukoza izaziva jaku represiju transkripcije *GAL* gena, čak i u prisutnosti galaktoze
 - u *in vitro* pokusima utvrđeno je da protein Gal4 u odsutnosti DNA postoji kao monomer, a kad je DNA prisutna, veže se na nju (UAS, eng. *upstream activating sequence*) (vidi slijedeći *slide*) kao dimer
 - NMR analizom utvrđena je fina struktura ovog dimera: prvih 65 aminokiselina (N-kraj) svakog od dva monomera formiraju tzv. “cinkov prst” koji je karakterističan za brojne proteine koji djeluju kao aktivatori transkripcije

galaktoza (7)

- indukcija metabolizma galaktoze
 - dodatkom galaktoze stanice kvasca prevladavaju blokadu transkripcije na GAL promotoru
 - za indukciju je potreban protein Gal3 ili njemu homologni protein Gal1 (galaktokinaza)
 - *in vitro* pokusima utvrđeno je da u prisutnosti galaktoze i ATP dolazi do vezanja proteina Gal3 (ili Gal1) na protein Gal80 što uzrokuje aktivaciju transkripcije proteinom Gal4 *in vivo* i *in vitro*
 - pri tome se formira ternarni kompleks Gal4-Gal80-Gal3
 - novija istraživanja pretpostavljaju da vezanje proteina Gal3 na protein Gal80 dovodi do promjene konformacije kojom se Gal80 oslobađa sa regije II na proteinu Gal4 (aa850-aa874) i veže na drugi dio proteina Gal4 (vjerojatno aa225-aa797)
 - ovako se Gal4 protein prevodi u oblik koji može aktivirati transkripciju na GAL promotoru

galaktoza (8)

- indukcija metabolizma galaktoze



galaktoza (9)

- indukcija metabolizma galaktoze
 - preostaje da se pojasni uloga fosforilacije u ovoj složenoj interakciji proteinskih molekula
 - uočene su promjene fosforilacije proteina Gal80 zavisno o izvoru ugljika
 - kod proteina Gal4 fosforilacija Ser699 bitno mijenja interakciju s proteinom Gal80 i uzrokuje maksimalnu aktivaciju transkripcije

galaktoza (10)

- kako represija glukozom djeluje na ekspresiju *GAL* gena?
- novija istraživanja pokazuju da se ovdje radi o vrlo složenom mehanizmu koji uključuje velik broj proteina
- pouzdano se zna da glukoza ne reagira izravno s proteinima odgovornim za transkripciju *GAL* gena
- glukoza proizvodi signal koji izaziva kaskadnu reakciju različitih proteina s kojima se signal za prisutnost glukoze dovodi do transkripcijskih proteina

- prisutnost glukoze u okolišu stanice kvasca detektiraju membranski proteini iz Hxt porodice proteina za transport heksoza
- pretpostavlja se da jedan od njih, Snf3, djeluje kao detektor niskih koncentracija glukoze
- drugi protein, Rgt2, djeluje kao detektor visokih koncentracija glukoze
- ovi proteini ulaze u interakciju s proteinima Grr1 i Hxk2 koji fosforilacijom (ili autofosforilacijom) prenose signal dalje
- zanimljivo je da je Hxk2 zapravo heksokinaza II, protein s višeznačnom funkcijom

galaktoza (11)

- Hxk2 fosforilira glukozu, fruktozu i manozu
- Hxk2 provodi i fosforilaciju proteina i autofosforilaciju, te tako obavlja svoju regulacijsku funkciju
- daljnji prijenos signala još nije razjašnjen, posebice eventualni utjecaj cAMP i fosforiliranih UH kao potencijalnih signalnih molekula
- središnju ulogu u represiji glukozom zauzima kompleks protein kinaze Snf1 s proteinima Snf4 i Brp
- ovaj je kompleks na neki način povezan s Glc7 kompleksom koji djeluje kao protein fosfataza i regulira mnoge procese u stanici kvasca, npr. sintezu glikogena
- pretpostavlja se da je aktivnost Glc7 kompleksa pod kontrolom Reg1 proteina
- Snf1 kompleks fosforilacijom djeluje na Mig1 kompleks koji pripada obitelji proteina s “cinkovim prstom” i djeluje kao opći represor koji se veže na promotore brojnih gena

galaktoza (12)

- represija glukozom na molekularnoj razini proučavana je intenzivno na *gal80* mutantima (kod kojih je ekspresija GAL gena konstitutivna) kako bi se isključio utjecaj indukcije (vidi slijedeći *slide*)
- ovim se istraživanjima došlo do slijedećeg mehanizma djelovanja:

u odsutnosti glukoze kod ovih se mutanata transkribira maksimalno gen *GAL4*; time se održava visoka razina pozitivnog regulacijskog proteina Gal4 koji se veže na promotore strukturnih *GAL* gena i oni su tada u potpunosti eksprimirani;

kada membranski proteini Snf3 i Rgt2 detektiraju prisutnost glukoze u okolini stanice, signal o njenoj prisutnosti prenosi se do Mig1 kompleksa putem proteina Grr1 i Hxk2 te Reg1-Glc7 regulacijskog kruga;

protein Glc7 je protein fosfataza koja defosforilira Snf1 kompleks i tako ga prevodi iz aktivnog u inaktivno stanje;

·ovim se istraživanjima došlo do slijedećeg mehanizma djelovanja:

aktivni oblik Snf1 kompleksa je protein kinaza koja fosforilira Mig1 protein;

inaktivacija Snf1 kompleksa dovodi do dominacije nefosforiliranog oblika Mig1 proteina, koji se prenosi iz citoplazme u jezgru, gdje stvara kompleks s proteinima Cyc8 i Tup1, tzv. Mig1 kompleks koji se veže na različite *GAL* promotore;

vezanjem na *GAL4* promotor reprimira se transkripcija *GAL4* gena, što uzrokuje četverostruko smanjenje koncentracije proteina Gal4;

to je dovoljno da izazove značajno smanjivanje ekspresije *GAL* gena, 30 puta u slučaju gena *GAL1*;

·ovim se istraživanjima došlo do slijedećeg mehanizma djelovanja:

Mig1 kompleks se također veže i na promotore strukturnih *GAL* gena čime se transkripcija *GAL* gena smanjuje za daljnjih pet puta;

za sve vrijeme signal o prisutnosti glukoze drži Snf1 kompleks u inaktivnom obliku posredstvom Glc7-Reg1 regulacijskog kruga, pa Mig1 kompleks drži cijeli sustav u reprimiranom stanju;

nestankom glukoze i prelaskom na dereprimirane uvjete, aktivira se Snf1 kompleks koji dovodi do oslobađanja Mig1 kompleksa sa promotora za regulacijski protein Gal4 i strukturne *GAL* gene, te se tako cijeli sustav oslobađa represije.

galaktoza (15)

·ovim se istraživanjima došlo do slijedećeg mehanizma djelovanja:

kod divljeg soja kvasca s *GAL80* fenotipom galaktoza uzrokuje ekspresiju *GAL* gena, a ako je u okolišu stanice prisutna i glukoza dolazi do represije metabolizma galaktoze;

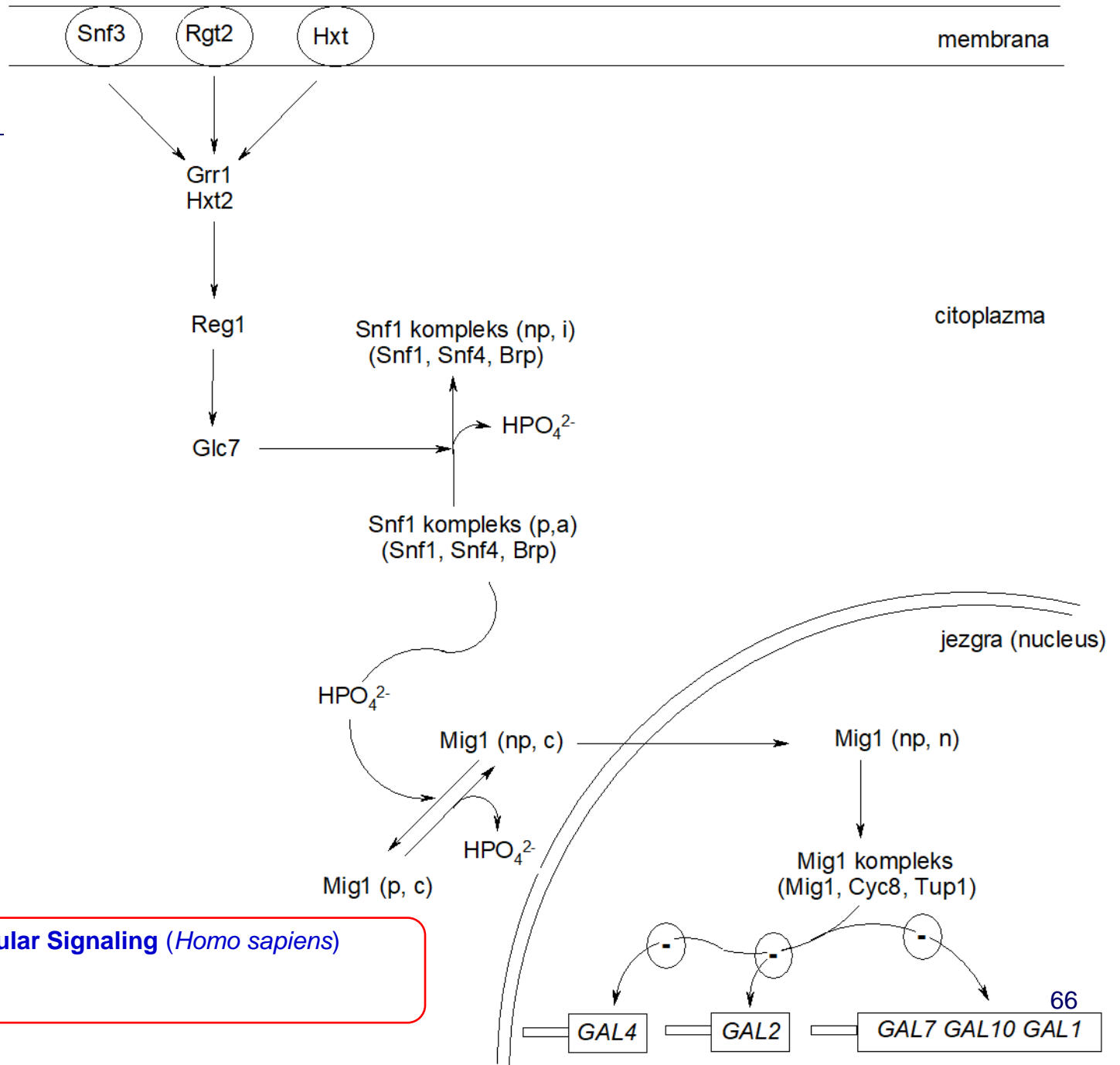
glukoza reprimira transkripciju gena *GAL2* koji kodira membranski protein za transport galaktoze uz istovremenu kataboličku inaktivaciju Gal2 proteina, što ima za posljedicu smanjenje koncentracije induktora unutar stanice (eng. *inducer exclusion*);

glukoza također reprimira transkripciju gena *GAL3*, pa se pojačava inaktivacija proteina Gal4 s Gal80 proteinom, konačni rezultat je da se u prisutnosti glukoze smanjuje unutarstanična koncentracija galaktoze i Gal3 proteina, a protein Gal4 blokira se s proteinom Gal80 i dolazi do jake represije *GAL* gena, čak do 1000 puta u usporedbi na dereprimirane uvjete.

galaktoza (16)

· opći regulacijski geni	produkti gena i/ili funkcija
<i>HXT</i>	porodica transportnih proteina i senzora glukoze
<i>SNF3</i>	senzor relativno niskih koncentracija glukoze
<i>RGT2</i>	senzor relativno visokih koncentracija glukoze
<i>GRR1</i>	prijenos signala za prisutnost glukoze
<i>HXK2</i>	heksokinaza 2, prijenos signala za prisutnost glukoze
<i>GLC7</i>	protein fosfataza koja aktivira Snf1 kompleks
<i>SNF1</i>	osnovni član Snf1 kompleksa odgovornog za aktivaciju Mig1 kompleksa
<i>SNF4</i>	član Snf1 kompleksa
<i>BRP</i>	član Snf1 kompleksa
<i>MIG1</i>	osnovni član Mig1 kompleksa odgovornog za represiju spec. regul. i strukt. gena
<i>CYC8</i>	član Mig1 kompleksa
<i>TUP1</i>	sastojak Mig1 kompleksa

galaktoza (17)



animacija: **Extracellular Signaling** (*Homo sapiens*)

saharoza

saharoza (1)

- kvasac *S. cerevisiae* **ne može** transportirati saharozu u stanicu
- metabolizam saharoze započinje pomoću enzima **invertaze** koja se kao slobodni, topljivi enzim nalazi u periplazmatskom prostoru stanice (između plazmine membrane i staničnog zida) i cijepa saharozu na glukozu i fruktozu
- sposobnost sinteze ekstracelularne invertaze (β -fruktofuranozidaze) jedini je preduvjet za rast *S. cerevisiae* na saharozi
- invertaza omogućava rast i na trisaharidu rafinozi (galaktozil- α -1-6-glukozil- α - β -fruktofuranozid)
- korištenje saharoze i rafinoze zahtijeva ekspresiju jednog od šest postojećih strukturnih gena koji kodiraju invertazu:

SUC1-SUC5 te *SUC7*

saharoza (2)

- izolirane su dvije invertaze iz stanica kvasca:
 - invertaza koja je jako glikozilirana i nalazi se u periplazmatskom prostoru i
 - invertaza koja je neglikozilirana i nalazi se u citoplazmi, funkcija joj je nepoznata
- za razliku od drugih UH, regulacija metabolizma saharoze odvija se isključivo represijom
- dok glukoza nije prisutna u okolini stanice, invertaza se sintetizira konstitutivno
- kad se glukoza pojavi u okolini stanice, dolazi do represije sinteze invertaze, u čemu sudjeluje veliki broj regulacijskih gena

saharoza (3)

- gen *SUC2*

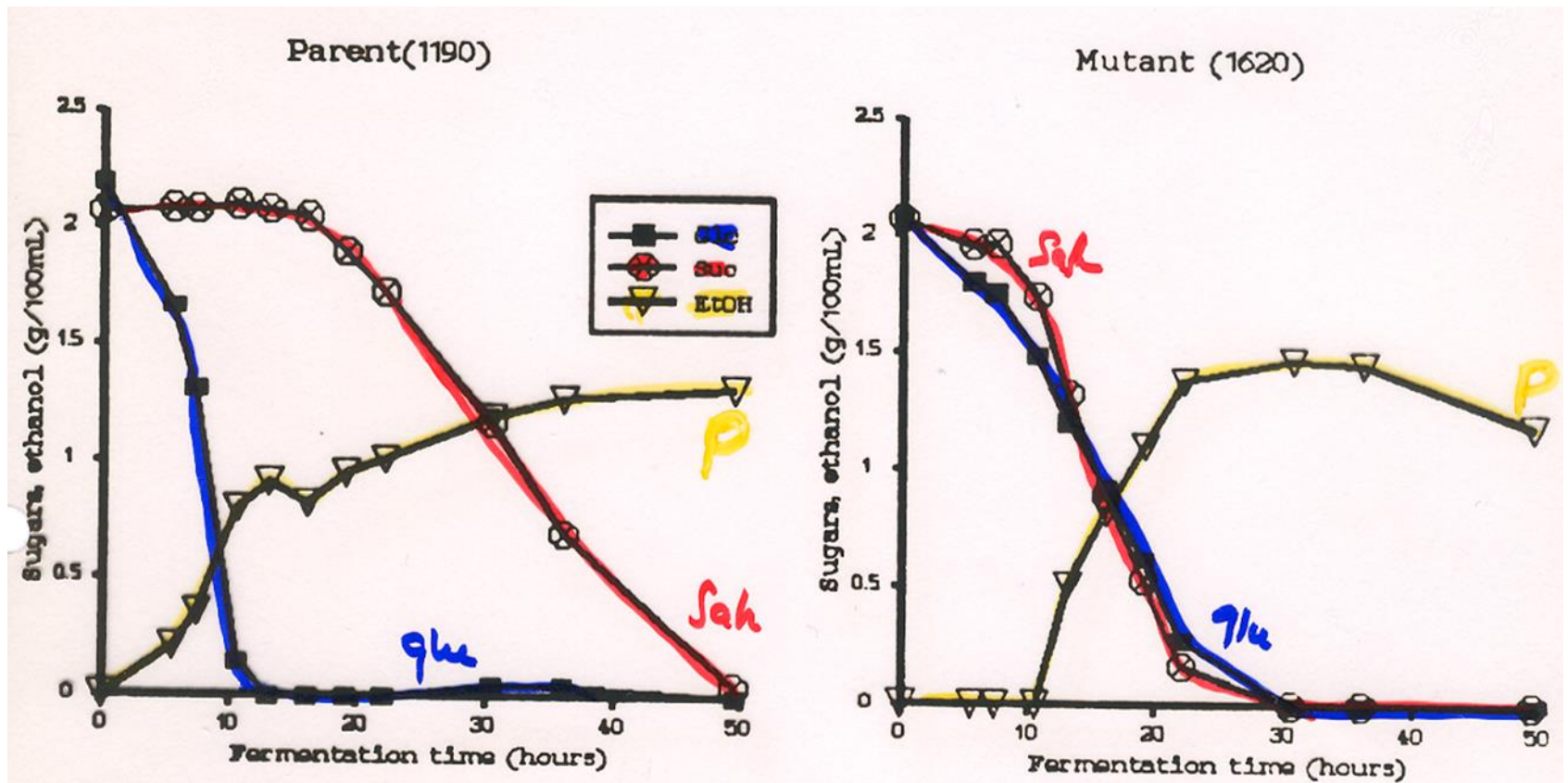
reprimira se visokim koncentracijama glukoze;

pri niskoj koncentraciji glukoze ekspresija *SUC2* gena je 8 puta veća nego na glukogenim supstratima;

smatra se da pri niskim koncentracijama glukoze, koje signalizira Snf3 protein, dolazi do indukcije transkripcije;

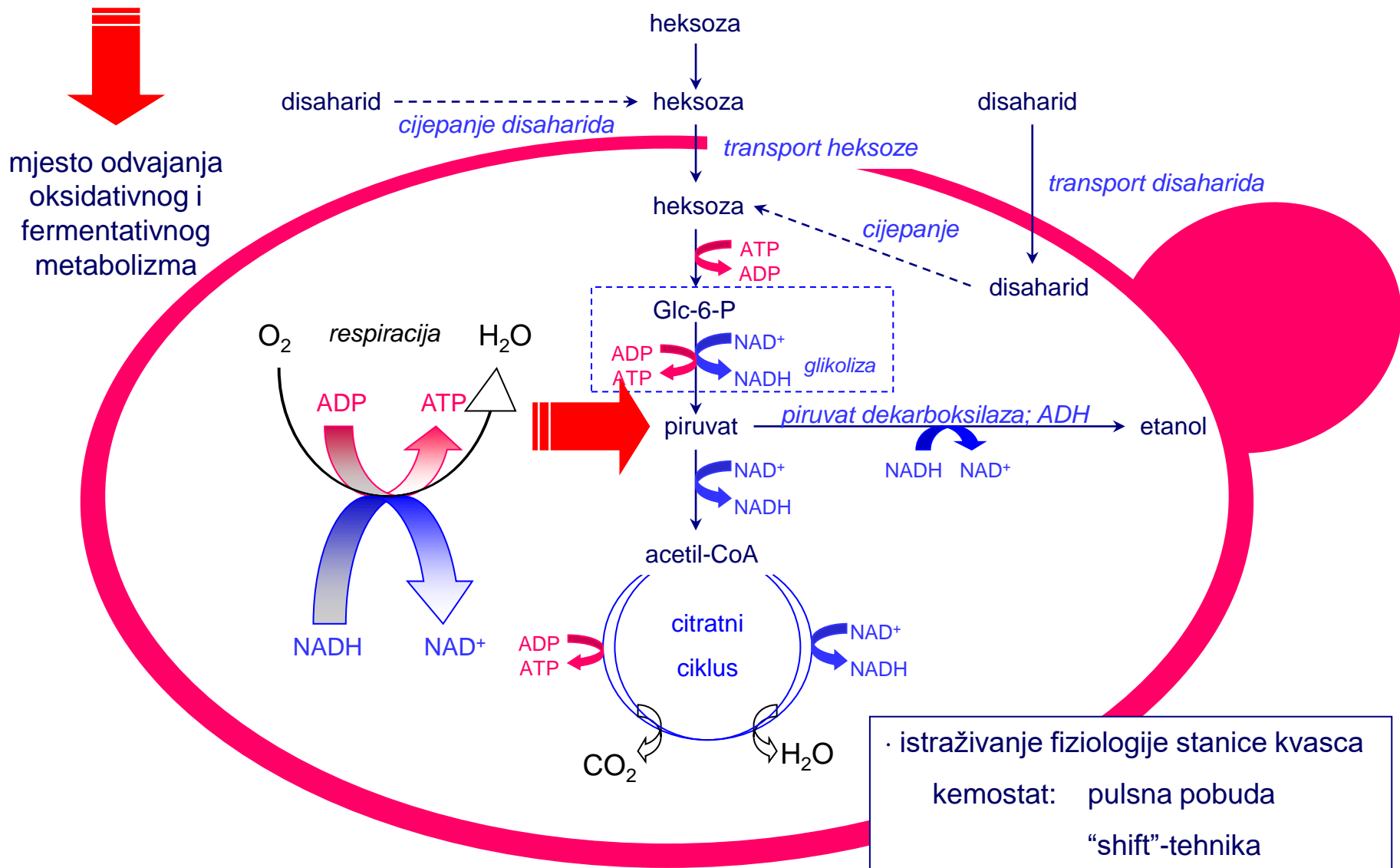
Mig1 protein sudjeluje kao negativni regulator transkripcije, ali na drugačiji način nego kod metabolizma galaktoze i maltoze.

saharoza (4)



regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasaca

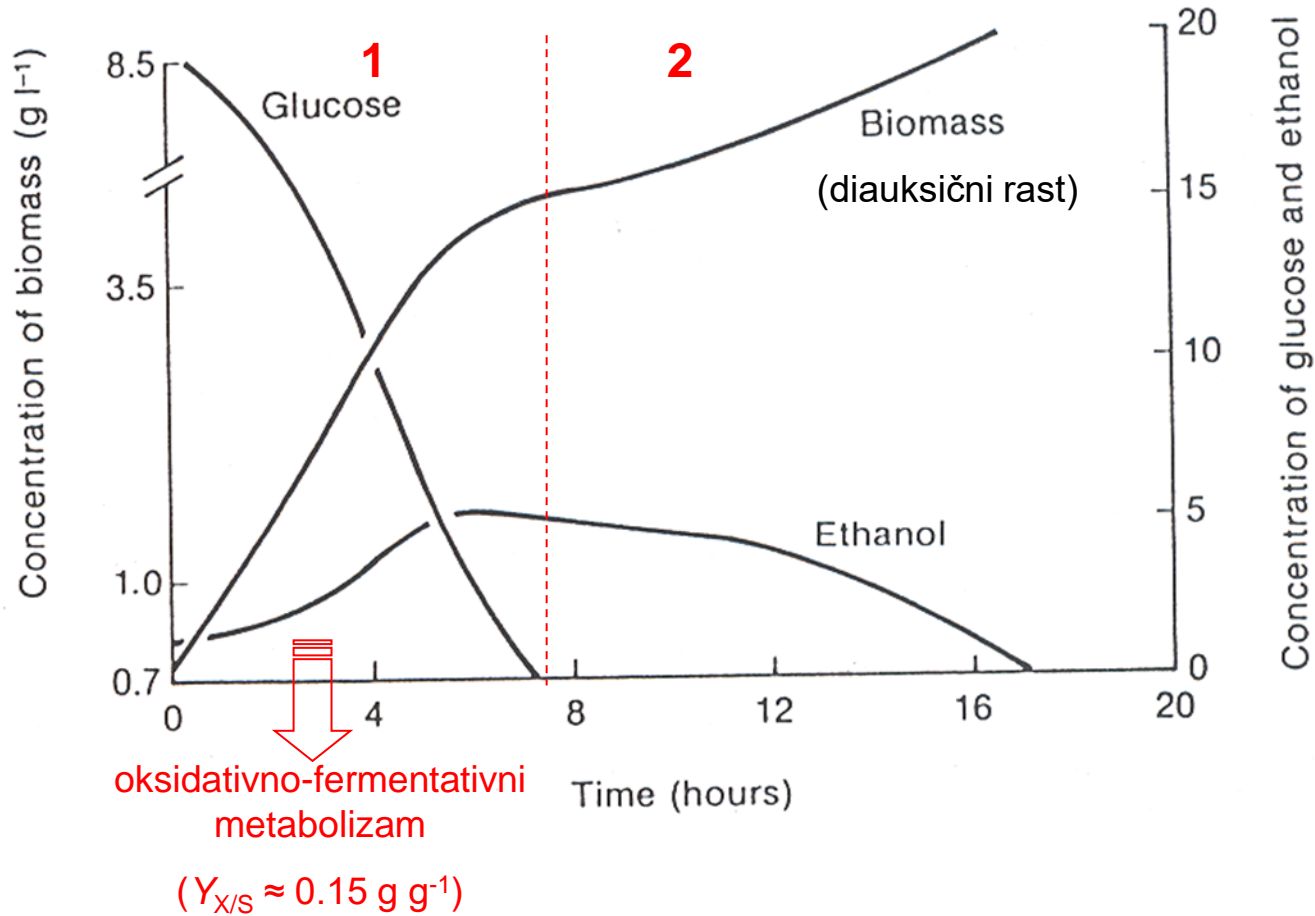
regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (1): metabolizam heksoza i disaharida



regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (1)

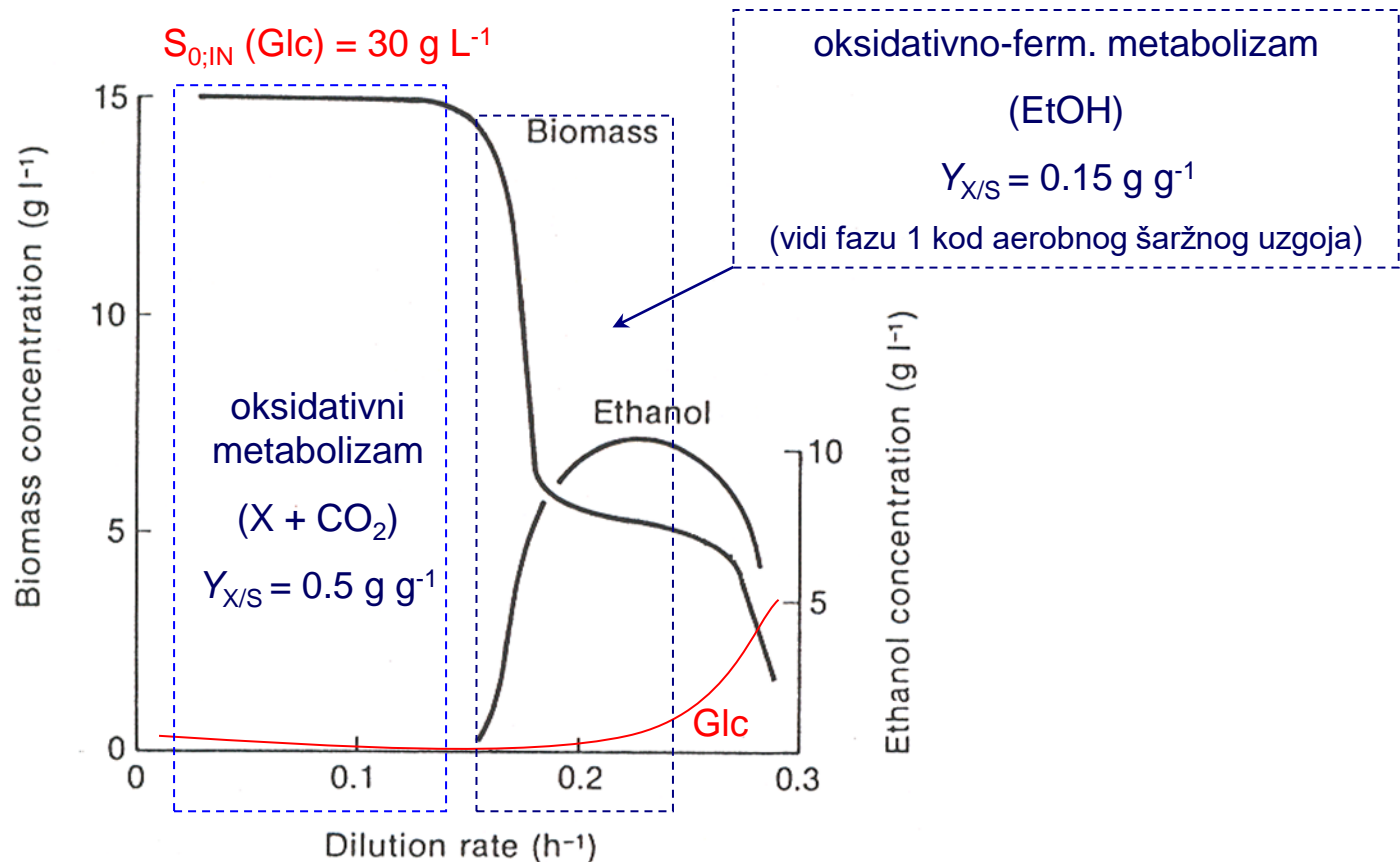
· šaržni uzgoj - aerobno: diauksični rast

(nakupljanje EtOH / potrošnja EtOH u aerobnim uvjetima)



regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (2)

- kontinuirani uzgoj - aerobno: učinak povećanja D na porast koncentracije biomase *S. cerevisiae*



regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (8)

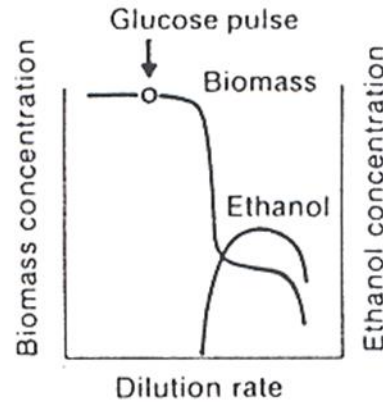
- alkoholna fermentacija i u aerobnim uvjetima kada koncentracija glukoze prijeđe određenu kritičnu vrijednost

1. KRATKOTRAJNI CRABTREE EFEKT

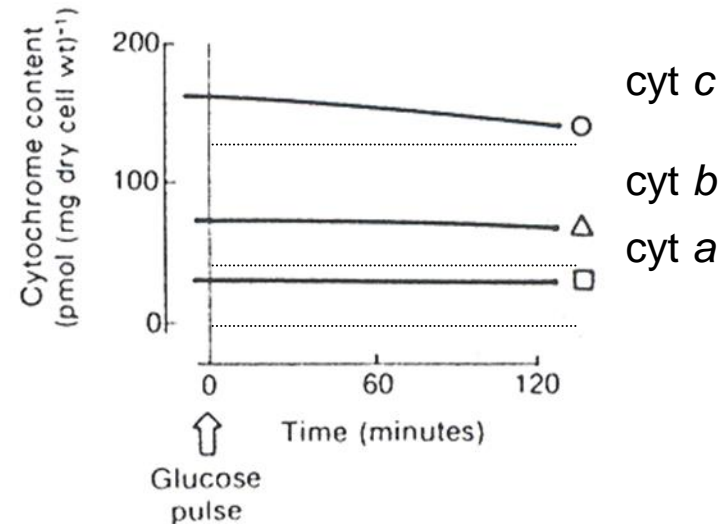
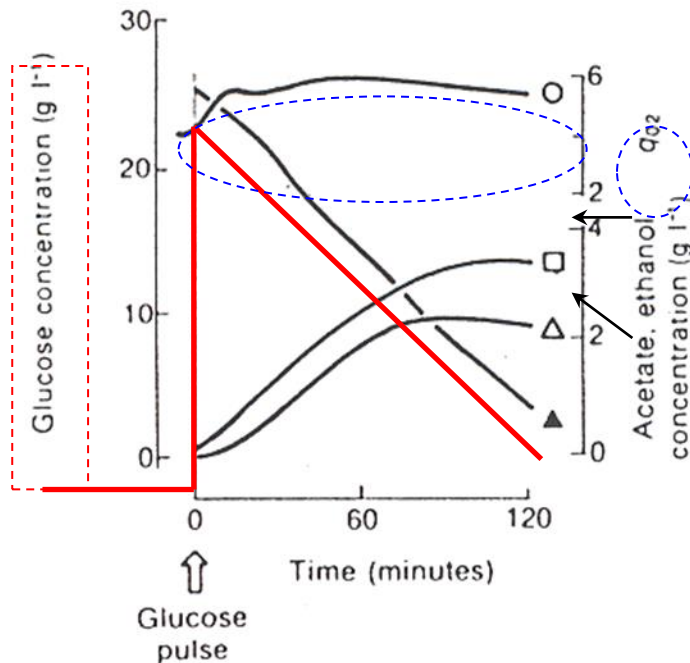
- proizvodnja etanola i acetata odmah nakon prijelaza s uvjeta ograničene dobave glukoze na uvjete suviška glukoze
- nemogućnost trenutačnog povećanja brzine respiracije (q_{O_2})

regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (9)

- kemostat / aerobno
- puls glukoze
- glukoza se brzo potroši
- prelazak s oksidativnog na respiro-fermentativni metabolizam



- nakupljanje EtOH i acetata
- EtOH se počinje nakupljati i prije nego li se smanji q_{O_2}



regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (10)

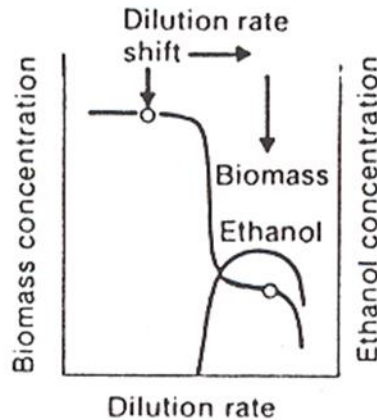
- alkoholna fermentacija i u aerobnim uvjetima kada koncentracija glukoze prijeđe određenu kritičnu vrijednost

2. DUGOTRAJNI CRABTREE EFEKT

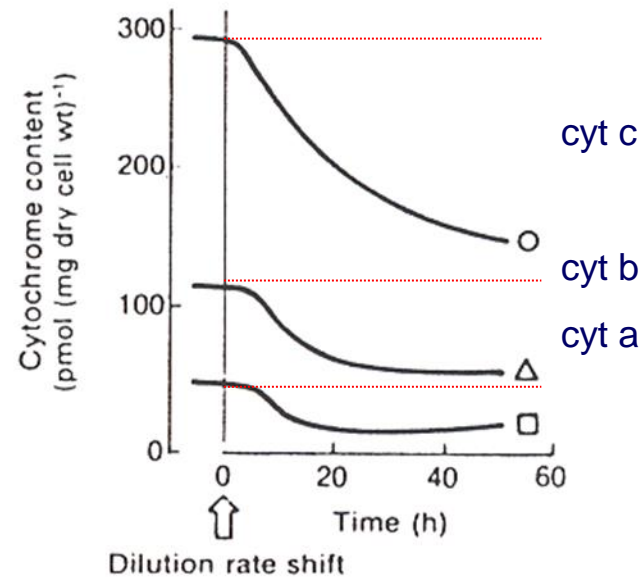
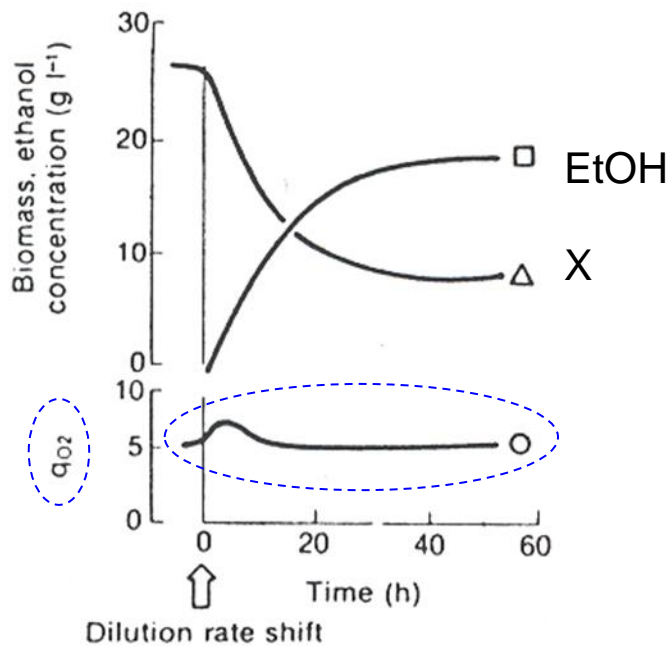
- aerobna fermentacija pri visokim specifičnim brzinama rasta
- **nedovoljan respiratorni kapacitet**: ukupna količina piruvata nastalog glikolizom ne može se potpuno oksidirati tj. usljed ograničavajućeg respiratornog kapaciteta stanice, svi nastali reduktivni oblici NADH ne mogu se oksidirati u lancu za prijenos e^- , pa se “višak” piruvata pregrađuje u etanol;
- **negativni efekt nakupljanja slabijih organskih kiselina** (acetata): pri specifičnoj brzini rasta od 0.38 h^{-1} ostvaruje se i maksimalna proizvodnja ATP respiracijom; da bi kvasac mogao rasti pri višim specifičnim brzinama rasta, mora fermentativnim putem proizvesti dodatni ATP; posljedica je nastajanje etanola i acetata.

regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (11)

- prilagodba stanice na respiro-fermentativni metabolizam (24-48 h)
- opada koncentracija biomase
- porast koncentracije EtOH
- q_{O_2}

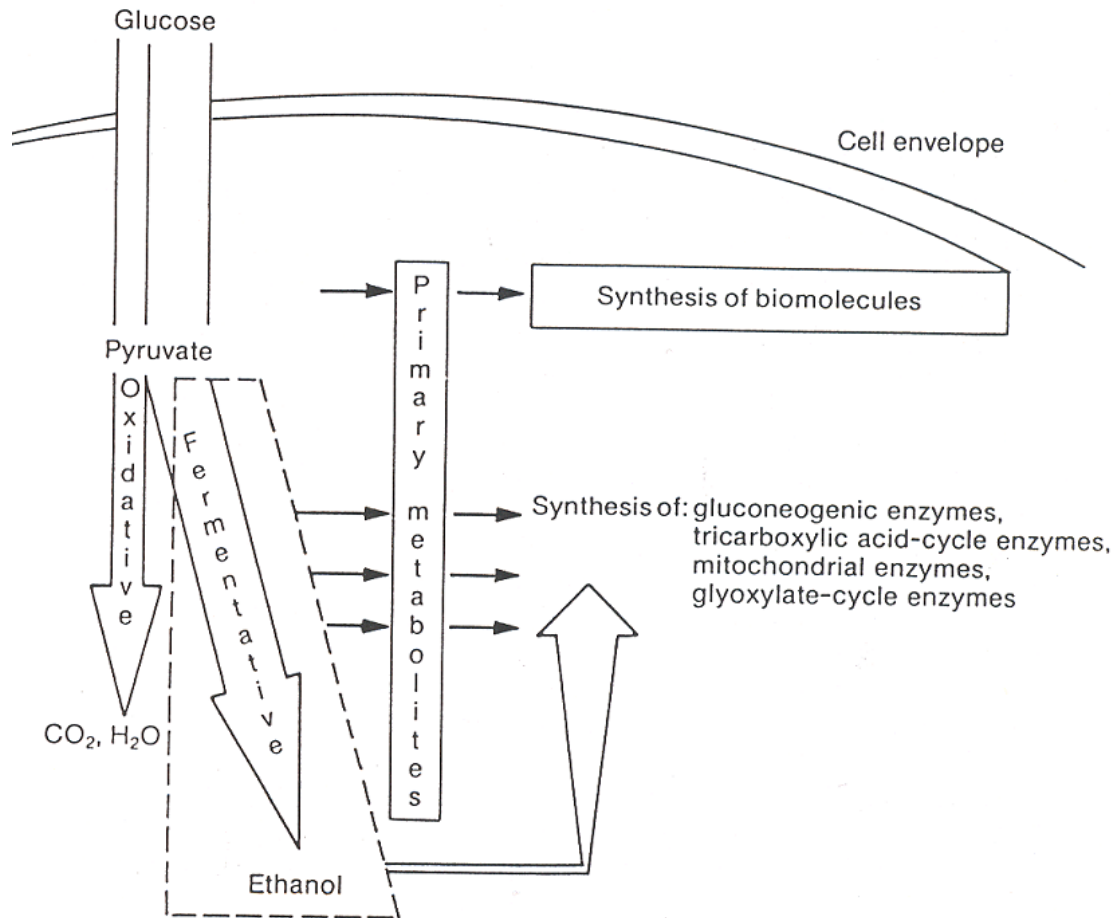


- opada koncentracija citokroma
- stanica se prilagođava na respiro-fermentativni metabolizam



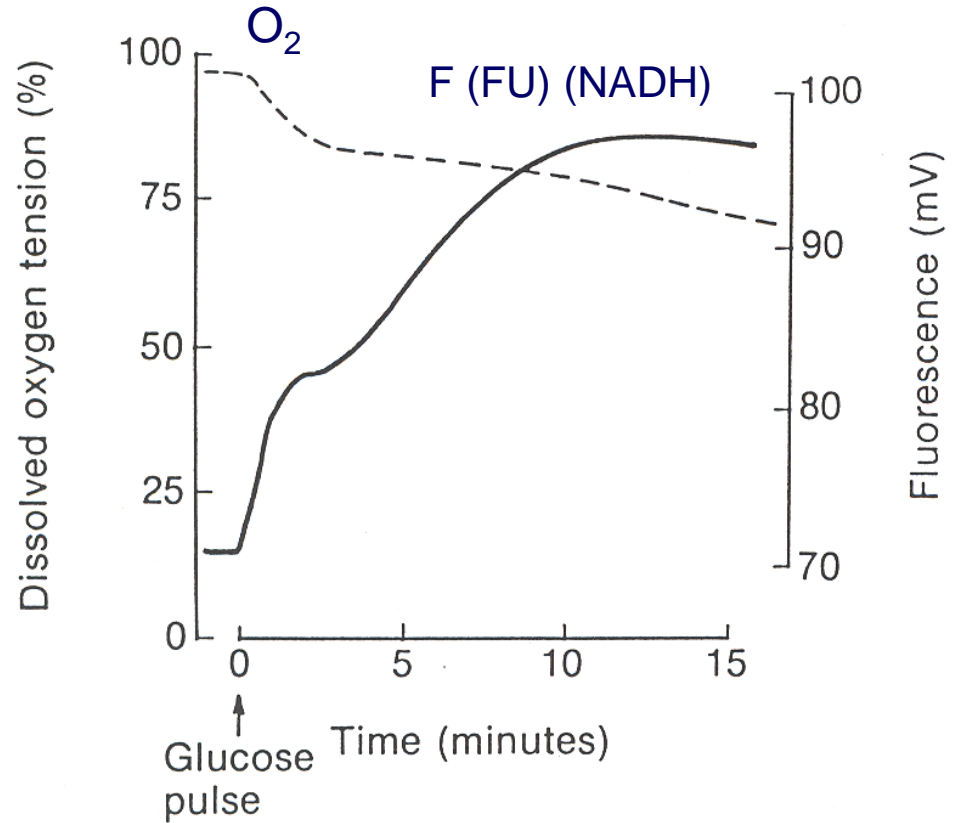
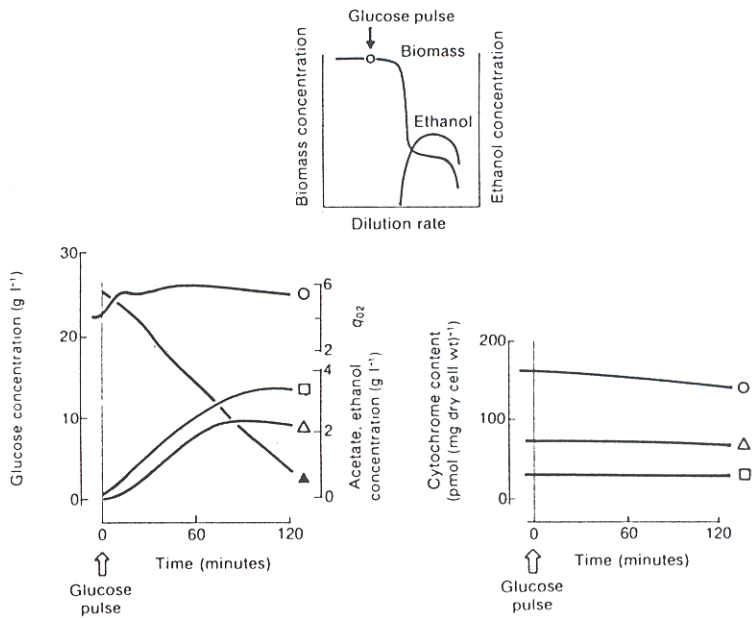
regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (12)

- regulacija metabolizma glukoze - ograničeni respiratorni kapacitet



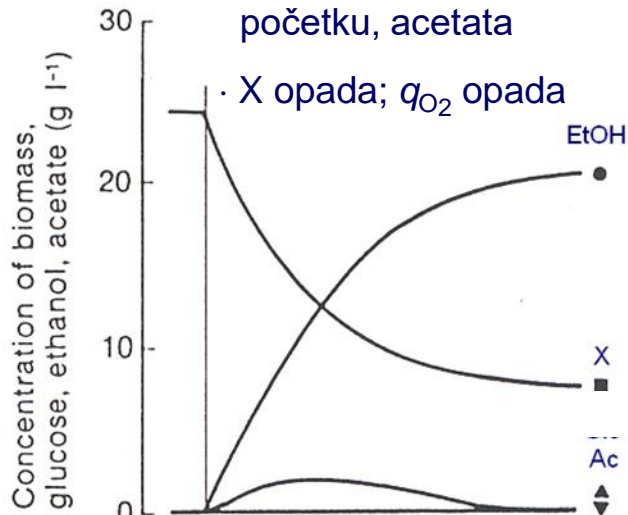
regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (13)

- konc. NADH kao odgovor na puls glc tijekom aer. kontinuiranog uzgoja kvasca (kratkotrajni Crabtree)

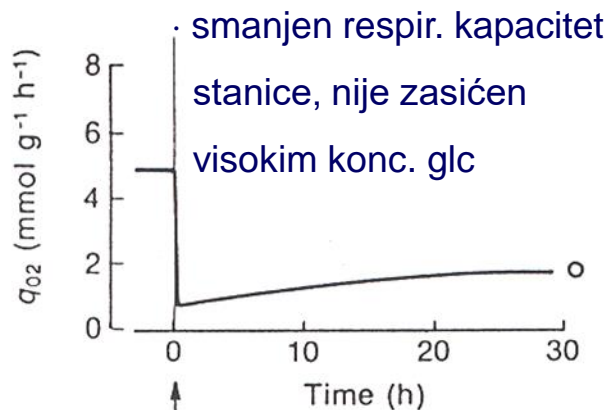


regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (14)

- uvođenje limitacije kisikom



- nakupljanje EtOH i, na početku, acetata
- X opada; q_{O_2} opada

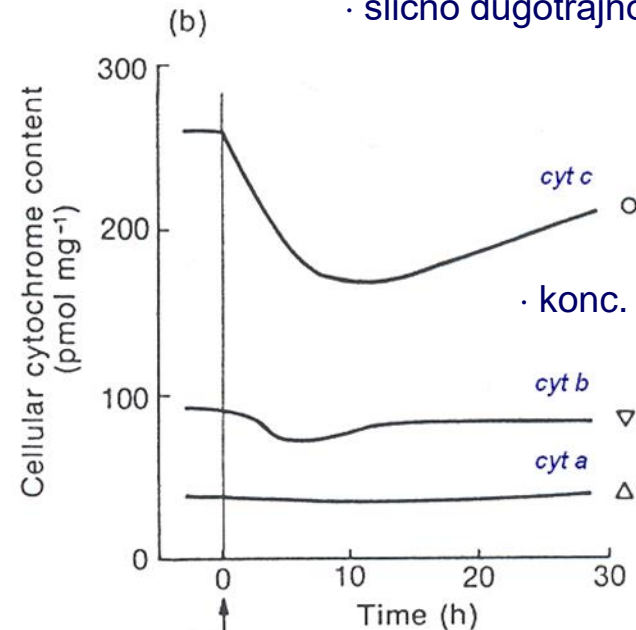


Oxygen limitation (21% - 2%)

- smanjen respir. kapacitet stanice, nije zasićen visokim konc. glc

- kada se dosegne *max.* respiratorni kapacitet (respiracija zasićena), započinje respiro-fermentativni metabolizam tj. počinje se nakupljati EtOH

- povećati konc. glc ili smanjiti konc O_2
- promjena konc. O_2 u ulaznom sterilnom zraku
- slično dugotrajnom Crabtree

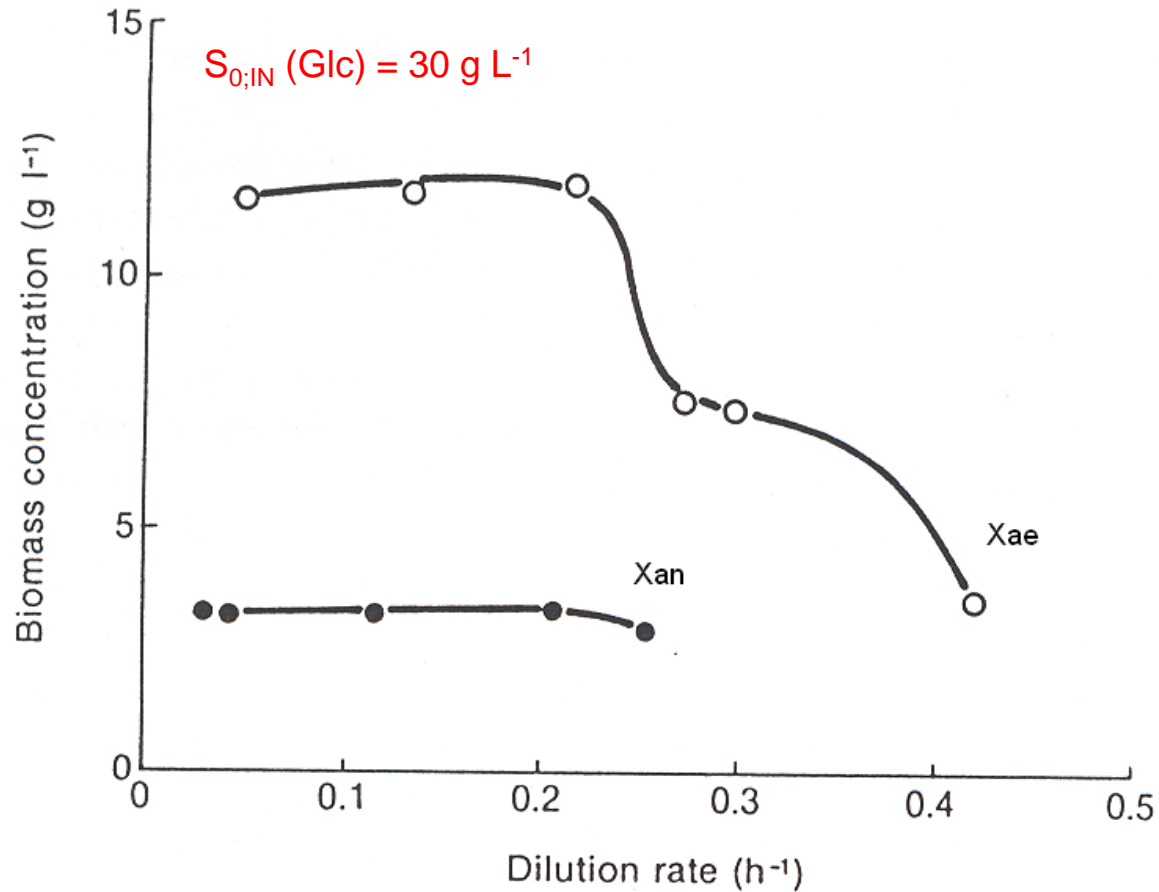


Oxygen limitation

- konc. cyt se mijenja

regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama kvasca (15)

- kontinuirani uzgoj - aerobno (ae) i anaerobno (an): učinak oksidativnog metabolizma na X i respiracijski kapacitet stanica



neke regulacijske pojave kod drugih kvasaca (1)

- ili “je li *Saccharomyces cerevisiae* tipičan kvasac?”
- podjela kvasaca prema potrebi za kisikom:

1. OBLIGATNO-AEROBNI (NEFERMENTATIVNI) KVASCI

- sve vrste iz rodova *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Lipomyces*, *Saccharomycopsis*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* i još neke vrste koje pripadaju rodovima *Torulopsis*, *Pichia*, *Debaryomyces*)

2. FAKULTATIVNO-FERMENTATIVNI KVASCI

- a. CRABTREE POZITIVNI (*Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*)
- b. CRABTREE NEGATIVNI (*Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*)

3. OBLIGATNO-ANAEROBNI (NE-RESPIRATORNI) KVASCI (*Arxiozyma*)

neke regulacijske pojave kod drugih kvasaca (2)

- CUSTEROV efekt

- neki kvasci fermentiraju glukozu u etanol u aerobnim uvjetima (uz nakupljanje acetata)
- prebacivanjem u anaerobne uvjete zaustavlja se rast stanica i fermentacija supstrata tijekom nekoliko sati
- nakon ovog perioda fermentacija supstrata se nastavlja vrlo sporo
(*Brettanomyces*, *Dekkera*, *Einiella*)

- KLUYVEROV EFEKT

- neki fakultativno-fermentativni kvasci, koji fermentiraju glukozu, neke šećere mogu koristiti samo u aerobnim uvjetima tj. ove šećere oksidiraju (respiracija)
- ove šećere ne mogu fermentirati u etanol
- Kluyver-pozitivni šećeri su u pravilu disaharidi, a od monosaharida ovdje pripada jedino gal

neke regulacijske pojave kod drugih kvasaca (3)

- Barnett i sur. (1990)

karakterizirano ukupno	590 vrsta kvasaca
ne fermentira glukozu	375 vrsta
fermentira glukozu	215 vrsta
Kluyverov efekt	132 vrste

- “je li *Saccharomyces cerevisiae* tipičan kvasac?”

Saccharomyces cerevisiae je

fakultativno-fermentativni,
Pasteur-pozitivni,
Crabtree-pozitivni,
Custer-negativni,
Kluyver-negativni kvasac.

literatura (1)

1. T. Anderlei, W. Zang, M. Papaspyrou, J. B. (2004) Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks, *Biochemical Engineering Journal* **17**, 187-194.
2. J.I. Castrillo, J. Kaliterna, R.A. Weusthuis, J.P. Van Dijken, J.T. Pronk (1996) High-cell-density cultivation of yeasts on disaccharides in oxygen-limited batch cultures, *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 621-628.
3. A. Conde, G. Diallinas, F. Chaumont, M. Chaves, H. Gerós (2010) Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**, 857-868.
4. R. Diaz-Ruiz, M. Rigoulet, A. Devin (2010) The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression, *Biochimica et Biophysica Acta*, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.08.010
5. J.P. van Dijken, W.A. Scheffers (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts, *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 199-224.
6. A. Fiechter, G.F. Fuhrmann, O. Käppeli (1981) Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells, *Advances in Microbial Physiology* **22**, 123-183 .
7. E. Fredlund, L.M. Blank, J. Schnürer, U. Sauer, V. Passoth (2004) Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*, *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5905-5911.
8. H. Fukuhara (2003) The Kluver effect revisited, *FEMS Yeast Research* **3**, 327-331.
9. J.M. Gancedo (1998) Yeast carbon catabolite repression, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 334-361.
10. J. Kaliterna, R.A. Weusthuis, J.I. Castrillo, J.P. Van Dijken, J.T. Pronk (1995) Transient responses of *Candida utilis* to oxygen limitation: regulation of the Kluver effect for maltose, *Yeast* **11**, 317-325.
11. J. Kaliterna, R.A. Weusthuis, J.I. Castrillo, J.P. Van Dijken, J.T. Pronk (1995) Coordination of sucrose uptake and respiration in the yeast *Debaryomyces yamadae*, *Microbiology* **141**, 1567-1574.
12. O. Kappeli (1986) Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts, *Adv. Microb. Physiol.* **28**, 181-209.
13. S. Laxman, B.P. Tu (2010) Systems approaches for the study of metabolic cycles in yeast, *Current Opinion in Genetics & Development* **20**, 599-604.
14. D. Lloyd, B. Kristensen, H. Degn (1983) Glycolysis and respiration in yeasts, *Biochem. J.* **212**, 749-754.

literatura (2)

15. H. Maaheimo, J. Fiaux, Z.P. Cakar, J.E. Bailey, U. Sauer, T. Szyperski (2001) Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ¹³C labeling of common amino acids, *Eur. J. Biochem.* **268**, 2464-2479.
16. I. Mustea, T. Muresian (1966) Crabtree effect in some bacterial cultures, *Cancer* **20**, 1499-1501.
17. S. Novak, V. Marić (1995) Transport i regulacija metabolizma ugljikohidrata kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: I. Glukoza, fruktoza i manoza, *Kemija u industriji* **44**, 341-353.
18. S. Novak, V. Zechner-Krpan, P. Raspor, V. Marić (2000) Transport ugljikohidrata i regulacija metabolizma ugljikohidrata u kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: II. Galaktoza, *Kemija u industriji* **49**, 433-441.
19. S. Novak, V. Zechner-Krpan, V. Marić (2004) Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Technology and Biotechnology.* **42**, 213-218.
20. S. Novak, V. Marić (1995) Utjecaj glukoze na energetski metabolizam kvasca – represija glukozom i katabolička inaktivacija, *Prehrambeno-tehnološka i biotehnološka revija* **31**, 35-42.
21. H.T.B. Pham, G. Larsson, S.-O. Enfors (1998) Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: simulation and model verification, *Biotechnology & Bioengineering* **60**, 474-482.
22. E. Postma, C. Verduyn, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken (1989) Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 468-477.
23. G.M. Santangelo (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 253-282.
24. A.M. Souto-Maior, D. Runquist, B. Hahn-Hägerdal (2009) Crabtree-negative characteristics of recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biotechnology* **143**, 119-123.
25. J. Thierie, M.J. Penninckx (2004) Possible occurrence of a Crabtree effect in the production of lactic and butyric acids by a flocc-forming bacterial consortium, *Current Microbiology* **48**, 224-229.
26. H. van Urk, P.R. Mak, W.A. Scheffers, J.P. van Dijken (1988) Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess, *Yeast* **4**, 283-291.
27. R.A. Weusthuis, J.T. Pronk, P.J.A. van der Broek, J.P. van Dijken (1994) Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts, *Microbiological Reviews* **58**, 616-630.

- drugi parcijalni pismeni ispit (**PP-2**) iz FIM-a održat će se u **četvrtak, 07.12.2023.**;
- student/ica koji/a ne želi polagati PP-2 ne treba doći na FIM u ovom terminu i ne treba ništa prijaviti/odjaviti;
- student/ica koji/a želi polagati PP-2 treba se prijaviti putem ISVU-a za ovaj ispit (rok 07.12.2023.);
- student/ica koji/a želi polagati pismeni ispit ukupnog gradiva (**PIUG**) treba se prijaviti putem ISVU-a za ovaj ispit (rok 07.12.2023.);
- student/ica koji/a želi polagati PP-2 ili PIUG ne šalje e-poštu nastavniku za prijavu ispita za ovaj niti za bilo koji drugi ispitni rok poradi prijave ispita
- nastavnik ne prijavljuje studenta za ispit.