

František K a p r á l e k :

Zákonitosti v průběhu submersní kultivace *Eremothecium ashbyi*.

Oddělení obecné mikrobiologie, biologická fakulta Karlovy university, Praha

Kvasinka *Eremothecium ashbyi* Guill. [*Crebrothecium ashbyi* (Guill.) R. out.] je v současné době předmětem intensivního studia jak se strany mikrobiologů, tak i kvasných technologů. Důvodem k tomu je její schopnost produkovat mimořádná množství riboflavinu, který je požadován farmaceutickým i potravinářským průmyslem. Při tom se tento mikroorganismus jeví z několika málo jiných mikroorganismů s toutéž schopností, pro tovární výrobu jako nejvhodnější. Dnes je fermentační výroba riboflavinu zavedena v celé řadě států, a množství takto získaného riboflavinu dosahuje značné výše, jak o tom svědčí údaje, které uvádí Beesch a Shull (1955). Podle nich bylo v roce 1953 vyrobeno 266 000 liber riboflavinu proti 236 000 liber v roce 1952 a 245 000 liber v roce 1951. V těchto datech není obsažen riboflavin produkovaný pro účely krmné, jehož bylo vyrobeno jistě několikrát více, neboť na jeho výrobě pracovalo 8 továren proti 3, které vyrábějí riboflavin čistý (Perlman a Kroll 1954). Již tyto zřejmě neúplné údaje svědčí o významu *Eremothecium ashbyi* pro kvasný průmysl.

Přehled literatury

Eremothecium ashbyi isoloval po prvé jako parazita bavlníkových tobolek v Sudanu anglický fytopatholog R. E. Massey, a podrobně je po stránce morfologické a systematické popsal Guilliermond (1936), který je také takto pojmenoval (1935). V novější době je Routien (1949) přejmenoval na *Crebrothecium ashbyi*. Guilliermond se spolupracovníky (1935) u něho též jako první popsal produkci žlutého pigmentu flavinového charakteru, který později po řadě podrobných studií, identifikovala Raffy (1938) jako riboflavin. Přes současný a pozdější rozmach ve studiu tohoto mikroorganismu chybí v literatuře jakákoliv zmínka o jeho ekologii, a dokonce jakákoliv zpráva o jeho nové izolaci z přírody. Není bez zájmu, že se nepodařila ani kultivace *Eremothecium ashbyi* přímo na bavlníkových tobolkách či na jejich vodném výluhu, jak uvádí Dikanskaja (1954). Je zřejmé, že v celém světě používané kmeny pocházejí z původně izolovaného kmene, udržovaného uměle ve sbírkách různých států.

Základní kameny ke studiu fyziologie *Eremothecium ashbyi* položil svými pracemi Schopfer (1944 a j.). Těžiště jeho a velké většiny následujících prací spočívá ve studiu výživy, případně ve zjišťování mechanismu syntézy molekuly riboflavinu. V tomto směru bylo sneseno již mnoho experimentálních údajů, obsažených v přehledných článcích Dikanské (1950) a Dyra a Munka (1954).

Relativně malá pozornost byla věnována sledování zákonitostí ve změnách probíhajících během fermentace *Eremothecium ashbyi*, přestože znalost průběhu fermentačního procesu nám v praxi vedle kontroly správnosti vedení fermentace dává i možnost cílevědomých zásahů do ní a kromě toho mohou zjištěné závislosti do značné míry pomoci ve vysvětlení vlastních principů tvorby riboflavinu, a přispět tak k theoretickému vysvětlení příčiny tohoto neobvyklého a nefyziologického jevu.

Řešením této otázky se u *Eremothecium ashbyi* zabývala pouze Dikanskaja (1954), která sledovala celou řadu fyziologických, morfologických i cytologických změn v průběhu růstu kultury, pěstované však za stacionárních podmínek. Na základě svých výsledků rozeznává ve stacionárně pěstované kultuře 4 fáze, z nichž první je charakterisována přibýváním mycelia, celkového i uvolněného riboflavinu, vysokou respirační aktivitou a přítomností cytochromů,

druhá dalším přibýváním mycelia a intensity synthesy a uvolňování riboflavinu jednotkou biomasy, se současným poklesem respirační aktivity a zmizením cytochromů. Ve třetí fázi se množství sušiny stává konstantním, a intenzita synthesy i uvolňování riboflavinu klesá, stejně jako respirační aktivita. Ve čtvrté fázi probíhá křivka množství mycelia křivolace, a s tím souvisí i křivolaký průběh ostatních křivek.

Poněkud více je o průběhu submersní fermentace známo u jiné kvasinky syntetisující riboflavin, *Ashbya gossypii*. Tento mikroorganismus je druhu *Eremothecium ashbyi* po stránce fyziologické, morfologické i systematické tak blízký, že oba bývají někdy považovány za jeden druh. Mickelson (1950) zjistil, že během prvních 72 hodin je rychle využita glukosa, a souběžně klesá pH ze 6,8 na 4,2. Při tom se zvolna zvětšuje množství vznikajícího ethanolu a kyseliny octové. Po vyčerpání glukosy začíná synthesa riboflavinu, a pH zvolna stoupá až k hodnotě 8,3; ethanolu a kyseliny octové ubývá. Ke stejným závislostem v průběhu asimilace glukosy, tvorby riboflavinu a hodnot pH dospěli Tanner a spolupracovníci (1949), a v poloprodučním měřítku Pfeifer a spolupracovníci (1950). V grafech všech těchto prací však chybějí údaje o množství mycelia, a i podrobnější údaje o ostatních změnách, neboť průběh fermentace je jimi sledován jako vedlejší otázka. Práce zaměřená výhradně k podrobnějšímu sledování průběhu submersní fermentace *Ashbya gossypii* není z literatury známa.

Úkolem této práce bylo stanovit zákonitosti v průběhu fermentace *Eremothecium ashbyi* za submersních podmínek, a porovnat je s výsledky získanými Dikanskou za stacionárních podmínek, a Mickelsonem, Tannerem a Pfeiferem s *Ashbya gossypii* za submersních podmínek.

Materiál a metody

Použitý kmen *Eremothecium ashbyi* byl ze sbírky Mikrobiologického ústavu biologické fakulty Karlovy university. Během experimentální práce byl udržován jednak v pískových konzervách způsobem obvyklým při konzervaci aktinomycet a plísní, jednak lyofilisací. Pískové konzervy se nám osvědčily až do stáří 7 měsíců. Starší konzervy nerostly po vyočkování všichni, a po 10 měsících nenastal růst vůbec. V souhlase s výsledky Hošťálkovými (1955) je nutno považovat tento způsob pro *Eremothecium ashbyi* za nespolehlivý. Úspěšnější byla lyofilisace vysporulované kultury v prostředí 5% roztoku maltosy v seru (Hošťálek 1955).

Živná půda použitá ve všech případech byla tohoto složení:

glukosa	10 g
pepton	10 g
kvasničný extrakt	1 g
dest. voda	ad 1000 ml

V případě pevné půdy byla přidána 2 % agaru. Reakce byla upravena na pH 6,7 až 6,8 před sterilizací, která byla prováděna v autoklávu při 1 atm po dobu 30 min.

V prvních pokusech byla kultivace prováděna ve 3 až 4 paralelních 500 ml varných baňkách s rovným dnem s 50 ml živné půdy na reciprokém třepacím stroji o délce kyvu 9,5 cm a rychlosti 96 kyvů za minutu, při teplotě $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$. Později jsme přikročili ke kultivaci v jediné 10litrové varné baňce s rovným dnem a 2000 ml živné půdy na reciproké třepačce se sníženým počtem kyvů na 75/min a zkrácenou délkou kyvu na 4 cm. Toto snížení bylo nutné proto, aby kapalina v nádobě vykonávala pohyb obdobný pohybu v 500 ml baňkách s 50 ml půdy na standardní třepačce. V daných časových intervalech jsme asepticky odebírali vzorek pro analýsy; po skončení pokusu činil obsah baňky asi 1000 ml, tedy polovinu výchozího množství živné půdy. Aby byla zintenzivněna výměna plynů při relativně menším povrchu kapaliny a užším průměru hrdla proti kultivaci v 500 ml baňkách, byl nad kapalinu přiváděn malý proud sterilního vzduchu — (cca 90 ml/min) vibračním motorkem. Tento způsob kultivace se nám osvědčil jak po stránce pracovní úspornosti, tak i po stránce přesnosti a správnosti analýs lépe, než metoda odběru několika paralelních baněk v daných časových intervalech.

Inokulum pro první pokusy na 500 ml baňkách vycházelo z pískových konserv, pro pokusy na 10 litrové baňce z lyofilisátů. V obou případech byly konzervy vyočkovány na šikmý agar uvedený živné půdy, a to tak, že v prvním případě byla část pisku na agar vysypána, ve druhém lyofilisát suspendován v kape živného media a tato suspenze nanesena na šikmý agar kličkou. Po 4 až 5denní inkubaci při 28°C byla kličkou naočkována 500 ml varná baňka s 50 ml živné půdy a inkubována 3 dny na standardní třepačce. Ta pak sloužila jako inokulum pro vlastní pokus; inokulum bylo 1%.

Glukosa byla stanovována Schoorlovou methodou (Tomíček 1949), sušina po dvojnásobném promytí mycelia destilovanou vodou sušením při 105°C do konstantní váhy. Reakce prostředí byla zjišťována elektronickým pH-metrem Philips chinhydronovou a antimonovou elektrodou proti nasycené kalomelové elektrodě. Riboflavin byl stanovován jednak celkový,

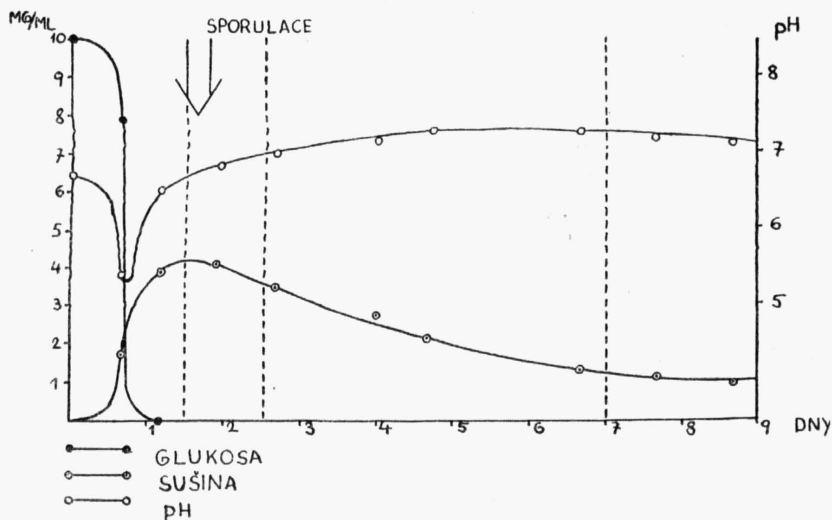
t. j. v myceliu i v mediu, a jednak uvolněný, t. j. v mediu zbaveném mycelia centrifugací. V prvním případě byl vzorek kysel hydrolysován v autoklávu. Množství riboflavinu vázaného v myceliu bylo určeno rozdílem obou hodnot. Stanovení bylo prováděno v prostředí 0,1 M fosfátového pufru pH 6,8 na Pulfrichově fotometru fluorometrickou methodou uváděnou Asatiani (1953), s drobnými technickými modifikacemi. Tato metoda byla kontrolována methodou polarografickou (Hošťálek 1955). Polarograficky získané výsledky byly pravidelně o 4 až 8 % vyšší. Chyba metody při pečlivé práci zkušeného pracovníka činila maximálně $\pm 8\%$, zpravidla však méně. Aktivita katalasy byla stanovována jodometrickou methodou (Avi-Dora Yaniv 1952, Sumner 1941). Promytá suspenze mycelia byla přidána do baňky s 50 ml 0,01 N H_2O_2 v 0,015 M fosfátovém pufru pH 6,8 předem vychlazené na 0 °C. Po 3, 6, 9 a 20 minutách bylo odebíráno po 5 ml této suspence a jodometricky stanoven zbylý peroxid. Množství rozloženého H_2O_2 bylo přepočteno na 1 mg sušiny, a pro jednotlivé odběry vypočtena reakční konstanta podle vzorce

$$k = \frac{2,3}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

(Brestkin a Ivanová 1955), kde t = čas ve vteřinách od začátku reakce, a = výchozí množství H_2O_2 , x = množství H_2O_2 rozložené za dobu t . Z jednotlivých konstant byla graficky extrapolována hodnota k_0 pro čas t_0 (Sumner 1941). Respirační aktivita byla sledována na Warburgově přístroji v atmosféře vzduchu při 28 °C (Kleinzeller, Málek, Vrba 1954). Substrátem byla 0,02 M glukosa a promyté mycelium bylo supendováno v takovém fosfátovém pufru pH 6,8, aby výsledná koncentrace pufru po příliti substrátu byla 0,1 M.

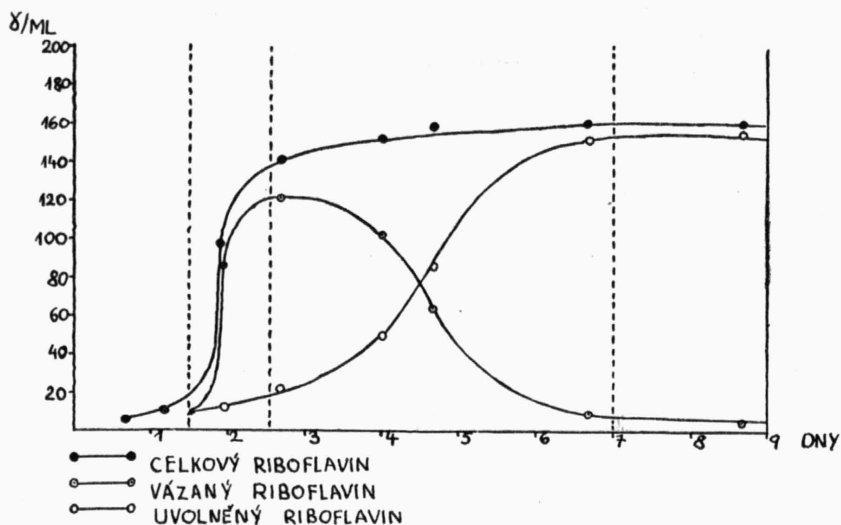
Výsledky

Výsledky získané na 500 ml baňkách i na 10litrové baňce dávaly křivky se zcela obdobným charakterem průběhu. V této práci předkládáme výsledky jednoho z pokusů na 10litrové třepací baňce shrnuté do tabulky 1. a znázorněné na obrázcích 1 až 7.



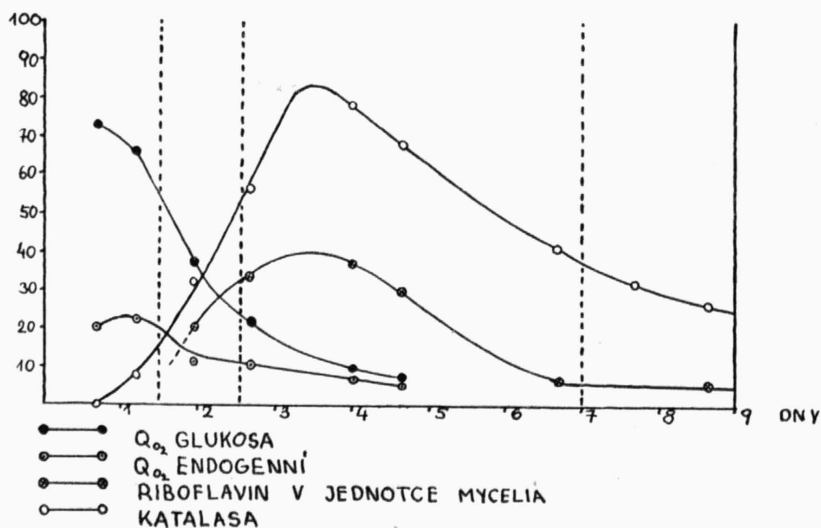
Obr. 1. Závislost pH a množství sušiny a glukosy na stáří kultury.

Zejména z obr. 4, kde je graficky znázorněn přírůstek sušiny, vázaného a uvolněného riboflavinu (derivace příslušných křivek) a který tedy vyjadřuje intensitu tří základních procesů při fermentaci probíhajících, totiž intensitu růstu, syntesy riboflavinu a jeho uvolňování do media, je zřejmé, že celý průběh fermentace můžeme rozdělit na čtyři odlišné charakteristické fáze.

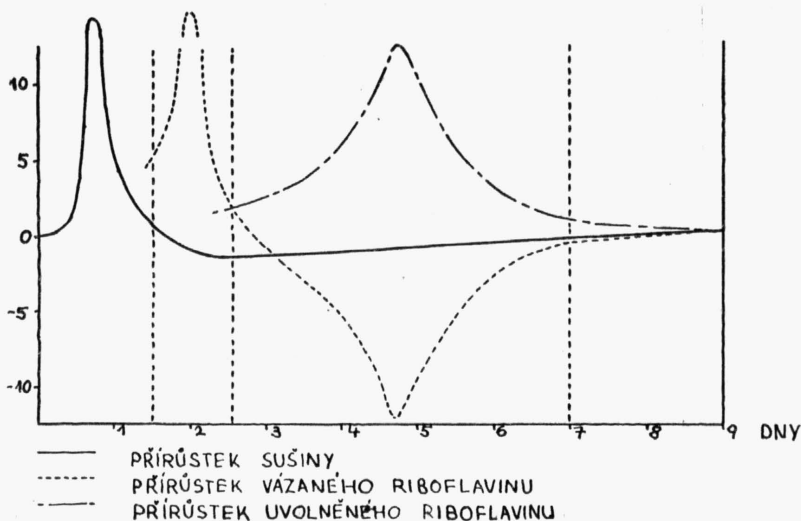


Obr. 2. Závislost obsahu celkového, uvolněného a vázaného riboflavinu na stáří kultury.

V první fázi, kterou je možno nazvat fází růstu, je dominujícím procesem růst kvasinky. V celé fázi je možno odlišit dvě období. Dělítkem mezi nimi je vrchol křivky přírůstku sušiny (obr. 4). V prvním období se proces růstu neustále zrychluje; zcela souběžně s tím probíhá neustále se zrychlující pokles hladiny glukosy, která není v tomto období ke stavbě biomasy či k respiraci



Obr. 3. Závislost obsahu riboflavinu v jednotce mycelia, aktivity katalasy, endogenní respirace a respirace na glukose na stáří kultury.



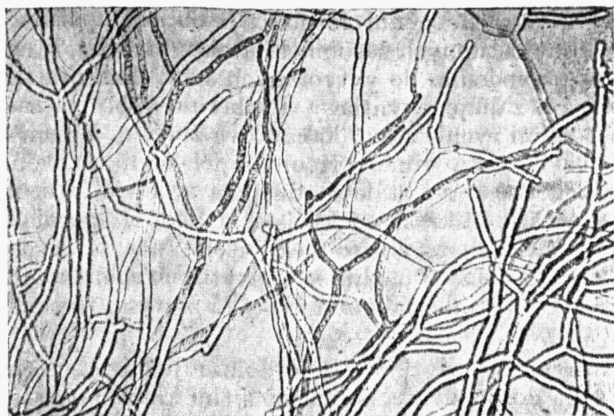
Obr. 4. Závislost přírůstku sušiny, vázaného a uvolněného riboflavinu na stáří kultury.

využívána zcela, nýbrž je částečně přeměňována na organické kyseliny (zejména kyselinu octovou, jak bylo orientačně zjištěno), které působí souběžný dosti značný pokles pH. Respirační aktivita mycelia je značně vysoká, aktivita katalasy nulová. Ve druhém období fáze růstu dochází vlivem podstatného snížení hladiny cukru k obratu křivky přírůstku, t. j. k stále podstatnějšímu zvolňování intenzity růstu, při čemž jako zdroj uhlíku jsou využívány i dříve vytvořené organické kyseliny. To má za následek obrat křivky pH k alkalické straně. Respirační aktivita na glukose zvolna klesá, zatím co endogenní respirační aktivita má vzestupný charakter, což zřejmě souvisí s hromaděním buněčných zásobních látek, a objevuje se též slabá aktivita katalasy. Produkce riboflavinu je prakticky nulová; slabě vzestupný charakter křivky celkového riboflavinu je v této fázi způsoben dozrívající produkcí vegetativních buněk inokula. Visuální vzhled kultury odpovídá uvedenému popisu: mycelia přibývá nejprve zvolna, pak se stoupající intenzitou a ve 27 hodině je mycelium jemně vločkovité, husté a naprosto bílé. Sedimentace při centrifugaci je pozvolná, a sediment načebraný, velmi snadno roztřepatelný. Mikroskopicky je kultura charakterisována (obr. 5) nepřítomností spor a dlouhými, bílými a štíhlými vlákny, bohatě se větvicími. Fáze končí úplným vyčerpáním glukosy, návratem křivky pH na výchozí hodnotu a vyvrcholením množství mycelia. Mikroskopicky je možno pozorovat tloustnutí některých buněk, z nichž později vznikají sporangia. Kultura je připravena ke sporulaci.

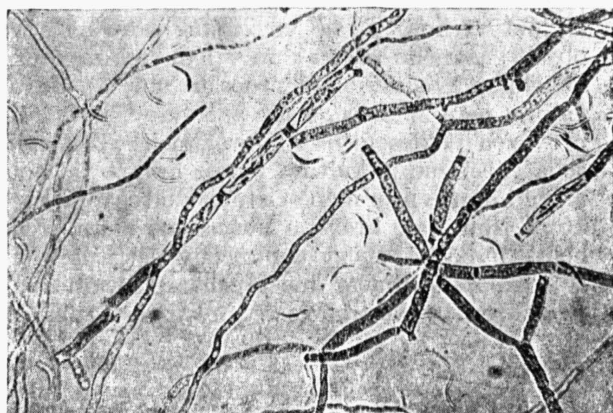
Druhá fáze, fáze syntézy riboflavinu, začíná sporulací. Již během sporulace, a zejména po ní, začíná strmě stoupat křivka obsahu celkového a vázaného riboflavinu, což svědčí o intenzivní syntéze riboflavinu uvnitř buněk. Uvolňování riboflavinu do media je nepatrné. Množství mycelia začíná vlivem nastupující autolysy zvolna klesat, alkalizace media pomalu postupuje. Respirační aktivita na glukose pokračuje v poklesu, a také endogenní respirační aktivita

Tab. 1. Fysiologické změny v rostoucí kultuře *Eremothecium ashbyi*

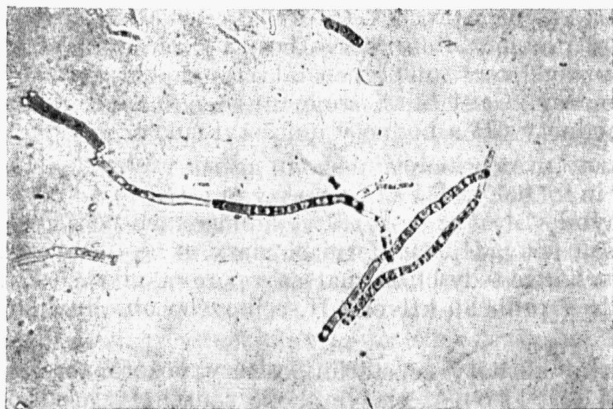
Čas		Glukosa mg/ml	pH	Sušina mg/ml	Riboflavin γ /ml			Vázaný riboflavin v 1 mg sušiny γ /mg	Aktivita katalasy $k_0 \cdot 10^5$	Q_{O_2}	
dny	hod.				celkový	uvolněný	vázaný			endogenní	glukosa
0	0	10,0	6,7	—	—	—	—	—	—	—	—
	16	7,9	5,4	1,77	5,9	—	—	—	0	20,1	73,5
1	28	0,0	6,5	3,87	11,1	—	—	—	8	22,1	65,5
	46	—	6,8	4,17	97,3	12,0	85,3	20,5	32	11,6	37,3
2	64	—	7,0	3,57	140,8	22,0	118,8	33,1	56	11,1	21,9
4	96	—	7,2	2,87	152,5	50,0	102,5	35,7	78	6,9	9,5
	112	—	7,3	2,20	149,0	86,4	62,6	28,4	68	5,7	7,7
6	160	—	7,3	1,39	160,6	150,5	10,1	7,3	41	—	—
7	184	—	7,2	1,12	—	—	—	—	32	—	—
8	208	—	7,1	0,97	158,8	153,9	4,9	5,0	26	—	—



Obr. 5. Mikroskopický obraz
24 hodin staré kultury.



Obr. 6. Mikroskopický obraz
36 hodin staré kultury.



Obr. 7. Mikroskopický obraz
6 dní staré kultury.

začíná klesat. Náhlý pokles křivky endogenní respirace v období sporulace může souviset s poklesem obsahu dostupných zásobních látek v myceliu, které se stanou nedostupnými svým převedením do vytvořených spor. Aktivita katalasy neustále stoupá. Visuálně je zahájení syntézy riboflavinu dobře patrné, neboť dosud bílé mycelium se velmi rychle stává kanárkově žlutým. V tomto období se též objevuje intenzivní čistá vůně, připomínající vůni růžového oleje. Sedimentace při centrifugaci se stává stále snadnější a rychlejší, a sediment stále nesnadněji roztřepatelný. Mikroskopicky jsou v období sporulace dobře patrná jak sporangia naplněná množstvím rohlíčkovitých spor, tak i sporangia praskající či prasklá a také volně v mediu se vyskytující rohlíčkovité spory (obr. 6). Mycelium dosud bílé, štíhlé a dlouhé se stává žlutým, tlustším a kratším.

Tato fáze přechází plynule ve fázi třetí, v níž je dominujícím procesem uvolňování riboflavinu z mycelia do prostředí. Souběžně s tím klesá množství riboflavinu vázaného v myceliu. Křivka celkového obsahu riboflavinu si uchovává svůj vzestupný charakter, svědčící o stále ještě probíhající tvorbě nového riboflavinu v myceliu, ovšem se stále se zmenšující intenzitou. Autolysa se prohlubuje a alkalizace media se zvolna zastavuje. Aktivita katalasy v tomto období vrcholí. To je ve zřejmé korelaci s vrcholem křivky znázorňující obsah vázaného riboflavinu v jednotce mycelia, a vyplývá z toho těsná fyziologická souvislost obou procesů (obr. 3). Je též patrné, že uvolňování riboflavinu není způsobeno jen autolysou, nýbrž že je to proces aktivní, neboť je provázen poklesem obsahu vázaného riboflavinu obsaženého v jednotce mycelia. Visuálně je kultura temně oranžová, homogennější a její vůně se stává méně intenzivní a méně čistou. Mikroskopicky pozorujeme stále méně vláken, která jsou stále kratší a intenzivně žlutá. Kromě toho jsou patrné prázdné blány buněčné, spory a buněčný detritus (obr. 7).

Kolem sedmého dne přechází kultura zvolna a plynule do poslední fáze charakterisované tím, že všechny fyziologické procesy se zvolňují a zastavují.

Diskuse

Z uvedeného je zřejmé, že průběh submersní fermentace *Eremothecium ashbyi* se dosti podstatně liší od průběhu fermentace stacionární, popsaného Dikanskou (1954), a to nejen tím, že všechny procesy probíhají rychleji, ale i tím, že Dikanskaja nezjistila ve svých pokusech časovou posloupnost a relativní oddělenost tří hlavních procesů, totiž růstu, syntézy a uvolňování. Podle jejich výsledků probíhá intenzita syntézy i uvolňování prakticky souběžně, a liší se pouze svou kvantitou při neustále stoupajícím a později konstantním množstvím biomasy. Další bližší srovnání je nesnadné, neboť Dikanskaja neuvádí hodnoty pH a hodnoty množství cukru.

Za to je však možno konstatovat principiální shodu našich výsledků s výsledky Mickelsonovými (1950), Pfeiferovými (1950) a Tannerovými (1949) získanými s *Ashbya gossypii* za submersních podmínek její kultivace. Tito autoři však neuvádějí množství biomasy, a neodlišují ani vázaný riboflavin od uvolněného. Je tedy bližší analýza a porovnání výsledků opět nemožné, nicméně shoda v průběhu křivek pH, celkového obsahu riboflavinu a glukosy je zřejmá.

Neustálý pokles respirační aktivity se stářím kultury pozorovala jak Dikanskaja, tak i Mickelson zcela ve shodě s našimi výsledky.

Souvislost sporulace s průběhem fermentace není dosud v literatuře popsána, stejně tak jako aktivita katalasy a její vztah k synthese riboflavinu u *Eremothecium ashbyi*.

Z ostatních autorů, kteří v jiných souvislostech uvádějí údaje mající vztah ke studované otázce je možno uvést výsledky W i c k e r h a m o v y (1946), který při sledování vlivu aerace na produkci riboflavinu u *Ashbya gossypii* stanovoval pH a celkový riboflavin 4., 6., a 8. den po naočkování. Při dostatečné aeraci získal výsledky změn hodnot pH a riboflavinu shodné s výsledky našimi i výše uvedených autorů.

V práci získané výsledky i dosavadní literární údaje dávají možnost předložit jako pracovní hypotézu určitý výklad fyziologického mechanismu tvorby riboflavinu v kultuře *Eremothecium ashbyi* při submersním pěstování na komplexní plnohodnotné půdě. Je zřejmé, že až do sporulace, tedy do okamžiku zahájení syntézy, kultura energicky roste a využívá přítomný cukr. Respirace při tom probíhá přes cytochromový systém, jehož přítomnost u *Eremothecium ashbyi* dokázala D i k a n s k a j a (1954), a u *Ashbya gossypii* M i c k e l s o n (1950) 100 % inhibicí respirace mladé kultury kyanidem. V pozdějším období, po vyčerpání glukosy, respirační aktivita na glukose značně poklesne, a mizí též cytochromový systém (D i k a n s k a j a 1954). Při tom se však současně objevuje aktivita katalasy a riboflavin. Tento zjev lze vysvětlit tím, že po vyčerpání glukosy je kultura nucena využívat k energetickému zisku jiný substrát, kterým jsou zřejmě aminokyseliny. Jejich oxidační deaminaci při tom provádějí oxydasy aminokyselin, jejichž koenzymen je flavin-adenin-dinukleotid, a jejichž činnost ve funkci terminálního oxydásového systému reagujícího přímo s kyslíkem je zákonitě spjata s činností katalasy, která odbourává vznikající peroxid vodíku (K l e i n z e l l e r 1955). Přímá souvislost aktivity katalasy s obsahem riboflavinu v myceliu *Eremothecium ashbyi* je zřejmá z obr. 3. Je pravděpodobné, že se stářím kultury stoupající aktivita proteas (D i k a n s k a j a 1954) souvisí nejen s autolysou, ale i s tímto obratem v metabolismu. Deaminasami uvolněný amoniak působí při tom alkalisaci prostředí nad výchozí hodnotu pH 6,8. Tento výklad podporuje i zjištění S h o i c h i S h i m i z u a spolupracovníků (1952), kteří papírovou chromatografií našli v myceliu *Eremothecium ashbyi* nejen riboflavin, ale i jeho estery, hlavně flavin-adenin-dinukleotid, zatím co v kultivačním mediu byl nalezen pouze riboflavin. K témuž výsledku dospěl i S t á r k a (1955), který chromatograficky a elektroforesou na papíře našel v homogenátu mycelia *Eremothecium ashbyi* nejen riboflavin, ale i riboflavin-fosfát (FMN) a flavin-adenin-dinukleotid (FAD). Při tom z hodnocení podle intensity fluorescence jednotlivých skvrn bylo zřejmé, že nejvíce bylo přítomno FAD. Ve filtrátu kultury byl nalezen jen riboflavin.

Podle uvedeného je možno soudit, že primárně vytvářeným flavinem je FAD, vznikající jako koenzym aerobních deaminas. Ten je teprve později při vylučování z buňky degradován přes FMN na prostý riboflavin, vyskytující se v mediu. Přímé vysvětlení otázky, proč se tvoří enormní, nefyziologická množství riboflavinu je nutno hledat v geneticky fixované poruše buď enzymatického systému katalysujícího tvorbu FAD, nebo v nemožnosti spojení FAD s apofermentem, či v labilitě tohoto spojení. Názor, že produkce enormního množství riboflavinu je důsledek patologické poruchy, vyslovili též jiní autoři (D i k a n s k a j a 1954). Vlivem této poruchy se organismus dostává do trvalého neharmonického vztahu s vnějším prostředím, které nutí fyso-

logický mechanismus buňky ke kompensaci, t. j. k neustálé nové synthese flavinu.

Tento názor doplňují a podporují výsledky získané D i k a n s k o u (1954) při srovnání fyziologie produkujícího kmene *Eremothecium ashbyi* s neprodukujícím. Zatím co nepozorovala rozdíly v procesech růstu a autolysy, našla podstatně nižší, téměř neměřitelnou proteolytickou aktivitu u neprodukující kultury proti produkující. Naopak, respirační aktivita neprodukčního kmene byla poněkud vyšší, než produkčního, při čemž rozdíl u mladých kultur nepatrný se stářím neustále zvětšoval. Rovněž cytochromový systém byl u neaktivního kmene podstatně více vyvinut než u produktivního. Tyto výsledky přivedly autorku k vývodu, že tvorba riboflavinu u produkujícího kmene souvisí se změnami v různých enzymatických systémech.

Pokud lze považovat mechanismus enormní produkce riboflavinu u odlišných druhů mikroorganismů za stejný nebo obdobný, a někteří autoři jsou na základě četných fakt tohoto mínění (D i k a n s k a j a 1950), souvisí tento názor s hypotézou, kterou vyslovil H i c k e y (1945) ve snaze vyložit inhibiční účinek i extrémně nízkých koncentrací železa (1 γ /ml) na tvorbu riboflavinu u *Clostridium acetobutylicum*. Uvádí, že tento zjev lze vysvětlit přítomností alternujících systémů přenašečů vodíku, z nichž jeden obsahuje železo. Pokud je tento systém pro organismus dostupný, produkce riboflavinu je minimální. Jakmile však mikroorganismus vlivem nepřítomnosti železa ztrácí možnost používat tohoto systému, je nucen zintensivňovat svůj flavoproteidový systém.

Toto vysvětlení účinku železa není však přesvědčivé, neboť není jasné, jaký železo obsahující systém H i c k e y míní, uvádí-li sám, že pro *Clostridium* jako typického anaeroba je charakteristická nepřítomnost cytochromů, cytochromoxydasy, katalasy i peroxydasy. Zůstává také nejasným, proč na prosté odstranění železa z media má negativní účinek jak na růst tak na syntézu (D i k a n s k a j a 1950), a dále proč i u celé řady jiných mikroorganismů s oběma respiračními systémy nevede odstranění železa k enormní produkci riboflavinu. Kromě toho není možno takto vysvětlit produkci riboflavinu u ostatních mikroorganismů nevykazujících tuto extrémní citlivost na železo, jako je *Eremothecium ashbyi* a *Ashbya gossypii*. Jejich citlivost vůči železu je řádově stejná jako všech ostatních mikroorganismů.

Správnější je zřejmě názor L e v i t o n ů v (1946), který ve svých podrobných pokusech s *Clostridium acetobutylicum* zjistil, že inhibiční účinek železa lze vyvážit, přidáme-li ke kultuře preparát katalasy. Na základě svých experimentů dospěl k názoru, že železo nepůsobí inhibičně na vlastní tvorbu riboflavinu, nýbrž spolu s H_2O_2 vznikajícím činností flavinových oxydas působí rozklad již vytvořeného riboflavinu. Tomuto rozkladu lze zabránit buď odstraněním železa, nebo rozložením peroxydu katalasou.

L e v i t o n ů v názor je ve zřejmé shodě s předloženým výkladem fyziologického mechanismu tvorby riboflavinu, a na jeho základě lze doplnit, že citlivost či necitlivost producentů riboflavinu na extrémně malé množství železa v mediu je dána přítomností či nepřítomností katalasy v jejich buňkách.

Souhrn

Byly studovány zákonitosti v průběhu submersní fermentace *Eremothecium ashbyi* na glukoso-peptonové půdě s kvasničným extraktem. Na základě získaných výsledků jsou v průběhu fermentace odlišeny čtyři fáze.

První fáze je charakterisována intenzivním růstem biomasy, rychlým využíváním glukosy spojeným s poklesem pH. Fáze končí vyčerpáním cukrů, návratem pH na výchozí hodnotu a vyvrcholením sušiny. Aktivita katalasy je nulová, respirační aktivita značná.

Druhá fáze začíná sporulačí kultury a je charakterisována intenzivní syntésou riboflavinu. Většina vytvořeného riboflavinu je při tom vázána na mycelium. Množství biomasy vlivem nastupující autolysy klesá, pH zvolna stoupá. Respirační aktivita klesá, aktivita katalasy se zvětšuje.

Třetí fáze je charakterisována aktivním uvolňováním riboflavinu z mycelia do media. Autolysa se prohlubuje, aktivita katalasy vrcholí.

Ve čtvrté fázi se všechny fyziologické procesy zvolňují a zastavují.

Byla prokázána těsná souvislost mezi aktivitou katalasy a obsahem riboflavinu v myceliu.

Je diskutován fyziologický mechanismus tvorby riboflavinu a vysloven názor, že produkce enormního množství riboflavinu je způsobena přechodem od cytochromového terminálního respiračního typu k typu flavoproteidovému, provázenému však patologickou poruchou činnosti flavinových oxydas.

Došlo: 15. II. 1956.

Adresa autora: Dr. F. Kaprálek, Praha 2, Viničná 5.

Literatura

- Asatiani, V. S. (1953): Biochemičeskij analiz. Čast I. Gruzmedgiz, Tbilisi.
- Avi-Dor, Y., Yaniv, H. (1952): The activity of catalase in *Pasteurella tularensis* J. Bact. 63 : 751—757.
- Beesch, S. C., Shull, G. M. (1955): Fermentation. Ind. Eng. Chem. 47 : 1857—1875.
- Brestkin, A. P., Ivanova, L. A. (1955): Aktivnost preparata katalasy v atmosfere uglekislogo gaza. Biochimija 20 : 54—56.
- Dikanskaja, E. M. (1950): Sintez riboflavina mikroorganizmami. Mikrobiologija 19 : 260—274.
- Dikanskaja, E. M. (1954): Obrazovanie riboflavina mikroskopičeskim gribom *Eremothecium ashbyii*. Trudy inst. mikrobiol. 3 : 35—67.
- Dyr, J., Munk, V. (1954): Biosynthesa riboflavinu mikroorganizmy. Prům. potr. 5 : 24—27.
- Guilliermond, A. (1935): Sur un champignon nouveau isolé des capsules du Cotonnier, *Eremothecium ashbyii* et ses relations possibles avec le *Spermophthora gossypii*. C. R. Ac. Sci. 200 : 1556—1558.
- Guilliermond, A. (1936): *L'Eremothecium ashbyii*, nouveau champignon parasite des capsules du Cotonnier. Revue de Mycologie 5 : 115—155.
- Guilliermond, A. - Fontain. - Raffy, A. (1935): Sur l'existence dans *Eremothecium ashbyii* d'un pigment jaune se rapportant au groupe des flavines. C. R. Ac. Sci. 201 : 1077 až 1080.
- Hickey, R. J. (1945): The inactivation of iron by 2,2'-bipyridine and its effect on riboflavin synthesis by *Clostridium acetobutylicum*. Arch. Biochem. 8 : 439—447.
- Hošťálek, Z. (1955): Studium podmínek udržování produkčního kmene *Eremothecium ashbyii*. Dipl. práce, biologická fakulta Karlovy university, (MS), Praha.
- Kleinzeller, A. (1955): Mechanismus biologických oxydací. Chem. listy 3 : 376—442.
- Kleinzeller, A. - Málek, J. - Vrba, R. (1954): Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii. St. zdrav. nakl., Praha.
- Leviton, A. (1946): Microbiological synthesis of riboflavin, theory concerning its inhibition. J. Am. Chem. Soc. 68 : 835—838.
- Mickelson, M. N. (1950): The metabolism of glucose by *Ashbya gossypii*. J. Bact. 59 : 659—666.
- Perlman, D. - Kroll, C. L. (1954): Fermentation. Ind. Eng. Chem. 46 : 1809—1828.
- Pfeifer, V. F. - Tanner, F. W. - Traufler, D. H. (1950): Riboflavin by fermentation with *Ashbya gossypii*. Ind. Eng. Chem. 42 : 1776—1781.
- Raffy, A. (1938): Spectrographie de fluorescence de la flavine d'*Eremothecium ashbyii* en solution et des cultures de ce champignon. C. R. Soc. Biol. 128 : 392—394.

- Routien, J. B. (1949): *Crebrothecium ashbyii*. Mycologia 41 : 183—185.
- Schopfer, W. H. (1944): La biotin, l'aneurin et le méso-inositol, facteurs de croissance pour *Eremothecium ashbyii* Guill. La biosynthèse de la flavine. Helv. Chim. Acta 27 : 1017 až 1032.
- Shoichi Shimizu, Shuzo Ohara-Kyubei Minoura (1952): Riboflavin production by *Eremothecium ashbyii*. XXXII : Forms of flavin produced during cultivation. J. Ferm. Technol. 30 : 13—22. Chem. Abstracts 1954, 48 : 3449d.
- Stárka, J. (1955): Nepublikované sdělení.
- Sumner, J. B. (1941): The chemical nature of catalase. Adv. Enzymol. 1 : 163—175.
- Tomiček, O. (1949): Odměrná analyza. Čs. chem. spol., Praha.
- Wickerham, L. J. (1946): The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. Arch. Biochem. 9 : 95—98.

Ф. Капралек:

Закономерности в ходе погруженного способа культивации *Eremothecium ashbyi*

Изучались закономерности в ходе погруженной ферментации *Eremothecium ashbyi* на глюкозо-пептоновой среде с дрожжевым экстрактом. На основании обнаруженных данных в ходе ферментации различались 4 фазы.

Первая фаза характеризуется интенсивным нарастанием биомассы, энергичным использованием глюкозы, сопровождаемым понижением pH. Фаза оканчивается израсходованием глюкозы, возвращением pH на исходную величину и достижением максимального веса мицелия. Активность каталазы отсутствует, интенсивность дыхания большая.

Вторая фаза начинается спорообразованием и характеризуется интенсивным синтезом рибофлавина. Большинство созданного рибофлавина в это время связано с мицелием. Количество биомассы вследствие наступления автолиза снижается, pH медленно поднимается. Интенсивность дыхания падает, активность каталазы увеличивается.

Третья фаза характеризуется активным выделением рибофлавина из мицелия в среду. Автолиз нарастает, и активность каталазы наибольшая.

В четвертой фазе все физиологические процессы замедляются и прекращаются.

Доказана прочная связь между активностью каталазы и содержанием рибофлавина в мицелии.

Дискутирован физиологический механизм образования рибофлавина и высказано мнение, что образование чрезвычайного количества рибофлавина вызывается переходом от цитохромного терминального дыхательного типа к типу флавопротеидному, сопровождаемому, однако, паталогическим нарушением деятельности флавиловых оксидаз.

F. Kaprálek:

Phases in the submerged growth of *Eremothecium ashbyi*

Regular phenomena in the course of submerged fermentation of *Eremothecium ashbyi* on glucose-peptone nutrient medium with yeast extract have been investigated. On the base of results obtained we can distinguish 4 phases of the fermentation.

The first phase is characterized by extensive growth of the mycelium, rapid utilization of glucose and a parallel drop in pH. The phase ends when glucose is exhausted, the pH returns to the initial level and the dry weight of mycelium reaches the maximum. Catalase activity is low, respiration activity high.

The second phase begins with the sporulation and is marked by extensive synthesis of the riboflavin. The majority of riboflavin formed is bound in the mycelium. Along with the beginning of autolysis the weight of mycelium decreases and pH begins to rise. Respiration activity weakens, the catalase activity has on the other hand an increasing tendency.

The third phase is characterized by releasing of the riboflavin from mycelium in medium. Autolysis becomes more extensive, and catalase activity reaches the peak.

In the fourth phase all physiological processes attenuate and end.

Evidence is presented which indicates the relation between catalase activity and riboflavin contents of mycelium.

A physiological mechanism of riboflavin formation is discussed, and the hypothesis pronounced claiming that production of enormous quantity of riboflavin is caused by shift of the cytochrome type of terminal respiration to the flavoprotein one which is accompanied, however, with pathological disorder in flavine-oxidase action.