

## Sledování pohybu volných aminokyselin při citronovém kvašení a likvidaci odpadních vod anaerobním sirným kvašením

VLADIMÍR TOLMAN, Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, ČSAV, Praha

663.15 : 547.466

Aminokyseliny náleží k látkám, jejichž přítomnost podstatně ovlivňuje průběh mikrobiálních biochemických pochodů, a to i tehdy, jsou-li přítomny jen v nepatrných koncentracích. Neslouží pouze jako zdroje dusíku, ale fungují též jako biokatalyzátory, tj. buď vůbec umožňují biochemické reakce, nebo je určitým způsobem usměrňují. Analytické sledování aminokyselin běžnými metodami není v těchto případech vůbec možné z důvodu jejich nízké koncentrace. Předložená práce uvádí způsob kvalitativního stanovení aminokyselin metodou papírové chromatografie po předchozím jejich nahromadění na iontoměničích za současného odsolení. Metoda byla vypracována pro odpadní vody z výroby kyseliny citronové, ale může být použita beze změny i pro vody lihovarské a drožďářské.

Z novější doby je z literatury známo několik prací, zabývajících se obsahem volných aminokyselin v řepných melasách jak z kvalitativního, tak i kvantitativního hlediska. Vavruš [1], Pavlas a Melounová [2, 3] použili k rozborům klasické dvou- a třezeměrné papírové chromatografie; vypracovali také modifikaci s použitím elektroforézy [4, 5, 6]. Aminokyseliny po kyselé hydrolýze v odpadních vodách po výrobě kyseliny citronové z řepné melasy zjišťovali Grégr, Barta a Palivec [7]. Velké množství prací s příbuznou tematikou uvádějí ve své monografii Macek a Hais [8].

V roce 1959 až 1960 byl prováděn výzkum čištění odpadních vod z výroby kyseliny citronové v závodě Spolana Kaznějov [Barta [14]]. V této souvislosti bylo nutno sledovat pohyb aminokyselin během celého procesu, tj. počínaje neprokvašeným melasovým substrátem přes různé fáze citronového kvašení a následujícího zkvašování vzniklých odpadních vod až k vyčištěným vodám, opouštějícím závod. Tato sledování měla za účel zjišťovat odbourávání aminokyselin v průběhu obou kvasných procesů a stanovit, zda po citronovém kvašení jsou ve vodách přítomny aminokyseliny, důležité pro příznivý průběh anaerobního sirného kvašení, tj. cystein, ornithin, serin či isoleucin [Postgate [9, 10] a Grossman]. Kromě toho bylo nutno stanovit, nedochází-li již během vzniku odpadních vod k jejich rozkladu a uvolňování aminokyselin z přítomných bílkovin a plísňového mycelu a v průběhu sirného kvašení také z bakteriálního kalu.

Kromě analýz původních, kvasících a prokvašených substrátů byl podroben analýze i mycel z *Aspergillus niger* a bakteriální kal, odpadající v průběhu anaerobní destrukce balastů, jenž obsahoval převážně odumřelé buňky sirných bakterií rodu *Desulfovibrio*.

### Materiál a metody

Materiál k rozborům pocházel z provozní výroby kyseliny citronové v závodě Spolana Kaznějov. Byly odebrány tyto vzorky:

#### a) Citronové kvašení:

1. Substrát před kvašením
2. Prokvašený substrát
3. Prokvašený substrát — louhy po oddělení citrátu vápenatého

#### 4. Louhy po praní citrátu vápenatého

#### 5. Mycel plísňe *Aspergillus niger*

#### b) Sirné kvašení:

#### 6. Původní odpadní voda z výroby kyseliny citronové

#### 7.—9. Substrát ad 6 po 2, 4 a 6 dnech kvašení

#### 10. Bakteriální kal

Vzorky pocházely z téže výrobní šarže. V průběhu citronového kvašení nedošlo k výskytu infekce, která by mohla mít za následek vznik artefaktů.

Podmínky kvasných pochodů, původ a izolace kultur sirných bakterií a veškeré detaily mikrobiologického charakteru jsou uvedeny v práci Barty a Hudcové [11].

Vzorky 1 až 4 a 6 až 9 bylo nutno před vlastní chromatografií zbavit přítomných balastů. Proto bylo k 6 ml filtrovaného vzorku přidáno 30 ml 96% ethanolu, po 3 hod byla odsáta vyloučená sraženina a promyta 5 ml 96% ethanolu. Aminokyseliny, obsažené v čirém filtrátu, byly zachyceny na sloupci Dowexu 50 v H-cyklu (20—50 mesh; 25.1 cm), jenž byl předem preparován podle Hirse [12]. Rychlost průtoku byla 1 kapka za 10 s. Sloupec se zachycenými aminokyselinami a kationty byl promyt 30 ml destilované vody (do vymizení kyselé reakce eluátu), načež bylo nasazeno 15 ml 6% amoniaku a nakonec opět voda. Prakticky veškeré aminokyseliny byly obsaženy v prvních 10 ml amoniakálního výluhu. Tento výluh byl odpařen ve vakuu do sucha a zbytek rozpuštěn ve vodě (vzorky 1 až 3 — 2 ml, vzorek 4 — 0,4 ml, vzorky 6 až 9 — 0,5 ml vody).

Mycel (vzorek 5) byl důkladně vyprán tekoucí vodou a vysušen ve vakuovém exikátoru nad  $P_2O_5$  za laboratorní teploty. 50 mg rozdrčeného mycelu bylo zahříváno s 3 ml 37% HCl v zatavené trubici 24 hodin na 105°, obsah trubice byl odpařen ve vakuu na vodní lázni do sucha, zbytek rozpuštěn v 10 ml teplé vody, roztok filtrován odsátím a filtr promyt 5 ml destilované vody. Filtrát byl znovu odpařen ve vakuu do sucha a odparek rozpuštěn v 1 ml destilované vody.

Vzorek 10 — bakteriální kal bylo nutno před hydrolýzou zbavit značného množství železa, jež bylo přítomno hlavně ve formě FeS. Odstředěný kal byl vysušen ve vakuovém exikátoru nad  $P_2O_5$ . 2 g sušeného kalu byly třepány s 20 ml 50% kyseliny octové 4 dny při teplotě 30°, pevná hmota byla od-filtrována, promyta vodou, ethanolem a etherem a dosušena opět ve vakuu nad  $P_2O_5$ . 50 mg vysušeného promytého kalu bylo pak hydrolyzováno i dále zpracováno stejným způsobem, jak je uvedeno v předchozím odstavci.

Chromatografie byla prováděna v jednorozměrném i dvourozměrném uspořádání v sestupné úpravě. První zkoušky (při nichž bylo spíše zjišťováno kvalitativní složení vzorků) byly provedeny dvourozměrně: v I. směru fenol : ethanol : voda (2 : 1 : 1) v atmosféře vodního amoniaku (vyvíjeno 1×), v II. směru *n*-butanol : kyselina octová : voda (4 : 1 : 1), (vyvíjeno 2×). Vlastní odkvašení aminokyselin bylo pak sledováno za použití jednorozměrné



techniky; kromě obou uvedených soustav bylo k tomu účelu použito ještě soustavy fenol — pufr pH 12 podle *McFarrena* (13). Chromatogramy byly zhotoveny vesměs na papíře Whatman 2. Detekce byla prováděna postříkem 0,2 % roztokem ninhydrinu v acetonu a skvrny byly vyvolány 5 minutovým zahřátím chromatogramu na 50°.

### Výsledky

Relativní koncentrace aminokyselin jsou udány počtem křížků.

#### a) Aminokyseliny při citronovém kvašení

Odkvácení aminokyselin při citronovém kvašení je zachyceno v tabulce 1. Bylo nanášeno 10 až 40  $\mu$ l každého vzorku.

#### b) Aminokyseliny v mycelu *Aspergillus niger*

V kyselém hydrolyzátu mycelu byly nalezeny tyto aminokyseliny: kyselina asparagová, kyselina glutamová, glycin, serin, threonin,  $\alpha$ -alanin, kyseliny aminomáselné (stopy), valin, methionin, leuciny, lysin a prolin.

c) Aminokyseliny při anaerobním sirném kvašení  
Přehled zjištěných aminokyselin podává tabulka 2. Bylo nanášeno 10 až 40  $\mu$ l od každého vzorku.

#### d) Aminokyseliny v bakteriálním kalu

V kyselém hydrolyzátu bakteriálního kalu byly nalezeny tyto aminokyseliny: kyselina asparagová, kyselina glutamová, glycin, serin, threonin,  $\alpha$ -alanin, prolin, valin, methionin, tyrosin, fenylalanin, lysin, arginin a leuciny.

### Diskuse

Jak je zřejmo z tabulky 1, v průběhu citronového kvašení se ve shodě s očekáváním snižují koncentrace téměř všech původně přítomných aminokyselin. Za daných podmínek se rychle využívají kyselina asparagová, kyselina glutamová,  $\alpha$ -alanin, prolin, valin, kyselina aminomáselná a leuciny, pomaleji serin, threonin, glycin a arginin. Tyrosin se účinkem plísně *Aspergillus niger* neodbourává.

Výsledek pokusu zároveň potvrzuje, že ke konci kvasného procesu dochází k ne zcela jasným pochodům, jež mají za následek druhotné zvýšení hladiny některých aminokyselin, jak je nejlépe vidět na případě lysinu (který se objevuje teprve v prácích loužích) a kyseliny aminomáselné. Tyto aminokyseliny se mohou uvolňovat z přítomných bílkovin působením proteolytických enzymů plísně *Aspergillus niger*, popřípadě jinými, těžko definovatelnými hnilobnými pochody. Pravděpodobně zcela odlišným způsobem dochází ke zvýšení koncentrace řady aminokyselin (lysin, arginin,  $\alpha$ -alanin

Tabulka 1

Aminokyseliny v různých fázích citronového kvašení

Aminokyselina	Substrát před kvašením	Prokvašený substrát	Louhy po oddělení citrátu Ca ++	Louhy po praní citrátu Ca ++
Kys. asparagová	+++	+	+	+
Kys. glutamová	+++	+	++	++
Serin	+++	+	++	++
Threonin	+++	+	++	++
Glycin	+++	++	++	++
$\alpha$ -alanin	+++	++	++	++
Prolin	+++	+	+	+
Valin	+++	+	+	+
Tyrosin	+++	++	++	++
Kys. aminomáselná	+++	+	+++	++
Arginin	++	+	++	++
Lysin	+	+	++	++
Leuciny	++++	++	++	++

Tabulka 2

Aminokyseliny při anaerobním sirném kvašení

Aminokyselina	Původní odpadní voda před kvašením	Odpadní voda po 2 dnech kvašení	Odpadní voda po 4 dnech kvašení	Odpadní voda po 6 dnech kvašení
Kys. glutamová	++	+	+	+
Kys. asparagová	+++	++	+	+
Serin	+++	++	+	+
Glycin	++	+	+	+
Threonin	++	+	+	+
$\alpha$ -alanin	++	+	+	+
Tyrosin	++	+	+	+
Valin	++	+	+	+
Arginin	++	+	+	+
Fenylalanin	++	+	+	+
Leuciny	++	+	+	+

a kyselina glutamová) při spařování mycelu horkou vodou, aby se vyloučila vsáknutá kyselina citronová. V tomto případě zřejmě dochází za vyšších teplot k částečné hydrolyze mycelu. Tomu nasvědčuje i okolnost, že všechny uvedené aminokyseliny jsou obsaženy i v úplném kyselém hydrolyzátu mycelu.

Z výsledků uvedených v tabulce 2 je patrné, že z aminokyselin, nejvhodnějších pro růst *Desulfovibrio*, jsou v odpadní vodě přítomny serin a leuciny. Dále je zachyceno ubývání aminokyselin během sirného zkvašování odpadních vod, které nevykazuje anomálie podobné těm, jež se vyskytly u kvašení citronového. I když lze i zde předpokládat, že dochází k rozkladu hromadícího se bakteriálního kalu, nejsou změny tím způsobené tak výrazné, jak se ukázalo při citronovém kvašení a nemohou tudíž ovlivnit celkový obraz. Všechny přítomné aminokyseliny v průběhu fermentace podstatně ubývají, což potvrzuje hloubku biologické destrukce balastů tak, jak je uvedeno v jiném článku, zabývajícím se touto otázkou [Barta, Hudcová (11)].

### Souhrn

V předložené práci jsou sledovány změny v obsahu aminokyselin v průběhu výroby kyseliny citronové zkvašováním melasy a v průběhu anaerobního zkvašování odpadních vod z této výroby sirnými baktériemi rodu *Desulfovibrio*. Bylo zjištěno, že louhy po vysrážení citrátu vápenatého, resp. vody po jeho vypírání obsahují oproti prokvašenému substrátu více lysinu a kyseliny aminomáselné, práci louhy pak i více kyseliny glutamové,  $\alpha$ -alaninu a argininu. Tyto aminokyseliny se mohou dostávat do roztoku po rozložení přítomných bílkovin mikroby nebo se mohou uvolňovat i z hmoty mycelu při jeho spařování. Z aminokyselin, důležitých pro růst sirných reducentů rodu *Desulfovibrio* je v prokvašených vodách obsažen serin a leuciny.

Kromě sledování volných aminokyselin během kvasných pochodů je podán i rozbor vázaných aminokyselin v kyselých hydrolyzátech mycelu plísně *Aspergillus niger* a bakteriálního sirného kalu.

### Literatura

- [1] Vavruha, I.: Stanovení aminokyselin v melasách a melasových výpalcích roztělovací chromatografií na papíře. Listy cukrovarnické 67, 151 (1951).
- [2] Pavlas P., Melounová-Häuslerová O.: Bílkoviny těžké štávy a štěpné produkty bílkovin, vzniklé alkalickým odbouráním při čerání a saturaci. Listy cukrovarnické 72, 263 (1956).
- [3] Pavlas P., Melounová-Häuslerová O.: Chromatografická studie složení aminokyselin difusních a těžkých štáv z kampaně 1955–1956. Listy cukrovarnické 73, 50 (1957).
- [4] Pavlas P., Melounová-Häuslerová O.: Chromatografie aminokyselin difusních štáv a možnosti použití elektroforezy na papíře v cukrovarnictví. Listy cukrovarnické 71, 93 (1955).
- [5] Pavlas P., Melounová-Häuslerová O.: Chromatografická a elektroforetická rozdělení aminokyselin difusních a těžkých štáv z kampaně 1954–1955. Listy cukrovarnické 72, 35 (1956).



- [6] Pavlas P., Melounová-Häuslerová O.: Elektroforetické dělení aminokyselin v cukrovarenských produktech a důkaz kyseliny  $\gamma$  — aminomáselné a ornithinu. Listy cukrovarnické 73, 131 (1957).
- [7] Grégr V., Barta J. a Palivec A.: Závěrečná zpráva výzkumného úkolu „Čištění odpadních vod z výroby kyseliny citronové sirným kvašením“; MCHP — 14M z roku 1958.
- [8] Macek K., Hais I. M.: Bibliografie papírové chromatografie, Nakladatelství ČSAV, Praha 1960.
- [9] Postgate J. R.: On the nutrition of *Desulphovibrio desulfuricans*. J. Gen. Microbiol. 5, 714 (1951).
- [10] Grossman J. P., Postgate J. R.: Cultivation of sulphate-reducing bacteria. Nature 171, 600 (1953).
- [11] Barta J., Hudcová E.: Faktory ovlivňující odbourávání balast-

ních látek v odpadních vodách z výroby kyseliny citronové anaerobním bakteriálním pochodem. Fol. microbiologica (1961) (v tisku).

[12] Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H.: Isolation of amino acids by chromatography on ion exchange columns; use of volatile buffers. J. Biol. Chem. 195, 659 (1952).

[13] McFarren E. F.: Buffered filter paper chromatography of the amino acids. Anal. Chem. 23, 188 (1951).

[14] Barta J., Hudcová E., Tolman V.: Závěrečná zpráva výzkumného úkolu „Čištění odpadních vod z výroby kyseliny citronové a toruly“ 1960.

Došlo do redakce 15. 11. 1960.

# ИЗУЧЕНИЕ ДВИЖЕНИЯ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПРИ ЛИМОННОКИСЛОМ БРОЖЕНИИ И ОБЕЗВРЕЖИВАНИИ СТОЧНЫХ ВОД АНАЭРОБНЫМ БРОЖЕНИЕМ ВЫЗВАННЫМ СЕРОБАКТЕРИЯМИ

При помощи хроматографических методов изучались изменения содержания аминокислот возникающих в процессе производства лимонной кислоты путем сбраживания мелассы а также при обезвреживании сточных вод отходящих из таких установок путем их анаэробного сбраживания введенными серобактериями. Результаты обработаны в форме таблиц.

# VERFOLGUNG DER BEWEGUNG DER FREIEN AMINOSÄUREN BEI DER FERMENTATIVEN ZITRONSÄUREHERSTELLUNG UND BEI DER ABWÄSSERLIQUIDATION DURCH ANAEROBE SCHWEFELGÄRUNG

Chromatographisch wurden die Veränderungen im Aminosäuregehalt bei der Herstellung von Zitronensäure durch Melassegärung und bei der Liquidation der Abwässer aus dieser Produktion mittels anaerober Vergärung durch Schwefelbakterien verfolgt. Die Ergebnisse sind in zwei Tabellen zusammengestellt.

# BEHAVIOUR OF FREE AMINO ACIDS IN MOLASSES AT CITRIC FERMENTATION AS WELL AS AT ANAEROBIC SULPHURIC FERMENTATION INTRODUCED IN WASTE WATER

Various chromatographic methods were applied to study the changes taking place in the content of amino acids in the fermenting molasses used for manufacturing citric acid. The behaviour of amino acids was also studied in waste water exposed to sulphuric fermentation by introduced anaerobic bacteria. The results of research are presented in the form of tables.