

## Zhodnocení řepných melas pro výrobu kyseliny citronové z kampaně 1962

A. ČEJKOVÁ, M. VOJKOVSKÁ, J. RYBÁŘOVÁ, Výzkumný ústav lihovarského a konzervářského průmyslu, Praha

664.15.547.477.1

Základní surovinou pro kvasnou výrobu kyseliny citronové v Československu je řepná melasa. Složení melasy je ovlivněno nejen technologií zpracování řepy v cukrovarech, ale v nemenší míře podmínkami klimatickými podmínkami kultivace cukrovky a délkou jejího skladování. Použití melasy ve výrobě kyseliny citronové přináší proto řadu problémů, spjatých s otázkou kvality melas, produkovaných v jednotlivých územních oblastech a různými cukrovary.

Kvalita melasy je vedle použitého produkčního kmene mikroorganismu jedním z hlavních faktorů ovlivňujících výsledek kvašení. Zatímco některé melasy umožňují ve výrobě dosáhnout až 60 % výtěžku z nasazeného cukru, setkáváme se s melasami, které jsou na kyselinu citronovou daleko méně zkvasitelné nebo je nelze zkvasit vůbec (Seichert 1963). Rozdíly v kvalitě melas z hlediska citronového kvašení se zabývalo několik autorů. Bernhauer, Rauch, Gross (1949) uvádějí např. zkvasitelnost pro *Aspergillus niger* pouze 5 vzorků ze 14 studovaných melas.

Nevhodnost některých melas pro citronové kvašení vysvětlují Braun a Kotschopoulos (1932) obsahem melaninu, Wendel (1939), Kovats a Niestrawski (1961) těžkými organickými kyselinami, Vergnaud a Niquet (1955) vysokou pufrací schopností melasy, Žuravskij aj. (1953) m. j. vysokým obsahem dusíku a fosforu, jiní autoři obsahem minerálních látek, zejména pak těžkých kovů (Perlman, Kita, Peterson 1946; Puente a Requeiro 1961; Usami a Taketomi 1962).

Použití melasy jako výchozí suroviny umožňuje však levnou výrobu kyseliny citronové a proto byly hledány způsoby úpravy melas pro zlepšení průběhu kvasného procesu. Jedním z nejrozšířenějších způsobů je úprava melasy přidávkou ferrokyanidu draselného, která byla předmětem patentové přihlášky Mezzadrolho (1937) a našla opodstatnění v řadě prací (Gerhardt, Dorrell, Baldwin 1946; Martin a Waters 1952; Leopold a Valtr 1960 aj.). Hlavní účinek ferrokyanidu spočívá ve snížení obsahu železa na hladinu, která neinhibuje syntézu kyseliny citronové (Underkofler a Hickey 1959) a odpovídá asi 0,2 mg % volného železa v melasovém roztoku (Žuravleva 1958). Optimální přírůstek ferrokyanidu se stanoví pro jednotlivé melasy biochemickým testem, který však udává hodnotu vyšší, než jaké by bylo zapotřebí ke snížení hladiny železa: přebytek  $K_4Fe(CN)_6$  se spotřebuje na vysrážení dalších minerálních látek, např. vápníku, křemíku, zinku a některých organických látek melasy, zejména betainu (Žuravleva 1958). Část přírůstku ferrokyanidu zůstává v roztoku ve volném stavu a zdá se, že pozitivně ovlivňuje kvasný proces (Těrentjeva 1959) Kowats, Lewicka a Kaminski (1957) dosáhli max. výtěžku kyseliny citronové na polských melasách s přidávkou 0,03 až 0,07 % ferrokyanidu; Martin a Waters (1952) sledovali produkci kyseliny citronové na melase Chatham z kampaně r. 1946 až 1950: max. výtěžky kyseliny dosáhli za přírůstku 0,05 až 0,08 % ferrokyanidu.

V práci byla sledována vhodnost československých řepných melas pro citronové kvašení z kampaně 1962 z 16 řepářských oblastí a 24 cukrovarů. Bylo přihlédnuto k technologii zpracování řepy v jednotlivých cukrovarech a podmínkám kultivačních oblastí cukrovky s uvážením jejich event. vlivu na zkvasitelnost melas na kyselinu citronovou. Získané výsledky mohou být podkladem pro orientaci při výběru melas pro průmyslovou výrobu kyseliny citronové.

### Materiál a metodika

#### Kmen mikroorganismu

*Aspergillus niger* K 10, provozní kmen závodu Spolana, n. p., Kaznějov; kmen byl uchováván jako konzerva suchých spor s karborafinem.

#### Substrát

Melasové zápary byly připraveny z průměrných kampaňových vzorků řepných melas předaných Výzkumným ústavem cukrovarnickým. Původ a složení melas uvádí tabulka. Melasy byly zředěny destilovanou vodou na obsah asi 15 % cukru, přidáno 0,045 g  $H_3PO_4$ /l zápary, 0,75 až 2,1 g  $K_4Fe(CN)_6$ /l a pH upraveno  $H_2SO_4$  (1:9) na 6,6 (Leopold a Valtr 1961). Po 15minutovém varu byla zápara rozlita po 100 ml do 300 ml Erlenmeyerových baněk, pH upraveno na 6,6 a sterilována při 1,1 at po dobu 40 minut. Stejným způsobem byla připravena zápara ze standardní melasy, která byla souběžně zkvašována.

#### Inokulum

Spory byly připraveny kultivací kmene z karborafinové konzervy v tekuté půdě podle Moyera a Leopolda (Leopold 1955) při 30 °C po dobu 9 dnů s následnou kultivací na tuhé půdě podle stejných autorů v 300 ml Erlenmeyerových baňkách se 100 ml půdy. Po 5 dnech kultivace byly spory asepticky seškrábány do 50 ml Erlenmeyerových baněk. Každá baňka obsahovala 9 g sterilního karborafinu jako nosiče a spory seškrábané ze 2 baněk. Pokusné baňky byly zaočkovány rozprášením této suspenze spor proudem vzduchu.

#### Kultivace

Povrchová kultivace probíhala v temperované komoře při 30 ± 1 °C po dobu 9 dnů. Každý pokus byl proveden ve 3 paralelních baňkách.

#### Použité sklo

Varné baňky zn. Sial pro přípravu zápary a Erlenmeyerovy baňky zn. Sial pro kvasné pokusy byly před použitím vyvařeny s kyselinou chlorovodíkovou, zředěnou 1:1 a vymyty vodovodní a destilovanou vodou.

### Analytické metody

#### Příprava vzorku

Po inkubaci byl substrát slit, narostlé mycelium povařeno s 50 ml destilované vody; po filtraci byly tekutiny spojeny a doplněny na 200 ml dest.  $H_2O$ .



### Stanovení kyseliny citronové

a) Titračně 0,1 N NaOH s fenolftaleinem jako indikátorem. Spotřeba louhu byla vyjádřena jako bezvodá kyselina citronová.

b) Komplexometricky podle *Leopolda a Valtra* (1958, a, b) jako měďnato-citrátový komplex. Zjištěné množství vyjádřeno jako bezvodá kyselina citronová.

### Stanovení vedlejších kyselin

Jejich množství odpovídá rozdílu mezi titračním a komplexometrickým stanovením kyseliny citronové.

### Chromatografické sledování kyselin

Byla použita sestupná chromatografie na papíru Whatman 4 v rozpouštědlové soustavě n-butanol + kyselina mravenčí + voda v poměru 10:1:5. Detekce 0,5% roztokem bromkresolové zeleni v 96% etylalkoholu.

### Stanovení pufrčního indexu zápar

Hodnota indexu odpovídá množství (g) čisté kyseliny chlorovodíkové potřebné ke snížení pH melasové zápary z 6,0 na 3,0 (*Vergnaud a Niquet* 1955).

### Cukry

Počáteční a zbytkové stanoveny Schoorlovou metodou po inverzi.

### pH

Acidimetrem AK s přesností  $\pm 0,1$  pH a papírky Phan.

### Sušina

Vytvořené mycelium bylo po povaření s destilovanou vodou odsáto na Büchnerově nálevce a sušeno při 105 °C do konstantní váhy.

## Výsledky a diskuse

Maximální výtěžnosti kyseliny citronové dosažené na jednotlivých melasách za optimálního přídatku ferrokyanidu uvádí *tabulka 1*.

Nejvyšší produkce kyseliny citronové 72,93 %, 72,01 %, 71,76 % a 70,99 % byly zjištěny na melasách ze závodů Sladkovičovo, Beroun, Smiřice, resp. Prosenice. Nejnižší výtěžnosti 34,73 %, 35,35 % a 35,37 % byly pozorovány na melasách z Uničova, Mělníka a Opavy. Srovnáním údajů chemické analýzy nelze zjistit mezi těmito melasami typický rozdíl jak z hlediska obsahu sacharózy, dusíku, popelovin, tak hodnot pufrčního indexu a pH.

Obsah sacharózy ve všech studovaných melasách odpovídal požadavku na melasy pro citronové kvašení, neboť podle *Těrentjevy* (1959) je limitní minimální koncentrace sacharózy v melase 45 %. Uvedené koncentrace dusíku melas nedosahují hodnot, limitujících biosyntetickou aktivitu plísně: *Bernhauer, Rauch a Gross* (1949) pozorovali tvorbu kyseliny citronové na melase s obsahem 3,33 % dusíku. Stejně tak hodnoty pufrčních indexů leží v rozmezí, které je podle citovaného anglického patentu (1958) optimální pro tvorbu kyseliny citronové a činí pro srovnání v přepočtu na koncentraci 2,5 % cukru v zápare 0,95 až 1,52: patentovou přihláškou udávané optimální rozpětí odpovídá 0,07 až 3,0. Za nevhodné pro citronové kvašení považuje *Těrentjeva* (1959) melasy s hodnotou pH nižší 6,5. Pouze u 3 vzorků ze studovaných melas bylo zjištěno pH s nižší hodnotou: 6,00 — Dobrovice; 6,31 — Louny; 6,42 — Trenč. Teplá. Výtěžnosti na těchto melasách činí 52,20 %; 50,27 %, resp. 61,09 %.

Na standardní melase použitý testovací kmen *A. niger* K 10 nevytváří kromě kyseliny citronové

žádné vedlejší kyseliny. Ze studovaných melas byla výlučná tvorba kyseliny citronové zjištěna na základě údajů chromatografické analýzy pouze na melase ze závodu Žatec. V ostatních případech se vytvářela vedle kyseliny citronové kyselina glukonová, u 11 vzorků kyselina 5-ketoglukonová; kyselina šťavelová byla zjištěna na melase ze závodu Opava, jantarová — ze závodu Uničov. Tvorbu kyseliny šťavelové v závislosti na typu zkvašované melasy studoval u téhož kmene *Leopold a Valtr* (1960): množství vytvářené kyseliny šťavelové se měnilo na studovaných melasách podle koncentrace přidávaného ferrokyanidu současně se změnou v produkci kyseliny citronové. Podobně v našich pokusech přidávky ferrokyanidu v daném rozmezí měnily u jednotlivých melas kromě výtěžnosti kyseliny citronové charakter produkovaných vedlejších kyselin. Se zvyšující se koncentrací ferrokyanidu nad optimální pro syntézu kyseliny citronové zpravidla stoupala tvorba vedlejších kyselin. V některých případech (Dobrovice, Louny, Předměřice, Slatiňany) se vytvářela kyselina šťavelová, která v záparách s nižší koncentrací ferrokyanidu nebyla zjištěna. U ostatních vzorků vyšší přidávky  $K_4Fe(CN)_6$  stimulovaly tvorbu kyseliny glukonové. Celkové množství kyselin podle titrační acidity však, vlivem přidávek ferrokyanidu vyšších než optimálních, nestoupalo.

Morfologie plísně se měnila jak vlivem typu melasy, tak přidávkou ferrokyanidu. U většiny melas byla pozorována v případech s nejnižšími koncentracemi ferrokyanidu sporulace mycelia. Se stoupajícím množstvím přidávaného ferrokyanidu do těchto zápar byla sporulace potlačena se současným zvýšením produkce kyseliny citronové. Stejnou závislost pozorovali *Puente a Requeiro* (1961) při srovnávacím studiu řepných a třtinových melas. Melasy, na nichž nebyla pozorována sporulace (Úžice, Beroun, Židlochovice, Slatiňany, Předměřice, Hr. Týnec) poskytovaly max. výtěžek kyseliny citronové již za nejnižšího použitého přídatku ferrokyanidu (0,75 g/l). Zelená pigmentace mycelia, projevující se v případě melasy Dobrovice, Mělník a Sladkovičovo na záparách s nízkou koncentrací ferrokyanidu (0,75 až 1,20 g/l zápary) a doprovázená slabou produkcí kyseliny citronové, byla eliminována vyššími přídávky  $K_4Fe(CN)_6$ . Tyto melasy poskytovaly max. výtěžek kyseliny citronové na záparách s koncentrací ferrokyanidu 1,65 až 2,1 g/l.

Ze studovaných melas byl pouze u vzorku ze závodu Uničov částečně potlačen růst mycelia bez ohledu na množství přidávaného ferrokyanidu. Slabý růst (0,76 g sušiny/100 ml zápary) byl zjištěn také v případě melasy Mělník, ovšem pouze za nejvyššího a pro tvorbu kyseliny citronové v tomto případě optimálního přídatku ferrokyanidu. Menší koncentrace ferrokyanidu stimulovaly růst mycelia (2,28 g sušiny na 100 ml zápary při 1,2 g ferrokyanidu/l), ale s nižší tvorbou kyseliny citronové (26,96 %). Obě melasy poskytovaly nejnižší výtěžek kyseliny citronové ze všech studovaných vzorků.

Srovnáním výtěžnosti kyseliny citronové na melasách ze závodů s různou technologií, tj. ze surováren (SU) anebo závodů, vyrábějících smíšené zboží (SM) se nepodařilo stanovit závislost mezi technologií cukrovárenské výroby a vhodností odpovídajících melas pro citronové kvašení. Třebaže melasy ze surováren Brodce, Litol, Úžice, Beroun, Smiřice a Hroch. Týnec poskytují vyšší výtěžky kyseliny citronové než závody ze stejných oblastí, ale produkující smíšené zboží, přesto tato zjištění nemají obecnou platnost: výtěžnost kyseliny citronové



Tabulka 1

Analýza melas														Charakteristika neupravených 15% melas				Analýza melasových zápar				
														před pokusem				Po 9 dnech kvašení				
podnik	oblast	závod	techno- logie	sacha- rizace (gBg *)	pola- rizace (*)	Cler- get (%*)	popel na 100 g melasy (g*)	dušik (%*)	pufrač- ní index g HCl/l	pH	cukry %	opti- mální konc. K <sub>2</sub> Fe (CN) <sub>6</sub> g/l	pH	cukry %	sušina g/100 ml	kyselina citronová			Vedlejší organické kyseliny chromatograficky			
																titrač- ní aci- dita %	kom- plexo- metric- ky %	výtěž- nost % **)	gluko- nová	šfave- lová	5-keto- gluko- nová	
Kolínské cukrovary	A	Dobruvice Brodce	SM SU	73,6 78,4	52,0 51,2	51,1 49,9	7,4 9,0	1,34 1,60	7,33 9,12	6,00 7,40	16,80 16,45	1,85 1,20	2,91 2,82	— 1,71	1,83 1,31	8,82 10,05	8,77 10,35	52,20 82,91	++ +	— —	— —	— —
	B	Litol Český Brod	SU SM	78,4 79,2	50,1 53,5	49,7 52,6	8,4 7,6	1,24 1,49	10,30 8,07	7,65 9,50	16,87 14,75	1,20 0,75	2,88 3,20	2,51 2,27	1,27 1,86	11,48 10,27	11,53 9,91	68,34 67,18	++ +	— —	++ +	— —
Pražské cukrovary	A	Mělník Úžice	SM SU	79,5 77,2	49,3 52,3	47,8 52,2	8,8 9,2	1,41 1,47	10,24 9,95	7,38 8,75	17,20 15,40	2,10 0,75	3,23 2,72	7,08 1,30	0,76 1,64	6,00 10,62	6,08 9,32	35,35 60,51	++ +	— —	— —	— —
	B	Modřany Beroun	SM SU	79,4 75,6	51,1 46,3	50,8 46,2	9,2 8,6	1,88 1,59	8,75 9,27	8,22 7,80	16,22 15,65	1,65 0,75	2,74 2,75	1,26 1,46	1,67 1,53	11,13 11,28	10,33 11,27	63,68 72,01	++ stopy	— —	— —	— —
Severočeské cukrovary	A	Louny Žatec	SM SU	79,0 80,8	51,4 51,5	50,6 51,0	8,8 8,8	1,42 1,82	8,38 9,32	6,31 7,38	16,55 14,70	1,20 0,75	2,78 3,09	1,30 6,67	2,86 1,89	10,20 6,84	8,32 6,44	50,27 43,80	stopy —	— —	— —	— —
	A	Smřice Předmětice	SU SM	82,0 79,6	50,6 54,1	50,5 52,8	11,2 8,8	1,94 1,64	9,53 9,37	8,83 8,50	17,00 15,50	1,20 0,75	3,00 2,97	1,22 1,40	1,71 2,07	11,90 9,72	12,20 9,44	71,76 60,50	stopy stopy	— —	++ ++	— —
Východočeské cukrovary	B	Slatiňany Hroch. Týnec	SM SU	75,7 79,6	52,3 53,5	51,2 52,8	9,4 8,7	1,70 1,66	9,37 7,92	8,50 9,40	15,90 16,80	0,75 0,75	2,89 2,60	3,28 1,32	1,66 1,91	9,80 12,64	9,87 10,98	80,81 65,35	++ stopy	— —	— —	— —
		Židlochovice	SU	79,8	52,1	51,3	9,0	1,66	8,93	7,46	19,10	0,75	2,90	0,87	1,82	11,34	12,68	68,38	stopy	—	+	—
Středo- moravské cukrovary	A	Uh. Hradiště Bedihošť	SM SU	80,1 79,2	54,9 53,8	54,0 51,6	9,2 9,3	1,51 1,47	7,87 8,75	6,80 7,53	18,80 16,30	1,20 0,75	2,70 2,95	1,20 1,21	1,76 2,33	12,94 10,61	12,05 10,22	64,09 62,69	stopy stopy	— —	++ ++	— —
	A	Uničov	SM	79,6	55,3	53,4	8,0	1,30	8,70	7,56	17,30	2,10	2,90	5,18	0,80	7,57	6,01	34,73	++	—	—	++
Severo- moravské cukrovary	B	Opava	SM	77,4	53,3	51,7	8,5	1,41	9,12	8,90	16,0	1,20	3,05	1,79	1,30	5,31	5,66	35,37	+	stopy	—	—
	C	Brdek	SM	77,9	52,8	51,6	9,9	1,46	8,62	8,05	16,20	1,65	2,65	1,06	1,28	10,95	9,79	60,43	stopy	—	—	—
Slovenské cukrovary	A	Prosenice	SM	79,6	53,5	52,1	9,3	1,44	8,45	8,46	15,10	1,20	2,85	1,09	1,60	11,39	10,72	70,99	+	—	+	—
	A	Trenč. Teplá	SM	76,1	52,3	51,4	8,9	1,33	9,52	6,42	16,40	1,65	2,75	1,20	1,30	11,58	10,02	61,09	+	—	—	—
	B	Sladkovičovo	SM	83,0	51,2	50,3	10,3	1,70	9,12	6,50	14,30	1,65	2,90	0,84	1,53	11,46	10,43	72,93	++	—	+	—
	C	Trebišov	SM	79,6	51,7	51,4	10,9	1,48	9,70	7,38	19,80	0,75	2,91	1,59	2,04	13,65	12,87	85,55	+	—	+	—
Standardní melasa									9,03	7,22	15,60	2,10	2,81	0,48	1,31	9,67	9,81	62,82	—	—	—	—

\*) Údaje analýzy vč. \*\*) Počítáno na vnesený cukr.



na melase ze závodu Bedihošť (SU) činí 62,69 % a ze závodu Uh. Hradiště (SM) 64,09 %; podobně na melase ze závodu Žatec (SU) 43,80 % a ze závodu Louny (SM) 50,27 %. Vysoká výtěžnost byla také zjištěna na melasách ze závodů na smíšené zboží v Prosenici, Sladkovičovu a Trebišova: 70,99 %, 72,93 %, resp. 65,55 %.

Získané výsledky poskytují informaci o vhodnosti některých československých melas pro citronové kvašení; neukazují však závislost mezi chemickými a fyzikálními vlastnostmi melas, vyplývajícími z uvedených analýz nebo jejich původem na jedné a průběhem citronového kvašení na straně druhé. Toto zjištění souhlasí se závěry *Bernhauera, Raucha a Grosse* (1949) ze studia německých řepných melas z hlediska jejich vhodnosti pro citronové kvašení.

V práci provedené pokusy potvrdily názor řady autorů, že jediným kritériem výběru melasy pro citronové kvašení zůstává biochemický test s produkčním kmenem mikroorganismu.

### Souhrn

Byla sledována vhodnost 24 československých řepných melas z kampaně r. 1962 pro citronové kvašení s použitím produkčního kmene *Aspergillus niger* K 10 jako testovacího organismu. Max. dosažené výtěžnosti kyseliny citronové odpovídaly 71,76 až 72,93 % počítáno na vnesený cukr na melasách ze závodů Beroun, Prosenice, Smiřice a Sladkovičovo. Podle obsahu sacharózy, dusíku, popelovin, hodnot pufračního indexu a pH se tyto produkční melasy nelišily od melas, poskytujících max. 34,73 až 35,35 % kyseliny citronové. Jednotlivé vzorky melas různě ovlivňovaly kromě produkce kyseliny citronové tvorbu vedlejších kyselin a morfologii plísně. Získané výsledky mohou být podkladem pro orientaci při výběru melas pro průmyslovou výrobu kyseliny citronové.

### Literatura

[1] Improvements in or relating to a process for producing citric

ОЦЕНКА СВЕКЛОВОЙ МЯЛАСЫ ПРОИЗВОДСТВА 1962 г. ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ЗАВОДОВ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

В статье приводятся результаты изучения свойств свекловичной мялассы производства 1962 г. Образцы мялассы, полученные от 24 чехословацких сахарных заводов, оцениваются по критерию их поведения при лимонном брожении. Таблицы, разработанные на основании полученных статистических и аналитических данных облегчают выбор мялассы, отвечающей своим качеством требованиям заводов изготовляющих из ней лимонную кислоту.

BEWERTUNG DER RÜBENMELASSEN FÜR DIE ZITRONENSÄUREFABRIKATION AUS DER KAMPAGNE 1962

Es wurde die Eignung der Rübenmelasse aus der Kampagne 1962 aus 24 tschechoslowakischen Zuckerfabriken zu der Zitronengärung verfolgt. Die in Tabellen zusammengestellten statistischen und analytischen Daten sowie auch die angewendete Methodik können auch in den kommenden Jahren bei der Auswahl und Bewertung der Melassen für die Zitronensäurefabrikation guten Dienst leisten.

QUALITY OF SUGAR BEET MOLASSES OF 1962 CROP DESIGNATED FOR PLANTS MANUFACTURING CITRIC ACID

Samples of sugar beet molasses collected from 24 sugar mills in Czechoslovakia have been tested to ascertain their quality and behaviour during citric fermentation. All the statistical and analytic data are presented in the form of tables permitting to choose molasses having satisfactory properties required by plants using molasses as raw material for manufacturing citric acid.

- acid by aerobic fermentation of solutions containing molasses. Angl. pat. 797,390 (1958).
- [2] Bernhauer K., Rauch J., Gross G.: Über die Säurebildung aus Zucker durch *Aspergillus niger*. XIII. Die Citronensäurebildung aus Zuckerrübenmelasse in der Oberflächenkultur. Bioch. Zeit. **319**, 469 (1949).
- [3] Braun V., Kotschopoulos M.: Über die Biochemische Eigenschaften und die unterschiedliche Vergärbarkeit der verschiedenen Melassearten. Bioch. Zeit. **254**, 393 (1932).
- [4] Gerhardt P., Dorrell W. W., Baldwin I. L.: Citric acid fermentation of beet molasses. J. bacter. **52**, 555 (1946).
- [5] Kovats J., Lewicka M., Kaminski S.: Badania nad różnymi melasami do celów fermentacji cytrynowej. Przem. spoż. **11**, 156 (1957).
- [6] Kovats J., Niestrawski I.: Die Herstellung von Citronensäure aus Rübenmelasse. Z. Zuckerind. **11/85**, 495 (1961).
- [7] Leopold J.: Pokusy k zesílení schopnosti řady kmenů *Aspergillus niger* tvořit citronovou kyselinu. Záv. zpr. Spolana, n. p., Kaznějov (1955).
- [8] Leopold H., Valtr Z.: Die Bestimmung der Gluconsäure und Citronensäure. I. Die Bestimmung der Gluconsäure in Form des Kupfer-Gluconat Komplexes. Nahrung **2**, 464 (1958)a.
- [9] Leopold H., Valtr Z.: Die Bestimmung der Gluconsäure und Citronensäure. II. Die Bestimmung der Citronensäure in Form des Kupfer-Citrat Komplexes. Nahrung **2**, 532 (1958)b.
- [10] Leopold H., Valtr Z.: Über die Bildung von Oxalsäure in Verläufe der Citronensäuregärung. Zbl. Bakter. II. Abt. **113**, 369 (1960).
- [11] Leopold J., Valtr Z.: Způsob zvýšení výtěžku kyseliny citronové, vyráběné kvasnou cestou z melasy. Čs. pat. 100,940 (1961).
- [12] Martin S. M., Waters W. R.: Production of citric acid by submerged fermentation. Ind. Eng. Chem. **44**, 2229 (1952).
- [13] Mezzadrol G. Ital. pat. 355,081 (1937).
- [14] Perlman D., Kita D. A., Peterson W. H.: Production of citric acid from cane molasses. Arch. bioch. **11**, 123 (1946).
- [15] Puente A., Requeiro B.: Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. 5. Influencia de algunos factores en medio de fermentación de melasces y tratamiento de estas en fermentación superficial. Microb. espan. **14**, 209 (1961).
- [16] Seichert L.: Kinetika tvorby kyseliny citronové u plísně *Aspergillus niger*. Kand. dis. práce MÚ ČSAV (1963).
- [17] Těrentjeva O. F.: K voprosu ustanovlenija režima podgotovki melassy dlja sbraživanija v limonnuju kislotu. Novoje v proizv. lim. kisl.: 14, Centr. bjuro techn. inf., Leningrad (1959).
- [18] Underkofler L. A., Hickey R. J.: Brodilynje proizvodstva. Překl. z angl., Pišče-promizdat, Moskva (1959).
- [19] Usami S., Taketomi N.: Comparison of molasses and glucose media for citric acid fermentation. Kogyo Kagaku Zasshi **65**, 1603 (1962).
- [20] Vergnaud P., Niquet R.: Process for production of citric acid. Pat. USA 2,883,329 (1955).
- [21] Wendel F.: Brenner-Ztg. **56**, 133 (1939). Cit. Bernhauer aj. (1949).
- [22] Žuravleva E. I.: Podgotovka melassy k limonno-kislomu broženiju. Trudy VKNII, Pišče-promizdat (1958).
- [23] Žuravskij G. L., Novoselova L. V., Jelisjev M. I., Bulichman A. A., Zacharova G. S.: Proizvodstvo piščevych kislot. Pišče-promizdat, Moskva (1953).

Došlo do redakce 29. 8. 1963