Vliv výšky a povrchu substrátu a typu kvasných nádob na citrónové kvašení

LEOPOLD JINDŘICH a VALTR ZDENEK, Biochemický výzkum n. p. Spolana, závod J. Fučíka, Kaznějov u Plzně

683.5

Na výsledek povrchového citrónového kvašení má, vedle použitého produkčního kmene plísně *Aspergillus niger*, vliv celá řada faktorů jako např. druh kvasného média a jeho složení, přísady a jejich množství jakož i vnější podmínky během kvasného procesu. U jedné z nejdůležitějších přísad při použití melasového roztoku, a to u ferrokyanidu draselného se ukázalo, že jeho vliv nezávisí pouze na jeho množství, ale též na způsobu přípravy substrátu a z části na jeho výšce [1, 2]. Protože další pozorování naznačovala působení ještě jiných vnějších faktorů, byl studován vliv výšky a povrchu substrátu i tvar kvasných nádob na průběh a výsledky citrónového kvašení.

Pokusná část

Mikroorganismus: K pokusům bylo použito provozního kmene plísně *Aspergillus niger*.

Kvasné médium: Pokusy byly provedeny s melasovým roztokem, obsahujícím 15 % cukru a optimální dávky přísad ferrokyanidu draselného a kyseliny fosforečné; pH roztoku (6,5–7,0) se upraví ředěnou kyselinou sírovou. Kvasné médium pro Erlenmeyerovy baňky (obvykle 100 ml do 300 ml baňky, výška substrátu 1,8 cm) se vaří, resp. steriluje v konečné koncentraci (asi 22 °Bg) s optimálním množstvím kyseliny fosforečné (asi 4,5 mg/100 ml) a ferrokyanidu draselného (asi 100 mg/100 ml). Kvasné médium pro hrnce a kádinky s přísadami (kyselina fosforečná asi 9 mg, ferrokyanid draselný asi 75 mg/100 ml) o celkové koncentraci kolem 38 °Bg se vaří 5 min, načež se doplní biologicky nezávadnou vodou na konečný objem (15 % cukru 22 °Bg).

Analytická stanovení:

a) *Mycelium*. Zkvašený roztok z nádob, uzavřených vatovou zátkou (malý odpar), byl vpraven přes nálevku do odměrné nádoby dvojnásobného obsahu,

mycelium bylo vyvařeno vodou, která byla spojena s původním filtrátem a mycelium bylo sušeno při 105°. U pokusů v otevřených nádobách (velký odpar) byl zkvašený roztok odlit do odměrky, mycelium bylo dobře vymačkáno, vyvařeno vodou a znovu dobře vymačkáno. Výluh byl spojen s prokvašeným roztokem a vše doplněno na původní objem kvasného média. Vymačkané mycelium bylo váženo vlhké, bez sušení.

b) *Kyselina citrónová* byla stanovena acidimetricky titrací 10 ml kvasného média s 0,1 N-NaOH. Jak ukázaly příležitostné zkoušky, netvořily se cizí kyseliny.

c) *Cukr* byl stanoven v neutralizovaném roztoku podle Schoorla [3].

d) *Kysličník uhličitý a kyslík* v atmosféře kvasných pokusů byly stanoveny Orsatovým přístrojem. U válců uzavřených násypkou s vatovou zátkou byla hrdlem násypky protažena skleněná, během pokusu uzavřená, vzorkovací trubička, na jejímž konci uvnitř válce byla upevněna dírkovaná destička z polyetylenu; několika pohyby dolů a nahoru byl vzduch nad myceliem před vzorkováním homogenizován. U pokusů s otevřenými válci byla nádoba před odebráním vzorku uzavřena plochou deskou s obdobným míchacím a vzorkovacím zařízením. Vzorky vzduchu z Erlenmeyerových baňek byly odebrány bez míchání, poněvadž s ohledem na poměrně malý vzduchový prostor byly obavy ze ztrát. Každý pokus, z něhož byl odebrán vzorek vzduchu, byl samozřejmě z dalšího sledování vyřazen a zrušen.

Dále uvedené výsledky jsou běžně průměrem tří kvasných pokusů, často průměrem dvou nebo tří pokusných sérií.

Výsledky

1. Vliv výšky substrátu při konstantním povrchu

a) *Pokusy v hrncích*. Pro hrnce bylo použito melas-

sového substrátu, který byl zkvašován ve vinidurových nádobách průměru 20 cm a výšky 12 cm. Výsledky pokusů jsou sestaveny v tabulce 1.

S rostoucí výškou substrátu do 8 cm zůstává výtěžek kyseliny citrónové prakticky konstantní, při 10 cm však silně klesá. Váhy mycelií přibývají s výškou substrátu téměř lineárně, jejich produkční schopnost však klesá.

Tabulka 1

Vliv různých výšek substrátu na kvašení

Substrát		Kys. citrónová		Mycel vlhký v g
výška cm	objem l	množ- ství g	výtě- žek %	
4	1,0	92	60,5	100
6	1,5	134	59,5	168
8	2,0	180	60,0	237
10	2,5	180	48,1	318

b) *Pokusy v kádinkách.* Pokusy byly opakovány v 1 l-kádinkách průměru 10,5 s melasovým roztokem, připraveným stejným způsobem jako sub a), avšak s přísadou různých množství kyseliny fosforečné. Výsledky jsou obsaženy v tabulce 2.

I zde jsou ve všech případech výtěžky kyseliny citrónové u výšek substrátu 3,7 a 7,4 cm asi stejné, u výšky 10,7 cm klesají; bez přídavku kyseliny fosforečné se tvoří méně kyseliny citrónové než v její přítomnosti, přičemž všechna použitá množství kyseliny fosforečné měla přibližně stejný vliv na výtěžek kyseliny citrónové. Ve shodě s výsledky pokusů sub a) stoupá množství mycelií s výškou substrátu, které se ještě zvětšuje s přibývajícím množstvím kyseliny fosforečné. Aktivita mycelií klesají s rostoucí výškou substrátu.

V 1 l-kádinkách byl dále sledován vliv různých dávek ferrokyanidu draselného při různých výškách substrátu. Z obr. 1 zjistíme, že výtěžky kyseliny citrónové klesají konformně s rostoucími dávkami ferrokyanidu, stejně tak váhy mycelií, kde se vliv ferrokyanidu při výškách 7 a 10 cm více projeví než při výšce 4 cm. K porovnání je v grafu znázorněn pokles výtěžnosti kyseliny citrónové v Erlenmeyerových baňkách (výška substrátu 1,8 cm), který je mezi přídavky 100 až 200 mg ferrokyanidu méně strmý než u pokusů v kádinkách. Vliv rostoucích dávek ferrokyanidu na mycelium se i zde hodně přibližuje poměrům v kádinkách při výšce 4 cm.

Pokusy uvedené na obr. 1 byly opakovány s tou obměnou, že jedna série kádinek byla inkubována v kvasné komoře temperované proudícím vzduchem, druhá v běžných laboratorních elektrických termostatech, kde je výměna vzduchu značně menší. U pokusů v kvasné komoře byly při všech výškách substrátu zaznamenány vyšší výtěžky kyseliny citrónové a také vliv stoupajících dávek ferrokyanidu se projevil daleko méně než u pokusů v termostatech.

c) *Pokusy v Erlenmeyerových a Philipsových baňkách* (300 a 750 ml, resp. 750 ml) — Pro úplnost byly provedeny pokusy i v těchto nádobách, přesto

Obr. 1. Vliv ferrokyanidu draselného při různých výškách substrátu (1,8, 4,7 a 10 cm) na výtěžky kyseliny citrónové a na váhy mycelií

že nebylo možno zajistit při různých výškách substrátu jeho konstantní povrch. K těmto pokusům bylo použito melasového roztoku pro Erlenmeyerovy baňky. Objemům substrátu 100, 150 a 200 ml ve 300 ml Erlenmeyerových baňkách odpovídaly výšky 1,8, 2,8 a 4,3 cm, při kterých se vytvořila prakticky stejná množství kyseliny citrónové (10,8 — 10,3 — 10,4 g), zatímco výtěžky kyseliny citrónové klesly z 68,6 přes 48,1 na 34,7 %. Váhy mycelií mírně klesaly (1,57 — 1,55 — 1,33 g), protože vlivem tvaru nádoby se zmenšovala plocha mycelií (50 — 43 — 31 cm²). U pokusů v 750 ml Erlenmeyerových baňkách s objemy substrátu 250, 350 a 450 ml s korespondujícími výškami 2,6 — 4,0 — 5,5 cm je úbytek plochy povrchů (z 82 přes 72 na 59 cm²) menší než v předešlých pokusech, ale přesto se projeví v klesajících váhách mycelií (2,8 — 2,4 — 2,2 g). Výtěžky kyseliny citrónové se snižovaly z 45,8 přes 28,7 na 20,1 %. Byl-li od čtvrtého dne po naočkování foukán vzduch nad povrch mycelií, zvýšily se u těchto pokusů výtěžky kyseliny citrónové na 55,8, resp. 35,6 resp. 29,0 %.

Pokusy v Erlenmeyerových baňkách byly doplněny pokusy ve Philipsových baňkách (750 cm³), které za přibližně shodných rozměrů dna s 300 ml Erlenmeyerovými baňkami měly dát možnost sledovat vliv větších výšek substrátu na kvašení. Bylo použito objemů substrátu 150 — 250 — 300 — 350 ml s od-

Tabulka 2

Vliv různých dávek kyseliny fosforečné při rozdílných výškách substrátu

Substrát		H ₃ PO ₄ : 0			H ₃ PO ₄ : 4,5 mg			H ₃ PO ₄ : 11,25 mg			H ₃ PO ₄ : 22,5 mg		
výška cm	objem ml	kys. citrónová		mycel vlhký g	kys. citrónová		mycel vlhký g	kys. citrónová		mycel vlhký g	kys. citrónová		mycel vlhký g
		množ- ství g	výtě- žek %		množ- ství g	výtě- žek %		množ- ství g	výtě- žek %		množ- ství g	výtě- žek %	
3,7	277	23,8	52,7	15	27,4	60,8	22	26,9	59,7	23	26,9	59,7	23
7,4	555	46,2	51,8	32	55,5	61,8	42	55,0	61,0	45	53,4	62,7	55
10,7	803	56,6	42,0	50	71,9	53,1	65	72,5	53,5	73	73,8	54,7	80

povídajícími výškami 2,5 — 4,4 — 5,5 — 6,6 cm. Vytvořilo se 15,7 — 20,5 — 19,7 — 18,5 g kyseliny citrónové, její výtěžnost silně klesala (70,0 — 54,5 — 44,5 — 34,6 %), zatímco váhy mycelií mírně stoupaly (2,5 — 3,0 — 3,2 — 3,2 g); zde se tedy vliv zmenšujících se ploch mycelií (47 — 43 — 41 — 39 cm²) neprojevil.

2. Vliv velikosti povrchu substrátu při konstantní výšce

a) *Pokusy v Erlenmeyerových baňkách* — Bylo použito Erlenmeyerových baňek objemu 300, 750 a 2000 ml. Nádoby byly plněny melasovým roztokem pro Erlenmeyerovy baňky do výše 1,8 cm a po naočkování byl substrát zkvašen. Výsledky jsou v tabulce 3. S rostoucím povrchem substrátu pochopitelně rostly váhy mycelií, zatímco výtěžnosti kyseliny citrónové klesaly.

Tabulka 3

Vliv povrchu substrátu na citrónové kvašení při výšce 1,8 cm

	Objem Erlenmeyerových baňek (ml)		
	300	750	2000
Objem substrátu v ml	100	170	320
Povrch substrátu v cm ²	50	80	172
Mycel v g	1,33	2,33	5,1
Kys. citrónová v %	63,7	61,3	55,2

b) *Pokusy v hrncích* — Pokusy byly provedeny v kulatých skleněných a vinidurových nádobách různých velikostí, přibližně stejné výšky, o průměrech 8,7 — 13,0 — 14,5 — 17,0 — 20,0 a 28,5 cm v pořadí, jak jsou uvedeny v tabulce 4. Měření teploty v substrátech při kvašení v nádobách č. 3 a č. 6 byly prakticky stejné, avšak acidity u pokusů v nádobách č. 6 převyšovaly od začátku až do konce acidity pokusů v nádobách č. 3. Výsledky kvasných pokusů jsou obsaženy v tabulce 4.

Protože výška substrátu je konstantní stejně jako poměr povrchu k objemu, jsou různé výsledky jednotlivých pokusů dány absolutní velikostí povrchů. Samozřejmě přibývá s objemem substrátu, a tím zároveň s povrchem absolutní množství kyseliny citrónové a váha mycelií; nápadná však je skutečnost, že s velikostí povrchu roste výtěžnost kyseliny citrónové, jejíž hranice je přibližně dosažena u pokusů č. 6. Vyplývá to jednak z obr. 2, na kterém se křivka, znázorňující závislost výtěžků kyseliny citrónové na ploše mycelia, přibližuje maximu a ze skutečnosti, že doposud pozorované nejlepší výtěžky kyseliny citrónové v provozu s plochou mycelia 5 m² se pohybují kolem 75 %.

S ohledem na různost použitého materiálu kvasných nádob u popsáných pokusů je třeba podotknout, že pokusy byly opakovány pouze ve vinidurových nádobách stejných rozměrů jako nahoře a že se výsledky prakticky shodly s výsledky, dosaženými ve skleněných a vinidurových nádobách.

V tabulce 4 zachycené závislosti výtěžků kyseliny citrónové na ploše mycelií jsou zvlášť výrazné, neboť absolutní rozdíl ve výtěžnosti mezi pokusy v nádobách č. 1 a č. 6 činí téměř 30 %. Vyskytly se však melasy, kde tento rozdíl byl menší a na základě našich zkušeností kolísá u různých melas mezi 10 až 30 %.

c) *Pokusy v hrncích a miskách* — Poněvadž je do určitých hranic produkce mycelia při konstantní výšce substrátu zhruba přímo úměrná ploše substrá-

Tabulka 4

Vliv povrchu substrátu na citrónové kvašení při výšce 8 cm

Číslo nádob	1	2	3	4	5	6
Objem substrátu (l)	0,48	1,08	1,32	1,82	2,51	5,1
Povrch substr. (cm ²)	59	133	165	227	314	638
Mycel vlhký (g)	30	79	92	123	186	331
Kys. citrónová (g)	23,4	76,4	117,0	177,0	259,0	561,0
Kys. citrónová (%)	44,3	57,8	60,2	65,4	69,2	73,3

tu, byla věnována pozornost velikosti obvodu povrchu mycelia, který má odlišnou strukturu od ostatního mycelia a musel by se projevit tím více, čím menší je plocha mycelia. Bylo použito tří druhů vinidurových nádob se stejným povrchem (314 cm²), ale o různých délkách obvodů a sice: hrnce s obvodem povrchu 62,8 cm a obdélníkové misky (30 × 10,5 cm a 43 × 7,3 cm) s obvodem povrchů 80,9, resp. 100,6 cm. Pokusy provedené v těchto různých typech nádob, daly mezi sebou velmi shodné výsledky bez ohledu na délku obvodu. Ke srovnávacím pokusům bylo použito dvou druhů melas: u jedné melasy se pohybovaly výtěžky kyseliny citrónové mezi 76,4 a 76,9 % (váhy mycelií mezi 205 a 210 g), u druhé melasy mezi 67,6 a 69,5 % (váhy mycelií 130—133 g).

d) *Pokusy v různých vysokých nádobách* — Bylo použito vinidurových hrnců průměru 17 cm a výšky 10, 19 a 28 cm, takže při plnění substrátem do výše 8 cm byla výška stěn nad substrátem 2, resp. 11 a 20 cm. Hrnce byly naplněny stejným množstvím melasového roztoku pro hrnce a po naočkování inkubovány v komoře bez proudícího vzduchu. Ve všech pokusech byly dosaženy prakticky stejné výtěžky kyseliny citrónové, takže výška stěny nádoby nad myceliem neměla vliv na průběh kvašení.

3. Kvašení v otevřených a uzavřených kvasných nádobách

Za otevřené kvasné nádoby jsou považovány kádinky, hrnce, misky, válce, za uzavřené kvasné nádoby pak vatovou zátkou opatřené Erlenmeyerovy baňky, válce nebo hrnce, uzavřené podobně jako Erlenmeyerovy baňky.

a) *Kvasné pokusy ve válcích* — Skleněné válce průměru 9 cm a výšky 25 cm sloužily jako otevřené nebo zavřené kvasné nádoby. Byly plněny 150, 350 a 600 ml kvasného melasového roztoku pro Erlenmeyerovy baňky. To odpovídalo výškám substrátu 2,4, 5,8 a 9,0 cm. Po naočkování byly pokusy inkubovány v kvasné komoře. Výsledky obou pokusů sérií lze porovnat v tabulce 5.

Obr. 2. Závislost výtěžků kyseliny citrónové na ploše mycelia

Tabulka 5
Citrónové kvašení v otevřených (O) a uzavřených (Z)
válcích

	Výška kvasného média v cm					
	2,4		5,8		9,0	
	O	Z	O	Z	O	Z
Mycel suchý (g)	4,4	4,1	9,1	4,7	13,3	5,4
Kys. citrónová (g)	12,3	8,0	25,7	9,8	32,8	10,1
Kys. citrónová (%)	54,5	35,5	49,0	18,7	36,4	11,4
Odpařeno (ml)	107	20	115	30	170	40

Poněvadž jde o substrát pro Erlenmeyerovy baňky, klesá výtěžek kyseliny citrónové po překročení kritické výšky média (asi 4 cm). S některými melasami byly při výšce substrátu 2,4 cm nalezeny pro výtěžky kyseliny citrónové téměř shodné výsledky. U pokusů v otevřených nádobách je odpar pocho-pitelně značně větší než v uzavřených nádobách. Výtěžnost kyseliny citrónové klesá se stoupající výškou substrátu, a to v otevřených nádobách po-maleji než v uzavřených. Naproti tomu stoupá váha mycelií a množství kyseliny citrónové v otevřených nádobách prudceji než v uzavřených.

V dalších pokusech bylo zkvašováno ve válcích vždy 600 ml substrátu pro hrnce (výška 9 cm). Po-kusy byly provedeny tak, že polovina válců byla otevřena, u druhé poloviny bylo hrdlo válců uzavře-no plochou deskou s vyříznutým kruhovým otvorem průměru 7, 5 a 3 cm. Plocha hrdla otevřeného válce byla 63,4 cm², plochy vyříznutých kruhových otvorů 38,5, 19,6 a 7,1 cm². Postupným uzavíráním válců klesá odpar (330 — 330 — 275 — 160 cm²), tvorba mycelií (24,1 — 22,2 — 20,3 — 12,5 g), absolutní množství kyseliny citrónové (50,0 — 47,9 — 41,1 — 36,9 g) a její výtěžnost (55,5 — 53,1 — 45,6 — 41,0 %).

b) Kvasné pokusy v uzavřených nádobách se stej-nými resp. různými vzdušnými prostory — U dříve popsaných pokusů s různými výškami a povrchy substrátu v Erlenmeyerových baňkách bylo třeba použít nádob různých velikostí. Tím se změnila velikost vzdušného prostoru nad myceliemi.

Ke studiu vlivu i tohoto faktoru byly provedeny pokusy v kádinkách výšky 3, 5,5, 8,0 a 10,0 cm, na které byly nalepeny násypky s vatovými zátkami (obr. 3). Vznikly tak hrnce s uzávěry jako u Erl-enmeyerových baňek, přičemž se dá zkvasit substrát v různých výškách se stejně velkým vzdušným pro-storem nad povrchem mycelia: U těchto a u násle-

Obr. 3. Kvasné pokusy v uzavřených nádobách s různými, resp. stejnými vzdušnými prostory

dujících pokusů sloužil jako substrát melasový roz-tok pro hrnce. Výsledky kvasných pokusů jsou sestaveny v tabulce 6.

Tabulka 6
Vliv různých výšek substrátu se stejným vzdušným
prostorem

	Výška (cm) a objem (cm ³) substrátu			
	2—130	4,5—320	7,0—450	9,0—550
Mycel suchý (g)	3,95	4,55	3,39	2,91
Kys. citrónová (g)	11,4	12,1	12,6	12,3
Kys. citrónová (%)	53,6	24,7	18,6	14,9

Odpar je asi stejný jako v pokuse s uzavřenými nádobami (tabulka 5). S rostoucí výškou substrátu váhy mycelií nejprve stoupají, později se však sni-žují; množství kyseliny citrónové zůstává prakticky konstantní, výtěžky však silně klesají.

V dalším byly použity kvasné nádoby různých výšek, uzavřené násypkami s vatovými zátkami. Výška substrátu byla ve všech nádobách 4,5 cm, výška vzdušného prostoru mezi povrchem substrátu a okrajem nádoby 1, 2,5, 5,5 a 8,5 cm. Tím vznikly nad substrátem různé objemy vzdušných prostorů (obr. 3). Výsledek kvasných pokusů je v tabulce 7.

Odpar je u všech pokusů stejný a asi tak veliký jako u předešlých pokusů. Vliv objemu vzdušného prostoru nad myceliem na citrónové kvašení v uza-vřených kvasných nádobě se značněji projeví teprve při větší výšce kvasné nádoby, kdy tvorba kyseliny citrónové klesá.

Tabulka 7
Vliv objemu vzdušného prostoru při konstantním objemu
substrátu

	Výška vzdušného prostoru (cm)			
	1	2,5	5,5	8,5
Mycel suchý (g)	4,8	4,2	4,1	4,0
Kys. citrónová (g)	14,8	14,8	13,9	10,5
Kys. citrónová (%)	30,7	30,7	28,9	21,9

4. Stanovení kysličníku uhličitého a kyslíku během kvašení v otevře-ných a uzavřených nádobách.

Bylo použito stejných skleněných válců otevře-ných a uzavřených násypkou s vatou jako u pokusů sub 3.a). Substrát pro hrnce byl zkvašen v množství 600 ml (90 g cukru) výšky 9 cm. Během citrónového kvašení mezi 4. a 8. dnem byla provedena měření obsahu kysličníku uhličitého a kyslíku ve vzdušném prostoru kvasných nádob. V substrátu bylo stano-veno množství kyseliny citrónové a zbytkového cukru a zjištěna váha vytvořeného mycelia. Výsledky pokusů jsou sestaveny v tabulce 8.

Odpar v uzavřených nádobách byl malý a kon-stantní, v otevřených nádobách vzrostl od 22 % do 50 %. Proti pokusům v otevřených nádobách, kde množství vytvořené CO₂ kolísalo kolem 1 %, nahro-madilo se CO₂ v uzavřených nádobách od 3. dne a dosáhlo 6. dne maxima 15 %, pak opět klesalo až do konce kvašení. Vysoká koncentrace CO₂ bránila od začátku normálnímu růstu mycelia, a to se zrcad-lilo v pomalé tvorbě kyseliny citrónové a v poma-lém a nedokonalém zužitkování cukru.

Měření kysličníku uhličitého a kyslíku bylo také provedeno během citrónového kvašení v 300 ml Erl-enmeyerových baňkách se 100 ml substrátu (výš-ka 1,8 cm). Množství CO₂ se pohybovalo kolem 2 % (s maximálními výkyvy 1,6 až 2,4 %), množství kys-líku od 17,0 do 18,0 %. V těchto pokusech se tedy nahromadilo značně méně kysličníku uhličitého

Tabulka 8

Vliv kysličníku uhličitého, vytvořeného během citrónového kvašení, na jeho průběh

	Dny po naočkování					
	3	4	5	6	7	8
% CO ₂	1,0 /3,7/	1,4 /4,8/	0,8 /8,4/	1,0 /15,3/	0,9 /13,0/	0,8 /7,6/
% O ₂	19,0 /18,3/	18,8 /15,0/	19,0 /13,8/	19,6 /7,7/	19,9 /9,6/	18,2 /14,2/
Mycel suchý (g)	7,4 /1,4/	11,1 /1,7/	15,0 /3,0/	17,5 /3,1/	17,1 /4,2/	18,5 /4,0/
Kys. citrónová (g)	16,8 /5,1/	29,0 /6,7/	36,5 /9,2/	39,5 /11,7/	42,0 /13,0/	43,3 /13,4/
Kys. citrónová (%)	13,6 /5,6/	32,2 /7,4/	40,6 /9,5/	43,8 /13,0/	46,6 /14,4/	48,0 /14,9/
Zbytkový cukr (g)	42,6 /63,2/	36,6 /51,9/	30,3 /47,7/	19,6 /40,4/	13,4 /39,5/	8,6 /38,0/

V tabulce 8 uvedené hodnoty se vztahují na pokusy v otevřených nádobách, hodnoty v závorkách na pokusy v uzavřených nádobách.

v atmosféře nad myceliem než v pokusech ve válkách se stejným uzávěrem. Přírůstky mycelií byly normální (od 0,62 g 3. dne do 1,4 g 8. dne), stejně tak přírůstky kyseliny citrónové (od 15,3 % do 65,5 %).

Diskuse

Vždy bylo nápadné, že výsledky laboratorních kvasných pokusů v Erlenmeyerových baňkách a v hrncích jsou často značně rozdílné. Částečně se dají vysvětlit různými výškami substrátu a také jejich různou přípravou, která se především odráží v různých podílech ferrokyanidu ve sraženině a v roztoku [1, 2]. K tomu přistupují různé typy kvasných nádob, které se liší ještě tím, že některé jsou otevřené, jiné uzavřené.

U substrátů ve větší výšce lze předpokládat pomalejší prokvašení než při nižší vrstvě. Lze se domnívat, že u povrchového kvašení nerozhodují pouze koncentrace nutričních prvků nebo jedů v médiu, ale též jejich absolutní množství, neboť na danou plochu mycelia působí celkové množství látek, obsažených v dané vrstvě média. Skutečně bývá např. optimální koncentrace ferrokyanidu draselného pro pokusy v Erlenmeyerových baňkách s výškou substrátu 1,8 cm větší než v médiu pro pokusy v hrncích (vrstva substrátu 8 cm), kde je stejná plocha mycelia konfrontována s větším absolutním množstvím tohoto jedu než u pokusů s vrstvou média 1,8 cm. Tato okolnost spolu s typem kvasné nádoby, výměnou vzduchu aj. je příčinou existence různých kritických výšek substrátu, která je např. pro otevřené nádoby (hrnce, misky aj.) 8 až 9 cm; tuto výšku kvasného média nelze totiž překročit, aniž by se snížila výtěžnost kyseliny citrónové.

Snížení vah mycelií a výtěžků kyseliny citrónové s rostoucí koncentrací ferrokyanidu bylo při výškách média 7 a 10 cm výraznější než při výšce 4 cm (obr. 1). S rostoucí výškou média se projevuje také vliv živin, neboť přibývají váhy mycelií; tak se vytvoří např. bez přidavku kyseliny fosforečné při výšce substrátu 10,7 cm asi stejné množství mycelia jako po přísadě 11 až 22 mg kyseliny fosforečné k menší výšce substrátu 7,4 cm (tabulka 2).

Růst mycelia je normální a výstavba aktivního enzymatického systému v něm je zaručena, je-li výměna vzduchu nad myceliem dostatečná a nenahromadí-li se škodlivé množství kysličníku uhličitého. V poměrně úzkých a vysokých, avšak otevřených válkách, kde výška prostoru nad myceliem byla dvojnásobek výšky kvasného média (tabulka 5 a 8), se v atmosféře nad myceliem nahromadilo asi 1 % CO₂, přičemž kvašení probíhalo normálně. Z tohoto hlediska je pochopitelné, že mezi kvasnými

pokusy v otevřených nádobách s vysokými a nízkými okraji nebylo rozdílu. Byly-li však válce uzavřeny násypkami s vatovou zátkou, dosáhla koncentrace CO₂ až 15 %, přičemž nejnižší počáteční hodnota 3,7 % CO₂ stačila, aby výrazně brzdila růst mycelia o tvorbu kyseliny citrónové. Podle výsledku kvasných pokusů v 300 ml Erlenmeyerových baňkách by 1,5 až 2,5 % CO₂ v atmosféře ještě mělo dovolit normální průběh citrónového kvašení, což je v souladu s výsledky dříve provedených pokusů [4]. Očividně to však platí pouze pro substrát výšky 1,8 cm, neboť při vyšších výškách (až do 9 cm viz tabulku 6) nastane v uzavřených nádobách inhibice růstu mycelií, jejichž váhy s výškou substrátu nepřibývají, jak se stane za normálních podmínek (otevřené nádoby); proto zůstává tvorba kyseliny citrónové konstantní nebo její výtěžky silně klesají. Výška vzdušného prostoru mezi myceliem a uzávěrem (násypka s vatou) do 2,5 cm se neprojevuje, při výšce 5,5 cm však nastává brzdění produkce kyseliny citrónové (tabulka 7), což souvisí s nahromaděním kysličníku uhličitého. V soulase s tím je v 300 ml Erlenmeyerových baňkách s normálním průběhem citrónového kvašení ještě dostatečná výměna vzduchu, zatímco ve vysokých válkách s prakticky stejným uzávěrem (tabulka 5) vzniká silná inhibice růstu mycelia a kvasného procesu.

Pozoruhodné jsou výsledky kvasných pokusů v otevřených hrncích při konstantní výšce 8 cm a různé velkém povrchu substrátu, resp. mycelia, kde s rostoucí plochou se zvyšovaly výtěžky kyseliny citrónové (tabulka 4), přičemž ve všech případech byly vytvořeny na jednotku plochy substrátu téměř stejné váhy mycelia. Totožné výsledky kvasných pokusů se stejně velkými plochami mycelií, ale s různými délkami jejich obvodů dokazují, že s rostoucí plochou mycelií ubývající množství okrajových bunečných struktur není příčinou shora uvedeného efektu. U analogicky provedených pokusů v Erlenmeyerových baňkách se řečený efekt neukázal, naopak, s rostoucí plochou mycelií klesaly výtěžky kyseliny citrónové. Pravděpodobně vysvětlení je to, že v porovnání s hrnci jde o uzavřené nádoby, ve kterých rostoucím plochám mycelií odpovídají 4, resp. 7, resp. 10násobné objemy vzdušných prostorů: podle shora uvedených nálezů (tabulka 7) vzrůstá obtížnost výměny vzduchu s velikostí uzavřeného prostoru nad myceliem, což vede k inhibici tvorby kyseliny citrónové. Potvrzují to výsledky pokusů v 750 ml Erlenmeyerových baňkách s různými výškami substrátu (1. c), kde se ve všech případech zvýšily výtěžky kyseliny citrónové, byl-li od 4. dne po naočkování foukán vzduch nad myce-

lium. Zde se tedy neprojevovalo *Erkamou* a spol. [5] pozorované snížení výtěžků kyseliny citrónové odváděním kyslíčnicku uhličitého, který může být podle *Wood-Werkmana* asimilován plísní.

Závěr

Výsledky této práce ukázaly, že i v laboratorním měřítku není lhostejné pro výtěžky kyseliny citrónové, v jakých výškách a v jakých nádobách se substrát zkvašuje. Nejen koncentrace, ale také absolutní množství živin nebo jedu v substrátu, spolu s řadou jiných faktorů, určuje kritickou výšku substrátu. Dlouho tradovaný pojem poměr plochy k objemu substrátu [6, 7] je lépe nahradit dvěma pojmy výška a povrch substrátu, protože jednoznačně vyjadřují vliv na výsledek kvašení, zatímco veličina $\frac{\text{povrch}}{\text{objem}}$ se při konstantní výšce substrátu

nezmění. Podle našich nálezů způsobuje zvětšování plochy při konstantní výšce v určitém rozmezí zvýšení výtěžků kyseliny citrónové. Dále byla v práci objasněna důležitá otázka kvašení v otevřených či uzavřených nebo různě vysokých nádobách, přičemž

hlavním činitelem, ovlivňujícím průběh citrónového kvašení, je buď nahromadění kyslíčnicku uhličitého, nebo nedostatečná výměna vzdušného prostoru nad myceliem produkční plísně; tyto vlivy se prolínají s vlivem výšky substrátu.

Literatura

- [1] Leopold H., Valtr Z.: Zur Wirkung des Kaliumferrocyanids bei der Herstellung von Melasselösungen für die Zitronensäuregärung. I. Mitteilung. Die Nahrung 8, 37 (1964).
- [2] Leopold H., Valtr Z.: Zur Wirkung des Kaliumferrocyanids bei der Herstellung von Melasselösungen für die Zitronensäuregärung. II. Mitteilung. Die Nahrung 8, 186 (1964).
- [3] Schoorl M.: Z. Untersuch. Lebensm. 57, 566 (1929).
- [4] Leopold H., Fencel Z.: Studie über die Biosynthese der Zitronensäure III. Die Melasse als Rohstoff der Zitronensäuregärung nach dem Oberflächenverfahren. Chemische Technik 10, 507 (1958).
- [5] Erkama J., Heikinen I., Hägerstrand B.: Studies on the metabolism of *Aspergillus niger* I. Effect of aeration on the production of citric acid in surface cultures. Acta chem. scand. 3, 858 (1949).
- [6] Prescott S. C., Dunn C. D.: Industrielle Mikrobiologie, Deutscher Verl. d. Wissenschaften, Berlin 1959 (S. 484).
- [7] Foster I. V.: Chemical activities of fungi. Academic Press, New York, 1949 (Chapter 12: Citric acid).

Došlo do redakce 17. 10. 1963.

ВЛИЯНИЕ ПЛОЩАДИ ПОВЕРХНОСТИ СУБСТРАТА, ВЫСОТЫ ЕГО СТОЛБА И ФОРМЫ СОСУДОВ НА ХОД ЛИМОННОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ

На ход поверхностного брожения влияет, кроме концентрации питательных и токсических веществ, также общее количество субстрата. Это относится в полной мере также к фосфорной кислоте и ферроцианиду калия, являющимися главными составляющими паточных затворов. При брожении в горшках с увеличивающейся площадью поверхности среды выход лимонной кислоты повышается, в конических колбах Эрленмейера это влияние не обнаруживается. В открытых бродильных сосудах уровень субстрата не влияет на результаты процесса. В сосудах закрытых воронками с ватой, а также в сосудах с узкой шейкой быстро повышается концентрация углекислого газа, действующего как ингибитор развития мицелия и образования лимонной кислоты. В конических колбах Эрленмейера с объемами не превышающими 300 мл обмен воздуха проходит достаточно интенсивно, в более крупных колбах обмен является однако недостаточным. При уровне субстрата превышающем 2 см ход лимоннокислого брожения тормозится затворами.

EINFLUSS DER HÖHE UND DER OBERFLÄCHE DES SUBSTRATS UND DES GÄRGEFÄSSTyps AUF DIE ZITRONENSÄUREGÄRUNG

Bei der Oberflächengärung ist neben der Konzentration der Nähr- und Giftstoffe auch ihre absolute Menge in dem Substrat entscheidend. Das gilt auch für Phosphorsäure und Kaliumferrocyanid als wichtige Zugaben in die Melasse-Gärlösung. Mit der wachsenden Mediumfläche erhöht sich in den Gefäßen die Zitronensäureausbeute, in den Erlenmeyerkolben wurde dieser Effekt jedoch nicht festgestellt. Bei den offenen Gärgefäßen ist die Randhöhe ohne Einfluß auf die Ergebnisse. Bei der Verschlüssung der Gefäße mittels Fülltrichter mit Watte oder bei der Verengung der Gefäßöffnung häuft sich CO_2 und das Wachstum des Myzels sowie auch die Zitronensäureproduktion wird gehemmt. In den 300-ml Erlenmeyerkolben ist der Luftaustausch ausreichend, nicht jedoch bei grösseren Kolben. Die Zitronensäuregärung wird auch durch Verschlüssung bei grösseren Substrathöhen als 2 cm gehemmt.

EFFECT OF THE SUBSTRATE AREA, HEIGHT OF ITS COLUMN AND FORM OF VESSELS ON CITRIC ACID FERMENTATION

Surface fermentation is affected not only by the concentration of nutritive and toxic substances, but also by the amount of substrate. This holds true for phosphoric acid and potassium ferrocyanide as main components of molasses mash. With increasing surface area the yields of citric acid are higher, but only in pots, whereas in the Erlenmeyer flasks no difference can be observed. In open fermenting vessels the level of substrate has no effect on the results of the fermentation process. In vessels closed with funnels and cotton wool, as well as in vessels with contracting necks concentration of CO_2 is very high the result being inhibition of mycelium growth and of citric acid formation. In the Erlenmeyer flasks up to 300 ml the exchange of air is intensive enough, but in larger flasks it is not sufficient. Closing covers retard citric acid fermentation, if the column of substrate is higher than 2 cm.