

# Kultivace kvasinky *Candida utilis* na etanolovém substrátu

## IV. Izolace stimulujících látek z melasových výpalků

663.132 663.551.62 663.14.031.234

Ing. JOHANNA RYBÁŘOVÁ, Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, Praha, Ing. VÁCLAV ČERNÝ a Ing. JIRÍ REISINGER, Lachema, Kaznějov

Melasové lihovarské výpalky nepatří mezi obecně známé a používané stimulatory růstu mikroorganismů, jako jsou kukuřičný extrakt, kvasničný autolyzát apod. a o jejich stimulačním účinku se vyskytuje velmi málo prací. Zjištění, že přidávek melasových lihovarských výpalků značně stimuluje růst kvasinek *Candida utilis*, pěstovaných na etanolu, vzbudilo zájem o identifikaci látek, které jsou nositeli stimulačních účinků výpalků.

Dosavadní výzkum stimulačního vlivu výpalků na růst kvasinek na etanolu byl soustředěn na anorganickou složku, izolovanou z výpalků ve formě popela buď veškerého, nebo nerozpustného podílu [1, 2]. Zvýšení výtěžnosti přidávkou anorganických látek dodaných jednak popelem, jednak solemi prvků, které se v popelu vyskytovaly, bylo vždy nižší ve srovnání s účinkem původních výpalků; to znamená, že organické látky, obsažené ve výpalcích, se rovněž na stimulačním působení podílejí. Izolace a testování organických sloučenin výpalků je značně obtížné a náročné, neboť organický podíl představuje až 60 % hm. z celkové hmoty výpalků a zahrnuje široké spektrum látek nejrůznější povahy a chemického složení. Kromě toho obsahují výpalky podobně jako jiné přírodní materiály bezpochyby řadu složek, které dosud nebyly objeveny.

Většina literárních údajů o složení organického podílu výpalků se týká skupin chemicky příbuzných látek, především redukujících látek, dusíkatých látek, resp. různých forem dusíku (celkový, amonný, betainový, aminokyselinový, bílkovinný), dále bezdusíkatých látek, těkavých a netěkavých organických kyselin a aminokyselin; z jednotlivých sloučenin se nejčastěji uvádí obsah betainu, glycerolu, kyseliny  $\alpha$ -pyrrolidonkarbonové a glutamové. Podrobnější zastoupení organických látek v melasových lihovarských výpalcích uvádí Grégr [3]. Z dusíkatých látek se kromě kyselin glutamové nacházejí další aminokyseliny, a to leucin a *i*-leucin, serin, glycin, valin, cystin, asparagová a  $\gamma$ -aminomáselná kyselina, alanin, arginin, asparagin, tyrosin a tryptofan. Dále jsou ve výpalcích obsaženy xantin, guanin, adenin a cholin, dusíkatá barviva a také bílkoviny. Z organických bezdusíkatých sloučenin se vyskytují vedle glycerolu 2,3-butanediol, kyselina jantarová, mléčná, glykolová a šťavelová, nižší mastné kyseliny a huminové kyseliny. Ze sacharidů byly stanoveny melibióza, rafinóza, glukóza, dále rozkladné produkty sacharidů, pektinové a gumovité látky a karamelová barviva. Podle Dietricha [4] obsahují výpalky také menší množství růstových látek, a to riboflavin, pantotenovou kyselinu, biotin, pyridoxin a niacin.

K izolaci látek z melasových výpalků, stimulujících růst kvasinek, se jevila jako nejschůdnější cesta rozdělit výpalky některou známou dělicí metodou a testovat, zda se podaří nahromadit stimulující látky v některé užší frakci. K tomu účelu byla zvolena metoda gelové chromatografie, která umožňuje dělení látek na základě rozdílů ve velikosti jejich molekul. Nejznámější aplikace této metody je odsolování roztoků bílkovin [5, 6] a byla rovněž použita při pokusech o izolaci látek, stimulujících citrónové kvašení, z melasy a odpadních louhů

po výrobě kyseliny citrónové [7, 8]. Nesporná výhoda této metody vzhledem k testování získaných frakcí kultivačními pokusy je použití vody jako elučního činidla, takže není nebezpečí, že se do média zanesou cizí příměsi.

Předložená práce uvádí výsledky pokusů o izolaci stimulujících látek z výpalků rozdělením metodou gelové chromatografie. Dále je posouzena účast aminokyselin na stimulačních vlastnostech výpalků, neboť o mnohých aminokyselinách je známo, že mají růstové účinky a v této souvislosti jsou také uváděny při pěstování kvasinek na etanolu [9, 10].

## MATERIÁL A METODIKA

### Mikroorganismus

Kvasničný kmen *Candida utilis* č. 49 ze sbírky VÚKPS, Praha.

### Uchovávání produkčního kmene

Kvasničný kmen je uchováván ve formě pasty asi s 21 % hm. kvasničné sušiny. Metodika je popsána v předcházejícím sdělení [2].

### Substrát

Čistý etanol o obsahu 75,97 g abs. alkoholu/100 ml.

### Melasové lihovarské výpalky

Byly použity zahuštěné melasové výpalky z lihovaru Kojetín, které obsahovaly 77,86 % hm. sušiny, 3,74 % hm. celkového dusíku a 21,19 % hm. celkového popela.

### Živné médium

Složení základního živného média je uvedeno v předcházejícím sdělení [2]. Koncentrace etanolu v živném médiu byla 2 % obj., tj. 15,2 g abs. alkoholu/l média.

### Kultivační zařízení a postup

Kultivační pokusy byly provedeny v 500 ml třepacích baňkách, jejichž základní parametry jsou uvedeny v předcházejícím sdělení [1]. Každý pokus byl veden minimálně ve třech paralelních baňkách a výsledky byly hodnoceny zvýšením výtěžnosti kvasničné sušiny (v % hm.) proti kontrolnímu pokusu, který byl nasazován v každé pokusné řadě. Kultivace probíhaly 8 hodin, což byla doba potřebná k využití etanolu v kontrolních kultivačních podmínkách.

### Frakcionace výpalků metodou gelové chromatografie

Zařízení pro gelovou chromatografii se skládalo z písotového mikročerpádky, kolony pro gelovou chromatografii a průtokového UV-analyzátoru spojeného se zapisovačem. Toto zařízení umožnilo dělení výpalků pomocí registrace látek absorbujících světlo v oblasti 254 nm. Tento způsob registrace byl zvolen bez předpokladu, že stimulující látky by byly charakterizovány absorpcí v UV-světle. K frakcionaci byly použity dva typy gelu Sepha-



dex, a to G-100 a G-25. Rozměr chromatografického sloupce byl 2,5×40 cm, průtok destilované vody asi 20 ml/h. Charakteristika gelových sloupců byla provedena roztokem Blue Dextranu (3 mg/ml) a 0,1N roztokem  $K_2Cr_2O_7$ .

K dělení výpalků bylo na kolonu vneseno 0,2 g vzorku ve formě asi 30 % hm. roztoku zbaveného sedimentu odstředěním (20 min a při 4 000 ot/min); při každém dělení bylo provedeno pět paralelních izolací, takže byl zpracován 1 g výpalků. Odpovídající frakce byly spojeny, odpařeny na vakuovém rotačním odpařovači a vysušeny za použití olejové vývěvy. Získané frakce byly použity jednak ke kulturním pokusům, jednak k analýzám.

#### Analytické metody

Stanovení pH, kvasničné sušiny a etanolu v kulturním médiu bylo provedeno metodami popsanými v předcházejícím sdělení [1], stejně jako stanovení obsahu etanolu v substrátu a výpočet výtěžnosti.

Rozbor melasových výpalků byl proveden podle předepsaných postupů [11], stejnými postupy byl proveden rozbor frakcí výpalků.

Papírová chromatografie aminokyselin: byla provedena jednorozměrnou vzestupnou metodou čtyřnásobným vyvíjením v rozpouštědlové směsi n-butanol — kyselina octová — voda v objemovém poměru 4:1:1 na chromatografickém papíru Whatmann č. 1. K detekci byl použit 0,25 % hm. roztok ninhydrinu v acetonu a chromatogramy byly sušeny při 60 °C po dobu 20 min. Skvrny aminokyselin byly stabilizovány protažením chromatogramů v 1 % hm. roztoku  $Cu(NO_3)_2$  [12]. K identifikaci skvrn byly současně nanášeny dvě standardní směsi aminokyselin s předem zjištěným pořadím jednotlivých aminokyselin. K přípravě roztoků aminokyselin byl jako rozpouštědlo použit 20 % obj. roztok 2-propanolu.

Tab. 1. Vliv různé koncentrace melasových lihovarských výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu

Přídavek výpalků g suš./l média	Přírůstek kvasničné sušiny g/l média	Výtěžnost % hm.	Zvýšení výtěž- nosti % hm.
—	8,74	57,6	—
0,5	9,16	60,4	2,8
1	9,65	63,5	5,9
1,5	10,09	66,4	8,8
2	10,59	69,6	12,0
3	10,97	72,2	14,6
5	11,20	73,7	16,1
7	10,87	71,4	13,8
10	10,85	71,4	13,8

Stanovení aminokyselin ve výpalcích, resp. frakcích výpalků a v kulturním médiu: vzorek výpalků, resp. frakcí výpalků stejně jako vzorky kulturního média byly nejprve odpařeny na vodní lázni k suchu, výpalky, resp. frakce po předchozím zředění vodou asi na 30 % hm. roztok. Suché odparky byly potom rozpuštěny v 20 % obj. roztoku 2-propanolu a nanášeny na chromatografický papír.

Kvantitativní stanovení aminokyselin ve výpalcích bylo provedeno na automatickém analyzátoru aminokyselin.

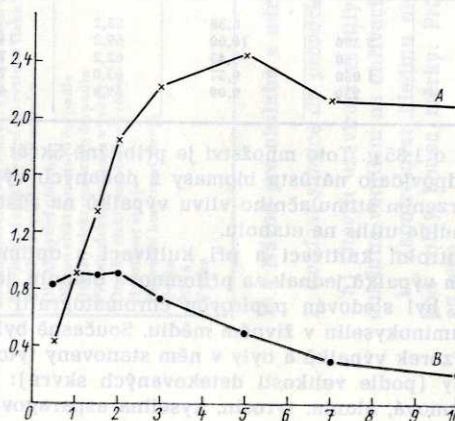
#### VÝSLEDKY A DISKUSE

##### Stimulační vliv výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu

Do živného média byly přidány výpalky v množství, které odpovídalo koncentraci 0,5 — 1 — 2 — 3 — 5 — 7 a 10 g sušiny výpalků/l média. Z výsledků kultivace uvedených v tabulce 1 je vidět, že výtěžnost stoupala se stoupajícím množstvím výpalků až do koncentrace 5 g

sušiny výpalků/l, kdy dosáhla hodnoty 73,7 % hm., tj. o 16,1 % hm. více než v kontrolní kultivaci. Vyšší přídavky, 7 a 10 g, mírně snižovaly tuto výtěžnost.

Vliv koncentrace výpalků na nárůst kvasničné biomasy je dále znázorněn graficky na obr. 1. Křivka A zobrazuje závislost přírůstku kvasničné sušiny, připadající na účet výpalků, tzn. po odečtení kvasničné sušiny, získané v kontrolní kultivaci a křivka B znázorňuje stejnou závislost, ale vztahenou na jednotné množství výpalků, a to 1 g sušiny výpalků/l. Z průběhu křivky B je zřejmé, že větší stimulační účinek vykazovaly nižší přídavky výpalků, a to 0,5 až 2 g sušiny výpalků/l; vyšší přídavky byly méně efektivní. Jako optimální přídavek bylo dále používáno množství výpalků, vnášející 2 g sušiny/l média.



Obr. 1. Vliv koncentrace výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu

Osa x — sušina výpalků g/l, osa y — kvasničná sušina g/l, křivka A — závislost přírůstku kvasničné sušiny na celkovém množství výpalků, křivka B — závislost přírůstku kvasničné sušiny vztaheného na 1 g výpalků

Tab. 2. Stanovení volných aminokyselin v kulturním médiu při kontrolním pokusu a pokusu s výpalky  
Z — začátek kultivace K — konec kultivace

Aminokyselina	Kontrolní kultivace		Kultivace s výpalky			
	Z	K	s etanolem		bez etanolu	
	Z	K	Z	K	Z	K
cystin	—	—	—	—	—	—
lysin	—	—	—	—	—	—
histidin	—	—	—	—	—	—
arginin	—	—	—	—	—	—
kyselina asparagová	—	—	+	—	+	—
serin	—	—	++	—	++	—
glycin	—	—	++	—	++	—
kyselina glutamová	+	+	+++	+	+++	+
treonin	—	—	—	—	—	—
alanin	+	+	+++	+	+++	+
prolin	—	—	?	—	?	—
tyrosin	—	—	+	—	+	—
kyselina $\gamma$ -aminomáselná	—	—	?	—	?	—
valin	—	—	++	—	++	—
fenylalanin	—	—	+	—	+	—
leucin + i-leucin	—	—	++	—	++	—

Při použití melasových výpalků jako suroviny pro krmné kvasinky je obvykle získávána výtěžnost 11 %, vztahená na sušinu dodaných výpalků [3]. Při kultivaci kvasinek *Candida utilis* v médiu bez etanolového substrátu pouze s optimálním přídavkem výpalků byl získán přírůstek kvasničné sušiny 0,39 g/l, který odpovídal výtěžnosti 19,5 % hm., vztaheno na sušinu dodaných výpalků. Z hodnot uvedených v tabulce 1 lze vypočítat, že přítomnost stejného množství výpalků v médiu s etanolovým substrátem způsobila zvýšení přírůstku kvasnič-



Tab. 3. Vliv frakcí výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu

Vzorek	Sušina vzorku g/l média	Výtěžek kvasničné sušiny g/l média	Výtěžnost % hm.	Zvýšení výtěžnosti % hm.
—	—	8,45	55,6	—
výpalky	2 250	10,28	67,6	12,0
frakce I	100	8,05	53,0	-2,6
frakce II	2 170	10,14	66,8	11,2
—	—	8,25	54,3	—
výpalky	2 300	10,16	66,8	12,5
frakce A	210	8,69	56,7	2,4
frakce B	770	9,42	62,0	7,7
frakce C	1 260	9,85	64,9	10,6
frakce D	40	8,20	54,0	-0,3
frakce B + C	2 030	9,80	64,5	10,2
—	—	8,38	55,2	—
výpalky	2 300	10,60	69,2	14,0
frakce 1	730	9,45	62,2	7,0
frakce 2	1 050	9,57	63,0	7,8
frakce 3	250	9,09	59,8	4,6

né sušiny o 1,85 g. Toto množství je přibližně 5krát vyšší, než by odpovídalo nárůstu biomasy z dodaných výpalků a je potvrzením stimulačního vlivu výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu.

Při kontrolní kultivaci a při kultivaci s optimálním přídatkem výpalků jednak za přítomnosti etanolu, jednak bez něho, byl sledován papírovou chromatografií obsah volných aminokyselin v živném médiu. Současně byl analyzován vzorek výpalků a byly v něm stanoveny tyto aminokyseliny (podle velikosti detekovaných skvrn): kyselina glutamová, alanin, tyrosin, kyselina asparagová, valin, leucin a i-leucin, serin, glycin a fenylalanin. Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná a prolin, které byly stanoveny kvantitativně na analyzátoru, nebyly na chromatogramech zřetelně detekovány.

Výsledky chromatografického stanovení volných aminokyselin v kultivačních médiích na začátku a na konci kultivací uvádí tabulka 2. Všechny aminokyseliny, vnášené přídatkem výpalků, byly kvasinkami využity kromě stopových množství kyseliny glutamové a alaninu, které se objevily i v kontrolním pokusu na začátku i na konci kultivace.

#### Frakcionace výpalků gelovou chromatografií

O stimulačních vlastnostech melašových výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu bylo zatím zjištěno, že jsou za ně značným dílem zodpovědné anorganické látky, izolované z výpalků zpopelněním. Účast organických sloučenin výpalků na stimulaci nebyla dosud sledována, pouze se předpokládá, že některé z nich, např. aminokyseliny, by mohly mít značný význam. Třídění sloučenin výpalků na anorganické a organické látky neodpovídá zcela skutečnosti, neboť řada sloučenin organické povahy je vázána na anorganické látky, např. kyseliny, které jsou ve výpalcích ve formě draselných nebo sodných solí. To znamená, že v různých frakcích výpalků, získaných gelovou chromatografií, se bude kromě organických sloučenin vyskytovat současně menší nebo větší množství anorganických látek a tuto skutečnost nelze při hodnocení účinků jednotlivých frakcí opomenout.

#### a) Dělení výpalků na gelu Sephadex G-100

Pro dělení výpalků byl nejprve použit gel Sephadex G-100 s mezí vyloučení odpovídající molekulové hmotě 100 000, který umožňuje dělení látek s širokým rozmezím molekulových hmot. Pro sloupec gelu o rozměrech 2,5 X 39,8 cm byly stanoveny tyto parametry:

celkový objem  $V_t$  . . . . . 195 ml,  
vnější objem  $V_o$  . . . . . 69 ml,

vnitřní objem  $V_i$  . . . . . 115 ml,  
objem gelové náplně  $V_m$  . . . . . 11 ml.

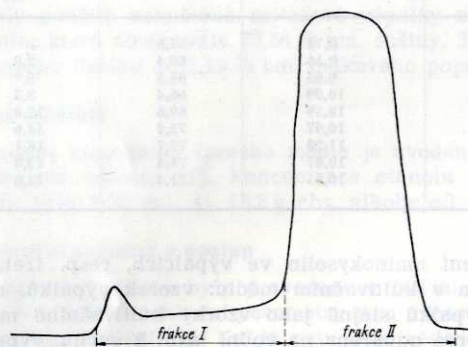
Při dělení výpalků na gelu Sephadex G-100 byly získány podle záznamu UV-analyzátoru pouze dvě frakce, které byly označeny jako frakce I a II (obr. 2). Hmotovou bilanci bylo stanoveno, že frakce I obsahovala 4 % hm. sušiny z celkového zpracovaného množství výpalků a byly v ní shromážděny látky s molekulovou hmotou vyšší než 100 000, tj. mez vyloučení použitého gelu. Většina sloučenin — 96 % hm. sušiny výpalků — přešla nerozdělena jako látky o nižší molekulové hmotě ve frakci II.

Tab. 4. Stanovení popela ve frakcích výpalků, získaných rozdělením 1 g výpalků na gelu Sephadex G-25

Vzorek	Sušina vzorku g	Sušina z celkové sušiny výpalků % hm.	Popel vzorku g	Popel na sušinu vzorku % hm.	Popel z celkové popela výpalků % hm.
výpalky	0,7786	100	0,2118	27,2	100
frakce A	0,0717	9,2	0,0055	7,7	3
frakce B	0,2644	33,9	0,0425	16,1	10
frakce C	0,4305	55,2	0,1590	36,9	75
frakce D	0,0132	1,7	0,0044	33,3	2
frakce 1	0,2595	44,3	0,0450	17,6	21,7
frakce 2	0,3597	46,2	0,1109	30,8	52
frakce 3	0,0783	10,0	0,0481	61,4	23

Tab. 5. Vliv modelové směsi aminokyselin a popela výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu

Přídavek	Množství přídatku na l média	Výtěžek kvasničné sušiny g/l média	Výtěžnost % hm.	Zvýšení výtěžnosti % hm.
—	—	8,22	54,1	—
výpalky	2 g sušiny	10,07	66,2	12,1
směs aminokyselin	60 mg	8,96	58,9	4,8
popel výpalků	620 mg	9,28	61,2	7,1
směs aminokyselin + popel výpalků	60 mg	9,43	62,0	7,9



Obr. 2. Záznam dělení výpalků na sloupci Sephadex G-100

Kultivačním testem bylo zjištěno, že látky stimulující růst kvasinek na etanolu jsou přítomny ve frakci II; její přítomnost, v množství alikvotním optimálnímu přídatku výpalků, poskytla prakticky stejnou výtěžnost jako přídatek původních výpalků (tabulka 3).

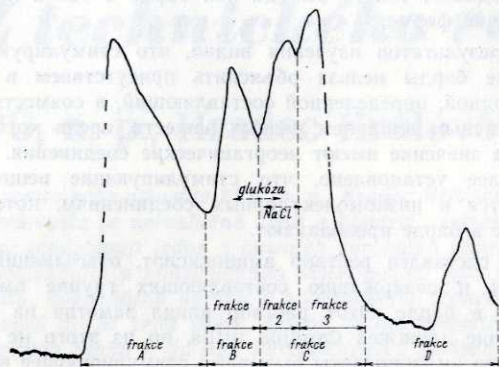
#### b) Dělení výpalků na gelu Sephadex G 25

Pro dělení nízkomolekulárních látek, které, jak bylo uvedeno, ve výpalcích převládají, byl použit gel Sephadex G 25 s mezí vyloučení odpovídající molekulové hmotě 5 000. Sloupec o rozměrech 2,5 X 38 cm měl tyto parametry:



celkový objem $V_t$	187 ml,
vnější objem $V_o$	75 ml,
vnitřní objem $V_i$	93 ml,
objem gelové náplně $V_m$	19 ml.

Podle záznamu UV-analýzátoru byly na tomto gelu získány čtyři frakce, které byly označeny A, B, C, D (obr. 3). Nejvíce sloučenin obsahovaly prostřední frakce: frakce C 55,2 % hm. a frakce B 33,9 % hm. sušiny zpracovaných výpalků. Mnohem méně látek přešlo do frakce A (9,2 % hm. sušiny výpalků) a do frakce D (1,7 % hm. sušiny výpalků).



Obr. 3. Záznam dělení výpalků na sloupci Sephadex G-25

Z výsledků uvedených v tabulce 3 je zřejmé, že růst nejvíce stimulovaly frakce, které obsahovaly nejvíce sloučenin; frakce C způsobila zvýšení výtěžnosti o 10,6 % hm. a frakce B o 7,7 % hm. Společně dávkované tyto frakce neovlivnily růst více než samotná frakce C, tj. zvýšení výtěžnosti bylo o 10,6 % hm. Frakce D byla bez účinku a frakce A stimulovala málo. Současně testované výpalky zvýšily výtěžnost o 12,5 % hm.

Frakce B a C, které měly největší stimulační vliv na růst kvasinek, obsahovaly dohromady 90 % hm. sušiny ze zpracovaných výpalků. Ve frakci C byly přítomny látky, které způsobily dva menší píky na záznamu absorpce (obr. 3). Proto bylo provedeno ještě jedno dělení za stejných podmínek a byly odebrány frakce 1, 2 a 3 (obr. 3), přičemž frakce 1 odpovídala v podstatě frakci B a frakce 2 a 3 dohromady opět frakci C. Hmotovou bilanci byl stanoven největší podíl látek ve frakci 2 (46 % hm. sušiny zpracovaných výpalků) a dále ve frakci 1 (32 % hm. sušiny výpalků) a jen malé množství přešlo do frakce 3 (10 % hm. sušiny výpalků).

Kultivačním testem bylo stanoveno, že se stimulační účinek opět dále rozdělil mezi tyto získané frakce (tabulka 3). Frakce 2 a 1 zvýšily výtěžnost o 7,8, resp. 7,0 % hm. a frakce 3 o 4,6 % hm. Pokusně bylo zjištěno, že s frakcí B prochází vnesená glukóza (mol. hmota 180) a s frakcí C NaCl (mol. hmota 77), to znamená, že stimulační látky patří spíše mezi sloučeniny s molekulovou hmotou přibližně v rozmezí 77 až 180.

Papírovou chromatografií bylo ve frakcích výpalků stanoveno zastoupení volných aminokyselin. Všechny aminokyseliny, zjištěné ve výpalcích, byly nalezeny ve frakci C, a to téměř kvantitativně; frakce B obsahovala pouze stopy alaninu, kyseliny glutamové, valinu, leucinu a i-leucinu a serinu. Žádné aminokyseliny nebyly detekovány ve frakcích A a D. Mezi těmito frakcemi vykazala maximální účinek frakce C. Při rozdělení frakce C na další dvě frakce zůstaly aminokyseliny výhradně ve frakci 2, která poskytla ve srovnání s frakcí 3 větší zvýšení výtěžnosti.

Vzhledem k významné účasti anorganického podílu vý-

palků na stimulaci růstu kvasinek na etanolu byla provedena analýza frakcí na obsah popela, která ilustruje rozdělení anorganických látek mezi jednotlivé frakce (tabulka 4). Z celkového popela stanoveného ve výpalcích přešlo 75 % hm. do frakce C a dalším rozdělením této frakce zůstala větší část ve frakci 2 (52 % hm.) a menší podíl ve frakci 3 (23 % hm.). Tato frakce měla relativně nejvyšší obsah popela, a to 61,4 % hm., vztaženo na sušinu frakce.

#### Vliv aminokyselin přítomných ve výpalcích na růst kvasinek

Frakce C a dále frakce 2, které při srovnávacích kultivacích poskytly nejlepší výsledky, obsahovaly všechny aminokyseliny nacházející se ve výpalcích, což podporovalo předpoklad o významu aminokyselin pro kvasinky využívající etanol. Jak již bylo řečeno v úvodu, vyskytují se v literatuře údaje o stimulačních vlastnostech aminokyselin mimo jiné i vzhledem k růstu kvasinek, kultivovaných na etanolu. Hernandez a Johnson [10] přidávali do média pro pěstování kvasinek *Candida utilis* na glukóze, acetalu nebo etanolu směs devatenácti aminokyselin, která se osvědčila při růstu bakterií na glukóze [13]. Vliv různých aminokyselin na růst kvasinek *Saccharomyces* na etanolu zkoušeli Beker et al. [14] a zjistili, že maximální účinek měl přírůstek kyseliny glutamové nebo asparagové; ostatní zkoušené aminokyseliny, glycin, alanin, cystein nebo metionin výtěžnost snižovaly.

Proto byly provedeny pokusy ke zjištění účasti aminokyselin, vyskytujících se ve výpalcích, na stimulaci růstu kvasinek *Candida utilis* na etanolu. Podle obsahu volných aminokyselin ve výpalcích bylo vypočteno množství jednotlivých aminokyselin, které je do živného média vnášeno optimálním přírůstkem výpalků. Byly zjištěny tyto hodnoty v mg aminokyselin/l média: 10,0 alanin, 9,5 kyselina glutamová, 7,7 tyrosin, 7,2 kyselina asparagová, 6,0 kyselina  $\gamma$ -aminomáselná, 5,0 valin, 4,8 i-leucin, 4,6 leucin, 3,9 serin, 3,6 prolin, 2,3 glycin a 0,8 fenylalanin. Celkové množství aminokyselin, přidávaných do média současně, bylo 0,060 g/l média.

Uvedené frakce C a frakce 2 s maximálním stimulačním účinkem obsahovaly také značné množství popela (36,9 % hm., resp. 30,8 % hm. na sušinu frakcí). Jelikož popel výpalků má na růst kvasinek značný stimulační vliv, bylo zajímavé stanovit, jaký účinek bude mít modelové dávkování aminokyselin a popela. Popel byl připraven spálením 2,56 g melasových výpalků, což odpovídá optimálnímu přírůstku (2 g sušiny výpalků/l média).

V tabulce 5 jsou shrnuty výsledky kultivačních pokusů s přírůstkem aminokyselin a popela výpalků; přírůstkem směsi aminokyselin, modelující zastoupení aminokyselin ve výpalcích, byla zvýšena hodnota výtěžnosti o 4,8 % hm. a popelem výpalků o 7,1 % hm. Současné dávkování směsi aminokyselin a popela výpalků způsobilo zvýšení výtěžnosti o 7,9 % hm., tj. více než směs aminokyselin, ale jen nepatrně více než přírůstek samotného popela.

Z uvedených výsledků nelze učinit jednoznačný závěr o účasti aminokyselin na stimulačním účinku výpalků. Za prokázané lze považovat, že přírůstek směsi aminokyselin analogické zastoupení aminokyselin ve výpalcích má stimulační účinek na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu, neboť zvýšení výtěžku kvasničné sušiny bylo vyšší, než by odpovídalo pouhé asimilaci přidaných aminokyselin (0,79 g kvasničné sušiny vzniklo na účet 0,05 g aminokyselin). Dále lze soudit, že aminokyseliny společně s anorganickým podílem (popelem) jsou odpovědné za stimulační účinek frakce 2. Zde však toto tvrzení není zcela správné, neboť složení popela připraveného z původních výpalků se bude pravděpodobně poněkud lišit od složení popela skutečně přítomného v této frakci. A dále aminokyseliny a popel tvoří zhruba 1/3 z celko-



vé sušiny frakce 2, to znamená, že je v ní obsaženo ještě mnoho dalších sloučenin, které mohou stimulaci ovlivňovat. Konečně z výsledků dosažených při testování frakce C a také původních výpalků lze soudit, že aminokyseliny nejsou rozhodující, resp. jedinou organickou složkou odpovědnou za stimulační účinek výpalků.

Z pokusů o izolaci stimulačních látek z výpalků metodou gelové chromatografie vyplývá, že stimulační účinek výpalků nespočívá v přítomnosti jediné látky, resp. skupiny příbuzných látek, ale že jde spíše o komplexní působení většího počtu sloučenin. Podobně *Zabrodskij et al.* [15] připisují výpalkům charakter komplexního stimulatoru růstu mikroorganismů vzhledem k obsahu vitamínů, aminokyselin a mikrobiogenních prvků. Z výsledků dělení výpalků metodou gelové chromatografie dále vyplývá, že mezi látkami se stimulačními účinky převládají sloučeniny s nižší molekulovou hmotou a těchto sloučenin je ve výpalcích většina; značná část z nich pak má anorganickou povahu.

#### Literatura

- [1] RYBÁŘOVÁ, J., ŠTROS, F., PECKA, K.: Kvas. prům. 24, 1978, s. 202.
- [2] RYBÁŘOVÁ, J., PECKA, K.: Kvs. prům., 24., 1978, s. 224.
- [3] GRÉGR, V.: Melasové výpalky. V. DYR J., GRÉGR V., SEILER A.: Lihovarství, II. díl, SNTL, Praha, 1963.
- [4] DIETRICH, K. R.: Chemiker Ztg., 81, 1957 s. 325.
- [5] PORATH, J., FLODIN, P.: Nature, 183, 1959, s. 1657.
- [6] Firemní literatura: Gel Filtration in Theory and Practice, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden, 1977.
- [7] KOLAROV, I.: Diplomová práce, VŠCHT, Praha, 1975.
- [8] LEOPOLD, J., ČERNÝ V., PAŠEK, J.: Studium složení a optimalizace přípravy kvasného substrátu pro standardní a zvýšenou koncentraci i výšku substrátu. Zpráva Z-223/3-76, Lachema, Kазnějov, 1976.
- [9] BEKER, M. E., DAMBERGA, G. E., POPOVA, M. V., AUZINJA, P. P., UPIT, A. A., KRAUZE, I. J.: Prikl. Biochim. i Mikrobiol., 13, 1977, s. 275.
- [10] HERNANDEZ E., JOHNSON, M. J.: J. Bacter., 94, 1976, s. 996.
- [11] GRÉGR, V., RYCHTERA, M.: Analytické metody ke cvičení z kvasné chemie a technologie, I. díl, SNTL, Praha, 1966.
- [12] HAIŠ, I., MACEK, K.: Papiřová chromatografie, NČSAV, Praha, 1959.
- [13] HERNANDEZ, E., JOHNSON, M. J.: J. Bacter., 94, 1967, s. 991.
- [14] BEKER, M. E., DAMBERGA, G. E., AUZINJA, P. P., VENTINA, E. M.: Abstr. Fifth Inter. Ferm. Symp., Berlin 1976, 1976 s. 491.
- [15] ZABRODSKIJ, A. G., OSOVIK, A. U., PŠEVORSKAJA, V. J., KALJUŽNYJ, M. J., TARASJUK, D. D.: Ferment. spirit. prom., č. 3, 1975, s. 26.

**Rybářová J., Černý V., Reisinger J.: Kultivace kvasinky *Candida utilis* na etanolovém substrátu. IV. Izolace stimulačních látek z melasových výpalků.** Kvas. prům., 25, 1979, č. 9, s. 200—209.

K izolaci látek stimulačních růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu byl proveden pokus frakcionace melasových lihovarských výpalků metodou gelové chromatografie. Rozdělením výpalků na gelu Sephadex G-25 bylo získáno několik frakcí, které vykazaly různý stimulační účinek, avšak ani u jedné frakce nebylo zaznamenáno tak velké zvýšení výtěžnosti jako v přítomnosti původních výpalků.

Z výsledků pokusů s frakcemi výpalků dále vyplynulo, že stimulační vliv výpalků není způsoben přítomností jediné určité látky, ale že se uplatňuje komplexní působení různých sloučenin, přičemž značný význam mají látky anorganické povahy. Dále bylo stanoveno, že sloučeniny se stimulačními vlastnostmi patří mezi nízkomolekulární látky, které ve složení výpalků převládají.

Modelový roztok aminokyselin, odpovídající kvalitativnímu i kvantitativnímu zastoupení volných aminokyselin ve výpalcích, měl výrazný účinek na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu, avšak není pravděpodobné, že by aminokyseliny měly rozhodující vliv na stimulační účinek výpalků.

**Рыбаржова И., Черны В., Райсингер Я.: Разведение дрожжей *Candida utilis* на этаноловом субстрате. 4-ая часть. Изоляция стимулирующих веществ из паточной барды.** Квас. прум. 25, 1979, № 9, стр. 200—209.

В рамках экспериментального изучения была с помощью хроматографии в среде геля фракционирована паточная барда для изоляции находящихся в ней веществ, стимулирующих размножение дрожжей *Candida utilis*. Разделение барды на геле СЕФАДЭКС Г-25 дало несколько фракций с разной интенсивностью стимулирующего влияния. Ни одна из этих фракций не обеспечила, однако, такого выхода как барда в своей первоначальной форме.

Из результатов изучения видно, что стимулирующее влияние барды нельзя объяснить присутствием в ней лишь одной, определенной составляющей, а совместным, комплексным влиянием разных веществ, среди которых важное значение имеют неорганические соединения. Было далее установлено, что стимулирующие вещества относятся к низкомолекулярным соединениям, которые вообще в барде преобладают.

Был составлен раствор аминокислот, отвечающий по составу и содержанию составляющих группе аминокислот в барде. Этот раствор влиял заметно на размножение дрожжей *Candida utilis*, но из этого не следует, что аминокислоты вызывают стимулирующее влияние наточной барды.

**Rybářová J., Černý V., Reisinger J.: Cultivation of *Candida utilis* Yeast in Ethanol Substrate. Part IV. Isolation of Stimulating Substances from Molasses Residues.** Kvas. prům. 25, 1979, No. 9, pp. 200—209.

Gel chromatography has been applied in a series of experiments to isolate from molasses residues, remaining in distilleries, substances stimulating the growth of *Candida utilis* yeast. The Sephadex G-25 gel has been used to obtain several fractions characterized by different stimulating effects, but none of them increased the yield as efficiently as residues in their original form.

It has been established that the stimulating effects are by no means due to one single component, but to the combined influence of various substances, among which anorganic compounds have an important role. It has been also found that substances with stimulating properties belong to low molecular ones, which in molasses residues generally prevail.

A model solution of amino acids of the same composition as in residues and with the same proportions has marked effects on the growth of *Candida utilis*, but it is improbable that amino acids play any decisive role in the stimulating effects of residues.

**Rybářová, J. - Černý, V. - Reisinger, J.: Kultivation der Hefe *Candida utilis* auf Äthanolsubstrat. IV. Isolation der stimulierenden Substanzen aus der Melasseschlempe.** Kvas. prům. 25, 1979, No. 9, S. 200—209.

Zur Isolierung der Substanzen, die das Wachstum der Hefen *Candida utilis* auf Äthanol stimulieren, wurden Versuche der Fraktionierung der Brennerel-Melasseschlempe mittels Gelchromatographie durchgeführt. Durch Auftrennung der Schlempe auf dem Gel Sephadex G-25 wurden einige Fraktionen gewonnen, welche unterschiedliche Stimulationswirkungen aufwiesen; bei keiner von diesen Fraktionen wurde jedoch eine so hohe Ausbeutesteigerung wie bei Anwesenheit der ursprünglichen Schlempe festgestellt.

Aus den Versuchen mit den Schlempefraktionen



ergab sich weiter auch die Feststellung, daß die stimulierende Wirkung der Schlempe nicht durch die Anwesenheit einer einzigen bestimmten Substanz verursacht wird, sondern daß hier die komplexe Wirkung verschiedener Verbindungen zur Geltung kommt, wobei eine große Bedeutung den Stoffen anorganischer Natur zukommt.

Weiter wurde festgestellt, daß die stimulierend wirkende Verbindungen zu den niedrigmolekularen Substan-

zen gehören, die in der Zusammensetzung der Schlempe überwiegen.

Die Modelllösung der Aminosäuren, die der qualitativen und quantitativen Vertretung der freien Aminosäuren in der Schlempe entsprach, hatte eine markante Wirkung auf das Wachstum der Hefen *Candida utilis* auf Äthanol; es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Aminosäuren einen entscheidenden Einfluß auf die Stimulationswirkung der Schlempe hätten.