

## Odstranění inhibičního vlivu krotonaldehydu na růst kvasinky *Candida utilis*

663.13:547.381 582.282.232

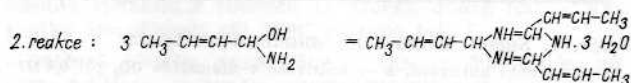
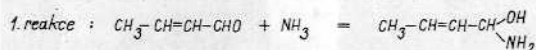
Ing. MILADA ŠESTÁKOVÁ, Ing. FRANTIŠEK ŠTROS, CSc.,

Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, odbor mikrobiálních výrob, Praha

Krotonaldehyd je potenciálně nejtoxičtější nečistota různých frakcí syntetického lihu, která brzdí růst kvasinky *Candida utilis* na minerální půdě se syntetickým etanolem jako zdrojem uhlíku a energie [1]. V zásaditém prostředí je však krotonaldehyd, podobně jako jiné aldehydy, nestálý; působením alkalických hydroxidů se aldolizuje za tvorby vysokomolekulárních pryskyřic. Této chemické reakce se využívá k čištění odpadních vod [2].

O odstraňování aldehydů z lihu amoniakem jsme v dostupné literatuře nenašli žádnou zprávu, ačkoliv amoniak má ještě další přednost, může se totiž mikrobiálně využívat jako dusíkatá živina. Amoniak přeměňuje krotonaldehyd jiným mechanismem než alkalické louhy;

z krotonaldehydu a amoniaku se pravděpodobně vytváří trimér, tzv. krotonaldehydamoniak, podle schématu [3].



Nepřítomností konjugované aldehydické skupiny s dvojnou vazbou v transformovaném krotonaldehydu se zřejmě ztrácí inhibiční účinek na biochemické procesy u *Candida utilis*.

V této práci jsme screening-testem na agarové půdě prokázali toxicitu krotionaldehydu na *C. utilis* a studovali jsme vliv různě velkých dávek amoniaku na rychlost odstraňování krotionaldehydu z etanolu. Srovnávacími kultivačními pokusy v třepných kulturách jsme chtěli prokázat odstranění inhibičního vlivu krotionaldehydu na růst *C. utilis* dávkováním amoniaku (jako dusíkaté živiny) do lihu s krotionaldehydem před přidáním etanolu do kultivačního média (resp. dávkováním lihoamoniakové směsi).

## MATERIÁL A METODY

**Mikroorganismus:** *Candida utilis* 49, sbírkový kmen VÚKPS, uchovávaný jako kvasničná pasta při +5 °C.

**Ražinovaný hydrogenovaný lih asi 96% [obj./obj.]** — Východočeské lihovary, n. p., Chrudim — zbavený karbonylových látek: 1 l hydrogenovaného syntetického etanolu se smísí s 10 g 2,4-dinitrofenylhydrazinu a po přidání 10 kapek konc. HCl se směs vaří 2 h pod zpětným chladičem. Po 24 h stání se směs dekantuje a destiluje. Jímá se střední frakce (asi 700 ml). Předestilovaný lih se upraví hydroxidem sodným na pH 7,0.

**Krotionaldehyd:** z katedry technologie paliv a vody VŠCHT — čerstvě předestilovaný; čistota kontrolována, podobně jako u etanolu, metodou plynové chromatografie.

**Amoniak, 25 % [hmot./obj.], p. a. [Merck, NSR].**

Ostatní chemikálie: čistota p. a. [Labora, n. p., Praha].

## ANALYTICKÁ METODIKA

**Stanovení kvasničné sušiny:** vázkovou metodou, po promytí a vysušení 10 ml kvasničné suspenze média v sintrovém kelímku G<sub>4</sub> při 105 °C do konstantní váhy.

**Stanovení pH:** pH-metrem s kombinovanou skleněnou a kalomelovou elektrodou.

**Stanovení čistoty použitých chemikálií, krotionaldehydu, etanolu a jeho metabolitů** 2–4 µl vzorku jsme analyzovali metodou plynové chromatografie na přístroji Chrom 2 (Laboratorní přístroje, Praha) s modifikací vyhrřivané zplyňovací komůrky, skleněné kolony (3 m, 0,3 cm) s Porapakem Q (80–100 mesh) a s citlivějším plamenoionizačním detektorem. Teplota kolony: 182 °C, zplyňovací komůrky: 220 °C, průtok nosného plynu dusíku: 26 ml.min<sup>-1</sup>, průtok vodíku: 35 ml.min<sup>-1</sup>, průtok vzduchu: 600 ml.min<sup>-1</sup>. Krotionaldehyd jsme kvantitativně stanovili metodou přímé kalibrace.

**Příprava modelových směsí lihu, krotionaldehydu, amoniaku a vody:** 8 různých směsí jsme připravili podle tab. 3. Krotionaldehyd jsme přidávali do směsí vždy těsně před měřením a po smísení jsme směsí asi 1 min třepali. 10 min po přidání krotionaldehydu jsme 4 µl analyzovali plynovou chromatografií. Mízení krotionaldehydu z média jsme dále kontrolovali v intervalech 30 min. Pro srovnání účinků amoniaku s účinky alkalického louhu jsme také analyzovali modelovou směs lihu s krotionaldehydem, jejíž pH jsme upravili přidáním hydroxidu sodného na stejnou zásaditou reakci směsí upravených čpavkem.

## BIOCHEMICKÁ METODIKA

**Screening-test pro zjištění toxických nečistot syntetického lihu.** Zjišťovali jsme toxicitu těchto 20 sloučenin, které jsou převážně složkami různých frakcí syntetického etanolu: metanol, acetaldehyd, dietyléter, hexan, 2-propanol (isopropylalkohol), aceton, 1-propanol, metyletylketon, 2-metyl-2-propanol (terc. butylalkohol), octan etylnatý, 2-butanol (sek. butylalkohol), 2-metyl-1-propanol (isobutylalkohol), 1-butanol, butyraldehyd, 2-buten-1-ol (krotylalkohol), krotionaldehyd, 2-propen-

-1-ol [allylalkohol], kyselina krotonová, akrylaldehyd (akrolein).

0,05 ml směsi klidových buněk *C. utilis* ve fosfátovém pufru (pH = 5,0) s jednou z testovaných sloučenin v 1 % koncentraci jsme po 15 min stání rozetřeli na tři pevné agarové půdy (po 10 ml) v Petriho miskách (průměru 10 cm). Počet narostlých kolonií jsme hodnotili po 24, 48 a 72 h inkubace v termostatu při 30 °C.

**Agarová půda pro zjištění toxických nečistot syntetického lihu** měla toto složení [4]:

40 g sladinkového výtažku,  
5 g kaseinového peptonu,  
1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
destilovaná voda ad 1000 ml (pH = 6,0),  
20 g agaru na 1000 ml živného média  
(sterilizace 20 min při 0,12 MPa).

Tabulka 1. Vliv nečistot syntetického etanolu a některých příbuzných látek na růst *C. utilis* 49 na živné agarové půdě při 30 °C po 24, 48 a 72 h kultivace

| Testovaná sloučenina                     | Počet narostlých kolonií <i>Candida utilis</i> |           |
|--|--|-----------|
|  | 24 h   | 48 a 72 h |
| acetaldehyd                              | +  | ++        |
| methanol                                 | +++  | +++       |
| diethylether                             | +++  | +++       |
| hexan                                    | +++  | +++       |
| ethanol                                  | +++  | +++       |
| 2-propanol (isopropylalkohol)            | ++   | ++        |
| 1-propanol (n-propylalkohol)             | ++   | ++        |
| aceton                                   | ++   | ++        |
| methyletylketon                          | ++   | ++        |
| octan etylnatý                           | ++   | ++        |
| 2-methyl-2-propanol (terc. butylalkohol) | ++   | ++        |
| 2-butanol (sek. butylalkohol)            | +++  | +++       |
| 2-methyl-1-propanol (isobutylalkohol)    | ++   | ++        |
| 1-butanol (n-butylalkohol)               | +++  | +++       |
| butyraldehyd                             | +++  | +++       |
| 2-buten-1-ol (krotylalkohol)             | 0  | ++        |
| 2-propen-1-ol (allylalkohol)             | 0  | 0         |
| krotionaldehyd                           | 0  | 0         |
| kyselina krotonová                       | ++   | +++       |
| akrylaldehyd (akrolein)                  | 0  | 0         |
| voda                                     | +++  | +++       |

Inhibiční vliv krotionaldehydu na růst kvasinky *C. utilis* při kultivaci na minerální půdě s etanolem a různým zdrojem dusíku. Základní minerální půda pro plnění kultivačních baněk (obsahu 500 ml) se zarážkami pro zvýšení přestupu kyslíku, měla toto složení:

4,80 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
0,65 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
0,25 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O,  
0,01 g ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O,  
ad 1000 ml vodovodní vody (pH = 5,0).

V kultivační půdě pro další sérii pokusů jsme zaměnili síran amonný močovinou s ekvivalentním množstvím dusíku, tj. 2,18 g močoviny v 1 l média.

Kultivační baňky (5 paralelních vzorků) byly plněny 100 ml kultivační půdy se síranem amonným nebo močovinou a 2 ml přečištěného lihu nebo jeho směsí se 100 mg krotionaldehydu a zaočkovány 2 ml kvasničné suspenze ve fyziologickém roztoku (asi 50–100 mg kvasničné sušiny v 1 ml). Pokusné série jsme inkubovali na rotační třepačce při 30 °C po dobu 16 h, pH média jsme upravovali na půdě bez močoviny ve 2 h intervalech 1N NaOH. Po ukončení kultivace jsme v médiu stanovili pH, kvasničnou sušinu a těkavé organické sloučeniny.

Tabulka 2. Vliv krotionaldehydu (100 mg na 1 l média) na výtěžnost kvasničné sušiny *C. utilis* na minerální půdě s etanolem a různým zdrojem dusíku a jeho odstranění přidavkem amoniaku do lihu s krotionaldehydem. Krotionaldehyd bez přidavku amoniaku byl dávkován do kultivačního média ve směsi s ethanolem těsně před zahájením kultivačního pokusu

| Zdroj dusíku v médiu                            | Krotionaldehyd (mg.l <sup>-1</sup> ) | Výtěžnost vůči kontrole (%) |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0                                    | 100                         |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 100                                  | 73,0                        |
| močovina  | 0                                    | 100                         |
| močovina  | 100                                  | 74,0                        |
| amoniak   | 0                                    | 100                         |
| amoniak   | 100                                  | 76,0                        |
| amoniak   | 100*)                                | 107,5                       |

\*) amoniak dávkován do směsi etanolu s krotionaldehydem, nikoliv přímo do kultivačního média.

Odstranění inhibičních vlastností krotionaldehydu v médiu přidavkem amoniaku do lihu s krotionaldehydem před přidavkem do média. Udělali jsme tři řady kultivačních pokusů: bez přidavku krotionaldehydu k lihu, s krotionaldehydem v lihu a s upravenou směsí lihu s krotionaldehydem přidavkem amoniaku a 2 h stáním této směsi při laboratorní teplotě před přidáním k fermentačnímu médiu. Pro tyto kultivační pokusy jsme použili základní kultivační médium, v němž byl síran amonný nahrazen ekvivalentním množstvím amoniaku a kyseliny sírové. Další uspořádání kultivačních pokusů bylo obdobné jako v předchozím odstavci.

## VÝSLEDKY

### 1. Toxicita nečistot surového syntetického etanolu a příbuzných látek pro *C. utilis*

Kolonie *C. utilis* rostly na agarových půdách s přidavkem všech testovaných sloučenin s výjimkou krotionaldehydu, allylalkoholu a akroleinu (tab. 1). Mírná inhibice růstu byla pozorována u krotionaldehydu, acetaldehydu a některých alkoholů. Protože je krotionaldehyd na rozdíl od allylalkoholu a akroleinu pravidelnou součástí surového syntetického etanolu a je potenciálním inhibitorem růstu *C. utilis*, byly s ním provedeny další studie [1] a pokusy se snahou odstranit jeho toxicitu přidavkem amoniaku do směsi krotionaldehydu s ethanolem.

### 2. Inhibiční vliv krotionaldehydu (100 mg v 1 l média) na růst *C. utilis* na syntetické etanolové půdě s různým zdrojem dusíku a jeho odstranění amoniakem

Kultivační média s přidavkem krotionaldehydu vykazala ve všech zkoušených případech, tj. v médiích se síranem amonným, močovinou i amoniakem aplikovaným do média a upraveným kyselinou sírovou na pH = 5,0 před přidáním etanolu s krotionaldehydem, snížení výtěžnosti kvasničné sušiny v rozmezí 24 až 27 % ve srovnání s kontrolními pokusy prováděnými za všech stejných podmínek, avšak bez krotionaldehydu (tab. 2). Dávkováním amoniaku do směsi etanolu s krotionaldehydem a 1 h stáním této alkalické směsi při pokojové teplotě před přidáním do kultivačního média jsme dosáhli odstranění inhibičního vlivu krotionaldehydu na růst *C. utilis*. Všechna takto připravená média vykazala stejný průběh kultivace a výtěžnosti kvasničné sušiny jako kontrolní pokusy (tj. bez přidavku krotionaldehydu), jak je zřejmé z tab. 2. Tímto způsobem bylo prokázáno, že přidavkem amoniaku k různým frakcím lihu obsahujícím krotionaldehyd může se odstranit v krát-

Tabulka 3. Chemická transformace krotionaldehydu v lihu různými přidavky amoniaku za laboratorní teploty. Podle množství přidaného amoniaku bylo pH média v rozmezí 8,5 až 10,6

| Číslo vzorku | Složení modelové směsi ml.l <sup>-1</sup> |                |         |      | Množství odstraněného krotionaldehydu (% původ. obsahu) | Čas proměnné odstranění krotionaldehydu min | Zbytek krotionaldehydu v médiu (% původního obsahu) |
|--------------|---|----------------|---------|------|---|---|---|
|              | ethanol                                   | krotionaldehyd | amoniak | voda |   |   |   |
| 1            | 750                                       | 1              | 0       | 250  | 0   |   | 100   |
| 2            | 750                                       | 1              | 250     | 0    | 100   | 10  | 0   |
| 3            | 750                                       | 1              | 200     | 50   | 100   | 10  | 0   |
| 4            | 750                                       | 1              | 150     | 100  | 100   | 10  | 0   |
| 5            | 750                                       | 1              | 100     | 150  | 100   | 10  | 0   |
| 6            | 750                                       | 1              | 50      | 200  | 100   | 10  | 0   |
| 7            | 750                                       | 1              | 25      | 225  | 91,6  | 90  | 0   |
| 8            | 750                                       | 1              | 5       | 245  | 75,1  | 120   | 6,9   |

ké době inhibiční vliv aldehydu na růst *C. utilis*, přičemž se současně využije pro tvorbu kvasničné biomasy, jako zdroj dusíku.

Vzniklý transformovaný trimér krotionaldehydamoniak, na rozdíl od krotionaldehydu, postrádá volnou aldehydickou skupinu konjugovanou s dvojnou vazbou a pravděpodobně proto neinhibuje aerobní růst *C. utilis*.

### 3. Vliv amoniaku na transformaci krotionaldehydu v lihoamoniakové směsi

Při přidavku 12,5 g amoniaku do 1 litru lihovodné směsi s 850 mg krotionaldehydu (vzorek 6) a vyšším (vzorky 2 až 5) mizí krotionaldehyd již po 10 min stání směsi při laboratorní teplotě (tab. 3). Menší přidavek amoniaku odstraňuje krotionaldehyd ze směsi jen částečně, např. 1,25 g.l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (vzorek 8) odstranilo za 10 min asi 75 % původního množství krotionaldehydu, po 1 h stání při laboratorní teplotě 93,1 %, ale za další 1 h stání se zbytkový obsah krotionaldehydu již nezměnil.

Bylo pozorováno, že náhradou amoniaku hydroxidem sodným mizel krotionaldehyd z lihovodné směsi značně pomaleji. Například při přidání NaOH v množství potřebném k dosažení stejného pH směsi jako u vzorku 2 s amoniakem (tj. pH = 10,6), vymizel krotionaldehyd úplně až za 5,5 h stání směsi při laboratorní teplotě. Tato transformace při reakci alkalickým kovem je doprovázena barevnou změnou reakční směsi z bezbarvé na tmavě oranžovou, nebo se z roztoku vylučovala jemná sraženina téže barvy. Při aplikaci amoniaku nebyla pozorována žádná změna barvy roztoků.

V dostupné literatuře jsme nenašli žádnou zprávu o úpravě syntetického lihu amoniakem s cílem zlepšit jeho vlastnosti pro fermentační účely. Pouze jeden patent [2] referuje o detoxikaci odpadních vod, obsahujících nenasyčené uhlovodíky a příbuzné látky typu akroleinu, krotionaldehydu, 2-ethylkrotionaldehydu, 2,4-hexadienal, metakrylaldehydu a metylvinylketonu přidavkem alkalických látek pro dosažení pH nejméně 8. Při tomto a vyšším pH a při teplotě 25 °C a vyšší kondenzují tyto sloučeniny již za 15 min na produkty vyšší molekulové hmoty, které se snadno štěpí v biologickém systému.

Naše pokusy dovolují podobné závěry a svědčí o přednostech amoniaku, jako rychlého detoxikačního činidla



a současně jako zdroje dusíku pro růst a energii mikrobiálních kultur.

## ZÁVĚR

Screening-testem na agarové půdě s *C. utilis* jsme prokázali, že krotionaldehyd je potenciálně nejtoxičtější složka syntetického lihu.

Plynově-chromatografickou analýzou modelových směsí lihu s krotionaldehydem s různě velkými přídávky amoniaku a hydroxidu sodného jsme prokázali, že při dávce 12,5 g amoniaku k 1 litru neutrální směsi syntetického lihu s krotionaldehydem (850 g krotionaldehydu na 1 l absol. alk.), transformuje krotionaldehyd pravděpodobně na trimér s amoniakem, při laboratorní teplotě již během 10 min.

Transformací krotionaldehydu amoniakem se odstraní inhibiční vliv krotionaldehydu na růst kvasinky *C. utilis* při výrobě krmného droždí z etanolu, což bylo dokázáno kultivačními pokusy.

Před dávkováním do fermentačního média se syntetický lih, obsahující krotionaldehyd detoxikuje smísením s dusíkatou živinou, aplikovanou ve formě amoniaku, a směs se nechá stát asi 15 min při laboratorní teplotě.

## Literatura

- [1] ŠESTÁKOVÁ M., ADÁMEK L., ŠTROS F.: Effect of Crotonaldehyde on the Metabolism of *Candida utilis* during the Production of Single Cell Protein from Ethanol. *Folia Microbiol.* 21, 1976 s. 444—454.
- [2] EVERETT R., LASHLEY J.: Detoxication of Aldehydes and Ketones. Patent USA, č. 3 876 334, 7. 7. 1973.
- [3] LUKEŠ R.: Organická chemie. I. Díl s. 402—419, NČSAV, Praha 1954.
- [4] DREWS G.: Mikrobiologische Praktikum für Naturwissenschaftler. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1968

Šestáková M., Štros F.: Ostranění inhibičního vlivu krotionaldehydu na růst kvasinky *Candida utilis*. *Kvas. prům.*, 26, 1980, č. 6, s. 126—130.

Screening testem na agarové půdě s *Candida utilis* byla zjištěna ze 20 nízkovroucích sloučenin nejvyšší toxicita u krotionaldehydu, akroleínu a allylalkoholu. Toxicita krotionaldehydu byla odstraněna amoniakem. Plynovou chromatografií modelových vzorků směsí etanolu, krotionaldehydu a amoniaku byla dokázána transformace krotionaldehydu (obvyklé nečistoty různých frakcí syntetického lihu) na trimér s amoniakem, probíhající při pH směsí vyšším než 8 a teplotě laboratoře během několika minut. Například 12,5 g amoniaku odstraní v 10 min 850 g krotionaldehydu v 1 litru lihovodné směsi. Kultivačními pokusy s *C. utilis* na minerálním médiu se syntetickým etanolem bylo dokázáno, že dusíkatá živina ve formě amoniaku smísená s lihem před přidáním k fermentačnímu médiu, zcela odstraňuje inhibiční vliv krotionaldehydu na růst *C. utilis*. Navržený způsob úpravy lihu amoniakem umožňuje racionální využití surového syntetického lihu s vysokým obsahem krotionaldehydu při mikrobiálním využití etanolu i v mírně aerobním prostředí.

Шестакова, М. — Штрос, Ф.: Нейтрализация ингибирующего влияния кротонального альдегида на размножение дрожжей *Candida utilis*. *Квас. прум.* 26, 1980, № 6, стр. 126—130.

Авторы изучали влияние двадцати разных низкокипящих соединений на размножение дрожжей *Candida utilis*. Дрожжи разводились на агаре и результаты экспериментов определялись посредством ситового анализа. Из всех изучаемых соединений наиболее ядовитыми оказались кротональный альдегид, акриальдегид и аллиловый спирт. Токсичность кротонального альдегида можно нейтрализовать аммиаком. Путем применения методов хроматографии в газовой среде было при ана-

лизах образцов, состоящих из смеси этанола, кротонального альдегида и аммиака установлено, что кротональный альдегид (примесь, загрязняющая разные фракции синтетического спирта) превращается в тример с аммиаком. Основным условием является pH превышающий 8. При температуре окружающей среды реакция требует всего лишь несколько минут. Так напр. 12,5 г аммиака устраняет в течение 10 минут 850 мг кротонального альдегида из одного литра смеси спирта с водой. В рамках экспериментального изучения дрожжи *Candida utilis* разводились в минеральной среде с синтетическим этанолом, причем было установлено, что азотистое питательное вещество в форме аммиака смешанного со спиртом перед его добавкой в сбраживаемую среду, полностью нейтрализует ингибирующее влияние кротонального альдегида на размножение приведенного вида дрожжей. Предложенный метод обработки спирта аммиаком дает возможность рационального использования сырого синтетического спирта с высоким содержанием кротонального альдегида для разведения дрожжей в умеренно аэробных условиях.

Šestáková, M. - Štros, F.: Neutralizing Inhibiting Effects of Crotonaldehyde Upon the Growth of *Candida utilis* Yeast. *Kvas. prům.* 26, 1980, No. 6, pp. 126—130.

Screening tests which have been carried out with *Candida utilis* cultivated in agar show, that of 20 compared low-boiling compounds the highest toxic effects have crotonaldehyde, acrolein and allyl alcohol. Toxicity of crotonaldehyde was neutralized with ammonia. By applying gas chromatography methods to a series of samples consisting of ethanol + crotonaldehyde + + ammonia it has been established that transformation of crotonaldehyde (which is present as a current impurity in various fractions of synthetic alcohol) into a trimer with ammonia takes place, if pH of the mixture exceeds 8. At normal room temperature the process takes only a few minutes. So e.g. 12,5 g of ammonia will remove in 10 minutes 850 mg of crotonaldehyde from 1 l of water + alcohol mixture. Cultivation experiments carried out with *Candida utilis* grown in a mineral medium and synthetic alcohol have shown that nitrogenous medium in the form of ammonia mixed with alcohol, before being added to fermentation medium, fully neutralizes inhibiting effects of crotonaldehyde upon *Candida utilis*. The described method, i. e. treatment of alcohol with ammonia permits to use raw synthetic spirit with high concentration of crotonaldehyde for cultivating yeast in moderate aerobic conditions.

Šestáková, M. - Štros, F.: Beseitigung des Inhibitionseinflusses des Krotionaldehyds auf das Wachstum der Hefe *Candida utilis*. *Kvas. prům.* 26, 1980, No. 6, S. 126—130.

Mittels Screening-Test auf Agarboden mit *Candida utilis* wurde aus 20 niedrigsiedenden Verbindungen die höchste Toxizität bei Krotionaldehyd, Akrolein und Allylalkohol festgestellt. Die Toxizität des Krotionaldehyds wurde durch Ammoniak beseitigt. Mittels Gaschromatographie der Modellproben des Gemisches von Äthanol, Krotionaldehyd und Ammoniak wurde die Transformation des Krotionaldehyds (die üblichen Verunreinigungen der verschiedenen Fraktionen des synthetischen Spiritus) auf Trimmer mit Ammoniak festgestellt, die bei einem pH des Gemisches über 8 und bei Labor-temperatur während einiger Minuten verläuft. Zum Beispiel entfernt 12,5 g Ammoniak in 10 Min. 850 mg Krotionaldehyd in 1 Liter des Spiritus-Wasser-Gemisches. Durch Kultivationsversuche mit *Candida utilis* auf Mineral-

medium mit synthetischem Äthanol wurde bewiesen, daß der Stickstoffnährstoff in der Form von Ammoniak, vor der Zugabe zu dem Fermentationsmedium mit Spiritus vermischt, den Inhibitionseinfluß des Krotonaldehyds auf das Wachstum von *Candida utilis* gänzlich

eliminiert. Das vorgeschlagene Verfahren der Spirituszubereitung mit Ammoniak ermöglicht die rationelle Ausnützung des synthetischen Rohsprits mit einem hohen Krotonaldehydsgehalt bei mikrobieller Ausnützung des Äthanol in schwach aerobem Milieu.