

Kultivace kvasinky *Candida utilis* na etanolovém substrátu

V. Vliv některých biogenních prvků na růst ve čtvrtprovozním měřítku

Ing. JOHANNA RYBÁŘOVÁ, Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, Praha

663.131/.132 582.282.232

Výsledky pokusů o izolaci stimulujících látek z melasových lihovarských výpalků metodou gelové chromatografie ukázaly, že stimulační vliv výpalků na růst kvasinek z etanolu spočívá v komplexním účinku různých složek výpalků [1]. Bylo zjištěno, že stimulující látky patří mezi nízkomolekulární látky (mol. hmota přibližně mezi 77 a 180), které ve výpalcích převládají a byl opět potvrzen význam anorganické složky výpalků, neboť frakce, které relativně nejvíce stimulovaly růst kvasinek, obsahovaly vždy větší množství popela.

Po konstatování, že melasové výpalky jsou komplexním stimulatorem růstu kvasinek *Candida utilis* na etanolu, zvláště vyniká praktický význam dřívějšího zjištění o stimulačním účinku některých makrobiogenních a mikrobiogenních prvků. Tyto prvky byly vytypovány podle složení výpalků, resp. popela výpalků při kultivačních pokusech vedených ve třepacích baňkách [2, 3]. Vhodnou kombinací vybraných prvků, mezi nimiž byla nutná přítomnost solí vápenatých a železitých za současného zvýšení obsahu hořčíku v živném médiu, bylo dosahováno zvýšení výtěžnosti srovnatelné s hodnotou získávanou vlivem přídatku původních výpalků. Vliv prvků na růst kvasinek byl proto ověřen kultivačními pokusy v laboratorním fermentoru o objemu 30 l, tj. ve čtvrtprovozním měřítku.

Při růstu kvasinek *Candida utilis* na etanolu vzniká kyselina octová, jejíž množství podle *Rychtery* a *Grégra* [4] závisí na fyzikálně chemických kultivačních podmínkách a vlastnostech a stavu kultury. Akumulace kyseliny octové je vždy spojena se snížením výtěžnosti kvasničné biomasy [5]. Přítomnost melasových lihovarských výpalků, která zvyšuje výtěžnost kvasničné biomasy z etanolu, omezuje hromadění kyseliny octové, což je pravděpodobně příčinou, nebo jednou z příčin stimulačního účinku výpalků. Při ověřování vlivu anorganických látek výpalků, především sloučenin vápníku, železa a hořčíku na růst kvasinek z etanolu, byla proto věnována pozornost tvorbě tohoto nežádoucího metabolitu.

MATERIÁL A METODIKA

Mikroorganismus

Byla použita produkční kultura kvasinek *Candida utilis*; kultura je uchovávána ve formě kvasničné pasty, která je obnovována nejdéle v desetidenních intervalech kultivací v laboratorním fermentoru. Kvasničná pasta se získává separací kultivačního média na laboratorní odstředivce Westfalia a uchovává se v chladnici při 5 °C.

Substrát

Syntetický etanol asi 94 % obj., Chemické závody, Záluží. Bylo použito několik partií etanolu. Příslušné obsahy alkoholu jsou uvedeny u jednotlivých pokusů.

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.

Kultivační zařízení

Pokusy byly provedeny v laboratorním skleněném 30litrovém fermentoru, jehož popis je uveden v jednom z předcházejících sdělení [6].

Složení živného média a kultivační postup

Živiny byly dodávány do média ve formě základního koncentrovaného zásobního roztoku tohoto složení: 35 ml 85 % hm. HPO_4 p. a., 30 g KOH p. a., 25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p. a., 0,5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml vodovodní voda. Do fermentoru se dávkovalo 300 ml zásobního roztoku živin a 17 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p. a. Před doplněním na konečný objem (17 l) vodovodní vodou byla do média resuspendována kvasničná pasta v množství 150 až 180 g (k dosažení 2 g kvasničné sušiny/l média), přidány zkoušené látky a upraveno pH na hodnotu 4,0. Etanolový substrát byl dávkován přítokovým způsobem spolu se zdrojem N, amoniakovou vodou, ve formě lihoamoniakové směsi, která obsahovala 450 ml syntetického etanolu (asi 94 % obj.) a 135 ml amoniakové vody (asi 21 % hm.). Kromě toho se do fermentoru dávkovalo 20 ml etanolu jako předloha pro zahájení růstu. Po spotřebování lihoamoniakové směsi byla pro využití zbytkového etanolu do fermentoru dávkována amoniaková voda zředěná vodovodní vodou 1 : 1, stejným způsobem jako lihoamoniaková směs, tj. přítokovým způsobem. Po ukončení kultivace bylo médium separováno na laboratorní odstředivce Westfalia. Výtěžek kvasničné sušiny byl počítán jednak z hmoty a sušiny získané kvasničné pasty, jednak z objemu kultivačního média a koncentrace kvasničné sušiny. V každé sérii pokusů inokulovaných stejnou kvasničnou pastou byla provedena kontrolní kultivace; výsledek kontrolní kultivace, vyjádřený výtěžností, byl brán jako kritérium pro hodnocení zkoušených látek. Každý pokus byl proveden minimálně ve dvou kultivačních sériích.

Analytické metody

Stanovení kvasničné sušiny a etanolu v kultivačním médiu, stanovení etanolu v substrátu a výpočet výtěžnosti je popsán v předcházejícím sdělení [2].

Rozbor melasových výpalků byl proveden předepsanými postupy [7].

Stanovení kyseliny octové v kultivačním médiu: kyselina octová byla stanovena jako těkavé kyseliny po destilaci vzorku média, okyseleného kyselinou fosforečnou, s vodní párou. Destilát byl titrován roztokem 0,05 N NaOH na bromtymolovou modř [8].

Stanovení sušiny v kvasničné pastě: 16 g kvasničné pasty bylo resuspendováno v destilované vodě na konečný objem 100 ml. 10 ml vzorku bylo usušeno v Al-misce, nejprve pod infralampou a potom v sušárně při 105 °C do konstantní hmoty.

VÝSLEDKY A DISKUSE

1. Vliv vápníku, železa a hořčíku na růst kvasinek na etanolu

Při růstu kvasinek v laboratorním fermentoru byly nejprve vyzkoušeny přísady prvků, které poskytly nejlepší výsledky při pokusech, provedených ve třepacích baňkách [3]. Byly testovány přísady: a) Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Mn; b) Ca, Fe, Mg, Zn, Cu; c) Ca, Fe, Mg. Nutno poznamenat, že v případě hořčíku a zinku se vždy jednalo o zvýšení živiny, neboť oba prvky jsou součástí základního živného média. Ve třepacích baňkách se konečná koncentrace kvasničné sušiny pohybovala kolem 1–1,2 % hm.; vzhledem k tomu, že kultivace ve fermentoru byly vedeny při vyšších hustotách buněčné populace (až 1,8 % hm. kvasničné sušiny), bylo množství zkoušených prvků zvýšeno úměrně této vyšší koncentraci. Odpovídající koncentrace přísad prvků byly tyto: 85 mg Ca, 10,6 mg Mg, 3,22 mg Fe, 0,40 mg Zn, 0,14 mg Mn a 0,11 mg Cu/l média.

Prvky byly do média dávkovány ve formě solí p.a., a to chloridů nebo síranů. Do celého objemu kultivačního média (17 l) bylo přidáváno: 5,27 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,83 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,264 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,033 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,012 g $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,007 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Syntetický etanol v této sérii pokusů obsahoval 74,00 g abs. alkoholu/100 ml, množství inokulační pasty bylo 175 g (19,5 % hm. kvasničné sušiny).

V těchto prvních pokusech bylo ve všech kultivacích s přísadami prvků zjištěno prakticky stejné zvýšení výtěžnosti zhruba o 6 % hm., tj. z hodnoty 63 % hm. v kontrolní kultivaci na a) 68,8 % hm., b) 69,1 % hm. a c) 68,7 % hm. Z praktického hlediska bylo významné zjištění, že nejnižší počet přidávaných prvků (Ca, Fe, Mg) způsobil stejný efekt jako přísad více prvků.

V další pokusné sérii byl ověřován podrobněji vliv přísad vápníku, železa a hořčíku, a to tak, že byly přidávány jednotlivě a ve vzájemných kombinacích; jejich koncentrace byla stejná jako v předcházející sérii pokusů. Syntetický etanol obsahoval 74,0 g abs. alkoholu/100 ml, množství inokulační pasty bylo 170 g (20,1 % hm. kvasničné sušiny). Výsledky kultivačních pokusů jsou uvedeny v tabulce 1. Přísady jednotlivých prvků a také současný přísad Ca a Mg neměly výrazný vliv na zvýšení výtěžnosti, přísad železa dokonce zhoršoval růst. Příznivější vliv mělo dávkování Mg a Fe, Ca a Fe a konečně všech tří prvků společně, při kterém byla výtěžnost zvýšena nejvíce, a to o 6,2 % hm.

V těchto pokusech byla sledována tvorba kyseliny octové analýzou kultivačního média ve druhé a čtvrté hodině kultivace. Z výsledků je zřejmé, že všechny zkoušené prvky, ať jednotlivě, nebo v kombinacích, více či méně omezují akumulaci kyseliny octové. V kontrolní kultivaci se ve čtvrté hodině vytvořilo 1160 g kyseliny octové/l média a v médiích s prvky nepřesáhlo její množství 850 mg; obsah většinou kolísá mezi 400 až 680 mg kyseliny octové/l média.

2. Vliv různých poměrů vápníku a železa na růst kvasinek na etanolu

Všechny dosud použité koncentrace prvků odpovídaly množství prvků, které jsou do živného média vnášeny nerozpustným podílem popela výpalků [3], přičemž toto množství bylo zvýšeno s ohledem na vyšší koncentraci kvasničné sušiny při kultivaci ve fermentoru. V další sérii pokusů byly zkoušeny různé koncentrace vápníku a

Tabulka 1. Vliv přísady vápníku, hořčíku a železa na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu (85 mg Ca, 10,6 mg Mg, 3,22 mg Fe/l média)

Prvek	Výtěžek kvasničné sušiny g	Výtěžnost % hm.	Zvýšení výtěžnosti % hm.	Kyselina octová	
				2. hodina	4. hodina
				mg/l média	
—	219	63,0	—	740	1160
Ca	223	64,1	1,1	510	410
Mg	226	64,9	1,9	570	840
Fe	216	62,2	−0,8	670	820
Ca, Mg	225	64,7	1,7	400	540
Ca, Fe	237	68,2	5,2	680	590
Mg, Fe	228	65,6	2,6	850	570
Ca, Mg, Fe	241	69,2	6,2	570	500

Tabulka 2. Vliv různých hmotových poměrů Ca a Fe na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu

Množství prvků mg/l		Hmotový poměr prvků Ca : Fe	Výtěžek kvasničné sušiny g	Výtěžnost % hm.	Zvýšení výtěžnosti % hm.
Ca	Fe				
—	—	—	213	61,1	—
85	3,2	26 : 1	234	67,1	6,0
114	4,3	26 : 1	231	66,4	5,3
64	3,2	20 : 1	242	69,5	8,4
85	4,3	20 : 1	240	68,9	7,8
108	5,4	20 : 1	241	69,2	8,1
196	9,8	20 : 1	238	68,3	7,2
48	3,2	15 : 1	236	67,7	6,6
64	4,3	15 : 1	233	66,9	5,8
85	5,4	15 : 1	231	66,3	5,2

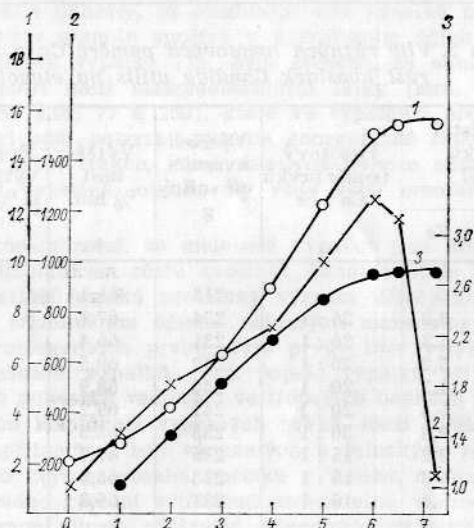
železa a přísad hořčíku zůstal nezměněn (10,6 mg Mg/l média). Základní použité přísady byly 85 mg Ca a 3,2 mg Fe, což odpovídá přibližně hmotovému poměru 26 : 1. Přísad vápníku byl jednak snížen na 48 a 64 mg Ca/l média, jednak zvýšen na 108, 114 a 196 mg Ca/l média a obsah železa byl upraven tak, aby vznikly poměry Ca : Fe = 26 : 1 a 15 : 1. Syntetický etanol použitý v této pokusné sérii obsahoval 74,2 g abs. alkoholu/100 ml, množství inokulační pasty bylo 173 g (19,8 % hm. kvasničné sušiny). Výsledky kultivace jsou uvedeny v tabulce 2.

Z výsledků vyplývá, že vzájemný poměr vápníku a železa má do jisté míry větší význam pro růst kvasinek než jejich množství. Optimální poměr Ca : Fe byl 20 : 1 v celém rozsahu zkoušených koncentrací s výjimkou nadměrného dávkování, tj. 196 mg Ca a 9,8 mg Fe/l média. Nejvhodnější dávka zkoušených prvků za daných podmínek kultivace byla 64 mg Ca a 3,2 mg Fe/l média; množství chloridu železitého se tedy nezměnilo a přísad chloridu vápenatého byl snížen z 5,27 g na 4,0 g/171 média.

3. Porovnání účinku výpalků a anorganického podílu výpalků na růst kvasinek na etanolu

K porovnání účinku výpalků a anorganického podílu výpalků na růst kvasinek a tvorbu kyseliny octové byla provedena série kultivací, při kterých byly v hodinových intervalech odebírány vzorky na stanovení kvasničné sušiny a kyseliny octové, popřípadě etanolu. Anorganický podíl výpalků byl testován jednak jako popel výpal-

ků, jednak jako vybrané prvky, tj. Ca, Fe a Mg. Pro kultivace ve větším měřítku se doporučuje přidavek výpal-ků, odpovídající 1–2 g sušiny výpal-ků/l média, přednostně 1 g [9], tzn. do celého objemu média se dávkovalo 22 g výpal-ků. Popel výpal-ků byl přidán v množství 5,3 g/17 l média, což je o něco více, než by odpovídalo množství popela z 22 g výpal-ků, vypočteného podle procentního obsahu popela ve výpalcích (21,19 % hm.); bylo zjištěno, že přímým spálením výpal-ků vznikne více popela — vyjádřeno v procentech na původní výpal-ky je to 24,2 % hm. — než se získá předepsanou analytickou metodou, kterou se stanoví zvlášť rozpustný a nerozpustný popel a celkový popel se vyjadřuje součtem obou hodnot. Popel byl do média aplikován po rozpuštění v 10 ml konc. HCl p. a. Prvky vápník, železo a hořčík byly přidány v optimálním množství (64 mg Ca, 3,2 mg Fe, 10,6 mg Mg/l média). Syntetický etanol obsahoval 74,4 g abs. alkoholu/100 ml, množství inokulační pasty bylo 150 g (22,6 % hm. kvasničné sušiny).



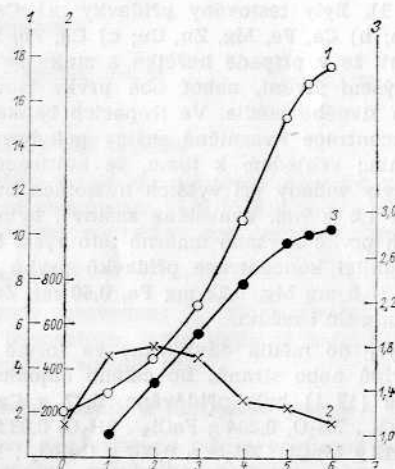
Obr. 1. Růstová křivka kvasinek *Candida utilis* na etanolu — kontrolní kultivace

Osa x — čas v hodinách, Osa y_1 — kvasničná sušina g/l, Osa y_2 — kyselina octová mg/l, Osa y_3 — ln kvasničné sušiny g/l

Výsledky kultivací jsou uvedeny v tabulce 3; nejvyšší zvýšení výtěžnosti o 10 % hm. bylo zjištěno při kultivaci s přidavkem výpal-ků a nižší, prakticky stejné zvýšení způsobil přidavek popela výpal-ků a přidavek prvků (7,8, resp. 7,1 % hm.). Z grafického znázornění růstových křivek a dynamiky akumulace kyseliny octové je zřejmý vliv výpal-ků i anorganického podílu výpal-ků jak popela tak prvků, na hromadění této kyseliny a na růstovou rychlost. V podmínkách kontrolní kultivace (obr. 1) stoupalo množství kyseliny octové a ke konci dosáhlo hodnoty 1,25 g/l média; po využití etanolu (přibližně v 6,5té hodině) byla kyselina octová kvasinkami spotřebována bez podstatného zvýšení nárůstu biomasy. Z průběhu růstové křivky v semilogaritmickém vynesení je patrné snížení růstové rychlosti od třetí hodiny kultivace, které lze přičíst nepříznivému vlivu hromadící se kyseliny octové. Růstová rychlost v intervalu mezi první a třetí hodinou byla $\mu = 0,40 \text{ h}^{-1}$ a v následující hodině se snížila na $0,35 \text{ h}^{-1}$. Na dalším poklesu růstové rychlosti po 4. hodině kultivace se již začíná podílet limitace kyslíkem, která na použitém kultivačním zařízení nastává při koncentraci kvasničné sušiny kolem 10 g/l média.

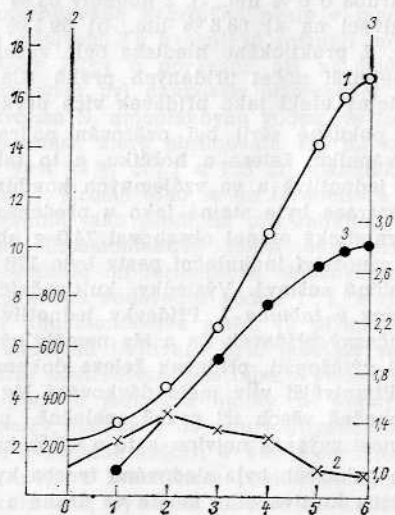
Při kultivaci kvasinek s přidavky zkoušených látek (obr. 2, 3, 4) vzniklo shodně ve všech případech menší

množství kyseliny octové během první poloviny kultivační doby a potom se postupně snižovalo. Relativně nejvíce kyseliny se vytvořilo za přítomnosti výpal-ků (asi 500 mg/l média), nejméně s přidavkem prvků, a to 200 mg/l média. Růstová rychlost byla při těchto kultivačních konstantní v době mezi první a čtvrtou hodinou a činila $\mu = 0,43 \text{ h}^{-1}$ v přítomnosti výpal-ků a $\mu = 0,44 \text{ h}^{-1}$ v přítomnosti popela výpal-ků nebo prvků — Ca, Fe, Mg. Snížení růstové rychlosti od 4. hodiny kultivace nastalo ve všech případech důsledkem limitace kyslíkem, jak již bylo uvedeno.



Obr. 2. Růstová křivka kvasinek *Candida utilis* na etanolu s přidavkem výpal-ků

Osa x — čas v hodinách, Osa y_1 — kvasničná sušina g/l, Osa y_2 — kyselina octová mg/l, Osa y_3 — ln kvasničné sušiny g/l

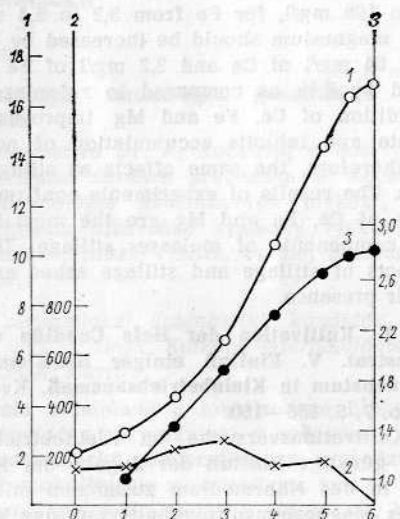


Obr. 3. Růstová křivka kvasinek *Candida utilis* na etanolu s přidavkem popela výpal-ků

Osa x — čas v hodinách, Osa y_1 — kvasničná sušina g/l, Osa y_2 — kyselina octová mg/l, Osa y_3 — ln kvasničné sušiny g/l

Výsledky kultivace kvasinek *Candida utilis* v laboratorním 30litrovém fermentoru, tj. ve čtvrtprovozním měřítku, ověřily příznivý vliv současného přidavku prvků Ca a Fe ve formě chloridu vápenatého a železitého spolu se zvýšením obsahu hořčíku, resp. síranu hořečnatého na růst kvasinek na etanolu. I v těchto pokusech se potvrdila nutnost zvýšení hořečnatého živin, třebaže stejně jako při pokusech ve třepacích baňkách [2, 3],

jde o velmi malá množství vzhledem k dávce Mg v základním živném roztoku (10,6 mg k 95,6 mg Mg/l média). Přídavek vápníku a železa naproti tomu zvyšuje jejich obsah v živném médiu mnohem více, neboť nejsou součástí živiny; určité množství je vnášeno do média vodovodní vodou, ve které bylo stanoveno okolo 65 mg Ca a 0,12 mg Fe/l. Ve vztahu k utilizaci etanolu kvasinkami mají uvedené prvky význam v tom, že omezují, podobně jako přídavek výpalků nebo popela výpalků, akumulaci kyseliny octové, která se jeví nežádoucím metabolitem, neboť zhoršuje parametry kultivace.



Obr. 4. Růstová křivka kvasinek *Candida utilis* na etanolu s přídavkem prvků (Ca, Mg, Fe)

Osa x — čas v hodinách, Osa y_1 — kvasničná sušina g/l, Osa y_2 — kyselina octová mg/l, Osa y_3 — ln kvasničné sušiny g/l

Tabulka 3. Vliv výpalků a anorganického podílu výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu

Přídavek	Množství mg/l	Výtěžek kvasničné suš. g	Výtěžnost % hm.	Zvýšení výtěžnosti % hm.
—	—	231	66,2	—
výpalky (sušina)	1 000	266	76,2	10,0
popel	310	258	74,0	7,8
Ca	64,0			
Mg	10,5	256	73,3	7,1
Fe	3,2			

Příčiny hromadění kyseliny octové při růstu kvasinek na etanolu nejsou jasné, jsou známy pouze některé podmínky její zvýšené tvorby a sice to, že její akumulace je podporována hodnotou pH vyšší než 4,5 a koncentrací etanolového substrátu vyšší než 2 g/l média [10]. Podle předpokládaného schématu metabolické přeměny etanolu je kyselina octová meziproductem, který vzniká z acetaldehydu účinkem acetaldehyd dehydrogenázy a za účasti acetyl-CoA syntetázy je převáděna ve svoji aktivní formu acetyl-CoA [11]. Hromadění kyseliny octové může být způsobeno pomalejší reakcí, ve které je převáděna na acetyl-CoA, což podporují výsledky Hanozeta aj. [12]; autoři sledovali aktivitu tří enzymů katalyzujících sled reakcí etanol → acetaldehyd → kyselina octová → acetyl-CoA a zjistili, že nejnižší aktivitu vykazovala

acetyl-CoA syntetáza. Také Abbott aj. [13] vysvětlují akumulaci kyseliny octové, při růstu bakterií na etanolu, zpomalením reakce katalyzované acetyl-CoA syntetázou pravděpodobně v důsledku nedostatku hořečnatých a také síranových iontů. Jiný důvod pro hromadění kyseliny octové při oxidaci etanolu kvasinkami uvádějí Novelli a Lipmann [14], a to nedostatek koenzymu A v kvasničných buňkách.

Z celkového hodnocení výsledků uvedených v předložené práci vyplývá, že anorganické složky melasových lihovarských výpalků, zastoupené především vápenatými, železitými a hořečnatými sloučeninami, se značnou měrou podléhají na stimulačním účinku výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu. Tato stimulace se projevuje především dokonalejším využitím etanolového substrátu pro tvorbu biomasy následkem potlačení akumulace kyseliny octové, resp. ztrát etanolu přeměnou na tuto kyselinu.*)

Na větším zvýšení výtěžnosti kvasničné hmoty z etanolu v přítomnosti výpalků, ve srovnání s přidávkou reprezentujícími anorganický podíl [tabulka 3], se s největší pravděpodobností uplatňuje vedle stimulačního účinku i asimilace některých uhlíkatých látek výpalků kvasničnými buňkami. Při výrobě krmného droždí z melasových výpalků se obvykle dosahuje výtěžnost 11 % hm., vztaženo na sušinu výpalků; tato hodnota může být zvýšena až na 25 % hm. přidávkou malého množství doplňkového C-substrátu k vyrovnání negativní uhlíkové bilance výpalků [16]. Z hodnot, uvedených v tabulce 3, lze schematicky odvodit, že přidávkou 22 g výpalků (tj. 17 g sušiny výpalků) vzniklo o 35 g kvasničné sušiny více než v kontrolní kultivaci. Přičte-li se 25 až 27 g kvasničné sušiny na účet příznivého vlivu anorganického podílu výpalků (popel nebo prvky Ca, Fe, Mg), zbude 8 až 10 g kvasničné sušiny, o které je možno předpokládat, že vzniká za účasti organických sloučenin výpalků, resp. zčásti jejich asimilací; při použití hodnoty výtěžnosti 25 % hm. asimilací použité dávky výpalků mohlo vzniknout až 4,2 g kvasničné sušiny.

*) Podobně stanovili Amano aj. [15], že při kultivaci kvasinek *Candida brassica* v polosyntetickém médiu s etanolem jako jediným zdrojem uhlíku je nutná přítomnost určitého množství Ca, Fe a Mg pro maximální využití substrátu.

Literatura

- [1] RYBÁŘOVÁ, J., ČERNÝ, V., REISINGER, J.: Kvas. prům., **25**, 1979, s. 200.
- [2] RYBÁŘOVÁ, J., ŠTROS, F., PECKA, K.: Kvas. prům., **24**, 1978, s. 202.
- [3] RYBÁŘOVÁ, J., PECKA, K.: Kvas. prům., **24**, 1978, s. 224.
- [4] RYCHTERA, M., GRÉGR, V.: Folia Microbiol., **22**, 1977, s. 480.
- [5] RUT, M., ŠTROS, F., ADÁMEK, L.: Hmotová bilance při syntéze kvasničné biomasy z etanolu. Výroční zpráva v. ú. C-11-329-011-01, VÚKPS, Praha, 1973.
- [6] RYBÁŘOVÁ, J., ADÁMEK, L., PECKA, K.: Kvas. prům., **24**, 1978, s. 106.
- [7] GRÉGR, V., RYCHTERA, M.: Analytické metody ke cvičení z kvasné chemie a technologie, I. díl. SNTL, Praha, 1966.
- [8] GRÉGR, V., SEINEROVÁ, V., HAUZAR, I., BARVÍNEK, J.: Návod k praktickým cvičením z kvasné technologie. SNTL Praha, 1962.
- [9] MOSTECKÝ, J., ŠTROS, F., AUNICKÝ, Z., ADÁMEK, L., KRUMPHANZL, V., RUT, M., HRUBAN, A.: AO 169 587, 1975.
- [10] ADÁMEK, L., RUT, M., ŠTROS, F.: Kvas. prům., **22**, 1976, s. 153.
- [11] MOR, J. R., FIECHTER, A.: Biotechnol. Bioeng., **10**, 1968, s. 159.
- [12] HANOZET, G. M., SIMONETTA, M., BARISIO, D., GEURRITORE, A.: Experimentia, **32**, 1976, s. 1246.
- [13] ABBOTT, B. J., LASKIN, A. I., MCCOY, C. J.: Appl. Microbiol., **25**, 1973, s. 787.
- [14] NOVELLI, G. D., LIPMANN, F.: J. Biol. Chem., **171**, 1948, s. 833.
- [15] AMANO, Y., YOSHIDA, O., KAGAMI, M.: J. Ferment. Technol., **53**, 1975, s. 264.
- [16] GRÉGR, V.: Sborník VŠCHT, odd. Fak. potr. technol., část 1, Praha, 1960, s. 101.

Rybářová, J.: Kultivace kvasinky *Candida utilis* na etanolovém substrátu. V. Vliv některých biogenních prvků

na růst ve čtvrtprovozním měřítku. Kvas. prům., 26, 1980, č. 7, s. 156—160.

Kultivačními pokusy ve čtvrtprovozním měřítku byl ověřen příznivý vliv přidavku vápenatých a železitých solí do živného média spolu se zvýšením obsahu síranu hořečnatého na růst kvasinek *Candida utilis* na etanolu. Bylo zjištěno, že kromě množství uvedených prvků, resp. Ca a Fe, má značný význam také jejich vzájemný hmotový poměr. Jako nejvhodnější se ukázal poměr Ca : Fe = 20 : 1 v rozsahu koncentrací 64—108 mg Ca a 3,2 až 5,4 mg Fe/l média při zvýšeném obsahu hořčiku o 10,6 mg Mg/l média. Přidavkem 64 mg Ca a 3,2 mg Fe/l média bylo dosaženo zvýšení výtěžnosti o 8 % hm. proti kontrolnímu pokusu. Srovnávacími kultivacemi bylo dále stanoveno, že přidavek uvedených prvků, tj. Ca, Fe a Mg do živného média, zvyšuje specifickou růstovou rychlost a omezuje akumulaci kyseliny octové, stejně jako přidavek popela výpalků nebo původních výpalků. Z pokusů vyplynul závěr, že sloučeniny vápníku, železa a hořčiku jsou nejdůležitějšími anorganickými sloučeninami melasových lihovarských výpalků, které mají podstatný podíl jak na stimulačním účinku popela výpalků, tak původních výpalků.

Рыбаржова, И.: Разведение дрожжей *Candida utilis* в этаноловой среде. 5-ая часть. Влияние некоторых биогенных элементов на их размножение в установках, отвечающих 1/4 размера промышленных. Кvas. пр. 26, 1980, № 7, стр. 156—160.

Эксперименты, осуществленные в установках, отвечающих по размерам одной четверти промышленных, подтвердили благоприятное влияние добавки в питательную среду солей окисного железа и кальция при одновременном повышении содержания в среде сульфата магния. Эти добавки стимулируют размножение дрожжей *Candida utilis* при их разведении в этаноловой среде. Было установлено, что кроме количества приведенных добавок, большую роль играет также их взаимное отношение. Оптимальными можно считать отношения Ca : Fe = 20 : 1 в пределах концентраций 64—108 мг/л для кальция и 3,2—5,4 мг/л для железа. Содержание магния следует довести до 10,6 мг/л. При добавке в среду 64 мг/л кальция и 3,2 мг/л железа выход дрожжей увеличился на 8 % (в массовом выражении) по сравнению с контрольным опытом. Добавки перечисленных элементов повышают удельную скорость размножения дрожжей и ограничивают накопление уксусной кислоты. Они, следовательно, действуют также как барда или ее зола. Видно, что соединения кальция, железа и магния являются весьма активными составляющими меласовой барды и ее золы, так как оказывают стимулирующее влияние на размножение дрожжей в этаноловой среде.

Rybářová, J.: Cultivation of *Candida utilis* in Ethanol Substrate. Part V. Effects of Some Bio-Elements on Yeast

Propagation in an Installation Scaled Down to 1/4 of Normal Size. Kvas. prům. 26, 1980, No. 7, pp. 156—160.

Experiments carried out with cultivation of *Candida utilis* yeast in an installation scaled down to 1/4 of normal size have shown a positive influence of ferric and calcium salts added to ethanol used as a substrate together with a higher concentration of magnesium sulphate. It has been established that beside the amounts of Ca and Fe added to substrate, very important is also their proportion to one another (in weight units). The best results ensure the following composition of the substrate: Ca : Fe = 20 : 1, concentration range for Ca from 64 to 108 mg/l, for Fe from 3,2 to 5,4 mg/l. The amount of magnesium should be increased by 10,6 mg/l. By adding 64 mg/l of Ca and 3,2 mg/l of Fe the yield was raised by 8 % as compared to reference experiments. Addition of Ca, Fe and Mg improves specific growth rate and inhibits accumulation of acetic acid and has, therefore, the same effects as stillage or stillage ashes. The results of experiments confirm that the compounds of Ca, Fe and Mg are the most important inorganic components of molasses stillage. The stimulating effects of stillage and stillage ashes are mainly due to their presence.

Rybářová, J.: Kultivation der Hefe *Candida utilis* auf Äthanolsubstrat. V. Einfluß einiger Bio-Elemente auf das Hefewachstum in Kleinbetriebsausmaß. Kvas. prům. 26, 1980, No. 7, S. 156—160.

Durch Kultivationsversuche im Kleinbetriebsausmaß wurde der günstige Einfluß der Zugabe der Kalk- und Eisensalze in das Nährmedium zusammen mit der Erhöhung des Magnesiumsulfatgehalts auf das Wachstum der Hefen *Candida utilis* auf Äthanol bestätigt. Es wurde festgestellt, daß neben mehreren angeführten Elementen, bzw. Ca und Fe, auch ihr wechselseitiges Masseverhältnis von großer Bedeutung ist. Es hat sich ergeben, daß das bestgeeignete Verhältnis Ca : Fe = 20 : 1 im Konzentrationsbereich 64—108 mg Ca und 3,2—5,4 mg Fe/l des Mediums bei einem erhöhten Gehalt des Magnesiums um 10,6 mg Mg/l des Mediums ist. Durch die Zugabe von 64 mg Ca und 3,2 mg Fe/l des Mediums wurde eine Ausbeuteerhöhung um 8 % M. im Vergleich mit dem Kontrollversuch erzielt. Die Vergleichskultivationen führten zu der Feststellung, daß die Zugabe der erwähnten Elemente, d. h. Ca, Fe und Mg zu dem Nährmedium die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit erhöht und die Akkumulation der Essigsäure beschränkt: dieselbe Wirkung hat auch die Zugabe von Schlempeasche oder ursprünglicher Schlempe. Aus den Versuchen kann geschlossen werden, daß die Ca-, Fe- und Mg-Verbindungen die wichtigsten anorganischen Verbindungen der Brennereimelasse-Schlempe sind, die sich wesentlich an der Stimulationswirkung der Schlempeasche sowie auch der ursprünglichen Schlempe beteiligen.