

# VPLYV MIKROELEMENTOV NA SACCHAROMYCES CEREVISIAE

P. NEMEC, J. BALAN, J. FUSKA, I. VELIKÝ

*Katedra technickej mikrobiológie a biochémie chemickej fakulty Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave*

PRIŠLO DO REDAKCIE 28. VII. 1952

## Úvod

Koncom minulého storočia fyziologická chémia zastávala názor, že podstatnými stavebnými článkami živých organizmov sú uhlohydráty, tuky a bielkoviny a že výskumom týchto troch skupín látok sa v podstate podarí rozriešiť problém väčšiny životných dejov. V tom čase sa myslelo, že organizmy pre svoju výživu potrebujú iba 10 prvkov, t. j. C, H, O, N, S, P, Fe, Ca, Mg a K. Analýzami popola rastlín sa však zistilo, že tento okrem spomenutých biogénnych prvkov obsahuje aj celý rad iných prvkov. Zpočiatku sa však prítomnosti týchto prvkov neprpisoval veľký význam, lebo sa predpokladalo, že sú v rastlinách prítomné iba náhodne, podľa toho, aké minerálne obsahovala pôda, na ktorej rastlina rástla.

Podľa kvantitatívneho podielu prvkov, zisteného analýzami rastlín, Bobko a Beljusov rozdelili prvky do troch skupín:

1. makroelementy, prítomné v rastlinách v množstvách  $10^1$ — $10^2\%$
2. mikroelementy, prítomné v množstvách  $10^{-3}$ — $10^{-6}\%$
3. ultraelementy, prítomné v množstvách  $10^{-7}$ — $10^{-12}\%$ .

Okrem týchto prvkov dokázal Bobko a Beljusov kvalitatívne aj celý rad iných prvkov (Be, Sc, Ga, W, Se, Mo, Sn, Cs, Ge, Sb, La, Ce, Dy, Sm, Yt).

Je prirodzené, že ani dnes nemôžeme považovať samu prítomnosť niektorého prvku v popole rastlín za dostatočný dôkaz jeho nevyhnutnosti. Aby sme mohli zaradiť prvok do skupiny prvkov, ktoré majú dôležitú úlohu vo fyziologických procesoch organizmu, musíme jeho neprítomnosťou vyvolať na pokusných organizmoch deficiénčné zjavy, ktoré sa potom snažíme prídavkom chýbajúceho mikroelementu vyliečiť; prípadne môžeme sledovať reakciu pokusných organizmov, pestovaných za normálnych podmienok, na pridávanie určitého prvku, t. j. pozorujeme, či nastáva stimulácia rastu, zvýšenie množstva sušiny, nápadné zmeny vo farbe a pod.

J. Sachs a W. Knop r. 1860 vypracovali nezávisle od seba metódu pestovania rastlín vo vodných roztokoch rôznych solí. Vodné kultúry umožňujú presnú kontrolu látok, stojacich rastlinám k dispozícii pre výživu, a neobyčajne sa teda hodí pre práce s mikroelementami. Touto metódou sa G. Bertramovi už r. 1905 podarilo dokázať, že Mn je pre rastliny podstatne dôležitý a že jeho nedostatok zapríčiňuje spomalenie alebo úplné zastavenie rastu.

Vyvolanie deficienčných znakov nedostatkom mikroelementov často naráža na veľké ťažkosti, lebo na krytie potreby mikroelementov pre pokusné rastliny často dostačujú množstvá týchto prvkov obsiahnuté v znečisteninách aj najčistejších chemikálií, v znečisteninách používanej destilovanej vody, prípadne sa skúmané prvky môžu vyluhovať z používaných nádob, alebo samo semeno rastliny obsahuje relatívne značné rezervné množstvá potrebných mikroelementov.

Tieto prvky pôsobia ako biokatalyzátory, prípadne ako súčiastky biokatalyzátorov a vo vyšších koncentráciách sa stávajú toxickými. Ich katalytický účinok sa prejavuje zaktivizovaním niektorých fyziologických procesov v organizme. Po prekročení optimálnej dávky dochádza v organizme k určitým poruchám fyziologických funkcií, ktoré sa prejavujú v zmene váhových pomerov produktov metabolizmu, v zmenách tvarových a farebných, v snížení množstva sušiny a pod. Po prekročení určitej koncentrácie mikroelementov prichádza k úplnému zastaveniu fyziologických procesov, čo zapríčiňuje odumretie organizmu za špecifických príznakov.

O fyziologickej funkcii jednotlivých mikroelementov vieme dnes pomerne veľmi málo, ale už zo samého faktu, že rastliny vyžadujú prítomnosť len veľmi malých množstiev týchto prvkov, vyplýva, že tu nemôže ísť o energetické alebo stavebné látky, ale že mikroelementy sú katalyzátormi jednotlivých enzymatických a biochemických dejov, odohrávajúcich sa v živom organizme. Naše vedomosti o mikroelementoch sú značne obširnejšie s patologického stanoviska, t. j. poznáme symptómy mnohých deficienčných chorôb, zapríčinených nedostatkom určitých mikroelementov, ale obyčajne nepoznáme presnú fyziologickú funkciu mikroelementov v živom organizme.

Napriek komplikovanosti výskumu, zaoberajúceho sa mikroelementami, a napriek tomu, že sa podstatná časť prác v tomto odbore vykonala iba priebehom posledných dvoch-troch desaťročí, existuje dnes už celý rad publikácií, ktoré encyklopedicky spracúvajú dnešné poznatky a pokusy s mikroelementami.

O vplyve mikroelementov na mikroorganizmy vieme ešte menej ako o vplyve týchto prvkov na vyššie rastliny. Tu nielenže zpravidla vieme iba veľmi málo o fyziologickej funkcii jednotlivých mikroelementov, ale veľmi často nevieme nič alebo len veľmi málo o tom, aké mikroelementy jednotlivý druh mikroorganizmu potrebuje.

Viacere pokusy dosvedčujú, že mnohé naše rastliny majú za normálnych podmienok pestovania k dispozícii iba suboptimálne množstvá mikroelementov, množstvá, ktoré síce dostačujú na to, aby sa u organizmu neprejavili nápadné deficienčné znaky, pričom však tieto množstvá často ani zďaleka nedostačujú na to, aby nám rastliny poskytli maximálnu úrodu. Napr. P. N e m e c, L. P a s t ý r i k a R. N á d v o r n í k, prípadne P. N e m e c, L. P a s t ý r i k, T e s a ř o v á, L u x a V o ř í š e k dosiahli prídavkom smesi mikroelementov do pôdy podstatné zintenzívnenie rastu sadeníc *Prunus insititia* a *Prunus avium*: ďalej P. N e m e c, J. V o ř í š e k, L. P a s t ý r i k a R. N á d v o r n í k

dosiahli zvýšenie úrody rajčiakov. *Arnold* dosiahol v kultúrach špargle a lociky, pestovaných vo vodných roztokoch až desaťnásobné zvýšenie čerstvej váhy tých rastlín, do ktorých živnej pôdy pridal smesi mikroelementov, a *McHargue* dosiahol pri kultivačných pokusoch v roztokoch značne vyššie úrody hrachu a pšenice po pridaní malého množstva Mn.

Sovietsky mikrobiológ *Jerusalemskij* zistil stimulujúci účinok zemiakovej šťavy na rast, rozmnožovanie a produkciu acetónu a etylalkoholu u acetón-etylových baktérií. Podarilo sa mu dokázať, že túto stimuláciu nezapríčiňujú vzrastové faktory, prítomné v zemiakovej šťave, ale že je to dôsledok pridanania mikroelementov prítomných v tejto šťave. Podľa analýz popola zemiakov zostavil dve smesi mikroelementov, ktoré mali približne ten istý stimulačný účinok ako zemiaková šťava.

Je nesporné, že účinok správne vyváženej smesi mikroelementov musí byť väčší ako účinok jednotlivých mikroelementov samých. Keďže však niektoré mikroelementy pôsobia oproti sebe antagonisticky a iné sa môžu vzájomne nahrádzať a dopĺňať, je neobvyčajne dôležité, aby smes bola v dokonalej rovnováhe, keďže by sa v opačnom prípade mohli prejavíť škodlivé účinky.

Pri našej práci sme pracovali so smesou 11 mikroelementov, ktorej autorom je *P. Nemeec*. Jej zloženie sa uvádza v *tab. 1*. Skúmali sme aj vplyv Zn, Mn a Cu samostatne na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*.

V ďalšom podávame krátky prehľad o účinkoch jednotlivých smesi použitých mikroelementov:

**Bór** je mikroelement, ktorý sa vo všeobecnosti najviac spomína v spojitosti so srdiečkovou hnilobou cukrovej repy, chorobou, ktorú zapríčiňuje ako to dokázal *Brandenburg*, nedostatok bóru v pôde. *Peivc* dokázal, že bór priaznivo ovplyvňuje vytváranie uhľohydrátov v rastlinách, a *Kuhn* o tomto mikroelemente predpokladá, že pôsobí pri udržiavaní normálnej koloidnej kvality protoplastu.

**Mangán** považuje *Lundergardh* za katalyzátor základného dýchania vyšších rastlín a predpokladá, že Mn má u rastlín podobnú úlohu ako Fe u živočíchov. *McHargue* dokázal, že rastliny, pestované vo vodných roztokoch solí s prídavkom solí Mn, vytvárajú viac plodov ako kontrolné rastliny, do ktorých syntetickej pôdy Mn nebol pridaný. Tento autor zastáva názor, že Mn ovplyvňuje tvorbu chlorofylu a tým má dôležitú úlohu v procese asimilácie CO<sub>2</sub>, a predpokladá, že tento mikroelement je súčasne úzko spätý s oxydázami a s enzýmami štiepiacimi cukor, tuky a škrob. *McHargue* upozorňuje i na to, že sa mangán nachádza vo zvýšencm množstve najmä v rastlinách, ktoré obsahujú značné množstvá vitamínov. *Rudra* dokázal, že klíčky rastlín pestovaných v pôdach s prídavkom Mn obsahujú viac kyseliny askorbovej ako klíčky kontrolných rastlín. *Burgstroem* pripisuje mangánu funkciu pri redukcii nitrátov, čo pri nedostatku tohto mikroelementu zapríčiňuje spomalenie alebo zastavenie rastu.

*Meď* je mikroelement, ktorý v malých koncentráciách často pôsobí stimulačne na mnohé rastliny, vo väčších koncentráciách však často pôsobí veľmi toxicky. Quarteroli považuje meď za nevyhnutne potrebný prvok pre normálny vzrast rastlín. Zistilo sa, že Cu je neobyčajne potrebná pre rastliny najmä v počiatočných štádiách rastu a nedostatok tohto mikroelementu v tomto štádiu sa nedá nahradiť pridaním roztokov solí medi v neskorších štádiách vývoja. Cu je súčasťou hemocyanínu, modrého krvného farbiva nižších organizmov, a zdá sa, že tento prvok má určitú úlohu pri tvorbe hemoglobínu potkanov. Hart a spolupracovníci totiž dokázali, že meď môže nahradiť železo pri umele vyvolanej anémii potkanov. Elvehjem predpokladá, že Cu pôsobí ako oxydačný katalyzátor. K podobnému názoru došiel i Kubowitz, ktorý zistil, že oxydáza zemiakov je vlastne bielkovina s obsahom medi. Muider zistil, že za neprítomnosti Cu *Aspergillus niger* netvorí spóry a že sa stúpajúcim množstvom prídavanej medi mení farba spórov od žltej až po čiernu. McHargue a Calfee dokázali stimuláciu rastu kvasníc po pridaní medi. S patologického stanoviska je v spojitosti s meďou zaujímavé to, že prídávaním tohto mikroelementu do pôdy sa dá vyliečiť tzv. choroba noviny (Urbarma chungskraankheit), ktorá sa vyskytuje na rašelinových pôdach.

*Zinok* sa v zelených rastlinách nachádza v najväčšom množstve v listoch a v stopkách a v značnom množstve sa nachádza aj v ihličí ihličnatých stromov. Podľa Mousserona a Farouxa obsahujú huby od 40 do 280 mg Zn/kg. Raulin už r. 1869 predpokladal, že tento mikroelement je pre vzrast húb nevyhnutný. Viacerí autori dokázali, že vzrast *Aspergillus niger* je stimulovaný prídavkom Zn. Bortels predpokladá, že Zn je nevyhnutne potrebný i pre *Bacillus prodigiosus* a pre kvasinky. Zn podporuje vegetatívny vzrast nižších rastlín a klíčenie semien. Roberg predpokladá, že Zn je negatívny fotokatalyzátor, že je teda antagonistom Fe.

*Jód*. Tento mikroelement je všeobecne známy ako prvok, ktorý má dôležitú úlohu pri normálnej funkcii štítnej žľazy. Scharrer a spolupracovníci zistili priaznivý účinok jódu na dojivosť kráv. Účinok jódu na rastliny nie je dostatočne preskúmaný.

*Bróm* je tiež mikroelement, ktorého účinok nie je dostatočne preskúmaný. Viacerí autori však zistili, že pôsobí stimulačne na rast niektorých rastlín, najmä na fazuľu a ryžu.

*Titan* je prítomný v mnohých zelených rastlinách. Young zistil stimulačný účinok tohto mikroelementu na rast ovsa. Podobnú skutočnosť zistili Němeca Kaš o vplyve titanu na rast hrachu a lucerny. Títo autori predpokladajú, že sa v rastlinných organizmoch môžu navzájom funkčne nahradzovať Ti a Fe, že teda Ti je oxydačným katalyzátorom výmeny látkovej.

*Cín*. Aj o tomto mikroelemente stojí k dispozícii pomerne málo bezpečne zistených údajov. Niektorí autori pozorovali stimulačný účinok Sn na klíčenie a skorý rast hrachu, ovsa a pšenice, kým iní autori popierali priaznivý vplyv tohto mikroelementu na kultúrne poľnohos-

podárske rastliny. P i r s c h l e dokázal, že Sn je veľmi silne toxický pre *Aspergillus niger*, a M a y zistil zvýšenú produkciu acetaldehydu kvasinkami po pridaní n/200 roztoku SnCl<sub>2</sub>.

**Lítium.** Fyziologická funkcia Li nie je presne známa. Soli Li pôsobia toxicky najmä na rastliny, ktoré pežadujú vo výžive aj Ca, avšak neprejavujú toxické účinky na najnižšie riasy, ktoré nepotrebnú vápnik, a na huby. M a a s e n pozoroval vplyv lítnej soli na baktérie. Z i s t i l, že pod ich vplyvom baktérie narastajú do obrovských rozmerov, napuchajú a membrány zoslizovatejú. Predpokladá, že k týmto zjavom prichádza v dôsledku poruchy v koloidnom systéme buniek pod vplyvom vysokej hydratácie lítneho iónu. Morfologicky pozmenené tvary buniek u kvasiniek pod vplyvom Li opísal W i c k e r s h a m a F a b i a n .

**Nikel** je mikroelement, ktorý sa nachádza vo veľmi mnohých rastlinách, avšak jeho fyziologický význam nie je jasný. Zistilo sa, že pre mnohé rastliny je toxický už v pomerne nízkych koncentráciách. P i r s c h l e skúmal vplyv Ni na kvasivosť kvasiniek a zistil, že tieto sú oveľa citlivejšie oproti toxickým vplyvom Ni ako Co.

**Kobalt** ako mikroelement má veľký význam najmä pre živočíchy. Vitamín B<sub>12</sub> ho obsahuje v svojej molekule. Je známe, že tento vitamín má dôležitú úlohu pri tvorbe červených krviniek a že je súčasťou antianemického faktora. Zdá sa, že je pre baktérie a vyššie rastliny dôležitejší ako Ni. Na pliesne a *Aspergillus niger* pôsobí stimulačne a je menej toxický ako Ni.

### Všeobecná časť

Za necelých 300 rokov, ktoré uplynuli od mylného vyhlásenia parížskej lekárskej fakulty o jedovatosti kvasiniek, nastal úplný obrat v ocenení významu a hodnoty kvasiniek a z jedovatého produktu sa stala cenná surovina, bohatá svojou biologickou hodnotou, a surovina s nemalým významom pre moderný farmaceutický priemysel.

Na začiatku sa ako pekárske droždie používaly iba svrchné pivovarské kvasinky, čo sa čiastočne robí až podnes. Len po dlhých desaťročiach (1781) sa objavilo prvé lisované droždie. Od r. 1850, keď bol vypracovaný tzv. viedenský postup výroby droždia, zaznamenal tento priemysel značný vzostup. Zaviedly sa rôzne spôsoby výroby, zvýšil sa výťažok kvasníc v pomere k liehu a na váhu spracovanej melasy a zvýšila sa aj kvalita droždia. Zatiaľ čo sa zdá, že ostatný kvasný priemysel dosahuje kulminačný bod, droždiarenstve možno očakávať veľký vzostup.

Príčin k predpokladu tohto vzostupu je niekoľko. Jednak je to lacná výroba tohto spotrebného artiklu, pretože i pri klasickej výrobe droždia z melasy je táto výroba nepomerne lacná vzhľadom na dôležitosť a cennosť výrobku. Ak uvážime, že je dnes možné a v budúcnosti sa pravdepodobne aj použijú na výrobu kvasiniek iné lacné uhľohydráty surovín, ktoré by sa inak nedaly použiť pre potravinárske účely

(sulfitové výluhy, výpalky, hydrolyzáty dreva), vidíme, že je to proces výroby dôležitý pre zužitkovanie odpadových surovín a proces značne zhodnocujúci aj inú výrobu. Avšak vzostup možno očakávať nielen z týchto príčin. Nejde tu v podstate len o zásobenie trhu kvasnicami, dnes používanými najmä v pekárstve, ale vzhľadom na pomerne nízku cenu a vysokú biologickú hodnotu treba umožniť zvýšiť aj spotrebu potravinárskeho a krmného droždia, dosiaľ iba veľmi málo používaného. Pre potravinárske účely sa kvasinky používaly za druhej svetovej vojny, keď sa v určitom pomere miešali s mäsom a v podobe paštét sa predávaly ako cenné zdroje bielkovín a vitamínov.

### Složenie droždia

Droždie obsahuje približne 75% vody a 25% sušiny. Z toho sušina droždia obsahuje asi 47% bezdusíkatých organických látok, medzi nimi aj vitamínov, prípadne provitamínov. K bezdusíkatým látkam patria najmä uhľohydráty, a to cukry, glykogén, celulózy, hemicelulózy a látky gumovitej povahy, ďalej látky tukovitej povahy, z nich najmä neutrálne tuky, mastné kyseliny, fosfolipidy a steroly. Priemerné hrubé složenie droždia v percentách je toto:

	lisované droždie	sušina
Voda	72,0%	0,0%
Dusíkaté látky N × 6,25	12,6%	45,0%
Bezdušikáté látky	13,2%	47,0%
Popoloviny a i.	2,2%	8,0%

Okrem toho droždie obsahuje mnohé vitamíny a provitamíny. Z vitamínov najmä skupinu vitamínov rozpustných vo vode (komplex B); zo skupiny vitamínov rozpustných v tukoch je to najmä provitamín D, ergosterol. Droždie je aj zdrojom mnohých dietetických faktorov s účinkom vitamínov. Obsah vitamínov udaný v mg/100 g, je asi tento:

	lisované droždie	sušina
B <sub>1</sub>	0,60	2,0
B <sub>2</sub>	0,90	3,0
amid kyseliny nikotínovej	9,0	30,0
B <sub>6</sub>	4,0	13,9
Ergosterol (provitamín D)	300,0	1000,0

Niektoré mikroorganizmy obsahujú až 30—60% tuku v sušine (*Torula pulcherima*, *Torula lipofera*, *Oidium lactis*, *Endomyces vernalis*). Staršie kultúry kvasiniek obsahujú viac tuku ako mladé kultúry; % tuku možno zvýšiť vetraním, t. j. dostatočným prístupom kyslíka a vyšším dávkovaním uhľohydrátov v substráte.

Po uvážení biologickej hodnoty droždia vidíme, že význam zvýšenia výroby potravinárskeho a krmného droždia je značne veľký.

V našej práci sme sa zaoberali problémom zvýšiť produkciu kvasníc tak, aby pritom neupadla kvalita, aby sa zvýšenie kvantity nedialo na úkor kvality. Týmto problémom zvýšenia produkcie sa zaoberal aj

V. Stuchlík, ktorému sa pridávaním rôznych vzrastových faktorov za propagácie a polkontinuálnym vedením rozmnožovania podarilo zvýšiť kvantitu droždia, čím tiež značne zlacnela výroba.

Podľa sovietskych autorov možno podstatne zvýšiť produkciu fermentačných produktov mikroorganizmov pridávaním smesi určitých mikroelementov. V našej práci sme sa snažili využiť tieto poznatky. Pracovali sme na zvýšení kvasivosti a sušiny kvasníc tak, že sme pridávali do substrátu určité množstvá známej smesi mikroelementov. O složení upotrebenej smesi a o dosiahnutých výsledkoch sa zmienime v druhej časti.

### *Charakteristika mikroorganizmov použitých pre pokusy*

*Saccharomyces cerevisiae* Hansen, kvasinky používané najviac v droždiarenstve, patria do rodu kvasiniek *Saccharomyces* a tie do triedy húb (*Fungi*), a to do skupiny vyšších húb. *Saccharomycety* sú mikroorganizmy, tvoriace bunky guľatého, mierne vajcovitého tvaru, veľkosti 5—10 mikrónov. Nepohlavne sa kvasinky rozmnožujú pučaním. Z materskej bunky vyrastie pupenec, ktorý vyrastá na dcérsku bunku, ktorá alebo ostáva spojená s materskou bunkou, alebo sa po dorastení oddeľuje a stáva sa samostatnou a schopnou ďalšieho rozmnožovania. Takto môže jediná materská bunka vytvoriť shluk až 60 jedincov charakteristicky zostavených v retiazkovitých a rozvetvených útvaroch. K sporulácii prakticky vo výrobe nedochádza. Generačná doba, t. j. čas, za ktorý sa počet kvasiniek zdvojnásobí, je v droždiarenstve udávaný medzi 3—6 hod. Je to doba, kým sa dcérska bunka stane úplne shodná s materskou bunkou. Generačná doba závisí od teploty, množstva kyslíka a od množstva a druhu živín. Pri nasadení kvasiniek do substrátu nastáva najprv prispôbenie kvasiniek prostrediu a len asi po 1 hod. začína vývoj a rast pupencov. Pri tejto fáze treba dostatočné množstvo cukru, ktoré možno postupne snižovať. Ku koncu kvasenia dorastajú kvasinky na normálnu veľkosť a tvar a nastáva kľud. Ako sme už spomenuli, veľký význam pre rast má vetranie, t. j. prívod kyslíka, ktorý je potrebný pri syntéze látok na výstavbu bunky, ako aj na dýchanie. Význam má však iba ten kyslík, ktorý je rozpustený v zápore, lebo iba tento môžu kvasinky upotrebiť. Pri nedostatku kyslíka sa začína rozmnožovanie spomaľovať a nastáva prevažne tvorba alkoholu. Teplotné optimum pre kvasinky tohto druhu je 28—30 °C. nižšia teplota spomaľuje rast, vyššia spomaľuje množenie a napomáha skvasovanie cukru na alkohol. Dôležité je aj dodržanie pH hodnoty, ktorej optimum sa udáva medzi 4,5—5,5. Nižšia hodnota pH snižuje možnosť infekcie baktériami.

Kvasinky, ktoré sme používali pre pokusy, boli kvasinky III. generácie, používané v technologickej prevádzke trencianskej droždiarne. Pôvodná kultúra bola dovezená z Anglicka r. 1935 a od toho času sa pre výrobu udržiava preočkovaním Lindnerovu metódou. Kultúra nejaví známky degenerácie.

### Složenie smesi MEB-49

Pri voľbe vhodných prvkov a ich vzájomnom pomere vychádzal autor smesi P. Nemec z určitých teoretických predpokladov. Pre splnenie teoretických a praktických požiadaviek sa smes MEB-49 zostavila z 11 prvkov, mikroelementov, pričom hlavnou požiadavkou kladenou na smes bola biologická účinnosť. Aby sa tejto požiadavke vyhovel, bolo potrebné, aby jednotlivé prvky smesi boli vo forme prístupnej pre organizmy, t. j. aby holi vo vode rozpustné. Dôležité je aj to, aby sa rozpustnosť nenarušila samým organizmom alebo aby nenastalo vy-srážanie nepriaznivou koncentráciou vodíkových iónov v prostredí, t. j. v živnej pôde. Príprava tejto smesi je analogická s prípravou smesi mikroelementov ME-49, opísanej P. Nemcom [19].

Tab. 1. Složenie smesi MEB-49

B	1,00 v. d.	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	20,00 g
Mn	0,70 v. d.	$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	14,00 g
Cu	0,50 v. d.	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	10,00 g
Zn	0,50 v. d.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10,00 g
J	0,05 v. d.	KJ	1,00 g
Br	0,05 v. d.	$\text{KBr} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,00 g
Ti	0,14 v. d.	titanyl-citrát amónny $\text{H}_2\text{O}$	2,80 g
Sn	0,05 v. d.	$\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,00 g
Li	0,05 v. d.	citrát litný	1,00 g
Ni	0,10 v. d.	$\text{NiSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,00 g
Co	0,10 v. d.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2,00 g
Zriedovadlo	12,50 v. d.	kyselina citrónová	250,00 g
$\text{N}_2$	2,44 v. d.	$\text{NH}_3$	59,20 g

### Vplyv mikroelementov na kvasivosť

Z uvedených faktov a úvah je jasné, že prvky, ktoré zahrnujeme pod pojem mikroelementy, majú nemalý význam pri najrôznejších biochemických procesoch. Nemožno popierať, že mnohé mikroelementy spôsobujú stimuláciu rastu a rozmnožovania, avšak si treba uvedomiť, že tieto prvky po prekročení optimálnej dávky prejavujú toxické účinky.

V tejto časti uvedieme praktické výsledky predpokusov a pokusov s jedrotrlivými mikroelementami (Zn, Mn, Cu), ako aj experimentálne výsledky o vplyve smesi MEB-49 na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*. Pokusy pre zistenie rýchlosti kvasenia sa robili na substráte, kde základným uhľohydrátom bola sacharóza prítomná v melase, to znamená, že substrát bol pripravený z technickej melasy, ktorú sme zriedili ako pri priemyselnej výrobe droždia.

Melasa, ktorú sme používali, mala toto složenie:

Acidita v n/l NaOH	1,8 $\text{cm}^3/100 \text{ g}$
pH	6,51
Polarizácia	48,02
Kvasiteľný cukor: melasa	28,34% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
	45,88% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
melasa + 20% cukru	
Dusík	1,615%
Fosfor	0,025%
Popol	11,89%



V popole tejto melasy sa podarilo polarograficky dokázať mikroelementy Cu, Cr, Mn a Zn, pričom Zn bol prítomný v koncentrácii  $5 \times 10^{-5}$  mólov. Polarografické analýzy sme robili metódou štandardného pridania. Treba však poznamenať, že polarografické stanovenie mikroelementov nie je dostatočne presné, takže treba tieto analýzy považovať len za informatívne.

Aciditu sme stanovovali titračne, dusík K jeldahlou metódou, fosfor gravimetricky a koncentráciu vodíkových iónov pH-metrom.

Percento skvasiteľného cukru sa v substráte určilo priamym skvasením po prechádzajúcej úprave koncentrácie cukru, pH a hladiny fosforu.

Na predpokusy sme používali kvasnice III. generácie, a to tak, že sa 2 g lisovaných kvasníc dekorate emulgovaly v 20 cm<sup>3</sup> vody a z emulzie sa odpipetovalo po 1 cm<sup>3</sup> do 25 cm<sup>3</sup> vhodne upraveného substrátu.

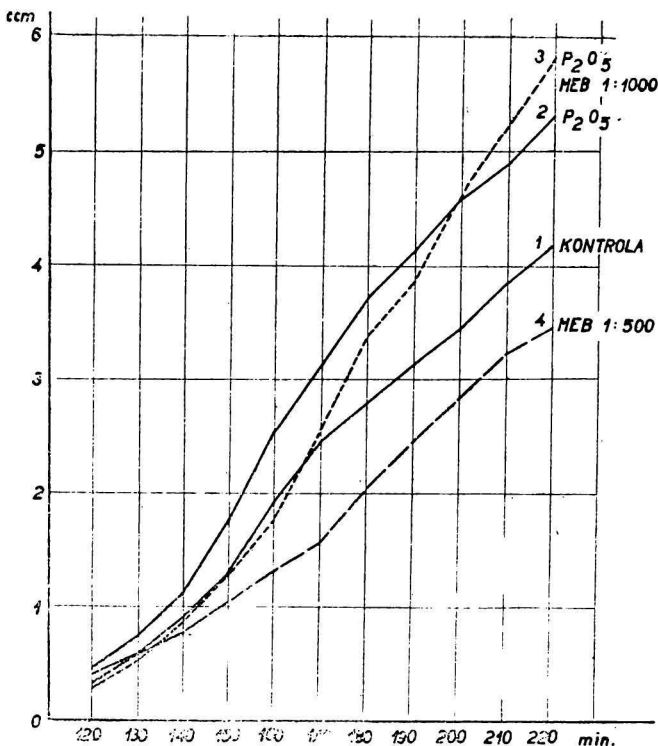
V predpokusoch sme zisťovali, či je potrebné do substrátu pridávať fosfor a či smes MEB-49 bude mať nejaké účinky na kvasivosť kvasiniek. Rýchlosť skvasovania sme zisťovali v Einhornových sacharimetroch a ako substrát sme použili takto upravenú melasu:

5,5 g melasy sa smiešalo s 50 cm<sup>3</sup> destilovanej vody a pridalo sa 0,01 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vo forme kyseliny fosforečnej a pH sme upravili na 4,5 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH). Potom sa doplnil substrát na 100 g, zahrial sa do varu a za horúca sa filtroval na sklenom filtri G 3 a G 4. Po filtrácii sa substrát vysterilizoval a aby sa vyšlo možnému nepresnému naočkovaniu, očkovovalo sa emulziou kvasníc celé množstvo spoločne. Naočkovanú melasu sme sterilne rozdelili do piatich Erlenmeyerových baniek a pridávali sme do nich množstvá P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, prípadne MEB-49 (tab. 2).

Tab. 2. Složenie substrátov na predpokusy

Číslo	Melasa g	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	MEB-49 konc.	H <sub>2</sub> O	pH
1	5,5	—	—	doplniť	4,5
2	5,5	0,01	—		4,5
3	5,5	0,01	0,1 cm <sup>3</sup> (= 1:1000)	100	4,5
4	5,5	—	0,2 cm <sup>3</sup> (= 1:500)	cm <sup>3</sup>	4,5

Z každej koncentrácie sa sterilne naplnily dva sacharimetre a tieto sa uložili do termostatu pri 30 °C. Pribehom kvasenia sa počnúc druhou hodinou zaznačovali množstvá vylúčeného CO<sub>2</sub> každých desať minút. Priemerné hodnoty jednotlivých sérií sa zaznačily do tab. 3, prípadne sa naniesly do grafu 1.



Graf 1. Predpokusy v sacharimetroch

1. Kontrola (melasa)
2. Melasa + P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>
3. Melasa + P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + MEB-49 1:1000
4. Melasa + MEB-49 1:500

Z tabuliek i z grafu vidieť, že množstvo fosforu, potrebné pre riadne skvasenie a pre normálne fyziologické funkcie kvasiniek, nie je v samej melase prítomné, keďže celá *krivka 1* (melasa bez fosforu) prebieha značne pod *krivkou 2* (melasa + P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

Ďalším poznatkom je, že smes MEB-49 je vo vhodnej koncentrácii schopná stimulovať kvasenie *Saccharomyces cerevisiae* (*krivka 3*, koncentrácia 1:1000). Z *krivky 4* (MEB-49, 1:500) vidieť, že táto dávka je už toxická, že značne spomaľuje kvasenie.

Ako sme neskôr pri hlavných pokusoch zistili, priebeh *krivky 3* je charakteristický pre priebeh kvasenia za prítomnosti takého množstva mikroelementov (či už smesi MEB-49 alebo samotného Zn, Mn alebo Cu), ktoré sa blíži toxickej dávke. Vo všetkých prípadoch totiž tieto koncentrácie mikroelementov spôsobovali značné spomalenie kvasenia v počiatočných štádiách fermentácie, ale po určitom čase sa rýchlosť vylučovania CO<sub>2</sub> vždy značne zrýchlila, takže v konečnom výsledku

Tab. 3. Vylúčené množstvá CO<sub>2</sub> pri predbežných pokusoch v sacharimetroch

Číslo →	1	2	3	4
Min.	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
120	0,40	0,50	0,30	0,35
130	0,60	0,73	0,56	0,60
140	0,94	1,14	0,90	0,85
150	1,35	1,80	1,32	1,05
160	1,95	2,50	1,80	1,33
170	2,45	3,15	2,60	1,62
180	2,80	3,70	3,40	2,10
190	3,15	4,10	3,90	2,50
200	3,50	4,55	4,60	2,90
210	3,90	4,90	5,20	3,30
220	4,25	5,35	5,80	3,50

predbehla kontrolnú sériu pokusov. Tento zjav pravdepodobne možno pripísať postupnému prispôsobovaniu sa mikroorganizmov prostrediu s neobvykle vysokým obsahom mikroelementov.

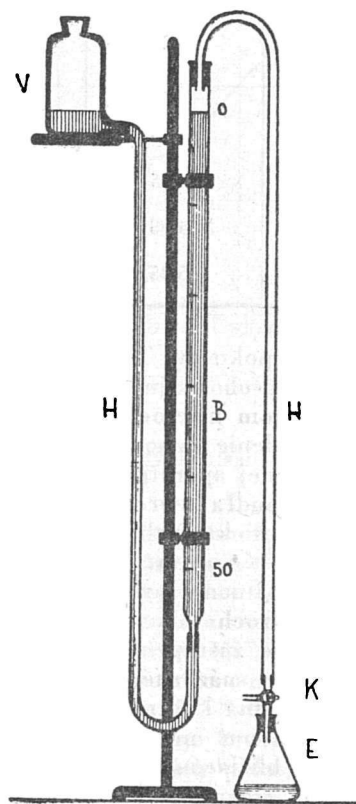
Pre dôkladnejšie posúdenie menovanej smesi sme prišli k ďalším pokusom, ale už v riadnej aparátúre, ktorú sme používali pri hlavných pokusoch. Keďže sa podľa teoretických predpokladov, ba aj podľa experimentálnych prác niektorých autorov dalo usudzovať, že niektoré mikroelementy budú stimulovať rýchlosť kvasenia aj samostatne, pristúpili sme k experimentálnemu vyskúšaní vplyvu rôznych koncentrácií Mn, Cu a Zn, teda troch mikroelementov, ktoré sú v smesi po bôre váhove najvýznačnejšie zastúpené. Výsledky pokusov sú uvedené v nasledujúcich tabuľkách a znázornené na *grafoch* 2, 3, 4, v ktorých je narysovaný priebeh kvasenia kontrolnej série (bez mikroelementov), série s optimálnym množstvom mikroelementov v substráte a série s hladinou mikroelementov, blížiacou sa toxickej dávke.

#### *Aparatúra, princíp a postup merania rýchlosti kvasenia na základe vylúčeného množstva CO<sub>2</sub>*

Aparatúra (*obr. 1*) sa skladala z vlastnej fermentačnej banky (E), ktorá sa plnila spoločne naočkovaným substrátom a patričným množstvom solí jednotlivých mikroelementov alebo smesou MEB-49. Hrdlo

banky bolo uzatvorené dobre tesniacou gumovou zátkou a po započatí pokusu bolo okolie zátky zatreté špeciálnym lakom, aby tesnenie bolo čo najdokonalejšie. Cez zátku prechádzala rúrka pre odvod plynu. Táto bola opatrená trojcestným kohútom (K), pomocou ktorého sa vyrovnával tlak po nasadení zátky. Gumovou hadičkou (H) bol odvod plynu pripojený na byretu (B) obsahu 50 cm<sup>3</sup> a táto zasa bola svojím druhým, teda dolným koncom spojená gumovou hadičkou s vyrovnávacou nádobkou (V), naplnenou nasýteným roztokom NaCl.

Pri pokusoch sa používalo 15 takýchto aparátúr, ktoré nemohly byť pre svoju rozlohu umiestené do termostatu. Teplota v miestnosti, kde bola uložená aparatúra za jednotlivých pokusov, kolísala maximálne  $\pm 1,25$  °C a kolísanie tlaku bolo maximálne  $\pm 0,8$  mm Hg, čo je vzhľadom na vylúčené množstvá a pracovné chyby zanedbateľná úchylka, a



Obr. 1. Aparatúra na meranie rýchlosti kvasenia.

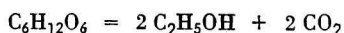
- E — Erlenmeyerova banka
- K — trojcestný kohút
- H — hadica
- B — byreta
- V — vyrovnávacía nádobka

preto sa nebrala do úvahy. Pri začatí pokusu bola hladina vyrovnávacieho roztoku NaCl na 50 dielku byrety, teda na značke horného konca. Ostatná časť aparatury, teda od 50 dielku k fermentačnej banke a až po hladinu substrátu bola vyplnená vzduchom. (Pre vyrovnávanie sa používal roztok NaCl preto, aby sa obmedzilo rozpúšťanie vylúčeného CO<sub>2</sub> vo vyrovnávacej tekutine, čím by sa boly výsledky značne skreslili.)

Fermentačné banky sa plnily vypočítaným množstvom substrátu, a to tak, aby sa po skvasení všetkého skvasiteľného cukru nevytlúčil objem CO<sub>2</sub> väčší ako obsah byrety, teda 50 cm<sup>3</sup>. Aby sme obmedzili možné chyby pri odpočítavaní a meraní objemu plynu, používali sme pre meranie toho istého pokusu vždy tri paralelné aparatury, to znamená, že účinok každej koncentrácie mikroelementov pridanej do substrátu sa v tom istom pokuse sledoval trojmo.

Hodnoty medzi sebou sa potom porovnali a extrém, ak vznikol, sa vynechal a do grafu sa nanášaly priemerné hodnoty minimálne z dvoch aparatur. K takémuto zásahu sme museli prikrčiť niekoľkokrát, keď množstvo plynu v jednej aparature bolo nápadne menšie ako v ostatných dvoch aparaturách. Je zrejmé, že v týchto prípadoch išlo o unikanie plynu v dôsledku netesnenia zátky. Extrémne väčšie množstvo plynu v jednej z paralelných troch aparatur v našich pokusoch nevzniklo.

Samo meranie bolo okrem chýlostivosti tesnenia aparatury pomerne jednoduché a ľahko uskutočniteľné. Sacharóza sa po hydratácii menila na dve hexózy a tie sa enzymaticky menily podľa sumárnej rovnice:



Pri začatí fermentácie sa pretlak, vzniknutý silným vtlačeníím zátky do fermentačnej banky, vypustil otvorením trojcestného kohúta. Pri otvorení trojcestnom kohúte sa vyrovnaly hladiny vyrovnávacieho roztoku tak, aby boly presne v úrovni hornej značky na byrete, a potom sa trojcestný kohút otočil tak, aby spájajal fermentačnú banku s hadicou vedúcou k byrete. Po začatí kvasenia začal zo substrátu unikať CO<sub>2</sub>, takže za vznikajúceho pretlaku sa začal vyrovnávací roztok pretlačovať do vyrovnávacej nádobky. Po rozbehnutí kvasenia sa v určitých intervaloch začalo s odpočítavaním vylúčeného množstva CO<sub>2</sub>, a to tak, že sa pomaly snižovala vyrovnávacia nádobka až dotiaľ, kým hladiny vyrovnávacej tekutiny v nádobke a v byrete boly v jednej úrovni, teda v tom okamihu bol v byrete ten istý tlak ako mimo aparatury a množstvo vylúčeného plynu sa mohlo priamo odpočítať na delení byrety. Nádobka sa potom znova zavesila do pôvodnej výšky, takže priebehom fermentácie bol v aparature vždy mierny pretlak. Experimentálne získané hodnoty, prípadne ich aritmetické priemery sa nanášaly do tabuliek a grafov. Pri pokusoch sa naraz zapojilo 15 aparatur, čo zodpovedá piatim rôznym koncentráciám sledovaným trojmo. Pri každom pokuse sa popri rôznych koncentráciách jednotlivých mikroele-

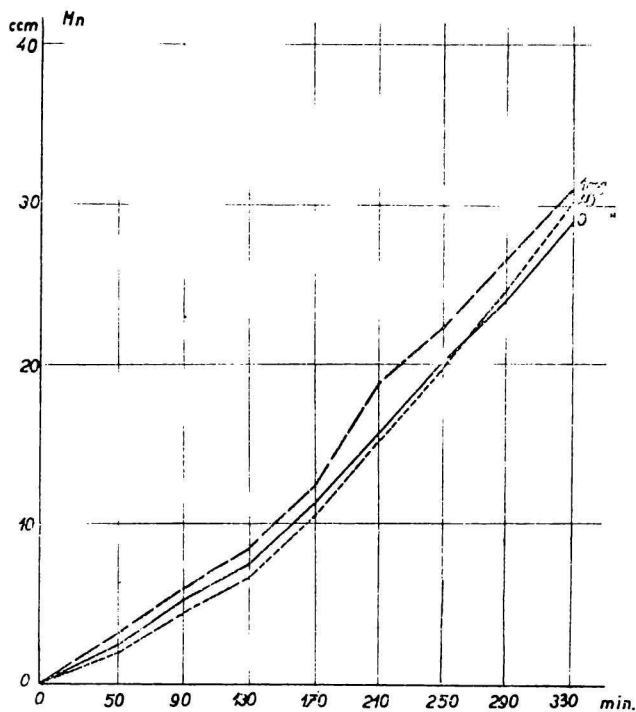
mentov alebo smesi mikroelementov nasadila i kontrolná trojica, t. j. substrát bez pridania mikroelementov.

### Vplyv Mn na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*

Emulzia a dávkovanie kvasníc. K naočkovaníu sa znova braly kvasnice III. generácie z technickej prevádzky. Z čerstvých lisovaných kvasníc sa navážilo 5 g do 50 cm<sup>3</sup> odmerky, dokonale sa emulgovaly a doplnily na žiadaný objem. Z takto pripravenej a dokonale premiešanej emulzie sa odpipetovalo 4,0 cm<sup>3</sup> na 100 cm<sup>3</sup> substrátu. Očkovanie pre všetky paralely bolo vždy rovnaké a spoločné.

Príprava substrátu. Melasa sa riedila destilovanou vodou takto: 5,5 g melasy sa premiešalo vodou, pridalo sa 0,01 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vo forme kyseliny fosforečnej, pH sa upravilo na 4,5 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH) a objem sa doplnil destilovanou vodou na 100 g. Po sterilizácii sa množstvo, potrebné pre pokus, naočkovalo patričným množstvom emulzie a po rozdelení do osobitných baniek sa pridával roztok MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O v nižšie uvedených množstvách (tab. 4). Potom sa všetky substráty doplnily vodou na rovnaký objem a takto pripravenou a naočkovanou živnou pôdou sa plnily fermentačné banky meracích prístrojov.

Roztok MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O sa pripravil tak, aby 1 cm<sup>3</sup> roztoku obsa-



Graf 2. Vplyv Mn na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*.

hoval 1 mg Mn, a patričné množstvo roztoku soli mikroelementu sa prídávalo mikropipetou. Priemerné hodnoty experimentálne získaných objemov vylúčeného plynu sú uvedené v tab. 4. Priebeh kvasenia trojice s optimálnym množstvom Mn (1 mg/l), kontrolnej trojice bez mikroelementu a trojice s mikroelementom v množstve, ktoré už začína prejavovať toxické účinky (40 mg Mn/l), je znázornený v grafe 2.

Tab. 4. Vplyv Mn na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*

Číslo série →	I	II	III	IV	V	VI	°C	Tlak v mm Hg
mg Mn/l →	0,0	1,0	5,0	10,0	20,0	40,0		
Čas v min. ↓	cm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>							
50	2,80	2,95	2,80	2,35	2,65	2,50	23,0	752,0
90	5,30	5,60	5,70	4,85	5,10	5,00		
130	7,50	8,25	7,95	7,40	7,70	7,00		
170	11,20	12,40	12,00	11,55	11,5	10,85	24,5	752,0
210	15,50	19,65	16,60	16,20	16,10	15,20		
250	20,00	21,90	21,25	20,80	20,75	19,65	25,5	751,2
290	24,00	26,35	2,26	25,30	25,05	24,15		
330	28,90	31,50	30,45	30,65	29,08	30,05	25,5	751,2

Z uvedenej tabuľky a najmä z uvedeného grafu vidieť, že Mn ako mikroelement má veľkú funkciu pre kvasinky a že je schopný podstatne stimulovať rýchlosť kvasenia. Priebehom celej fermentácie bolo množstvo vylúčeného plynu v trojici aparátúr s prídavkom 1 mg Mn/l asi o 10% väčšie ako množstvo CO<sub>2</sub> v kontrolných aparátúrach. Hneď po prekročení optimálnej koncentrácie začína prudký pokles rýchlosti kvasenia a v koncentráciách 10,0 20,0 a 40,0 mg Mn/l sa tak ako v predpokusech s MEB-49, konaných v E i m h o r n o v ý c h sacharimeroch, aj tu stretávame so zjavom, že počiatočná fáza kvasenia sa spomaľuje, ale toto spomaľenie sa vyrovná v ďalšej fáze, v ktorej všetky tri skúmané koncentrácie značne predbiehajú kontrolu.

Predpokladáme, že by sa v praxi dal využiť poznatok, že Mn v takomto neobyčajne malom množstve vie značne urýchliť kvasný proces, pravda, bolo by treba, predtým dôkladnejšie preštudovať tento problém, a to najmä otázku, aký je váhový podiel jednotlivých produktov kva-

senia, či totiž nevzniká väčšie množstvo metylalkoholu, vyšších alkoholov a pod. Keďže sme sa však zameriavali najmä na zvýšenie produkcie kvasníc, nezaoberali sme sa týmto problémom bližšie, ale myslíme, že by sa tento poznatok dal dobre využiť najmä v melasových liehovaroch.

### *Vplyv Cu na kvasivosť Saccharomyces cerevisiae*

Ďalším mikroelementom v smesi MEB-49 je Cu, ktorej vplyv na kvasinky sme taktiež skúmali osobitne. Emulzia kvasníc, očkovanie i príprava substrátu bola totožná s prípravou opísanou pri Mn. Skúmaly sa vplyvy týchto koncentrácií Cu:

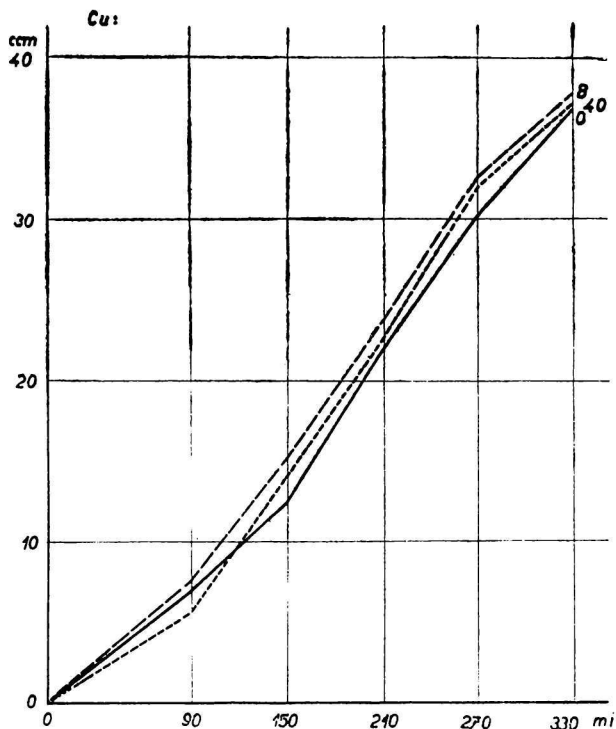
0,0    0,3    0,5    1,0    5,0    8,0    12,0    20,0    40,0 mg Cu/l

Cu sa pridávala ako roztok  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ .

Keďže sme na súčasné vykonanie všetkých pokusov nemali k dispozícii dost' aparatúr, boli sme nútení skúmať vplyv Cu na dvakrát. Postupovali sme pritom tak, že i pri druhej časti pokusov sme použili kontrolnú trojicu bez pridania mikroelementov. Ak sa pri niektorom odčítaní priemer vylúčených množstiev  $\text{CO}_2$  líšil od priemerných množstiev  $\text{CO}_2$ , vylúčených v kontrolných pokusoch v prvej časti pokusu, korigovali sme všetky v tom čase odmerané objemy o rozdiel medzi prvým a druhým priemerom. Tieto občasná menšie odchýlky boli zrejme zapríčinené jednak odlišnými tepelnými a tlakovými pomermi v miestnosti, kde sa pokus robil, jednak aj tým, že sme každý deň používali čerstvú, i keď rovnako pripravenú emulziu kvasníc, ktorá však predsa nebola čo do kvality použitých kvasníc úplne shodná s prvou emulziou. (Podobne sme postupovali i pri skúmaní všetkých ostatných mikroelementoch.)

Z grafu i z tabuľky vidieť, že aj Cu má schopnosť stimulovať kvasivosť kvasiniek, ale súčasne vidieť, že táto schopnosť je oveľa menšia ako schopnosť Mn. Veľmi rozdielne sú aj optimálne dávky (Mn : 1,0 mg/l, Cu : 8 mg/l). Pri Cu sa zdá hranica toxickej dávky značne vyššia ako pri Mn, keďže tu ešte aj koncentrácia 40 mg/l spomaľuje kvasenie len celkom v počiatočných štádiách kvasenia (asi do 120 min.). Vidíme, že i tu sa stretávame so zjavom, opísaným pri pokusoch s Mn, že mikroelementy v príliš veľkých koncentráciách spomaľujú prvú a urýchľujú druhú fázu kvasenia. Celkový charakter krivky kvasenia pri 40 mg Cu/l zodpovedá zhruba krivke kvasenia po pridaní 20 mg Mn/l, ktorá tiež pretína krivku kvasenia kontrolného pokusu v okolí 120 min. Priebeh kontrolného pokusu, pokusu s optimom mikroelementu (8 mg Cu/l) a priebeh pokusu s 40 mg Cu/l znázorňuje graf 3, kým priemery všetkých pokusov znázorňuje tab. 5.





Graf 3. Vplyv Cu na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*.

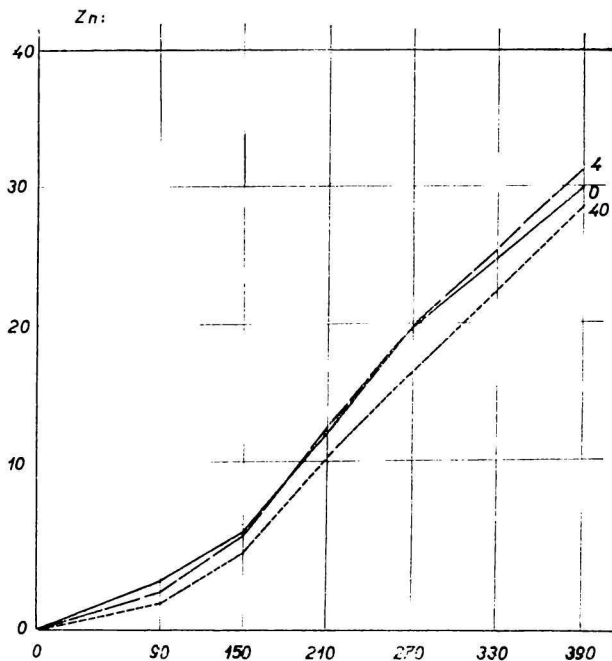
Tab. 5. Vplyv mikroelementu Cu na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*

Číslo série →	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	°C	Tlak v mm Hg
mg Cu/l →	0,0	0,3	0,5	1,0	5,0	8,0	12,0	20,0	40,0		
Čas v min. ↓	cm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>										
90	6,80	6,50	6,60	6,50	6,20	7,15	7,00	6,40	6,00	26,0	755,5
150	12,20	13,20	13,90	13,20	13,50	14,60	14,60	13,80	13,90		
210	21,30	21,10	22,00	21,20	21,80	22,80	22,40	22,20	22,00	27,0	755,0
270	29,70	29,60	31,20	29,80	30,90	31,05	31,00	31,50	31,00		
330	85,90	35,80	36,70	35,30	36,40	36,70	37,00	37,20	36,20	27,5	755,0

## Vplyv Zn na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*

Posledným samostatne skúmaným mikroelementom bol Zn v koncentráciách: 0,0 4,0 5,0 7,0 20,0 25,0 40,0 mg Zn/l. Sám postup prác a organizácia pokusu boli totožné s pokusmi, už prv opísanými, a Zn sa pridával ako roztok  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

Priemery experimentálne získaných hodnôt vylúčených objemov kysličníka uhličitého sú uvedené v tab. 6. V grafe 4 je znázornený priebeh kvasenia v kontrolnej trojici (0,0 mg Zn/l), v trojici s hladinou mikroelementov v okolí optima (4 mg Zn/l) a v trojici, u ktorej sa už prejavujú toxické účinky (40 mg Zn/l).



Graf 4. Vplyv Zn na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*.

Z uvedených výsledkov a z grafu 4 vidieť, že aj Zn má určité stimulačné účinky na kvasivosť kvasiniek, i keď sa zdá, že oveľa menšie ako predtým skúmané prvky. Podľa priebehu kvasenia by sa vlastne dalo predpokladať, že všetky skúmané koncentrácie tohto mikroelementu sú už za optimálnou dávkou, lebo okrem koncentrácie 40 mg Zn/l vidíme pri všetkých pokusoch spomalenie kvasenia pod rýchlosť kontrolných pokusov v prvých štádiách kvasenia a v konečných štádiách všetky tieto koncentrácie dohánajú kontrolný pokus. Ak by sme si narysovali všetky krivky, uvidíme, že stúpajúcim množstvom Zn sa

Tab. 6. Vplyv mikroelementu Zn na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*

Číslo série →	I	II	III	IV	V	VI	VII	°C	Tlak v mm Hg
mg Zn/l →	0,0	4,0	5,0	7,0	20,0	25,0	40,0		
Čas v min. ↓	cm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>								
90	3,60	2,90	3,00	2,70	2,55	2,60	2,40	23,5	759,0
150	7,20	6,95	6,95	7,10	6,55	6,55	6,00		
210	12,50	12,65	12,40	12,50	11,75	11,50	10,60	24,0	759,0
270	19,60	19,60	19,10	19,50	18,40	18,00	16,70		
330	25,00	25,60	25,50	25,50	24,70	24,15	22,80	25,5	758,5
390	29,90	31,20	31,00	31,10	30,50	30,15	28,80		

predlžuje čas, priebehom ktorého vidieť inhibičné vplyvy mikroelementu na kvasivosť v počiatočných štádiách. Čas, v ktorom pretínajú krivky kvasenia krivku kontrolných pokusov, stúpa približne takto:

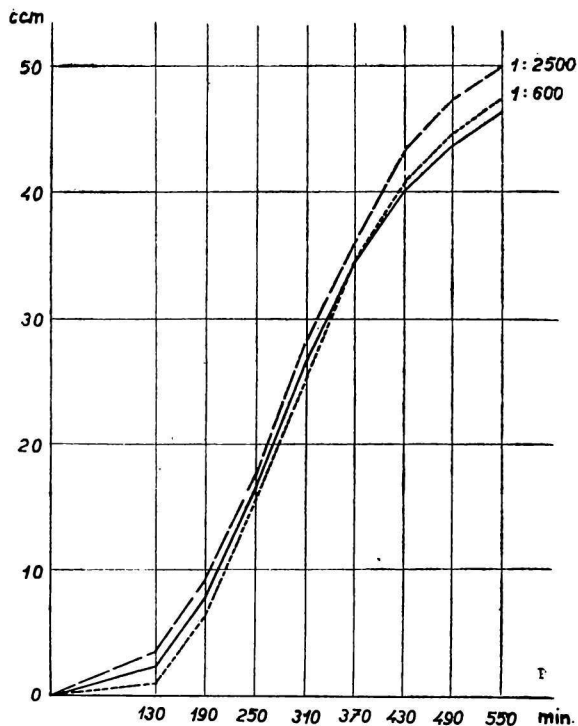
Tab. Závislosť doby spomalenia kvasivosti v prvých štádiách kvasenia od stúpajúceho množstva Zn v substráte po prekročení optimálnej dávky

Konc. Zn v mg/l →	4,0	5,0	7,0	20,0	25,0
Čas v min. →	200	300(?)	285	350	380

Koncentrácia 40 mg Zn/l priebehom celého pokusu značne zostáva za kontrolnými pokusmi, takže ju už musíme považovať za toxickú.

#### Vplyv smesi MEB-49 na rýchlosť kvasenia *Saccharomyces cerevisiae*

Pri hlavných pokusoch pre vyskúmanie vplyvu smesi MEB-49 na kvasivosť kvasiniek sme postupovali tým istým spôsobom ako pri skúmaní vplyvu jednotlivých mikroelementov. Skúmali sme vplyv 9 koncentrácií MEB-49 vzhľadom na kontrolu. Keďže sme ani tieto pokusy nemohli vykonať naraz, postupovali sme podobne ako pri pokusoch s medou. Podľa tab. 8 a grafu 5 vidieť, že optimálne množstvo smesi MEB-49 leží okolo koncentrácie 1 : 2500, kým toxickou začína byť iba oblasť v okolí koncentrácie 1 : 600, prípadne 1 : 500. Skúmali sa tieto



Graf 5. Vplyv smesi MEB-49 na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*.

koncentrácie smesi mikroelementov: 0, 1 : 500 000, 1 : 4 500, 1 : 3 000, 1 : 2 500, 1 : 2 000, 1 : 1 000, 1 : 800, 1 : 600 a 1 : 500.

Veľmi zaujímavé je porovnať množstvá mikroelementov, prítomné v optimálnej a toxickkej dávke smesi mikroelementov, s množstvami tých istých mikroelementov v optimálnych a toxických dávkach, keď sme ich skúmali osobitne. Po prepočítaní vidíme, že v optimálnej aj toxickkej koncentrácii smesi MEB-49 je prítomné oveľa väčšie množstvo Mn, Cu i Zn ako v optimálnych a toxických koncentráciách týchto prvkov samých. Vidíme, že dávky, ktoré by po pridaní samého prvku pôsobili už toxicky, sú ešte stimulujúce, ak tento mikroelement pridáme vo vhodne vyváženej smesi. Tento fakt potvrdzuje už dávnejšie známa skutočnosť, že niektoré mikroelementy pôsobia proti sebe antagonisticky. Výhoda použitia vyváženej smesi mikroelementov pre stimulovanie fyziologických funkcií živých organizmov je najmä v tom, že takáto smes prejavuje stimulačné účinky v širšom rozmedzí ako jednotlivé mikroelementy samy, teda pri praktickom použití smesi je menej pravdepodobné škodlivé predózovanie, ako keby sme používali jeden jediný mikroelement. Za použitie smesi hovorí i tá skutočnosť, že v technickom prostredí pri priemyselnej výrobe droždia kolíše obsah jednotlivých mikroelementov v melase podľa jej pôvodu a takto

Tab. 8. Vplyv smesi MEB-49 na kvasivosť *Saccharomyces cerevisiae*

Číslo série →	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	°C	Tlak v mm Hg
Pomer MEB-49 substrátu →	0	1/500 000	1/4 500	1/3 500	1/2 500	1/2 000	1/1 000	1/800	1/600	1/500		
Čas v min. ↓	ccm CO <sub>2</sub>											
130	2,20	2,50	3,05	3,40	3,60	2,70	2,50	3,20	1,70	1,90	25,5	756,0
190	8,20	8,40	9,15	9,50	9,35	8,80	8,60	9,00	6,80	7,10		
250	15,90	16,50	17,00	17,80	17,40	16,60	16,70	17,40	15,50	14,20	26,0	757,0
310	26,40	26,40	27,80	28,30	28,30	27,60	26,90	27,50	25,10	24,10		
370	33,90	34,20	35,40	35,50	35,70	34,90	34,60	36,40	34,00	32,50	26,5	758,0
430	40,20	40,90	42,10	42,10	43,40	41,90	41,40	43,00	40,70	40,30		
490	43,90	44,50	46,00	46,30	47,70	46,50	45,70	46,40	44,80	44,80	26,5	758,0
550	46,80	47,50	49,00	49,00	50,10	48,70	48,50	48,40	47,90	47,00		

prítomné prvky by skôr mohli ovplyvniť účinok jedného pridávaného mikroelementu ako celej smesi, ktorá je dokonale vyvážená. Napr. pri smesi MEB-49 vidíme, že ešte aj pätnásobné množstvo optimálnej dávky smesi spomalí kvasenie iba v počiatočnom štádiu a ku koncu kvasenia i táto vysoká koncentrácia doháňa kontrolné pokusy.

Keď v závere tejto časti našej práce shrnieme experimentálne získané poznatky, zistíme toto:

Pridávaním mikroelementov Mn, Cu a Zn v optimálnych dávkach možno dosiahnuť stimuláciu kvasenia, ale všetky tri mikroelementy v dávkach väčších ako optimálnych spomaľujú kvasenie najprv iba v počiatočných štádiách kvasenia a neskôr (pri ešte väčších dávkach) už v priebehu celého kvasenia. Podobný účinok má i smes MEB-49. Ďalej sme dokázali, že optimálne dávky mikroelementov, používaných jednotlivo, sú iné ako optimálne dávky tých istých mikroelementov, podávaných v smesi s inými mikroelementami.

Najväčšiu stimulačnú mohutnosť sme zistili u mangánu, ktorý už v koncentrácii 1 mg Mn/l substrátu spôsobil zrýchlenie vylučovania CO<sub>2</sub> priemerne asi o 10% priebehom celého kvasenia. Trocha menšia bola stimulačná mohutnosť smesi MEB-49 v optimálnej koncentrácii 1 : 2 500. Mikroelementy Cu a Zn mali aj zreteľný stimulačný účinok na kvasivosť, tento účinok však bol oveľa menší ako u Mn, prípadne u smesi MEB-49.

Všetky pokusy zaoberajúce sa stimuláciou kvasenia sa robily v závodnom laboratóriu trenčianskej droždiarne. Radi využívame túto príležitosť, aby sme sa poďakovali celému kolektívu závodného laboratória, najmä však Dr. Ing. Stuchlíkovi, ktorý nám pri pokusoch všemožne išiel v ústrety a tak nemalou mierou prispel k zdarnému priebehu prác.

### *Vplyv smesi MEB-49 na rozmnožovanie kvasiniek*

Už vo všeobecnej časti tejto práce sme sa zmienili o tom, že sa veľmi málo vie o úlohách jednotlivých mikroelementov v životných procesoch rastlín a mikroorganizmov. Fakt, že veľmi malé množstvá týchto prvkov vedia vplývať a meniť životné procesy organizmov, upevňuje predpoklad, že mikroelementy nie sú energetickými látkami, ale že tu ide o biokatalyzátory, prípadne o ich súčasť, ktoré majú dôležitú úlohu v jednotlivých životných procesoch mikroorganizmov.

Na základe týchto poznatkov a predpokladov sme pristúpili k vlastným pokusom s rozmnožovaním kvasiniek za prítomnosti smesi mikroelementov. Pretože však naša práca je zameraná na potreby priemyslu, bolo treba brať do úvahy i prostredie a pôvod substrátu, s akým sa v priemysle pracuje. Naš droždiarenský priemysel používa ako substrát pre výrobu pekárskeho droždia v podstate len roztok melasy, priživovaný rôznymi anorganickými soľami. Složenie melasy sa každoročne nielenže mení, ale závisí aj od prostredia, pôdy a rôznych podmienok, za akých sa repa pestovala a spracovávala. Týmto spôsobom

sa mení aj množstvo v melase prítomných mikroelementov. Mikroelementy prítomné v melase spôsobujú, že mikroorganizmy, ktoré vyrástly v tomto prostredí vytvorily si pomerne veľkú zásobu mikroelementov. Túto zásobu však nemožno nazvať dostatočnou, lebo ako uvidíme pri ďalších pokusoch, po pridaní smesi mikroelementov v optimálnej koncentrácii sa značne zrýchli rozmnožovanie kvasiniek, a už v predchádzajúcom sme ukázali, že smesou mikroelementov možno urýchliť aj samo kvasenie.

Pri našich pokusoch sme si museli vytvoriť základňu, o ktorú by sme sa mohli bezpečne oprieť. Museli sme si vybrať štandardný substrát známeho zloženia, a preto sme pre základné pokusy nepoužívali roztok melasy, ale Nielsenovu tekutú pôdu, pripravenú z analyticky čistých chemikálií. Pokiaľ nám stály k dispozícii, používali sme na prípravu roztoku chemikálie fy. Merck, na ktorých je uvedené maximálne znečistenie, pri ostatných chemikáliách sme používali p. a. chemikálie našej výroby. Pri týchto však nemôžeme udať maximálne prípustné množstvá znečistenín.

Složenie Nielsenovej pôdy je takéto:

Chemikália:	Množstvo:	Znečistenie (max.):
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g	p. a.
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,7 g	Pb 0,0009 ‰
		Fe 0,0001 ‰
		Mn 0,0005 ‰
		Zn 0,005 ‰
		Ca 0,005 ‰
		Na 0,01 ‰
		Voľné alkálie 0,002 ‰
		Voľné kyseliny 0,005 ‰
		Cl 0,0003 ‰
		PO <sub>4</sub> 0,0005 ‰
		NO <sub>3</sub> 0,002 ‰
		As 0,00005 ‰
		NH <sub>4</sub> 0,002 ‰
CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,4 g	p. a.
NaCl	0,5 g	p. a.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,6 g	Pb 0,0005 ‰
		Fe 0,0005 ‰
		Ca 0,001 ‰
		Mg 0,0002 ‰
		As 0,0005 ‰
		P 0,00005 ‰
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,5 cm <sup>3</sup> 1% roztoku	p. a.
Sacharóza	100 g	obvč. kryšt. cukor
H <sub>2</sub> O	od 1000 cm <sup>3</sup>	raz destilovaný

Pôda sa po sterilizovaní ochladila a vzniknutý zákal sa odfiltraval cez filter G 4 a pôda sa znovu sterilizovala pri tej istej teplote ako predtým.

Pre naše pokusy sme si museli vypestovať vhodnú kultúru kvasiniek, keďže nám nevyhovovala taká kultúra, ktorá bola vypestovaná na melase s pomerne veľkým obsahom mikroelementov a ktorá by bola teĎa obsahovala i značné zásobné množstvá mikroelementov, ktoré by nám boly mohly skresľovať výsledky. Obyčajnú kultúru kvasnic bolo treba pred pokusom zbaviť zásobného množstva mikroelementov a takto si ju pripraviť pre základné pokusy.

Mikroelementy sme odstránili ochudobňovacím procesom, ktorý spočíval v tom, že sa očko čistej kultúry *Saccharomyces cerevisiae* vnielo do prostredia s nízkym dosahom mikroelementov, v našom prípade do tekutej Nielsenovej pôdy vo Freudenreichovej banke. Po rozmnožení kultúry a po usadení kvasiniek na dno banky sa odlialy 2/3 číreho roztoku nad vrstvičkou kvasiniek a zvyšok suspenzie mikroorganizmov sa sterilne preliat do ďalšej Freudenreichovej banky s Nielsenovým syntetickým substrátom. Tento proces sa opakoval tri mesiace a takto získaná kultúra nám slúžila pre naočkovanie základného pokusu na syntetickej pôde. Priebehom celého ochudobňovania sa kvasinkám nepridával nijaký vitamín do substrátu, iba pri poslednom prenesení ochudobnenej kultúry sa táto preniesla do Nielsenovho substrátu s prídavkom vitamínu B<sub>1</sub> (aneurínu).

Do 2000 cm<sup>3</sup> sterilnej Nielsenovej pôdy sme pridali 0,02 g aneurínu, čo zodpovedá 10 γ na 1 cm<sup>3</sup> pôdy. Pri pridávaní aneurínu sme museli prihliadať na jeho termolabilitu, najmä na jeho nestálosť voči vlhkému teplu, napr. proti sterilizácii v autokláve. Keďže sme sterilizáciu nemohli obísť, pridávali sme aneurín vo forme roztoku v zriedenej kyseline octovej o pH 3,5, lebo za týchto podmienok je vitamín B<sub>1</sub> pomerne termostabilný a vvdrží sterilizáciu pri 130 °C po dobu 15 min., bez toho že by sa rozložil.

Do 200 cm<sup>3</sup> vitamínom obohatenej Nielsenovej syntetickej pôdy sa sterilne preniesla ochudobnená kultúra. V tejto pôde sa kvasinky nechaly 10 dní v termostate pri teplote 28 °C. Po uplynutí tejto doby, ktorá mala slúžiť na dostatočné rozmnoženie kultúry, dôkladným pretrepaním sa vytvorila homogénna suspenzia mikroorganizmov, ktorou sme sterilne naočkovali 1000 cm<sup>3</sup> Nielsenovej pôdy, ktorú sme po dôkladnom pretrepaní delili do desiatich sterilných haniiek, v ktorých bol pripravený stúpajúci rad koncentrácií smesi MEB-49, doplnený destilovanou vodou na rovnaký objem. Po sterilnom pridaní 100 cm<sup>3</sup> naočkovanej Nielsenovej pôdy sme obsah znova dôkladne premiešali a sterilnými pipetami sme odoberali z každej koncentrácie 3 × 10 cm<sup>3</sup> ktorými sme naplňali vždy po tri Freudenreichove banky, ktoré sme inkubovali v termostate pri 28 °C po dobu 27 dní, za ktorú pôsobily jednotlivé koncentrácie smesi mikroelementov na rozmnožovanie kvasiniek. Pri našich pokusoch s rozmnožovaním sme použili týchto 10 koncentrácií mikroelementov v smesi MEB-49:



I	0 — bez mikroelementov	VI	1:4 000
II	1:500 000	VII	1:3 500
III	1:30 000	VIII	1:2 000
IV	1:10 000	IX	1:1 500
V	1:5 000	X	1:500

Tu treba spomenúť aj vplyv ochudobňovacieho procesu na použití kultúru *Saccharomyces cerevisiae*, ktorý sa prejavil v niekoľkých deficienčných zjavoch. Najmarkantnejším deficienčným znakom bolo spomalenie rozmnožovania kultúry, ktoré sa takmer blížilo zastaveniu rozmnožovania. Že toto spomalenie nezapríčinil len priamy nedostatok vitamínov, prípadne látok typu *Bios*, dokázali sme tým, že po pridaní vhodne vyváženej smesi mikroelementov sa značne zvýšila rýchlosť rozmnožovania. Vidíme teda, že deficienčné zjavy, vyvolané nedostatkom mikroelementov, sú do určitej miery reverzibilné a že sa dajú aspoň čiastočne odstrániť pridaním smesi MEB-49. Ďalším znakom, ktorý treba pričítať nedostatku mikroelementov, bola neobyčajne nízka kvasivosť, takže unikanie hublínok CO<sub>2</sub> zo substrátu sa vôbec čkom nedalo pozorovať. Ďalej sme pozorovali ružový farebný nádych na dne kultúry osvetlenej rozptýleným svetlom. Predpokladá sa, že toto neobvyklé sfarbenie je spôsobované značným obsahom Mg v pôde (Stučhлік).

Tieto deficienčné zjavy, spôsobené ochudobňovacím procesom, po pridaní smesi MEB-49 sa čiastočne strácaly, čím sme dokázali nevyhnutnosť prítomnosti mikroelementov pre životné procesy kvasiniek.

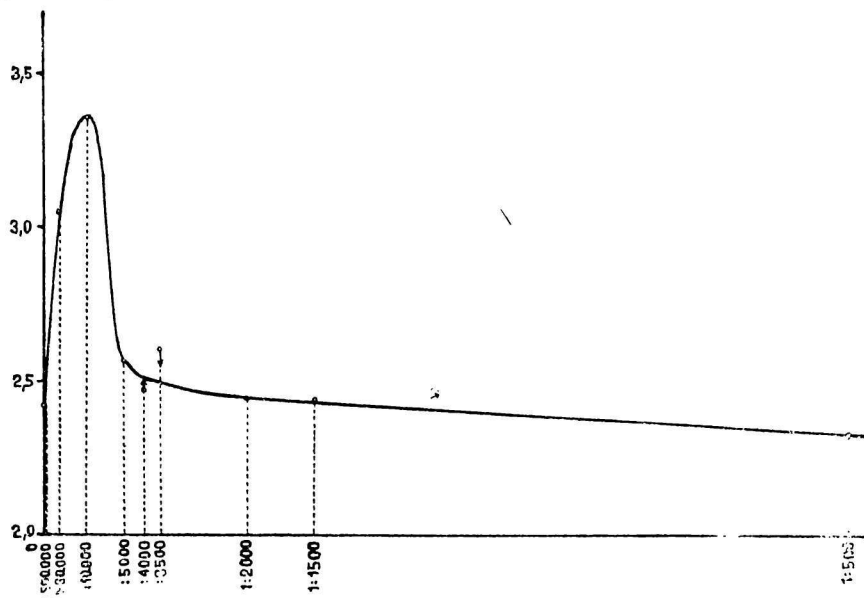
Rozmnožovanie kvasiniek sme kontrolovali počítaním jedincov v Bürkerovej komôrke, keďže sme túto metódu považovali za vhodnejšiu pre naše pokusy ako počítanie kolónií na agarových platinách. Dôsledným počítaním a kontrolou jednotlivých pokusov sme dosiahli pomerne dosť presné čísla.

V tab. 9 sú uvedené priemerné hodnoty (počet mikroorganizmov v cm<sup>3</sup>) pre jednotlivé hladiny mikroelementov. Táto istá závislosť je znázornená na grafe 6.

Tab. 9. Vplyv smesi MEB-49 na rozmnožovanie ochudobnenej kultúry *Saccharomyces cerevisiae*

Číslo série	Koncentrácia MEB-49	Milióny organizmov v cm <sup>3</sup>	Číslo série	Koncentrácia MEB-49	Milióny organizmov v cm <sup>3</sup>
I	0	2,415	VI	1/4 000	2,475
II	1/500 000	2,410	VII	1/3 500	2,5975
III	1/30 000	3,04 5	VIII	1/2 000	2,4375
IV	1/10 000	3,350	IX	1/1 500	2,4375
V	1/5 000	2,5625	X	1/500	2,3275

Z tabuľky a z grafu možno vyčítať, že optimálna koncentrácia smesi MEB-49 pre ochudobnenú kultúru *Saccharomyces cerevisiae*, pestovaná na Nielsenovej syntetickej pôde s prídavkom vitamínu B<sub>1</sub>, pohybuje sa v pomerne úzkom rozmedzí koncentrácie 1/10 000



Graf 6. Vplyv smesi MEB-49 na rozmnožovanie ochudobnenej kultúry *Saccharomyces cerevisiae*.

Na osi x koncentrácia mikroelementov (pomer MEB-49: substrát).

Na osi y milióny organizmov v cm<sup>3</sup>.

Na druhej strane sa nám javí koncentrácia 1 : 500 ako mierne toxická dávka.

Optimálna dávka smesi MEB-49 zapríčinila zvýšenie počtu kvasiniek o 38,7 % vzhľadom na kontrolnú sériu pokusov bez prídania smesi mikroelementov.

Na základe týchto pokusov sme sa presvedčili, že mikroelementy sú nevyhnutné pre životné procesy kvasiniek, a mohli sme teda prísť k ďalším pokusom, t. j. k zisťovaniu vplyvu smesi MEB-49 na rozmnožovanie neochudobnenej kultúry kvasiniek na melase.

Ako sme už uviedli, náš droždiarský priemysel používa ako substrát pri výrobe droždia najmä roztok melasy, ktorá sa vyznačuje tým, že vplyvom vonkajších faktorov sa mení jej zloženie s roka na rok, že sa teda mení i množstvo a pomer prítomných mikroelementov. O stimulujucom vplyve mikroelementov a najmä o vplyve vyváženej smesi mikroelementov sme sa presvedčili v predchádzajúcich pokusoch s kvasivosťou i s rozmnožovaním.

K pokusom s rozmnožovaním neochudobnenej kultúry na melasovom substráte sme prikočili s otázkou, ako budú vplývať v melase prí-

tomné mikroelementy na koncentráciu pridávanej smesi mikroelementov, pričom ďalším nevyriešeným problémom bol vplyv zásobného množstva mikroelementov v tele bunky na stimulačný efekt smesi. Výsledok pokusov nám objasňuje a zčiasťky osvetľuje tieto otázky.

Pre pokusy sme používali neochudobnenú kultúru kvasníc, izolovanú z predajného droždia trenčianskej droždiarne, a melasu, ktorej analýza je uvedená na str. 14 v časti *Vplyv mikroelementov na kvasivosť*.

Melasu sme zriedili a upravili týmto spôsobom:

100 g melasy  
 900 g vody  
 0,5 g primárneho fosforečnanu draselného  
 pH 4,5 g (HCl, NaOH).

Takto zriedenú melasu sme zahriali v autokláve na 120 °C a vy-srážané kaly sme odfiltrovali na filtri G 4. Po opätovnej sterilizácii sme v melase rozmnožili kvasinky potrebné pre naočkovanie pokusu.

Spôsob vykonania pokusu bol totožný s predchádzajúcim pokusom, pri ktorom sme použili ochudobnenú kultúru a Nielsenovu živnú pôdu s tým rozdielom, že sme používali, ako sme už uviedli, neochudobnenú kultúru *Saccharomyces cerevisiae*, ako substrát sme použili melasu a skúmali sme niektoré iné koncentrácie smesi MEB-49 ako v predchádzajúcom pokuse.

750 cm<sup>3</sup> melasového substrátu vyššie uvedeného složenia sme spoločne naočkovali 100 cm<sup>3</sup> kvasničnej suspenzie z čistej kultúry. Takto spoločne naočkovaný substrát sme po dôkladnom premiešaní sterilne delili do 9 baniek, v ktorých boli pripravené vysterilizované smesi mikroelementov v patričných koncentráciách, doplnené vodou na objem 5 cm<sup>3</sup>. Z každej banky sme po opätovnom dôkladnom premiešaní od-brali sterilne 3 × 10 cm<sup>3</sup> naočkovaného substrátu s prídavkom mikroelementov a plnili sme nimi Freudenreichove banky, ktoré sme inkubovali v termostate na 30 °C po dobu 48 hodín. Po uplynutí tejto doby sme zastavili rozmnožovanie a ostatné životné procesy kvasiniek prida-ním rovnakých objemov nasýteného roztoku sublimátu do každej z Freudenreichových baniek.

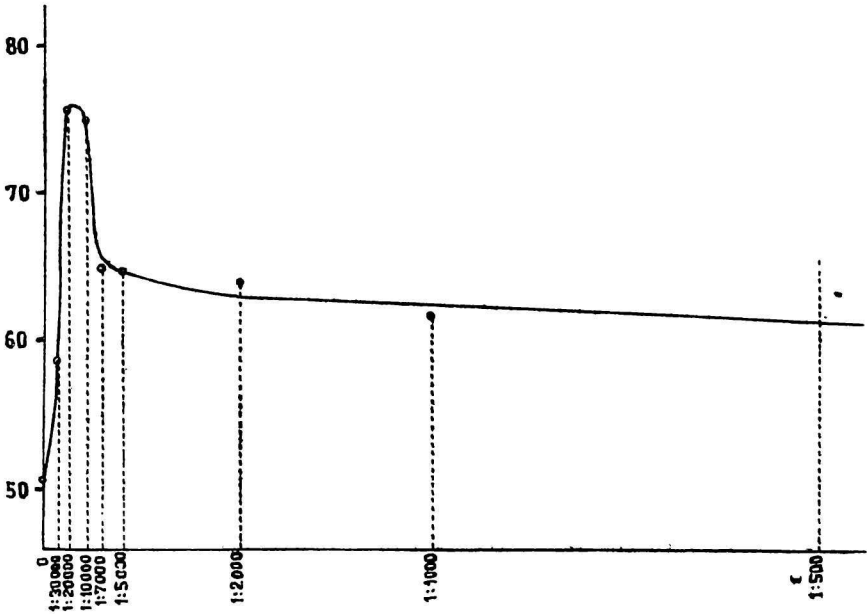
Pre veľkú hustotu mikroorganizmov v substráte sme pred započatím počítania v Bürkerovej komôrke riedili všetky vzorky v pomere 1 : 10 (5 cm<sup>3</sup> suspenzie, 50 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O).

Aby kvasinky v zornom poli mikroskopu netvorili klky a shluky, ktoré by sťažovali počítanie, pridávali sme spolu s roztokom sublimátu aj zriedenú kyselinu octovú, čím sme získali ľahko počítateľné, ojedinele sa vyskytujúce bunky.

Pri pokusoch sme skúmali vplyv týchto koncentrácií smesi MEB-49:

I	0 — bez mikroelementov	VI	1:5 000
II	1:30 000	VII	1:2 000
III	1:20 000	VIII	1:1 000
IV	1:10 000	IX	1:500
V	1:7 000	X	1:500

Bunky na Bürkerovej komôrke sme počítali tým istým spôsobom ako pri predchádzajúcom pokuse s ochudobnenou kultúrou. Aritmetické priemery počtu kvasiniek v 1 cm<sup>3</sup> sme zaznamenali do tab. 10 a znázornili grafom 7.



Graf 7. Vplyv smesi MEB-49 na rozmnožovanie *Saccharomyces cerevisiae* na melase.

Na osi x koncentrácia mikroelementov (pomer MEB-49: substrát).  
Na osi y milióny organizmov v cm<sup>3</sup>.

Tab. 10. Vplyv smesi MEB-49 na rozmnožovanie *Saccharomyces cerevisiae* na melase

Číslo série	Koncentrácia MEB-49	Milióny organizmov v cm <sup>3</sup>	Číslo série	Koncentrácia MEB-49	Milióny organizmov v cm <sup>3</sup>
I	0	50,638	VI	1:5000	64,699
II	1:30000	58,637	VII	1:2000	63,996
III	1:20000	75,538	VIII	1:1000	61,584
IV	1:10000	74,828	IX	1:500	66,024
V	1:7000	64,723			

Podľa výsledkov pokusov, zaznačených v tabuľke a nanosených v grafe, možno posúdiť stimulačný efekt smesi MEB-49 na produkciu kvasiniek. Kým pri predchádzajúcom pokuse s ochudobnenými kvasin-

kami pestovanými na syntetickej pôde bol pri koncentrácii MEB-49 1 : 10 000 počet kvasiniek o 38,7% vyšší ako pri kontrolnom pokuse. pri tomto pokuse sa zvýšila produkcia kvasiniek pri koncentrácii MEB-49 1 : 20 000 o 49,2% už za 48 hodín. Stimulačná mohutnosť smesi MEB-49 v koncentrácii 1 : 10 000 bola len oniečo nižšia.

Keďže sme na syntetickej pôde neskúšali vplyv koncentrácie MEB-49 1 : 20 000, nie je vylúčené, že skutočné optimum pre ochudobnenú kultúru ležalo tiež v oblasti medzi 1 : 10 000 a 1 : 20 000. Zaujímavá je aj tá skutočnosť, že ani jedna zo skúmaných koncentrácií neprejavuje ešte vyslovene toxické účinky, čo svedčí o správnom vyvážení smesi. Stúpnutie počtu kvasiniek pri koncentrácii 1 : 500 treba pravdepodobne považovať za pozorovaciu alebo pokusnú chybu.

Keď zhodnotíme výsledky tejto časti práce, treba konštatovať, že mikroelementy majú veľký vplyv aj na rozmnožovanie kvasiniek. Prvými pokusmi na syntetickom substráte sme dokázali potrebu mikroelementov pre *Saccharomyces cerevisiae*, lebo sa nám podarilo vyvolať deficiénčné zjavy pri pestovaní v prostredí bez mikroelementov, deficiénčné zjavy, ktoré sme v ďalšom vedeli vhodnou koncentráciou smesy MEB-49 aspoň čiastočne odstrániť a korigovať. Vidieť teda, že fyziologické zmeny kvasiniek pestovaných bez mikroelementov nie sú absolútne ireverzibilné, najmä pokiaľ poškodenie organizmov nie je príliš hlboké. V druhej časti sme dokázali, že stimuláciu rozmnožovania možno dosiahnuť aj použitím priemyselného substrátu, teda melasy, a neochudobnenej kultúry kvasiniek.

Po zistení uvedených faktov nám išlo o to, vyšetriť, či paralelne so zvýšením počtu kvasiniek stúpne i množstvo vytvorenej kvasničnej hmoty, teda vlastne sušiny. Úlohou záverečnej časti našich pokusov práve bolo vyriešiť túto otázku.

### Vplyv smesi MEB-49 na tvorbu sušiny

Keďže nám už nestála k dispozícii melasa, ktorú sme používali v prvých fázach pokusu, boli sme nútení použiť inú melasu, ktorá však tiež pochádzala z cukrovaru v Trenčianskej Teplej. Táto melasa mala toto zloženie:

Polarizácia	50,4%
Refrakcia (G o e r z)	77,8
Alkalita v n/1 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,6871 cm <sup>3</sup> /100 g
pH (pH meter)	9,3
N (K j e l d a h l)	1,582%
Popol	9,5 %
P	0,023

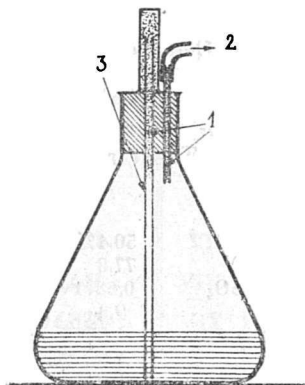
5,5 g melasy sa doplnilo vodou na 100 cm<sup>3</sup> a pH sa arzénom zbytnou kyselinou sírovou upravilo na 4,5. Keďže nám išlo a čo naj dôkladnejšie vyčerenie melasy, aby nám prípadne pod vplyvom rôznych množstiev ťažkých kovov vypadnuté kaly neskresľovali výsledky pri vážení

sušiny, na radu prof. J. Vašátku sme sa rozhodli použiť tento postup: Na každých 100 cm<sup>3</sup> pôdy sa pridal k substrátu 1 g karborafínu a celá pôda sa zahriala na 80 °C, načo sa za horúca filtrovala dva razy za sebou cez Bürkerov lievik.

Na každých 100 cm<sup>3</sup> vyčerenej pôdy sa pridal 0,01 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vo forme kyseliny fosforečnej. Pôda sa potom delila po 700 cm<sup>3</sup> do dvojlitrových Erlenmeyerových baniek, kde sa do nej pridávaly patričné množstvá smesi MEB-49. Hladina dusíka sa vo všetkých koncentráciách vyrovnávala roztokom (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na úroveň tej koncentrácie amóniaku a amónnych solí, ktorá by vznikla po pridaní smesi MEB-49 v koncentrácii 1 : 500. Pôvodne sme totiž chceli zistiť množstvá vytvorenej sušiny po pridaní smesi mikroelementov v týchto množstvách: 0 (kontrola), 1 : 30 000, 1 : 20 000, 1 : 15 000, 1 : 10 000, 1 : 7 000, 1 : 5 000, 1 : 1 000, 1 : 500. Po sterilizácii sme však zistili, že v bankách s koncentráciou smesi mikroelementov 1 : 1 000 a 1 : 500 vzniklo značné množstvo srazeniny, ktoré sa po ochladení substrátu čiastočne rozpúšťalo. Ostávajúce množstvo srazeniny bolo však také veľké, že by sa holly výsledky sušiny v týchto dvoch koncentráciách veľmi skreslili, a preto sme im zodpovedajúce hodnoty nemohli brať do úvahy. Po úprave hladiny dusíka sa všetky pôdy doplnily vodou na rovnaký objem a sterilizovali sa 20 minút pri 2 atmosférach. Pokusy so všetkými koncentraciami sa robily dvojmo a udávané výsledky sú aritmetickými priermi výsledkov oboch paralelných pokusov.

Pre naočkovanie sme používali prečistenú emulziu predajných kvasníc z trenčianskej droždiarne, pripravenú takto:

1 g kvasníc sa dokonale emulgoval v 100 cm<sup>3</sup> vody a do takto získanej emulzie sa pridal 0,3 cm<sup>3</sup> arzenu zbavenej, analyticky čistej



Obr. 2. Banka použitá na kultiváciu *Saccharomyces cerevisiae* so zariadením na prevzdušňovanie.

1. vatové uzávery
2. hadica k vývevo
3. rúrka na prevzdušňovanie

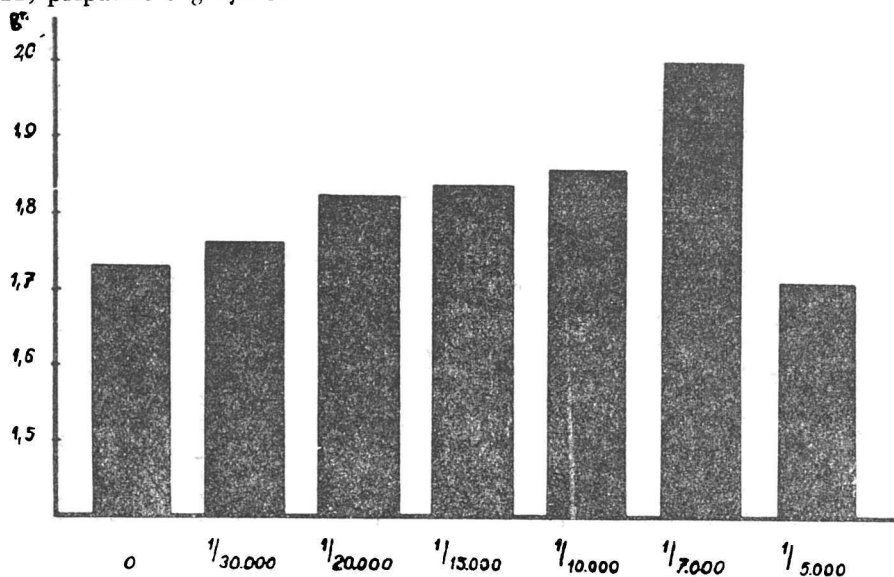
kyseliny sírovej. Po polhodinovom kyslom kúpeli, za ktorého sa mály zničiť prípadne prítomné vegetatívne formy baktérií a zoslabené bunky kvasníc, doplnil sa objem na 300 cm<sup>3</sup> a každá banka so substrátom sa sterilnou pipetou naočkovala 10 cm<sup>3</sup> takto získanej emulzie.

Erlenmeyerove banky sa potom zazátkovali sterilnými gumovými zátkami, upravenými pre prevzdušňovanie pomocou vývevy (obr. 2), pričom sa všetky banky pripojily k jednej výveve, takže prevzdušňovanie vo všetkých bankách bolo rovnako intenzívne.

Naočkované substráty sa potom inkubovali v termostate pri 30 °C a pre dokonalé nasýtenie záparsy kyslíkom sa všetky pôdy 10 minút prevzdušňovali prúdom sterilného vzduchu, načo sa na 10 hodín prestalo s prevzdušňovaním. Po uplynutí tejto doby sa zápara nepretržite prevzdušňovala až do uplynutia 30 hodín, keď sa zastavilo rozmnožovanie pridaním 25 cm<sup>3</sup> nasýteného roztoku urotropínu (hexametylén-tetramínu) do každej banky.

Skvasená zápara sa centrifugovala parciálne, vždy 20 minút pri 3000 otáčkách za minútu, načo sa číra zápara nad vrstvičkou usadených kvasníc opatrne stiahla pipetou a do skúmavky sa pridal nový podiel záparsy aj s kvasinkami, ktorý sa znova 20 minút centrifugoval. Takto sa pokračovalo až do oddelenia všetkých kvasiniek zo substrátu a sediment kvasníc sa dokonale premyl trikrát vodou, načo sa znova každý raz vycentrifugoval. Premyté kvasinky sa kvantitatívne preniesly do vysúšačiek s kremenným pieskom, v ktorých sa sušily pri 104 °C do konštantnej váhy.

Priemerné výsledné množstvá získanej sušiny sú zaznačené v tab. 11, prípadne v grafe 8.



Graf 8. Vplyv smesi MEB-49 na tvorbu sušiny *Saccharomyces cerevisiae*.

Tab. 11. Množstvo sušiny po pridaní rôznych množstiev smesi MEB-49

Koncentraci a smesi MEB-49	0 (kontr.)	1/30 000	1/20 000	1/15 000	1/10 000	1/7 000	1/5 000
Sušina v g	1,7030	1,7854	1,8221	1,8312	1,8507	1,9981	1,7087

Z grafu i z tabuľky vidieť, že optimálna koncentrácia smesi MEB-49 leží v tomto prípade v okolí koncentrácie 1 : 7 000, kde sa za 30 hodín vytvorilo o 17,3% viac sušiny ako pri kontrolnom pokuse. Po prekročení tejto koncentrácie množstvo vytvorenej sušiny prudko klesá (konc. 1 : 5 000).

Pri celkovom zhodnotení priebehu krivky vidíme, že toto v podstate súhlasí s krivkou rozmnožovania na melase, ale že je o niečo posunutá smerom k vyšším koncentráciám smesi mikroelementov. Toto posunutie celej krivky treba pravdepodobne pripísať skutočnosti, že sa pre oba pokusy používaly rôzne melasy, teda substráty s rôznym obsahom prítomných mikroelementov.

Z uvedených výsledkov vidieť, že možno pomocou vhodne zvolenej smesi mikroelementov podstatne zvýšiť nielen počet, ale aj množstvo sušiny kvasníc. Bolo by teda veľmi žiadúce, aby sa týmto problémom intenzívne zaoberal aj náš droždiarský priemysel, ktorému by sa takto mohlo podariť značne zvýšiť výrobnú kapacitu prakticky bez akýchkoľvek ďalších investícií. Je však prirodzené, že v prípade priemyselného použitia mikroelementov v droždiarenstve by sa musela patrične zmeniť, prípadne urýchliť aj prítoková schéma živín, aby rýchlejšie sa množiace kvasinky mali k dispozícii dostatok stavebných a energetických látok. Napriek pomernej komplikovanosti takéhoto nového zostavenia prítokovej schémy by sa zavedenie použitia mikroelementov v droždiarenstve bezpochyby neobyčajne dobre vyplatilo.

Podľa našej myšlienky by menlivé množstvo mikroelementov prítomné v melase nebolo neprekonatelnou prekážkou. Dôležitá by bola najmä starostlivosť o to, aby sa pri dávkovaní neprekročila optimálna dávka, keďže po jej prekročení výťažok droždia pomerne prudko klesá. Na druhej strane však vidíme, že všetky koncentrácie nižšie ako optimálne tiež značne stimulujú tvorbu sušiny. Keďže v dohľadnej dobe nemožno vôbec počítať so spektrografickými analýzami droždiarských surovín, teda s analýzami, ktoré by jedinú svojou presnosťou vyhovovaly práci s mikroelementami, bude sa treba pri dávkovaní mikroelementov spoliehať skôr na skúsenosti, získané s melasami z jednotlivých krajov, prípadne bude treba zistiť akési „priemerné“ optimálne množstvo mikroelementov pre všetky melasy.

Vzhľadom na veľké perspektívy a možnosti uplatnenia mikroelementov v kvasnom priemysle sme presvedčení, že by sa tejto otázke mala venovať zvýšená pozornosť výskumníkov i prevádzkových a výskumných laboratórií jednotlivých závodov.



## Záver

V predchádzajúcich prácach kolektívu P. Nemca [19, 20, 21] sa vyslovila téza, že s hľadiska výživy zelené rastliny žijú v prírode väčšinou v stave subakútneho nedostatku mikroelementov. Ak sa zeleným rastlinám privedú mikroelementy vo vhodnej forme a v správnom množstve, dochádza u nich k zintenzívneniu fyziologických funkcií. U zelených rastlín sa to prejavuje zrýchlením a zmohtnutením rastu a zväčšením váhy plodov, prípadne zväčšením množstva produkovaných asimilátov (cukru).

Predložená práca ukazuje, že túto Nemcovu tézu možno rozšíriť aj na kvasinku pивnú, žijúcu v podmienkach technickej výroby droždia. Hlavné zdroje živín, melasa a superfosfát, neobsahujú zrejme mikroelementy v optimálnom množstve. Tento fakt sa zrejme demonštruje pri pridaní mikroelementov zvýšením kvasivosti, rýchlosti rozmnožovania a váhy sušiny v optimálnych koncentráciách. Je veľmi zaujímavé, že koncentračné optimum jednotlivých funkcií sa nekryje, ale že je omiečo iné pre každú sledovanú fyziologickú funkciu. Tento fakt potencionálne zakladá možnosť prostredníctvom minerálnej výživy vplývať na fyziologické procesy výroby droždia a azda aj na iné procesy v technickej mikrobiológii.

## Súhrn

Autori sledovali vplyv Nemcovej smesi mikroelementov MEB-49 (tab. I) na kvasivosť, rozmnožovanie a produkciu sušiny u *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. Porovnávacie pokusy konali jednak na plno-syntetickej pôde Nielsenovej, jednak na technologickom substráte (melasa + superfosfát), používanom pri výrobe droždia.

Na kultiváciu upotrebili jednak kultúru, ochudobnenú o mikroelementy trojmesačnou kultiváciou v syntetickej pôde, pripravenej pokiaľ možno bez stôp mikroelementov, jednak normálnu technickú kultúru.

Vo všetkých prípadoch sa pri optimálnej koncentrácii mikroelementov pozorovalo značné zintenzívnenie fyziologických funkcií kvasinky.

Graf 1 ukazuje závislosť produkcie CO<sub>2</sub> od prítomnosti MEB-49 melasovej pôde. Graf 5 ukazuje závislosť produkcie CO<sub>2</sub> od kvantity mikroelementov v syntetickej pôde. Graf 6 ukazuje závislosť počtu buniek (rozmnožovania) od koncentrácie MEB-49. Upotrebila sa ochudobnená kultúra a syntetická Nielsenova pôda s aneurínom. Graf 7 ukazuje závislosť počtu buniek (rozmnožovania) od koncentrácie MEB-49. Použila sa normálna prevádzková kultúra *Saccharomyces cerevisiae* a melasová pôda ako pri výrobe droždia. Graf 8 ukazuje závislosť produkcie sušiny od koncentrácie MEB-49.

Z uvedených výsledkov je zrejmé, že pridaním vhodného množstva smesi mikroelementov možno značne zvýšiť rozmnožovanie a váhu su-

šiny kvasinky. Dôležité je, že tento fakt sa v prakticky nezmenšenej miere pozoroval aj pri technickom substráte (melasa + superfosfát), používanom v technológii droždia.

Tento fakt umožňuje zvýšiť kapacitu droždiarenského priemyslu, beztoho že by vyžadoval ďalšie technické investície. Táto možnosť má v dnešnom štádiu výstavby socializmu v našej vlasti veľký význam.

### *Влияние микроэлементов на Saccharomyces cerevisiae*

П. Немец, И. Балан, И. Фуска, Н. Велики

Кафедра технической микробиологии и биохимии химического факультета Словацкого высшего технического учебного заведения в Братиславе

#### В ы в о д ы

Авторы исследовали влияние смеси микроэлементов Немца МЕВ-49 (таб.) на брожение, размножение и продукцию сухих веществ *Saccharomyces cerevisiae* Hansenia. Паралельные опыты были проведены как на вполне синтетической питательной среде Нильзена, так и на технологическом субстрате (патока суперфосфат), который употребляется при производстве дрожжей.

При культивации была употреблена как культура, обедненная микроэлементами трехмесячной культивацией в синтетической питательной среде, приготовленной по возможности без следов микроэлементов, так и нормальная техническая культура.

Во всех случаях при оптимальной концентрации микроэлементов была замечена значительная интенсивность физиологических функции дрожжевой клетки

График показывает на зависимость продукции  $\text{CO}_2$  от присутствия МЕВ-49 в паточном субстрате, График 5 показывает на зависимость продукции  $\text{CO}_2$  от количеств микроэлементов в синтетической питательной среде. График 6 показывает на зависимость числа клеток (размножения) от концентрации МЕВ-49. При этом была употреблена обедненная культура и синтетическая питательная среда Нильзена с аневрином. График 7 показывает на зависимость числа клеток (размножения) от концентрации МЕВ-49. При этом была употреблена нормальная-техническая культура *Saccharomyces cerevisiae* и паточный субстрат, как при производстве дрожжей.

График 8 показывает на зависимость продукции сухих веществ от концентрации МЕВ-49.

Из вышеприведенных результатов ясно видно, что прибавлением подходящего количества смеси микроэлементов можно значительно увеличить размножение и вес сухих веществ дрожжевой клетки. Важно отметить от, что этот факт был практически замечен в той же степени и у технического субстрата (патока + суперфосфат), употребляемого при технологии дрожжей.

Этот факт дает возможность существенно повысить мощность дрожжевой промышленности без повышения технических капиталовложений. Эта возможность имеет большое значение в настоящем этапе развития социализма в нашей стране.

Поступило в Редакцию 28-го июля 1952 г.

# EINFLUSS VON MIKROELEMENTEN AUF SACCHAROMYCES CEREVISIAE

P. NEMEC, J. BALAN, J. FUSKA, I. VELIKY

*Lehrstuhl für technische Mikrobiologie und Biochemie der chemischen Fakultät  
an der Slowakischen technischen Hochschule in Bratislava*

## Zusammenfassung

Es wurde der Einfluss des Mikroelementenkomplexes MEB-49 von Nemeč (tab. 1) auf Gärfähigkeit, Vermehrung und Trockenstoffproduktion von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen verfolgt. Kontrollversuche wurden einesteils auf vollsynthetischem Nährboden von Nielsen, einesteils auf zur Hefefabrikation benütztem technologischem Substrat (Melase + Superphosphat) durchgeführt.

Zur Kultivierung wurde einesteils eine auf synthetischem Boden ohne Spuren von Mikroelementen hergestellte durch dreimonatige Kultivierung an Mikroelementen verarmte Kultur, einesteils eine normale technische Kultur angewendet.

In allen Fällen wurde bei der optimalen Konzentration der Mikroelemente eine bedeutende Intensivierung der physiologischen Funktionen der Hefepilze beobachtet.

Fig. 1 zeigt die Abhängigkeit der CO<sub>2</sub> Produktion von der Gegenwart von MEB-49 im Melassenboden. Fig. 5 zeigt die Abhängigkeit der CO<sub>2</sub> Produktion von der Quantität der Mikroelemente im synthetischen Nährboden. Fig. 6 zeigt die Abhängigkeit der Hefenzellenanzahl (Vermehrung) von der MEB-49 Konzentration. Benützt wurde die verarmte Kultur und der synthetische Boden von Nielsen mit Aneurin. Fig. 7 zeigt die Abhängigkeit der Hefenzellenanzahl (Vermehrung) von der MEB-49 Konzentration bei Benützung einer normalen Betriebskultur *Saccharomyces cerevisiae* und von Melassenboden wie bei der Hefefabrikation. Fig. 8 zeigt die Abhängigkeit der Trockenstoffproduktion von der MEB-49 Konzentration.

Aus den angeführten Ergebnissen ist ersichtlich, dass durch Beimengung eines geeigneten Mikroelementenkomplexes Vermehrung und Trockenstoffgewicht der Hefepilze bedeutend erhöht werden können. Es ist von Wichtigkeit, dass dies auch bei in der Hefetechnologie angewendetem technischem Substrat praktisch in unvermindertem Mass beobachtet wurde.

Diese Ergebnisse liefern potentiell die Möglichkeit einer Kapazitätserhöhung der Hefeindustrie ohne weitere technische Investitionen zu fordern. Diese Möglichkeit ist im heutigen Stand des Aufbaues von Sozialismus in unserer Heimat von grosser Wichtigkeit.

*In die Redaktion eingelangt den 28. VII. 1952*

## LITERATURA

1. Bernštejn, *O roli mikroelementov v pitanii životnych*, Priroda 6, 35 (1947).
2. Bernštejn, *O biologičeskoj roli manganca*, Uspechi sovrem. biologii 25, 2 (1948).
3. Bobko E. V., *K voprosu o roli bora v rastenijach*, Bot. žurn. SSSR 26, 10 (1941).
4. Bobko E. V., Beljusev M. A., *Importence du bore pour la betterave à sucre*, Ann. Agron. N. S. 3, 493 (1911).
5. Bortels H., *Über die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen*, Biochem. Z. 182, 301 (1927).
6. Burgstroem H., *Über die Schwermetallkatalyse der Nitratasymilation*, Planta 29, 292 (1939).
7. Buromskij I. D., *Vlijanie Zn, Mg i K na obmen veščestv u Aspergillus niger*, Mikrobiologija 5, 800 (1938).
8. Condek, Bendman, *O teželych metallach v kletke. Med i vitamin B. Med i železo v opuchlach*, Uspechi sovrem. biologii 4, 1935.
9. Gal'cov P. E., *Vlijanie manganca na razvitie rastenij, Iz rezult. laborat. opytov i laborat. za 1908—1909 gg.* Moskva 1911, 402—414.
10. McHargue J. S., Calfee R. K., *Effect of manganese, copper and zinc on the growth of yeast*, Plant Physiology 6, 559 (1931).

11. Jerusalemskij I. D., *Značenie mikroelementov dľa aceton-etylovych bakterij*, Doklady Ak. Nauk SSSR, 76 (1951).
12. Jerusov S. S., *K voprosu o rasprostraneni litiya v rastenijach*. (Sostavl. pri učastii B. I. Bondurkova), Tr. Biogeochem. laborat. AN. SSSR 5, 79 (1939).
13. Kaminskaja Š. E. *K nachoždeniju titana v organizmach* (Soobščenie II). Tr. Biogeochem. laborat. AN SSSR 7 (1944).
14. Kanter R. M., *O sravnitel'nom vlijanii solej teželych metallov na rost i chimičeskij sostav gribka Aspergillus niger* (Diss. na stepeň magistra farmacii, II, 1903).
15. Kubowitz, *Über die chemische Zusammenstellung der Kartoffeloxydase*, Biochem. Z. 292, 221 (1937).  
Lundergardh H., *Mangan als Katalysator der Pflanzenatmung*, Planta 29, 419 (1939).
16. May A. V., *Über die Einwirkung von Metallsalzen auf den Verlauf der alkoholischen Gärung*, Biochem. Z. 141, 417 (1923).
17. Mousseron M., Fauroux P., *Zink in Pilzen*, Bull. soc. chim. biol. 114, 1935 (1932); Z. f. Pflanzenernährung, Düngung u. Bodenkunde (A) 33, 368 (1934).
18. Mulder E. G., *Über die Bedeutung des Kupfers für das Wachstum von Mikroorganismen und über eine mikrobiologische Methode zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Bodenkupfer*, Archiv f. Mikrobiologie 10, 72 (1939).
19. Nemeč P., Pastýrik L., Nádvorník R., *Experimentálny príspevok k otázke funkcie mikroelementov vo výžive rastlín*, Chem. zvesti 4, 149 (1950).
20. Nemeč P., Pastýrik L., Tesařová M., Lux A., Voříšek J., *Experimentálny príspevok k otázke funkcie mikroelementov vo výžive rastlín*, Chem. zvesti 5, 254 (1951).
21. Nemeč P., Voříšek J., Pastýrik L., Nádvorník R., *Experimentálny príspevok k otázke funkcie mikroelementov vo výžive rastlín*, Chem. zvesti 5, 272, (1951).
22. Němec A., Kaš V., *Studien über die physiologische Bedeutung des Titans im Pflanzenorganismus*, Biochem. Z. 140, 583 (1923).
23. Peive Ya. V., *The rôle of boron in symbiotropism of flax and the practical problems of applying boron fertilizers*, Khim. Sotsial. Zmeled. 4, 55.
24. Pirschle K., *Vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung der Elemente nach Wachstumversuchen mit Aspergillus niger*, Planta 23, 177 (1934); 24, 649 (1935).
25. Pirschle K., *Die Bedeutung von Spurenelemente für Ernährung, Wachstum und Stoffwechsel der Pflanzen II*, Ergebnisse der Biologie 17, 285 (1925).
26. Raulin J., *Etudes chimiques sur la végétation*, Ann. Sci. Nature bot. 11, 93 (1869).
27. Roberg M., *Über die Wirkung von Eisen, Zink und Kupfersalzen auf Aspergillen*, Ztrbl. Bakteriologie, 74, 333 (1928).
28. Rundra M. N., *Rôle of Manganese in the biological synthesis of ascorbic acid*, Nature 143, 811 (1939).
29. Scharrer K., *Biochemie der Spurenelemente*, Berlin 1941.
30. Scharrer K., Schropp W., Schwaibold J., *Milchertrag und Milchjodspiegel von Milchkühen auf jodgedüngten Weiden*, Tierernährung 5, 676 (1933).
31. Stiles W., *Trace elements in plants and animals*, Cambridge 1951.
32. Ščerbakov A., *K voprosu o fiziologičeskoj roli elementov, neobchodimych rasteniju v malych količestvach*, Dokl. AN SSSR 21, 188 (1938).
33. Ščerbakov A., *Vlijanie mikroelementov na raspredelenie kaľcija, magnija i fosfornoj kisloty v rastenijach*, Chimiz. soc. zemled. 7, 34 (1935)
34. Škofnik M. Ja., *Značenie mikroelementov v žizni rastenij v zemedelii*, Moskva-Leningrad 1950.
35. Škofnik M. A., Makarova N. A., *Ob antagonizme železa i medi*, Dokl. AN SSSR 70 (1951).

36. Škořnik M. A., Makarova N. A., *Ob antagonizme bora i medi*, Dokl. AN SSSR 68, 185 (1949).
37. Valeckij R., *Biologičeskaja roľ mikroelementov*, Uspechi chimii 7, 1062 (1938).
38. Vinogradov A. P., *Fiziologičeskoje značenie medi*, Priroda 10, 43 (1934).
39. Wickerham L. J., Fabian F. W., *Dissociation of Saccharomyces Acetisacchari u Pichia Alcoholophila*, Journ. Inf. Dis. 58, 165.
40. Young R. S., *Certain rarer elements in soils and fertilizers and their rôle in plant growth*, N. Y. Cornell agric. exp. sta. mem. 174, (1935).
41. Zabluda T. V., *Fiziologičeskoje dejstvíe medi na rasteńie*, Tr. Čuvašk. uč. inst. 1, 1 (1938).