

Vliv pH při mléčném kvašení na celkovou výtěžnost kyseliny mléčné

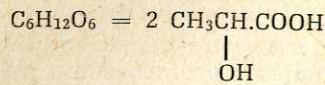
VLADIMÍR KRUMPHANZL, JOSEF DYR, VLADIMÍR KOBR, VŠČHT, Praha

661.733.2

Výroba kyseliny mléčné nepatří sice svým objemem mezi největší v kvasném průmyslu, přesto však není možné její důležitost z hlediska národního hospodářství podceňovat, a to zejména při dnešním nedostatku organických kyselin pro potravinářské účely. Proto je nutné zajistit nejen její dostatečné množství, ale i kvalitu.

V současné době se u nás kyselina mléčná vyrábí z melasy. Hospodárnost výroby vyžaduje v první řadě zaručení vysoké výtěžnosti, a to nejen při kvašení, ale rovněž i při izolaci.

Ze stechiometrické rovnice homofermentativního kvašení



vyplývá, že teoreticky můžeme
že 100 g monosacharidu vyrobit

100 g kyseliny mléčné
100 g disacharidu vyrobit

105 g kyseliny mléčné
100 g škrobu vyrobit

111 g kyseliny mléčné

Praktické výtěžky jsou však nižší. Tak např. *Taylor* a *Breitzke* [1] uvádějí, že za normálních provozních podmínek je dosažitelná výtěžnost 85 %.

Vaňková [2], která provedla laboratorní prověření homofermentativních kmenů mléčných baktérií, většinou používaných v našich výrobnách, dosáhla těchto výtěžností na přizívené melasové půdě (počáteční koncentrace cukru 9 %):

použitý kmen	výtěžnost %
KVA	72
KVB	81
1m	75
3m	73
alb	79
LD	69
VD	80

To znamená, že v průměru dosažená výtěžnost je 75,6 %.

Stejného výsledku bylo dosaženo při rozboru déle trvajícího období kvašení v jednom našem závodě, který vyrábí mléčnou kyselinu pro potravinářské účely. Dosažená průměrná výtěžnost v kvasírně se pohybovala okolo 75 %.

Cukr, který potřebují mikroorganismy jako stavební složku pro tvorbu buňky, tvoří pouze zlomek celkových ztrát. Lze proto předpokládat, že v průběhu kvašení jsou vytvářeny vedlejší produkty, ať již mléčnými baktériemi nebo kontaminací, která je však při poměrně vysoké teplotě kvašení potlačována. Proto je pravděpodobnější, že ztráty cukru jsou převážně způsobeny použitou kulturou, která se dostala do nepříznivých životních podmínek.

Z faktorů, které ovlivňují průběh kvašení jsou: teplota kvašení, počáteční koncentrace cukru, fosforu, doplňkových organických živin a dále pH půdy, které je periodicky regulováno přídavky neutralizačních činidel.

Konečným produktem kvašení homofermentativních mléčných baktérií je převážně kyselina mléčná, zatím co u heterofermentačních baktérií kyselina octová, etylalkohol, glycerin, kysličník uhličitý a někdy manit, za přítomnosti fruktózy (sacharózy) v kvasící zápaře. Homofermentativnost a heterofermentativnost však není vlastnost stabilní, ale za změněných kultivačních podmínek je možné měnit i kvalitu a kvantitu konečných produktů.

Stephensonová [3] se zabývala otázkou vlivu pH. Zjistila, že zatímco při pH 4,5 se tvoří 87 % kyseliny mléčné, při pH 9,0 se tvoří pouze 6,1 %. Na úkor kyseliny mléčné však vzniká kyselina octová, kyselina mravenčí a etylalkohol. Podobně Gunsalus a Niven [4] konstatují, že pH vyvolává tvorbu etylalkoholu, formaldehydu a v alkalickém prostředí dokonce i polysacharidů. Kempe, Halvorson a Piret [5] rovněž sledovali vliv pH v rozmezí 3,5 až 6,2 na výtěžnost a rychlosť produkce kyseliny mléčné. Zjistili, že optimální pH pro produkci kyseliny mléčné je silně závislé na složení půdy. Dosažená výtěžnost se v průměru pohybovala okolo 70 %, zatímco konverze cukru na kyselinu mléčnou byla v průměru 80 %. Důležité je, že maximální hodnoty konverze bylo dosaženo v úzkém pH, což by umožnilo stanovit optimální podmínky pro kvašení. V další práci se Finn, Halvorson a Piret [6] zabývali otázkou vlivu pH na celkovou rychlosť kvašení. Zjistili, že existuje velmi úzké rozmezí pH, kdy je dosahováno maximální rychlosti. Zůstává dosud otevřená otázka vlivu anaerobity prostředí což je jistě důležité, když si uvědomíme, že v některých provozech promíchávají záparu vzduchem, aby rozvířili sedimentovaný uhlíčitan vápenatý. Ani z literárních údajů nevyplývá jednotné stanovisko. Win-

disch, Haehn a Heumann [7] sledovali aerobní a anaerobní metabolismus *Streptococcus lactis* a *Lactobacillus delbrückii*. Prokázali, že v metabolismu za aerobních a anaerobních podmínek není rozdíl. Diference byly pozorovány v růstu a dělení mikroorganismů. Naproti tomu Bolcato [8] uvádí u výsledku manitolmlečného kvašení, že při dodržování anaerobity stoupají výtěžky manitu. Ze zápar obsahující 8,5 až 9,5 % cukru bylo získáno 4,0 až 5,8 % kyseliny mléčné, 1,2 až 1,6 % kyseliny octové a 2,5 až 4,1 manitu.

Z dalších faktorů, které přicházejí v úvahu, jsou živiny. Zajímavé je sdělení Kempeho, Gilliese a Westa [9] kteří tvrdí, že nízká počáteční koncentrace živin sice zpomaluje rychlosť kvašení, ale současně redukuje tvorbu vedlejších produktů, a tím se zvyšuje výtěžek kyseliny mléčné. Doporučují proto dodávat živiny v průběhu celého kvasného procesu.

Vzhledem k tomu, že při „Sledování vlivu některých faktorů na celkový průběh mléčného kvašení za použití kmene *Lactobacillus delbrückii-L 70*“ [10] jsme zjistili, že s klesající počáteční koncentrací cukru se zvyšuje konverze na kyselinu mléčnou, pokusili jsme se tuto anomaliu vysvětlit.

V prvé řadě jsme se pokusili izolovat a identifikovat vznikající vedlejší produkt, dále jsme prověřili, zda otázka vzniku tohoto vedlejšího produktu je charakteristická jak pro poměry laboratorní, tak i provozní. Konečně v poslední fázi jsme sledovali, zda existuje závislost mezi udržovaným pH v průběhu fermentace a změnou konverze cukru na kyselinu mléčnou. Lze totiž předpokládat, že pH jako faktor neustále podléhající změnám při mléčné fermentaci může být právě příčinou uvedených nedostatků.

Experimentální část

Analytické metody

Redukující cukry — byly stanoveny metodou Luff-Schoorlovou [12].

pH — bylo stanoveno na elektronkovém pH-metru, výrobek výzkumného ústavu STZ v Ústí nad L.

Volná kyselina mléčná — stanovena jako titrační acidita 0,1N NaOH na fenolftalein,

1 ml 0,1N NaOH odpovídá 0,009 g kys. mléčné.

Vázaná kyselina mléčná — komplexometricky byl stanoven vápník vázající kyselinu mléčnou a na základě stechiometrie bylo vypočítáno odpovídající množství kyseliny mléčné ve vzorku [13].

Chromatografie cukrů — byla použita metoda podle Cifonelliho a Smitha [14] — chromat. papír Whatman č. 1, vyvýjecí směs n-butylalkohol, kys. octová, voda 4:1:5.

Detekce — po oxydaci iodistanem draselným (doba oxydace 6 min) postřík papíru roztokem benzidinu — bílé skvrny na modrému podkladu. Skvrna manitu charakteristicky žlutne.

Roztoky A: Nasycený vodný roztok iodistanu draselného;

B: 0,1N roztok benzidinu v 50% vodném roztoku alkoholu — 10 objemů
+ aceton — 2 objemy
+ 0,2N HCl — 10 objemů.

Elementární analýza — stanovení C, H₂ a O₂ vyzlovaného vedlejšího produktu.

Tabulka 1

Vzorek		pH	Volná kys. mléčná g/100 ml	Vázaná kys. mléčná g/100 ml	Cukr %
č. 3	zápara během kvašení občas míchána vzduchem	6,40	0,180	9,31	0,112
č. 4	zápara během kvašení občas míchána mechanicky	11,00	—	10,79	0,099
č. 5	dtto — mechanicky	6,30	0,144	10,08	0,088
č. 6	dtto — vzduchem	5,80	0,216	9,25	0,10

a) Pokus o izolaci a identifikaci vedlejšího produktu vznikajícího v procesu mléčného kvašení

Použitý kmen *Lactobacillus delbrückii* L-70 ne-tvoří ani etylalkohol, těkavé kyseliny, tj. kyselinu octovou a mravenčí, ani jiné těkavé látky v pozorovatelném množství. To znamená, že vedlejší produkt musí být látka netěkavá nebo velmi málo těkavá. Na základě uvedeného rozboru situace jsme přistoupili k vlastní práci. Kyselina mléčná asi 7%, získaná fermentací 10% roztoku sacharózy s přídavkem 0,25 % K_2HPO_4 a 16 ml kvasničného autolyzátu na 1 litr půdy byla po vyizolování (rozložení mléčnanu vápenatého kyselinou sírovou a odfiltrování vysráženého síranu vápenatého) zahušťována na vyšší koncentraci za vakua tak, aby teplota zahušťované kyseliny v baňce nepřestoupila hodnotu 60 °C. Při vyšším zahuštění na 60 až 70 % bylo zpozorováno vypadávání krystalické sedliny, velmi dobře rozpustné ve vodě a srazitelné etylalkoholem. Elementární analýzou bylo zjištěno, že obsahuje 39,55 % C, 8,07 H. Bod tání 164 °C. Po 20 h zahřívání s 5% kyselinou sírovou látka nereduovala Fehlingův roztok. Látka po odpaření vykristalovala a

vykazovala bod tání 166° (Kofl.). Směsný bod tání této látky s látkou vzatou do reakce byl 163°. To znamená, že látka se nehydrolyzuje. Připravený tribenzalderivát vykazoval bod tání 212 až 215° (Kofl.). Srovnávací vzorek byl připraven stejným způsobem z D-manitu. Vzniklý tribenzalderivát měl bod tání 215 až 217° (Kofl.). Směsný bod tání benzalderivátu 203 až 207°. Na základě těchto zjištěných skutečností bylo možné konstatovat, že jde o alkoholický cukr — manit.

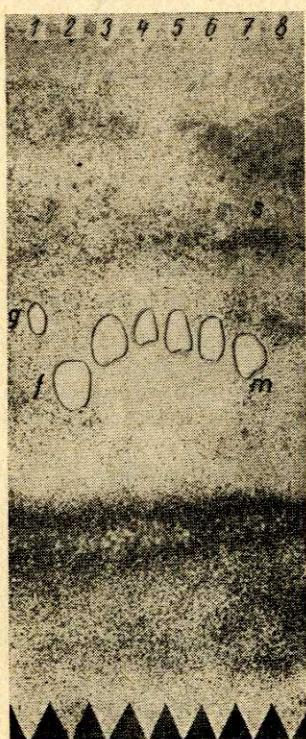
Poznámka: analýzu provedl inž. J. Jarý, CSc., katedra organické chemie, VŠCHT.

b) Proveření tvorby manitu při kvašení v provozních podmínkách

V této části práce byly odebrány vzorky z provozů, jednak v průběhu kvašení a jednak po dokvašení. Na stabilizaci byl přidán thymol. Přesto se však neporařilo proces úplně zastavit a proto byly analyzovány vzorky pouze prokvašených zápar.

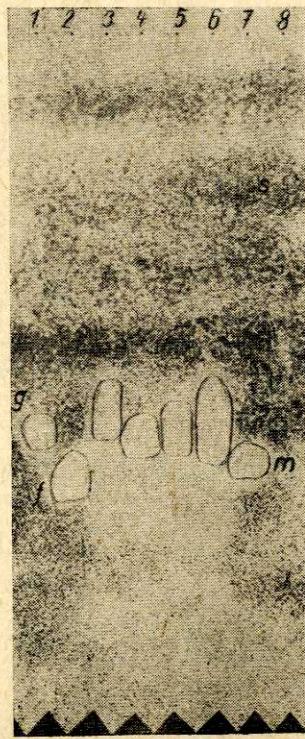
1. Vzorky prokvašených zápar ze závodu cukrovar Sered měly složení jak uvádí tabulka 1.

Z tabulky 1 je patrné, že prokvašení zápar pro-



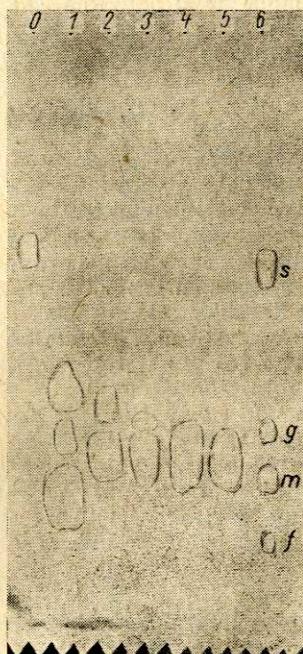
Obr. 1. Vzorky prokvašených zápar ze závodu Cukrovar Sered

1 — standard glukózy; 2 — standard fruktózy; 3, 4, 5, 6 — jednotlivé vzorky prokvašených zápar; 7 — standard manitu; 8 — standard sacharózy



Obr. 2. Vzorky prokvašených zápar ze závodu Cukrovar Hulin

1 — standard glukózy; 2 — standard fruktózy; 3, 4, 5, 6 — jednotlivé vzorky prokvašených zápar; 7 — standard manitu; 8 — standard sacharózy



Obr. 3. Záznam průběhu kvašení — změny v obsahu cukru

0 — start kvašení; 1 — 24 h kvašení; 2 — 48 h kvašení; 3 — 72 h kvašení; 4 — 96 h kvašení; 5 — 120 h kvašení; 6 — standard sacharózy glukózy, manitu a fruktózy

Tabulka 2

Vzorek	pH	Volná kys. mléčná g/100 ml	Vázaná kys. mléčná g/100 ml	Cukr %
č. 3	5,30	0,288	14,64	0,160
č. 4	5,10	0,648	10,08	0,096
č. 5	5,20	0,432	12,78	0,070
č. 6	5,10	0,468	9,37	0,160

běho normálně, zbytkové cukry byly nízké a množství vytvořené kyseliny mléčné odpovídající. Na chromatogramu (obr. 1) je však vidět, že se ve všech případech tvoří při kvašení manit (soudě podle velikosti skvrn, až na vzorek č. 3) stejně.

2. Pokud jde o vzorky prokvašených zápar ze závodu Cukrovar Hulín, jejich složení uvádí tabulka 2.

I v tomto případě, podle výsledných analýz, probíhalo kvašení normálně. Chromatografickým záznamem na obr. 2 byl však rovněž prokázán u všech vzorků manit. Dělení vzorků není tak výrazné, avšak při detekci bylo ve všech případech zaznamenáno okamžité žloutnutí skvrn, a to je charakteristické právě pro manit.

Uvedenými pokusy bylo prokázáno, že i v provozních podmínkách se tvoří manit, což se samozřejmě musí projevit na snížené výtěžnosti.

c) Vliv pH na tvorbu manitu při zkvašování rafinovaného cukru a melasy za použití různých živin

Při sledování vlivu pH na tvorbu vedlejších produktů (pokus I.-IV.) se měřený rozsah pohyboval okolo 4,0 až 7,0. Jsou to mezní hodnoty přicházející v úvahu, protože pod pH 4,0 se fermentační proces podstatně zpomalí a nad pH 7,0 je zápara zbavena ochranné acidity, takže je umožněno rozmožení kontaminace.

Tvorba vedlejších produktů byla posuzována z差ence mezi vytvořenou kyselinou mléčnou a zjištěnou hodnotou odkvašeného cukru. Jako vytvořená kyselina mléčná byl uvažován rozdíl součtu volné a vázané kyseliny mléčné prokvašené záparu a záparu ihned po zakvašení.

Složení živných půd pro jednotlivé pokusy bylo:

Pokus I

Sacharózová půda asi 10 %, přizivená sladovým květem v množství 2 g/100 ml a K₂HPO₄ v množství 0,25 g/100 ml. Živiny byly přidány najednou do startu kvašení.

Pokus II

Sacharózová půda asi 10 %, přizivená kvasničným autolyzátem v množství 16 ml/litr a K₂HPO₄ v množství 0,25 g/100 ml. Živiny přidány rovněž najednou do startu kvašení.

Pokus III

Melasová půda asi 10 %, přizivená dávkou sladového květu v množství 0,4 g/100 ml a K₂HPO₄ v množství 0,25 g/100 ml. Živiny byly rozděleny na čtyři dávky a přidávány postupně vždy po dvanácti hodinách kvašení.

Pokus IV

Melasová půda asi 10 %, přizivená dávkou kvasničného autolyzátu v množství 0,12 g/100 ml a K₂HPO₄ 0,25 g/100 ml. Živiny byly opět rozděleny na čtyři dávky a přidávány postupně vždy po dvanácti hodinách kvašení.

Na zakvašení byla použita kultura *Lactobacillus delbrückii* L-70 ze sbírek Katedry kvasné chemie a technologie na VŠCHT v Praze, teplota kvašení 45 °C, zápara byla v průběhu kvašení neustále míchána. Kvasicí zápara byla neutralizována kysličníkem vápenatým nebo uhličitanem vápenatým v tříhodinových intervalech. Analýzy vzorků byly prováděny každých 24 hodin, celková doba kvašení 120 hodin.

Z tabulky 3 vyplývají tyto závěry:

1. Při kvašení na sacharózové půdě konverze cukru na kyselinu mléčnou stoupá s rostoucím pH. Nejvyšší konverze, dosažená při pH 7,0, je přibližně 90%, tzn. že i v tomto případě se 10 % cukru ztrácí. Na půdách přizivených sladovým květem při pH 6,0 a 7,0 jsou výsledky zkresleny rozvíjením kontaminace.

2. Optimální pH pro konverzi cukru však neodpovídá optimálnímu pH pro dosažení maximální výtěžnosti. Při pH nižším i vyšším než je 5,0, jsou prokvasy poměrně malé. Kvašení na počátku je sice uspokojivé, ale časem se velmi zpomalí, nebo v kraj-

Tabulka 3
Výtěžky kyseliny mléčné a konverze cukru na kyselinu mléčnou při sledování vlivu pH na kvašení

Pokus	pH	Cukr pův. g ve 100 ml	Cukr zbytk. g ve 100 ml	Cukr zbytk. % na cukr pův.	Cukr zkaš. g ve 100 ml	Vytvoř. mléčná kys. g ve 100 ml	Konverze %	Výtěžek %
I.	4	9,60	3,10	32,3	6,50	3,22	49,5	33,6
	5	10,10	10,19	1,9	9,91	7,02	70,8	69,5
	6	8,06	3,00	37,20	5,06	4,25	84,0	52,7
	7	8,00	5,30	66,30	2,70	2,44	90,5	30,5
II.	4	8,84	4,62	52,3	4,22	2,41	57,0	27,2
	5	8,50	1,17	13,8	7,33	6,86	93,5	80,7
	6	8,98	2,00	22,3	6,98	5,81	83,3	64,8
	7	9,52	4,70	49,3	4,82	4,55	94,2	47,7
III.	4	9,74	3,90	40,5	5,84	3,74	64,0	38,5
	5	9,26	0,26	2,8	9,00	6,50	72,3	70,2
	6	9,60	0,32	3,3	9,28	9,99	107,0	104,0
	7	9,26	3,56	38,4	5,70	7,10	124,0	76,5
IV.	4	10,30	5,04	48,8	5,26	2,43	48,2	23,6
	5	9,94	0,14	1,4	9,80	6,27	64,0	63,0
	6	9,60	—	—	9,60	9,74	101,0	101,0
	7	10,30	1,94	19,0	8,36	8,42	100,0	82,0

Poznámka: Při stanovení vázené kyseliny mléčné komplexometrickou metodou jsou dosahovány pouze relativní výsledky, protože uvedená metoda dává na melase všeobecně vyšší hodnoty. Proto hodnoty konverze nelze brát jako absolutní a slouží pouze ke srovnání.

ním případě úplně zastaví. To znamená, že optimální pH pro kvašení sacharózových půd je 5,0, resp. mezi 5,0 až 6,0. Konverze je sice nižší než u vzorku s vyšším pH, avšak celková výtěžnost na vnesený cukr v měřeném intervalu je nejvyšší.

3. Podobné výsledky byly získány i při zkvašování melasové půdy. Optimální pH se však poněkud posunulo do alkaličtější oblasti. Nejhodnější se ukázalo pH 6,0, kdy se dosáhlo nejvyšší konverze a výtěžnosti. Při pH 4,0 byl opět vysoký zbytkový cukr a minimální konverze, při pH 5,0 kvašení sice doběhlo do konce, avšak hodnota konverze byla nízká. Naproti tomu při pH 7,0 byla konverze 100% avšak výtěžnost byla nízká.

4. Pokud jde o tvorbu manitu v průběhu kvašení, jeho maximální množství vzniká v okamžiku nejintenzívnejšího kvašení. Tak např. při zkvašování rafinovaného cukru přiziveného sladovým květem (pH udržováno na hodnotě 5,0) je časový průběh kvašení jak je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4

Den kvašení	Volná kys. mléčná g/100 ml	Váz. kys. mléčná g/100 ml	Cukr %	Množství vytvořené kys. za 24 h g/100 ml	Množství zkvašeného cukru za 24 h g/100 ml
0	0,13	—	10,10	—	—
1	0,10	1,61	7,80	1,58	2,30
2	0,65	4,18	2,30	3,12	5,50
3	0,58	6,30	0,42	2,05	1,88
4	0,27	6,87	0,22	0,26	0,20
5	0,29	6,87	0,19	0,02	0,03

Z tabulky 4 vyplývá, že v údobí mezi 24 h a 48 h je proces fermentace nejintenzívnejší, a to, je vidět na množství vytvořené kyseliny mléčné. Také odkvás cukru je v tomto údobí nejvyšší. Množství spotřebovaného cukru však neodpovídá množství vypprodukované kyseliny mléčné, což je známkou tvorby vedlejších produktů. Zjištěná skutečnost je potvrzena na chromatogramu, kde množství manitu v uvedeném časovém intervalu prudce vzrůstá.

ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ПРИ МОЛОЧНОКИСЛОМ БРОЖЕНИИ НА ОБЩИЙ ВЫХОД МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Авторы изучали влияние кислотного числа при молочнокислом брожении на процесс образования молочной кислоты и на ее выход. Было установлено, что при применении штамма *Lact. delbrückii* L 70 брожение сопровождается непрерывным образованием маннита, имеющего характер побочного продукта деятельности дрожжей. Авторы предполагают, что присутствие маннита является основной причиной снижения выхода молочной кислоты. При кислотном числе около 4,0 количество маннита резко повышается.

EINFLUß DES pH BEI DER MILCH-SÄUREGÄRUNG AUF DIE GESAMT-AUSBEUTE DER MILCHSÄURE

Die Autoren studierten den Einfluß des pH bei der Milchsäuregärung auf die Milchsäure-Bildung und Ausbeute. Es wurde bewiesen, daß der benützte Stamm *Lact. delbrückii* L 70 in dem ganzen Gärungsverlauf als Nebenprodukt Mannit bildet. Nach der Feststellung der Autoren ist der bei der Gärung entstehende Mannit wahrscheinlich die Hauptursache der niedrigeren Milchsäureausbeute. Bei einem pH, das dem Wert 4,0 nahe liegt, erfolgt die Mannitbildung in größerem Maß.

EFFECT OF pH AT LACTIC FERMENTATION UPON THE YIELD OF LACTIC ACID

The article deals with the effect of pH at lactic fermentation upon the formation of lactic acid and therefore upon its final yield. It has been ascertained that the strain *Lact. delbrückii* L 70 produces during the whole fermentation period mannitol this being a side product of its activity. The presence of mannitol is apparently one of the main reasons of low lactic acid yields. The proportion of mannitol increases if pH is near 4,0.

V dalších hodinách kvašení se množství manitu prakticky nemění. Je to potvrzeno jak chemickými analýzami, tak chromatogramem.

Z uvedených výsledků vyplývá, že vhodným regulováním pH v průběhu kvašení jak na melasové, tak i sacharózové zápaře lze dosáhnout nejen dobré výtěžnosti, ale i krátké doby kvašení.

Závěr

V uvedené práci bylo prokázáno, že se v průběhu procesu mléčného kvašení, za nepříznivých kultivačních podmínek, mohou tvořit vedlejší produkty. Vznik těchto vedlejších produktů může podstatně ovlivnit konečný výtěžek. Jednu z látek se podařilo izolovat a identifikovat. Jde o alkoholický cukr manit. Jeho tvorba byla prokázána nejen při kultivaci v laboratorních podmínkách, ale rovněž v prokvašených záparách z některých provozů. Protože koncentraci volné kyseliny je nutné při kvašení neustále regulovat, aby se nezvolnil kvasný proces, může být právě její nedostatečná úprava příčinou snižování výtěžku. Bylo proto sledováno, do jaké míry tato změna pH může ovlivnit tvorbu manitu. Pokusy bylo skutečně prokázáno, že s pH, blížícím se k hodnotě 4,0, se ve zvýšené míře tvoří uvedený vedlejší produkt.

Literatura

- [1] Taylor G. G., Breitzke W. C.: Ind. Eng. Chem. 44, 1955 (1952).
- [2] Vaňková: Diplomová práce, vedoucí Stárka J., Karlova univerzita, 3 (1954).
- [3] Stephensonová M.: Bacterial Metabolism (1949).
- [4] Gunsalus I., Niven C. F.: J. Biol. Chem. 145, 131 (1945).
- [5] Kempe L. L., Halvorson H. O., Piret E. L.: Ind. Eng. Chem. 42, 1852 (1950).
- [6] Finn R. K., Halvorson H. O., Piret E. L.: Ind. Eng. Chem. 42, 1857 (1950).
- [7] Windisch F., Haehn H., Heumann W.: Z. Naturforsch. 8B, 453 (1953).
- [8] Bolcato V.: Ind. saccharifera It. 22, 427 (1929).
- [9] Kempe L. L., Gillies R. A., West R. E.: Appl. Microb. 4, 175 (1956).
- [10] Krumphanzl V., Dyr J.: Sborník VŠCHT, odd. FPT v tisku.
- [11] Cifonelli J. A., Smith F.: Anal. Chem. 26, 1132 (1954).
- [12] Tomiček O.: Odměrná analýza, Praha 1949.
- [13] Pochobradský: Kvasný průmysl 5, 68 (1959).

Došlo do redakce 3. 6. 1963.