

"Ince S.Y.P.R.I.S."
nr. 1/51

B. CHECHELSKA, T. URBĄŃSKI

Badanie wywarów po fermentacji acetonowo-butanolowej na zawartość riboflawiny i możliwość jej otrzymywania

STRESZCZENIE

Przeanalizowano wywar otrzymany po oddestylowaniu zacierów z fermentacji acetonowo-butanolowej na zawartość riboflawiny, w którym nie stwierdzono obecności riboflawiny.

Celem stwierdzenia, czy przyczyną nieobecności riboflawiny jest zawartość żelaza w zacierach melasowych, przygotowano wywar otrzymany z fermentacji zacierów z mąki jęczmiennej, który nie zawierał żelaza. I w tych warunkach nie stwierdzono obecności riboflawiny. Wyprowadzono wniosek, że przyczyną nieobecności riboflawiny w wywarach jest szczep *Clostridium acetobutylicum* stosowany w wytwórni, który nie jest zdolny do biosyntezy riboflawiny.

*

Riboflawina — laktoflawina — witamina B₂ ma duże znaczenie dla celów leczniczych i odżywczych. Ponieważ synteza jej na drodze chemicznej następuje sporo trudności i jest kosztowna, poszukiwano od dawna naturalnych źródeł w świecie roślinnym. Wiadome było, że riboflawina występuje w tkankach roślinnych i zwierzęcych^{12, 13, 25, 26, 27, 50}). Znaczenie przemysłowe uzyskało jednak dopiero odkrycie, że przy fermentacji acetonowo-butanolowej tworzy się w odpowiednich warunkach witamina B₂. Znalezione najkorzystniejszych warunków pozwoliło zwiększyć wydajność riboflawiny tak znacznie, że uczyniło to wydobywanie jej opłacalnym. Literatura tematu obejmuje prawie wyłącznie patenty, dostępne tylko w lakonicznych skrótach, kryjących zapewne wiele ważnych szczegółów.

Fermentację prowadzą mikroorganizmy, a więc bakterie: *Clostridium acetobutylicum*^{38, 42, 49}), drożdże: *Eremothecium ashbyii*^{6, 10, 14, 17, 36}), *Ashbya gossypii*^{10, 48}), *Candida flareri*^{29, 47}), *Candida Guilliermondia*^{29, 47}). Fermentację prowadzono na różnego typu pożywkach i starano się przez dodawanie pewnych substancji względnie usuwanie wpłynąć korzystnie na produkcję riboflawiny. Jako pożywki stosowano: ryż⁴⁹), zboże, kukurydzę, melasę⁴⁰), kartofle¹¹), zbierane mleko, serwatke^{32, 33, 34, 35}). Do pożywek dodawano: soli nieorganicznych np. siarczan amonu, magnezu^{2, 46}), fosforany^{2, 46, 29}); materiały bogate w proteiny⁴⁰) jak: pepton, albumina, jajka, mąka rybia, skrawki mięsa, skóry⁶); lipoidy: oleje roślinne, fasy olejowe, lécytyna^{6, 42}) cukry (syrop zbożowy⁴⁰); aminokwasy⁴²), asparagina, mocznik; biotyna^{2, 29}). Najkorzystniejsze pH waha się dość znacznie, przeważnie w granicach 5—7,5^{10, 14, 45, 46}), niektórzy podają niższe jednak (pH — 3—3,5)²⁹) i wyższe (pH — 9)^{6, 42}).

Metale jak Fe, Ni, Co, Cu, Pb i Zn hamują biosyntezę riboflawiny^{1, 3, 11, 43}). Stwierdzono decydujący wpływ żelaza na wydajność riboflawiny. Nawet minimalna zawartość żelaza w pożywce redukuje wydajność riboflawiny. Kadzie fermentacyjne żelazne obniżają zawartość riboflawiny, również naczynia i przewody żelazne, z którymi zacier się stykał wywierają wyraźny ujemny wpływ¹¹). Maksymalna dopuszczalna zawartość żelaza w pożywce nie może przekraczać 40—60 γ /l²⁹).

Wytłumaczenie wpływu żelaza na biosyntezę riboflawiny było przedmiotem badań. A. Leviton stwierdził,³⁰) że riboflawina, która w czystych roztworach jest nadzwyczaj

trwała wobec działania nadtlenu wodoru, rozkłada się szybko w rozcieńczonych roztworach nadtlenu wodoru w obecności śladów jonów żelazowych. Szybkość rozkładu wzrasta gwałtownie w granicach tych stężeń, przy których zachodzi gwałtowna redukcja wydajności ryboflawiny w syntezie mikrobiologicznej. Opatentowano dodawanie różnych związków inaktywujących jon żelazowy jak np. 2,2' — dwupirydył^{18, 19}), hydrosulfit sodowy, katalaza³¹).

Aby uniknąć żelaza w aparaturze stosuje się kadzie z mas plastycznych²⁹), wykładane aluminium^{1, 29}) lub szkłem²⁹).

Ważne jest dobre napowietrzenie cieczy podczas fermentacji^{29, 45, 46}). Optymalne wydajności riboflawiny w procesach fermentacyjnych prowadzonych na skalę techniczną wynoszą 300—400 γ /ml pożywki^{14, 29, 45}).

Wyodrębnienie riboflawiny z wywarów nastęczało niemało trudności. Riboflawina jest na ogół źle rozpuszczalna. Najlepiej rozpuszcza się w wodzie, ale tylko w ilości 12 mg w 100 g wody w 27,5°C. Rozpuszczalność wzrasta po dodaniu do wody mocznika lub kwasu bornego, z którymi riboflawina tworzy kompleks. Rozpuszczalność riboflawiny w alkoholu metylowym wynosi 4,5 mg w 27,5°C. Nie rozpuszcza się w typowych rozpuszczalnikach organicznych jak: aceton, eter, benzen, chloroform. Dobrze rozpuszcza się w roztworach alkalicznych, ale zachodzi równocześnie szybki jej rozkład. Z innych utrudniających wyodrębnienie i oczyszczenie riboflawiny należy wymienić dużą wrażliwość riboflawiny na światło; pod wpływem światła riboflawina rozkłada się nieodwracalnie, tracąc aktywność witaminy. Riboflawina posiada względnie dużą odporność na temperaturę: ogrzewając riboflawinę w 120°C w ciągu 6 godzin stwierdzono tylko minimalny rozkład.

Z materiałów roślinnych ekstrahuje się riboflawinę wodnymi roztworami kwasów lub mieszaninami wodno-alkoholowymi, z wywarów pofermentacyjnych wodnych — alkoholem butylowym (nasyconym wodą)^{24, 26}). Po ekstrakcji następuje kombinacja różnych metod wytrącań i adsorpcji.

Do wytrącania stosowano: octan ołowiu, kwas fosfortungstenowy w 1 n H₂SO₄, następnie ekstrakcję osadu alkoholem amylovym. Azotan srebra i siarczan rtęci nie wytrąca witaminy w roztworze kwaśnym, azotan srebra wytrąca riboflawinę tylko w roztworze neutralnym.

Do adsorpcji riboflawiny stosowano: ziemię Fullera w roztworze kwaśnym^{12, 23}) (HCL^{25, 26}), Supersorb (w specjalny sposób preparowana ziemia Fullera)⁷) frankonit^{26A}) w roztworze neutralnym (rodzaj ziemi odbarwiającej) florisil⁴¹) — uwodniony żel krzemionkowy, askanit⁸), węgiel aktywny (noryt)¹⁵). Ostatnio zastosowano do adsorpcji riboflawiny syntetyczne żywice, jak żywica do wymiany kationów KH 9, amberlit IR 100¹⁶). Lepiej niż wolna riboflawina adsorbują się jej estry: octan, fosforan, jednobursztynian⁴¹), tak np. tlenek glinu nie adsorbuje riboflawiny, ale acetylowane flawiny adsorbują się na tlenku glinu²⁷). Do wymywania zaadsorbowanej riboflawiny używano: mieszaniny metanolowo-wodne, pirydynowo-wodne^{25, 26}), rozcieńczony amoniak²⁵), kwas octowy, mieszaniny pirydyny z kwasem octowym^{12, 13, 16}). Stosowano także niższe wielowodorowe alkohole i ich estry, jak gli-

ceryna, glikol, jedno-metylowy i jedno-etylowy, eter glikolu etylenowego⁸⁾. Przy wymywaniu stosuje się zwykle temperaturę pokojową, niekiedy wyższą, do 100°⁸⁾. Interesującą metodą oczyszczania riboflawiny jest wytrącanie z roztworów zawierających riboflawinę związków o nieustalonej budowie zwanego prekursorem riboflawiny. Wytrącanie przeprowadza się za pomocą środków redukujących jak $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, TiCl_3 , SnCl_2 , VSO_4 , CrCl_2 i CrSO_4 ^{5, 9, 21, 37)}. Zamiast chemicznych środków redukujących można również wykorzystywać bakterie redukujące, zdolne do wytworzenia w roztworze odpowiedniego potencjału redukcyjnego. Stosowano w tym celu z powodzeniem kilkanaście gatunków bakterii jak np. *Streptococcus zymogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus liquefaciens*^{4, 22)}. Prekursor łatwo przekształca się w riboflawinę.

Celem niniejszej pracy była próba otrzymania riboflawiny z wywarów po fermentacji acetonu-butanolowej z fabryki w Raciborzu, otrzymywanych jako produkt odpadkowy przy fabrykacji acetonu i butanolu.

Przed przystąpieniem do opracowania metody wydobywania riboflawiny z wywarów pofermentacyjnych należało zbadać zawartość w nich riboflawiny.

W tym celu ustalono na podstawie literatury następującą metodykę badań: 3—4 l wywaru wytrąsano z 1—2 l butanolu przez 24—28 godzin. Otrzymano po oddzieleniu od gęstej warstwy wodnej roztwór butanolowy koloru żółto-czerwonego, z którym przeprowadzono następujące próby:

1. Roztwór butanolowy zagęszczono pod próżnią, pozostałość rozpuszczono w wodzie, zakwaszono HCl i wytrąsano z ziemią Fullera. Ziemię Fullera odsączono i wymywano przez kilkunastogodzinne wytrąsanie z roztworem pirydyny i kwasu octowego w wodzie. Ziemię Fullera odsączono, roztwór zagęszczono pod próżnią, pozostałość rozpuszczono w wodzie, roztwór wodny ekstrahowano kilkakrotnie eterem (dopóki eter się barwi), zagęszczono pod próżnią, rozpuszczono w wodzie, zadano acetonem, pozostawiono do drugiego dnia, przesączono, aceton oddestylowano i roztwór odparowano w próżni.
2. Roztwór butanolowy zagęszczono pod próżnią do $\frac{1}{10}$ objętości, wlało 10 objętości wrzącego acetonu, wytrącony osad odsączono, aceton oddestylowano, ciecz stężono pod próżnią $\frac{1}{80}$ objętości pierwotnego roztworu acetonowego do pozostałości dodano równą objętość acetonu i wstawiono do lodówki. Po kilku dniach wytrącono osad odsączono i próbowano przekrystalizować z gorącej wody.
3. Roztwór butanolowy przepuszczono przez kolumnę chromatograficzną z tlenkiem glinu. Roztwór butanolowy po adsorbacji jest koloru jasno-żółtego, butanol oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem i postępowano dalej, jak w p. 1. Rurę chromatograficzną przemyto mieszaniną wody, metanolu i pirydyny. Zaadsorbowany na tlenku glinu brązowy pigment prawie się nie wymywa. Eluat odparowano w próżni.
4. Roztwór butanolowy gotowano z węglem aktywowanym. Węgiel aktywowany odsączono i wyekstrahowano roztworem metanolu i pirydyny w wodzie. Ekstrakt odparowano w próżni, pozostały po odsączeniu węgla roztwór butanolowy zagęszczono w próżni pod zmniejszonym ciśnieniem i postępowano dalej, jak w p. 1.

5. Roztwór butanolowy przepuszczono przez kolumnę chromatograficzną z uwodnioną krzemionką. Krzemionkę wymyło roztworem wodnym pirydyny i kwasu octowego. Eluat oddestylowano pod próżnią.
6. Roztwór butanolowy wykłócono kilkakrotnie wodą. Jasny, żółtawy (prawie bezbarwny) roztwór zagęszczono pod próżnią.
7. Roztwór butanolowy zagęszczono pod próżnią, pozostałość rozpuszczono i wytrąsano przez parę godzin z żywicą wymieniającą kationy (f-my ang. Light). Żywicę odsączono i wypłukiwano przez wytrąsanie z roztworem wodnym pirydyny i kwasu octowego. Eluat zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozcieńczono wodą i gotowano z węglem aktywnym, węgiel przemyto i eluat zagęszczono pod próżnią.
8. Roztwór butanolowy zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do $\frac{1}{10}$ objętości, dodano równą objętość eteru naftowego, pozostawiono do następnego dnia. Osad odsączono, rozpuszczono na gorąco w wodzie, dodano 10 obj. wrzącego acetonu, ciecz zdekantowano, zagęszczono do $\frac{1}{80}$ obj. roztworu acetonowego dodano równą objętość acetonu i wstawiono do lodówki. Po kilku dniach osad odsączono.

Otrzymane według powyższych metod (od 1 do 8) osady badano na zawartość riboflawiny. Żadna ze zbadanych prób nie dała pozytywnego wyniku, tj. nie stwierdzono w nich obecności riboflawiny. Otrzymane osady były lepkie, maziste, bądź rozplywające się w powietrzu, zaś roztwory wodne nie dawały barwnych reakcji, charakterystycznych dla riboflawiny.

Wobec otrzymania ujemnych wyników z wywarem raciborskim, przypuszczaliśmy, że rezultat ten jest spowodowany zbyt dużą zawartością żelaza w zacierach melasowych, poddawanych fermentacji. Dla potwierdzenia tego przypuszczenia przygotowano próbne wywary po fermentacji butanolowej zacierów sporządzonych:

- a. z mąki jęczmiennej (6% zacier) w naczyniach miedzianych, pocynowanych; zagęszczenie wywaru przeprowadzono w naczyniach wyłożonych ołowiem;
- b. z mąki jęczmiennej w kolbach szklanych zagęszczanie wywaru przeprowadzono w parownicach porcelanowych.

Wywary te (a i b) poddano analogicznym badaniom na zawartość riboflawiny, jak i wywar raciborski. I w tym wypadku otrzymano wyniki ujemne. Żaden z próbnych wywarów, w których obecność żelaza była wykluczona, nie wykazał obecności riboflawiny.

Z powyższych badań nasuwa się wniosek, że przyczyną nieobecności riboflawiny w badanych wywarach jest stosowany w fabryce raciborskiej szczep *Clostridium acetobutylicum*, który jest niezdolny do biosyntezy riboflawiny.

Ponieważ jednak głównym celem fabryki raciborskiej jest produkcja acetonu i butanolu, zaś różne szczepy *Clostridium acetobutylicum* w stosunku do przeprowadzonej fermentacji są bardzo kapryśne, należy do zagadnienia otrzymywania riboflawiny z wywarów pobutanolowych podchodzić bardzo ostrożnie. Dopiero wyczerpujące badania laboratoryjne nad wyhodowaniem szczepu syntezującego riboflawinę i dającego dobre wydajności acetonu i alkoholu butylowego mogłyby upoważnić do zmiany procesu w kierunku otrzymywania wywarów nadających się do otrzymywania z nich riboflawiny.

LITERATURA

Monografie ogólne:

1. H. R. Rosenberg: Chemistry and physiology of the vitamins Interscience. New York 1945.
2. F. Bicknell, F. Prescott: The vitamins in medicine — W. Heinemann, London, 1947.
3. H. Vogel: Chemie und Technik der Vitamine. Stuttgart 1940.
4. W. A. Dewiatnin: Vitaminy. Moskwa, Piszczepromizdat 1948.
5. B. A. Kudriaszow: Biologiczskie osnovy uczenia o witaminach. Moskwa, Swietkaja nauka 1948.

Prace:

1. Arsberger C.: U. S. 2326425. Chem. Abstr. **38**, 617 (1944).
2. Burkholder P.: U. S. 2363227. Chem. Abstr. **39**, 3416 (1945).
3. Comm. Solv. Corp. Brit. 553904. Chem. Abstr. **38**, 6044 (1944).
4. Comm. Solv. Corp. Brit. 621469. Chem. Abstr. **43**, 7190 (1949).
5. Comm. Solv. Corp. Brit. 621552. Chem. Abstr. **43**, 7190 (1949).
6. Comm. Solv. Corp. Brit. 623082. Chem. Abstr. **43**, 6782 (1949).
7. Conner R. T., Straub G. J.: Ind. Eng. Chem. Anal. **13**, 385 (1940).
8. Dale J. K.: U. S. 2343254. Chem. Abstr. **38**, 3093 (1944).

9. Dale J. K.: U. S. 2421142. Chem. Abstr. **41**, 5692 (1947). Brit. 621468.
10. Deseive E.: Chem. Abstr. **42**, 2310 (1948).
11. Dyr. J. Bramboravstvi a Průmysl: **1**, 1950.
12. Ellinger P., Koschara W.: Ber. **66**, 315 (1933).
13. Ellinger P., Koschara W.: Ber. **66**, 811 (1933).
14. Forster J.: Brit. 593027. Chem. Abstr. **42**, 1710 (1949).
15. Frieden E., Mitchell H., Williams P.: J. Am. Chem. Soc. **66**, 269 (1944).
16. Fujiwara M., Shimizu H.: Ind. Eng. Chem. Anal. **21**, 1009 (1949).
17. Grob E. C.: Chem. Abstr. **43**, 1457 (1949).
18. Hickey R.: Chem. Abstr. **40**, 3495 (1946).
19. Hickey R.: U. S. 2425280. Chem. Abstr. **41**, 6668 (1947).
20. Hildebrandt F. M.: Advances in Enzymology **7**, 557 (1947).
21. Hines G.: U. S. 2367644. Chem. Abstr. **39**, 3399 (1945).
22. Hines G.: U. S. 2387023. Chem. Abstr. **40**, 428 (1946).
23. Keenan L. G.: Chem. Abstr. **38**, 1005 (1844).
24. Keresztes J. C., Riches: U. S. 2355220. Chem. Abstr. **38**, 6488 (1944).
25. Kuhn R.: Ber. **66**, 317 (1933).
26. Kuhn R.: Ber. **66**, 579 (1933) 26A. R. Kuhn: Ber. **66**, 1034 (1933).
27. Kuhn R., Kaltschmitt H.: Ber. **68**, 128 (1935).
28. Legg D., Beesch S.: U. S. 2370. 177. Chem. Abstr. **39**, 4430 (1945).
29. Levine H., Oyaas J., Wasserman L.: Hoogerheide J. Stern J. Ind. Eng. Chem. **41**, 1665 (1949).
30. Leviton A.: J. Am. Chem. Soc. **68**, 835 (1946).
31. Leviton: U. S. 2447812. Chem. Abstr. **43**, 8106 (1949).
32. Meade R., Rodgers N.: U. S. 2369680. Chem. Abstr. **39**, 4716 (1945).
33. Meade R., Rodgers N.: U. S. 2433063, 4. Chem. Abstr. **42**, 3906 (1948).
34. Meade R., Rodgers N.: U. S. 2433232. Chem. Abstr. **42**, 3906 (1948).
35. Meade R., Rodgers N.: U. S. 2449140, 1, 2, 3. Chem. Abstr. **42**, 9071 (1948).
36. Merck Co.: Brit 621401. Chem. Abstr. **43**, 7189 (1949).
37. Millan Mc.: U. S. 2367646. Chem. Abstr. **39**, 3400 (1945).
38. Miner C.: U. S. 2202161. Chem. Abstr. **34**, 6776 (1940).
39. Pasternak R., Brown C.: U. S. 2324800. Chem. Abstr. **38**, 221 (1944).
40. Piersma H.: U. S. 2400710. Chem. Abstr. **40**, 4484 (1946).
41. Rubin S., De Ritter E.: Chem. Abstr. **39**, 3803 (1945).
42. Rudert F. J.: U. S. 2374503. Chem. Abstr. **39**, 3116 (1945).
43. Sebek O.: Chem. listy **41**, 238 (1947).
44. Silcox H. E.: Ind. Eng. Chem. **40**, 1603 (1948) **41**, 1872 (1949).
45. Stiles H.: U. S. 2483. 855. Chem. Abstr. **44**, 2698 (1950).
46. Tabekin B.: U. S. 2493274. Chem. Abstr. **44**, 2698 (1950).
47. Tanner F., van Lanen: U. S. 2424003. Chem. Abstr. **41**, 6368 (1947).
48. Tanner F., van Lanen: U. S. 2445128. Chem. Abstr. **42**, 6496 (1948).
49. Walton M.: U. S. 2368074. Chem. Abstr. **39**, 3878 (1945).
50. Warburg O., Chirstian W.: Chem. Zentr. 1934, I. 401.

СОДЕРЖАНИЕ

По данным литературы во время ацетон-бутилового брожения происходит биохимический синтез витамина B₂ (рибофлавина).

В настоящей работе исследовано барду после ацетон-бутилового брожения, полученную из фабрики, производящей ацетон и бутиловый спирт методом брожения наточных заторов, на содержание рибофлавина.

Барду экстрагировано бутиловым спиртом. Полученный раствор в бутиловом спирте, после отделения густого водяного слоя, подвергнуто исследованию на содержание рибофлавина, применяя 8 разных методов. Ни в одном случае рибофлавина не обнаружено.*

Для подтверждения, что причиной отсутствия рибофлавина может быть присутствие железа в наточных заторах, приготовлено барду после брожения заторов из ячменной муки. Затор был приготовлен в луженных или стеклянных посудах. И в этих бардах не обнаружено присутствия рибофлавина.

Авторы пришли к заключению, что причиной отсутствия рибофлавина в бардах является применяемый на заводе штамм *Clostridium acetobutylicum*, который не способен к биосинтезу рибофлавина.

SUMMARY

According to the literature, acetone — butanol fermentation produces a certain amount of vitamin B₂ (riboflavin).

The authors examined the vinass from a factory producing acetone and butanol from beet molasses, as to the presence of riboflavin.

The vinass was shaken with butanol. The butanol layer was separated and was examined. Eight different methods were tried, but none discovered the presence of riboflavin.

Following these results, an attempt was made to find whether the presence of iron in the mash was responsible for the absence of riboflavin. Therefore the mash was prepared of oats meal in tinned or glass vessels. The fermental material did not contain riboflavin either.

A conclusion was drawn that the strain of *Clostridium acetobutylicum*, used by the factory, is incapable of bio-synthesising riboflavin.