

Warszawa, 10 marca 1933 r.

2

C12d 3/02

URZĄD PATENTOWY



RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 17665.

Kl. 12 o 10.

Deutsche Hydrierwerke Aktiengesellschaft
(Berlin - Charlottenburg, Niemcy).

Sposób wytwarzania butanolu i acetonu przez fermentację.

Zgłoszono 15 grudnia 1928 r.

Udzielono 10 grudnia 1932 r.

Pierwszeństwo: 22 października 1928 r. (Niemcy).

Do otrzymywania butanolu i acetonu z surowców, zawierających skrobię lub cukier, proponowano i stosowano dotychczas cały szereg bakteryj, a więc np. *bacillus butylicus* Fitz (pat. niem. 323533), *bacillus Weizmann* (pat. niem. 445982), *bacillus butylicus* Boinot-Firmin (pat. niem. 372762), *bacillus acetobutylicus* (pat. amer. 1.427.595), *bacillus butyloaceticus* (pat. amer. 1.537.597), *Clostridium butyricum* Prazmowski — Fike — Smyth (pat. amer. 1655435) oraz liczne bakterje z grupy *amylobacter* (pat. ang. 164,023).

Praktyka sposobu niniejszego polega na tem, że miesza się dokładnie niewielkie próbki świeżego nieprzefermentowanego zacieru z 1 — 2% butanolu i szczepi je następnie materiałami zawierającymi odpowiednie bakterje (jakoto ziarna zbożowe, otręby, ziemia, owoce, nawóz i t. d.). Dodatek butanolu zapobiega wzrostowi wszelkich zarodków niewytrzymałych na jego działanie, nie przeszkadzając wzrostowi tych, jakie zamierzamy hodować. Fermentują nieledwie wszystkie próbki, wybiera się jednak te tylko, które fermentują najsil-

niej i zawierają dobrze wykształcone drobne bakterie w postaci laseczek. Najlepsze próbki służą następnie do szczepienia nowych próbek zacieru, zmieszanych również z butanolem. Dobór i szczepienie dalsze powtarza się aż do osiągnięcia kultur najbardziej wydajnych

Obecnie udało się otrzymać grupę bakterij, która od wszystkich wymienionych oraz gdzie indziej opisanych gatunków różni się zarówno pod względem morfologicznym jak i biologicznym, zwłaszcza zaś różni się pod względem sprawności. Tę grupę bakterij, zwaną w dalszym ciągu grupą butylobakter, można scharakteryzować w następujący sposób.

Bakterie grupy butylobakteru tworzą komórki wegetatywne o długości około 2—3 mikronów i średnicy $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$ mikrona. W przeciwieństwie do wszystkich powyższych gatunków komórki te w normalnych warunkach nie tworzą łańcusczków, ani nitek. Są to fakultatywne anaeroby. Na płytkach rozwijają się one jedynie w warunkach anaerobiotycznych. Bardzo charakterystyczne jest zabarwienie odczynnikami Grama; gdy 5% zacier zbożowy zaszczerpić zarodnikami, to młode komórki barwią się z początku gram-dodatnio (niebiesko). Jednakże po 24 godz. stają się stopniowo czerwono-fioletowe, później z godziny na godzinę coraz czerwieniejsze, a po upływie 42 godz. stają się zupełnie gram-ujemne (czerwone). Zabarwienie to zachowują przez 1 do 3 godzin, poczem znowu przybierają barwę czerwono-fioletową, a po 48 godz. znowu są całkowicie gram-dodatnie (niebieskie).

Tworzenie zarodników następuje po 24 godz.; zarodniki leżą mimośrodowo i mają kształt cylindrów o długości 1 mikrona i średnicy $\frac{1}{2}$ do $\frac{2}{3}$ mikrona.

Dalej bardzo charakterystyczna jest wydajność (sprawność) fermentacji w stężonych zacierach. Dotychczas opisywane

gatunki bakterij mogą przefermentować 5%-owy do 8%-owy zacier kukurydzany z wydajnością około $\frac{1}{3}$ zawartości skrobi. Natomiast butylobakter może przefermentować 12 — 14%-owy zacier kukurydzany z wydajnością 40 — 43% obecnej skrobi, a więc przy podwójnem prawie stężeniu zwiększa wydajność o 33%. Dzięki podwojeniu stężenia przy fermentacji prowadzonej zapomocą butylobakteru otrzymywanie butanolu i acetonu wymaga zużycia tylko połowy pary i energii. Ze względu na wyższą wydajność butylobakteru zwiększa się wartość praktyczna procesu prawie dwukrotnie.

Dalszą cechą charakterystyczną grupy butylobakteru jest zdolność dostosowania się każdorazowo do surowców, przeznaczonych do fermentacji. Np. odmiana otrzymana z kukurydzy (*Butylobacter zeae* Bakonyi) po 4 — 5 przeszczepieniach na stężony zacier ziemniaczany w przerwach 24 godzinnych wykazuje obfite wytwarzanie zarodników oraz taką samą siłę fermentacyjną, jak w zacierach kukurydzanych. Również w trudno fermentujących surowcach, np. w rozcieńczonej melasie z trzciny cukrowej (blach strap) bez dodatku pożywek, po 4 przeszczepieniach występuje silna fermentacja i obfite wytwarzanie zarodników.

Otrzymywanie butylobakteru odbywa się w sposób poniżej podany, a do wykonania tego sposobu można zastosować zwykłą technikę bakterjologiczną. Ponieważ jednak butylobakter nie wszędzie jest rozpowszechniony, zaleca się stosować metodę hodowli Bakonyi'ego, polegającą na tem, że dzięki stałej obecności 1 — 2% butanolu zapobiega się rozwojowi bakterij mniej odpornych. Otrzymywanie butylobakteru sposobem Weizmann'a (pat. niem. Nr 445982) jest niemożliwe, ponieważ zarodniki butylobakteru są nadzwyczaj wrażliwe na ogrzanie, znacznie wrażliwsze niż zarodniki

wszelkich innych dotychczas znanych gatunków. Ogrzewanie do 100°C, przepisane przez Weizmann'a, dzieła szczególnie szkodliwie; zarodniki przeważnie obumierają, a użyte do fermentacji powodują fermentację bardzo powolną i z niewielką wydajnością. Prócz tego jako materiał wyjściowy należy dobrać odpowiednie podłoże dla bakteryj. Dotychczas udało się otrzymać cztery odmiany butylobakteru.

1. *Butylobacter Zeae* Bakonyi, otrzymany z kukurydzy węgierskiej (1924)

2. *Butylobacter betae* Bakonyi, otrzymany z niemieckich buraków pastewnych (Okręg Zerbst, 1928)

3. *Butylobacter sinenae* Bakonyi, otrzymany z pomarańczy jaffskich (1928)

4. *Butylobacter solani* Bakonyi, otrzymany z niemieckich ziemniaków (Okręg Zerbst, 1928).

Natomiast nie udało się otrzymać butylobakteru z niemieckiej kukurydzy, ponieważ znajduje się on przypuszczalnie tylko na owocach, zbieranych na dobrych glebach humusowych, albo na częściach roślin stałe stykających się z glebą (buraki, ziemniaki).

Na dno wyjałowionej rurki, długości około 40 cm, wprowadza się wzięty aseptycznie kawałek materiału wyjściowego, następnie pokrywa warstwą grubości około 20 cm 5%-owego świeżego nieprzefermentowanego odwaru zbożowego, zawierającego 1 — 2% butanolu, poczem rurki, z których wypompowano powietrze, utrzymuje się w temperaturze 37°C około 24 godz. W razie obecności butylobakteru lub innego czynnika fermentacyjnego w rurkach ujawnia się żywa fermentacja. Dzięki dodatkowi butanolu można rozróżnić pod mikroskopem następujące bakterje.

1. Grube pałeczki, t. j. rozmaite *Strepto-pałeczki*, bakterje kwasu masłowego; brak jednak bakteryj siennych oraz bakte-

ryj z grupy macerans, albowiem bakterje te w obecności butanolu nie mogą się rozwijać, jak to stwierdzono doświadczalnie.

2. Cienkie pałeczki (*Butylobacter*)

3. Rozmaite kokki.

Jeżeli cienkie pałeczki występują w przeważającej ilości, to można natychmiast próbować rozdzielania poszczególnych gatunków zapomocą zwykłej metody płytek agarowych, w przeciwnym wypadku hodowlę przeszczepia się co 24 godziny na świeży zacier kukurydzowy, zawierający butanol, dzięki czemu gatunki mniej odporne na działanie butanolu szybko giną. Na płytkach *butylobacter* rozwija się jedynie bez dostępu powietrza (anaerobioza) i dzięki następującym cechom charakterystycznym daje się łatwo oddzielić od innych gatunków:

1. Komórki wegetatywne są znacznie krótsze i smuklejsze, niż wszystkie pozostałe dotychczas znane bakterje w fermentacji butanolowo-acetonowej. Nie tworzą one łańcuszków i wykazują wyżej wspomniane bardzo charakterystyczne zabarwienie Gramem (dodatnie, ujemne, potem znowu dodatnie).

2. Zarodniki należą również do najmniejszych, jakie wogóle tworzą bakterje fermentacji butanolowo-acetonowej, są one cylindryczne, gdy zarodniki pozostałych gatunków są ukształtowane owalnie.

Jedynie *Bacillus butylicus* Boinot-Firmin (B. F.) ma zarodniki prawie takiej samej wielkości i kształtu; jednakże *Butylobacter* tworzy tylko jeden zarodnik, *Bacillus Butylicus* B. F. często dwa; *Butylobacter* ma komórki zaokrąglone, B. F. — wielokątne; *Butylobacter* nie tworzy łańcuszków ani nitek jak B. F., a wreszcie *Butylobacter* jest prawie o połowę krótszy i smuklejszy niż B. F. Aby łatwiej stwierdzić tożsamość butylobakteru, przytoczone są na załączonej tablicy zebrane właściwości najbardziej znanych gatunków:

Bacillus Weizmann'a		Bacillus Butyl. B. F.		Bacillus butyloace- ticum		Bacillus aceto- butylicum		Clostridium butyr. Fike-Smyth		Butylobac- ter	
Autor	Weizmann	Boinot	Freiberg	Horton	Fike-Smyth	Bakonyi					
Patent	pat. niem. 445982	pat. niem. 372762	pat. amer. 1537597	pat. amer. 1427595	pat. amer. 1655435						
Komórki	3-3 ¹ / ₂ × 0,3-0,6 μ	3-5×0,4 μ	3-4×0,4-0,6 μ	2-4×1-2 μ	3-10×0,75-1 μ	2-3×0,25-0,3 μ					
Zarodniki	2,2 × 1,2 μ	1-1,2×0,5 μ	2,2×1,2 μ	1,6×1,2 μ	2-2,5×1 μ	1×0,5-0,75 μ					
Kształt komór	zaokrą- głony	wielokątny	zaokrągłony	zaokrą- głony	zaokrągłony	zaokrągłony					
Tworzenie łańc.	występuje	występuje	występuje	występuje	występuje	występuje					niema
Kształt zarodnik.	owalny	cylindrycz- ny	owalny	owalny	owalny	cylindryczny					
Ilość zarodnik.	1	1-2	1	1	1	1					1
Zabarwie- nie Gramem	dodatnie	dodatnie	dodatnie	dodatnie	dodatnie, a potem ujemne	dodatnie, potem ujemne, później znowu dodatnie					

Otrzymywanie butanolu i acetonu przez fermentację zapomocą butylobacteru odbywa się, jak niżej:

10.000 kg zmielonej kukurydzy z dodatkiem dwu lub trzykrotnej ilości wody gotuje się przez 1 do 2 godz. pod ciśnieniem 2 atm i po przedmuchaniu do kadzi fermentacyjnej rozcieńcza się do około 80.000 l. Po ochłodzeniu do 37°C otrzymany zacier kukurydzowy zaszczenia się hodowlą laboratoryjną lub większą ilością poprzedniego zacieru silnie fermentującego. W tym ostatnim przypadku fermentacja rozpoczyna się natychmiast i po 30 — 40 godz. kończy się całkowicie. Utworzone produkty fermentacji: butanol i aceton otrzymuje się w stanie czystym zapomocą destylacji. Wydajność wynosi 2500 — 2700 kg. W taki sam sposób dają się przerabiać wszystkie inne gatunki zbóż, ziemniaki, melasa i podobne materiały.

Przy użyciu melasy, jako materiału fer-

mentującego, wystarcza półgodzinne uprzednie podgrzanie do 100°C zacieru melasowego, aby również i tutaj osiągnąć w opisany sposób zadowalającą fermentację.

Zastrzeżenie patentowe.

Sposób wytwarzania butanolu i acetonu przez fermentację surowców, zawierających skrobię albo cukier, znamienny tem, że jako czynniki powodujące fermentację stosuje się bakterje z grupy Butylobacter, charakteryzujące się tem, że nie wytwarzają łańcuszków, barwią się odczynnikiem Grama naprzód dodatnio, następnie ujemnie, poczem znów dodatnio, i posiadają zarodniki cylindryczne o wymiarach $1 \times 0,75 \mu$, występujące zawsze pojedynczo.

Deutsche Hydrierwerke
Aktiengesellschaft.
Zastępca: M. Skrzypkowski,
rzecznik patentowy.