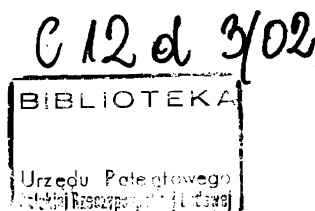


10 grudnia 1928 r.

2

URZĄD PATENTOWY



RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 9107.

Kl. 6 b 16.

Commercial Solvents Corporation
(Terre Haute, Indiana, Stany Zjednoczone Ameryki).

**Sposób otrzymywania uodpornionej hodowli drobnoustrojów
butylo - acetonowych oraz alkoholu butylowego i acetonu.**

Zgłoszono 19 maja 1927 r.

Udzielono 28 czerwca 1928 r.

Pierwszeństwo: 1 października 1926 r. (Stany Zjednoczone Ameryki).

Wynalazek niniejszy dotyczy fermentacji butylo - acetonowej, a przedmiotem jego jest sposób przeprowadzania takiej fermentacji z dobrymi wynikami, nawet w warunkach jej niesprzyjających.

Fermentację butylo - acetonową węglowodanów stosowano w ostatnich latach na wielką skalę w przemyśle, a w tym celu przygotowywano wyjałowiony zacier krochmalowy lub cukrowy i zaszczipiano w nim na ciepło kulturę drobnoustrojów butylo - acetonowych, dzięki czemu następowała fermentacja w temperaturze około 36°C, którą to temperaturę utrzymują rzeżone drobnoustroje podczas fermentacji bez zewnętrznego ogrzewania.

W razie użycia wyjałowionego zacieru

zbożowego o 8-procentowym stężeniu, fermentacja trwa od 36 do 72 godzin, dając ilość cieczy „rozpuszczalnika” stanowiącą około 25% wagi użytego suchego zboża. Rozczynnik otrzymany w ten sposób składa się z alkoholu butylowego, acetonu i alkoholu etylowego. Sfermentowany zacier destyluje się następnie w zwykły sposób celem usunięcia zeń rozczynników zawartych w roztworze wodnym.

Obecnie drobnoustroje butylo-acetonowe można oddzielić i oczyścić zapomocą sposobu Weizmann'a (amerykański patent. Nr 1 315 585). Drobnoustroje butylo - acetonowe nazywane były dotychczas rozmaitemi nazwami, jak np. bacillus amylobacter, clostridium butyricum, bacillus bu-

tyricus, bacillus butylo-aceticum, bacillus aceto-butylicum, clostridium aceto-butylicum i t. d. Drobnoustroje te różnią się od siebie nieco w zależności od sposobów otrzypywania ich hodowli, lecz wszystkie ich zarodniki posiadają wspólne cechy charakterystyczne.

Drobnoustroje butylo - acetonowe odznaczają się głównie tem, że wytwarzają z węglowodanów mieszaninę rozpuszczającą, składającą się z około dwóch części alkoholu butylowego, dwóch części acetonu i niewielkich ilości alkoholu etylowego, przyczem podczas fermentacji wydziela się mieszanina gazowa wodoru z dwutlenkiem węgla. Podczas pierwszego okresu fermentacji kwasowość zacieru wzrasta szybko do takiego stopnia, iż potrzeba od 4 do 6 cm³ 10-normalnego wodorotlenku sodowego na 10 cm³ zacieru. Podczas następnego okresu fermentacji, kwasowość zacieru maleje i w normalnych wypadkach wymaga w końcu fermentacji 2 do 3 cm³ wodorotlenku sodowego. Drobnoustroje butylo - acetonowe działają bezpośrednio na krochmal, którego wobec tego nie trzeba uprzednio przetwarzać na cukier.

Drobnoustroje powyższe nie wymagają do swego rozwoju wolnego tlenu, lecz zwykle stosowane są w praktyce w warunkach aerobowych czyli przy swobodnym dostępie tlenu. Młode komórki wegetatywne zabarwiają się na żółto jodem, lecz następnie, w miarę zbliżania się podziału, przyjmują kształt kłostrydiowy czyli gronowy, poczem zabarwiają się jodem na niebiesko lub fioletowo wskutek obecności granulozy.

Młode komórki roślinne są bardzo ruchliwe (peritrichous flagella). Są one początkowo gramopoztywne, lecz po upływie 18 do 20 godzin stają się gram - negatywnymi.

Czyste kultury drobnoustrojów butylo - acetonowych dają w praktyce przemysłowej rozpuszczalnik w ilości stanowiącej

25% użytego suchego zboża, a w razie fermentowania innych węglowodanów — mniej więcej taką samą wydajność. Przekonano się jednak, że bardzo często wydajność ta zmniejsza się wskutek nienormalnej fermentacji. Znane są dwa różne typy fermentacji nienormalnych, z których jedną nazwano „fermentacją skażoną”, a drugą „fermentacją leniwą”.

Fermentacja skażona powstaje wskutek obecności w zacierze fermentującym obok drobnoustrojów butylo - acetonowych również innych organizmów. Drobnoustroje zwane b. volutans wytwarzają kwas mleczny, w razie ich obecności w zacierze, atakują bardzo czynnie zawarty w tym zacierze węglowodan i zmniejszają lub uniemożliwiają normalną fermentację.

Zdołano już dotychczas zapobiec skażeniu zacieru podczas fermentacji butylo - acetonowej, dzięki czemu można już obecnie uniknąć pojawienia się podczas fermentacji rzeczonych organizmów skażających, drogą odpowiednich ostrożności podczas wyjaławiania i fermentacji, a jeżeli nawet organizmy skażające dostaną się do zacieru, to wtedy można je zniszczyć zapomocą ponownego wyjaławiania lub neutralizacji kwasowości zacieru.

Fermentacja powolna czyli leniwa jest anormalna i niepożądana gdyż zdarza się sporadycznie i bez widocznych przyczyn, przyczem ma zazwyczaj charakter epidemiczny lub nagły.

Jeżeli stwierdzono fermentację leniwą w jednej lub większej ilości naczyń instalacji, użytej do przeprowadzania fermentacji butylo - acetonowej, to w przeciągu 24 godzin pojawiała się ona często w setkach innych niepołączonych ze sobą naczyń rozmaitych rozmiarów, zawierających laboratoryjne hodowle bakterij. Nawet hodowle przechowywane przez długie lata w zamkniętych rurkach w postaci zarodników nie były wolne od „leniwości” po przeniesieniu ich do wyjałowionego zacieru, pod-

czas panowania „epidemji” w instalacji fermentacyjnej.

Fermentacja leniwa odznacza się przede wszystkim długim okresem kwaśności i wielką powolnością w dobieganiu do końca. Epidemja „lenistwa fermentacyjnego” zmniejsza znacznie ilość rozpuszczalników, które można otrzymać we wskazanym czasie zapomocą urządzeń danego rozmiaru i normalnej pojemności, przyczem produkcja podczas takiej epidemji nie osiąga zwykłych norm i jest narażona na duże straty.

Powolność jest również doniosłą cechą fermentacji leniwej jak i zmniejszenie się ilości otrzymanych zapomocą tej fermentacji rozpuszczalników. Fermentacje leniwe nie są najczęściej fermentacjami kompletnymi, czyli nie wszystkie węglowodany fermentacyjne ulegają fermentacji, co powoduje straty zarówno na wydajności otrzymanego rozpuszczalnika, jak i na zbyt niem przeciąganiu się fermentacji.

Wynalazek niniejszy polega na sposobie przeprowadzania fermentacji butylo - acetonowej, dzięki czemu unika się strat na czasie i na rozpuszczalnikach, spowodowanych zazwyczaj przez powyższą powolność fermentacji, otrzymując w danej instalacji wydajność równomierną i wyższą od osiągniętych dotychczas.

Wynalazek wyjaśniony jest poniżej na podstawie teorii, na której się opiera, aczkolwiek w gruncie rzeczy należy go odróżniać od samej teorii. Powtarzanie się i charakter epidemiczny rzeczonoego lenistwa fermentacji wskazuje na to, iż jest ono chorobą drobnoustrojów butylo - acetonowych. Warunki przebiegu fermentacji ulegające najpierw wpływowi lenistwa nie są dokładnie znane, jest jednak pewnem, że w razie gdy zacier ulega w jednym naczyniu fermentacyjnem lenistwu fermentacyjnemu, choroba ta pojawia się zazwyczaj nagle w dużej ilości innych naczyń.

Najmniejsze zetknięcie zacieru „leniwego” z innym zacierem zaraża go lenistwem,

Jeżeli próbkę zacieru fermentującego leniwie przefiltrować najpierw przez filtr Buechnera, celem usunięcia wszystkich ciał stałych, a następnie przez filtr Berkefelda, celem usunięcia bakterij, to wtedy jedna kropla otrzymanego przesączu, wprowadzona do zacieru fermentującego normalnie, zaraża go lenistwem. Jeżeli nawet kroplę rzeczonoego przesączu rozcieńczyć milion razy i kroplę tego rozcieńczonego przesączu wprowadzić do zacieru fermentującego normalnie, to i wówczas zaraża się on tem lenistwem fermentacji. Lenistwo to można więc rozprzestrzeniać bez ograniczenia, przenosząc kroplę przesączu Berkefelda z zacieru fermentującego leniwie do zacieru świeżego, a następnie fermentując ten świeży zacier przez 24 godziny i przenosząc otrzymany zeń filtrat Berkefelda do następnego zacieru świeżego i t. d. Takie przenoszenie nie jest w gruncie rzeczy rozcieńczaniem, gdyż „lenistwo fermentacyjne”, bez względu na jego przyczyny, jest równie wyddatne w drugim zacierze, jak w pierwszym.

Na podstawie tych faktów i innych jeszcze, nieprzytoczonych powyżej, można przypuścić, że fermentacja leniwa wywołana jest przez żywe organizmy ultramikroskopijne. Gdyby tak było, to organizmy te mogą być saprofitami czyli bakterjami gnilnemi, żyjącemi w związku z organizmami butylo - acetonowemi, albo też są one paraszytami lub bakterjofagami czyli bakterjożercami.

Stosownie do niniejszego wynalazku, znaleziono sposób uczynienia bakterij butylo - acetonowych odpornemi na epidemję lenistwa fermentacyjnego, dzięki któremu podczas fermentacji węglowodanu otrzymuje się zawsze normalną wydajność rozpuszczalników bez przeszkód ze strony epidemji lenistwa, czyli, opierając się na wymienionej teorii, bez względu na obecność w zacierze ultratrucizn lub bakterjofagów. Osiągnięto to drogą uodpornienia

hodowli drobnoustrojów butylo - acetonowych na działanie ultratrucizn lub na wpływ wszelkich innych czynników, wywołujących leniwość fermentacji, obecnych w zacierze lub w otrzymanym z niego filtracie Berkefelda.

Uodpornienie to osiąga się drogą wielokrotnego wytwarzania nowych kultur butylo-acetonowych w obecności przesączu zacierpniętego z fermentacji leniwej, przy czym hodowle te ogrzewa się i wstrząsa przed każdym zaszczepianiem ich na nowej pożywce.

Uodpornienie drobnoustrojów butylo - acetonowych można wykonać w następujący sposób: przygotowuje się wyjałowiony zacier węglowodanowy w postaci np. 6-cio procentowego zacieru zbożowego i zaszczepia w nim zasiew hodowli drobnoustrojów butylo - acetonowych, a następnie ogrzewa i wstrząsa przez trzy minuty w temperaturze 100°C; poczem dodaje się jedną lub więcej kropel czystej cieczy, otrzymanej z zacieru węglowodanowego, podlegającego leniwej fermentacji butylo - acetonowej, drogą przefiltrowania próbki tego zacieru, najpierw celem usunięcia ciał stałych, a następnie przez filtr Berkefelda celem usunięcia bakterii. Otrzymanemu w ten sposób zacierowi pozwala się potem fermentować w temperaturze około 36°C, przez cztery lub więcej dni, t. j. do chwili rozwinięcia się zarodników. Te kultury zarodnikowe używa się następnie do zaszczepiania świeżego zacieru zbożowego, który ogrzewa się i wstrząsa podobnie jak poprzednio, przez 3 minuty w temperaturze 100°C i traktuje dwiema kroplami przesączu wskazanego poprzednio. Druga fermentacja przebiega podobnie jak pierwsza, poczem dodaje się do niej przesączu i wstrząsa, czyli powtarza proces opisany powyżej. Po wykonaniu około dziesięciu takich procesów, a mianowicie w końcu ostatniego procesu otrzymuje się hodowle w stanie za-

rodników już uodpornione na fermentację leniwą, a jeżeli hodowle te nie są jeszcze uodpornione dostatecznie, to proces powtarza się aż do pożądanego skutku. Chcąc przekonać się, czy hodowle są już uodpornione, należy zaszczepić je w zacierze wyjałowionym, dodając doń jednocześnie kilka kropel przesączu przefiltrowanego przez filtr Berkefelda, i jeżeli następująca potem fermentacja daje normalną wydajność rozpuszczalnika, w normalnym przeciągu czasu, to jest to wskazówką, że rzeczne kultury są całkowicie uodpornione.

Podczas przeprowadzenia takich prób bierze się dla porównania normalne czyli nieuodpornione hodowle do fermentowania normalnego wyjałowionego zacieru węglowodanowego, a następnie bierze się normalne nieuodpornione hodowle do fermentowania wyjałowionego zacieru węglowodanowego, zawierającego przesącz wzięty z zacieru fermentującego leniwie, i otrzymane wyniki porównywa się z wynikami osiągniętymi zapomocą hodowli uodpornionych.

Wyniki osiągnięte zapomocą hodowli uodpornionych przytoczone są w następującej tablicy.

Użyte hodowle.	Ilość procesów użytych do uodpornienia danych hodowli.	Przeciętna ilość rozpuszczalnika otrzymanego z 4 flaszek fermentacyjnych w obecności ultrawirusów (ultratrucizn) po 2 godz.
R 1	10	24,2
R 2	10	25,3
R 3	10	25,8
R 4	10	23,2
M	Zero	6,8
S	Zero	15,8
S'	Zero	19,6
R 1	17	26,3
R 2	17	25,8
R 3	17	26,5
R 4	17	24,9
M	Zero	22,3
S	Zero	18,5
S'	Zero	7,9

Tablica powyższa wskazuje jasno nie tylko na korzyści osiągnięte przez użycie hodowli uodpornionych, lecz również wykazuje, iż proces uodporniania nie przetwarza hodowli o niskiej wydajności na hodowlę o wysokiej wydajności, gdyż np. rodowlę R 4, po uodpornieniu ich, wytwarzają normalną fermentację w obecności ultrawirusów (ultratrucizn), są konsekwentnie mniej wydajne, aniżeli hodowle sąsiednie. Chcąc więc otrzymać dużą ilość rozpuszczalnika, należy uodpornić hodowlę odznaczającą się dużą wydajnością w normalnych warunkach fermentacyjnych.

Należy przytem zauważyć, że chociaż kultury porównawcze (nieuodpornione) wskazane w tablicy dają w obecności ultrawirusa wydajność znacznie mniejszą, aniżeli kultury uodpornione, to jednak faktyczna ilość rozpuszczalnika otrzymywanego zapomocą poszczególnych hodowli nieuodpornionych jest niejednakowa w różnych próbach, a mianowicie hodowla M daje w jednym wypadku wydajność 6,8%, a w drugim wypadku — 22,3%. Ta niepewność wyników charakteryzuje procesy biologiczne. Ważnem jest jednak to, iż hodowle nieuodpornione posiadają wydajność przeciętnie niższą od hodowli uodpornionych.

Podczas uodporniania hodowli ogrzewa się je i wstrząsa przez 3 minuty w temperaturze 100°C, lecz oczywiście temperaturę tę i czas można zmieniać zgodnie z techniką bakterjologiczną. Ogrzewanie i wstrząsanie zapobiega powstawaniu drobnoustrojów w postaci wegetatywnej, pozwalając jedynie rozmnażać się zarodnikom, w celu osiągnięcia tego warunku, wstrząsanie i ogrzewanie można odpowiednio zmieniać.

Jeżeli wprowadzić hodowlę uodpornioną do zacieru węglowodanowego, zawierającego przesącz wzięty z zacieru fermentującego leniwie, to wtedy następuje normalna szybka i całkowita fermentacja

z dużą wydajnością rozpuszczalnika, co stwierdzono podczas laboratoryjnej próby właściwości hodowli uodpornionych w ten sposób. Korzyści wynikające z uodpornienia hodowli zaznaczają się silniej podczas ich stosowania w przemyśle, gdyż fermentacja leniwa jest wówczas niemożliwą.

Przypuszczalny ultrawirus może co pewien czas powodować nadzwyczajną leniwość fermentacji w razie użycia zwykłych hodowli, lecz w razie użycia hodowli uodpornionych wypadki powolności fermentacji nie zdarzają się w praktyce przemysłowej, dzięki czemu fermentację butylo - acetonową można przeprowadzić z dużą wydajnością rozpuszczalników.

Dalsza korzyść wynikająca z zastosowania uodpornionych drobnoustrojów butylo - acetonowych do przeprowadzania fermentacji polega na tem, iż otrzymuje się zawsze wyższą ilość rozpuszczalników, aniżeli w wypadku użycia hodowli nieuodpornionych. W wypadku np. zastosowania w normalnych warunkach fabrycznych kultur nieuodpornionych, ilość rozpuszczalnika, otrzymanego z suchego zboża, dochodziła rzadko kiedy do 24% i to podczas kilkomiesięcznego okresu pracy, zaś przy użyciu kultur uodpornionych, w warunkach fabrycznych otrzymano z suchego zboża wydajność 25% -ową lub wyższą. W związku z tem należy zauważyć, że w praktyce przemysłowej wydajności rozpuszczalnika nie są tak wysokie, jak wydajności otrzymane podczas doświadczeń laboratoryjnych.

Pomiędzy zdolnością hodowli uodpornionych do wytwarzania normalnych ilości rozpuszczalnika z zacieru zawierającego ultrawirusy lub bakterjofagi, powodujące powolność fermentacji, oraz ich zdolnością do dawania wysokich wydajności rozpuszczalnika w praktyce fabrycznej, niezależnie od tego, czy fermentacja jest leniwa lub nie, istnieje prawdopodobnie pewien ścisły związek. Możliwem jest

więc, że w praktyce przemysłowej ultrawirus wywołujący powolność fermentacji jest prawie zawsze obecny, a obecnie epidemie lenistwa fermentacyjnego spowodowane są wzrostem jadowitości ultrawirusów. W pewnych razach jadowitość ta może wywołać tylko słabe obniżenie się wydajności rozpuszczalnika otrzymanego zapomocą hodowli nieuodpornionych bez wytwarzania charakterystycznych objawów fermentacji leniwej.

Aczkolwiek uodpornianie hodowli najlepiej jest wykonać zapomocą pewnej ilości przesączu przez filtr Berkefelda, wziętego z zacieru, o fermentacji leniwej, to jednak można do tego użyć również inny przesącz bakteryjny, a chociaż w celu wprowadzenia jadu można wziąć dowolną część zacieru fermentującego leniwie, to jednak niedobrze jest stosować w tym celu zacier nieprzefiltrowany, ponieważ można przez to wprowadzić zarodki drobnoustrojów postronnych, gdyż przesączu nie pobiera się zazwyczaj z hodowli uodpornionych. Zamiast zboża można użyć wraz z hodowlami uodpornionymi do utworzenia zacieru fermentacyjnego wszelki inny węglowodan fermentacyjny cukrowy lub skrobiowy.

Zastrzeżenia patentowe.

1. Sposób otrzymywania uodpornionej hodowli drobnoustrojów butylo - acetonowych, znamieny tem, iż drobnoustro-

je te zaszczepia się na odpowiedniej pożywce w obecności zacieru fermentującego leniwie, przyczem przed tem zaszczepieniem hodowle wstrząsa się celem zapobieżenia powstawaniu drobniotkich komórek wegetatywnych.

2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tem, że rzeczzone zaszczepianie i wstrząsanie powtarza się wielokrotnie.

2. Sposób według zastrz. 1 i 2, znamieny tem, że zaszczepianie przeprowadza się w obecności przesączu zacieru.

4. Sposób według zastrz. 1 — 3, znamieny tem, że stosuje się zacier węglowodanowy.

5. Sposób według zastrz. 1 — 4, znamieny tem, że drobniotkie komórki wegetatywne usuwa się drogą ogrzewania kultur do 100°C przez 3 minuty.

6. Sposób otrzymywania alkoholu butylowego i acetonu zapomocą hodowli drobnoustrojów butylo - acetonowych otrzymanych w sposób według zastrz. 1 — 5, znamieny tem, iż stosuje się wyjałowiony zacier wraz ze wskazaną hodowlą uodpornionych drobnoustrojów butylo-acetonowych.

7. Sposób według zastrz. 6, znamieny tem, że stosuje się wyjałowiony zacier węglowodanowy.

Commercial Solvents
Corporation.

Zastępca: I. Myszczyński,
rzecznik patentowy.