

HELENA KAKOL, JADWIGA BOGUCKA, HANNA GAJCY

## SYNTEZA WITAMINY B<sub>2</sub> PRZY UŻYCIU SZCZEPU EREMOTHECIUM ASHBYII \*

Z Zakładu Badania Organopreparatów i Witamin Instytutu Leków w Warszawie  
Kierownik Zakładu: mgr J. Iwanowska

Wyodrębnienie w 1879 r. przez Blytha, a w 1925 r. przez Bleyera i Kallmanna flawiny z mleka zapoczątkowało wiele prac poświęconych tej witaminie.

Kuhn, György i Wagner-Jauregg w 1933 r. otrzymali z surowego białka kurzego owoflawinę i w tym samym roku Ellinger i Koschara ekstrahowali laktoflawinę z serwatki mleka krowiego.

Zarówno owoflawina jak i laktoflawina są to barwiki posiadające zieloną fluorescencję, zaliczone ze względu na ich własności do grupy żółtych barwików, znanych już uprzednio pod nazwą liochromów. Dalsze badania wykazały, że hepatoflawina wyodrębniona z wątroby jest identyczna z wyżej wspomnianymi związkami.

Ustalono również, że istnieje pokrewieństwo pomiędzy laktoflawiną a tzw. żółtym fermentem oddechowym, otrzymanym przez Warburga z drożdży. Z laktoflawiny pod wpływem naświetlania powstaje lumiflawina, stanowiąca również produkt rozpadu „żółtego fermentu oddechowego”.

W dwa lata po wyodrębnieniu czystej laktoflawiny, Kuhn i Karrer podali wzór witaminy B<sub>2</sub> oraz jej syntezę.

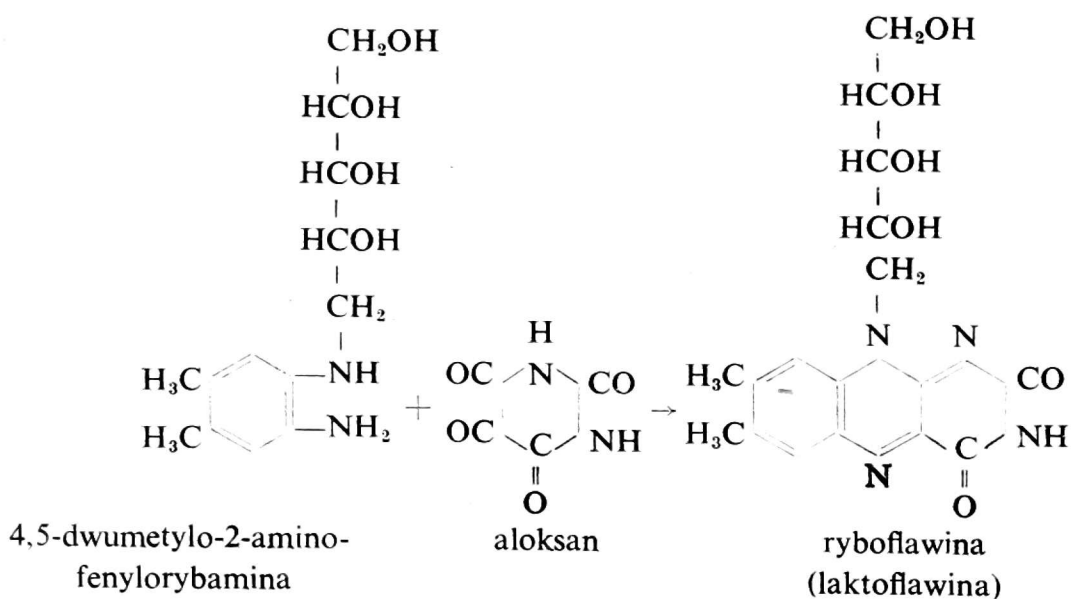
Produkt wyjściowy stanowiła 4,5-dwumetylo-2-aminofenylorybamina, którą kondensowano z aloksanem.

Oprócz tej syntezy opracowano jeszcze kilka innych. Otrzymywanie ryboflawiny na drodze syntezy jest sprawą ważną, ponieważ wyodrębnienie jej z produktów naturalnych, jak drożdże, wątroba, serwatka mleka, które zawierają ją we względnie znacznych ilościach, jest dość kosztowne.

Wiele mikroorganizmów posiada zdolność syntezy ryboflawiny. Spośród bakterii: *Clostridium acetobutylicum*, *Aerobacter cloacae*, *Aerobacter aerogenes* syntetyzują ryboflawinę na płynnych podłożach; spośród

\* Przy pomocy technicznej lab. E. Bańka, W. Rdzanek.

grzybków: *Ashbya gossypii*, *Mycocandida riboflavina*, *Candida guillermonti*, *Candida flareri* oraz *Eremothecium ashbyii* syntetyzują ją na podłożach zarówno płynnych jak i stałych. Znaczna ilość prac została poświęcona grzybkowi *Eremothecium ashbyii* od czasu, kiedy Guillermond w 1935 r. opisał ten grzybek donosząc, że *Eremothecium ashbyii*, pasożyt żyjący na bawełnie, produkuje znaczne ilości barwika dyfundującego do agaru lub żelatyny i zabarwiającego grzybnię na żółto.



Wielu badaczy ustalało wpływ poszczególnych składników pożywki tak na wzrost grzybni *Eremothecium* jak i na syntezę witaminy B<sub>2</sub>. Do ważniejszych prac należą: Schopfera w 1944 r., który usiłując ustalić warunki hodowli *Eremothecium ashbyii* stwierdził, że biotyna stanowi ważny składnik pożywki wzrostowej, podczas gdy tiamina i inositol są czynnikami dodatkowymi oraz, że w peptonie występuje jakiś nieznaną czynnik nieodzownie potrzebny dla wzrostu grzybka. Doświadczenia Schopfera i Guillonda w 1945 r. wykazały, że dodatek lecytyny lub argininy zwiększa wzrost *Eremothecium ashbyii* w podłożu zawierającym biotynę, tiaminę i inositol.

Dulaney i Grutter w 1950 r. donieśli, że inositol jest jedynym ważnym czynnikiem wzrostowym dla *Eremothecium ashbyii*, przy czym źródłem azotu były aminokwasy, jak l-arginina, kwas dl-glutaminowy lub l-prolina, w ilości około 0,1%. Dodatek różnych witamin z grupy B nie wpływał na zwiększenie ilości syntetyzowanej witaminy B<sub>2</sub>.

W tymże roku Mikoura ustalił, że w pewnych warunkach inositol może być zastąpiony przez fitynę.

Yaw w 1952 r. przeprowadziła badanie dotyczące wpływu aminokwasów, między innymi l-waliny, dl-metioniny, l-histydyny, l-argininy i tyrozyny stwierdzając, że histydyna odgrywa ważną rolę w biosyntezie witaminy B<sub>2</sub>.

Roche w 1949 r. podał w patencie pożywkę, w skład której wchodzi:

soczewica, cukier trzcinowy, bursztynian amonu. Hodowla *Eremothecium ashbyii* trwała 7—8 dni w temperaturze 28°. Ilość syntetyzowanej witaminy B<sub>2</sub> wynosiła od 1,78 g do 2,48 g ryboflawiny na 1 litr pożywki.

Hickey w 1953 r. badał wpływ ekstraktu drożdżowego, oleinianu sodu, kazeiny i kwasu glutaminowego, dodawanych w odpowiednich ilościach do pożywki fermentacyjnej. Hickey otrzymywał znaczne ilości witaminy B<sub>2</sub> w granicach od 1000 do 1500 w ml pożywki zawierającej od 0,3% do 2% kazeiny.

Z prac przytoczonych jak i znajdujących się w piśmiennictwie wynika, że dane dotyczące warunków wzrostu *Eremothecium ashbyii* i syntezy witaminy B<sub>2</sub> nie są całkowicie ustalone.

W pracy niniejszej, w szeregu doświadczeń ustalono skład pożywki usiłując otrzymać maksymalną wydajność ryboflawiny.

#### CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Przy prowadzeniu biologicznej syntezy ryboflawiny posługiwano się dwoma szczepami *Eremothecium ashbyii*: angielskim i paryskim, którymi szczepiono równolegle pożywki fermentacyjne. Ponieważ nie zauważono różnicy w wydajności ryboflawiny między tymi szczepami, w opisie pracy nie uwzględniono podziału na szczep paryski i angielski.

*Eremothecium ashbyii* przechowywano na agarze skośnym w lodówce, przeszczepiając go co miesiąc. Przed każdym zaszczepieniem pożywki fermentacyjnej przeszczepiano szczep z agaru skośnego na pożywkę hodowlaną „matkę”, w której umieszczano perełki szklane, w celu lepszego rozdrobnienia grzybni. Skład „matki”: pepton 1%, glikoza 1%, ekstrakt drożdżowy 0,1%, bulion 0,2%, pH — 6,2. Inkubacja „matki” trwała od 24 do 48 godzin. Hodowlę „matki” przeprowadzano w kolbach stożkowych na 300 ml. Po szeregu prób, najkorzystniejszym okazało się wytrząsanie pożywki hodowlanej („matki”) w ciągu trzech dni, w celu zwiększenia ilości grzybni. Do tego celu używano kolb płaskodennych na 750 ml, w których znajdowało się po 100 ml pożywki. Następnie zaszczepiano pożywkę fermentacyjną różnymi ilościami „matki”, lub zagęszczaną grzybnią, otrzymaną przez odwirowanie pożywki hodowlanej. Stwierdzono, że ilość grzybni ma bezpośredni wpływ na wydajność ryboflawiny. Trzęsawka znajdowała się w ciemnym pomieszczeniu o temp. 28°.

#### Podłoża fermentacyjne

Pożywka podstawowa: maltoza 1%, glikoza 1,5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%, NaCl 0,1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,07%, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,5 mg, inositol 3 mg, tiamina 1,5 mg, biotyna 0,07, pH— 6,2.

I. Pożywka podstawowa + ekstrakt drożdżowy 0,01%, kwas glutaminowy 0,95%, l-leucyna 0,6%, asparagina 0,5%, pH = 6,2.

II. pożywka podstawowa + ekstrakt drożdżowy, kwas glutaminowy, l-leucyna, asparagina, pH = 6,2.

III. wg Hickey'a: pożywka podstawowa + kwas l-glutaminowy, kwaśny hydrolizat kazeiny, oleinian sodu, kwas borowy,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , pH = 6,4.

IV.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{NaCl}$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,07%,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,5 mg,  $\text{CaCO}_3$  0,1%, ekstrakt drożdżowy 0,3%, pepton 0,5%, sacharoza 2%, pH = 6,0.

IV.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{NaCl}$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,07%,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,5 mg,  $\text{CaCO}_3$  0,1%, ekstrakt drożdżowy 0,3%, pepton 0,5%, sacharoza 2%, pH = 6,0.

V.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{NaCl}$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,07%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 mg, kazeiny hydrolizat kwaśny 2%, sacharoza 1%,  $\text{CaCO}_3$  0,1%, pH = 6,0.

RI wg Rudert'a: modyfikacja własna:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,07%,  $\text{NaCl}$  0,1%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%, kukurydza 1%, glikoza 2%, pH = 6,8.

RII. wg Rudert'a: modyfikacja własna:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,07%,  $\text{NaCl}$  0,1%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%, soczewica 2%, kazeiny hydrolizat kwaśny 1%, glikoza 2%, pH = 6,8.

RIII. wg Rudert'a: modyfikacja własna:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,07%,  $\text{NaCl}$  0,1%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%, soja 2%, kazeiny hydrolizat kwaśny 1%, glikoza 2%, pH = 6,0.

wg Roch'a: soczewica 2%, cukier inwertowany 0,375%, sacharoza 1,125%, amonu bursztynian 0,5%,  $\text{NaCl}$  0,5%, woda wodociągowa, pH = 6,0.

MWI. wg Roch'a: modyfikacja własna: soczewica 2%, glikoza 2%, sodu bursztynian 0,5%,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5%, woda wodociągowa, pH = 6,0.

MWII. wg Roch'a: modyfikacja własna: soja 2%, glikoza 2%, sodu bursztynian 0,5%,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5%, woda wodociągowa, pH = 6,0.

RoI. wg Roch'a: modyfikacja własna: soja 2%, cukier inwertowany 0,375%, sacharoza 1,125%, sodu bursztynian 0,5%,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5%, woda wodociągowa, pH = 6,0.

RoII. wg Roch'a: modyfikacja własna: kukurydza 2%, cukier inwertowany 0,375%, sacharoza 1,125%, sodu bursztynian 0,5%,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5%, woda wodociągowa, pH = 6,0.

RoIII. wg Roch'a: modyfikacja własna: soja 2%, cukier inwertowany 0,375%, sacharoza 1,125%, sodu bursztynian 0,54%, amonu chlorek 0,48%, kwas askorbinowy 0,5%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



0,07%, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 5 mg%, kazeina lub ekstrakt drożdżowy 1%, pH = 6,8.

*Warunki fermentacji:* Fermentację ryboflawiny przeprowadzano w kolbach stożkowych na 300 i 700 ml oraz w kolbach płaskodennych na 750 ml. Inkubację pożywek fermentacyjnych prowadzono w temp. 28° w ciemni. Czas fermentacji wynosił od 5 do 9 dni. W pierwszym etapie pracy fermentacja miała charakter statyczny. W wyniku przeprowadzanych do-

Tabela 1. Zależność wydajności od sposobu przeprowadzania fermentacji

Rodzaj fermentacji	Rodzaj pożywki	Wydajność γ/ml.
Hodowla statyczna	II	260
Hodowla napowietrzana	II	310
Hodowla wytrząsana	II	1300

świadczeń wyłoniła się konieczność wytrząsania badanych podłoży, w celu łatwiejszego dostępu tlenu do podłoża, jak również mechanicznego rozbicia grzybni. Zmontowano aparaturę do przepuszczania wyjałowionego powietrza przez kolby fermentacyjne. Wydajność ryboflawiny w związku z przewietrzaniem podniosła się o 19%. W końcowym etapie pracy fermentację podłoży przeprowadzano wyłącznie na trzęsawce. Wydajność ryboflawiny podniosła się w związku z tym wielokrotnie.

Tabela 2 Zawartość ryboflawiny, γ/ml w zależności od podłoża fermentacyjnego

Podłoże ferment.	II	III	A	R I	R II	R III	MH I	MH II	R socz.	R soja	RK	R socz. ksz.	R socz. extr. drożdż.	R socz. ksz. wit. C	I	II	III	IV
Zaw. wit. B <sub>2</sub> w γ/ml	1300	700	120	50	230	250	60	120	200	130	70	500	150	330	150	100	300	120

Ilościowe oznaczanie ryboflawiny wykonywano dwoma sposobami. W pierwszym etapie pracy stosowano odczynnik Denigesa, opierając się na powstawaniu pomarańczowo zabarwionego związku ryboflawiny z tlenkiem rtęciowym w obecności kwasu siarkowego. Pomiar wykonywano na kolorymetrze Klett'a. Ilość ryboflawiny mierzono również fluorometrycznie na spektrofotometrze uniwersalnym Colemana. Przed każdym pomiarem ilości ryboflawiny doprowadzano pożywkę fermentacyjną 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do pH = 1,5, autoklawowano przez 30 minut w temp. 121°, a na-

stępnie alkalizowano 20% KOH do  $\text{pH} = 5,5$ . Pożywkę sączo i przygotowywano rozcieńczenia do pomiaru.

Tabela 1 przedstawia ogólną wydajność charakterystyczną dla każdego z rodzaj fermentacji. Jeśli chodzi o hodowlę statyczną i napowietrzaną, to po przeprowadzeniu potrzebnych doświadczeń zaniechano je, ze względu na stosunkowo niską wydajność ryboflawiny.

W dalszym ciągu pracy zajęto się wyłącznie prowadzeniem hodowli pożywek fermentacyjnych na trzęsawce. Do tego celu wyselekcjonowano pożywki, na których uzyskano największą wydajność ryboflawiny.

## EKSTRAKCJA

Po przeprowadzeniu fermentacji i oznaczeniu zawartości ryboflawiny w pożywkach fermentacyjnych, przystąpiono do ekstrakcji ryboflawiny. Ekstrakcję ryboflawiny z pożywek fermentacyjnych przeprowadzano różnymi metodami.

### *I. Ekstrakcja przy pomocy węgla aktywowanego*

Do adsorpcji używano węgla aktywowanego Carbopol nr 2. Adsorpcję przeprowadzano na gorąco przy czym  $\text{pH}$  pożywki musiało wynosić 6,5. Po adsorpcji węgiel suszono i przeprowadzano na gorąco eluację różnymi rozpuszczalnikami jak: 80% acetonem, 20% acetonem z kwasem mlekowym, 10 n HCl z 25% etanolem, 1% formaldehydem, alkoholem oktylowym, izopropylowym, butylowym i metylowym dioxanem i dioxanem z wodą w stosunku 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 na zimno i na gorąco.

### *II. Redukcja ryboflawiny przy pomocy amalgamatu cynku*

Metoda ta miała na celu przeprowadzenie ryboflawiny w pomarańczowo zabarwiony leuko-związek, rozpuszczający się w alkoholu izopropylowym. Przy dostępie tlenu ryboflawina przechodzi z postaci leuko na normalną, którą można otrzymać przez odparowanie alkoholu izopropylowego. Do tego celu zakwaszono pożywkę fermentacyjną z oznaczoną ilością ryboflawiny stężonym HCl i dodawano w odpowiedniej proporcji świeżo przygotowany amalgamat cynku. Redukcję przeprowadzano na gorąco pod chłodnicą zwrotną. Odsączenie zredukowanej ryboflawiny odbywało się w atmosferze azotu. Następnie, przemywano osad gorącym alkoholem izopropylowym, który z kolei odparowywano, otrzymując krystaliczną ryboflawinę.

### III. Ekstrakcja ryboflawiny za pomocą przepuszczania siarkowodoru

Do pożywki fermentacyjnej wlewano odpowiednią ilość zasadowego octanu ołowiawego bezpośrednio przed siarkowodorowaniem. Przepuszczano siarkowodor do momentu odbarwienia się pożywki, a następnie sączono. Sączek wraz z osadem umieszczano w kolbie stożkowej w 100 ml wody destylowanej, po czym dodawano 3% wodę utlenioną do chwili zniknięcia czarnego zabarwienia. Całość sączono i z przesączu wykryształizowano ryboflawinę. Metoda ta dawała bardzo dużą wydajność krystalicznej ryboflawiny z tym jednak, że nie udało się otrzymać kryształków całkowicie wolnych od zanieczyszczeń solami ołowiu.

### IV. Ekstrakcja ryboflawiny mieszaniną acetonu z wodą

Pożywkę fermentacyjną odparowywano do suchości i zalewano odpowiednią ilością mieszaniny acetonu z wodą i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną. Po przesączeniu wyciąg acetonowo-wodny odparowywano do mniejszej objętości, a następnie wyklócano trzykrotnie eterem etylowym, po czym wymywano kilkakrotnie wodą, odparowywano do zmniejszonej objętości i dodawano dziesięciokrotną objętość gorącego acetonu. Po kilku godzinach płyn z nad osadu dekantowano, odparowywano ponownie do zmniejszonej objętości, po czym dodawano wodę i aceton w równych ilościach. Po kilku godzinach wypadały kryształy ryboflawiny. Wydajność tej metody wynosi 80%. Otrzymano żółto-pomarańczowy krystaliczny proszek, nie rozpuszczający się w eterze i chloroformie, słabo rozpuszczający się w wodzie i alkoholu etylowym, dobrze w słabych roztworach alkaliów. Temperatura topnienia 280°. Roztwory ryboflawiny dawały w świetle przechodzącym żółto-zieloną fluorescencję zanikającą pod wpływem ługów i kwasów.

### WNIOSKI

1. W wyniku syntezy biologicznej przy pomocy *Eremothecium ashbyii* otrzymano krystaliczną ryboflawinę.
2. Najwyższą wydajność ryboflawiny wynoszącą 1300  $\gamma$ /ml osiągnięto na II podłożu fermentacyjnym (koncepcja własna).
3. Ustalono optymalne warunki fermentacji jak: inkubacja podłoża fermentacyjnych w ciągu 6 dni, wytrząsanie w ciemni w temperaturze 28°.
4. Opracowano najprostszą i tanią metodę ekstrakcji ryboflawiny z podłoża fermentacyjnego za pomocą mieszaniny acetonu z wodą uzyskując 80% wydajności.

Г. Конколь, И. Богуцка, Г. Гайцы

## СИНТЕЗ ВИТАМИНЫ В<sub>2</sub> ПРИ УПОТРЕБЛЕНИИ ШТАММА EREMOTHECIUM ASHBYII

### Содержание

Авторы в представленной работе занялись выработкой биологической синтеза при помощи грибка *Eremothecium ashbyii*.

Установлено несколько ферментаций, а также условия ферментаций: время „optimum“ температуры и насыщение кислородом и рН основания. Выработано методы „экстракции“ рибофлавина. По выработке физикохимических исследований установлено получение чистой кристаллической vitamins В<sub>2</sub>.

Н. Какол, J. Богуска, Н. Гайцы

## THE SYNTHESIS OF VITAMIN B<sub>2</sub> BY USING EREMOTHECIUM ASHBYII

### Summary

The synthesis of riboflavine by *Eremothecium ashbyii* was worked out. Some mediums and conditions of fermentation as: time, temperature, aeration and medium's pH were established.

The method of riboflavine's extraction was worked out too. It was confirmed by physico-chemical way, that the obtained substance was the pure, cristaline vitamin B<sub>2</sub>.

### PIŚMIENNICTWO

1. Bleyer B., Kallmann: *Biochem. Z.*, 1925, 155, 54.
2. Blyth A. W.: *J. Chem. Soc.*, 1879, 530.
3. Dulaney E., Grutter F. H.: *Mycologia* 1950, 42, 717.
4. Ellinger P., Koschara W.: *Ber.*, 1933, 66, 315, 1411.
5. Guillermond A.: *Compt. Rend. l'Acad. Sci. Paris* 1935, 200, 1556—1558.
6. Hickey R. J.: *Jour. of Bacteriology*, 1953, 66.
7. Karrer W., Salomon H., Schöpp K., Schlitter E.: *Helv. Chim. Acta*, 1934—1936, 17—19.
8. Kuhn R., György P., Wagner-Jauregg T.: *Ber.* 1933, 66, 317, 576, 1034.
9. Kuhn R., Rudy H., Weygand F., Wagner-Jauregg T.: *Ber Dtsch. Chem. Ges.* 1933—1937, 66—70.
10. Roche: *F. P.* 1949, 950057.
11. Rudert F. J.: *A. P.*, 1945, 24, 4, 2374503.
12. Schopfer W. H.: *Helv. Chim. Acta*, 1943, 27, 1017—1032.
13. Schopfer W. H., Guillond M.: *Experientia* 1945, 1, 22.
14. Yaw K. E.: *Mycologia*, 1952, 44, 307.

Otrzymano: 1. 8. 1959.