

## ВЫДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА $B_{12}$ ИЗ БИОМАССЫ АКТИВНОГО ИЛА

*Маркевич Р.М., Гребенчикова И.А., Ручай Н.С., Гриц Н.В.*

**БГТУ**

В научных публикациях имеются сообщения о том, что активный ил может служить источником соединений, обладающих  $B_{12}$ -витаминной активностью. К ним относятся кобаламины, состоящие из 4 элементов: атома кобальта, ковалентно с ним связанного лиганда, корринового кольца и нуклеотидной части. Биологической активностью для человека и животных обладают кобаламины, содержащиеся в нуклеотидной части 5,6-диметилбензимидазол (истинный витамин  $B_{12}$ ), а также 5-окси- и 5-метоксибензимидазол (факторы Ш и Ш<sub>m</sub>), причем активность двух последних форм составляет около 40% активности истинного витамина [1,2].

Витамин  $B_{12}$  синтезируют только микроорганизмы. У микроорганизмов наблюдается множество форм кобаламинов, которые отличаются лигандом и нуклеотидной частью. Кроме того, согласно принятой схеме биосинтеза витамина  $B_{12}$  [2] существует цепь промежуточных и побочных соединений, имеющих корриновое кольцо. Таким образом, в продуктах микробного синтеза могут содержаться различные корриноиды, не обладающие витаминной активностью. Состав и соотношение этих соединений зависят от видовой и штаммовой специфичности микроорганизмов, состава среды и условий культивирования. В этой связи представлялось необходимым изучить возможность использования сточных вод различных производств, различных условий их обработки для максимального получения соединений, обладающих  $B_{12}$  витаминной активностью.

Для количественного определения витамина  $B_{12}$  в биомассе активного ила кобаламины переводили в водный раствор путем гидролиза, замеряли экстинкцию при 530 нм и по построенной

калибровочной кривой определяли его содержание. Витамин  $V_{12}$  имеет максимум поглощения при 278, 361, 525 и 550 нм. Максимум при 278 нм относится к бензимидазольной части молекулы, другие максимумы - вклад корриинового кольца. Соотношение  $D_{361}/D_{278}$  может служить для оценки относительного содержания истинного витамина  $V_{12}$ , для которого указанное соотношение составляет 1.7-1.8. Соотношение  $D_{361}/D_{550}$  должно быть близко к 3.15-3.40 [3].

На содержание витамина исследовалась суспензия активного ила Минской городской станции аэрации, сточные воды гидролизного производства и производства этанола из зерна, обработанные в аэробных и анаэробных условиях. Анаэробное сбраживание суспензии активного ила приводило к увеличению общего количества корриноидов, однако доля истинного витамина оставалась недостаточной для того, чтобы рассматривать активный ил городской станции аэрации как источник для выделения витамина  $V_{12}$ . Наибольшее количество соединений, обладающих  $V_{12}$ -витаминной активностью, обнаружено в биомассе активного ила анаэробно очищенной сточной воды спиртового производства. Оно составило при длительности обработки 3 суток 0.8-1.1 мг на 1 л сточной воды [4].

Кобаламины преимущественно накапливаются в клетках микроорганизмов. Для экстракции витамина из биомассы изучено 3 способа: подкисленной (до pH 4.6-5.0) водой; подкисленной водой с добавлением ацетонциангидрина (до 0.3%), как источника цианогруппы, обеспечивающей образование стабильной формы - цианкобаламина этиловым спиртом с добавлением ацетонциангидрина. Общее количество извлеченных кобаламинов в пересчете на 1 л сточной воды составило соответственно 0.8; 0.55 и 1.1 мг, что свидетельствует в пользу последнего способа. Однако для промышленного применения с целью удешевления процесса можно ограничиться водной экстракцией.

Для выделения витамина  $V_{12}$  из водного раствора применяются два основных подхода: сорбция и экстракция. В качестве сорбентов могут использоваться активированный уголь, окись алюминия, ионообменные смолы [5]. На модельном водном растворе витамина  $V_{12}$  нами определена эффективность сорбции на активированном угле марки А, которая составила 92 % при количестве сорбента 3% об. В случае сорбции из водного клеточного экстракта эффективность

процесса находится на уровне 68%, что, вероятно, объясняется занятостью сорбционной емкости активированного угля большим количеством примесей.

Десорбция может быть осуществлена водными растворами спиртов, ацетона либо водно-фенольными смесями. Нами установлено, что количество десорбированного витамина возрастает с увеличением концентрации этанола и достигает максимума при 96%.

Поскольку витамин  $B_{12}$  образует комплекс с фенолом, крезолом и резорцином, это создает благоприятные условия для очистки его от примесей. После перевода витамина в водную фазу оценили содержание истинного витамина в смеси корриноидов. Значения соотношений экстинкций  $D_{361}/D_{278} = 1.23$  и  $D_{361}/D_{550} = 2.91$  в значительной мере приблизились к таковым для чистого витамина  $B_{12}$ .

Проведенные исследования позволили предложить схему выделения витамина  $B_{12}$  из биомассы активного ила (рис. 1).

В заключение следует отметить, что выделение витамина  $B_{12}$  является целесообразным только при достаточном количестве биологически активных форм и зависит от вида сточных вод, способов и режимов их обработки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Витамин  $B_{12}$  и его применение в животноводстве. - М.: Наука, 1971.
2. Воробьева Л.И. Микробиологический синтез витаминов. - Изд-во Моск. ун-та, 1982.
3. Березовский В.М. Химия витаминов. - М., 1973.
4. Маркевич Р.М., Гребенчикова И.А., Наукович О.А., Ручай И.С. Влияние условий обработки активного ила на выход и состав корриноидов. - Труды БГТУ, Химия и химическая технология, 1997, вып. 5, - С. 48-50.
5. Быховский В.Я. Микробиологический синтез витамина  $B_{12}$ . Обз. информ. - М., 1984

Сточная вода производства этанола из крахмалсодержащего сырья,  
очищенная в анаэробных условиях (содержание кобаламинов

0.8 - 1.1 мкг/мл;  $D_{361}/D_{272} = 0.68$ ,  $D_{361}/D_{550} = 2.65$ )

↓  
центрифугирование

Биомасса активного ила

↓  
экстракция кобаламинов

Водный экстракт

↓  
сорбция (количество  
активированного угля 3% об.)

↓  
десорбция 96% этанолом (этанол:  
активированный уголь 4:1)

Элюат

( $D_{361}/D_{272} = 0.77$ ,  $D_{361}/D_{550} = 2.76$ )

↓  
экстракция (фенол:  
хлороформ 1:2)

Экстракт

( $D_{361}/D_{278} = 1.23$ ,  $D_{361}/D_{550} = 2.91$ )

↓  
кристаллизация ацетона

Кристаллический препарат витамина  $B_{12}$

Рис. 1. Схема выделения витамина  $B_{12}$  из биомассы активного ила