

УСПЕХИ ХИМИИ

т. XXXVIII

1969 г.

Вып. 3

УДК 547/663 : 665.592

О ХИМИЗМЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЯХ ПРОЦЕССОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

В. И. Карбан, Р. В. Кучер и Н. И. Мироненко

В статье приведен обзор отечественной и зарубежной литературы по микробиологическому синтезу белковых веществ из нефтяных углеводородов. Приведена общая характеристика процесса и условия его протекания, а также химический механизм микробиологического окисления алифатических ароматических и гетероциклических углеводородов. Особое внимание уделено физико-химическим и топохимическим особенностям процесса. Показано, что рассматриваемый процесс с физико-химической точки зрения сходен с процессом эмульсионного окисления углеводородов. Библиография — 241 наименование.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	539
II. Общая характеристика процесса микробиологического синтеза белковых веществ из углеводородов	540
III. Химический механизм микробиологического окисления углеводородов	543
IV. Физико-химические и топохимические особенности процесса	549

I. ВВЕДЕНИЕ

Ферментативный синтез белка и витаминов, протекающий в дрожжевой клетке, в последнее время привлекает усиленное внимание научных многих специальностей. Выросла и бурно развивается новая отрасль промышленности, производящая аминокислоты, витамины и другие ценные продукты микробиологическим путем. Известна способность некоторых микроорганизмов использовать чистые углеводороды¹⁻⁵, спирты и кислоты⁶⁻⁹, а также нефть и нефтепродукты¹⁰⁻¹⁶ в качестве источников углерода и энергии. На возможность окисления нефтяных углеводородов микроорганизмами указывал еще в 20—30-х годах выдающийся советский микробиолог Таусон¹⁷. Некоторые виды микроорганизмов отлично развиваются в отстойных бассейнах нефтеперерабатывающих заводов¹⁸, в пластовых водах нефтяных месторождений, в почвах, питанных нефтью¹⁹, и даже под битумными покрытиями дорог²⁰⁻²¹. Эти микроорганизмы являются, в основном, аэробными формами и перерабатывают парафиновые углеводороды, главным образом нормального строения^{22, 23}. Поскольку микробы представляют собой живые организмы, они более или менее богаты белками. Таким образом, нефть может стать источником белков, являющихся необходимой и наиболее дефицитной составной частью в продуктах питания человека и животных.

Для покрытия дефицита в пищевых продуктах, остро ощущаемого большинством населения земного шара, по данным Макферсона²⁴, к 1980 г. потребуется производить дополнительно ~18 млн. т жиров, 9,9 млн. т животных белков и 11,4 млн. т аминокислот в год. Самым выгодным и дешевым из основных сырьевых источников для синтеза про-

дуктов питания является нефть и атмосферный азот, фиксируемый в виде аммиака.

Процесс получения пищевых продуктов микробиологическим путем представляется очень выгодным вследствие высокой скорости размножения микроорганизмов, их высокой биохимической активности, возможности использовать сравнительно дешевые исходные вещества, а также независимости производства от климатических и погодных условий. Благодаря прогрессу в технологии выращивания микроорганизмов создаются благоприятные условия для управления их развитием в производственных условиях.

В настоящее время имеется довольно обширная отечественная и зарубежная научная литература о развитии микроорганизмов на отдельных фракциях нефти и чистых углеводородах²⁵⁻³². Особенno следует упомянуть работы, проводимые французскими исследователями во главе с Шампань³³⁻³⁷. Культивируя микроорганизмы (главным образом дрожжи) на различных фракциях нефти, они получили белковые вещества и ценные водорастворимые витамины. Полученный продукт был назван белково-витаминным концентратом (БВК). При этом за счет депарафинизации улучшается качество нефти, так как снижается температура застывания получаемых из нее топлив и масел³⁸. Большой интерес в научном отношении представляют работы Сенеза с сотр.³⁹⁻⁴². В последние годы в СССР ведутся широкие исследования по выделению и подбору микроорганизмов, усваивающих углеводороды нефти, созданы опытно-промышленные установки по производству БВК, проводятся испытания питательной ценности и безвредности полученного продукта⁴³⁻⁵⁴.

В основе микробиологического синтеза белка и витаминов из нефти лежит процесс ферментативного окисления углеводородов и их производных. Об условиях протекания, механизме и продуктах микробиологического окисления, которое значительно отличается от химического окисления тех же углеводородов, в настоящее время известно мало, а имеющиеся сведения не систематизированы и требуют уточнения. Основную роль в создании теории ферментативного окисления углеводородов должны сыграть химики в тесном контакте с микробиологами, биохимиками и учеными других специальностей.

II. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ УГЛЕВОДОРОДОВ

Основным сырьем для производства белково-витаминного концентрата являются жидкие нефтяные парафиновые углеводороды нормального строения, полученные в процессе депарафинизации дизельных топлив с последующей адсорбционной очисткой. Пригодны также парафины, полученные при низкотемпературной депарафинизации, очищенные серной кислотой. В результате такой очистки парафины содержат не более 0,5% ароматических углеводородов. Некоторые виды микроорганизмов можно культивировать на отдельных фракциях дизельных топлив без предварительного выделения из них нормальных парафинов. В этом случае депарафинированную часть топлива необходимо отделять от сырой белковой массы.

Содержание алканов с различной длиной углеродной цепочки в нефтях различных месторождений колеблется в широких пределах. Различные микроорганизмы усваивают главным образом парафины с числом углеродных атомов $C_{10} - C_{24}$ ¹⁻⁵, а также $C_1 - C_4$ ^{25, 32, 49}. Так, дрожжи в большинстве случаев ассимилируют углеводороды от *n*-ионана до

n-октадекана ($C_9 - C_{18}$), а также ненасыщенные соединения с той же длиной углеродной цепи⁵⁰.

Опыт показывает, что микроорганизмы обладают определенной избирательной способностью усваивать тот или иной субстрат⁵¹⁻⁶⁵. Изоалканы используются микроорганизмами хуже, чем *n*-алканы⁶⁶. Соединения ароматического ряда мало пригодны как источники углерода для микроорганизмов рода *Candida*^{56, 67, 68}. Обнаружена также и более узкая специфичность субстрата. Микроорганизмы могут расти на одном углеводороде и не развиваться на другом, близком к первому по строению⁶⁹.

В настоящее время ведутся поиски высокоактивных культур микроорганизмов (главным образом дрожжей), обеспечивающих быстрое накопление биомассы. Большинство исследователей уделяет особое внимание дрожжам рода *Candida* как наиболее активным^{3, 29, 70}.

На питательную ценность дрожжей впервые указал Дельбрюк в 1875 г.; это положение было развито в более поздних работах других авторов⁷¹⁻⁷⁸. Питательная ценность белка определяется в первую очередь соотношением входящих в него аминокислот⁷⁹. Аминокислотный состав белка дрожжей зависит от вида дрожжей, питательной среды и способа выращивания^{80, 81}. Однако у отдельных видов дрожжей нет резких различий в содержании аминокислот⁸², и это определяет высокую биологическую ценность дрожжевого белка^{83, 84} (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1

Содержание некоторых аминокислот в дрожжах, мясе и зерне пшеницы⁸⁰

Аминокислоты	Суточная потребность человека, г	Содержание аминокислот, г/100 г		
		в дрожжах	в животных тканях	в зерне пшеницы
Аргидин	3,5	4,3	7,1	3,0
Гистидин	2,0	2,8	2,2	1,2
Лизин	5,2	6,4	8,1	2,7
Тирозин	3,9	4,2	3,1	—
Триптофан	1,1	1,4	1,2	1,0
Фенилаланин	4,4	4,1	4,5	9,3 с тирозином
Цистин	3,8	1,3	1,1	4,3
Метионин	3,8	следы	3,3	
Лейцин	9,1	13,2	12,1	13,0
Изолейцин	3,3	3,4	3,4	4,0
Валин	3,8	4,4	3,4	3,5
Тreonин	3,5	5,0	5,2	3,3

Белки дрожжей усваиваются организмом на 85—88%; по этому показателю они занимают промежуточное положение между белками растительного (65—75%) и животного (90—95%) происхождения⁸⁵⁻⁸⁷. Благодаря высокому содержанию лизина и валина, дрожжи являются хорошим дополнением к белку злаков и улучшают их питательную ценность⁸⁸.

Дрожжи богаты витаминами группы В, содержание которых зависит от культуры дрожжей, питательной среды и способа культивирования (табл. 2)^{47, 48, 89, 90}. В дрожжах, культивируемых на углеводородах нефти, витамины сочетаются с другими ростовыми веществами неизвестного состава.

Как любой живой организм, дрожжи могут существовать лишь в присутствии воды. Они нуждаются в продуктах питания: углероде, азоте,

ТАБЛИЦА 2

Содержание (мг) водорастворимых витаминов и их значение³⁰

	Тиамин В ₁	Рибофлавин В ₂	Никотиновая кислота РР	Пантотеновая кислота	Пиридоксин В ₆
Суточная потребность человека	2	3	15	3	2
Содержание витаминов в продуктах:					
мясо (говядина)	1—3	2	40—100	7—21	1—4
печень	5—10	16	75—275	30—60	5
молоко	0,3—0,7	1—3	1—5	1—4	1—3
зерно	0,5—7,0	1—1,5	10—30	5—20	3—6
сухие дрожжи	2—20	30—60	200—500	30—200	40—50
БВК	3—16	75	130—200	150—192	23
Функции	углеводный обмен	дегидрирование, окисление	перенос углерода	ацетилирование, синтез жирных к-т	переаминирование
Последствия недостатка витаминов	нервные заболевания, бери-бери	остановка развития	пеллагра	остановка развития	дерматиты

фосфоре, калии, магний и многих микроэлементах. Источником углерода и энергии являются исключительно углеводороды нефти. Азот, фосфор, калий и магний вводят в питательную среду в виде раствора минеральных солей в воде. Микробиологическое окисление протекает, таким образом, в эмульсии углеводорода в водной фазе. К элементам, необходимым для роста и развития дрожжей, относятся, прежде всего, железо, цинк и марганец^{91, 92}. Железо входит в состав многих ферментов и необходимо для роста дрожжей и накопления биомассы^{93, 94}. Цинк также входит в состав карбоксидазы, цитохрома, цитохромоксидазы и некоторых других ферментов⁹⁵. Марганец влияет на катализическую деятельность многих окислительных ферментов. Относительно других элементов, требующихся в меньших дозах, таких как медь, молибден, кобальт, иод, бор и другие, можно считать, что достаточные их количества содержатся в водопроводной воде и минеральных солях, обычно применяемых для культивирования дрожжей.

Основным параметром развития процесса является температура. Для каждого микроорганизма существует оптимальная температура, при которой время деления клеток является минимальным. Все эти температуры лежат в пределах 25—40°^{42, 96, 97}, и, следовательно, микробиологическое окисление нефтяных углеводородов в энергетическом отношении выгоднее химического окисления, протекающего с достаточной скоростью лишь при повышенных температурах.

Важным фактором при культивировании микроорганизмов на углеводородных субстратах в аэробных условиях является подача кислорода. Кислород требуется не только для построения самой биомассы, но и для окисления углерода и удовлетворения энергетических потребностей обмена веществ в дрожжевых клетках. Общая потребность в кислороде при выращивании дрожжей на углеводородах в 2—4 раза выше, чем при использовании углеводных субстратов, так как в последнем случае кислород необходим только для покрытия энергетических затрат

роста и клеткой не фиксируется³⁰. Необходимый микроорганизмам кислород должен быть растворен в водной среде. Предел роста клеток определяется диффузией кислорода воздуха в среду.

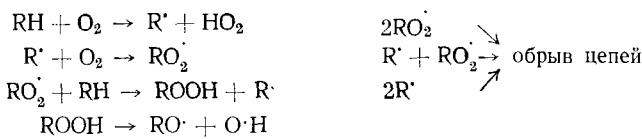
В настоящее время усилия ученых и инженеров направлены на развитие теории и совершенствование аппаратуры непрерывного процесса микробиологического окисления углеводородов нефти⁹⁸⁻¹⁰².

Микробиологическое окисление углеводородов нефти можно проводить в двух направлениях: выращивать микроорганизмы для использования их как таковых в виде белково-витаминных концентратов или экстрагировать из водной среды вырабатываемые микроорганизмами ценные продукты. На этих свойствах микроорганизмов основаны применяемые в ряде стран промышленные способы получения аминокислот и витаминов методом микробиологического синтеза¹⁰³⁻¹¹⁰. Большой интерес представляют те виды микроорганизмов, которые, перерабатывая углеродсодержащие вещества, выделяют в реакционную среду преимущественно одну какую-либо аминокислоту. Таким способом в промышленных масштабах из углеводов и растительного сырья в настоящее время получают глутаминовую кислоту и лизин. Над разработкой методов биосинтеза других аминокислот интенсивно работают ученые в лабораториях Японии, США, Советского Союза и других стран¹¹¹⁻¹²⁰.

III. ХИМИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ

Механизм окисления углеводородов микроорганизмами, как показывают многочисленные опыты, отличается от механизма химического окисления. При окислении углеводородов в жидкой фазе, как это твердо установлено, первичным продуктом окисления является гидроперекись, ответственная в дальнейшем за вырожденное разветвление сложного цепного окисления. Основным радикалом, ведущим реакционные цепи, является перекисный радикал RO[·]:

Процесс химического окисления углеводородов детально исследовали Эмануэль с сотр.^{121, 122}, они вывели ряд кинетических закономерностей и предложили следующую схему окисления:



Механизм микробиологического окисления углеводородов отличается от приведенного выше и изучен значительно меньше.

Усвоение углеводородов микроорганизмами зависит от следующих условий: проникновения углеводородов в клетку, способности микроорганизмов адаптироваться к углеводородам и, наконец, от наличия ферментов, необходимых для первичного окисления углеводородов^{123, 124}. Проникновение углеводородов в клетки микроорганизмов, определяющее в основном топохимию реакции, в значительной мере связано с физико-химическими особенностями процесса, которые будут рассмотрены ниже.

Явление адаптации, происходящее, по-видимому, на уровне ферментных систем, в настоящее время привлекает внимание многих исследователей¹²⁵⁻¹³⁵. Микроорганизмы, усваивающие углеводороды, должны адаптироваться к питательной среде, которая в естественных условиях

претерпевает большие изменения. Одни микроорганизмы, не сумевшие приспособиться к новым условиям, погибают. Другие, постепенно адаптируясь, начинают усваивать новые субстраты¹³⁶.

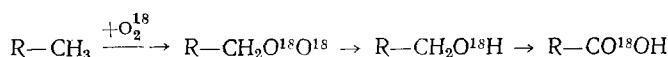
Собственно процесс окисления происходит при помощи ферментов, которые снижают энергию активации реакции на 16—18 ккал/моль, в то время как небиологические катализаторы приводят к понижению энергии активации всего лишь на 4—8 ккал/моль¹³⁷. Непосредственно в катализе принимают участие как простетическая группа, так и некоторые группы белкового носителя, входящие в активный центр фермента¹³⁸. Доказано^{139, 140}, что конфигурация молекул в некоторых ферментах в ходе взаимодействия с соответствующими субстратами значительно изменяется. Очевидно, при этом каталитические группы располагаются в порядке, необходимом для ферментативного воздействия на субстрат^{141—143}.

При образовании фермент-субстратного комплекса имеет место поляризация связей, что является причиной «напряженной конфигурации» комплекса. В таком комплексе связи растягиваются и ослабляются¹⁴⁰. Связывание ферментом субстрата индуцирует изменение конформации белковой основы фермента, и, наоборот, под влиянием фермента деформируются и активируются молекулы субстрата. Согласованное воздействие двух или нескольких групп активного центра фермента на поляризацию определенных связей субстрата лежит в основе каталитического действия фермента^{144, 145}. Кинетика действия ферментов описывается уравнением Михаэлиса или более сложными уравнениями в зависимости от числа компонентов активных центров^{146, 147}.

Данных о роли и механизме действия ферментов в процессах микробиологического окисления углеводородов недостаточно. Только в последнее время начали появляться интересные работы по определению участия ферментов в этих процессах^{129, 132, 133, 135, 148}.

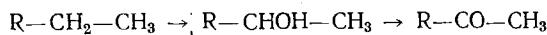
Первичным актом микробиологического окисления является атака кислородом молекулы углеводорода. К сожалению, до сих пор в литературе нет единого мнения о месте атаки. Многие исследователи считают наиболее вероятным путем микробиологического окисления *n*-парафинов окисление одной из конечных метильных групп до карбоксильной через промежуточное образование спирта и альдегида^{149—154}.

Используя метод меченых атомов, Стюарт с сотр.¹⁵⁵ показали, что кислород, включающийся в молекулу углеводорода, является молекулярным кислородом, и в качестве первого продукта окисления образуется гидроперекись:



О наличии гидроперекиси в продуктах метаболизма свидетельствуют и другие авторы^{40, 156, 157}. Возможность образования гидроперекиси в качестве промежуточного продукта окисления подтверждается тем, что синтезированные 1-алкилгидроперекиси окисляются микрококками, выросшими на углеводородных субстратах¹³⁶.

Описанная схема процесса в настоящее время не является достоверно установленной. Наряду с окислением конечного атома *n*-парафинов считается возможным окисление углеродного атома в α -положении¹⁵⁸. В этом случае процесс образования жирных кислот идет путем накопления вторичных спиртов и метилалкилкетонов:



Фостер объясняет окисление углерода в α -положении исходя из представления о равновесии свободных радикалов внутри цепи *n*-парафина⁶⁵. Первичная активация состоит в образовании свободного *n*-алканового радикала по конечному углероду. Однако атом водорода может переместиться внутри молекулы и сделать активным соседний атом углерода, т. е. образовавшийся первичный радикал изомеризуется в радикал соответствующего изостроения. Первыми стабильными продуктами, образующимися по этому механизму, являются кетоны. Эти соединения обнаруживаются лишь в некоторых культурах, растущих на парафине^{158–161}, но относительная легкость, с которой метилкетоны усваиваются микроорганизмами, окисляющими углеводороды, приводит к мысли, что эти вещества могут быть промежуточными при окислении *n*-алканов, особенно с короткой цепью^{158–162}.

При выращивании различных бактерий (*Ps. aeruginosa*, *Achromobacter* sp., *Nocardia* sp., *Mycobacterium* sp.) на очищенных углеводородах с четным и нечетным количеством атомов углерода (C_6 и C_7) Треккани с сотр. отмечают образование насыщенных жирных кислот с неразветвленными цепями^{163–165}. Низшие парафины с четным и нечетным количеством атомов углерода дают различные продукты окисления⁶⁹. При использовании в качестве субстрата *n*-гексана образуются капроновая, масляная и уксусная кислоты, а *n*-гептана — все жирные кислоты, имеющие в молекуле от одного до семи атомов углерода. Это исследование нуждается в дополнительном подтверждении опытами. Процессу усвоения парафинов с четным числом атомов углерода мешает наличие в реакционной массе кислот с нечетным числом атомов углерода. Если же клетками усваивается углеводород с нечетным количеством атомов углерода, то присутствие в реакционной среде любых жирных кислот не составляет помехи реакционному процессу¹⁶⁵.

Установлено, что *Ps. methanica* образует из газообразных углеводородов продукты окисления, имеющие то же число атомов углерода, что и исходные углеводороды^{166–169}. При добавлении этана, пропана и *n*-бутана, были обнаружены, соответственно, уксусная кислота и ацетальдегид, пропионовая кислота и ацетон, масляная кислота и 2-бутанон. При микробиологическом окислении метана в качестве внеклеточных продуктов образуются метиловый спирт, формальдегид и муравьиная кислота, двуокись углерода, водород и полисахариды¹⁷⁰.

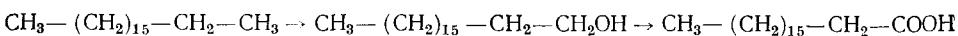
При окислении *n*-гексадекана конечным продуктом является цетиловый эфир пальмитиновой кислоты^{165–171}. Цетиловый спирт, вступающий в реакцию этерификации с пальмитиновой кислотой, образуется из гидроперекиси *n*-гексадецила, которая, по-видимому, является первым промежуточным соединением в процессе окисления *n*-гексадекана. Микроорганизмы, выросшие на гексадекане, легко окисляли эту гидроперекись. Эфир образуется также при выращивании микроорганизмов на окта- и тетрадекане¹⁷². Спиртовая часть эфира имеет тот же углеводородный скелет, что и парафин субстрата. На основании этого можно утверждать, что спиртовая часть эфира, получаемого из углеводорода, образуется непосредственно из алкана путем окисления конечного атома углерода.

Кислотная же часть эфиров, по мнению Треккани⁶⁹, во всех случаях бактериального окисления алканов, по-видимому, содержит 16 атомов углерода независимо от длины цепи нормального углеводорода, использованного в качестве субстрата.

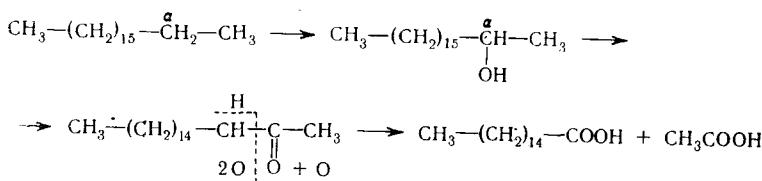
Гололобов считает¹³⁶, что пальмитиновая кислота не всегда является кислотной частью эфиров. Этого же мнения придерживаются Каллио и Финнери^{173, 174}, которые при выращивании микрококков в среде с

октадеканом выделили из культуральной жидкости два эфира: октадеканал пальмитат $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ и октадеканал стеарат $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$.

Кислотная часть октадеканал стеарата образуется в результате окисления конечного атома углерода в октадекане:



В октадеканал пальмитате кислотная часть содержит на 2 атома углерода меньше, чем углеводород. Образование пальмитиновой кислоты можно объяснить, допуская окисление α -углеродного атома октадекана с возникновением вторичного спирта, затем метилалкилкетона и расщеплением последнего по схеме:



Как сказано выше, при микробиологическом окислении углеводородов наблюдается прямое связывание кислорода^{175, 176}. Многие исследователи предполагают, что первичное ферментативное воздействие на молекулы углеводорода возможно при непосредственном участии кислорода. Это предположение доказано⁶⁹ вхождением O^{18} в цетиловый эфир пальмитиновой кислоты.

Возможность микробиологического разложения углеводородов в анаэробных условиях кажется менее вероятной^{177, 178}, однако недавно появились сообщения о развитии специфических углеводородокисляющих бактерий из рода *Pseudomonas* на минеральной среде с нефтью в анаэробных условиях¹⁷⁹.

Итак, превращение алифатических углеводородов заключается в образовании в начальный период реакции насыщенных жирных кислот с неразветвленными цепями. Что касается дальнейшего распада жирных кислот, то различными авторами получены на этот счет не вполне сходные результаты. По мнению большинства авторов^{156, 159}, кислоты с четным числом углеродных атомов разрушаются по схеме β -окисления до уксусной кислоты. При нечетном числе углеродных атомов кислоты могут подвергаться также и α -окислению, превращаясь в кислоту с четным числом атомов углерода, подвергающуюся в дальнейшем уже только β -окислению до пропионовой и уксусной кислот. Так, по свидетельству Стедмена²³, *Methanobacterium suboxydans* преобразует валериановую кислоту путем β -окисления в пропионовую и уксусную кислоты, а масляную и капроновую — в уксусную кислоту.

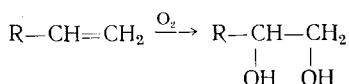
Некоторые виды бактерий способны окислять молекулы *n*-алканов с обоих концов, образуя какmono-, так и дикарбоновые кислоты¹⁸⁰. ω -Окисление в дикарбоновые кислоты является, очевидно, второстепенным путем и представляет собой первые этапы последующего β -окисления.

Окисление промежуточных продуктов метаболизма можно искусственно затормозить, прибавляя в реакционную среду вещества-ингибиторы, такие как азид натрия, цианистый натрий, α, α' -дипиридили, ионы

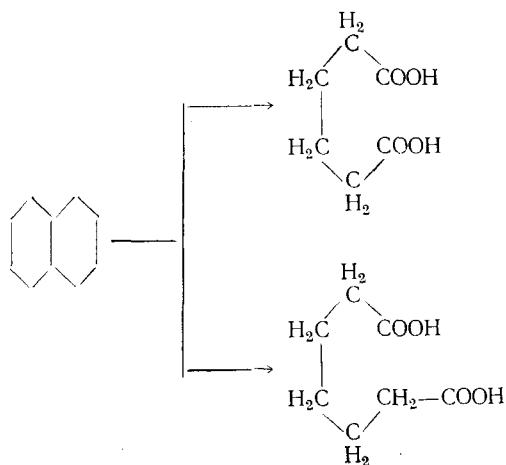
тяжелых металлов и другие^{23, 181}. Возможно, применение ингибиторов будет полезным при изучении механизма образования и накопления ценных продуктов, а также для определения роли соответствующих ферментов, принимающих участие в процессе.

Механизм бактериального окисления ненасыщенных соединений исследован мало. Известно, что микроорганизмы способны усваивать олефины в качестве источников углерода и энергии. По сообщению Штурм¹⁸², ненасыщенные углеводороды усваиваются микроорганизмами легче, нежели соответствующие им парафины. Атаке подвергаются и насыщенные и двойные связи олефинов. Так, Вандерлинден установил, что при разложении октена-1 клетками *Pseudomonas aeruginosa* основные преобразования происходят на насыщенном конце цепи молекулы олефина, а двойная связь остается нетронутой¹⁸³.

Представляет интерес сообщение о том, что окисление 1-гексадецена дрожжами *Candida lipolytica* вызывает накопление 1,2-гексадекандиола в качестве промежуточного продукта¹⁸⁴. Это свидетельствует о возможности окисления в олефине одновременно двух атомов углерода, связанных двойной связью¹⁸⁵:

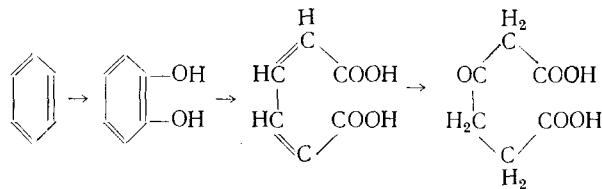


О механизме микробиологического окисления насыщенных циклических соединений, таких как циклогексан, декалин, пергидрофenantрен и пергидроантрацен, известно мало^{186, 187}. Доказано¹⁸⁸ образование перекиси, муравьиного альдегида, валериановой и муравьиной кислот при культивировании *Pseudomonas fluorescens* на циклогексане. При выращивании *Flavobacterium* на декалине промежуточным продуктом является адипиновая кислота¹⁸⁹:

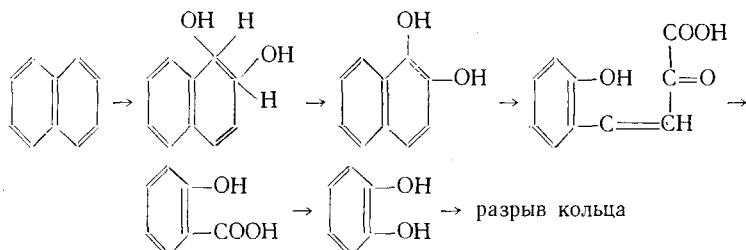


Микроорганизмы усваивают ароматические соединения, превращая их в *o*- или *p*-дигидроксифенольные производные, а затем расщепляя кольца до алифатических кислот^{190, 191}. При окислении бензола^{192, 193} в качестве промежуточного продукта образуется пирокатехин; накапливаются также фенол и *cis-cis*-муконовая кислота¹⁹⁴. Из клеток, вырос-

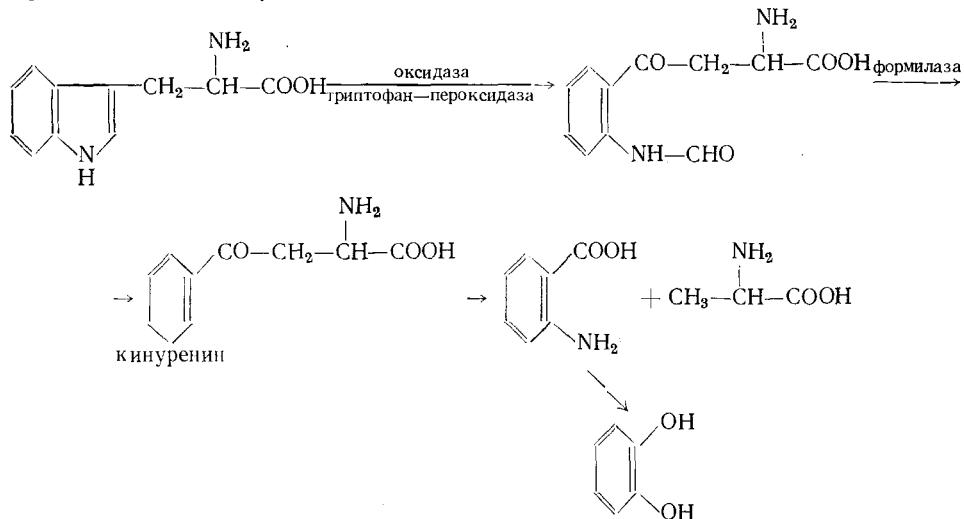
ших на бензоле, была экстрагирована бензолоксидаза, превращающая этот углеводород в 3-оксоадипиновую кислоту^{195, 196}. Ферментный экстракт не содержит фенолоксидазу, и только целые клетки, выросшие на феноле (но не адаптированные к бензолу), немедленно связывают кислород в присутствии фенола. Окисление бензола представлено следующей схемой:



Уокер и Уилтшир, изучая пути распада нафтилина при культивировании пяти различных микроорганизмов, показали, что во всех случаях промежуточными продуктами являются нафтилинидол, салициловая кислота и пирокатехин. Этот же механизм подтверждается работами Азулея с сотр.^{198, 199}:



Механизм окисления ароматических и гетероциклических углеводородов подробно изложен в обзоре Треккани⁶⁹. Разложение триптофана, например, происходит по следующей схеме:



Аналогично превращается и индол. Исследовано также микробиологическое окисление индолилуксусной и никотиновой кислот, никотина, ароматических нитросоединений и соединений группы лигнина.

IV. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ТОПОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА

Краткое рассмотрение химизма окисления нефтяных углеводородов убедительно показывает, что в изучении его сделаны лишь первые шаги. Имеющиеся данные далеко не достаточны для составления полного представления о химизме этого процесса.

Работ по физико-химическому изучению процесса микробиологического окисления, по кинетике протекания отдельных его стадий в настоящее время нет. Однако в связи с актуальностью этого процесса и внедрением его в промышленность подобные сведения крайне необходимы, так как без знания физико-химических и кинетических закономерностей процесса трудно говорить о возможности рационального управления им.

В работах, появившихся в последнее время, указывается, что в процессе роста дрожжевых клеток обнаруживаются свободные радикалы^{200, 201}. Эта мысль подтверждается наличием сигналов ЭПР в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, а также при окислении НАДН клетками *Mycobacterium phlei*. В последнем случае предполагается, что сигналы ЭПР могут быть вызваны радикалами, близкими по строению к семихинону. Возможность участия свободных радикалов в процессе микробиологического окисления может быть установлена исследованием хемилюминесценции, возникающей при действии свободных радикалов на дрожжевые клетки²⁰². Значительная роль свободных радикалов в ферментативных процессах окисления подтверждается работами Эмануэля с сотр. по исследованию ферментативного окисления с помощью сукцинодегидразы и других ферментов²⁰³⁻²⁰⁶. Свободно-радикальные реакции ферментативного окисления могут тормозиться под влиянием ингибиторов цепных процессов окисления, таких как фенольные соединения и другие. Все это указывает на то, что при микробиологическом окислении нефтяных углеводородов не исключается возможность протекания отдельных стадий процесса при участии свободных радикалов.

Микробиологическое окисление углеводородов нефти происходит в сложной системе, состоящей из нескольких фаз. В водной среде находится в диспергированном состоянии углеводород, там же присутствуют клетки микроорганизмов. В результате роста микроорганизмов образуются поверхностно-активные вещества, обусловливающие дополнительное эмульгирование углеводорода^{36, 37}. Все это говорит о том, что указанная система весьма сложна. На чисто химические процессы здесь накладывается влияние факторов, связанных с жизнедеятельностью микроорганизмов, а также с коллоидно-химической природой системы. С этой точки зрения целесообразно рассмотреть механизм проникновения углеводорода в клетки, находящиеся в водной фазе, так как без контакта этих двух составных частей системы невозможно протекание процесса. Существуют различные теории, объясняющие механизм поступления питательных веществ в клетку. Так, Джонсон предполагает⁶⁶, что проникновение углеводорода в клетку происходит при участии липидов клеточной оболочки, и длинная парафиновая цепь углеводородной молекулы становится частью фосфолипидной мицеллы клеточной мембранны. Это объяснение весьма общо, и многие факты в свете его остаются неясными. Имеются предположения о том, что первоначальное окисление парафина протекает вне клетки²⁰⁷. В этом случае некоторые ферменты должны были бы выделяться клеткой в среду²⁰⁸, однако многие авторы с этим не соглашаются¹³⁶. Все больше и больше фактов сви-

действует о том, что фермент для проявления своей активности должен быть заключен в определенные структурные образования внутри клетки в неизмененном виде²⁰⁹⁻²¹⁷.

Внутриклеточную активность ферментов могут увеличивать поверхностно-активные эмульгаторы, как это имеет место при действии поверхностно-активных веществ на дрожжи *Candida albicans*²¹⁸. В этом случае каталазная активность *Candida albicans* возрастает благодаря увеличению проницаемости клеточной стенки под воздействием ионных поверхностно-активных веществ. Взаимодействие поверхностно-активных эмульгаторов с *Saccharomyces ellipsoideus* ведет к образованию комплексов с липидами, липопротеидами или протеинами клеточной поверхности, чем нарушаются процессы метаболизма²¹⁹.

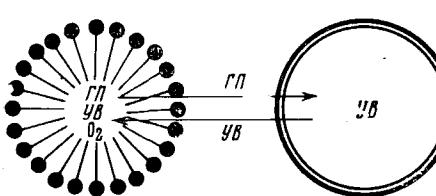


Рис. 1. Топохимическая схема эмульсионного окисления углеводородов в присутствии эмульгатора

Сложность реакционной системы приводит к мысли о том, что для формулировки общих закономерностей протекания процесса необходимо рассмотреть его топохимию. В связи с тем, что подобные исследования микробиологического окисления почти отсутствуют, нам кажется интересным кратко остановиться на

процессе эмульсионного окисления нефтяных углеводородов, близком с физико-химической точки зрения к микробиологическому окислению. По-видимому, в дальнейшем можно будет провести ряд аналогий в протекании реакции. Кинетика эмульсионного окисления углеводородов была обстоятельно изучена в работах Кучера и сотр., они же высказали предположение о топохимии процесса²²⁰⁻²²².

Прежде всего было показано, что поверхностно-активные эмульгаторы являются существенным кинетическим фактором, приводящим к изменению скорости процесса (преимущественно к его ускорению) благодаря стабилизации углеводородных капель, а также капель продуктов реакции в водной среде.

При проведении реакции окисления углеводородов в эмульсиях вполне возможно протекание отдельных стадий процесса в водной фазе²²². Предполагая существование мицелл эмульгаторов, ядро которых состоит из органической части молекулы и имеет олеофильный характер, можно допустить достаточно легко протекающую солубилизацию водонерастворимых веществ в ядре мицеллы. В результате этого в рыхлой, постоянно омываемой водой мицеллярной структуре существует высокая локальная концентрация реагирующих веществ, подвергающихся поляризующему действию воды. Вполне резонно в этом случае допустить повышенную реакционную способность солубилизованных веществ.

Углеводородная фаза является в данном случае источником реагирующих веществ, которые подвергаются солубилизации. Кроме того, в нее диффундируют продукты реакции, образующиеся в водной фазе. Вполне естественно, что все это сопряжено с диффузией реагирующих веществ из одной фазы в другую. Несколько упрощенная топохимическая схема реакции представлена на рис. 1.

Однако предложенная схема не является универсальной. Она предполагает наличие поверхностно-активных эмульгаторов в системе и совершенно не рассматривает случаев окисления углеводородов в эмульсиях, не стабилизованных эмульгаторами.

Ряд опытов²²³ убедительно показывает, что при окислении углеводородов в эмульсиях весьма существенную роль играет давление окисляющего кислорода. Так, при окислении изопропилбензола в автоклаве из нержавеющей стали повышение давления до 10 атм приводит к возрастанию скорости реакции, которая при увеличении давления выше 15 атм практически не изменяется. Все это приводит к мысли, что реакция эмульсионного окисления углеводородов при атмосферном давлении протекает не в кинетической, а в диффузационной области. В этом случае скорость процесса лимитируется растворимостью кислорода в эмульсии и, особенно, в водной фазе. Было также установлено²²⁴, что растворимость кислорода в водной фазе значительно возрастает в присутствии растворенных поверхностно-активных эмульгаторов.

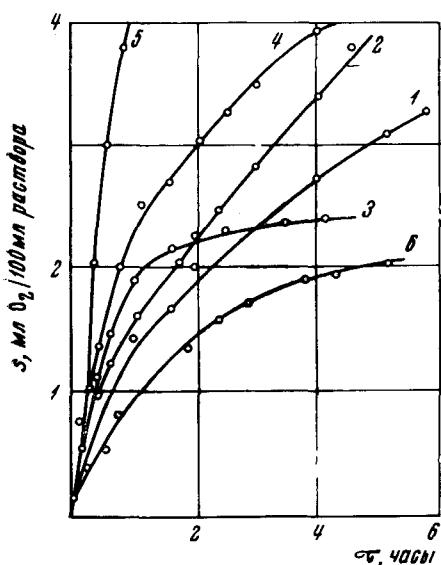


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика растворения кислорода: 1 — в 5%-ном растворе некаля; 2 — в 5%-ном растворе лейканола; 3 — в 0,1 N растворе пальмитата калия в 0,1 N растворе соды; 4 — то же с солюбилизированным изопропилбензолом; 5 — в изопропилбензоле, при 80°; 6 — в 0,1 N растворе соды при 25°.

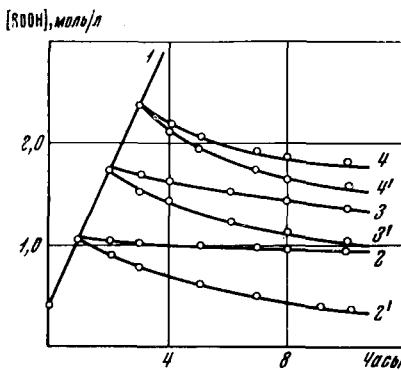


Рис. 3

Рис. 3. Кинетические кривые эмульсионного окисления изопропилбензола (1) и распада гидроперекиси в отдельной углеводородной фазе (2, 3, 4) и в эмульсии (2', 3', 4') при 110°.

Из рис. 2 видно, что растворимость и особенно скорость растворения кислорода в растворах эмульгаторов выше, чем в чистой воде.

Наконец, постановкой ряда кинетических опытов по эмульсионному окислению углеводородов было установлено, что отдельные стадии реакции (в данном случае это реакция инициирования, происходящая при распаде гидроперекиси) протекают на границе раздела фаз²²⁵. Особенно это касается реакций, в которых принимают участие поверхностно-активные реагенты (например, гидроперекиси), которые адсорбируются на поверхности углеводородных капель. В этом случае на разные части молекулы реагирующего вещества действует различная среда. Органическая (гидрофобная) часть молекулы втягивается в углеводородную среду, гидрофильная же часть молекулы сольватируется молекулами воды.

Таким образом, разность химических потенциалов вещества, отдельные части молекулы которого находятся в разных фазах, создает до-

полнительное поляризующее действие, что приводит к повышению реакционной способности реагирующего вещества.

Особенно это видно на примере реакции распада гидроперекиси, скоростью которой в присутствии водной фазы значительно возрастает (см. рис. 3).

Переходя к рассмотрению микробиологического окисления углеводородов, можно отметить сходность ряда закономерностей с окислением углеводородов в эмульсиях. Прежде всего отдельные стадии реакции могут протекать в разных фазах или на границе их раздела. Оболочка клетки состоит из дифильных белковых молекул, строение которых напоминает дифильное строение молекул поверхностно-активных эмульгаторов²²⁶. В этом случае вполне вероятно внедрение углеводорода между органическими цепями гидрофобных «хвостов» белковых молекул, подобно тому, как это имеет место при солюбилизации олеофильных веществ в так называемых «пластинчатых» мицеллах²²⁷.

По-видимому, для образования фермент-субстратного комплекса исключительно благоприятные условия достигаются на границе раздела фаз и, прежде всего, на поверхности клетки, так как в этом случае создается высокая локальная концентрация этих молекул.

На скорость и кинетику реакций микробиологического окисления должна также оказывать влияние дисперсность реагирующих веществ. Это относится как к дисперсности капель углеводорода, так и к дисперсности пузырьков окисляющего газа.

Эти вопросы требуют систематического исследования. При решении их необходимо провести опыты, показывающие насколько скорость процесса изменяется при механическом перемешивании реакционной смеси. Исследование влияния механического перемешивания окисляющей эмульсии углеводорода должно способствовать выяснению роли диффузионных факторов в кинетике микробиологического окисления углеводородов, так как при увеличении скорости перемешивания возрастает скорость диффузии отдельных компонентов.

Весьма вероятно, что при проведении реакции при атмосферном давлении для объяснения процесса в какой-то мере можно использовать приведенную топохимическую схему (см. рис. 1). В связи с этим интересно также выяснить влияние солюбилизации отдельных компонентов в водной фазе на кинетику процесса. Эти исследования, на наш взгляд, следует проводить в условиях все уменьшающегося количества углеводородной фазы до полного исчезновения границы раздела фаз углеводород — водный раствор.

Наконец, последним вопросом, требующим решения в настоящее время, является влияние повышения давления окисляющего газа, содержащего кислород. При повышенном давлении растворимость последнего повышается. Таким образом, при увеличении содержания кислорода в водной фазе усиливается скорость диффузии его в капли углеводорода или в клетки, насыщенные углеводородом. В этом случае процесс может интенсифицироваться, как это наблюдается в случае эмульсионного окисления углеводородов, однако при микробиологическом окислении необходимо учитывать влияние давления на жизнедеятельность микроорганизмов²²⁸. Из литературных данных известно, что высокие давления (до 200 атм) губительно действуют на дрожжевые организмы⁷⁰. При давлении выше атмосферного кислород может подавлять и ограничивать рост микроорганизмов, способных развиваться в различных питательных средах. Дальнейшие исследования должны быть направлены на поиск культур, устойчивых к повышенному давлению кислорода.

С кинетической точки зрения процесс микробиологического синтеза белковых веществ (вернее, его отдельные стадии) протекает в открытой системе, так как в этом случае происходит материальный обмен между местом реакции и внешней средой²²⁹. К изменению количества вещества в открытой системе приводят не только химические процессы, но и процессы материального обмена с окружающей средой, что необходимо учитывать при определении скорости реакции.

* * *

Целью настоящего обзора является рассмотрение современного состояния вопроса о механизме микробиологического окисления углеводородов нефти. Важность рассматриваемой проблемы очевидна. Интерес к ней привел к образованию фактически новой отрасли естествознания на стыке химии и микробиологии, которая занимается вопросами получения различных веществ с помощью микроорганизмов. Хотя сам процесс микробиологического синтеза известен и используется промышленностью давно, однако переработке этим способом нефтяных углеводородов до сих пор не уделяли должного внимания, несмотря на всю ее важность. Это касается физико-химических особенностей рассматриваемого процесса, так как микробиологические и биохимические аспекты его интенсивно изучаются. Во избежание перегрузки в данной статье не рассматриваются многие важные чисто биохимические и микробиологические вопросы, которые освещены в других обзорах.

Вопросам биосинтеза белков и витаминов уделялось большое внимание на проводившихся в последние годы VIII и IX Международных микробиологических конгрессах (Москва, 1962, 1966 г.г.), Конференции по прикладной микробиологии (Стокгольм, 1963 г.), Симпозиуме по нефтяной микробиологии (Чехословакия, 1964 г.) и других встречах ученых^{230–233}. В настоящее время большинство работ в области микробиологического синтеза посвящено накоплению экспериментальных данных по подбору сырья и культур микроорганизмов, изучению и выделению продуктов окисления, разработке методик контроля и исследования процесса, а также его аппаратурному оформлению. Подбираются условия проведения процесса, изучается питательная ценность продуктов окисления. Сделаны некоторые шаги в установлении механизма ферментативного окисления углеводородов, роли микроэлементов в этом процессе, исследуется механизм взаимодействия живой клетки с углеводородом.

Нам кажется, однако, что настало время более подробного изучения именно химической (особенно физико-химической) стороны микробиологического окисления углеводородов. Как и во всякой развивающейся отрасли науки, здесь имеется ряд фактов, о природе которых приводятся лишь правдоподобные догадки или противоречивые данные. Что касается изучения физико-химической стороны процесса, то в этом направлении работ почти совсем не проводили, хотя они имеют первостепенное значение для совершенствования технологии. Химикам, занимающимся исследованием этого процесса, необходимо использовать имеющиеся в литературе данные по подобным процессам (жидкофазное окисление углеводородов, реакции, протекающие в эмульсиях и т. п.).

Основной трудностью на пути исследования ферментативного окисления углеводородов является прежде всего сложность реакционной системы, что требует одновременных усилий исследователей многих специальностей, в том числе многих отраслей химии. Слабое развитие наших знаний о чисто химическом аспекте ферментативных процессов

и, в частности, в применении к микробиологическому окислению углеводородов также затрудняет работу исследователей в этой области. Развитие исследований сулит большие перспективы в создании новой технологии получения кормовых и пищевых продуктов, а также синтеза ценных органических веществ (аминокислот, витаминов и т. д.). Есть основания полагать, что разработка теории, выяснение общих закономерностей и, в частности, химического механизма процесса микробиологического окисления углеводородов будут существенно продвинуты в ближайшие годы. Совершенно ясно, что расширение и углубление знаний по механизму ферментативного окисления нефтяных углеводородов сделает реальным совершенствование существующих технологических процессов получения белковых веществ из нефти, а также организацию новых процессов избирательной переработки углеводородов нефти в важнейшие продукты и полу продукты промышленности органического синтеза.

За время подготовки статьи к печати появились новые работы о ферментативном окислении твердых *n*-парафинов различными группами микроорганизмов^{234, 235}. Неудовлетворительный рост некоторых углеводородокисляющих микроорганизмов на твердых парафинах в ряде случаев можно объяснить неустойчивостью дисперсий с этими парафинами. Даже в присутствии эмульгаторов измельченные твердые парафины в водной среде образуют укрупненные частицы, что затрудняет рост микроорганизмов. Миллер и Джонсон²³⁵ предлагают растворять твердые парафины в жидких углеводородах, которые сами не усваиваются данными микроорганизмами (или усваиваются в незначительной степени) и могут служить растворителями. Эти авторы выращивали *Candida intermedia* и *Canlida lipolytica* на эйкозане (C_{20}) и гексадекане (C_{16}), растворенных в пристане (2,6,10,14-тетраметилпентадекан), и отмечают хороший выход клеток. Однако число парафинов, которые можно при этом исследовать, ограничено их растворимостью в пристане.

В последнее время появились также работы, посвященные действию поверхностно-активных веществ на микроорганизмы, изучению связи между строением и функцией поверхностно-активных веществ^{236, 237}. Как свидетельствуют эти исследования, поверхностно-активные вещества взаимодействуют с клеточной стенкой, изменяя ее проницаемость и вызывая утечку жизненно важных составных частей протоплазмы (различных аминокислот и производных нуклеиновых кислот) вследствие нарушения осмотического равновесия. Поверхностно-активные вещества влияют также на локализацию ферментов внутри микроорганизмов и на взаимодействие ферментов. В зависимости от pH среды в присутствии поверхностно-активных веществ наблюдается либо повышение активности ферментов, либо угнетение их катализитического действия.

По-прежнему большое внимание уделяется вопросам микробиологического превращения ароматических углеводородов^{238, 239}, а также росту микроорганизмов на газообразных углеводородах^{240, 241}.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Лопатник, Микробиология, 33, 236 (1964).
2. Г. П. Славинина, Там же, 32, 403 (1963).
3. J. Takahashi, Y. Kawabata, K. Yamada, Agric. Biol. Chem., 29, 292 (1965).
4. Н. Д. Иерусалимский, Е. А. Андреева, С. А. Лирова, И. Т. Ермакова. Прикл. биохимия и микробиол., 1, 601 (1965).
5. K. Kobayashi, K. Yamada, J. Ferment. Assoc. Japan, 21, 407 (1963).

6. В. Н. Шапочкиков, И. Г. Орлова, Микробиология, **34**, 602 (1965).
7. A. Rieche, G. Hilgetag, A. Martin, M. Thonke, M. Logenz, Zbl. Bacteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. und Hyg., **118**, 53 (1964).
8. Н. Б. Градова, Л. К. Кручинина, Прикл. биохимия и микробиол., **3**, 315 (1967).
9. С. А. Лирова, Л. М. Глазунова, Н. Д. Иерусалимский, Там же, **3**, 413 (1967).
10. Э. Э. Бирштейхер, Нефтяная микробиология, Гостоптехиздат, М., 1957.
11. В. О. Таусон, Энергетика жизненных процессов, Изд. АН СССР, М., 1952.
12. В. И. Білай, М. М. Підоплічко, В. С. Гутиря, А. С. Бухало, Г. А. В'юн, П. М. Галич, Е. З. Коваль, В. Я. Масумяп, О. О. Мілько, Мікробіологічний журнал, **27**, 3 (1965).
13. Ван Да-Чэнъя, Ван Юй, **4**, 532 (1964); РЖХим., **1966**, 3Ф569.
14. T. L. Miller, M. J. Johnson, Biotechnol. Bioengng., **8**, 567 (1966).
15. M. Alexander, B. Lustigman, J. agric. and food chem., **14**, 410 (1966).
16. T. Aida, K. Yamaguti, J. agric. chem. Soc. Japan., **40**, 119 (1966); (перев. в со. Микробиологический синтез, **1967**, вып. 2, 1).
17. Т. А. Таусон, Микробиология, **8**, 530 (1939).
18. М. С. Матвеев, Химия и технол. топлив и масел, **5**, 34 (1966).
19. И. Г. Нетте, Н. Н. Гречушкина, И. Л. Работникова, Прикл. биохимия и микробиол., **1**, 167 (1965).
20. R. W. Traxler, Bitum. mater., vol. 1, Interscience, N. Y.—London—Sydney, **1**, 323 (1964).
21. R. W. Traxler, J. Robinson, D. Wetmore, J. appl. chem., **16**, 266 (1966).
22. Д. К. Керстен, Микробиология, **33**, 31 (1964).
23. T. C. Stadman, U. A. Bargé, J. Bacteriol., **1951**, 6167.
24. A. McFerson, Chem. Engng Progr., **61**, 101 (1965).
25. J. W. Foster, J. Microbiol. and Serol., **28**, 3 (1962).
26. W. J. Evans, J. Gen. Microb., **32**, 2 (1963).
27. F. Just, W. Schabel, Die Brauerei, wiss Beilage, **4**, 95 (1961).
28. Н. Фритше, V Междунар. биохим. конгресс, 2 секция, сб. реф., Изд. АН СССР, М., 1961, стр. 76.
29. Л. Д. Штурм, Е. П. Розанова, Микробиология, **32**, 1103 (1963).
30. А. Шампань, Ш. Верне, Б. Лен, Ж. Филоза, Нефтехимия, **3**, 5 (1963).
31. A. Champagnat, Industrie, **17**, 242 (1963).
32. Л. А. Горская, Р. А. Рогачева, сб. Микробиологический синтез, **1967**, вып. 3, 6.
33. А. Шампань, Ш. Верне, Б. Лен, Ж. Филоза, Микробиологическое де-парафинирование с целью получения БВК, VI Междунар. конгр. по нефти, Франкфурт, 1963.
34. A. Champagnat, Sci. Americain, **213**, 13 (1965).
35. L. Lefrançois, Inds. agric. et aliment, **1964**, 6.
36. A. Champagnat, B. Laine, Bull. Assoc. franç., **1964**, 163.
37. A. Champagnat, Rev. Inst. franc. pétrole, **1962**, 1372.
38. M. Grimberg, Seifen-Ole-Fette-Wachse, **92**, 109 (1966).
39. J. Senez, E. Azoulay, Ann. Inst. Pasteur, **38**, 868 (1960).
40. J. Senez, E. Azoulay, Simpos. Marine Microbiol., Springfield, ed. C. C. Thomas, **1963**, 464.
41. E. Azoulay, P. Couchoud-Beaumont, J. Senez, Ann. Inst. Pasteur, **107**, 520 (1964).
42. E. Azoulay, Bull. soc. franç. physiol. végét., **2**, 299 (1965).
43. А. П. Крючкова, Р. Н. Бравичева, Сб. Микробиологический синтез, **1965**, вып. 3, 1.
44. М. Г. Коломийцева, А. С. Скоропостижная, Г. К. Осипов, А. К. Запорожская, А. К. Руденко, Там же, **1966**, вып. 13, 6.
45. И. Н. Позмогова, Н. С. Курятов, Прикл. биохимия и микробиол., **2**, 640 (1966).
46. А. Н. Григорян, Н. Д. Гуляева, А. П. Ковалев, сб. Микробиологический синтез, **1967**, вып. 5, 6.
47. Е. И. Квасников, Д. М. Исакова, В. Т. Васкиньюк, Микробиология, **36**, 932 (1967).
48. Т. В. Финогенова, А. Б. Лозинов, В. М. Беликов, И. Т. Ермакова, Л. Н. Мунтян, Э. Н. Сафонова, Там же, **37**, 38 (1968).
49. З. П. Телегина, Там же, **36**, 67 (1967).
50. R. Scheide, Brauntweinwirtschaft, **106**, 373 (1966).
51. E. W. Hansen, R. E. Callio, Science, **125**, 1198 (1957).
52. Б. Магасалик, в кн. Регуляция клеточного обмена, Изд. АН СССР, М., 1962, стр. 117.

53. В. Н. Гершанович, Вестник АМН СССР, **1963**, в. 12, 74.
54. И. С. Попов, Тр. В Лен. Микологической конф., Л., **1960**, 35.
55. А. С. Спирин, Вестник АН СССР, **4**, 41 (1965).
56. Е. М. Губарев, Основные процессы обмена веществ у микробов, Изд. АН СССР, М., 1961, стр. 11.
57. Н. Д. Иерусалимский, Г. К. Скрябин, Изв. АН СССР, сер. биол., **1965**, 125.
58. R. E. Kallio, W. R. Finnerty, см. ⁴⁰, стр. 769.
59. А. П. Крючкова, Г. И. Воробьева, Микробиология, **32**, 856 (1963).
60. Н. Т. Семушкина, Н. И. Монахова, Гидролизная и лесохим. пром., **1962**, 35.
61. Г. П. Славнина, Микробиология, **33**, 851 (1964).
62. Л. Д. Штурм, Е. П. Розанова, Там же, **35**, 138 (1966).
63. T. L. Miller, M. J. Johnson, Biotechnol. and Bioengng., **6**, 299 (1964).
64. G. W. Fuhs, Arch. Microbiol., **39**, 374 (1961) (перев. в сб. Микробиологический синтез, **1965**, в. 1, 2).
65. Дж. Фостер, Доклад на заседании Моск. отд. Всес. микробиологического общ. при АН СССР, 1964, Изд. Всес. микробиол. общества, **1964**, 41.
66. M. J. Johnson, Chem. Ind., **36**, 272 (1964).
67. Н. П. Елинов, Автореф. докт. дисс., 1963, Л., Гос. ин-т усоверш. врачей им. С. М. Кирова.
68. Н. И. Елинов, Тр. В Лен. Микологической конф., Л., **1960**, 45.
69. V. Treccani, Progr. ind. microbiol., **4**, 2 (1964).
70. Н. П. Елинов, Патогенные дрожжеподобные организмы, «Медицина», М., 1964, стр. 59.
71. E. Schmidt, Unasylva, **7**, 152 (1953).
72. R. Kautzman, M. Lindemann, Die Hefen, т. 2, Nurnberg, 1962. Herausg. Dr. Ferdinand.
73. A. F. Wiley, F. M. Holderby, K. W. Fries, Food and feed yeast in the USA. 1943.
74. Р. В. Гивартовский, Пищевые дрожжи и их применение, Пищепромиздат, М-Л, 1930, стр. 38.
75. А. М. Лазарев, Е. А. Плевако, П. Н. Фишер, Белковые пищевые дрожжи, Пищепромиздат, М., 1942, стр. 27.
76. В. И. Шарков, И. А. Беляевский, Производство пищевых дрожжей из дресвины, Л., 1943, стр. 76.
77. О. П. Молчанова, Сб. Материалы конф. по лечебному питанию, «Медицина», М., 1942, стр. 41.
78. А. Залит, Молочная пром., **1959**, 56.
79. Ю. И. Кремер, А. А. Шмидт, Вопросы питания, **1961**, 32.
80. А. А. Стәфайчука, Тр. Днепропетровского ин-та по гидролизу растительных отходов сельского хозяйства, Сельхозгиз, **1940**, 287.
81. Е. И. Медведева, Р. Б. Зайденберг, С. З. Хайт, З. В. Левина, Прикл. биохимия и микробиол., **2**, 372 (1966).
82. А. П. Крючкова, П. Н. Фишер, Хим. наука и пром., **2**, 86 (1957).
83. Р. Блок, D. Bolting, Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов ИЛ, М., стр. 216 (1949).
84. Дж. Уайт, Технология дрожжей, Пищепромиздат, М., 1957, стр. 112.
85. C. Vergnet, Ind. chim. belge, **30**, 213 (1965).
86. О. П. Молчанова, Основы рационального питания, Медгиз, М., 1958, стр. 18.
87. I. Leopold, Ceskosl. biol., **3**, 235 (1945).
88. H. J. Burkert, в кн. Global impacts app. Microbiol., N.-Y.-London-Sydney, **1964**, 234.
89. Е. А. Плевако, Р. В. Гивартовский, Технология дрожжевого производства. Пищепромиздат, М., 1949, стр. 56.
90. М. Н. Мейсель, Усп. биолог. химии, **1**, 390 (1950).
91. Г. П. Славнина, Тр. Всес. НИИ геологоразведки нефт. ин-та, **41**, 308 (1964).
92. Г. И. Воробьева, Л. П. Самойлова, Л. М. Чаплина, М. Л. Беркович в сб. Микробиологический синтез, **1965**, вып. 9, 1.
93. А. М. Малков, Технология хлебопекарных и кормовых дрожжей, Пищепромиздат, М., 1962, стр. 134.
94. М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, «Мир», М., 1966.
95. B. N. Olson, M. J. Johnson, J. Bacteriol., **57**, 235 (1949).
96. И. Н. Позмогова, Прикл. биохимия и микробиол., **2**, 276 (1966).
97. И. Н. Позмогова, там же, **1**, 606 (1965).
98. Н. В. Степанова, Ю. М. Романовский, Н. Д. Иерусалимский, ДАН, **163**, 1266 (1965).
99. Н. Д. Иерусалимский, Микробиология, **30**, 818 (1961).

100. И. Н. Позмогова, И. Е. Ломова, М. И. Лакоза, Прикл. биохимия и микробиол., **2**, 505 (1966).
101. J. Malek, J. Ričica, Folia microbiologica, **10**, 301 (1965).
102. L. Lefrançois, Inds. agric. et aliment, **1964**, 61.
103. A. Toshinobu, Recent Progr. Microbiol., Toronto, Univ. Press, **1963**, 325.
104. E. L. Dulapet, Там же, стр. 317.
105. З. Г. Розумовская, Микробиология, **31**, 172 (1962).
106. Л. Начев, Р. Гешева, Там же, **3**, 739 (1964).
107. И. Т. Ермакова, сб. Микробиологический синтез, **1967**, вып. 3, 11.
108. С. Ф. Дронов, Л. М. Лупова, В. В. Белова, Там же, **1967**, вып. 3, 4.
109. М. И. Верховцева, Е. Л. Рубан, Н. Н. Суворов, Изв. АН СССР, сер. биол., **1967**, вып. 3, 374.
110. Y. Imada, J. Takahashi, K. Yamada, Biotechnol. and Bioengng., **9**, 45 (1967).
111. А. М. Безбородов, С. С. Урусова, Д. Н. Черменский, Л. М. Шульц, Микробиология, **32**, 385 (1963).
112. J. Senez, см. ⁸⁸, стр. 363.
113. K. Yamada, J. Takahashi, K. Kobayashi, Agric. and Biol. Chem., **27**, 773 (1963).
114. A. P. Sims, B. F. Folkes, Proc. Roy. Soc., **B159**, 479 (1964).
115. А. П. Крючкова, Г. И. Воробьев, Л. М. Бобры, Прикл. биохимия и микробиол., **1**, 78 (1965).
116. Y. Imada, O. Takahashi, K. Yamada, K. Uchida, K. Aida, Agric. and Biol. Chem., **30**, 487 (1966).
117. N. Vugt, H. Weissbach, J. Biol. Chem., **240**, 3064 (1965).
118. Н. Ниап, Progress in industr. microbiol., **5**, 56 (1966). (перев в сб. Микробиологический синтез, **1966**, вып. 6, 12).
119. K. Agima, S. Ogino, K. Yano, D. Tamura, Agric. and Biol. Chem., **29**, 1004 (1965).
120. В. М. Беликов, С. В. Гордиенко, Э. Н. Сафонова, сб. Микробиологический синтез, **1965**, вып. 10, 2.
121. Н. М. Эмануэль, Е. Т. Денисов, З. К. Майзус, Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе, Изд. АН СССР, М., 1965.
122. И. В. Березин, Е. Т. Денисов, Н. М. Эмануэль, Окисление циклогексана, Изд. МГУ, М., 1962.
123. Ш. де Дюв, Структурные компоненты клетки, ИЛ, М., 1962, стр. 65.
124. Ш. де Дюв, Структура и функции клетки, ИЛ, М., 1964, стр. 18.
125. А. Г. Середа, Автореф. кандид. дисс. Киев, 1964, Ин-т биохимии АН УССР.
126. Ю. Н. Карасевич, Микробиология, **31**, 2 (1962).
127. К. В. Косиков, ДАН, нов. сер., **80**, 105 (1951).
128. А. И. Опарин, Н. С. Гельман, И. Г. Жукова, ДАН, **99**, 593 (1954).
129. Ж. Сенез, см. ⁶⁵, стр. 67.
130. I. O. Harriss, Arch. Biochem. Biophys., **457**, 70 (1957).
131. T. A. Pederson, Physiologia plantarum, **16**, 151 (1963).
132. E. Azoulay, D. Senet, Ann. Inst. Pasteur, **107**, 520 (1964).
133. E. Azoulay, J. Chentean, J. Davidovics, Biochim. biophys. acta, **77**, 554 (1963).
134. R. L. Schuman, M. A. Farrell, R. W. Stone, J. Bacteriol., **1943**, 45.
135. J. Senet, E. Azoulay, Biochim. biophys. acta, **47**, 2 (1961).
136. А. Д. Гололобов, Н. К. Грачева, сб. Микробиологический синтез, **1966**, вып. 1, 5.
137. В. А. Яковлев, Кинетика ферментативного катализа, «Наука», М., 1965, стр. 27.
138. О. Р. Поляновский, в кн. Ферменты, Изд. АН СССР, М., 1964, стр. 56.
139. Д. Кошланд, в кн. Горизонты биохимии, «Мир», М., 1964, стр. 83.
140. А. Е. Браунаштейн, М. Я. Карпейский, Р. М. Хомутов, см. ¹³⁸, стр. 142.
141. А. А. Баландин, Биохимия, **23**, 655 (1958).
142. А. А. Баландин, Усп. химии, **31**, 1265 (1962).
143. В. Л. Кретович, Изв. АН СССР, сер. биол., **1961**, 525.
144. В. Л. Кретович, Биохимия, **23**, 335 (1958).
145. А. А. Баландин, Там же, **23**, 475 (1958).
146. K. Laidler, The Chemical Kinetics of Enzyme Action, Oxford, 1958.
147. K. Laidler, Trans. Faraday Soc., **51**, 550 (1955).
148. M. J. Johnson, Chem. Ind., **1964**, 36.
149. А. П. Крючкова, Г. И. Воробьев, Гидролизная и лесохим. пром., **1964**, 86.
150. R. W. Traxler, Yale Scient. Mag., **38**, 18 (1938).
151. М. В. Поморцева, К. А. Соловьева, Микробиология, **34**, 598 (1965).
152. Т. В. Финогенова, В. М. Беликов, И. Т. Ермакова, Л. Н. Мунтян, Прикл. биохимия и микробиол., **2**, 156 (1966).

153. Н. В. Поморцева, К. А. Соловьева, Микробиология, **34**, 598 (1965).
154. R. J. Egerton, M. D. Lilly, Biotechnol. and Bioengng, **7**, 309 (1965).
156. J. E. Stewart, W. R. Finnerty, R. E. Kallio, Science, **132**, 3475 (1960).
156. L. Canonica, Rivista Italiana delle sostanze grasse, **41**, 505 (1964); (перев. в сб. Микробиологический синтез, **1965**, вып. 2, 11).
157. J. E. Stewart, R. E. Kallio, J. Bacteriol., **78**, 441 (1959).
158. J. W. Foster, Arch. Microbiol., **92**, 35 (1960).
159. В. М. Солонін, Мікробіологічний журнал, **28**, 90 (1966).
160. A. C. van der Linden, G. J. E. Thijssse, Adv. Enzymol. and Related Subjects Biochem., т. 27, N.-Y.-London-Sydney, Interscience, **1965**, 469.
161. R. Shaw, Nature, **209**, 1369 (1966).
162. E. R. Leadbetter, J. W. Foster, Arch. Microbiol., **35**, 92 (1960).
163. V. Treccani, L. Canonica, Ann. Microbiol., **5**, 162 (1953).
164. V. Treccani, L. Canonica, Atti Congr. int. Microbiol., **1**, 274 (1953).
165. V. Treccani, L. Canonica, M. Girolamo, Ann. Microbiol., **6**, 183 (1956).
166. E. R. Leadbetter, J. W. Foster, Bact. Proc., **1958**, 118.
167. E. R. Leadbetter, J. W. Foster, Arch. Microbiol., **30**, 91 (1958).
168. E. R. Leadbetter, J. W. Foster, Arch. biochem. biophys., **82**, 491 (1959).
169. E. R. Leadbetter, J. W. Foster, Arch. Microbiol., **35**, 92 (1960).
170. E. Zajic. Developments in industrial microbiology, **6**, 16 (1965); (перев. в сб. Микробиологический синтез, **1966**, вып. 16, 6).
171. D. Schissler, J. Bact., **78**, 441 (1959).
172. J. E. Stewart, R. E. Kallio, Bact., Proc., **1959**, 118.
173. R. E. Kallio, W. R. Finnerty, см.⁴⁰, стр. 149.
174. W. R. Finnerty, R. E. Kallio, J. Bacteriol., **87**, 1261 (1964).
175. R. W. Hansen, R. E. Kallio, Science, **125**, 1198 (1957).
176. E. R. Leadbetter, J. W. Foster, Nature, **184**, 1498 (1959).
177. F. M. Muller, A. van Leenwenhoek J. Microbiol. and Serol., **23**, 369 (1957).
178. D. M. Updegraff, G. B. Wren, Appl. Microbiol., **2**, 309 (1954).
179. В. А. Кузнецова, В. М. Горленко, Прикл. биохимия и микробиол., **1**, 623 (1965).
180. A. S. Kester, J. W. Foster, J. Bacteriol., **85**, 4 (1963).
181. G. J. E. Thijssse, Biochim. biophys. acta, **84**, 2 (1964).
182. Л. Д. Штурм, Микробиология, **27**, 783 (1958).
183. R. Huubregste, A. C., van der Linden, A. van Leenwenhoek J. Microbiol. and Serol., **30**, 185 (1964).
184. J. Bruyn, Meded. vlaamsche Acad., **C57**, 41 (1954).
185. J. W. Foster, A. van Leenwenhoek J. Microbiol. and Serol., **28**, 242 (1962); (перев. в сб. Микробиологический синтез, **1966**, вып. 2, 7).
186. R. Wieland, G. Griss, B. Haccins, Arch. Microbiol., **28**, 383 (1958).
187. D. Ooyma, J. W. Foster, A. van Leenwenhoek J. Microbiol. and Serol., **31**, 45 (1965); (перев. в сб. Микробиологический синтез, вып. 2, 7).
188. B. Imelik, C. r., **226**, 2082 (1948).
189. C. Colla, V. Treccani, Ann. Microbiol., **10**, 77 (1960).
190. H. H. Tabak, C. W. Chambers, P. W. Kabler, J. Bacteriol., **87**, 910 (1964).
191. K. Yamada, D. Takahashi, Agric. and biolog. chem., **28**, 943 (1965).
192. C. Arnaudi, L. Canonica, V. Treccani, Ricerca scient., **25**, 3244 (1955).
193. S. Dagley, P. J. Chapman, D. T. Gibson, J. M. Wood, Nature, **202**, 7775 (1964).
194. R. Wieland, G. Griss, B. Haccins, Arch. Microbiol., **28**, 383 (1958).
195. E. K. Marr, R. W. Stone, Bact. Proc., **1958**, 123.
196. V. Treccani, B. Bianchi, Atti Congr. Naz. Microbiol. IX, Biochem. J., **41**, 373 (1959).
197. N. Walker, G. H. Wiltshire, J. Gen. Microbiol., **8**, 273 (1953).
198. M. Malesset-Bras, E. Azoulay, Ann. Inst. Pasteur, **109**, 894 (1965).
199. M. Malesset-Bras, E. Azoulay, Там же, **109**, 106 (1965).
200. Р. М. Налбандян, А. Ф. Ванин, Л. А. Блюменфельд, Тр. Моск. общ. испыт. природы, отд. биол., **16**, 187 (1966).
201. T. C. Hollis, M. M. Weber, J. Biol. Chem., **240**, 1783 (1965).
202. Ю. М. Петрусевич, А. Г. Коноплянников, Тр. Моск. общ. испыт. природы, отд. биол., **16**, 59 (1966).
203. Н. М. Эмануэль, Тр. VIII Междунар. противоракового конгресса, Медгиз, М., 1963, т. II, стр. 117.
204. Н. М. Эмануэль, Л. П. Липчина, ДАН, **121**, 141 (1958).
205. Н. М. Эмануэль, Л. П. Липчина, ДАН, **124**, 1157 (1959).
206. Н. М. Эмануэль, Л. П. Липчина, ДАН, **130**, 221 (1960).
207. В. О. Таусон, Основные положения растительной биоэнергетики, Изд. АН СССР, М., 1950, стр. 443.

208. D. Koshland, Adv. Enzymol., **22**, 45 (1960).
209. Н. С. Гельман, Автореф. докт. диссерт., Ин-т биохимии АН СССР им. А. Н. Баха, М., 1963.
210. М. Н. Мейссель, Тр. Ин-та микробиологии АИ СССР, **1959**, в. 6, 185.
211. А. Ротштейн, Тр. V Междунар. биол. конгресса, симпозиум, II, стр. 243, Изд. АН СССР, М., 1961.
212. Л. Е. Рубан, Изв. АН СССР, сер. биол., **1962**, 461.
213. Ф. Сикевич, О значении внутриклеточной структуры для регуляции обмена, Изд. АН СССР, М., 1962.
214. М. В. Федоров, Изв. АН СССР, сер. биол., **1957**, 112.
215. D. R. Biggs, A. W. Limape, Biochim. biophys. acta, **78**, 785 (1963).
216. A. W. Limape, J. L. Still, Там же, **16**, 305 (1955).
217. P. Mitchell, Nature, **180**, 134 (1957).
218. С. С. Строев, Тр. Лен. хим.-фарм. ин-та, **18**, 109 (1965).
219. M. Okuda, H. Takada, J. Biol. Osaka City Univ., **14**, 141 (1963).
220. Р. В. Кучер, А. И. Юрженко, М. А. Ковбуз, ДАН, **117**, 638 (1957).
221. Р. В. Кучер, А. И. Юрженко, М. А. Ковбуз, в сб. Окисление углеводородов в жидкой фазе, Изд. АИ СССР, М., 1959, стр. 212.
222. Р. В. Кучер, С. Д. Казьмин, А. И. Юрженко, Сб. работ Ин-та физико-органической химии АН БССР, **8**, 132 (1960).
223. Р. В. Кучер, М. А. Ковбуз, ЖФХ, **33**, 429 (1959).
224. Р. В. Кучер, М. А. Ковбуз, Э. М. Бугрова, И. М. Васильевич, Ж. прикл. химии, **35**, 170 (1962).
225. Р. В. Кучер, С. Д. Казьмин, Нефтехимия, **3**, 371 (1963).
226. А. Г. Пасынский, Биофизическая химия, М., 1963.
227. J. W. Mc Bain, Solubilization in detergent action, 1942.
228. J. P. Neppesey, J. Inst. Brew., **70**, 337 (1964).
229. А. Г. Пасынский, Усп. соврем. биол., **43**, 1263 (1957).
230. О Первом Междунар. симпозиуме в Италии, 1960; Микробиология, **30**, 371 (1961).
231. Конфер. по прикл. микробиологии, Стокгольм, 1963; Там же, **32**, 1105 (1963).
232. IX Междунар. конгр. по микробиологии, Москва, 1966; Тезисы докладов, «Медицина», М., 1966.
233. М. В. Иванов, Г. А. Могилевский, Г. П. Славнина, Изв. АИ СССР, сер. геол., **5**, 799 (1965).
234. T. Miller, M. Johnson, Biotechnol. and bioengng., **8**, 549 (1966).
235. Е. З. Коваль, В. Я. Масумяи, А. А. Грушевська, Мікробіологічний журнал, **30**, 309 (1968).
236. A. Obajasi, J. agric. chem. Soc. Japan, **40**, 53 (1966) (перев. в сб. Микробиологический синтез, **1967**, вып. 14, 23).
237. С. С. Строев, Н. П. Елисов, Микробиология, **36**, 451 (1967).
238. Е. М. Юровская, Л. Е. Ботвицова, Л. Ф. Ерусалимская, там же, **37**, 655 (1968).
239. D. Gibson, J. Wood, P. Chapman, S. Dagle, Biotechnol. and bioengng., **9**, 33 (1967).
240. P. S. Vargy, M. J. Johnson, Appl. microbiol., **15**, 1473 (1967).
241. Е. И. Квасников, Ю. Р. Малашенко, В. А. Романовская, Э. Ф. Запотылько, Микробиология, **37**, 662 (1968).

Донецкий государственный университет,
Донецкое отделение института
физико-органической химии АН УССР