

## ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ТОПЛИВ

*Варфоломеев С. Д., Калюжный С. В., Медман Д. Я.*

Освещены химические аспекты биотехнологии получения топлив, потенциальные ресурсы и возможности биотопливной технологии. Рассмотрено современное состояние научных исследований по получению биогаза (смесь метана и углекислого газа), этанола, ацетона, бутилового спирта и водорода из биомассы. Проанализированы технологические особенности и экономические аспекты перечисленных выше процессов.  
Библиография — 213 ссылок.

### Оглавление

I. Потенциальные ресурсы и возможности биотопливной технологии . . . . .	1201
II. Биогаз . . . . .	1203
III. Этанол . . . . .	1213
IV. Ацетано-бутиловое брожение . . . . .	1219
V. Водород . . . . .	1224
VI. Заключение . . . . .	1227

Последнее десятилетие характеризуется все возрастающим интересом к проблеме освоения возобновляемых источников энергии. Одно из главных направлений этой работы связано с использованием солнечной энергии. В последние годы существенное развитие получают биотехнологические способы конверсии солнечной энергии в топливо. Мировой интерес к данной проблеме высок, ежегодно проводится большое число симпозиумов, конференций и семинаров.

Новое научно-техническое направление «топливо из биомассы» достаточно активно развивается в нашей стране [1—6]. Ряд разработок вышел на уровень технических решений, другие проходят стадию лабораторного исследования и опытного освоения.

### I. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РЕСУРСЫ И ВОЗМОЖНОСТИ БИОТОПЛИВНОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Биомасса — самая дешевая и крупномасштабная форма аккумулируемой и возобновляемой энергии. Под термином биомасса мы подразумеваем любые материалы биологического происхождения, продукты жизнедеятельности и органические отходы, образующиеся в процессе их переработки. Ежегодный прирост биомассы на Земле составляет 200 млрд. т., что составляет в энергетическом эквиваленте  $3 \cdot 10^{21}$  Дж [7, 8].

Системы преобразования энергии путем получения биотоплив достаточно разнообразны и включают в себя процессы получения метана, водорода, этанола, метанола, бутилового спирта и ацетона, ряда других компонентов, представляющих интерес как топливные материалы. Общие возможности биотопливной технологии достаточно высоки и обсуждаются в обзоре [9].

Потенциальным сырьем для производства биотоплива могут служить продукты естественной вегетации, отходы сельского хозяйства, разнообразные отходы промышленности и коммунального хозяйства и, наконец, урожай специально выращиваемых, так называемых «энергетических» плантаций (сахарный тростник, маниок, картофель, микроводоросли и т. д.).

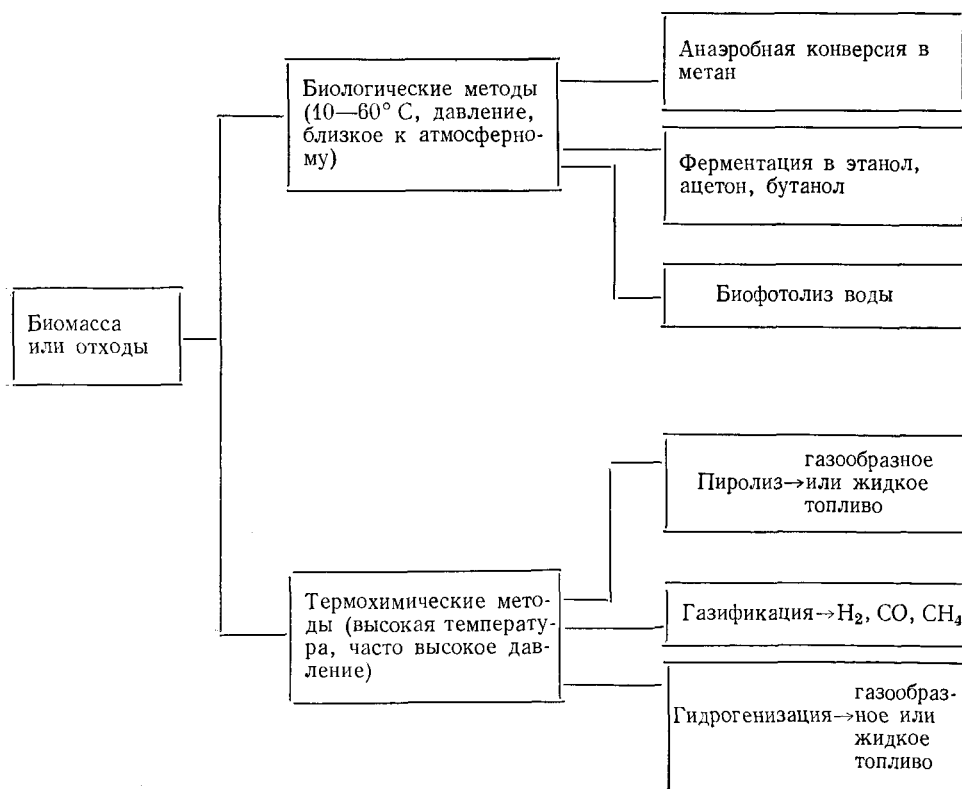
Таблица 1

## Энергоемкость некоторых видов топлив, отходов и биомассы [10]

Топлива	Энергоемкость, МДж/кг	Биомасса и отходы	Энергоемкость МДж/кг
Уголь	29,3	Типичная биомасса	14,0
Кокс	28,4	Бактерии	22,7
Торф сухой, беззольный	21,0	Микроводоросли	20,0
Торф, высушенный воз- духом (25% H <sub>2</sub> O)	16,3	Солома (15% H <sub>2</sub> O)	14,2—15,5
Бурый уголь	14,7	Солома сухая	17,0
Лигнит, коммерческое топливо	26,8	Травянистые материалы	17,5
Неочищенная нефть	42,3	Натуральные растения	18,3
Дизельное топливо	41,0	Древесина (мокрая)	16,0
Бензин	43,5	Древесина сухая без- зольная	18,7
Керосин	45,6—47,8	Неочищенные отходы	9,0—11,0
Очищенный газ	41,0	Отходы топлива	14,7—15,6
Натуральный газ <sup>a</sup>	31,7—39,8	Навоз крупного рогатого скота	21,4
Коксовый газ <sup>a</sup>	16,1	Свиной навоз	20,0
Водород <sup>a</sup>	12,1	Моносахариды	15,5
Метан <sup>a</sup>	37,7	Полисахариды	17,6
Биогаз (60% CH <sub>4</sub> ) <sup>a</sup>	22,3	Лигнин	31,1
Метанол	22,4	Белок	23,9
Этанол 95%	28,2	Жир	31,4
Этанол 100%	29,7	Карбогидраты	16,7—17,6
Изопропанол	33,0	Неочищенное волокно	18,8—19,7
n-Пропанол	33,6		
n-Бутанол	36,2		

<sup>a</sup> Энергоемкость в МДж/м<sup>3</sup>.

Энергоемкость некоторых видов топлив, отходов и биомассы приведена в табл. 1. Для многих материалов самым простым способом получения из них энергии является сжигание. Другие методы переработки исходного сырья приведены на следующей схеме:



Принципиально важны оценки потенциального вклада биотоплив в суммарную энерговооруженность общества. Очевидно, что для развивающихся стран, с относительно низкой энерговооруженностью, расположенных в зонах высокой биопродуктивности, биотопливная технология может составить основу новой энергетики. Для высокоразвитых стран оценки процентного вклада биотоплив оживленно дискутируются в литературе.

В настоящее время использование биомассы в США составляет 2% общего потребления энергии (1,5 квад/г или  $1,6 \cdot 10^9$  ГДж/г)<sup>1</sup>. Различные оценки на уровне 2000 г. дают от 4 квад/г. ( $4,2 \cdot 10^9$  ГДж/г.) до 17 квад/г. ( $1,8 \cdot 10^{10}$  ГДж/г.). Последняя величина составляет 15—20% общего энергопроизводства США [11].

Значительное внимание уделено перспективам использования возобновляемых источников энергии в Европе. Детально и тщательно проанализирована проблема получения биогаза для различных европейских стран в работах [10—12]. Основной вывод этих исследований заключается в том, что биотоплива будут играть существенную роль в энергетике этих стран. На уровне 2000 г. вклад биотехнологии получения топлива в общей энергетической потребности стран «Общего рынка» будет составлять 5—10%. Для сравнения укажем, что производство гидроэнергии в общем балансе энергии составляет всего лишь 2%.

Анализируется роль биомассы в энергообеспечении стран Латинской Америки. Показано, что 10—20% общих потребностей в энергии стран Латинской Америки, могут быть покрыты путем использования биомассы и биотехнологии ее конверсии в топливо [13].

Энергетическая программа Китая обсуждается в работах [14, 15]. Показано, что до 30% энергообеспечения страны может быть реализовано путем использования биотоплив.

Экологические проблемы использования биомассы и связанные с этим преимущества обсуждаются в работе [16].

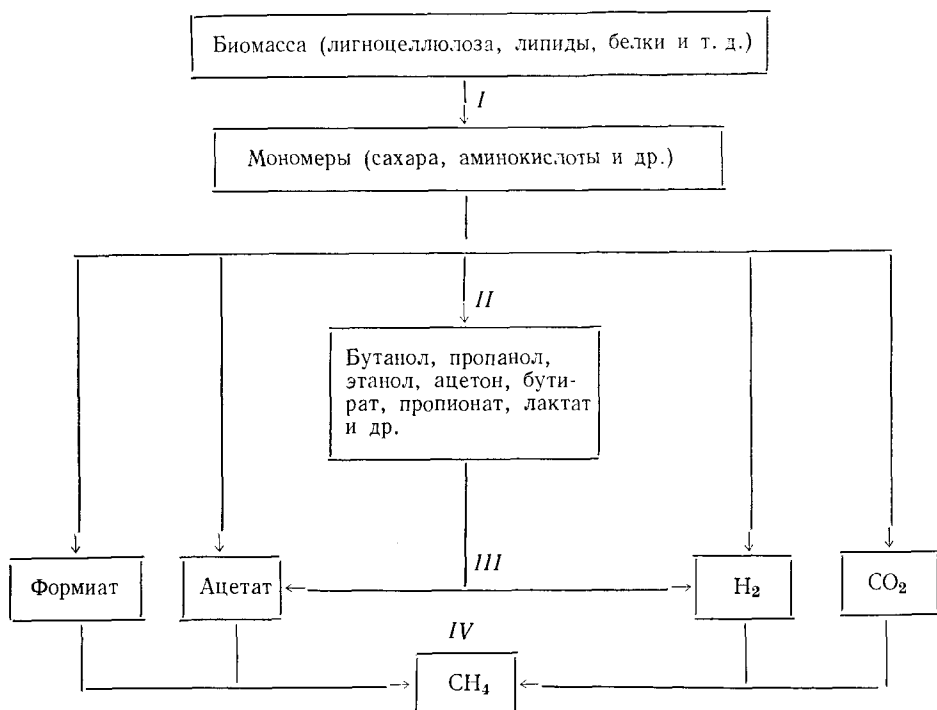
## II. БИОГАЗ

Наиболее развитой представляется технология получения биогаза (смеси 50—80% метана и 20—50% углекислоты) путем анаэробной конверсии различного растительного сырья и органических отходов [17—20]. В настоящее время работы в этой области ведутся как в рамках фундаментального исследования процесса образования метана сложными микробными ассоциациями, так и в рамках создания усовершенствованной технологии с целью интенсификации процесса.

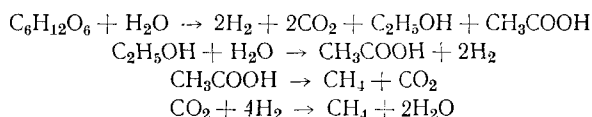
### 1. Основы получения метана

Анаэробная конверсия биомассы в метан (метановое брожение) — сложный многоступенчатый распад разнообразного органического материала в анаэробных условиях под действием бактериальной флоры, конечным результатом которого является образование метана и углекислого газа. Согласно современным представлениям, анаэробное превращение практически любой биомассы в метан происходит через четыре последовательных этапа: фаза гидролиза (расщепления) сложных биополимерных молекул (белков, целлюлозы, липидов и др.) на более простые, например мономеры: аминокислоты, углеводы и др.; фаза ферментации образовавшихся мономеров до еще более простых веществ — низших кислот и спиртов; ацетогенная фаза (образование  $H_2$ ,  $CO_2$ , формиата и ацетата) и непосредственно метаногенная фаза, которая ведет к конечному продукту расщепления — метану [19, 21]:

<sup>1</sup> Один квад соответствует  $10^{15}$  британских термических единиц, каждая из которых равна  $1,06 \cdot 10^9$  ГДж. Эта величина соответствует приблизительно 50 млн. т. угля.



В работах [21—29] описано изучение кинетики метаногенеза из различных субстратов (целлюлозы, гемицеллюлоз, моносахаров, этанола, метанола, бутирата, ацетата), построены кинетические схемы и созданы компьютерные модели, описывающие процессы образования метана в таких системах, в присутствии природных метаногенных ассоциаций, ассоциации *Methanobacillus kuznescoyii* и чистой культуры *Methanosarcina vacuolata*. Для примера на рис. 1 приведена динамика анаэробной конверсии глюкозы в метан, в присутствии метаногенной ассоциации *Methanobacillus kuznescoyii*. Громадный экспериментальный материал, накопленный при изучении этого процесса, обобщен в виде следующей кинетической схемы:



Первые две реакции осуществляет неметаногенный микроорганизм по пути Эмбдена — Мейергофа, третью и четвертую — ацетатиспользующий и водородиспользующий метаногены.

На основании предложенной кинетической схемы была создана математическая модель процесса, представляющая собой систему девяти нелинейных дифференциальных уравнений [27—29]. Адекватность предложенной модели проверена решением так называемой прямой задачи. Решение же обратной задачи позволило определить из имеющихся экспериментальных данных кинетические параметры и константы процесса конверсии глюкозы в метан. Математические расчеты подтверждают хорошее качество описания эксперимента.

Метановое брожение может протекать в диапазонах температур от 10 до 65°С. Показано, что термофильное метановое брожение (45—65°С) в 2—3 раза интенсивнее мезофильного брожения (25—30°С), причем, изменение температуры влияет лишь на скорость процесса, но не на качественный состав образующихся продуктов.

Кислотогенный этап, определяемый деятельностью первичных анаэробов, протекает при pH от 5 до 6,5—7 и характеризуется интенсивным развитием бактерий, сбраживающих свободные углеводы. Этот период

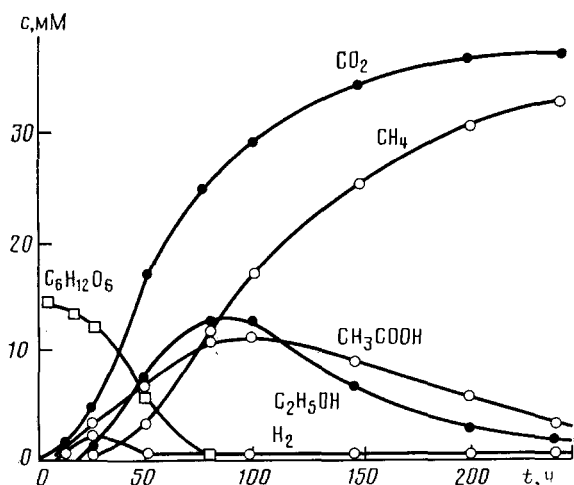


Рис. 1. Динамика анаэробной конверсии глюкозы в присутствии ассоциации *Methanobacillus kuznesceovii* [24]

сопровождается уменьшением содержания углеводов в среде, снижением величины рН среды, возрастанием общего содержания летучих жирных кислот, представленных муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной и другими кислотами. Преобладают в этот период пропионовая и масляная кислоты [17, 21, 30]. Микробиологические и биохимические процессы этой стадии изучены еще недостаточно [17, 20, 34].

Среди обширной группы кислотогенных бактерий особое значение имеют ацетогенные, молочнокислые и маслянокислые бактерии, а также продуценты капроновой и янтарной кислот, этанола, бутанола и других низших спиртов и кетонов (в литературе всю эту группу часто называют бактерии, синтезирующие растворители).

В последние годы наметился определенный интерес к всестороннему изучению анаэробных бактерий кислотогенной стадии, представляющих важное значение не только с позиций метангенерирования, но и являющихся непосредственно продуцентами биотопливных веществ.

## 2. Метанобразующие бактерии

Метаногены являются облигатными анаэробами, чувствительными к кислороду. Окислительно-восстановительный потенциал среды их роста составляет —300 мВ и ниже [31]. На сегодняшний день известно свыше 45 видов метанобразующих бактерий.

В зависимости от видов метанобактерии могут использовать в качестве источников энергии ограниченное количество субстратов (табл. 2). Среди них наиболее важным является ацетат, который занимает первое место среди предшественников (более 75%) [17, 23—29, 32—35]. За ацетатом следует углекислота [26—29, 36—38], формиат, метанол [22,

Таблица 2

Химические реакции, осуществляемые метаногенами [54]

Химические реакции	$\Delta G'_0$ на $\text{CH}_4$ (кДж/моль)
$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	—139
$4\text{HCOO}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O} + 3\text{CO}_2$	—119
$4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$	—186
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	—31
$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	—103
$4\text{CH}_3\text{NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$	—75
$2(\text{CH}_3)_2\text{NH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$	—74
$4(\text{CH}_3)_3\text{N} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_3$	—75

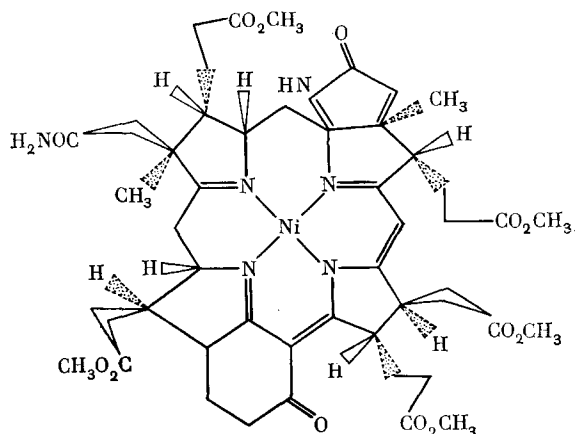


проявляющий гидрогеназную активность. Из этого комплекса были выделены четыре компонента: три белка ( $A_1$ ,  $A_2$  и  $A_3$ ) и кофермент ФАД [52].  $A_1$  — кислород-резистентная гидрогеназа, которая использует кофермент  $F_{420}$  как субстрат. Гидрогеназа  $A_1$  может быть идентична коферменту  $F_{420}$ -восстанавливающей гидрогеназе, выделение которой описано в [53]. Соединения  $A_2$  и  $A_3$  — кислород-лабильные белки. Предполагают, что  $A_2$  может участвовать в восстановлении как на формильном уровне, так и как активатор метилкофермента М редуктазной системы [54]. Функция  $A_3$  пока непонятна.

Компонент В — кислород-чувствительный, термостабильный кофактор [51], имеющий молекулярный вес около 1000 Д и содержащий аденозиновый остаток [54]. Каталитические количества АТФ и  $Mg^{2+}$  требуются для функционирования метилкофермента М редуктазной системы. Вероятно, АТФ активирует ферменты или связанные с ферментами коферменты за счет реакций ацилирования и фосфорилирования [55].

Метилкофермент М редуктаза представляет собой кислородстабильный белок, состоящий из трех субъединиц и имеющих максимум поглощения около 425 нм [56]. В качестве простетических групп выступают две молекулы недавно обнаруженного фактора  $F_{430}$  [57].

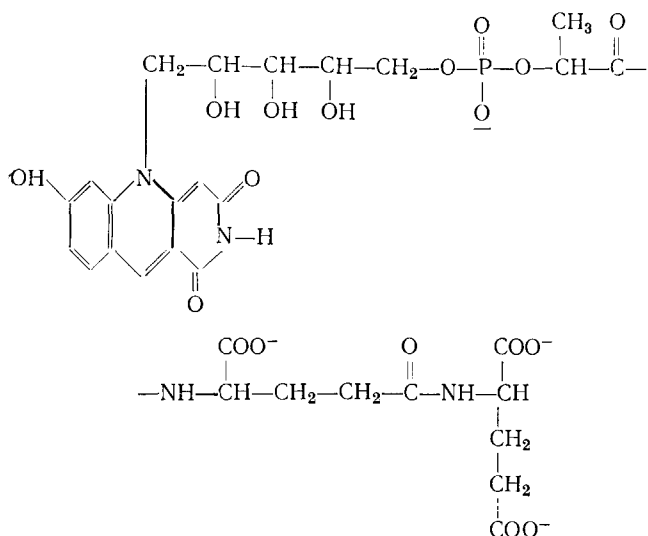
Фактор  $F_{430}$ , названный так после обнаружения характеристического максимума его поглощения при 430 нм [58] является никельсодержащим тетрапирролом [59—65]. Структура этого хромофора, модифицированного метилированием карбоксиметил- и карбоксиэтилгрупп установлена Пфальцем и соавт. [66]:



Фактор  $F_{430}$  обычно образует комплексы с коферментом М в соотношении  $\sim 1:1$  и комплекс обычно обозначается  $CoMF_{430}$  [67].

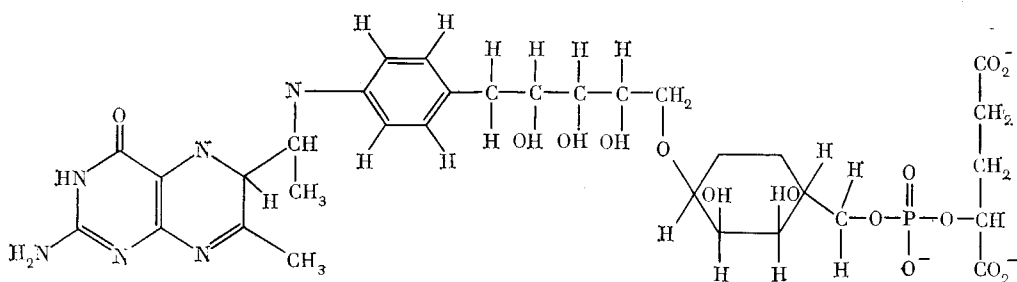
Функция  $CoMF_{430}$  в процессе метанообразования до конца не установлена. С химической точки зрения это соединение вероятнее всего выступает как переносчик электрона [54].

Образование метана из углекислоты представляет собой перенос восьми электронов от водорода на  $CO_2$ . Как свидетельствуют данные по фракционированию изотопов *M. thermoautotrophicum*,  $H^+$  в метан переходит из воды,  $H_2$  служит только донором электронов, а углекислота используется в газообразной форме [70, 71]. Переносчиком электронов в этом процессе выступает кофермент  $F_{420}$ , получивший название по максимуму флуоресценции в окисленной форме, впервые описанный в 1972 г. и имеющий низкий окислительно-восстановительный потенциал ( $E_0 = -0,34$  отн. н. в. э.) [72—74]



Это соединение является первичным электронным акцептором гидрогеназы [39, 52, 53], формиадегидрогеназы [75—77],  $F_{420}$  — зависимой НАДФ-редуктазы [78] и является электронным донором на терминальной стадии восстановления  $\text{CO}_2$ . Более того,  $F_{420}$  — это донор электронов для двух критических реакций клеточного синтеза, осуществляемых пируватдегидрогеназой и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназой.

В 1978 г. эксперименты с меченым  $^{14}\text{CO}_2$  показали, что за время от 2 до 20 с 25—50% метки связывается в соединение, дающее яркую желтую флуоресценцию [36]. Эти результаты позволили предположить, что соединение позднее идентифицированное как 5,10-метенил-5,6,7,8-тетрагидрометаноптерин (5,10-метенил-ТГМП) [80] является интермедиатом при восстановлении  $\text{CO}_2$  до  $\text{CH}_4$ . После инкубации, при невозможности восстановления условий, 5,10-метенил-ТГМП превращается в соединение, имеющее уже голубую флуоресценцию и являющееся метаболитическим предшественником 5,10-метенил-ТГМП (оно не содержит  $\text{C}_1$ -единицы от  $\text{CO}_2$ ). Это соединение названо метаноптерин [81]. Метаноптерин выделен из клеток *Methanobacillus thermoautotrophicum* в 1983 г. [82]. Его структура определена в 1984 г. с использованием ЯМР-спектроскопии высокого разрешения (500 МГц) комбинированным методом ЯМР  $^1\text{H}$  и ЯМР  $^{13}\text{C}$  [83]:



*Methanosarcina barkeri* содержит другое метаноптериновое производное, названное сарцианптерин. Отличие от метаноптерина заключается в наличии глутаминовой кислоты, присоединенной к  $\alpha$ -гидроксиглутаровой кислоте [81].

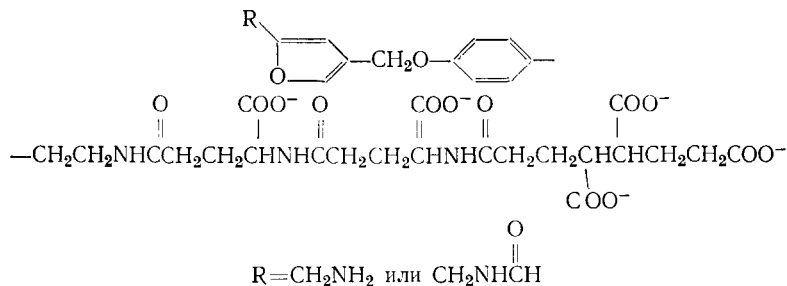
Кратковременная инкубация клеточной суспензии *M. thermoautotrophicum* с  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  (в атмосфере водорода) и последующее выделение 5,10-метенил-ТГМП показали, что метка присутствует в виде метенильной ( $=\text{CH}-$ ) группы [54].

Таким образом, метаноптерин выступает как  $\text{C}_1$ -переносчик в двух последовательных стадиях восстановления  $\text{CO}_2$ , что проявляется в обра-



зовании метилен-ТГМП и метил-ТГМП соответственно [54]. Экспериментальное подтверждение таких процессов получено в работах [79, 84].

Прямое доказательство роли метаноптерина при восстановлении  $\text{CO}_2$  до метана сделано в работе [15], где показано, что стимулированное коферментом М поглощение  $\text{CO}_2$  и, так называемый, RPG-эффект (см. ниже) требуют согласованного действия двух стабильных к кислороду и нагреванию соединений, одно из которых метаноптерин. Второе соединение, получившее название CDR-фактор ( $\text{CO}_2$ -восстанавливающий фактор), было открыто в 1982 г. [86] и является еще одним коферментом метаногенов; CDR-фактор встречается в двух формах, а именно, как свободный амин и как формамид:



В последнем случае, как предполагают, формильная группа берет происхождение от  $\text{CO}_2$ , так как именно эта форма накапливается в реакционной смеси при инкубации в атмосфере  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$  в отсутствие метаноптерина. Это доказывает, что CDR-фактор действует как  $\text{C}_1$ -переносчик раньше, чем ТГМП-производное. В литературе встречается также другое название CDR-фактора — метанофуран [87]. Активация  $\text{CO}_2$  протекает за счет энергии, получаемой из АТФ [89]. Энергетически предпочтительным типом  $\text{CO}_2$ -фиксации является восстановительное карбоксилирование.

Важным представляется объяснение так называемого RPG-эффекта [90]: резкого увеличения восстановления  $\text{CO}_2$  при добавлении в реакционную смесь  $\text{CH}_3\text{—S—CoM}$ . Такой эффект дает и серия на первый взгляд разнородных соединений: серин [54], формальдегид, гидроксиметилкофермент М [91], пируват, *L*-кетоглутарат, *L*-малат и изоцитрат [92]. Общее свойство этих соединений заключается в том, что все они могут выступать донорами  $\text{C}_1$ -интермедиатов на различных стадиях восстановления: формильной группы (пируват, *L*-кетоглутарат, малат и изоцитрат),  $=\text{CH—}$  (серин, формальдегид, гидроксиметилкофермент М) и метильной группы ( $\text{CH}_3\text{—S—CoM}$ ). Кроме этого, RPG-эффект ясно указывает на прямую связь между терминальной (восстановления  $\text{CH}_3\text{—S—CoM}$ ) и начальной (активация  $\text{CO}_2$ ) стадиями метаногенеза [47, 91].

Несмотря на принципиальную правильность схемы метаногенеза, предложенной Баркером, она все же носит слишком общий характер. За последние 30 лет предпринималось несколько попыток конкретизировать эту схему [46, 88], но недостаточная изученность биохимии метаногенов не позволяла выйти за рамки общих рассуждений и предположений. И только в 1984 г. Келтъенс, суммировав новейшие данные, предложил молекулярную модель образования метана из  $\text{CO}_2$  и водорода [54].

Модель Келтьенса исходит из предпосылки, что активация  $\text{CO}_2$  осуществляется метилредуктазной системой (рис. 2). Одноэлектронное восстановление комплекса  $\text{CH}_3\text{SCoMF}_{430}$  приводит к образованию метана и высокоактивного тиул-радикала, который активирует и захватывает  $\text{CO}_2$  с образованием тиокарбоксилрадикала. Возможность существования тиул-радикала в молекулярных системах образования метана доказана экспериментально [69]. Образовавшийся тиокарбоксилрадикал подвергается атаке CDR-фактора, сопряженной с одноэлектронным вос-

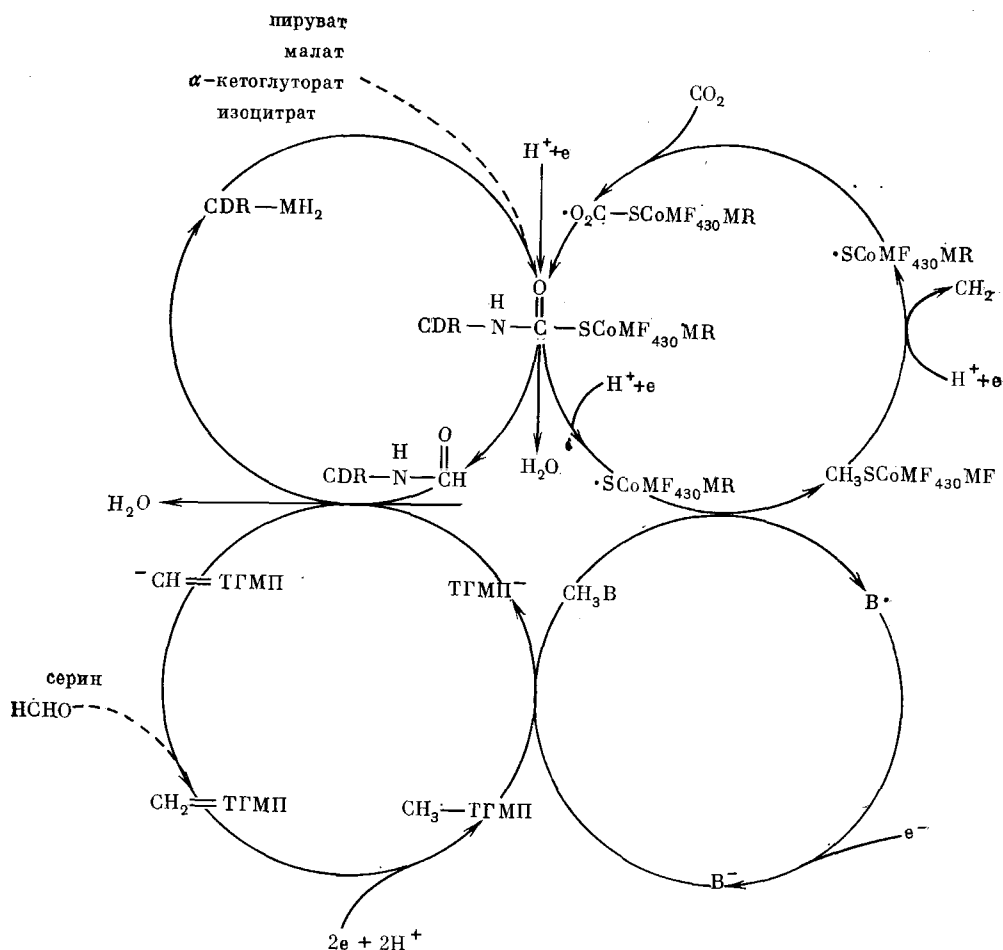


Рис. 2. Молекулярная модель восстановления  $\text{CO}_2$  до метана по Келтзенсу [54]

становлением, в результате чего образуется комплекс тиокарбамата CDR-фактора и  $\text{CoMF}_{430}$  (рис. 2). Еще одна одноэлектронная стадия восстановления приводит к образованию формамидной формы CDR-фактора и высвобождению тиул-радикала. Последующие стадии включают перенос формильной группы ТГМП и образование метил-ТГМП. Они протекают с потреблением четырех электронов и промежуточным образованием метенил- и метилен-ТГМП. Метил-ТГМП является относительно слабым донором метилкарбонима ( $\text{CH}_3^+$ ). Для того, чтобы перенести его на тиул-радикал,  $\text{CH}_3^+$ -ион должен быть сначала восстановлен до метил-радикала. Это может быть функцией компонента В метилкофермента М-редуктазной системы (рис. 2).

После добавления RPG-эффекторов увеличение восстановления  $\text{CO}_2$ , как уже отмечалось выше, вызвано допированием  $\text{C}_1$ -единиц, которые в конечном итоге приводят к повышению концентрации тиул-радикалов, необходимых для связывания  $\text{CO}_2$ . Однако RPG-эффект носит транзитный характер, что вызвано, по-видимому, двумя причинами: действием радикальных ловушек и истощением  $\text{C}_1$ -интермедиатов при восстановлении  $\text{CO}_2$  для синтеза клеточного углерода.

Выше мы подробно рассмотрели метаболизм и биохимические особенности метаногенных организмов, специализирующихся в основном на конверсии  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  и(или) формиата. Метаболизм и биохимические особенности организмов, основными субстратами для которых являются ацетат, метанол, метиламины, изучены значительно меньше, что объясняется как меньшей численностью этой группы организмов, так и определенными методическими трудностями при их культивировании и ис-

следовании [42, 93]. К настоящему времени, методом меченых атомов и некоторыми другими методами твердо установлено, что общим терминальным переносчиком метильной группы, для всех метаногенов, выступает кофермент М [36, 50, 93—96]. Предполагают, что первичными реципиентами метильной группы могут выступать метаноптерины или корриноиды, а дальнейший перенос метильной группы осуществляется так же, как и при восстановлении  $\text{CO}_2$  водородом [93, 97].

Существуют два базовых механизма трансформации ацетата в метан и  $\text{CO}_2$ . Механизм I, называемый еще ацетокластическим [98, 99] описан выше и включает расщепление ацетата таким образом, что метильная группа превращается в метан, а карбоксильная в  $\text{CO}_2$ . Механизм II предложен в 1936 г. Баркером и Ван Нилом и является двустадийным процессом [100]. Сначала ацетат разлагается до водорода и  $\text{CO}_2$ , затем идет восстановление  $\text{CO}_2$  водородом. Согласно гипотезе Ван Нила, все потенциальные метаногенные субстраты сначала конвертируются до окисленных продуктов и  $\text{CO}_2$ , а метанообразование происходит восстановлением  $\text{CO}_2$  [100]. Дифференцировать эти два механизма можно, используя  $^{14}\text{C}$ -меченые субстраты.

Многочисленными экспериментами было показано, что чистые культуры, относящиеся к семейству *Methanosarcina*, а также *Methanotrix soengenii* конвертируют ацетат по I механизму [98, 101, 102]. Не вызывает также сомнения, что формиат, метанол и метиламины конвертируются в метан чистыми культурами метаногенов по I механизму [46]. Гипотеза Ван Нила подтверждается для других субстратов, таких как спирты ( $\text{C}_2$  и больше) и жирные кислоты ( $\text{C}_3$  и больше), но при существенной ее модификации, заключающейся в том, что конверсия этих субстратов протекает при участии не одного, а нескольких микроорганизмов. Взаимодействие нескольких микроорганизмов осуществляется за счет процесса, получившего название межвидовой перенос водорода [103]. Такое явление впервые было продемонстрировано на этанолокисляющей культуре, названной *Methanobacillus omelianskii* [103]. Подобное взаимодействие культур показано при метаногенной деградации целлюлозы и гемицеллюлозы [21, 104], глюкозы [24—26, 105], бутирата [21, 106, 107], пропионата [108], ацетата [109], а также метанола, этанола и ацетата метаногенной ассоциацией *Methanobacillus kuznescoo-vii* [23—26, 108, 110]. Особенно важное значение межвидовой перенос водорода играет при анаэробной деградации жирных кислот, так как их окисление по термодинамическим причинам может протекать только при очень низких парциальных давлениях водорода в системе, которые и обеспечиваются деятельностью водородопотребляющих организмов [111—113].

Метаногены сыграли огромную роль в генезисе природного газа на Земле. Геохимическими методами анализа показано, что в СССР более 80% газовых месторождений промышленного значения приходится на долю биологического метана, который накопился в таких колоссальных количествах за миллиарды лет деятельности метаногенов [17]. Достижения современной биотехнологии позволяют надеяться, что в недалеком будущем промышленное получение метана способно заменить значительную часть добываемого природного газа.

#### 4. Технологические основы получения биогаза

Явление выделения горючего газа при разложении органического материала в анаэробных условиях известно давно. Первое практическое применение биогаза относится к концу XIX века, когда в 1885 г. в английском городе Экстере метан, полученный из септического танка, использовался для освещения улиц [114].

Первый крупномасштабный завод по производству биогаза построен в 1911 г. в Бирмингеме для стерилизации осадка сточных вод этого города. Образовавшийся метан перерабатывался в электроэнергию. В настоящее время имеется бесчисленное количество примеров использова-

ния метантанков в различных странах мира, и сейчас эта область биотехнологии переживает период интенсивного развития [1, 5, 10, 11, 14].

Промышленное получение биогаза из органических отходов имеет ряд преимуществ [5]:

1) теплотворная способность биогаза составляет 20—28 МДж/м<sup>3</sup>, (0,7—0,8 кг условного топлива); переработка 1 т органического вещества (по сухому весу) дает до 800 м<sup>3</sup> биогаза;

2) процесс протекает периодически, полупериодически и непрерывно в разномасштабных реакторах объемом от нескольких кубических метров до тысячи кубических метров, реакторы, как правило, просты в изготовлении;

3) метановое брожение осуществляет эффективную очистку сточных вод, а переработка отходов животноводства, растениеводства и активного ила приводит к получению обеззараженных высококачественных удобрений и полной минерализации азота и фосфора;

4) высокий коэффициент конверсии энергии органических веществ в биогаз, достигающий 90 %;

5) биогаз может с высокой эффективностью использоваться и непосредственно как топливо или посредством газогенераторов с к. п. д. 83 % трансформироваться в электрическую и тепловую энергию;

6) при анаэробной переработке отходов можно наряду с биогазом получать ценные биологически активные соединения, например витамин В<sub>12</sub>.

Критический анализ экономических проблем, связанных с внедрением биогазовой технологии, дан в работе [115]. Показано, что производство биогаза может быть экономически оправдано лишь при соблюдении серии условий: должна существовать обеспеченность сырьем с минимальными и пренебрежимыми транспортными расходами и расходами на хранение; должна существовать система использования газа без его накопления и хранения; должен существовать дешевый источник низкопотенциального тепла для обогрева и термостатирования метантанка.

Наибольший практический интерес вызывают работы, направленные на конверсию в биогаз отходов животноводческих ферм, которая рассматривается как интегральная составная часть современного животноводческого производства [116]. Крупномасштабная реализация биогазовой технологии позволяет в одном процессе решать три взаимосвязанные задачи — получение топлива, конверсию и обеззараживание отходов, получение концентрированных удобрений.

Усовершенствованная технология конверсии отходов животноводческого производства описана в работах [117, 120].

Лимитирующей стадией получения биогаза является деструкция биомассы на олигомерные и мономерные составляющие. В этом плане ведутся исследования по интенсификации процессов деполимеризации с помощью различных методов. Одно из последних направлений в этой области связано с использованием ионизирующего облучения. Показано, что предварительное облучение биомассы  $\gamma$ -радиацией может в несколько раз интенсифицировать процесс образования метана [29, 121].

Ведутся исследования по автоматизации и контролю метангенерирующего процесса. Так, например, найдена корреляция между продуктивностью метангенератора и содержанием кофермента F<sub>420</sub>. Развита методика определения F<sub>420</sub> в смесях и предложены способы оценки «метангенерирующей силы» смешанной культуры по содержанию кофермента F<sub>420</sub> [123].

Принципиально новые возможности биотехнологии получения топлива связаны с разработкой способов биогазификации торфа [124]. Как известно, во многих странах имеются большие запасы торфяного топлива, разработка которых сдерживается отсутствием экологически приемлемой технологии.

Первые попытки конверсии торфа в биогаз относятся к 20-м годам [125]. В настоящее время разрабатываются несколько проектов,

ориентированных на получение биогаза из торфа. Проект, развиваемый Институтом газовой технологии (Чикаго, США), получивший название «Биотермгаз-процесса», предусматривает комбинированную конверсию торфа в метан с участием стадий биологической и термохимической газификации [126, 127].

Второй проект, работы над которым ведет фирма Дайнотек (США), предусматривает химическую переработку торфа щелочью, сопряженную с окислительным процессом, с последующей анаэробной конверсией в биогаз [128, 129].

Проведено сравнение технико-экономических показателей различных процессов, в том числе и традиционных, и показано, что оба развиваемых проекта в ближайшем будущем могут вывести на экономически значимую технологию. Основные резервы улучшения технологии связаны с разработкой способов предобработки торфа с улучшением его способности к биодegradации [124].

Авторы [130] провели сравнение скоростей метанообразования для целлюлозы и гемицеллюлозы при мезофильном и термофильном разложениях. При мезофильном процессе (35°) конверсия гемицеллюлозы была выше, чем целлюлозы, однако гемицеллюлоза существенно хуже конвертировалась по сравнению с целлюлозой в условиях термофильного разложения (55°С). Скорости образования газа из гемицеллюлозосодержащих материалов, в зависимости от условий процесса, составляет 0,3—0,6 объема биогаза на объем реактора в день при содержании метана 52—63%.

Большой интерес представляют попытки объединения в одной системе получения атомной энергии и биогаза. Имеются сообщения, согласно которым в рамках атомной электростанции в Бельгии создана система получения биогаза, основанная на использовании тепла охлаждающей воды. За счет низкопотенциального бросового тепла электростанции в водоемах осуществляется культивация водорослей, конвертируемых в биогаз на последующей метаногенной стадии [131, 132].

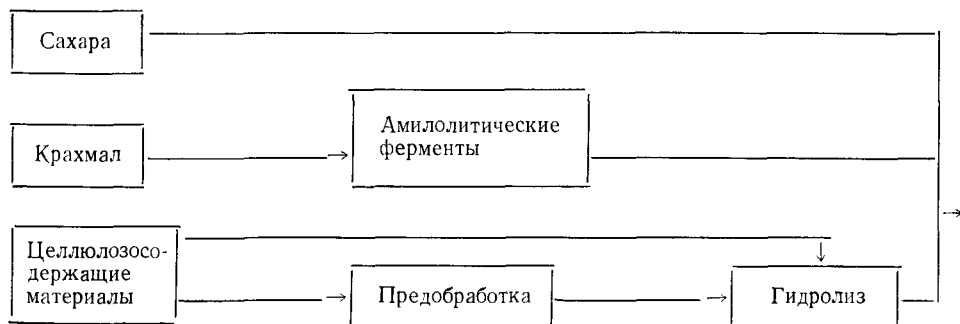
Обзор современного состояния биогазовой промышленности в мире дан в работах [5, 10, 11].

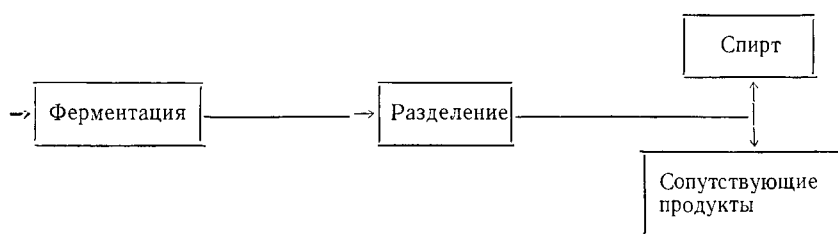
### III. ЭТАНОЛ

#### 1. Химические основы получения

С ростом дефицита жидкого ископаемого топлива в ряде стран возникает необходимость замены топлива из нефти на топливный этанол, в первую очередь, для нужд автомобильного транспорта. Источниками сырья для производства топливного этанола, являются растения с высоким содержанием сахара (сахарный тростник, сахарная свекла и т. д.), крахмала (картофель, кукуруза и т. д.), зерновые культуры, а также разнообразный дешевый растительный материал лигноцеллюлозного характера.

Принципиальная схема биотехнологического получения этанола выглядит следующим образом:





В широком масштабе реализуется пока только часть этой схемы, основанная на использовании в качестве исходного сырья крахмала или сахаров (мелассы). Низкосортный кукурузный крахмал разжижается  $\alpha$ -амилазой при высокой температуре ( $80^\circ$ , 20—30 мин), гидролизуется глюкоамилазой до растворимых сахаров — в основном до глюкозы, далее осуществляется дрожжевое брожение глюкозы до этанола, который подвергается затем ступенчатой дистилляции [133].

Лимитирующей стадией конверсии дешевого целлюлозосодержащего сырья является стадия гидролиза (целлюлоза примерно в 100 раз труднее подвергается гидролизу, чем крахмал). В настоящее время в процессе развития и конкуренции находятся три основных способа гидролиза целлюлозы: 1) разбавленными минеральными (серная) кислотами при высокой температуре; 2) концентрированными минеральными кислотами при низкой температуре (серная кислота, соляная или плавиковая кислота); 3) ферментативный гидролиз при низкой температуре. Каждый из способов имеет определенные преимущества и недостатки.

При применении концентрированных кислот достигаются высокие скорости гидролиза целлюлозы, но возникают проблемы с восстановлением кислот и коррозией оборудования.

Процессы с использованием разбавленных кислот требуют высоких температур, чтобы достичь технологических скоростей конверсии целлюлозы, но одновременно с этим увеличивается скорость разложения глюкозы и опять же протекает коррозия оборудования [143, 144].

Ферментативный гидролиз не имеет указанных выше недостатков, но на сегодняшний день стоимость целлюлаз (ферментов, осуществляющих гидролиз целлюлозы) достаточно высока. Кроме того, очень часто для достижения больших глубин конверсии целлюлозы необходима интенсивная предобработка для разрушения лигниновой оболочки и перевода целлюлозы из кристаллического состояния в аморфное. Другие проблемы ферментативного гидролиза заключаются в ингибировании целлюлаз продуктами гидролиза и инактивации ферментов.

В общем, гидролиз разбавленными кислотами позволяет достичь выходов глюкозы только 50—60% от теоретического, в то время как гидролиз концентрированными кислотами или многостадийный процесс, включающий декристаллизацию целлюлозы (процесс Тсао-Пурдю) могут потенциально достичь выходов в 90% от теоретического. Выход глюкозы для ферментативного гидролиза сильно зависит от типа предобработки (механическое измельчение, делигнификация растворителями, обработка острым паром, прегидролиз гемицеллюлоз разбавленной кислотой) и может варьировать от меньше, чем 50% до больше, чем 90% от теоретического [134—140].

Авторы работы [134] провели экономический анализ по стоимости конечного продукта — этанола для различных способов гидролиза целлюлозы. Ни один из них экономически не имеет преимуществ по сравнению с традиционным для США получением этанола из зерна. Но экономическая ситуация может существенным образом измениться, если коммерческую значимость в качестве химического агента найдет фурфурол — главный побочный продукт кислотного гидролиза древесины [134].

В этой связи ведутся исследования по использованию различных компонентов биомассы, не подвергающихся спиртному сбраживанию.

Интересное направление работ связано с разработкой методов получения мономеров из биомассы [141, 142]. Так, описан способ получения 2-винилфурана — компонента, способного составить основу новых поливинильных полимеров.

Многообещающе выглядит также использование гибридного процесса, в котором разбавленная кислота используется для предобработки и отделения соответствующей фракции древесины (в основном гемицеллюлозной), а ферментативный гидролиз для превращения оставшейся целлюлозы в глюкозу [154].

Частичная деструкция целлюлозы осуществляется также с помощью ряда физических методов, например, обработкой целлюлозы острым паром или ее гамма-облучением. Исследован эффект на ферментативный и кислотный гидролиз предварительной обработки биомассы. Показано, что при дозах выше 10 Мрад происходит деградация багассы (остаток сахарного тростника после отжимки сока), багасса, облученная дозой в 100 Мрад, дает в 2—4 раза больше глюкозы по сравнению с необлученным образцом. Облучение влияет на кислотный гидролиз больше, чем на ферментативный [145—147].

Вторая стадия переработки целлюлозы — конверсия углеводов в этанол — один из наиболее древних микробиологических процессов, используемых человечеством:



Коэффициент преобразования энергии в этой реакции равен 98%.

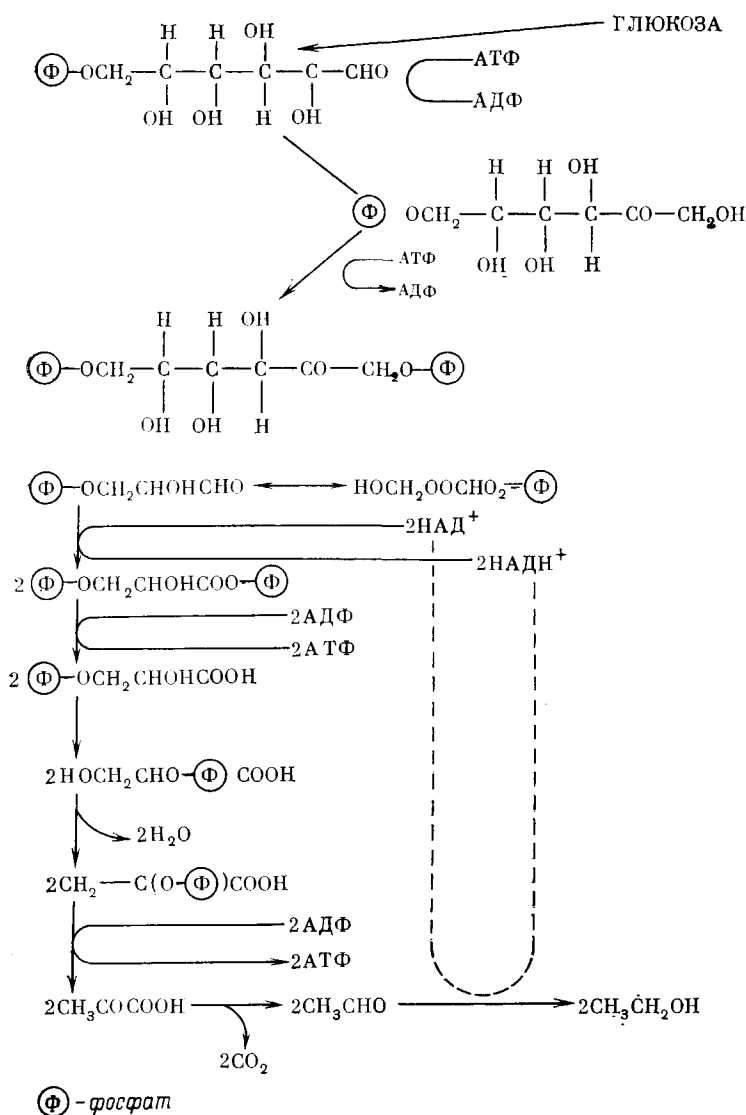
Механизм микробиологического получения этанола достаточно сложен, однако весьма детально изучен на микробиологическом и биохимическом уровнях [1], см. схему 1.

В технологическом масштабе сбраживание сахаров в этанол осуществляют, как правило, дрожжи (*Candida brassicae*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* и др.). Теоретический выход этанола по весу 51% от начальной концентрации глюкозы, практический, из-за роста дрожжей и образования побочных продуктов — 47%. Много проблем создает инактивация дрожжей высокими концентрациями этанола (свыше 10—12%), поэтому активно разрабатываются методы экстрагирования этанола из культуральной среды [148]. Большие надежды в этом плане возлагаются на бактерии *Zymomonas mobilis*, осуществляющие ферментацию сахаров вдвое быстрее дрожжей [149]. Так, иммобилизованные в Са-альгинатных шариках клетки *Z. mobilis* давали на выходе из реактора 102—116 г/л·ч этанола при входящей концентрации глюкозы 100 г/л [150].

В последние годы широкое распространение получили идеи прямой, фактически одностадийной конверсии полисахаридов в этанол. Особенно перспективными в этом плане являются термофильные анаэробные бактерии: они не требуют аэрации, растут при высоких (60—65° С) температурах, обладают большой скоростью генерации при росте на целлюлозе и высокой метаболической активностью, содержат полный набор ферментов целлюлазного комплекса, сбраживают целлюлозу и сахара с образованием ограниченного спектра метаболитов: этанол, лактат, H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> [137]. Эти бактерии обладают также рядом преимуществ, свойственных термофилам в целом. Так, при высоких температурах, во-первых, падает растворимость кислорода и других газов, что снижает их токсическое действие и увеличивает время поддержания анаэробноза, во-вторых, снижается вязкость растворов и увеличивается растворимость субстратов, что улучшает их доступность для ферментов, и, наконец, в-третьих, возрастает летучесть этанола, что позволяет проводить непрерывный процесс его отгонки с использованием небольшого вакуума и тем самым снижать его ингибирующее действие.

Технологическое применение термофильных анаэробных бактерий ограничивает ряд недостатков: несбалансированность целлюлазного комплекса ферментов; относительно небольшой выход этанола в расчете на молекулу сброженного сахара; повышенная чувствительность к

Схема 1



этанолу (как правило, метаболизм практически полностью подавляется уже при 0,5%-ных концентрациях этанола в среде); невысокая способность сбраживать продукты гидролиза гемицеллюлоз [137].

В настоящее время пригодные для прямой конверсии растительного сырья в этанол природные штаммы микроорганизмов нуждаются в улучшении их биологических характеристик. Оно может быть достигнуто методами селекции соответствующих мутантов и конструированием рекомбинантных штаммов с заданными свойствами методами генетической инженерии, а также поиском новых природных штаммов и подбором микроорганизмов, пригодных для совместного культивирования. Развитию усовершенствованных методов получения этанола, созданию новых штаммов микроорганизмов, толерантных к повышенному содержанию этанола и низким рН, посвящены работы [152, 153].

## 2. Технологические особенности и экономика

Наибольший опыт применения этанола как топлива имеет Бразилия. Итогом почти полувековых изысканий в этом направлении стала Национальная спиртовая программа (PROALCOOL), принятая правительством Бразилии в 1975 г. Главная цель этой программы была направле-



на на снижение импорта нефти путем частичной замены бензина на этанол и предусматривала производство к 1985 г. 107 млрд. литров этанола в год [156]. Источник спирта в этом случае — сбраживание сахара, полученного из сахарного тростника [155]. Надо отметить, что Бразилия, в целом, успешно выполняет эти планы. Проводимая в стране кампания по замене бензина спиртом позволяет Бразилии ежегодно экономить 2 млрд. долларов. Результатам бразильского эксперимента по развитию систем получения топливного этанола из сахарного тростника посвящена работа [156].

Как уже отмечалось, традиционным для США является производство этанола из зерна, его стоимость 42 цента/л [134]. Использование последнего в качестве субстрата объясняется низкими ценами и некоторыми излишками производства зерна, главным образом, кукурузы [157, 158]. Указанные обстоятельства, а также энергетический кризис привели к принятию в США национальной спиртовой программы, направленной, в основном, на производство газохлоа (90% бензин, 10% этанол) [159]. Популярность нового топлива была обусловлена его хорошими антидетонационными свойствами (10—20% этанола эквивалентны 1—2 см<sup>3</sup> тетраэтилсвинца/галлон) [159] и экономичностью — расход газохлоа на 25,3 г/км меньше, чем неэтилированного бензина [160].

Из разработок по кислотному гидролизу лигноцеллюлозных материалов следует выделить процесс, разработанный в Нью-Йоркском университете [134]. Для достижения технологически приемлемых скоростей гидролиза древесины разбавленной серной кислотой и снижения потерь от разложения сахаров при высокой температуре, процесс проводят в непрерывном режиме с коротким (10 с) временем удержания в зоне высоких температур в специально сконструированном реакторе при температуре 232°С и давлением 34,02 атм. От получающейся взвеси отделяются нерастворимые вещества (лигнин, непрореагировавшая целлюлоза, зольные компоненты и гипс), а получающийся раствор, содержащий растворимые сахара в концентрации 10—11 мас.% подается в периодический реактор, где сбраживается до этанола дрожжами. Время рецикла — 48 ч. Концентрация этанола на выходе 5,2 масс.% или 6,5 об.%. Последняя стадия — дистилляция этанола [134].

Экономические расчеты, сделанные для завода производительностью 914,6 млн. л этанола в год, показывают, что общие капитальные вложения составляют около 132 млн. долларов, расчетная стоимость этанола будет составлять 72 цента/л. Таким образом, из приведенных расчетов видно, что стоимость этанола, полученного кислотным гидролизом, достаточно высока и такая технология пока не может развиваться без государственных дотаций.

Недавно группой ученых Мичиганского университета предложен новый процесс гидролиза древесины с помощью газообразного фтористого водорода. Обработка сухой древесины протекает при пониженном давлении в течение часа. В результате из целлюлозы образуется глюкозилфторид (с выходом от теоретического до 99%). Далее глюкозилфторид гидролизуются водой (1 ч, 140°) с образованием глюкозы и фтористого водорода. Последний рециклизуется вакуумированием или с помощью небольшого нагревания, а его остатки в растворе нейтрализуются карбонатом кальция. Осадок СаF<sub>2</sub> обрабатывается серной кислотой для достижения более полной рециклизации HF. Основные продукты процесса — глюкоза и лигнин. Глюкоза далее сбраживается в этанол. Оценочная стоимость глюкозы 12 центов за кг, из которых 7,5 центов — стоимость исходной древесины [161]. К сожалению, сообщений о масштабировании этого процесса пока не поступало.

Все многообразие научно-технологических решений по ферментативной переработке целлюлозы в этанол в США может быть сведено к трем базовым процессам.

1) Использование отдельных реакторов для наработки целлюлаз, гидролиза целлюлозы и ферментации сахаров в этанол (Армейские лаборатории Нэйтик).

2) Использование отдельного реактора для наработки целлюлаз и совместное проведение процесса осахаривания целлюлозы и ферментации образовавшихся сахаров в спирт. («Галф Ойл Кемикалс Ко» — университет штата Арканзас).

3) Использование одного единственного реактора для прямой конверсии целлюлозы в этанол с помощью одного или нескольких видов микроорганизмов (Массачусетский технологический институт).

Наиболее разработанной, с точки зрения техники и экономики, является технология компании «Галф Ойл Кемикалс Ко». Гидролиз целлюлозы осуществляется целлюлозными ферментами гриба *Trichoderma reesei*, а сбраживание образующихся сахаров в этанол клетками *Candida brassicae* [135, 162, 163]. Масштабирование данного технологического процесса предполагалось осуществить в 3 этапа, причем на последнем этапе, который запланирован на конец 80-х гг будет построен завод по комплексной переработке 3 тыс. т сухих отходов в день. Помимо производства 200 млн. л абсолютного спирта в год, завод будет давать при сжигании неиспользованной целлюлозы еще 52,5 МВт электроэнергии в год. Полная стоимость проектируемого завода, составляет 230 млн. долларов. Коммерческая стоимость производимого этанола составит 38 центов/л [135].

Лаборатории в г. Нэйтик в сотрудничестве с компанией «Нью-Брансвик» построили пилотную установку, где древесина подвергается обработке паром, затем гидролизуется целлюлозами, полученными глубинным культивированием мутантного штамма *T. reesei* в отдельном 400 л ферментере. Образовавшиеся сахара в реакторе объемом 250 л ферментируются в спирт, последний дистиллируется. Лигнин и непрореагировавшая целлюлоза сжигаются. Установка в высшей степени автоматизирована для целей анализа и контроля [134, 164].

Экономика процесса проанализирована для завода мощностью 100 млн. л в год 95%-ного этанола, перерабатывающего 495 тыс. т городских отходов, содержащих 375 тыс. т целлюлозы. Капитальные вложения на создание такого завода ожидаются в размере 83,5 млн. долларов, себестоимость этанола — 42 цента [135, 164]. По другим данным себестоимость этанола для этого процесса составляет 55 центов/л [134].

Разработка Массачусетского технологического института (МТИ) основана на использовании мутантных штаммов термофильных бактерий *C. thermocellum* и *C. thermosaccharolyticum* для прямого получения этанола из сельскохозяйственных целлюлозосодержащих отходов. В лабораторных экспериментах выход спирта достигал 85% от теоретически возможного [165]. Недостатком этой разработки является относительно низкие скорости конверсии целлюлозы в этанол. Проведенный экономический анализ базировался на проекте завода по технологии МТИ, перерабатывающего 1500 т/день стеблей кукурузы, способного производить примерно 100 млн. л этанола в год. Себестоимость этанола составляет 28 центов/л при стоимости сырья 30 долларов за тонну. Капитальные затраты на строительство и работу завода составляют 34,4 млн. долларов [135].

Процесс Тсао-Пурдю основан на методе предобработки целлюлозосодержащих материалов, заключающемся в растворении целлюлозной фракции в циклогексане, этилендиамина, концентрированной фосфорной, серной и соляной кислотах и последующем осаждении целлюлозы уже в аморфном виде метанолом или водой [166]. В последнее время процесс Тсао-Пурдю подвергся критике из-за больших технических сложностей при масштабировании и считается экономически невыгодным [135].

Канадская фирма «Айэтик» разработала эффективный метод предобработки лигноцеллюлозных материалов для последующего гидролиза. При этом используют метод Мэйсона (или так называемый паровой взрыв), когда острый пар под давлением проникает в биомассу, а затем от мгновенной декомпрессии происходит разрушение упорядоченной структуры лигноцеллюлозы и превращение ее в рыхлую аморфную

массу. Лигнин при этом плавится и легко отделяется от целлюлозной фракции. Помимо этого, при такой обработке происходит извлечение гемицеллюлозной фракции, которая переходит в воду после конденсации пара. Гидролиз целлюлозы осуществляется ферментными препаратами *T. reesei* C-30 и *A. niger*. При этом за 100 ч при 45—50°С осаживается 90—95% целлюлозы и 80—85% гемицеллюлозы. Ферментация получаемой глюкозы в этанол происходит с 95% выходом. Выход этанола — 270 л из 1 т древесины. Ксилоза дрожжами не ферментируется и ее концентрированный раствор после упаривания служит коммерческим продуктом под названием «кормовые мелассы». Если будет также реализован эффективный процесс ферментации ксилозы в спирт, то выход этанола может составить 360 л на 1 т древесины. Оставшийся после гидролиза лигнин используется для приготовления фенол-формальдегидных пластмасс и адгезивов.

Технико-экономические расчеты для проектируемого фирмой «Айэтик» завода по переработке 250 т лигноцеллюлозы в день, производительностью 30 млн. л этанола в год, показывают, что общие капитальные вложения будут в районе 10 млн. долларов, а стоимость этанола — 45 центов/л [133, 135]. Одна из канадских компаний планирует расширение завода в Манитобе, уже производящего этанол из ячменя, за счет использования процесса «Айэтик».

Аналогичный проект разработан другой канадской фирмой «Стейк Технолоджи». Отличие его от процесса «Айэтик» заключается в реализации непрерывной предобработки лигноцеллюлозного сырья [133, 135].

Комплексный подход Канады к использованию биомассы проявляется также в разработке интегрированных сельскохозяйственных проектов, включающих, например, выращивание кукурузы, производство говядины и топливного этанола [167].

Во Франции правительство в 1981 г. выделило 26 млн. долларов на программу по развитию производства газохолоа. Предполагается, что реализация этой программы к 1990 г. позволит Франции на 25—50% удовлетворить национальные потребности в транспортном топливе. Планируется производить этанол из древесины, соломы и артишоков, сбраживание глюкозных сиропов иммобилизованными клетками будет совмещено с удалением этанола экстракцией для предотвращения ингибирования процесса [168].

В Японии интерес к получению этанола из биомассы возник в 50-х гг. Японские технологи разработали три процесса гидролиза целлюлозосодержащего сырья концентрированными кислотами при атмосферном давлении и температуре не выше 100°С [169].

К сожалению, недостатки, свойственные гидролизу концентрированными кислотами, японским исследователям до конца преодолеть не удалось, и в национальном проекте по получению топливного этанола, осуществляемом министерством международной торговли и промышленности с 1980 по 1986 г., большое внимание уделяется ферментативному гидролизу. Японские исследователи сообщают, что создали очень простой метод ферментативного осахаривания целлюлозосодержащих материалов и получения сахаров и этанола низкой стоимости при значительной экономии энергии [135, 155].

Научно-технологическую активность в сфере разработки процессов получения топливного этанола из биомассы проявляют также Индия, Финляндия, Италия, Швеция, Австрия, Австралия, Новая Зеландия, ЮАР, Маврикий и др. страны [114, 170, 171].

#### IV. АЦЕТОНО-БУТИЛОВОЕ БРОЖЕНИЕ

В настоящее время вновь возрождается интерес к получению органических растворителей микробиологическим путем. Обращение к истории показывает, что интерес к ацетон-бутанол-этанольному брожению то падал, то возникал вновь, определяя возможности использования ко-

нечных продуктов ферментации, а также стимулируя научные исследования в этой области.

Первые большие усовершенствования процессов превращения углеводов в бутанол, ацетон и этанол в промышленных масштабах зафиксированы во время и после первой мировой войны. Спрос на ацетон был достаточно высок, что привело к быстрому развитию производства. Одно время бутанол не имел большой ценности, а его хранение и применение представляло трудности. Однако со временем было обнаружено, что бутанол является весьма ценным химическим продуктом, и некоторые из его эфиров стали использовать в производстве лаков для автомобилей и других отраслей промышленности.

Необходимо отметить, что СССР явился пионером в развитии микробиологического ацетоно-бутилового производства, научные основы которого были разработаны академиками Шапошниковым и Иерусалимским.

Основные процессы, осуществляющиеся в промышленном масштабе до второй мировой войны, представляли собой сбраживание отходов производства кукурузы, крахмала и патоки. Экономичность производства зависела, главным образом, от стоимости сырья и после второй мировой войны, в связи с развитием производства синтетических растворителей из дешевой нефти, микробиологическое получение растворителей было прекращено в большинстве стран как экономически невыгодное [172, 173].

Возрастающая стоимость продуктов нефтепереработки за период 70-х гг. дала толчок к созданию более совершенных технологий по получению бутанола. Коммерчески выгодное производство разработано на основе ферментации тростниковой патоки культурой *C. acetobutylicum* [174].

Бутанол, как топливо, имеет высокие характеристики. Смешивая бутанол в количестве до 50% с бензином получают удовлетворительный топливный продукт.

Культуры, используемые для ацетоно-бутилового брожения, относятся к виду *C. acetobutylicum* и кроме морфологических различий, отличаются по углеводным средам, которые они конвертируют, по скорости сбраживания, типу требуемых азотистых питательных веществ и соотношению получаемых растворителей.

Поиски новых штаммов связаны с необходимостью использования более дешевого и легкодоступного сырья, чем дорогие углеводы. Возможность получения бутанола из гидролизатов сосновой древесины была изучена с помощью *C. acetobutylicum* NC113-2951 [176]. Ферментацию осуществляли при 30°С, в течение 5—7 дней. Полученный гидролизат — 30 г/л (ксилоза 4, манноза 6, галактоза 2, глюкоза 88%). Обесцвечивание и обработка паром основного гидролизата, только в сочетании друг с другом, приводили к удалению ингибиторов и позволили получить до 1,6 г/л бутанола, что равняется 9% выхода продукта от поглощенных углеводов. Однако в процессе обесцвечивания, гидролизаты теряли до 30% присутствующих сахаров. Использование для очистки гидролизатов комбинации катионо- и анионообменных смол позволило в результате последующей ферментации получить наивысший выход бутанола (5,7 г/л — 17% от использованных углеводов).

Для определения оптимальных условий получения бутанола и ацетона из кислой молочной сыворотки использовали культуру *C. acetobutylicum* ATCC 324 [177]. Культура указанного продуцента способна использовать несколько углеводов, в том числе и лактозу с образованием бутанола, ацетона и этанола в соотношении 6:3:1. Максимальный синтез растворителей наблюдали при использовании стерильной молочной сыворотки в ферментере без перемешивания. Через 120 ч pH снижался до 5,2, концентрация растворителей достигала 9,2 г/л, а остаточной масляной кислоты в среде — 2,5 г/л. Автоклавирование и отсутствие перемешивания приводит к увеличению выхода растворителей. Периодическая ферментация *C. beijerinckii* на ультрафильтрате сыворотки, глюкозе,

лактозе и галактозе, используемых в качестве углеродного источника, позволила сравнить условия получения бутанола из ультрафильтрата сыворотки с другими субстратами и определить оптимальные параметры процесса [178].

Основным направлением исследований по интенсификации и удешевлению производства бутанола в нашей стране является замена ценного пищевого сырья (муки) непищевым (например, свеклосахарной мелас-сой). Перспективным представляется использование культуры *C. acetobutylicum* штамм S, которое позволило изменить соотношение растворителей и получить достаточно высокий выход бутанола (69—72%) при содержании остаточного сахара от 0,6 до 0,3%. Процесс заканчивается через 42 ч, содержание растворителей к концу процесса составляло 15,07 г/л, в том числе: бутанола — 11,03; ацетона — 3,38, этанола — 0,6 [179].

В работе [177] проводили сравнение утилизации *C. acetobutylicum* различных сахаров гемицеллюлозных гидролизатов. Выход бутанола 90% от теоретически возможного наблюдался при ферментации глюкозы. Другие пять сахаров обеспечивали образование бутанола в убывающем порядке: целлобиоза > манноза > арабиноза > ксилоза > галактоза.

Важным вопросом остается поиск штаммов, утилизирующих целлюлозу. Оказалось, что целлюлолитической активностью обладают только 2 из 21 проверенных штаммов вида *Clostridium*, образующих растворители [180]. Кроме того, в результате дальнейших исследований, было обнаружено, что эти же штаммы проявляют эндоглюканазную и целлобиазную активности, но, в целом, их активность недостаточна для гидролиза кристаллической целлюлозы.

Биохимические основы анаэробного метаболизма разработаны достаточно подробно и изложены в работах [181—183]. У *C. acetobutylicum* глюкоза метаболизируется в пировиноградную кислоту по пути Эмбдена-Мейергофа, с образованием 2 молекул АТФ и 2 молекул НАДФ. Ацетил-КоА,  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$  образуются в результате фосфорокластической реакции расщепления пирувата. Количество водорода у *C. acetobutylicum* варьируется в зависимости от наличия НАДН-ферредоксинокси-редуктазы [184]. Образовавшийся ацетил-КоА превращается в ацетат (синтезируется АТФ), в этанол (требуется 2 молекулы НАДН) и в ацетоацетил-КоА, который или же трансформируется в ацетон или восстанавливается (требуется 2 молекулы НАДН) в бутирил-КоА. *C. beijerinckii* восстанавливает ацетон в изопропанол [185]. Ранее предполагали, что образование бутирата связано с трансферазной активностью, но последние исследования показали, что основной путь метаболизма проходит через бутирилфосфат и образование АТФ [186, 187]. Бутирил-КоА далее восстанавливается в бутанол с участием двух молекул НАДН. Водород, выделяющийся на первых этапах превращения глюкозы, идет на образование НАДН, используемого при восстановлении бутанола.

Известно, что в течение фазы роста, при периодическом культивировании *C. acetobutylicum*, основными продуктами являются уксусная и масляная кислоты, водород и  $\text{CO}_2$ . Кислоты повторно ассимилируются, когда рН культивирования падает, и превращаются в растворители при одновременном потреблении сахара. Существует мнение, что накопление бутирата в среде активирует новую ферментативную систему, приводящую к образованию ацетона и бутанола и нарушает обычный механизм цикла. Переход от кислоты к синтезу растворителя может быть частично объяснен последними энзимологическими исследованиями на уровне ферментов этих двух фаз. Показано, что активность фосфатацетилтрансферазы и ацетилкиназы была значительно снижена, а фосфатбутирилтрансфераза исчезала в фазе синтеза растворителя у *C. acetobutylicum* ATCC824 [187]. Сходная ситуация обнаружена у *C. acetobutylicum* DS 14: бутиральдегид- и бутанолдегидрогеназные активности определялись только для клеток, синтезирующих ацетоно-бутанольную смесь [186]. Тот же феномен наблюдался у *C. beijerinckii* [185]. *C. aceto-*

*butylicum* обладает трансферазной системой, переводящей ацетоацетил-КоА из цикла на синтез ацетоацетата, последний может быть декарбоксилирован в ацетон. Ацетат (бутират)-КоА-трансфераза — фермент с широкой субстратной специфичностью, который также имеет более высокую активность в клетках синтезирующих бутанол, чем в клетках, синтезирующих кислоту [174, 186]. Декарбоксилирование ацетоацетата в ацетон стимулирует трансферазную реакцию посредством хорошо известной ацетоацетатдекарбоксилазы, которая опять же индуцируется только в клетках, синтезирующих бутанол [174, 186, 187].

Синтез восстановленных конечных продуктов зависит от восстановительного потенциала клетки. В течение кислотной фазы в периодической культуре часть его теряется в виде  $H_2$ . При синтезе растворителя на 1 моль глюкозы образуются 2 моля НАДН, некоторое количество последнего образуется и из восстановленного ферредоксина. Следовательно, для увеличения количества бутанола, необходимо увеличить общее количество НАДН. Это может быть, например, осуществлено при ингибировании гидрогеназы на стадии образования кислот [145] или посредством непрерывного культивирования, на стадии получения растворителей. Максимальный теоретический выход 1 г глюкозы: бутанола — 0,41 г, ацетона — 0,32 г, этанола — 0,5 г. Таким образом, при образовании смеси этих продуктов, максимальный теоретический выход зависит от соотношения продуктов. Если это соотношение имеет вид 6:3:1 (бутанол — ацетон — этанол), типичный вариант, когда максимальный теоретический выход растворителей составит 0,39 г/г.

Установлено, что при высоком значении pH синтезируются, в основном, кислоты, в то время как при низком pH образуется ацетоно-бутанольная смесь. Оптимальные pH для синтеза растворителей варьируются в зависимости от штамма и условий культивирования и, как правило, лежат в диапазоне 4,0—6,0 [180, 189]. По-видимому, это связано с тем, что ацетоацетатдекарбоксилаза имеет оптimum pH в районе 5,0 [190]. Кроме того, pH влияет на соотношение между диссоциированными и недиссоциированными формами уксусной и масляной кислот и известно, что только недиссоциированная форма проникает через клеточную мембрану [191].

Эти выводы, однако, нельзя применить ко всем видам *Clostridium*, синтезирующих бутанол. В *C. beijerinckii* PI 13436 существенный синтез бутанола достигается при pH 6,8, и не обнаружено величины значения концентрации кислоты или pH, которая могла бы коррелировать с началом образования бутанола [185]. У *C. acetobutylicum* NCIB 8052 (ATCC 824) синтез бутанола мог быть индуцирован при pH 7,0 добавлением высоких концентраций ацетата и бутирата (100 мМ каждого) [192], а у некоторых культур *C. acetobutylicum*, выделенных в Египте, конечное значение pH, вплоть до 6,4, не предотвращало синтеза бутанола (20 г/л) [193]. Какой бы ни был механизм процесса, добавление ацетата и бутирата в периодическую культуру влияет на время начала синтеза [185, 192, 194], на конечные соотношения продуктов, концентрацию и выход в той мере, которая не может зависеть исключительно от простой конверсии кислот в ацетоно-бутанол-этанольную смесь [195].

Важным фактором в образовании ацетоно-бутанольной смеси является концентрация углеродного источника. Слишком низкие концентрации глюкозы [189, 196, 197] давали в результате только кислоты. В периодической культуре организмы не входили в фазу образования бутанола при этих условиях, в непрерывных системах концентрация субстрата должна быть не ниже 5 г/л [198].

Детальные исследования кинетики образования продуктов были проведены в условиях хеостатного культивирования, при лимитации глюкозой, азотом, фосфатом [199]. Удельная скорость потребления глюкозы повышалась с увеличением скорости разбавления. Увеличение скорости разбавления приводило к повышению скорости образования кислоты, которая не появлялась при низких скоростях роста. Совершенно другая картина имела в скоростях образования ацетона, бутанола и этанола.

Показано, что их количества увеличиваются с увеличением скорости разбавления до определенного момента ( $0,1\text{--}0,2\text{ ч}^{-1}$ ), а потом быстро убывают снова. Экстраполяция указывает на образование ацетоно-бутанольной смеси при нулевой скорости роста. Таким образом, синтез бутанола только частично связан с ростом. Если клетки, синтезирующие бутанол, вновь поместить в буферный раствор, они продолжают синтезировать растворители. Таким же образом могут быть использованы не растущие клетки для продолжительного образования бутанола [198, 200].

Слабым местом в ацетоно-бутанольной ферментации является низкая концентрация целевых продуктов (около 2%). Растворители, особенно бутанол, токсичны для клеток бактерий. В тестовых экспериментах, скорость роста *C. acetobutylicum* ATCC 824 ингибировалась на 50% при концентрации бутанола 7—13 г/л, ацетона — 40 г/л и этанола — 50—60 г/л [201]. Общее ингибирование роста наблюдалось при 14—16 г/л бутанола, 70 г/л ацетона и этанола. Нижний предел концентрации — 4,4—8 г/л бутанола, при котором не происходит никакого уменьшения скорости роста. Аналогичную реакцию на органические растворители показывали и другие штаммы, в некоторых случаях они были еще более чувствительны, чем штамм 824. Для культуры *C. acetobutylicum* P 262 добавление 10 г/л бутанола практически прекращало рост.

Различие в ингибирующей концентрации растворителей может быть объяснено различиями в гидрофобности спиртов [202]. Действию растворителей подвергаются липидные слои клеточных мембран. Показано, что бутанол (0,5—1,5% объемных), добавленный в липидную фракцию, полученную из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста штамма *C. acetobutylicum* ATCC 824, значительно увеличивает подвижность спин-меченых углеводов в липидных дисперсиях, говоря иначе, бутанол приводит к «разжижению» липидного бислоя [203]. Установлено, что состав липидных ацилцепочек при переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста изменяется к более высокому процентному содержанию насыщенных цепочек. Добавление бутанола (0,5—1 об.%) к культурам влияет на состав цепочек таким же образом. Был сделан вывод, что способность увеличивать процентное содержание насыщенных жирных кислот в мембране в ответ на увеличение уровня бутанола, противодействует «разжижающему» эффекту последнего [203].

*C. acetobutylicum* чувствительна не только к бутанолу, но также к уксусной и масляной кислотам. Эффект ингибирования кислотами коррелируется с внутриклеточной концентрацией недиссоциирующих структур и значением pH [204]. Двукратное уменьшение скорости роста происходит при 8—15 г/л уксусной и 6—13 г/л масляной кислот [201].

В настоящее время промышленная ферментация при периодическом культивировании приближается к пределу биологических возможностей, используемых культур. Например, *C. acetobutylicum* штамм Вейсмана, культивируемый в  $90\text{ м}^3$  периодическом ферментере на тростниковой мелассе, дает общий выход растворителей 19,5 г/л в соотношении 6:3:1 (бутанол — ацетон — этанол) за 30—34 ч с выходом 0,3 г/г и продуктивностью 0,6 г/л·ч. Для сравнения, лучший результат, полученный на лабораторной установке с глюкозой, как источником углерода: общий выход ацетоно-бутанольной смеси 18,4—21,3 г/л, продуктивность 0,3—0,9 г/л·ч [205].

Переход от периодических к непрерывным режимам культивирования позволил повысить продуктивность ацетоно-бутанольной ферментации. В работе [199] описано двустадийное хемостатное культивирование *C. acetobutylicum* DS 1731, оптимизированное по pH и температуре. Первая стадия проводилась при скорости разбавления ( $D$ ) —  $0,125\text{ ч}^{-1}$  ( $37^\circ\text{C}$ , pH 4,3), а вторая при  $D=0,03\text{ ч}^{-1}$  ( $33^\circ\text{C}$ , pH 4,3). Проток синтетической среды содержал 0,1 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 54 г/л глюкозы. Эти условия позволили провести полную утилизацию углеродного источника, давая выход конечного продукта 18,2 г/л (4,87:12,78:0,78 г/л ацетон — бутанол — этанол).

Хемостатное культивирование *C. acetobutylicum* ATCC 824 с лимитацией глюкозой (50 г/л) и использованием комплексной среды при  $D=0,1 \text{ ч}^{-1}$  дало общий выход растворителей 15,9 г/л (5,4:9,5:1 г/л ацетон—бутанол—этанол), выход бутанола 0,32 г/г, продуктивность 2,56 г/л·ч получена при  $D=0,22 \text{ ч}^{-1}$ . Высокая продуктивность этой системы связана с высокой концентрацией биомассы, как результат использования комплексной среды. Очевидно можно еще увеличить продуктивность, используя рециркуляцию биомассы.

Непрерывное образование ацетона и бутанола также может осуществляться при использовании иммобилизованных клеток. С целью снижения потерь активности, разработана техника дозирования питательных веществ [198]. Используя эту технику, осуществили непрерывное получение ацетоно-бутанольной смеси из клеток *C. acetobutylicum* ATCC 824, иммобилизованных в Са-альгинатный гель или адсорбированных на древесных буковых стружках [198]. В системе адсорбированных клеток лучшие результаты достигнуты при  $D=0,2 \text{ ч}^{-1}$ : выход растворителей 6,3 г/л, выход бутанола — 0,33 г/г и продуктивность — 1,2 г/л·ч. Это многообещающие цифры, если принять во внимание, что скорость роста микроорганизмов не была доведена до максимума, а среда не оптимизирована.

Для непрерывного получения бутанола и изопропанола проводили иммобилизацию растущих клеток *C. beijerinckii* МД 27,6 в Са-альгинатный гель. Среда содержала глюкозу и дрожжевой экстракт. Лучший результат получен при  $D=0,3 \text{ ч}^{-1}$ : общий выход растворителей — 9—10 г/л, продуктивность — 1,5 г/л·ч.

Таким образом, несмотря на то, что ацетоно-бутанольная ферментация является одним из первых чисто микробиологических процессов, разработанных на промышленном уровне, возобновление интереса к этому производству может быть оправдано только с решением ряда вопросов, способных привести к экономически выгодным результатам. Использование более совершенной технологии, такой как непрерывное культивирование и иммобилизованные клетки, может повысить продуктивность ферментации. Попытки решения проблемы токсичности бутанола и ацетона и повышения выхода синтезируемых продуктов сконцентрировались на адаптации и селекции толерантных штаммов, а также на получении различных мутантов в изучении генетического контроля продукции бутанола. В настоящее время появились работы по разработке методов генетического анализа, позволяющие манипулировать с соответствующими генами для создания штаммов, способных к более продуктивному синтезу растворителей и к изменению их соотношения.

Следует отметить, что ацетоно-бутиловая ферментация является безотходным производством. Углекислый газ и водород, образующиеся в процессе брожения, можно считать вторичными продуктами. Двуокись углерода, жидкая и твердая, находит применение в пищевой промышленности, а водород используется как топливо, либо в процессах метанообразования. Жидкий отход производства, барда, содержащая рибофлавин, витамины и белок, используется на корм скоту.

## V. ВОДОРОД

Важный природный феномен, который представляет большой интерес, с точки зрения конверсии энергии, был обнаружен в 1942 г. [206]. При адаптации в темноте, в анаэробных условиях, в течение нескольких часов, клетки микроскопических водорослей, при освещении, начинают активно выделять водород. Поскольку микроскопические водоросли на свету способны продуцировать молекулярный кислород, представляется принципиальная возможность использовать механизм фотосинтеза для осуществления реакции биофотоллиза воды с преобразованием световой энергии в топливную форму [1].

В последующие годы, феномен образования водорода микроскопи-



ческими водорослями исследовался в ряде лабораторий. Обсуждение современного состояния этого вопроса дано в обзорных работах [1, 2, 206, 207]. Имеется несколько примеров лабораторных процессов получения водорода. В работе [208] описано использование термофильных водорослей *Mastigoladus laminosus*. Система для получения водорода действовала в течение нескольких суток, с эффективностью по использованию энергии солнечного света 2,7%. Сохранение культуры водорослей от действия кислорода осуществлялось с помощью смеси аргона, азота и CO<sub>2</sub>.

Определенный интерес, в этом плане, представляют сине-зеленые водоросли, обладающие как гидрогеназной, так и нитрогеназной активностью. Ограничения в подаче азота промотируют образование водорода в 2,5—3,5 раза по сравнению с обычными условиями [133]. Эксперименты, проведенные с сине-зелеными водорослями *Anabaena cylindrica* показали, что выход водорода увеличивается примерно на 70% при использовании периодического освещения (период 10 с). В лабораторных условиях создана установка по производству водорода, в которой суспензия водорослей циркулировала между темной и освещенной зонами [209].

Практическое использование феномена фотовыделения водорода микроскопическими водорослями в настоящее время еще не реализовано, в связи с низкой эффективностью выделения водорода в стационарном режиме. Возможно, дальнейшие исследования, оптимизация и увеличение эффективности процесса создадут условия технологической эксплуатации этого явления.

Эксперименты, проведенные с фотосинтезирующими бактериями показали, что наилучшими кандидатами для получения водорода являются пурпурные бактерии и цианобактерии. Сообщается, что использование иммобилизованных клеток фотосинтезирующих бактерий позволило достигнуть продуктивности выделения водорода — 40 мл H<sub>2</sub> на г сухих клеток в час [210]. Непрерывным культивированием пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum* на среде с лактатом также достигались достаточно высокие продуктивности — 180 мл H<sub>2</sub> с литра культурной среды в час [211].

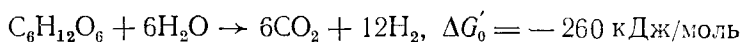
В конце 70-х — начале 80-х гг. активно велись также работы по искусственному фотосинтезу [1, 68, 76, 213]. Лучшие результаты были достигнуты на искусственных системах, содержащих освещаемые хлоропласты и ферментативные препараты бактериальных гидрогеназ. Такие системы были способны в течение нескольких часов выделять водород со скоростями до 94 мкмоль H<sub>2</sub> на мг хлорофилла в час [212].

Генетическая модификация фотосинтезирующих организмов, изучение их биохимических путей, повышение гидрогеназной и нитрогеназной активностей, оптимизация питания, режимов освещения, иммобилизации микроорганизмов — вот пути, ведущие к увеличению эффективности фотосинтеза и его индустриализации [133].

Достаточно давно была также зафиксирована способность некоторых хемотрофных организмов выделять молекулярный водород. В последующем этот феномен детально исследовался у нас в стране и за рубежом. Современное состояние вопроса детально анализируется в работе [79].

Водородобразующие микроорганизмы широко распространены в природе, при этом образование водорода может идти из соединений углеводного характера, включая крахмал и целлюлозу, из amino- и кетокислот.

При полном распаде глюкозы только до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub> теоретически может реализоваться предельный к. п. д. преобразования энергии, равный 99%.

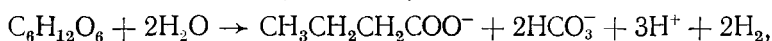


Практически при кластридиальном брожении процесс идет с образо-

ванием, помимо  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ , ацетата или ацетата и бутирата.

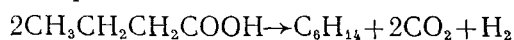


$$\Delta G'_0 = -206,6 \text{ кДж/моль}$$

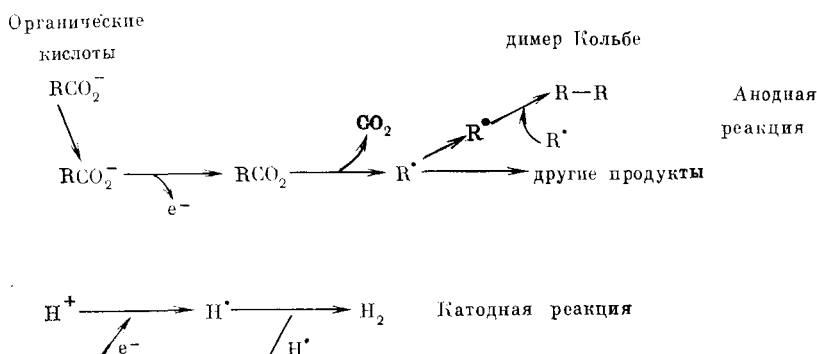


$$\Delta G'_0 = -255,2 \text{ кДж/моль}$$

В первом случае в водородную форму конвертируется 33% запасенной в глюкозе энергии, во втором — 16,7%. Это определяется тем, что значительная доля энергии остается в алифатических кислотах [1]. Для повышения к. п. д. преобразования энергии образующие алифатические кислоты можно превращать в топливо с помощью электролиза Кольбе [118]. Процесс активно изучается в компании «Дайнотек» (США) [133]. Органические кислоты селективно экстрагируются из культуральной жидкости керосином. Реэкстракция кислот проводится водным раствором. Превращение органических кислот в жидкое и газообразное топливо осуществляется по реакции:

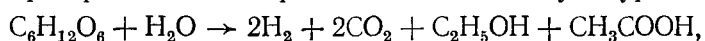


Принципиальные анодные и катодные реакции электролиза приведены ниже:



Получающиеся алканы могут служить хорошим топливом для двигателей внутреннего сгорания, а образовавшаяся смесь водорода и  $\text{CO}_2$  используется для производства электричества.

Определенный интерес вызывают также анаэробные бактерии, которые способны наряду с водородом образовывать этанол. В работе [119] описана новая термофильная водородообразующая культура, выделенная из гидротерм Камчатки, разлагающая глюкозу по уравнению:



$$\Delta G'_0 = -201,44 \text{ кДж/моль}$$

В этой системе к. п. д. преобразования энергии (суммарно в водородную и этанольную формы) равен 79%.

Одно из последних достижений в области получения водорода из воды — создание микробиологических систем биофотолиза воды на основе культур микроорганизмов, сопряженных по метаболитам [122, 175]. В настоящее время созданы и прошли лабораторные испытания системы фоторазложения воды на водород и кислород под действием солнечного света с раздельным получением газов. Получены производительности до 0,5 л  $\text{H}_2$  на л среды · ч (соответственно 0,25 л  $\text{O}_2$  на л среды · ч) [175].

В заключение данного раздела, можно отметить определенные успехи в лабораторных исследованиях фотобиологических процессов получения водорода, а также создание нескольких демонстрационных установок. Масштабирование таких процессов является пока еще сложной биотехнологической задачей, но колоссальные преимущества водородной энергетики вселяют надежды, что исследования в этом направлении будут продолжаться и принесут ожидаемые практические результаты.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последние годы характеризуются все возрастающим интересом к разработке возобновляемых источников энергии и сырья. Важное место в этих проектах занимают процессы биотехнологического характера. Национальные программы в области топливной биотехнологии активно развиваются в США, Великобритании, Франции, Бразилии, Японии, Канаде, КНР и в других странах.

Последние 10 лет в ряде стран, в том числе и в нашей стране, проводятся работы по использованию биосистем для получения энергетически емких соединений топливной природы. Эти исследования направлены на создание принципиально новых энергетических технологий, использующих возобновляемые источники энергии, прежде всего солнечную энергию.

В настоящее время в перспективе просматриваются две категории систем, способных внести существенный вклад в энергообеспеченность страны.

*Биоэнергетическая технология первого поколения* предполагает широкое промышленное освоение процесса метаногенеза, который уже сегодня вышел на уровень технических решений.

Процесс представляет собой анаэробную микробиологическую конверсию целлюлозосодержащих материалов в смесь метана и углекислого газа. В настоящее время исследованы количественные закономерности процесса, изучены пути превращения веществ в сложной последовательности реакций, выявлены ключевые промежуточные соединения, впервые созданы математическая модель и методы регуляции метаногенеза.

Крупномасштабная реализация биогазовой технологии позволяет решить три крупные взаимосвязанные задачи — получение топлива, концентрированных органоминеральных удобрений, проблему охраны окружающей среды от загрязнений биологического характера (отходы сельского хозяйства). Только за счет утилизации отходов в СССР можно получить до 150 млн. т условного топлива, что полностью покрывает будущие потребности сельского хозяйства в энергии.

В настоящее время сельское хозяйство потребляет 60—62 млн. т нефтепродуктов. За счет процесса получения биогаза сельскохозяйственное производство может перейти на энергетическую самообеспеченность.

Существенный вклад может внести процесс получения топливного этанола и ацетон-бутанольной смеси из целлюлозы.

*Биоэнергетическая технология второго поколения* связана с созданием масштабированного процесса биофотолиза воды — реакции разложения воды на водород и кислород под действием солнечного света. В настоящее время такого рода реакция осуществлена на основе микробиологических культур, сопряженных по промежуточным соединениям.

Сложности создания систем преобразования солнечной энергии состоят в необходимости освоения техническими конструкциями достаточно больших территорий. В силу этого конструкции должны быть максимально просты, удобны в эксплуатации, не требовать дорогостоящих материалов.

Предполагается, что биоэнергетические промышленные установки получат развитие в 1990—2000 гг., что создаст новую энергетическую технологию, использующую энергоемкое и экологически чистое топливо. При достаточном развитии эта категория процессов может покрыть существенную часть энергетических затрат общества.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Варфоломеев С. Д. Конверсия энергии биокаталитическими системами, М.: Изд-во МГУ, 1981. 361 с.
2. Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1981. 342 с.
3. Заварзин Г. А. //Изв. АН СССР. Сер. биол. 1986. № 3. С. 341—360.

4. Заварзин Г. А.//Природа. 1987. № 1. С. 66—79.
5. Паницхава Е. С., Березин И. В.//Биотехнология, 1986. № 2. С. 3—12.
6. Паницхава Е. С., Березин И. В.//Там же. 1986. № 3. С. 8—15.
7. Bolton J., Hall D. O.//Ann. Rev. Energy. 1979. V. 4. P. 335—401.
8. Hall D. O.//Solar Energy. 1979. V. 22. P. 303—328.
9. Варфоломеев С. Д.//Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 1. М.: Изд-во ВИНТИ, 1983. С. 6—62.
10. Pankhurst E. S.//Biomass. 1983. V. 3. P. 1—42.
11. Foster K. E., Karpiscak M. M.//Ibid. 1983. V. 3. P. 269—285.
12. Hall D. O.//Ibid. 1982. V. 2. P. 239—244.
13. Sanchez-Sierra G., Umana-Quesada A.//Ibid. 1984. V. 4. P. 21—41.
14. Wu Wen, Chen En-Jian.//Ibid. 1983. V. 3. P. 287—312.
15. Chen Ruchen.//Ibid. 1981. V. 1. P. 39—46.
16. Trimble J. L., Van Hook R. I., Gray Folger A.//Ibid. 1984. V. 6. P. 3—13.
17. Чан Динь Тоай, Хлудова М. С., Паницхава Е. С.//Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 1. М.: Изд-во ВИНТИ, 1983. С. 151—194.
18. Паницхава Е. С. Дис. ... докт. биол. наук. М.: Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1978. 400 с.
19. Vogels G. D.//Antonie van Leenwenhoek. 1979. V. 45. P. 347—352.
20. Бонч-Осмоловская Е. А.//Усп. микробиологии. 1979. Т. 14. С. 106—123.
21. Склад В. И., Калюжный С. В., Михантьева Т. В. и др.//Биотехнология. 1987. Т. 3. № 1. С. 79—85.
22. Калюжный С. В., Ножевникова А. Н., Варфоломеев С. Д.//Микробиология. 1985. Т. 54. № 2. С. 257—262.
23. Калюжный С. В., Варфоломеев С. Д.//Биотехнология. 1986. Т. 2. № 1. С. 94—100.
24. Калюжный С. В., Варфоломеев С. Д.//Там же. 1986. Т. 2. № 3. С. 70—77.
25. Чан Динь Тоай, Калюжный С. В., Паницхава Е. С., Варфоломеев С. Д.//Биоконверсия солнечной энергии. Пушкино: ОНТИ НЦБИ, 1984. С. 79—88.
26. Чан Динь Тоай, Калюжный С. В., Паницхава Е. С., Варфоломеев С. Д.//Там же. 1984. С. 89—95.
27. Калюжный С. В., Чан Динь Тоай, Спивак С. И. и др.//Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1984. Т. 25. № 4. С. 411—417.
28. Калюжный С. В. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1985. 205 с.
29. Калюжный С. В., Спивак С. И., Варфоломеев С. Д.//Биотехнология. 1986. Т. 2. № 5. С. 94—101.
30. Asinari Disan Marsano C. M., Binot R., Bol T. et al.//Biomass. 1981. V. 1. P. 47—59.
31. Pavnter U. J. B., Hungate R. E.//J. Bacteriol. 1968. V. 95. P. 1943—1951.
32. Khan A. W., Mes-Hartree M. J.//Appl. Bacteriol. 1981. V. 50. P. 283—288.
33. Zeikus J. G., Weimer P. J., Nelson D. R., Daniels L.//Arch. Microbiol. 1975. V. 104. P. 124—134.
34. Van Den Berg L., Lamb K. A., Murray W. D., Armstrong D. W. J.//Appl. Bacteriol. 1980. V. 48. P. 437—444.
35. Ножевникова А. Н., Ягодина Т. Г.//Микробиология. 1982. Т. 51. № 4. С. 642—649.
36. Daniels L., Zeikus J. G.//J. Bacteriol. 1978. V. 136. P. 75—84.
37. Fuch G., Stupperich E., Thauer R. K.//Arch. Microbiol. 1978. V. 18. P. 121—126.
38. Jones W. J., Pavnter M. J. B., Gupta R.//Arch. Microbiol. 1983. V. 135. P. 91—97.
39. Tzeng S. F., Wolfe R. S., Bryant M. P.//J. Bacteriol. 1975. V. 121. P. 184—191.
40. Кренус Н. Б.//Изв. АН СССР. Сер. биол. 1979. Т. 1. 103—112.
41. Thauer R. K., Fuchs G.//Naturwiss. 1979. V. 66. P. 89—94.
42. Hippe H., Caspari D., Fiebig K., Gottschalk G.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 494—498.
43. Edwards T., McBride B. C.//Appl. Microbiol. 1975. V. 29. P. 540—545.
44. Doddema H. J., Vogels G. D.//Appl. Environ. Microbiol. 1978. V. 36. P. 752—754.
45. Keltjens J. T., van Beelen P., Stassen A. M., Vogels G. D.//FEMS Microbiol. Lett. 1983. V. 20. P. 259—262.
46. Balch W. E., Fox G. E., Magrum L. J. et al.//Microb. Rev. 1979. V. 43. P. 260—296.
47. Wolfe R. S. Antonie van Leenwenhoek/J. Microbiol. and Serol. 1979. V. 45. P. 353—364.
48. Barker H. A.//Bacterial Fermentation. N. Y.: J. Wiley and Sons. INC. 1956. P. 1—27.
49. McBride B. C., Wolfe R. S.//Biochemistry. 1971. V. 10. P. 2317—2324.
50. Taylor C. D., Wolfe R. S.//J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 4879—4885.
51. Gunsalus R. P., Wolfe R. S.//Ibid. 1980. V. 255. P. 1891—1895.
52. Nagle D. P., Wolfe R. S.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 2151—2155.
53. Jacobson F. S., Daniels L., Fox J. A. et al.//J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 3385—3388.
54. Keltjens J. T.//Antonie van Leenwenhoek. 1984. V. 50. P. 383—396.
55. Whitman W. B., Wolfe R. S.//J. Bacteriol. 1983. V. 154. N 2. P. 640—649.
56. Ellefson W. L., Wolfe R. S.//J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 4259—4262.
57. Ellefson W. L., Whitman W. B., Wolfe R. S.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 3707—3710.
58. Gunsalus R. P., Wolfe R. S.//FEMS Microbiol. Lett. 1978. V. 3. P. 191—193.
59. Diekert G., Gills H.-H., Jaenchen R., Thauer R. K.//Arch. Microbiol. 1980. V. 128. P. 256—262.
60. Diekert G., Jaenchen R., Thauer R. K.//FEBS Lett. 1980. V. 119. P. 118—120

61. Diekert G., Weber B., Thauer R. K.//Arch. Microbiol. 1980. V. 127. P. 273—278.
62. Jaenchen R., Diekert G., Thauer R. K.//FEBS Lett. 1981. V. 130. P. 133—136.
63. Jaenchen R., Gills H. H., Thauer R. K.//FEMS Microbiol. Lett. 1981. V. 12. P. 167—170.
64. Whitman W. B., Wolfe R. S.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 92. N 4. P. 1196—1201.
65. Diekert G., Klee B., Thauer R. K.//Arch. Microbiol. 1980. V. 124. P. 103—106.
66. Pfaltz A., Jaun B., Fassler A. et al.//Helv. Chim. Acta. 1982. V. 65. P. 828—865.
67. Keltjens J. T., Whitman W. B., Caerteling C. G. et al.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 108. P. 495—503.
68. Gisby P. E., Hall D. O.//Nature. 1980. V. 287. P. 251—253.
69. Keltjens J. T., Caerteling C. G., van Koofen A. M. et al.//Arch. Biochem. Biophys. 1983. V. 223. P. 235—253.
70. Fuchs G., Thauer R., Ziegler H., Stichler W.//Arch. Microbiol. 1979. V. 120. P. 135.
71. Lacy D., Fulton G., Spencer R. W., Orme-Johnson W. H.//J. Bacteriol. 1980. V. 141. P. 694.
72. Cheeseman P., Toms-Wood A., Wolfe R. S.//Ibid. 1972. V. 112. P. 527—531.
73. Eirich L. D., Vogels G. D., Wolfe R. S.//Biochemistry. 1978. V. 17. P. 4583—4593.
74. Pol A., van der Drift C., Vogels G. D. et al.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980. V. 92. P. 255—260.
75. Tzeng S. F., Bryant M. R., Wolfe R. S.//J. Bacteriol. 1975. V. 121. P. 184—191.
76. Rao K. K., Gogotov I. N., Hall D. O.//Biochemie. 1975. V. 60. P. 291—296.
77. Jones J. B., Stadtman T. C.//J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 1049—1053.
78. Eirich L. D., Dugger R. S.//Biochem. Biophys. Acta. 1984. V. 802. N 3. P. 454—458.
79. Кондратьева Е. Н. Хемолитотрофы и метилотрофы. М.: Изд-во МГУ, 1983. С. 80—94.
80. Van Beelen P., De Cock R. M., Gunt W. et al.//FEMS Microbiol. Lett. 1984. V. 21. P. 159—163.
81. Van Beelen P., Labro J. E. A., Keltjens J. T. et al.//Eur. J. Biochem. 1984. V. 139. P. 359—365.
82. Keltjens J. T., Huberts M. J., Laarhoven W. H., Vogels G. D.//Ibid. 1983. V. 130. P. 537—544.
83. Van Beelen P., Stassen A. P. M., Bosch J. W. G. et al.//Ibid. 1984. V. 138. P. 563—571.
84. Escalante-Semerena J. C., Wolfe R. S.//J. Bacteriol. 1984. V. 158. P. 721—726.
85. Leigh J. A., Wolfe R. S.//J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 7536—7540.
86. Romesser J. A., Wolfe R. S.//Zentralbl. Bakteriol. Abt. 1: Orig. Reine C. 1982. V. 3. P. 271—276.
87. Leigh J. A., Rinehart K. L. Jr., Wolfe R. S.//J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 3636—3640.
88. Eirich L. D., Vogels G. D., Wolfe R. S.//J. Bacteriol. 1979. V. 140. P. 20—27.
89. Leigh J. A.//Appl. Environ. Microbiol. 1983. V. 45. P. 800—803.
90. Gunsalus R. P., Wolfe R. S.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977. V. 76. P. 790—795.
91. Romesser J. A., Wolfe R. S.//J. Bacteriol. 1982. V. 152. P. 840—847.
92. Van Beelen P., Thiemessen H. L., De Cock R. M., Vogels G. D.//FEMS Microbiol. Lett. 1983. V. 18. P. 135—138.
93. Lovley D. R., White R. H.//J. Bacteriol. 1984. V. 160. N 2. P. 521—525.
94. Shapiro S., Wolfe R. S.//J. Bacteriol. 1980. V. 141. N 2. P. 728—734.
95. Van der Meijden P., Heythuysen H. J., Pouwels A. et al.//Arch. Microbiol. 1983. V. 134. N 3. P. 238—242.
96. Baresi L., Wolfe R. S.//Appl. Environ. Microbiol. 1981. V. 41. P. 388—391.
97. Vogels G. D., Visser C. M.//FEMS Microbiol. Lett. 1983. V. 20. P. 291—297.
98. Smith M. R., Mah R. A.//Appl. and Environ. Microbiol. 1980. P. 993—999.
99. Smith M. R., Zinder S. H., Mah R. A.//Proc. Biochem. 1980. V. 15. P. 34—39.
100. Barker H. A.//Arch. Microbiol. 1936. V. 7. P. 404—419.
101. Winter J., Wolfe R. S.//Ibid. 1979. V. 121. P. 97—102.
102. Zehnder A. J., Huser B. A., Brock T. D.//Ibid. 1980. V. 124. P. 1—11.
103. Bryant M. P., Wolin E. A., Wolin M. J., Wolfe R. S.//Ibid. 1967. V. 59. P. 20—31.
104. Weimer P. J., Zeikus J. G.//Appl. Environ. Microbiol. 1977. V. 33. P. 289—297.
105. Chen M., Wolin M. J.//Ibid. 1977. V. 34. P. 756—759.
106. McInerney M. J., Bryant M. P., Mespell R. B., Costerton J. W.//Ibid. 1981. V. 41. P. 1029—1039.
107. McInerney M. J., Mackie R. I., Bryant M. P.//Ibid. 1981. V. 3. P. 825—828.
108. Boone D. R., Bryant M. P.//Ibid. 1980. V. 40. P. 626—632.
109. Zinder S. H., Koch M.//Ibid. 1984. V. 138. P. 263—277.
110. Панджава Е. С.//Микробиол. журн. 1982. Т. 44. С. 60—64.
111. Bryant M. P.//J. Anim. Sci. 1979. V. 48. P. 193—201.
112. Thauer R. K., Jungermann K., Decker K.//Bacteriol. Rev. 1977. V. 41. P. 100—180.
113. Wolin M. J., Miller T. L.//ASM News. 1982. V. 48. P. 561—565.
114. Lewis C. W.//Biomass. 1981. V. 1. N1. P. 5—15.
115. Wase D. A., Foster C. F.//Ibid. 1984. V. 4. P. 127—142.
116. Бекер М. Е., Упит А. А., Гринберг А. И., Дубровскис В. С.//Материалы советско-финского симпозиума «Биогаз-85, проблемы и решения». М., 1985. С. 48—70.
117. Lo K. V., Liac P. H., March A. C.//Biomass. 1985. V. 6. N 4. P. 301—316.

118. Sanderson J. E., Wise D., Augenstein D.//Biotechnol. Bioeng. Symp. 1978. V. 8. P. 131—151.
119. Склар В. И., Карякина Е. Е., Медман Д. Я. и др.//Биотехнология. 1986. Т. 2. № 3. С. 16—23.
120. Ахти О.//Материалы советско-финского симпозиума «Биогаз-85, проблемы и решения». М., 1985. С. 103—117.
121. Склар В. И., Калужный С. В., Чан Динь Тоай. Тез. докл. II. Всесоюз. конф. «Возобновляемые источники энергии». Ереван, 1985. Т. 1. С. 244.
122. Чан Динь Тоай. Дисс. ... докт. хим. наук. М.: Изд-во МГУ, 1985. 344 с.
123. Hutschemackers J., Delafontaine M., Maveau H. P., Nyns E.-J.//Biomass. 1982. V. 2. P. 115—125.
124. Viraraghaven T., Cocci A. A., Landine R. C., Steeves A. L.//Ibid. 1984. V. 5. P. 137—159.
125. Merlin E., Norrbin S., Oden S. Ingeniersvetenskapsakademiens. 1926. Hanligar N 53 (Stockholm).
126. Chosh S., Klass D. L.//Resource Recovery Conservat. 1979. V. 4. P. 115—139.
127. Srivastava V. J., Novil M., Tarman P. B., Chynoweth D. B.//Biogas and alcohol Fuels Production. V. 11. Emmans. Pennsylvania: The J. G. Press., 1981. P. 31—59.
128. Wise D. L., Cooney C. L., Angestein D. C.//Biotechnol. Bioeng. 1978. V. 20. P. 1153—1172.
129. Buivid M. D. L., Wise Mc P. L., Carty W. T.//Resource Recovery Conservat. 1979. V. 5. P. 117—138.
130. Ghosh S., Henry M. P., Christopher R. W.//Biomass. 1985. V. 6. P. 257—269.
131. San Marzano C. D., Naveau C. H. P., Nyns F.-J.//Energy from Biomass in Europe/ Eds Palz W. et al. 1980. P. 392—397.
132. Piron-Fraipont C., Dujardin E., Sironal C.//Ibid. 1980. P. 703—708.
133. Bungay H. R. Energy, the biomass options. N. Y.—Brisbane—Toronto—Chichester: J. Wiley Intersci: Publ. 1981. 347 p.
134. Jones J. L., Semran K. T.//Biomass. 1984. V. 5. P. 109—135.
135. Клесов А. А.//Прикл. биохим. и микробиол. 1985. Т. 21. Вып. 2. С. 269—283.
136. Клесов А. А.//Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М.: Изд-во ВИНТИ, 1983. Т. 1. С. 63—150.
137. Акименко В. К.//Биотехнология. 1985. Т. 1. № 2. С. 128—132.
138. Rabson R., Rogers P.//Biomass. 1981. V. 1. N 1. P. 17—37.
139. Chanal D. S., McGuire S., Pikor M., Noble G.//Ibid. 1982. V. 2. N 2. P. 127—137.
140. Altani E., Albanesi D., Cantarella M. et al.//Ibid. 1982. V. 2. N 4. P. 245—254.
141. Arebion J., Delmas M., Gaset A.//Ibid. 1983. V. 3. P. 59—65.
142. Borredon M., Delmas A., Gaset A.//Ibid. 1983. V. 3. P. 67—74.
143. Song S. K., See Y. Y.//Ibid. 1984. V. 6. P. 93—100.
144. Beck J., Stricklourd R. C.//Ibid. 1984. V. 6. P. 101—110.
145. Kumakura M., Kojima T., Kaetsu I.//Ibid. 1982. V. 2. P. 299—308.
146. Kumakura M., Kaetsu I.//Ibid. 1983. V. 3. P. 199—208.
147. Сунитын А. П., Ковалев Г. В., Меса-Манреса С. Р. и др.//Химия древесины. 1984. № 5. С. 60—71.
148. Minier M., Gomu G.//Energy from Biomass. I EC Conference. L.: Applied Science Publishers. 1981. P. 298—305.
149. Swings J., Deley J.//Bacteriol. Rev. 1977. V. 41. P. 1—46.
150. Margaritis A., Baijai P. K., Wallace J. B.//Biotechnol. Lett. 1981. V. 3. N 11. P. 613—618.
151. Zeikus J. G., Ng T. K.//Annual Report on fermentation processes. V. 5. N. Y.—San Francisco: Acad. Press, 1982. P. 263—289.
152. Hawgood N., Evans S., Greenfield P. F.//Biomass. 1985. V. 7. P. 261—278.
153. Ingram L. O., Carey V. C., Dombek K. M. et al.//Ibid. 1984. V. 6. P. 131—143.
154. Poosaran N., Hetes R. H., Rogers P. L.//Ibid. 1985. V. 7. P. 171—185.
155. Proceedings. Intern. Symp. on Ethanol from Biomass/Ed. Duckworth H. E. Ottawa: The Royal Society of Canada. 1983. 654 p.
156. Khan A. S., Fox R. W.//Biomass. 1982. V. 2. N 3. P. 213—221.
157. Keim C. R.//Enzyme Microb. Technol. 1983. V. 5. P. 103—114.
158. Malik V. S.//Process Biochem. 1982. V. 17. N 2. P. 38—41.
159. Kalmbacher R. S., Martin F. G., Mistelev P.//Biomass. 1985. V. 7. N 1. P. 1—11.
160. Scheller W. A.//Gasohol USA. 1979. V. 1(7). P. 18—20, 28.
161. Chem. Eng. News. 1982. V. 60(5). P. 21—23.
162. Emert G. H., Katzen R., Fredrickson T. E., Kaupisch K. F.//CEP September. 1980. P. 47.
163. Emert G. H., Katzen R., Fredrickson T. E., Kaupisch K. F.//Proc. Pan-Pacit. Synthuels Conf. V. 2. Tokyo, 1982. P. 447.
164. Spano L., Tassinari T., Ryu D. D. Y. et al.//Biogas and Alcohol Fuels Production. Proc. Semikar on Biomass Energy for City, Farm and Industry. Pennsylvania: The JG Press Inc. Emmans. 1980. P. 62.
165. Baker A. J., Jeffries T. W. Report to USDA Forest Service for U. S. Agency for International Development (TMR Authorization N 81— 89). U. S. Department of Agriculture. Forest Laboratory. Madison, Wisconsin. 1981. 66 p.
166. Chang M., Thou T., Tsao G. T.//Bioenergy/Ed. Fiechter A. Berlin—Heidelberg—N. Y.: Springer-Verlag, 1981. P. 15—32.
167. Ganesh D., Mowat D. N.//Biomass. 1985. V. 7. № 1. P. 13—25.
168. Pipeline and Gas J. 1981. V. 208(7). P. 7.

169. Locke E. G., Garum E.//Forest Products J. 1961. V. 11(8). P. 380—382.
170. Du Preez J. C., De Jong F., Botes P. J., Lategan P. M.//Biomass. 1985. V. 8. N 2. P. 101—118.
171. Deepchand K., Baguant J.//Ibid. 1985. V. 7. N 3. P. 215—224.
172. Логоткин И. С. Технология ацетоно-бутилового производства. М.: Пищепром, 1958. 267. с.
173. Броильные производства. М.: Пищепром, 1959. Т. 1. С. 291—327.
174. Hartmanis M. G. N., Klason I., Gatenbeck S.//Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984. V. 20. P. 66—71.
175. Варфоломеев С. Д., Медман Д. Я., Пинчукова Е. Е., Чан Динь Тоай//Докл. АН СССР. 1985. Т. 284. № 5. С. 1275—1277.
176. Maddox I. S., Murray A. E.//Biotechnol. Lett. 1983. V. 5. P. 175—178.
177. Welsh F. W., Veliky I. A.//Ibid. 1984. V. 6. N 1. P. 61—64.
178. Schoutens G. H., Nieuwenhuizen M. C. H., Kossen H. W. F.//Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984. V. 19. P. 203—206.
179. Лукина Г. П., Ежова Н. Е., Гуськова Н. П.//Микробиол. пром-сть. 1983. № 6. С. 37—38.
180. Lee S. F., Forsberg C. W., Gibbins L. N.//Appl. Envir. Microbiology. 1985. N 8. P. 220—228.
181. Doelle H. W. Bacterial Metabolism, 2nd ed. N. Y.: Acad. Press, 1975.
182. Gottschalk G. Bacterial Metabolism. Hamburg: Springer-Verlag, 1979.
183. Volesky B.//Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 1983. V. 27. P. 101—118.
184. Petitdemange H., Cherier C., Blusson H., Gay R.//Can J. Microbiol. 1977. V. 23. P. 152—160.
185. George H. A., Chen J.-S.//Appl. Envir. Microbiol. 1983. V. 46. P. 321—327.
186. Andersch W., Bahl M., Gottschalk G. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1983. V. 18. P. 327—332.
187. Hartmanis M. G. N., Gatenbeck S.//Appl. Envir. Microbiol. 1984. V. 47. P. 1277—1283.
188. Kim D. H., Bellows P., Datta R., Zeikus J. G.//Ibid. 1984. V. 48. P. 764—770.
189. Bahl H., Andersch W., Braun K., Gottschalk G.//Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1982. V. 14. P. 7—20.
190. Davres R.//Biochem. J. 1943. V. 37. P. 230—238.
191. Petitdemange H., Blusson H., Gay R.//Anal. Chem. 1981. V. 116. P. 564—570.
192. Holt R. A., Stephens G. M., Morris J. G.//Appl. Microbiol. 1984. V. 48. P. 1166—1170.
193. Fonad M., Ali A.-Z., Yassein M.//Agric. Wastes. 1982. V. 4. P. 291—304.
194. Gottschalk J. C., Morris J. G.//FEMS Microbiol. Lett. 1981. V. 12. P. 385—389.
195. Martin J. R., Petitdemange H., Ballongue J., Gay R.//Biotechnol. Lett. 1983. V. 5. P. 89—94.
196. Fond O., Petitdemange E., Petitdemange H., Gay E.//Ibid. 1984. V. 6. P. 13—18.
197. Gottschalk J. C., Morris J. G.//Ibid. 1981. V. 3. P. 525—530.
198. Forberg C., Enfors S.-O., Haggstrom L.//Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1983. V. 17. P. 143—147.
199. Bahl H., Andersch W., Gottschalk G.//Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1982. V. 15. P. 201—205.
200. Forberg C., Haggstrom L.//Eur. Microb. Technol. 1985. V. 7. P. 230—234.
201. Costa J. M., Moreira A. R.//ACS Symposium Series 207. 1983. P. 501—512.
202. Zajic J. E., Cooper D. C., Jack T. K., Kosaricc N.//Microbial Enhanced Oil Recovery. Tulsa, Oklahoma: Penn Well Books, 1983. P. 141—149.
203. Vollherbst-Schneek K., Sands J. A.//Appl. Environ. Microbiol. 1981. V. 6. P. 61—64.
204. Salmond C. V., Kroll R. G., Booth D. R.//J. Gen. Microbiol. 1984. V. 130. P. 2845—2850.
205. Bu'Lock J. D., Bu'Lock A. J., The Acetone-Butanol Fermentation and Related Topics 1980—1983 (Fermentation Research. N. 1). Science and Technology Letters, 1983.
206. Gajfron H., Rubin J.//J. Gen. Physiol. 1942. V. 26. P. 219—240.
207. Красновский А. А.//Биоконверсия солнечной энергии. Пушкино. ОНТИ НЦБИ, 1984. С. 3—21.
208. Miyamoto K., Hallenbeck P., Benemann J.//Appl. Environ. Microbiol. 1979. V. 38. P. 440—446.
209. Jeffries T. W., Leach K.//Ibid. 1978. V. 35. P. 1228—1230.
210. Vincenzini M., Bulloni W., Manelli D., Florenzano G.//Experientia. 1981. V. 37. P. 710—712.
211. Zurrer H., Bachoten R.//Biomass. 1982. V. 2. P. 165—174.
212. Rao K. K., Hall D. O.//Photosynthesis in Relation to Model Systems/Ed Barder J. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, P. 293—329.
213. Красновский А. А.//Преобразование солнечной энергии. Черноголовка, 1981. С. 82.