

УДК 579.222.7:2:57.083.134

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ *n*-БУТАНОЛА С КЛОСТРИДИЯМИ

© В.И. Сушкова*, С.В. Яроцкий, А.В. Сухоженко

ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов,
1-й Дорожный проезд, 1, Москва, 117545 (Россия), e-mail: sushkovaval@mail.ru

С целью разработки технологической схемы производства *n*-бутанола микробиологическим синтезом, обеспечивающим выход суммы растворителей не менее 40% от условного крахмала в субстрате, проведена интенсификация процесса ацетоно-бутиловой ферментации путем получения новых штаммов *Clostridium acetobutylicum* (СВ 6-1) ВКПМ В-10289 и (СВ-2) ВКПМ В-10290 и оптимизации состава питательных крахмалосодержащих субстратов с выходом суммы растворителей 39-53% от условного крахмала в субстрате.

Разработана технологическая схема производства *n*-бутанола, основанная на комплексной переработке целлюлозо- и пентозансодержащего сырья, отрубей, мелассы и предусматривающая следующие варианты: 1) биосинтез *n*-бутанола *Cl. acetobutylicum* СВ-2 ВКПМ В-10290 из ржаной муки с использованием культуральной жидкости *Cl. tyrobutyricum*; 2) двухэтапный процесс экстракции *n*-бутанола из культуральной жидкости при ацетоно-бутиловой непрерывной ферментации и по ее завершению; 3) получение *n*-бутанола по традиционной технологии с исследуемыми штаммами или симбиотическим консорциумом двух бактерий *Cl. tyrobutyricum* и *Cl. acetobutylicum* с и без экстракции *n*-бутанола из отработанной культуральной жидкости. Выход суммы растворителей следующий: 1 – до 40% от условного крахмала в субстрате; 2 – 34,5% ; 3 – до 43% от сброженных углеводов.

Ключевые слова: ферментативный гидролизат, кукурузная кочерыжка, отруби, меласса, ржаная мука, штамм, экстрактивная ферментация, олеиловый спирт, продуктивность, выход, масляная кислота, *n*-бутанол, масляно-кислородное брожение, ацетоно-бутиловая ферментация.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии», ГК № 16.М04.12.0017.

Введение

Заводы по производству биобутанола по типовой технологии работали во многих странах мира, включая Россию, Соединенные Штаты Америки, Великобританию, Китай, Южную Африку и Индию. Появление на рынке более дешевого по стоимости бутанола из нефтепродуктов привело к закрытию производств биобутанола. Но повышающиеся цены на нефть и стремление к укреплению национальной безопасности за рубежом явились стимулом к продолжению исследований по совершенствованию технологии производства *n*-биобутанола из возобновляемых видов растительного сырья. В настоящее время созданы пилотные заводы в США, Англии, Австрии, Китае.

Конкурентоспособность производства *n*-бутанола микробиологическим синтезом в основном зависит от эффективности процесса ацетоно-бутиловой ферментации. Продукты биосинтеза *n*-бутанол, этанол, ацетон, масляная и уксусная кислоты и другое являются токсичными по отношению к продуценту *Clostridium*

Сушкова Валентина Ивановна – ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, доцент, тел.: (495) 315-04-65; факс: (495) 315-05-01, e-mail: sushkovaval@mail.ru

Яроцкий Сергей Викторович – заведующий лабораторией, доктор биологических наук, тел.: (495) 928-37-59, e-mail: yarotsky@genetika.ru

Сухоженко Алексей Владимирович – научный сотрудник, e-mail: suhozenko_av@fastmail.net

(*Cl. acetobutylicum*) (критические концентрации *n*-бутанола – 12–13 г/л [1] и масляной кислоты – 6 г/л [2]). Это снижает технико-экономические показатели процесса ферментации и производства *n*-бутанола в целом. Выходы продуктов биосинтеза (*n*-бутанола – 20–22%, суммы растворителей – 35–37% от условного крахмала в питательном субстрате) значительно ниже

* Автор, с которым следует вести переписку.

теоретических выходов (*n*-бутанола 26,6 и суммы растворителей 43,24% от сброженного крахмала) [1, 3]. По этим причинам при получении *n*-бутанола микробиологическим синтезом имеют место высокие затраты на углеводсодержащее сырье и теплоэнергоресурсы [3].

За рубежом в производстве *n*-бутанола используют следующие штаммы: *Cl. acetobutylicum* P262 (также известный как *Clostridium saccharobutylicum*) [4, 5]; *Cl. acetobutylicum* NRRL B643, ATCC 824, B18, *Cl. beijerinckii* 8052 [6]; BA 101, [7–15]; EA 2018 [14]; LMD 27,6; P260 [16]. Еще большее количество штаммов получено и исследовано в лабораторных условиях, в том числе *Cl. acetobutylicum* ВКПМ В-4786 [17, 18]; ВКПМ В-5359 (S-3716) [19]; DSM 1731 [2] SoLRH (ptAAD) [16]; *Cl. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 [2]; NI-4, [20]; *Cl. beijerinckii* NCIMB 8052 [21]; JCM 1390 [22]; CCM-6182 [23] *Cl. pasteurianum* NRRL B-592 [23] и др. Максимальные показатели концентраций *n*-бутанола, суммы растворителей (г/дм³) и продуктивности по сумме растворителей (г/дм³/ч) имеют известные штаммы *Cl. acetobutylicum* №6 (12,3; 19,2; 0,36), ВКПМ В-4786 (11,0; 20,0; 0,37) [18]; SoLRH (ptAAD) (*n*-бутанол 17,6) [16]; *Cl. beijerinckii* BA101 (15,8–19,6; 24,2–26,1; 0,34) [4, 8, 11, 24] и P 260 (сумма растворителей 25; 0,31–0,36) [16, 25].

Для культивирования этих штаммов в лабораторных условиях используют следующие синтетические среды: MSS [17], P2, [14, 15, 17, 20, 25] и TYA [20]. Для роста клостридий и биосинтеза ими растворителей требуются как макро-, микроэлементы, так и ростовые вещества. Источником всех этих компонентов является крахмалсодержащее сырье (зерносырье и картофель) [1].

Максимальные выходы *n*-бутанола и суммы растворителей имеют место в процессе ацетонобутилового брожения крахмала зерносырья и мальтодекстрин [1, 6–10, 17, 18, 26, 27]. Наш экономический анализ показал, что стоимость субстратов из муки зерносырья составляет около 50% от себестоимости суммы растворителей [3]. С целью снижения расхода муки зерносырья для приготовления питательных субстратов чаще используют смесь различных видов сырья.

В промышленном производстве СССР *n*-бутанола микробиологическим синтезом по традиционной технологии использовали смешанный субстрат следующего состава: обдирная мука (40–80%), свекловичная меласса (18,8–61,2%) и нейтрализованные гидролизаты отходов от переработки растительного сельскохозяйственного сырья (кукурузной кочерыжки, подсолнечной лузги, конопляной костры) (3,5–6,3%). При содержании в субстрате 5,9% гидролизата и 22,3% мелассы от общего количества условного крахмала выход растворителей с 1 т условного крахмала составлял 362,3 кг (36,2%), в том числе *n*-бутанола – 210,3 кг (21,0%). Процесс брожения длился 60–72 ч [1].

Проверенно значительное количество более дешевого возобновляемого углеводсодержащего сырья, чем обдирная ржаная мука: сахарсодержащие (свекла, соевая, свекольная мелассы; патоки); крахмалсодержащие (мальтодекстрины, зерно, пшеничные и рисовые отруби, саго, топиока, картофель); пентозансодержащие (кукурузная кочерыжка, багасса, плодоовощные отходы); целлюлозосодержащие материалы (солома пшеницы, ячменя, овса и риса, пожнивные остатки соевых бобов, макулатура, скорлупа ореха, высушенная зерновая послеспиртовая барда) и другие (молочная сыворотка, глицерин) [1–36].

Совмещение процессов ацетонобутиловой ферментации с методами выделения *n*-бутанола позволяет перерабатывать высокие концентрации углеводов в питательном субстрате (400–500 г/л), получать более высокие концентрации *n*-бутанола в продуктах выделения растворителей 20–45 г/л и существенно экономить теплоэнергосистемы [4–6]. Известна технология экстрактивной ферментации в две ступени в биореакторах с олеиловым спиртом и рециркуляцией культуральной жидкости и биомассы клостридий, обеспечивающая концентрацию *n*-бутанола в экстрагенте 35–37 г/дм³ [37–39]. Но она не позволяет полностью извлечь *n*-бутанол из культуральной жидкости. Кроме того, невозможно осуществить полную ее рециркуляцию, так как будут накапливаться не целевые продукты метаболизма и снижать выход *n*-бутанола.

Известна двухстадийная технология получения бутанола с двумя культурами, на первой стадии с *Cl. tyrobutyricum* и на второй – *Cl. acetobutylicum* [4]. В данном процессе выше выход суммы растворителей на 2% (45,66%) и есть возможность получать в основном *n*-бутанол с минимальным количеством соразтворителей. Ramey D. удалось достигнуть высокого выхода *n*-бутанола 34% [40] и содержания бутанола в составе растворителей – 80% на глюкозе при использовании данного метода с иммобилизованными биомассами бактерий и совмещенного с процессом выделения *n*-бутанола [4, 40].

Мы провели сравнительный анализ эффективности использования штамма *Clostridium beijerinckii* BA 101 для ацетонобутилового брожения крахмалсодержащих сред, смешанных субстратов, глюкозы и

олигосахаров. Был сделан вывод, что на низкомолекулярных субстратах (глюкоза, сахароза мелассы, мальтодекстрины) образуется меньше сопродуктов по отношению к *n*-бутанолу [8–11].

Таким образом, основными направлениями интенсификации процесса ацетоно-бутилового брожения и снижения себестоимости производства *n*-бутанола в целом являются:

- 1) получение высокопродуктивного штамма бактерий – продуцента *n*-бутанола, толерантного к продуктам биосинтеза – масляной кислоте и *n*-бутанолу;
- 2) оптимизация состава питательного субстрата и использование в качестве дополнительного субстрата масляной кислоты;
- 3) использование непрерывного процесса ацетоно-бутиловой ферментации совмещенного с одним из методов выделения *n*-бутанола из культуральной жидкости.

Цель данной работы – разработать технологическую схему получения *n*-бутанола микробиологическим синтезом, обеспечивающим выход суммы растворителей не менее 40% от условного крахмала в субстрате.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить более эффективный штамм бактерий *Cl. acetobutylicum*;
- оптимизировать состав питательного субстрата с дополнительным источником питания масляной кислотой;
- разработать технологию экстрактивной ацетно-бутиловой ферментации.

Экспериментальная часть

Объекты исследований. Для исследований были использованы штаммы бактерий ацетоно-бутилового брожения: *Clostridium (Cl.) acetobutylicum* ВКПМ В-4786 (коллекция музея культур ФГУП ГосНИИ генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов), №6 и №7 (коллекция МГУ) и штаммы маслянокислого брожения *Cl. tyrobutricum* ВКПМ В-9615, В-10406, *Cl. butyricum* ВКПМ В-9619 и *Cl. butyricum* ВКПМ В-9617 (коллекция музея культур ФГУП ГосНИИ генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов).

С использованием УФ-облучения суспензий штаммов *Cl. acetobutylicum* №6 и ВКПМ В-4786 с последующим отбором получено два штамма с повышенным уровнем биосинтеза *n*-бутанола СВ-6-1 и СВ-2 соответственно.

Полученные штаммы адаптированы к стерильным фугатам культуральных жидкостей следующих штаммов маслянокислых бактерий: *Cl. tyrobutricum* ВКПМ В-9615, ВКПМ В-10406 и *Cl. butyricum* ВКПМ В-9619.

Данные штаммы депонированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) как *Cl. acetobutylicum* ВКПМ В-10289 и ВКПМ В-10290 соответственно.

Штаммы бактерий ацетоно-бутилового брожения *Cl. acetobutylicum* являются облигатными анаэробами, палочковидными, гетеротрофными микроорганизмами [1]. Бактерии имеют клостридиальную форму спорообразования, каждая вегетативная клетка может образовывать только одну спору. Споры могут переносить нагревание до 65 °С в течение 40 дней, легко выдерживает нагревание до 80 °С в течение 10–30 мин, гибнут при нагревании до 100 °С в течение 4 мин.

Молодые вегетативные клетки ацетоно-бутиловых бактерий по Граму положительны. В процессе развития культуры число грамтрицательных клеток все более возрастает. Это потерявшие активность и мертвые клетки [1].

Данные штаммы ацетоно-бутиловых бактерий сбраживают как гексозные моносахариды (глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу), так и пентозные (ксилоза, арабиноза) а также рамнозу (6-дезоксиманноза) и сахарозу. Установлено, что они обладают гемицеллюлазной активностью [17].

В присутствии углеводов они сбраживают следующие кислоты: уксусную, масляную. Утилизируют минеральный азот только в присутствии экстракта дрожжей. Из источников азота они утилизируют отдельные аминокислоты, в том числе аспарагин, но присутствие в питательном субстрате источника азота из смеси 18 аминокислот для их роста недостаточно.

Ацетоно-бутиловые бактерии развиваются в присутствии ростовых веществ, содержащихся в дрожжевых автолизатах, а также в зерновых культурах: кукурузе, пшенице, ржи, а также картофеле. Установлено, что из витаминов им необходимы два: биотин и пара-аминобензойная кислота [1, 17].

Длительное хранение бактерий вида *Cl. acetobutylicum* возможно после леофилизации, а также в средах с минимальным содержанием сбраживаемых сахаров (3% ржаной муки) в течение полгода. Культуру фер-

ментируют в термостате при 37 °С в течение 2–3 сут. Полученную суспензию бактерий хранят при 4–6 °С, споровую суспензию хранят в стерильной воде при 4 °С или стерильном 25% растворе глицерина при -70 °С.

Сырье и составы питательных субстратов. В процессе исследований были использованы следующие виды крахмалсодержащего сырья: обдирная ржаная мука, отруби и картофель. Ржаная мука содержала 65% полисахаридов, отруби – 60% легкогидролизуемых полисахаридов, картофель – 18% крахмала. Используемый образец мелассы содержал 54,31% РВИ (редуцирующих веществ после инверсии), в том числе 40% сахарозы.

Был проверен ряд субстратов следующего состава (мас.%):

- а) 5–7% водная суспензия ржаной обдирной муки;
- б) 6 и 7% суспензия ржаной обдирной муки с добавкой свекловичной мелассы в количестве 0,5 и 1,35 % по РВИ;
- в) 6 и 7% ржаной обдирной муки +1% мальтозы;
- г) картофель – 25,0 (75% влажность, 18% крахмала), уксуснокислый аммоний – 0,15; мел – 0,2; цистеин – 0,05; глюкоза – 5,0;
- д) ржаная обдирная мука – 6, меласса – 0,5% по сахарозе, культуральная жидкость после маслянокислого брожения со штаммом *Clostridium tyrobutyricum* ВКПМ В-9615 или В-10406 или со штаммом *Clostridium butyricum* ВКПМ В-9619 – 4–30, вода – остальное (условный крахмал в субстрате 4,375 мас.%);
- е) смешанный субстрат из ферментативного гидролизата кукурузной кочерыжки и отрубей.

Для проведения процессов брожения использовали синтетические питательные субстраты SOL [41, 42] и MSS [17].

Агаризованные питательные субстраты готовили на основе среды SOL с содержанием агара 1,5%.

В качестве гидролизатов пентозансодержащего сырья использовали один образец осветленного ферментативного гидролизата кукурузной кочерыжки ($d < 1$ мм, РВИ=5,9%; РВ=5,54%, ГМ 1:7, а.с.в.7,02%, рН 4,5). Для его приготовления проводили гидротермообработку при $t=100$ °С в течение 1ч и двухступенчатый ферментативный гидролиз. (Первая ступень: ксиланаза (НПО «ВОСТОК») при температуре 50 °С, рН 5,0 в течение 1 ч. Вторая ступень: GC-220, МЭК-СХ3 и Novozim при температуре 50 °С, рН 5,5–4,5 в течение 20 ч.) Гидролизат нейтрализовали до рН 6,0 2N раствором NaOH и фильтровали. Готовили два образца питательных субстратов, один обогащали минеральными и ростовыми компонентами путем добавления 3% отрубей, другой 3% (по отрубям) ферментативного гидролизата отрубей. Содержание редуцирующих веществ в субстратах приведены в таблицах 1 и 2.

Синтетические среды стерилизовали при $t=120$ °С в течение 30 мин; субстраты, содержащие мелассу и муку – при 135 °С, в течение 1,5 ч (суммарное время нагрева, выдержки и охлаждения).

Методы анализа. Содержание свободных масляной и уксусной кислот, а также растворителей (*n*-бутанол, ацетон, этанол) в культуральной жидкости (КЖ) и органической фазе определяли методом газохроматографического анализа (ГХ) с пламенно-ионизационным детектированием. Использовали капиллярную колонку Heliflex® AT-AquaWAX-DA (Grace) длиной 15–30 м, внутр. диаметр 0,5–0,32 мм, толщина пленки 0,25 мкм. В качестве внутренних стандартов применяли 0,2% об. растворы *n*-пентанола и пропионовой кислоты. Система сбора и обработки данных «Мультихром» на основе персонального компьютера. Погрешность определения в диапазоне концентраций 500–10000 мг/л составляет менее 10% относительных.

Концентрацию редуцирующих веществ (РВ), пересчитанных на глюкозу, в КЖ и субстратах определяли фотоколориметрическим методом с реактивом DNSA на фотоколориметре марки КФК – 2М [17].

Для определения концентрации редуцирующих веществ после инверсии (РВИ), пересчитанных на глюкозу, в КЖ (субстрате) использовали известный принцип анализа [43].

Содержание углеводов в кукурузной кочерыжке и мелассе определяли эбулиостатическим методом [44].

Определение растворимых и легкогидролизуемых углеводов в крахмалсодержащем сырье по ГОСТ 26176-91 [45].

Методы исследований. УФ-облучению подвергали суспензию микроорганизмов, выращенных на жидкой среде MSS (12–18 ч) после добавления стерильного фугата культуральной жидкости маслянокислых бактерий в количестве 50 мас.%. Отбор высокопродуктивного штамма осуществляли в несколько последовательных этапов: с твердой агаризованной среды и жидкой среды MSS по биомассе, с суспензионной 6% мучной среды по времени брожения и затем по биосинтезу *n*-бутанола. Отобранный вариант адап-

тировали к культуральной жидкости маслянокислых бактерий в количестве от 4 до 30% по объему к субстрату с проверкой биосинтеза *n*-бутанола.

Брожение проводили в лабораторных, статических, строго анаэробных условиях во флаконах общим объемом 120 см³ и рабочим объемом 50 см³, доза посевного материала 2–5 об.%. Условия ферментации: pH 4,0–6,3, температура 37 °С, 48–96 ч.

Методика ферментации маслянокислых бактерий представлена в предыдущих работах данных авторов [41, 42].

Методика экстрактивной ацетоно-бутиловой ферментации представлена в предыдущей работе данных авторов [46].

Количество параллельных ферментаций – от 2 до 5 раз. Среднее квадратичное отклонение результата измерения концентрации МК составляет 0,25. При доверительной вероятности 0,95 коэффициент Стьюдента равен 3,182. Доверительные границы случайной погрешности полученного результата составляют 0,79 г/л. Среднее квадратичное отклонение концентрации *n*-бутанола составляет 0,212. Коэффициент Стьюдента равен 2,571. Доверительные границы случайной погрешности полученного результата – 0,55 г/л [47].

Обсуждение результатов

Разработка состава питательного субстрата для оценки свойств коллекционных штаммов-продуцентов *n*-бутанола. Коллекционные штаммы *Cl. acetobutylicum* №6, №7, ВКПМ В-4786 выращивали на различных крахмалсодержащих питательных субстратах, результаты исследований даны в таблице 1.

Из данных таблицы 1 видно, что при брожении суспензии ржаной муки штамм №6 превосходит штаммы №7 и ВКПМ В-4786 по продуктивности и выходам *n*-бутанола и суммы растворителей. При брожении субстратов из 7% ржаной муки для штаммов №6 и ВКПМ В-4786 получены максимальные концентрации *n*-бутанола 9,5 и 9,0 г/дм³ и суммы растворителей 17,6 и 15,3 г/дм³ соответственно. При этом продуктивность штамма №6 по *n*-бутанолу и сумме растворителей составляет 0,13 и 0,24 г/л/дм³ соответственно при времени брожения 72 ч.

Зависимости выходов *n*-бутанола и суммы растворителей от нагрузки по условному крахмалу представлены на рисунке 1. Выхода *n*-бутанола и суммы растворителей у штамма №6 составляют 20,8 и 38,7% от крахмала в субстрате при максимальной нагрузке по крахмалу 45,5 г/дм³. Для штамма ВКПМ В-4786 максимальной нагрузкой по крахмалу является концентрация в питательном субстрате 39 г/дм³. При низкой продуктивности выхода по *n*-бутанолу и сумме растворителей составили 21,3 и 36,7% соответственно от крахмала в субстрате.

При ферментации данных коллекционных штаммов на суспензии ржаной муки процесс кислотообразования идет вяло, соответственно, затягивается процесс биосинтеза растворителей. Основным компонентом питательных субстратов, усиливающих процесс кислотообразования у клостридий, является витамин биотин. Биотин содержится в мелассе и отрубях (0,1 и 0,7–0,8 мг/кг соответственно [40]).

Рис. 1. Зависимость выходов *n*-бутанола и суммы растворителей от нагрузки по крахмалу при брожении субстратов из ржаной муки

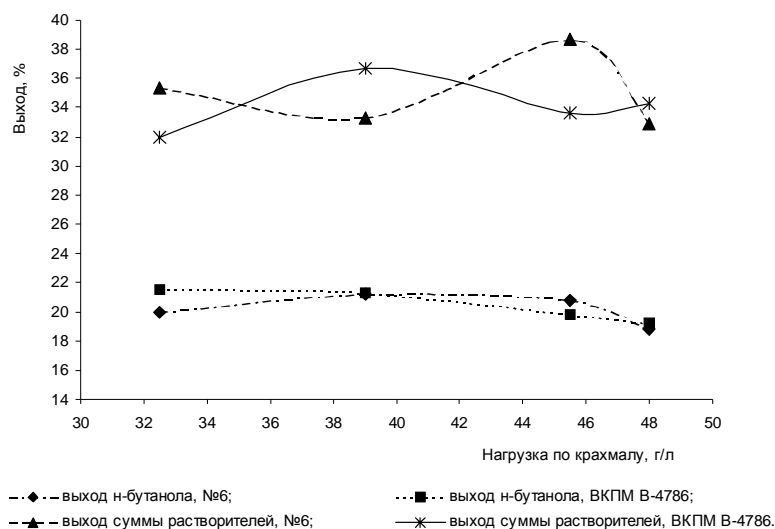


Таблица 1. Эффективность ацетоно-бутиловой ферментации коллекционных штаммов *Cl. acetobutylicum*

Состав среды	Номер штамма	Состав продуктов брожения, г/дм ³						Время, ч	Продуктивность, г/дм ³ /ч		Выход от субстрата, %	
		n-бутанол	ацетон	этанол	сумма растворителей	кислоты			n-бутанола	растворителей	n-бутанола	растворителей
						мас-ляная	уксусная					
6% суспензия ржаной муки (крахмал 39,0 г/дм ³)	№7	7,1	4,7	0,8	12,6	0,6	0,7	72	0,10	0,18	18,2	32,3
	№6	8,3	4,0	0,7	13,0	1,0	1,1	72	0,12	0,18	21,2	33,3
	ВКПМ В-4786	8,3	5,3	0,65	14,3	0,85	0,6	168	0,05	0,09	21,3	36,7
6% ржаная мука + 0.5% сахара мелассы (43,75 г/дм ³)	№6	8,3	4,6	0,6	13,5	0,9	1,2	48	0,17	0,28	18,9	30,9
	ВКПМ В-4786	8,4	4,9	0,8	14,1	0,8	1,3	96	0,09	0,15	19,2	32,2
6% ржаная мука + 1,35% РВИ мелассы (51,8 г/дм ³)	№6	9,1	4,0	2,3	15,4	1,15	1,33	96	0,10	0,16	17,6	29,7
	ВКПМ В-4786	9,08	4,73	1,1	14,9	0,83	1,35	120	0,08	0,12	17,5	28,8
6% суспензия ржаной муки + 1,0% мальтозы (условный крахмал 48,0 г/дм ³)	№7	9,0	6,5	0,7	16,2	0,3	0,7	72	0,13	0,23	18,8	33,8
	№6	9,0	6,0	1,3	16,3	0,2	0,7	63	0,14	0,26	18,8	33,9
	ВКПМ В-4786	9,3	5,4	0,7	15,4	1,0	0,4	72	0,13	0,21	19,4	32,1
7% ржаная мука (условный крахмал 45,5 г/дм ³)	№6	9,5	6,2	1,9	17,6	1,6	2,3	72	0,13	0,24	20,8	38,7
	ВКПМ В-4786	9,0	5,7	0,6	15,3	0,6	0,6	240	0,04	0,06	19,8	33,6
6% суспензия ржаной муки + отруби 10% по крахмалу (крахмал 42,9 г/дм ³)	№7	8,5	5,0	0,8	14,3	0,7	0,8	72	0,12	0,20	19,8	33,3
	№6	7,2	3,7	1,7	12,6	0,4	1,0	72	0,10	0,18	16,8	29,4
	ВКПМ В-4786	7,5	4,8	0,7	13,0	0,8	1,6	96	0,08	0,14	17,5	30,3
6% ржаная мука + отруби 10% по крахмалу +1% мальтоза (условный крахмал 51,9 г/дм ³)	№6	9,0	6,0	1,3	16,3	0,2	0,7	63	0,14	0,26	17,3	31,4
	ВКПМ В-4786	8,0	5,0	1,0	14,0	0,5	1,0	168	–	–	–	–
	ВКПМ В-4786	4,0	2,4	0,2	6,6	1,3	1,5	168	–	–	–	–
7% ржаная мука + 1,35% РВИ мелассы (условный крахмал 58,3 г/дм ³)	ВКПМ В-4786	11,0	7,1	0,9	18,9	4,0	0,5	408	0,03	0,05	21,2	36,4
	№7	2,0	0,8	0,3	3,1	5,2	8,5	48	0,04	0,07	3,4	5,3
	№6	11,7	5,9	2,2	19,2	1,4	1,6	54	0,23	0,36	20,0	32,9
5% глюкозы +2% ржаной муки (условный крахмал 58,0 г/дм ³)	ВКПМ В-4786	11,2	6,8	1,5	20,0	3,1	3,8	48	0,23	0,42	19,2	34,3
	№7	9,4	5,6	0,6	15,6	1,0	1,5	72	0,13	0,22	16,2	26,9
MSS, 6% глюкоза, (остаточные РВ=5 г/дм ³)	№6	11,0	6,8	2,2	20,0	1,0	1,0	72	0,15	0,28	18,9	34,5
	ВКПМ В-4786	10,0	6,0	0,6	16,6	0,8	1,8	96	0,10	0,17	17,2	28,6
	ВКПМ В-4786	9,5	3,9	1,5	14,8	0,8	0,5	96	0,10	0,17	18,2**	29,6**
ФГКК* + 3% отрубей (РВ=47,4 г/л; РВИ=74,4 г/л; остаточные РВ=16,4 г/дм ³)	ВКПМ В-4786	64%										
	№6	9,1	3,2	0,7	13,0	2,5	4,3	120	0,08	0,11	29,4**	42,4**
	ВКПМ В-4786	70%										

*– ферментативный гидролизат кукурузной кочерыжки; **– выхода от сброженных РВ.

При ацетоно-бутиловом брожении питательного субстрата из ржаной муки с добавлением мелассы в количестве 0,5–1,35 мас.% РВИ наблюдается увеличение кислотообразования, снижение времени брожения и как результат увеличение продуктивности (табл. 1). Для данных штаммов максимальным содержанием используемой мелассы (содержание сахарозы не менее 40 мас.%) в питательном субстрате является концентрация 1,35% РВИ. При концентрации РВИ данного образца мелассы в субстрате более 1,35% идет закисание.

Кроме того, увеличение нагрузки по углеводам в процессе ацетоно-бутиловой ферментации также ведет к закисанию. Уксусная и масляная кислоты в концентрациях более 5–7 и 4–7 г/дм³ соответственно ингибируют процесс ферментации данных коллекционных штаммов.

Кинетические зависимости концентраций продуктов биосинтеза штаммами *Cl. acetobutylicum* №6, ВКПМ В-4786 представлены на рисунках 2 и 3. При брожении субстратов из муки и мелассы (7% ржаной муки и 1,35% РВИ мелассы) достигнута максимальная концентрация *n*-бутанола со штаммами №6 и ВКПМ В-4786 11,7 и 11,2 г/дм³ и концентрации суммы растворителей 19,2 и 20,0 г/дм³ соответственно. Максимальная нагрузка по условному крахмалу для штаммов №6 и ВКПМ В-4786 в условиях данных исследований составляет 58,3 г/дм³ (рис. 4). При этом продуктивность по *n*-бутанола равна 0,23 г/дм³/ч для обоих штаммов и по сумме растворителей 0,36 г/дм³/ч для штамма №6 и 0,42 г/дм³/ч – для ВКПМ В-4786. Выхода *n*-бутанола и суммы растворителей для штамма №6 составили 20,0 и 32,9% от условного крахмала в субстрате соответственно. Выхода *n*-бутанола и суммы растворителей для штамма ВКПМ В-4786 составили 19,2 и 34,3% соответственно (рис. 4).

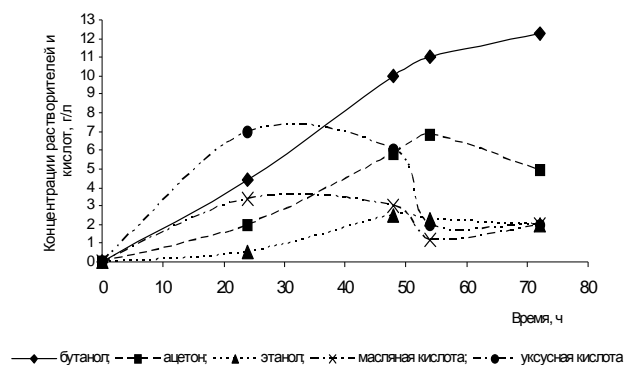


Рис. 2. Кинетические кривые синтеза растворителей при биоконверсии 7% суспензии ржаной муки и 1,35% РВИ мелассы штаммом *Cl. acetobutylicum* №6

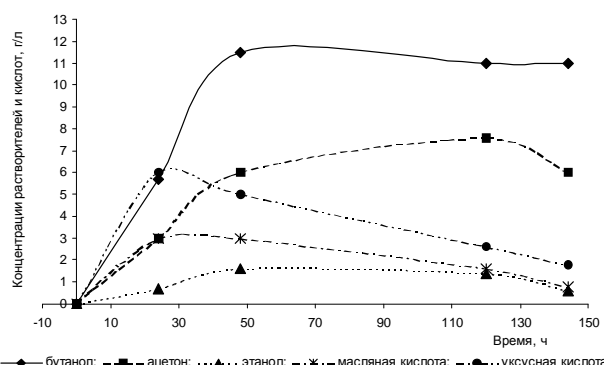
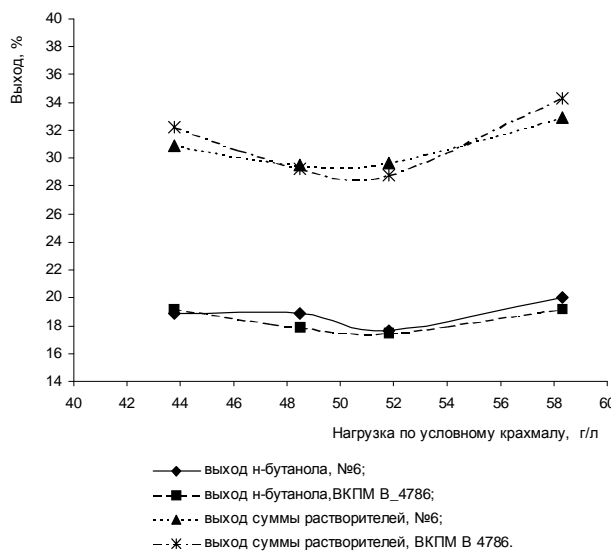


Рис. 3. Кинетические кривые синтеза растворителей при биоконверсии 7% ржаной муки и 1,35% РВИ мелассы штаммом *Cl. Acetobutylicum* ВКПМ В-4786

Рис. 4. Зависимость выходов *n*-бутанола и суммы растворителей от нагрузки по условному крахмалу при брожении субстратов из ржаной муки и мелассы



По данным рисунков 1, 4 и таблицы 1 видно, что при ацетоно-бутиловом брожении смешанного субстрата из ржаной муки и мелассы выхода *n*-бутанола и суммы растворителей для обоих штаммов приблизительно одинаковы. Максимальная нагрузка по условному крахмалу в сравнении с брожением ржаной муки выше 58 г/дм³. При этом максимальные выхода *n*-бутанола и суммы растворителей составляют 19–20% и 33–34% соответственно. В условиях эксперимента наблюдается снижение выходов продуктов биосинтеза при введении мелассы в субстрат на 2–5%, в сравнении с процессом брожения субстрата из ржаной мукой.

При замене 1% сахарозы мелассы на мальтозу в таком же количестве наблюдается увеличение продуктивности и выходов *n*-бутанола и суммы растворителей на 1–2 и 3–4% соответственно (табл. 1).

При ферментации штамма ВКПМ В-4786 на субстрате с добавками отрубей выход *n*-бутанола и суммы растворителей выше по сравнению со штаммом №6, а продуктивность ниже.

При ферментации данных штаммов на субстрате только из отрубей и их ферментативных гидролизатах с мелассой идет закисание. При ферментации штамма №6 на ферментативных гидролизатах отрубей брожение идет активно в сторону выделения большого количества газов, наблюдались взрывы флаконов.

Введение 2% муки в 5% водный раствор глюкозы позволяет провести ацетоно-бутиловое брожение без продувки азотом и добавок макро- и микроэлементов, витаминов. Данный вывод подтверждают данные авторов [8], которые заменили состав среды Р2 зерновым затором с концентрацией зерна 1,67 мас. %.

При ацетоно-бутиловой ферментации штамма №6 на смешанном субстрате, состоящем из ферментативного гидролизата кукурузной кочерыжки и пшеничных отрубей, в интервале рН 4,5–5,0 получены удовлетворительные результаты. Ферментация со штаммом ВКПМ В-4786 в данных условиях не идет, в том числе и на субстрате, продутом азотом. При замене отрубей на ферментативный гидролизат получить нейтральные растворители не удалось, идет закисание со штаммом №6, и брожение со штаммом ВКПМ В-4786 не идет.

При ацетоно-бутиловой ферментации данных штаммов доля *n*-бутанола в составе суммы растворителей зависит от состава субстрата следующим образом: на крахмалсодержащих и смешанных субстратах – 55–61%; на глюкозе со штаммом ВКПМ В-4786 – 64%; на смешанном субстрате из ферментативного гидролизата кукурузной кочерыжки и отрубей со штаммом №6 – 70%.

Таким образом, из данных таблицы 1 и рисунков 1–4 можно сделать следующие выводы:

а) продуктивность штамма №6 выше, чем у остальных исследуемых коллекционных штаммов на крахмалсодержащих субстратах; максимальные выхода суммы растворителей от крахмала в субстрате получены в процессе брожения субстрата из 6% ржаной муки с отрубями и без них со штаммом ВКПМ В-4786 (36,7%) и 7% ржаной муки со штаммом №6 (38,7%);

б) использование данного образца мелассы в составе субстрата в количестве 0,5–1,35% по РВИ снижает выход продуктов биосинтеза на 2–5%;

в) при введении сахаров более низкой молекулярной массы (сахароза, мальтоза), чем крахмал муки, в количестве 1% позволяет увеличивать нагрузку по условному крахмалу до 58 г/дм³ (субстрат 7% ржаной муки и 1,35% РВИ мелассы) и получать культуральную жидкость с концентрацией *n*-бутанола около 11 г/дм³ и суммы растворителей 19–20 г/дм³;

д) 2% ржаной муки и 3% пшеничных отрубей в составе субстратов, содержащих моносахариды, обеспечивают типовой процесс ферментации данных штаммов необходимыми макро- и микроэлементами, ростовыми веществами;

е) доля *n*-бутанола в составе растворителей при брожении глюкозы и моносахаров смешанного субстрата из ферментативного гидролизата кукурузной кочерыжки и отрубей составляет 64–70%.

Разработка состава питательного субстрата для оценки свойств новых штаммов Cl. acetobutylicum ВКПМ В-10289 и ВКПМ В-10290 – продуцентов n-бутанола. Эффективность процесса ацетоно-бутилового брожения различных крахмал- и сахарсодержащих субстратов с новыми штаммами представлена в таблице 2. Кинетические характеристики штаммов представлены на рисунках 5 и 6, зависимости выходов *n*-бутанола и суммы растворителей от концентрации условного крахмала в субстрате – на рисунке 7.

Из данных таблицы 2 видно, что полученные штаммы *Cl. acetobutylicum* ВКПМ В 10289 и ВКПМ В-10290 на смешанных субстратах из крахмал-(ржаной муки) и сахарсодержащего сырья (мелассы) показывают лучшие результаты, чем исходные коллекционные штаммы. Штамм ВКПМ В 10289 дает максимальные концентрации *n*-бутанола 13–14 г/дм³ и суммы растворителей 22–23 г/дм³, продуктивности 0,19–0,28 и 0,32–0,47 г/дм³/ч и выхода 23–27 и 39–44% соответственно от условного крахмала в субстрате. Для штамма ВКПМ В-10290 максимальные концентрации *n*-бутанола составляют 12–20 г/дм³ и суммы растворителей 18–32 г/дм³, продуктивности 0,22–0,25 и 0,37 г/дм³/ч, выхода 25–32 и 37–53% соответственно от условного крахмала в субстрате.

Таблица 2. Эффективность процесса ацетоно-бутиловой ферментации штаммов *Cl. acetobutylicum* ВКПМ В 10289 и ВКПМ В-10290

Состав субстрата	Наименование штамма	Состав продуктов брожения, г/дм ³						Время, ч	Продуктивность, г/дм ³ /ч		Выход от исходного крахмала, %	
		н-бутанол	ацетон	этанол	сумма растворителей	кислоты			н-бутанол	растворители	н-бутанола	растворителей
						масляная	уксусная					
6% ржаная мука (39 г/дм ³ крахмал)	ВКПМ В 10289	9,0	5,1	1,6	15,7	1,0	0,6	48	0,19	0,33	23,3	40,5
	ВКПМ В-10290	9,0	5,7	0,6	15,3	0,6	0,6	72	0,12	0,21	23	39
6% ржаная мука + 0.5% сахароза мелас-сы (∑43,75 г/дм ³)	ВКПМ В 10289	8,6	4,5	1,4	14,5	0,8	0,7	48	0,18	0,30	19,7	33,1
	ВКПМ В-10290	9,4	5,1	1,0	15,5	1,0	1,5	96	0,10	0,16	21,5	35,4
6% ржаная мука +1% сахароза (∑48.5г/дм ³)	ВКПМ В 10289	14,0	7,4	1,5	22,9	0,0	0,0	72	0,19	0,32	27,0	44,2
	ВКПМ В-10290	10,7	4,7	2,4	17,8	1,0	1,8	96	0,11	0,18	22,1	36,7
7% ржаная мука (45.5 г/дм ³ условного крахмала)	ВКПМ В 10289	8,8	4,8	0,7	14,3	0,8	1,0	96	0,09	0,15	19,3	31,5
	ВКПМ В-10290	12,0	6,8	1,2	20	2,0	3,4	54	0,22	0,37	26,4	43,9
7% ржаная мука + 1% сахароза мелассы (∑55 г/дм ³)	ВКПМ В 10289	13,5	6,1	3,0	22,6	2,0	2,4	48	0,28	0,47	23,2	38,8
	ВКПМ В-10290	11,5	6,0	1,6	19,1	3,0	5,0	48	0,24	0,39	20,9	34,7
7% ржаная мука +1% сахароза мелассы +1% мальтозы (∑62 г/ дм ³)	ВКПМ В-10290	20,0	9,7	3,5	33,2	2,17	2,53	96	0,22	0,36	32,3	53,5
6.3% а.с картофеля + 5% глюкозы (∑56,3 г/дм ³ условного крахмала; оста-точные РВ=7,4 г/ дм ³)	ВКПМ В-10290	12,2	4,4	1,4	18,0	0,8	1,1	48	0,25	0,37	24,9**	36,8**
		(60%)	(68%)									
6% отруби+1% сахарозы мелассы	ВКПМ В-10289	0,9	0,05	0,3	–	1,9	0,9	72	–	–	–	–
		2,4	0,5	0,2	3,1	2,8	2,3	168	–	–	–	–
6% ФГ отрубей+1% сахарозы мелассы+ п-аминобензойная кислота (РВИ=37 г/дм ³ , РВ=19,8 г/дм ³)	ВКПМ В-10289	0,4	0,2	0,06	–	6,8	4,7	24	–	–	–	–
		0,4	0,3	0,06	–	6,7	4,6	48	–	–	–	–
ФГКК*+3% ФГ отрубей (РВИ=68,8 г/дм ³ , РВ=48,5 г/дм ³ , остаточные РВИ=24,0 г/дм ³ и РВ=23,0 г/дм ³)	ВКПМ В-10290	0,8	0,3	0,1	–	5,1	3,5	168	–	–	–	–
		4,2	1,1	0,3	5,6	7,5	6,4	144	0,03	0,04	16,5**	21,9**
		(75%)										

*– ферментативный гидролизат кукурузной кочерыжки; **– выхода от сброженных РВ.

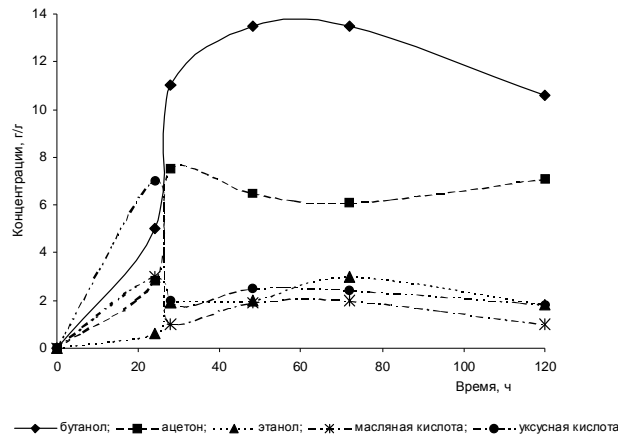


Рис. 5. Кинетические кривые синтеза растворителей при биоконверсии 7% суспензии ржаной муки и 1,35% РВИ мелассы штаммом *Cl. acetobutylicum* СВ-6-1

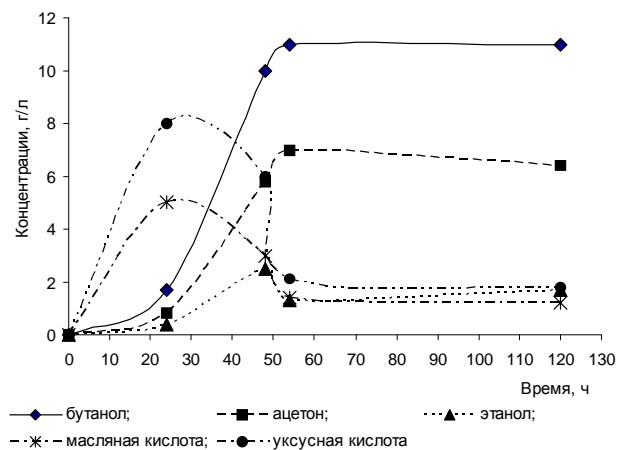


Рис. 6. Кинетические кривые синтеза растворителей при биоконверсии 7% суспензии ржаной муки и 1,35% РВИ мелассы штаммом *Cl. acetobutylicum* СВ-2

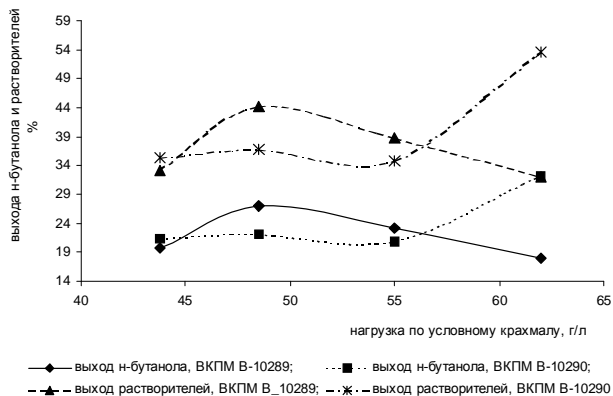


Рис. 7. Зависимость выходов *n*-бутанола и суммы растворителей от нагрузки по условному крахмалу при брожении субстратов из ржаной муки и мелассы

Штамма ВКПМ В-10290 интенсивно сбраживает картофельный субстрат, продуктивность по *n*-бутанолу 0,25, по сумме растворителей 0,37 г/дм³/ч. Штамм ВКПМ В 10289 не сбродил картофельный субстрат и субстрат с содержанием условного крахмала 62 г/дм³.

По кинетическим кривым (рис. 5, 6) видно, что данные штаммы, адаптированные к культуральным жидкостям маслянокислого брожения с преимущественным содержанием масляной кислоты, в процессе ацетоно-бутилового брожения выдерживают более высокие концентрации 7–8 г/дм³ масляной кислоты, которую сами продуцируют. Стадия кислотообразования у штамма СВ-2 ВКПМ В-10290 в сравнении со штаммом СВ 6-1 ВКПМ В 10289 идет интенсивнее до концентрации масляной кислоты 8 г/дм³ и в течение 48 ч.

Из данных рисунка 7 видно, что штамм СВ 6-1 ВКПМ В 10289 показывает максимальные выходы при концентрации 48,4 г/дм³ условного крахмала, а штамм СВ-2 ВКПМ В-10290 при концентрации условного крахмала более 56,3 г/дм³ на смешанном субстрате из ржаной муки и мелассы.

Брожение 6% суспензии отрубей и 1% сахарозы мелассы данными штаммами шло с образованием *n*-бутанола, но медленно и с низким выходом. Ферментативные гидролизаты отрубей с мелассой в процессе ацетоно-бутилового брожения закисали.

Ферментация штаммов на смешанных субстратах из ферментативных гидролизатов кукурузной кочерыжки и ферментативных гидролизатов отрубей в условиях исследований была неэффективной.

При ацетоно-бутиловой ферментации данных штаммов доля *n*-бутанола в составе суммы растворителей зависит от состава субстрата следующим образом: на крахмалсодержащих субстратах с мелассой 59–61%, на картофельном субстрате 68% и на смешанном субстрате из ферментативных гидролизатов кукурузной кочерыжки и отрубей 75%.

Для адаптации штаммов к культуральным жидкостям маслянокислых бактерий был выбран субстрат, дающий минимальный выход растворителей (33–35%) – это суспензия 6% ржаной муки с добавкой 0,5% сахара мелады (условный крахмал 43,75 г/л). На других субстратах с данными штаммами были получены выходы близкие к теоретическим (табл. 2), при этом условии от использования культуральных жидкостей маслянокислых бактерий можно получить только минимальный эффект, так как масляная кислота является не только источником биосинтеза *n*-бутанола, но и оказывает ингибирующее действие на рост и развитие культуры.

Результаты исследований представлены в таблице 3, а со штаммами *Cl. acetobutylicum* СВ-2 ВКПМ В-10290 и *Cl. tyrobutyricum* ВКПМ В-10406 в предыдущей работе авторов [39].

Из данных таблицы 3 видно, что оптимальным количеством добавки культуральных жидкостей *Cl. tyrobutyricum* ВКПМ-10406 и *Cl. butyricum* ВКПМ В-9619 в субстрат является 20 мас.%, выхода *n*-бутанола и суммы растворителей составили 23 и 36–38% от условного крахмала в субстрате, повышение выходов 2 и 3% соответственно.

Для штаммов *Cl. acetobutylicum* СВ-2 ВКПМ В-10290 и *Cl. tyrobutyricum* ВКПМ В-10406 выхода *n*-бутанола и суммы растворителей составили 25 и 40% соответственно от условного крахмала в субстрате, повышение выходов 3,5 и 5% [39].

При количестве культуральной жидкости в субстрате 20% мас. добавленная максимальная концентрация масляной кислоты не превышает 2 г/дм³, это составляет 1,68 г/дм³ *n*-бутанола при теоретическом выходе 84% от масляной кислоты или дополнительный максимальный выход *n*-бутанола от условного крахмала в субстрате должен быть 3,84%.

Экспериментальные данные хорошо согласуются с расчетными данными. Доля *n*-бутанола в составе растворителей соответственно увеличилась с 59–61 до 61–63%.

Таким образом, по представленным результатам исследований ацетоно-бутиловой ферментации новых штаммов *Cl. acetobutylicum* (СВ 6-1) ВКПМ В 10289 и (СВ-2) ВКПМ В-10290 можно сделать следующие выводы:

а) данные штаммы имеют более высокую продуктивность (0,19–0,28 г/дм³/ч по *n*-бутанолу и 0,32–0,47 г/дм³/ч г/л/ч по сумме растворителей) и дают более высокие концентрации *n*-бутанола 12–20 г/дм³ при выходе 26–32% и суммы растворителей 22,6–33,2 г/дм³ при выходе 39–53% от углеводов в субстрате в сравнении с исходными штаммами;

б) для штамма *Cl. acetobutylicum* СВ 6-1 (ВКПМ В-10289) оптимальным является субстрат следующего состава: 6% мас. ржаная мука с 1% мас. сахарозы или 1% мальтозы, для штамма ВКПМ В-10290 – 7% мас. ржаная мука с 1% мас. сахарозы и 1% мальтозы (максимальная нагрузка по условному крахмалу 48,5 и 56–62 г/дм³ соответственно);

Таблица 3. Эффективность ацетоно-бутиловой ферментации штаммов, адаптированных к культуральным жидкостям маслянокислого брожения

Количество культуральной жидкости в субстрате, мас.%. Наименование штамма	Время, ч	Состав продуктов брожения, г/дм ³					Выход от крахмала, %	
		<i>n</i> -бутанол	ацетон	этанол	кислоты		<i>n</i> -бутанола	растворителей
					масляная	уксусная		
<i>Cl. acetobutylicum</i> СВ-2 (ВКПМ В-10290)								
0	96	9,4	5,1	1,0	1,0	1,5	21,5	35,4
8,	24	2,8	1,6	0,1	2,5	1,9	–	–
<i>Cl. butyricum</i> ВКПМ В 9619 (39 г/л)	48	9,1	5,1	0,6	0,6	1,3	23,3	37,9
20,	24	3,8	2,1	0,2	3,1	2,3	–	–
<i>Cl. butyricum</i> ВКПМ В-9619	48	10,4	5,7	0,7	0,8	1,6	23,8	38,4
30,	48	1,6	0,6	0,1	2,5	1,9	–	–
<i>Cl. butyricum</i> ВКПМ В-9619	72	4,7	2,4	0,3	1,4	2,1	–	–
	96	9,9	5,0	0,6	2,2	3,2	22,6	35,4
<i>Cl. acetobutylicum</i> СВ 6-1 (ВКПМ В-10289)								
0	48	8,6	4,5	1,4	0,8	0,7	19,7	33,1
4	24	6,2	3,7	1,4	0,8	1,6	–	–
<i>Cl. butyricum</i> ВКПМ В-9619 (39 г/л)	48	7,8	5,0	1,6	1,2	0,3	20,0	36,9
20,	24	3,53	1,77	0,20	2,1	1,9	–	–
<i>Cl. butyricum</i> ВКПМ В-9619	48	9,90	5,19	0,72	1,4	1,7	22,6	36,1

- в) картофельный субстрат является перспективным для штамма *Cl. acetobutylicum* СВ-2 (ВКПМ В-10290);
- г) доля *n*-бутанола в составе суммы растворителей зависит от состава субстрата следующим образом: из ржаной муки с мелассой 59–61%, со штаммом СВ-2 ВКПМ В-10290 на картофельном субстрате с глюкозой 68% и на смешанном субстрате из ферментативного гидролизата кукурузной кочерыжки и отрубей 75%;
- д) показана возможность использования культуральной жидкости маслянокислого брожения с преимущественным содержанием масляной кислоты в составе субстрата для процесса ацетоно-бутилового брожения в количестве 20% об.; при этом увеличивается выхода *n*-бутанола на 2–3,5% и суммы растворителей на 3–5% от условного крахмала в субстрате, доля *n*-бутанола в составе растворителей на крахмалсодержащем субстрате составляет 61–63%.

Эффективность ацетоно-бутиловой ферментации смешанных культур. Эффективность типового процесса ацетоно-бутиловой ферментации с использованием симбиоза культур *Cl. acetobutylicum* и *Cl. tyrobutyricum* или *Cl. butyricum* проверялась как с коллекционными штаммами [44], так и вновь полученными. Совместное использование двух видов бактерий рода *Clostridium* возможно благодаря совпадению оптимальных параметров процесса ацидогенеза (процесса образования кислот) маслянокислого и ацетоно-бутанольного брожений: $t=35-37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5,7-6,5$. При снижении pH ниже 5,7 *Clostridium acetobutylicum* из масляной кислоты продуцируют бутанол.

Культуры маслянокислого и ацетоно-бутилового брожений засеивали в соотношении 1 – 11 : 1. Субстраты с глюкозой продували азотом. Результаты исследований представлены в таблице 4 и на рисунках 8 и 9.

Из данных таблицы 4 и рисунков 8 и 9 видно, что при брожении глюкозы симбиозом культур эффект выражается в увеличении доли *n*-бутанола в составе растворителей до 66–75%. При концентрации глюкозы в субстрате не более 5% выхода *n*-бутанола и суммы растворителей составили 29–30 и 42–43% от сброженных углеводов соответственно. Но время брожения процесса определяется медленно бродящей культурой, т.е. культурой маслянокислого брожения и составляет 144–192 ч.

При брожении смешанного субстрата из ферментативного гидролизата кукурузной кочерыжки и отрубей получены результаты аналогичные данным с монокультурой №6 (табл. 1). Доля *n*-бутанола в составе растворителей 69% (70%) и выхода *n*-бутанола и суммы растворителей составляют 30 (29,4%) и 43,7% (42,4%) соответственно от сброженных РВ.

Таким образом, симбиотическим консорциумом двух бактерий рода *Clostridium*, в котором продукт метаболизма маслянокислых бактерий – масляная кислота служит субстратом для синтеза *n*-бутанола бактериями *Cl. acetobutylicum* в типовом процессе ацетоно-бутилового брожения раствора с концентрацией 30–50 г/дм³ глюкозы и других моно- и диосахаров с добавками отрубей позволяет получить выход *n*-бутанола и суммы растворителей 27–30% и 40–43% соответственно от сброженного условного крахмала и долю *n*-бутанола в составе суммы растворителей 66–75%.

Реализация процесса ацетоно-бутилового брожения со смешанными культурами возможна после проведения селекционных работ с культурами маслянокислого брожения с целью сокращения времени процесса до 48–72 ч.

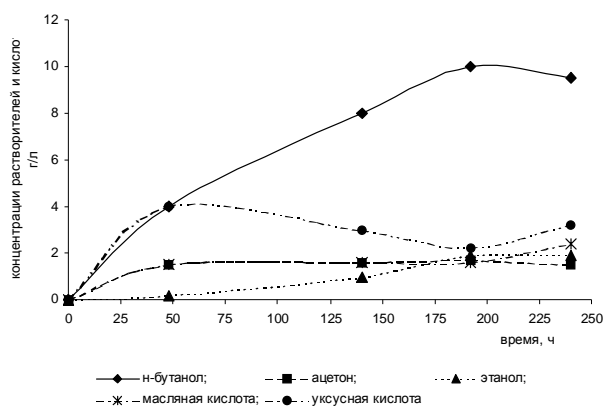


Рис. 8. Кинетические кривые синтеза растворителей смешанными культурами *Cl. acetobutylicum* №6 и *Cl. tyrobutyricum* ВКПМ В-9615 на 5% растворе глюкозы с 1% мальтозы

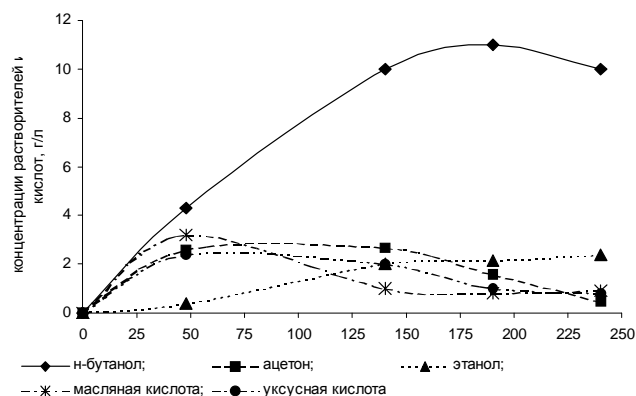


Рис. 9. Кинетические кривые синтеза растворителей смешанными культурами *Cl. acetobutylicum* ВКПМ-4786 и *Cl. tyrobutyricum* ВКПМ-9615 на 6% растворе глюкозы

Таблица 4. Показатели процесса ацетоно-бутиловой ферментации смешанными культурами клостридий

Наименования культур, их соотношение	Состав питательного субстрата	Время, ч	Концентрация условного крахмала, г/дм ³		Химический состав отработанной культуральной жидкости, г/дм ³					Выход от сброженного условного крахмала, %	
			исходная*	остаточная	<i>n</i> -бутанол	ацетон	этанол	МК	УК	<i>n</i> -бутанола	растворителей
<i>Cl. tyrobutyricum</i> ВКПМ-9615											
<i>Cl. acetobutylicum</i> ВКПМ В-4786 (11 : 1)	MSS, 6% глюкоза, 0,5% отруби, витамины	192	46,1	2,9	11,0 74,6%	1,6	2,15	0,8	1,0	25,5	34,1
<i>Cl. acetobutylicum</i> №6 (1,7 : 1)	MSS, 5% глюкоза, 1% мальтоза, 0,5% отруби, витамины	192	48,9	14,85	10,2 73,9%	1,7	1,9	1,6	2,2	29,9	40,5
<i>Cl. acetobutylicum</i> ВКПМ В-4786 (3,5 : 1)	6% ФГ отрубей + 1,35% РВИ мелассы	144	26,9+11,5 = 38,4	13,3	7,6 62,3%	4,2	0,4	1,1	2,2	30	48,6
<i>Cl. acetobutylicum</i> ВКПМ В-10289 (2 : 1)	6% ФГ отрубей + 1% РВИ мелассы (РВ=35,04; РВИ=46,6г/дм ³)	168	27,4	6,6	5,6 66%	2,4	0,5	2,3	2,8	26,9	40,9
и <i>Cl. acetobutylicum</i> ВКПМ В-10289 (1 : 1)	ФГКК**+3% отрубей (РВ=47,4; РВИ=74,4 г/дм ³)	168	42,7	17,3	7,7 69%	2,9	0,5	2,4	3,8	30,3	43,7
<i>Cl. butyricum</i> ВКПМ-9619											
<i>Cl. acetobutylicum</i> ВКПМ В-10290 (1 : 1)	MSS, 5% глюкоза, 0,74% РВИ ФГ отрубей+0,5% отруби, витамины	144	42,0+0,74 = 42,74	9,0	9,6 66,6%	3,6	1,2	1,3	2,5	28,5	42,7

Примечания. * – исходная концентрация рассчитана с учетом разбавления посевным материалом; ** – ферментативный гидролизат кукурузной кочерыжки.

Экстрактивная ацетоно-бутиловая ферментация. Разработана технологическая схема получения *n*-бутанола, включающая процесс экстракции *n*-бутанола олеиловым спиртом из культуральной жидкости в два этапа [46, 48]. В первом этапе экстракцию проводят в биореакторе в процессе ацетоно-бутилового брожения крахмалсодержащего субстрата или любого другого питательного субстрата с концентрацией углеводов 32–45 г/л. Восполнение источника углерода осуществляется 40% раствором глюкозы или любого другого концентрированного источника моносахаров. Олеиловый спирт добавляют на стадии максимального образования *n*-бутанола в исходном субстрате в количестве 0,3 к расходу культуральной жидкости. При завершении ферментации состав культуральной жидкости – рафината и экстракта следующие (г/дм³): *n*-бутанол – 7,5–8,2; ацетон – 7,0–7,8; этанол – 0,9–1,1 и *n*-бутанол – 30–35; ацетон – 2,2–2,5; этанол – 0,2–0,25 соответственно.

Второй этап проводят в противоточном экстракторе по завершению процесса ферментации. Такая схема позволяет исчерпывать *n*-бутанол из культуральной жидкости до концентрации 0,2 г/дм³ и получать концентрацию *n*-бутанола в экстрагенте 30–35 г/дм³ при соотношении общего объема олеилового спирта к расходу культуральной жидкости 0,6–0,7. Легколетучие компоненты ацетон и этанол могут быть извлечены из рафината и экстрагента путем испарения за счет разности давлений под вакуумом.

Выделение *n*-бутанола в процессе ацетоно-бутилового брожения обеспечивает непрерывность ферментации и экономию теплоэнергоресурсов при мойке и стерилизации ферментационного оборудования. Увеличение концентрации *n*-бутанола (30–35 г/дм³) в экстрагенте и регенерация экстрагента способствуют экономии теплоэнергоресурсов при ректификации.

Технологическая схема производства *n*-бутанола микробиологическим синтезом и со-продуктов ацетона и этанола. Разработана технологическая схема производства *n*-бутанола, основанная на комплексной переработке целлюлозо- и пентозансодержащего сырья, отрубей и мелассы и предусматривающая несколько вариантов.

1. Технологическая схема биосинтеза *n*-бутанола и масляной кислоты. Часть культуральной жидкости после маслянокислого брожения питательного субстрата из целлюлозо- и пентозансодержащего сырья и мелассы с культурой *Cl. tyrobutyricum* используют для получения масляной кислоты. Другую часть после или без отделения биомассы маслянокислых бактерий – для приготовления субстрата из ржаной муки и мелассы или из целлюлозо- и пентозансодержащего сырья и отрубей в производстве *n*-бутанола со штаммами *Cl. acetobutylicum* (СВ 6-1) ВКПМ В-10289 или (СВ-2) ВКПМ В-10289 с выходом суммы растворителей до 40% от условного крахмала в субстрате.

В результате реализации этой схемы, кроме *n*-бутанола, ацетона и этанола, будет получена масляная кислота.

Отработанную культуральную жидкость используют в процессе метанового брожения и дальше по схеме утилизации жидких и твердых отходов, рекомендуемой для производства этилового спирта из древесного сырья [40].

2. Технологическая схема, включающая непрерывный процесс экстрактивной ацетоно-бутиловой ферментации с выращиванием биомассы бактерий из ржаной муки с восполнением источника углерода из целлюлозо- и пентозансодержащего сырья и отрубей с выходом суммы растворителей 34,5% от сброженных углеводов, экстракцию *n*-бутанола из культуральной жидкости в противоточном экстракторе, выделение *n*-бутанола из экстракта и его очистку, регенерацию экстрагента путем ректификации; испарение легколетучих сопродуктов под вакуумом.

3. Технологическая схема по традиционной технологии производства *n*-бутанола, с использованием штаммов *Cl. acetobutylicum* №6 или СВ 6-1 ВКПМ В-10289 или СВ-2 ВКПМ В-10289 или симбиотического консорциума двух бактерий *Cl. tyrobutyricum* и *Cl. acetobutylicum*, обеспечивающая долю *n*-бутанола в составе растворителей 69–75% и выход *n*-бутанола и суммы растворителей до 30 и 43% от сброженных углеводов соответственно.

4. Технологическая схема по варианту 3 и после завершения процесса ферментации выделение *n*-бутанола из культуральной жидкости путем жидкостной экстракции олеиловым спиртом в противоточном экстракторе, выделение *n*-бутанола из экстракта и его очистка, регенерация экстрагента путем ректификации; испарение легколетучих сопродуктов под вакуумом.

Список литературы

1. Логоткин И.С. Технология ацетонобутилового производства. М., 1958. 264 с.
2. Patáková P., Lipovský J., Čížková H., Fořtová J., Rychtera M., Melzoch K. Exploitation of Food Feedstock and Waste for Production of Biobutanol // Czech J. Food Sci. 2009. Vol. 27, N4. Pp. 276–283.
3. Яроцкий С.В., Сушкова В.И., Синеокий С.П., Лукина Г.П. Экономический анализ производства биобутанола и перспективы его развития // Деп. в ВИНТИ 10.04.08, №308-2008. 65 с.
4. Ramey D. Production of butyric acid and butanol from biomass. Final report // Work performed under: contract № DE-F-G-02-00ER 86106 for Department of Energy. Morgantown, WV, 2004.
5. Сушкова В.И., Яроцкий С.В. Эффективность методов выделения продуктов ацетон-бутиловой ферментации // Химия растительного сырья. 2011. №3. С. 5–14.
6. Qureshi N. Agricultural residues and energy crops as potentially economical and novel substrates for microbial production of butanol (a biofuel) // CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. 2010. Vol. 5, N10. Pp. 1–8.
7. Madihah M.S., Ariff A.B., Sahaid K.M., Suraini A.A. and Karim M.I.A. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Cl. acetobutylicum* // J. of Microb. & Biotechnol. 2001. Vol. 17. Pp. 567–576.
8. Parekh M., Formanek J., Blaschek H.P. Pilot-scale production of by *Clostridium beijerinckii* BA 101 using a low-cost fermentation medium on corn steep water // Appl Microbiol Biotechnol. 1999. Vol. 51. Pp. 152.
9. Jesse T.W., Ezeji T.C., Qureshi N. and Blaschek H.P. Production of butanol from starch-based waste packing peanuts and agricultural waste // J. of Industrial Microb. & Biotechnol. 2002. Vol. 29. Pp. 117–123.
10. Thaddeus C.E., Thaddeus N., Qureshi H.P. Blaschek Butanol Fermentation Research: Upstream and Downstream Manipulations // The Chemical Reconl. 2004. Vol. 4. Pp. 305–314.
11. Qureshi N., Lolas A. and Blaschek H.P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA 101 // J. of Industrial Microb. & Biotechnol. 2001. Vol. 26. Pp. 290–295.
12. Edhilvia J.C., Quresh N., and Blaschek H.P. Production of acetone, butanol and ethanol from Degemmed corn using *Clostridium beijerinckii* BA 101 // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2002. Vol. 5. Pp. 98–100.
13. Ezeji T.C., Blaschek H.P. Fermentation of dried distillers' grains and soluble (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia // Bioresource Technology. 2008. Vol. 99. Pp. 5232–5242.
14. Qureshi N., Saha B.C., Dien B., Hector R.E., Cotta M.A. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I – Use of barley straw hydrolysate // Biomass and bioenergy. 2010. Vol. 34. Pp. 559–565.
15. Formanek J., Mackie R., Blaschek H.P. Enhanced butanol production by *Cl. beijerinckii* BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. Pp. 2306–2310.
16. Green E.M. Fermentative production of butanol – the industrial perspective // Curr Opin Biotechnol. 2011. Vol. 22, N3. Pp. 337–343.
17. Березина О.В., Синеокий С.П., Великодворская Г.А., Шварц В., Зверлов В.В. Внеклеточная гликозилгидролазная активность клостридий, образующих ацетон, бутанол и этанол // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44, №1. С. 49–55.
18. Сушкова В.И., Березина О.В., Яроцкий С.В. Эффективность ацетон-бутилового брожения культурами *Clostridium acetobutylicum* // Общество, наука, инновации. НТК-2011: материалы ежегод. Всерос. науч.-технич. конф. Киров, 2011. Электронная версия. (CD-ROM). (Биологический факультет. Секция «Биотехнология» Статья № 20).
19. Патент №95103597 (РФ). Штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* – продуцент *n*-бутилового спирта и ацетона / Г.П. Лукина, С.К. Абилев, И.К. Любимова, М.А. Великая, И.Е. Ежова, Т.В. Артюшкина / 1996.
20. Nasser N.K., Al-Shorgani, Kalil M.S., Yusoff W.M.W. The Effect of Different Carbon Sources on Biobutanol Production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 // Biotechnology 2011. Vol. 10, N3. Pp. 280–285.
21. Eunjong J., Kimoon D.-H. Fermentation of Rice Bran and Defatted Rice Bran for Butanol Production Using *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 // Microbiol. Biotechnol. 2009. vol. 19, no. 5. Pp. 482–490.
22. Areesirisuk A., Laopaiboon L., Fangkum A., Ponchai N., Leelavacharamas V., Laopaiboon P. Growth and butanol production of *Clostridium beijerinckii* from sweet sorghum juice // Thai Journal of Biotechnology. 2008. Vol. 8, N1. Pp. 44–49.
23. Patakova P., Macha D., Rychtera M., Linhova M., Fribert P., Muzikova Z., Lipovsky J., Paulova L., Pospisil M., Sebor G., Melzoch K. Perspectives of Biobutanol Production and Use // Biotechnology and Bioengineering. 2007. Vol. 97, N6. Pp. 243–266.
24. Qureshi N., Lolas A., Blaschek H.P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA 101 // J. of Industrial Microb. & Biotechnol. 2001. Vol. 26. Pp. 290–295.
25. Patáková P., Lipovský J., Čížková H., Fořtová J., Rychtera M., Melzoch K. Exploitation of food feedstock and waste for production of biobutanol // Czech J. Food Sci. 2009. Vol. 27. Pp. 276–283.
26. Qureshi N., Saha B.C., Cotta M.A. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. Part II – Fed-batch fermentation // Bioprocess and Biosystems Engineering. 2007. Vol. 30. Pp. 419–427.
27. Ежова И.Е. Комплексное использование сырья в ацетон-бутиловом производстве : автореф. дис. ... канд. техн. наук. М., 1975. 29 с.
28. Qureshi N., Blaschek H.P. Butanol production from agricultural biomass // Food Biotechnology. 2005. Pp. 525–551.

29. Lin Y.L., Blaschek H.P., Butanol Production by a Butanol-Tolerant Strain of *Clostridium acetobutylicum* in Extruded Corn Broth // Applied and Environmental Microbiology. 1983. Vol. 45, N3. Pp. 966–973.
30. Gutierrez N.A., Maddox I.S., Schuster K.C., Swoboda H., Gapes J.R. Strain comparison and medium preparation for the acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation process using a substrate of potato // Bioresource Technology. 1998. Vol. 66. Pp. 263–265.
31. Nimcevic D., Schuster M., Gapes J.R. Solvent production by *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 growing on different potato media // Applied Microbiology and Biotechnology. 1998. Vol. 50, N4. Pp. 426–428.
32. Grobden N.G., Eggink G., Cuperus F.P. and Huizing H.J. Production of acetone, butanol and ethanol (ABE) from potato wastes: fermentation with Integrated Membrane Extraction // Applied Microbiology and Biotechnology. 1993. Vol. 39. Pp. 494–498.
33. Nimcevic D., Gapes J.R. The Acetone-Butanol Fermentation in Pilot Plant and Pre-Industrial Scale // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2000. Vol. 2, N1. Pp. 15–20.
34. Коротких, А.А. Мировой рынок биотоплива. Состояние и перспективы // Россия и Америка в XXI веке. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.rusus.ru/?act=read&id=88>
35. Edhilvia J.C., Quresh N., Blaschek H.P. Production of acetone, butanol and ethanol from Degemmed corn using *Clostridium beijerinckii* BA 101 // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2002. Vol. 5. Pp. 98–100.
36. Patent 4326032 (US). Process for the production of organic fuel / H. Leslie, E. Grove, A. Hoyt, Paul St. / 1982.
37. Patent 20100221802 (US). Method for producing butanol using two-phase extractive fermentation / Grady M.C., Jachic M., Patnaik R. / 2010.
38. Patent 20090305370 (US). Method for producing butanol using two-phase extractive fermentation / Grady M.C., Jachic M., Patnaik R. / 2009.
39. Roffler S.R., Blacnh H.W., Wilke C.R. In-situ recovery of butanol during fermentation // Bioprocess Engineering. 1987. №2. С. 181–190.
40. Patent 5753474 (US). Continuous two stage, dual path anaerobic fermentation of butanol and other organic solvents using two different strains of bacteria / Ramey D.E. 1998.
41. Сушкова В.И., Жуковский С.В., Березина О.В., Яроцкий С.В. Биосинтез масляной кислоты штаммом *Clostridium butyricum* ВКПМ В-9619 из кукурузной кочерыжки и мелассы // Химия растительного сырья. 2011. №1. С. 157–162.
42. Сушкова В.И., Березина О.В., Яроцкий С.В. Пути интенсификации процесса биосинтеза масляной кислоты // Химия растительного сырья. 2012. №1. С. 171–180.
43. Сушкова В.И., Воробьева Г.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества. М., 2008. 215 с.
44. Емельянова И.Э. Химико-технический контроль гидролизного производства. М., 1969. 365 с.
45. ГОСТ 26176-91. Корма, Комбикорма. Методы определения растворимых и легкогидролизуемых углеводов. 1993.
46. Сушкова В.И., Яроцкий С.В., Сухоженко А.В. Процесс экстрактивной ацетон-бутиловой ферментации // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : материалы V Всерос. конф. Барнаул, 2012. С. 382–383.
47. ГОСТ 8.207-76. Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения.
48. Заявка на патент 2011125862/10(038258) (RU). Способ получения *n*-бутанола / В.И. Сушкова, С.В. Яроцкий, В.Г. Дебабов / 2011.
49. Патент 2406763 (RU). Способ микробиологического синтеза *n*-бутанола / В.И. Сушкова, С.В. Яроцкий / 2010.

Поступило в редакцию 19 августа 2012 г.

После переработки 4 мая 2013 г.

Sushkova V.I.* , Yarotsky S.V., Suchozenko A.B. DEVELOPMENT TECHNOLOGICAL SCHEMATA OF PRODUCTION *n*-BUTANOL WITH *CLOSTRIDIUMES*

Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 1-st Dorozhnyi pr., 1, 117545 Moscow (Russia), e-mail: sushkovaval@mail.ru

With the object development technological schemata of production *n*-butanol of microbiological synthesis provided yield of amount solvents no less 40% from carbohydrates in media, do intensification of process acetone-butanol fermentation by means of obtain new strain *Clostridium acetobutylicum* BKПIM B-10289 и BKПIM B-10290 and optimization of composition starch-containing media with yield of amount solvents 39-53% from carbohydrates in media.

Develop technological schemata of production *n*-butanol use as bases on complex treatment mixture of a cellulose- or hemicellulose-containing material, bran, molasses, provided three variations: 1. biosynthesis of *n*-butanol *Cl. acetobutylicum* CB-2 BKПIM B-10290 of rye flour with usage of fermentative liquid *Cl. tyrobutyricum*; 2. two stage process of extraction *n*-butanol of fermentative liquid in acetone-butanol continuous fermentation and after her end; 3. production *n*-butanol by traditional technology with researched strains or of symbiosal consortium two bacterias *Cl. tyrobutyricum* и *Cl. acetobutylicum* with or without extraction *n*-butanol of exhaust fermentative liquid. The yield of amount solvents following: 1 – up to 40% from carbohydrates in media; 2 – up to 34,5%; 3 – up to 43% from fermented carbohydrates.

Keywords: enzymatic hydrolysate, corn cabbage stump, bran, molasses, rye flour, strain, extractive fermentation, oleyl alcohol, productivity, yield, butyric acid, *n*-butanol, butyrate fermentation, acetone-butanol fermentation.

References

1. Logotkin I.S. *Tekhnologiya atsetonobutilovogo proizvodstva*. [Atsetonobutilovogo production technology]. Moscow, 1958, 264 p. (in Russ.).
2. Pataková P., Lipovský J., Čížková H., Fořtová J., Rychtera M., Melzoch K. *Czech J. Food Sci.*, 2009, vol. 27, no. 4, pp. 276–283.
3. Iarotskii S.V., Sushkova V.I., Sineokii S.P., Lukina G.P. *Deposited at VINITI* 10.04.08, N308-2008. 65 p. (in Russ.).
4. Ramey D. *Work performed under: contract DE-F-G-02-00ER 86106 for Department of Energy*. Morgantown, WV, 2004.
5. Sushkova V.I., Iarotskii S.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2011, no. 3, pp. 5–14. (in Russ.).
6. Qureshi N. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2010, vol. 5, no. 10, pp. 1–8.
7. Madihah M.S., Ariff A.B., Sahaid K.M., Suraini A.A., Karim M.I.A. *J. of Microb. & Biotechnol.*, 2001, vol. 17, pp. 567–576.
8. Parekh M., Formanek J., Blaschek H.P. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 1999, vol. 51, pp. 152.
9. Jesse T.W., Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P. *J. of Industrial Microb. & Biotechnol.*, 2002, vol. 29, pp. 117–123.
10. Thaddeus C.E., Thaddeus N., Qureshi H.P. *The Chemical Reconl.*, 2004, vol. 4, pp. 305–314.
11. Qureshi N., Lolas A. and Blaschek H.P. *J. of Industrial Microb. & Biotechnol.*, 2001, vol. 26, pp. 290–295.
12. Edhilvia J.C., Qureshi N., Blaschek H.P. *Appl Biochemistry and Biotechnology*, 2002, vol. 5, pp. 98–100.
13. Ezeji T.C., Blaschek H.P. *Bioresource Technology*, 2008, vol. 99, pp. 5232–5242.
14. Qureshi N., Saha B.C., Dien B., Hector R.E., Cotta M.A. *Biomass and bioenergy*, 2010, vol. 34, pp. 559–565.
15. Formanek J., Mackie R., Blaschek H.P. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol. 63, pp. 2306–2310.
16. Green E.M. *Curr Opin Biotechnol.*, 2011, vol. 22, N3, pp. 337–343.
17. Berezina O.V., Sineokii S.P., Velikodvorskaia G.A., Shvarts V., Zverlov V.V. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 2008, vol. 44, no. 1, pp. 49–55. (in Russ.).
18. Sushkova V.I., Berezina O.V., Iarotskii S.V. *Obshchestvo, nauka, innovatsii. NTK-2011: ezhegodnaia otkrytaia vsrossiiskaia nauchno-tekhnichekaia konferentsiia: sbornik materialov*. [Society, science and innovation. STC-2011: Annual Open All-Russian Science-Engineering Conference]. Kirov, 2011. CD-ROM. Article 20. (in Russ.).
19. Patent (RU). 1996. (in Russ.).
20. Nasser N.K., Al-Shorgani, Kalil M.S., Yusoff W.M.W. *Biotechnology*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 280–285.
21. Eunjong J., Kimoon D.-H. *Microbiol. Biotechnol.*, 2009, vol. 19, no. 5. Pp. 482–490.
22. Areesirisuk A., Laopaiboon L., Fangkum A., Ponchai N., Leelavacharamas V., Laopaiboon P. *Thai Journal of Biotechnology*, 2008, vol. 8, no. 1, pp. 44–49.
23. Patakova P., Maxa D., Rychtera M., Linhova M., Fribert P., Muzikova Z., Lipovsky J., Paulova L., Pospisil M., Sebor G., Melzoch K. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, vol. 97, no. 6, pp. 243–266.
24. Qureshi N., Lolas A., Blaschek H.P. *J. of Industrial Microb. & Biotechnol.*, 2001, vol. 26, pp. 290–295.
25. Pataková P., Lipovský J., Čížková H., Fořtová J., Rychtera M., Melzoch K. *Czech J. Food Sci.*, 2009, vol. 27, pp. 276–283.
26. Qureshi N., Saha B.C., Cotta M.A. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2007, vol. 30, pp. 419–427.
27. Ezhova I.E. *Kompleksnoe ispol'zovanie syr'ia v atsetono-butilovom proizvodstve: avtoref. diss. ... kand. tekhn. nauk*. [Integrated use of raw materials in the production of acetone-butyl: dissertation Candidate of Technical Sciences]. Moscow, 1975. 29 p. (in Russ.).
28. Qureshi N., Blaschek H.P. *Food Biotechnology*, 2005, pp. 525–551.
29. Lin Y.L., Blaschek H.P. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, vol. 45, no. 3, pp. 966–973.

* Corresponding author.

30. Gutierrez N.A., Maddox I.S., Schuster K.C., Swoboda H., Gapes J.R. *Bioresource Technology*, 1998, vol. 66, pp. 263–265.
31. Nimcevic D., Schuster M., Gapes J.R. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, vol. 50, no. 4, pp. 426–428.
32. Grobgen N.G., Eggink G., Cuperus F.P., Huizing H.J. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, vol. 39, pp. 494–498.
33. Nimcevic D., Gapes J.R. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, vol. 2, no. 1, pp. 15–20.
34. Korotkikh A.A. *Rossia i Amerika v XXI veke*. [Russia and America in the XXI century]. URL: <http://www.rusus.ru/?act=read&id=88> (in Russ.).
35. Edhilvia J.C., Quresh N., Blaschek H.P. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002, vol. 5, pp. 98–100.
36. Patent 4326032 (US). 1982.
37. Patent 20100221802 (US). 2010.
38. Patent 20090305370 (US). 2009.
39. Roffler S.R., Blacnh H.W., Wilke C.R. *Bioprocess Engineering*, 1987, no. 2, pp. 181–190.
40. Patent 5753474 (US). 1998.
41. Sushkova V.I., Zhukovskii S.V., Berezina O.V., Iarotskii S.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2011, no. 1, pp. 157–162. (in Russ.).
42. Sushkova V.I., Berezina O.V., Iarotskii S.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2012, no. 1, pp. 171–180. (in Russ.).
43. Sushkova V.I., Vorob'eva G.I. *Bezotkhodnaia konversiiia rastitel'nogo syr'ia v biologicheski aktivnye veshchestva*. [Waste-free conversion of plant materials into biologically active substances]. Moscow, 2008, 215 p. (in Russ.).
44. Emel'ianova I.E. *Khimiko-tekhmicheskii kontrol' gidroliznogo proizvodstva*. [Chemical and technical control of hydrolysis production]. Moscow, 1969, 365 p. (in Russ.).
45. *GOST 26176-91*. [26176-91]. 1993. (in Russ.).
46. Sushkova V.I., Iarotskii S.V., Sukhozhenko A.V. *Novye dostizheniia v khimii i khimicheskoi tekhnologii rastitel'nogo syr'ia: materialy V Vseros. konf.* [New advances in chemistry and chemical engineering plant materials: the V All-Russian Conference]. Barnaul, 2012, pp. 382–383. (in Russ.).
47. *GOST 8.207-76*. [State Standard 8.207-76]. 1977. (in Russ.).
48. Patent Application 2011125862/10(038258) (RU). 2011. (in Russ.).
49. Patent 2406763 (RU). 2010. (in Russ.).

Received August 19, 2012

Revised May 4, 2013