

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ВИД ТОПЛИВА – БИОБУТАНОЛ

Бутанол – альтернативное топливо. На фоне истощающихся мировых (доступных) запасов нефти рассматривается как потенциальный источник энергии. В промышленных масштабах бутанол получают химическим синтезом, хотя первоначально производство бутанола было связано с микробиологическим синтезом. Для экономически выгодного производства штаммы микроорганизмов должны обладать способностью сверхсинтеза бутанола. В обзоре рассмотрены пути синтеза бутанола микроорганизмами и их регуляция, наиболее перспективные штаммы-продуценты для промышленного производства и методы повышения их продуктивности.

Введение

В последние годы внимание исследователей все больше акцентируется на производстве жидких органических продуктов и топлива, в первую очередь этанола и бутанола, из возобновляемых источников сырья на основе биомассы.

Промышленное производство бутанола в начале XX века было основано на ферментации углеводного сырья (кукурузной муки) бактериями *Clostridium acetobutylicum*. Увеличение спроса на бутанол и резкий рост нефтехимического производства привели к тому, что биотехнологический процесс получения бутанола оказался дорогостоящим и был заменен более эффективным химическим синтезом. В последние годы из-за глобального потепления и загрязнения атмосферы, а также повышения цен на нефть возобновился интерес к микробиологическому процессу получения бутанола не только в качестве сырья для химической промышленности, но и как альтернативного топлива.

Одним из подходов к проведению непрерывной биоконверсии биомассы, является интегрирование стадии выделения спирта с процессом ферментации – так называемая экстрактивная ферментация.

При ацетон-бутанол-этанольной (АБЭ) ферментации (название по основным продуктам брожения в производстве бутилового спирта) бактерии *C. acetobutylicum* на первом этапе вырабатывают масляную, пропионовую, молочную и уксусную кислоты (стадия производства кислот), затем водородный показатель снижается и начинается стадия синтеза растворителей бутанола, ацетона, этанола и изопропанола. Эта стадия инициируется повышением концентрации масляной кислоты (больше 2 г/л) и снижением водородного показателя $pH < 5$.

При использовании обычной ферментации АБЭ выход бутанола из глюкозы относительно низкий и составляет приблизительно 15 %, редко превышает 25 %. Производство бутанола лимитируется тем, что при концентрации бутанола 1–2 % ощутимо блокируется рост микроорганизмов, что приводит к остановке ферментации. По этой причине концентрация бутанола при обычном процессе АБЭ не превышает 1,5 % общего объема при продуктивности 4,5 г/л·ч⁻¹ и выход составляет меньше 25 % от массы глюкозы [1].

Пирог и др. [2], используя ряд инженерных решений, анонсировали создание полноценной промышленной технологии получения биобутанола. В процессе ферментации использовали сдвоенные биореакторы непрерывного действия с иммобилизованными микроорганизмами, проведена оптимизация процесса ферментации АБЭ, при этом синтез бутанола проходил в два этапа. На первом этапе синтезировалась масляная кислота, на втором – бутанол. Такой процесс позволил значительно увеличить выход, скорость накопления и концентрацию бутанола.

По сравнению с обычным процессом АБЭ новая технология исключала производство нежелательных продуктов (уксусная, молочная и пропионовая кислоты, ацетон, изопропанол, этанол). В таком процессе на выходе получали масляную кислоту, бутанол, углекислый газ и водород. Необходимо отметить, что новая тех-

нология позволяла наряду с основным продуктом получать еще один вид альтернативного топлива – водород.

Проведение процесса с помощью такой технологии позволило минимизировать ингибирующее действие спиртов на микроорганизмы, увеличить продуктивность реактора и уменьшить энергозатраты на концентрирование и выделение целевого продукта.

1. Физические и химические характеристики

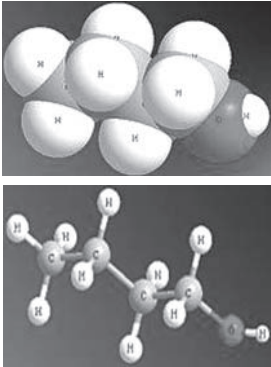
Бутанол – нормальный бутиловый спирт (*n*-бутанол, метилпропан), бесцветная жидкость с отчетливым сивушным запахом, представляет собой линейный четырехуглеродный алифатический спирт с молекулярной формулой C₄H₉OH или CH₃(CH₂)₃OH. Существуют изомеры бутанола – изобутанол, вторбутанол и трет-

бутанол. Бутанол смешивается с органическими растворителями и частично с водой, образуя азеотроп. Токсичность бутанола относительно невелика, LD₅₀ = 2290–4360 мг/кг, хотя и является наивысшей среди младших спиртов [3–15]. Основные характеристики бутанола представлены в табл. 1.

Бутанол имеет ряд преимуществ по сравнению с этанолом, который в настоящее время используется как основное биотопливо, и обладает более высокой энергоемкостью, гидрофобностью и сравнительно небольшой коррозионной активностью.

В промышленных масштабах бутанол получают из пропилена или ацетальдегида с помощью различных схем химического синтеза – схема Оксо, схема Реппе и кротонилдегидрогидрогенацией (рис.1).

Таблица 1. Основные характеристики бутанола [16]

Свойства	Бутанол	Химическая структура			
Температура плавления, °С	–89,3				
Молярная масса, г/моль	74,12				
Температура воспламенения, °С	35–37				
Температура самовоспламенения, °С	343–345				
Температура вспышки, °С	25–29				
Относительная плотность (вода : 1,0)	0,81				
Критическое давление (гПа)	48,4				
Критическая температура, °С	287				
Пределы взрываемости, % в воздухе	1,4–11,3				
Растворимость в воде	9,0 мл на 100 мл (7,7 г/100 мл при 20 °С)				
Относительная плотность пара (воздух : 1,0)	2,6	Бутанол	Бензин	Этанол	Метанол
Давление паров (кПа при 20 °С)	0,58	117–118	27–221	78	64,7
Точка кипения, °С	0,8098	0,7–0,8	0,7851	0,7866	
Плотность при 20 °С, г/мл	–	–	+	+	
Растворимость в 100 г воды	27–29,2	32	19,6	16	
Плотность энергии, МДж·л ⁻¹	110000	115000	84000	76000	
Содержание энергии/значение (БТЕ/галлон)	11,2	14,6	9	6,5	
Соотношение воздух–топливо	0,43	0,36	0,92	1,2	
Теплота парообразования (МДж/кг)	178	160–300	112,3	81,14	
Жидкие теплоемкости (Ср) на СТП, кДж/кмоль °К	96	91–99	129	136	
Теоретическое октановое число	78	81–89	102	104	
Моторное октановое число	0,88	3,52 ± 0,62	–0,31	–0,77	
Коэффициент распределения октанол/вода (как logP _{о/в})*	1,66	–	1,7	1,6	
Дипольный момент (полярность)	2,593	0,24–0,32	1,078	0,5445	
Вязкость, 10 ⁻³ Па					

*LogP является мерой гидрофобности (липофильности) и похож на полярность.

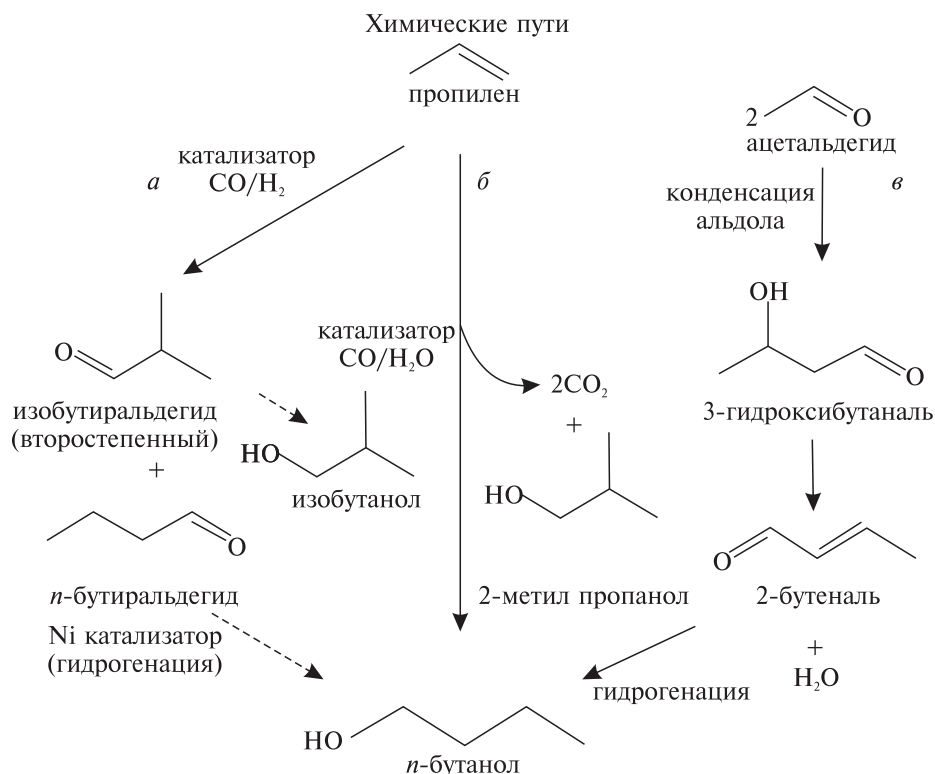


Рис. 1. Схема промышленного синтеза бутанола: *а* – схема Оксо, *б* – схема Реппе, *в* – кротонилдегидро гидрогенизацией [16]

В Оксо-синтезе (гидроформилирование), монооксид углерода и водород добавляются к двойной С=С связи с использованием катализаторов, таких как Co, Rh или Ru. В зависимости от условий реакции (давления, температуры), а также типа катализатора получают различные изомерные соотношения бутанола.

Процесс Реппе – производство бутанола при низкой температуре и давлении. Этот процесс не был коммерчески успешным, скорее всего, из-за дорогостоящей технологии. До недавнего времени самым распространенным направлением для синтеза бутанола было использование кротональдегид гидрогенизации ацетальдегида. Процесс состоит из альдольной конденсации, обезвоживания и гидрогенизации. В настоящее время он используется все реже, хотя в будущем может вернуть себе утраченные позиции. Это связано с тем, что остальные пути химического синтеза связаны с использованием нефти, а процесс кротональдегид гидрогенизации обеспечивает альтерна-

тивный маршрут с использованием в качестве исходного сырья этанола, который можно получать из биомассы. В этом случае этанол дегидрируют в ацетальдегид, из которого можно перейти к дальнейшему синтезу бутанола [3]. В 2010 г. мировое производство бутанола составило более 3 млн тонн.

2. Ферментация АБЭ

В классической ферментации АБЭ получают конечные продукты – ацетон, бутанол и этанол в соотношении 3:6:1 соответственно.

Процесс ферментации разделяется на два этапа – кислотообразование и получение спиртов. При накоплении достаточного количества ацетата (уксусной кислоты) и бутирата (масляной кислоты) первая фаза синтеза запускает последующий процесс спиртообразования.

При использовании в качестве исходного субстрата глюкозы получение пирувата происходит по схеме Эмбдена–Мейегофа–Парнаса (рис. 2).

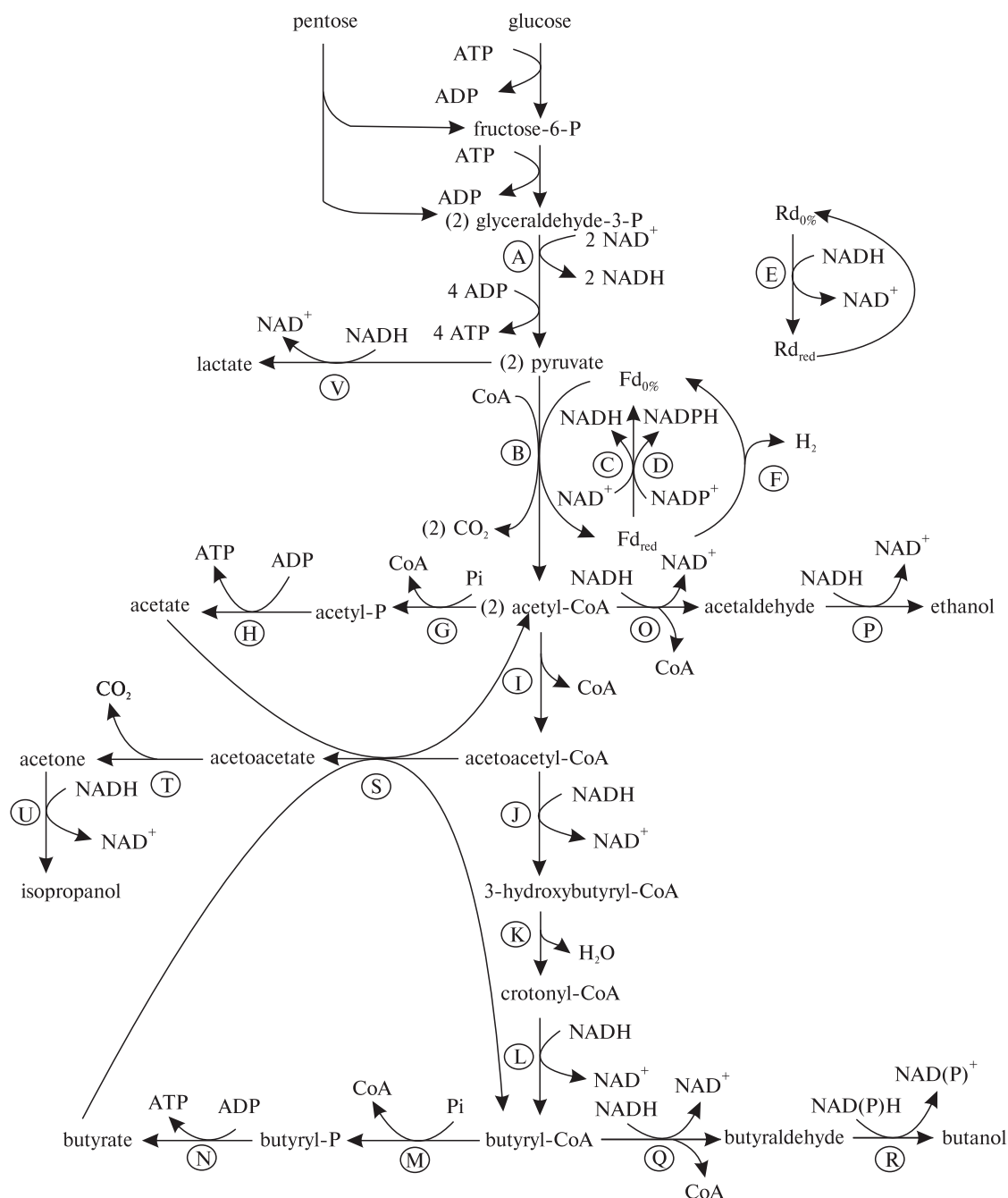


Рис. 2. Схема биохимического пути АБЭ ферментации. Энзимы обозначены буквами: А – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, В – пируват-ferredоксин оксидоредуктаза, С – НАДН-ferredоксин оксидоредуктаза, D – НАДФН-ferredоксин оксидоредуктаза, E – НАДН рубредоксин оксидоредуктаза, F – гидрогеназа, G – фосфотрансацилаза, H – ацетат киназа, I – тиолаза, J – 3-гидроксибутирил-КоА дегидрогеназа, K – кротогеназа, L – бутирил-КоА дегидрогеназа, M – фосфат бутитрансфераза (фосфотрансбутирилаза), N – бутират киназа, O – ацетоальдегид дегидрогеназа, P – этанол дегидрогеназа, Q – бутиральдегид дегидрогеназа, R – бутанол дегидрогеназа, S – ацетоацетил-КоА : ацетат/бутират : КоА трансфераза, T – ацетоацетат декарбоксилаза, U – изопропанол дегидрогеназа, V – лактат дегидрогеназа; CoA – коэнзим А, P – фосфат, Rh – рубредоксин, Fd – ферредоксин [17]

В этом процессе две молекулы АТФ (аденозинтрифосфат) и НАДН (никотинамиддинуклеотид) используются на 1 моль глюкозы. Субстраты, содержащие пентозы, переходят в пируват по пентозофосфатной схеме. В этой схеме на три молекулы пентозы тратится пять молекул АТФ и НАДН.

Из пирувата может также формироваться лактат. В этом процессе принимают участие два энзима. Лактатдегидрогеназа катализирует формирование лактата из пирувата с помощью регенерации НАД⁺, а второй энзим – НАД-независимая лактатдегидрогеназа – принимает участие в утилизации лактата и продуцирует из него пируват.

В обычных условиях пируват превращается в ацетил-КоА с помощью пируват-ферредоксин оксидоредуктазы с выделением СО₂ и окислением ферредоксина [18], при этом ацетил-КоА является средним разветвлением основного метаболического пути. Таким образом, два направления синтеза приводят к образованию ацетата и бутирата, а третье направление – к образованию этанола. В этом случае ацетоальдегид дегидрогеназа катализирует реакцию превращения ацетил-КоА в ацетоальдегид с использованием НАДН и получением НАД⁺ и КоА. Превращение ацетоальдегида в этанол происходит при помощи этанол дегидрогеназы с участием НАДН.

Процесс превращения ацетил-КоА в ацетат катализируется фосфат ацетилтрансферазой (фосфотрансацетилазой) с использованием фосфора, получением КоА и образованием ацетилфосфата. Дальнейшее преобразование ацетилфосфата происходит с помощью ацетаткиназы в ацетат. Ацетат, в свою очередь может превращаться в ацетил-КоА с помощью ацетоацетил-КоА : ацетат/бутират : КоА трансферазы. Третий путь изменений ацетил-КоА связан с тиолазой (ацетил-КоА ацетилтрансферазой), которая преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА с получением КоА. Ацетоацетил-КоА является еще одной точкой разветвления основного пути синтеза. В спиртовой фазе ацетоацетил-КоА с участием ацетоацетил-КоА : ацетат/бутират : КоА трансферазы превращается в ацетоацетат, который в свою очередь переходит в ацетон. Эта реакция катализируется ацетоацетат декарбоксилазой и сопровождается вы-

делением СО₂. В процессе кислотообразования ацетоацетил-КоА с помощью 3-гидроксibuтирил-КоА дегидрогеназы и НАДН преобразуется в 3-гидроксibuтирил-КоА. Превращение 3-гидроксibuтирил-КоА в кротонил катализируется кротоназой с получением воды. Дальнейшее преобразование кротонила происходит при помощи бутирил-КоА дегидрогеназы и НАДН с получением бутирил-КоА. Бутирил-КоА является последней точкой разветвления основной схемы.

Преобразование бутирил-КоА в зависимости от этапа (спиртообразования или кислотообразования) проходит по направлению синтеза бутанола или бутирата. В первом случае бутиральдегид дегидрогеназа катализирует реакцию с использованием НАДН, получением КоА и преобразованием в бутиральдегид, который в дальнейшем с участием бутанол дегидрогеназы и НАДФН преобразуется в бутанол. Преобразование бутирил-КоА на этапе кислотообразования катализируется фосфатбутилтрансферазой (фосфотрансбутирилазой) с использованием фосфора, получением КоА и образованием бутирилфосфата. Бутирилфосфат при участии бутирилкиназы и АДФ преобразуется в бутират. В свою очередь бутират может превращаться в бутирил-КоА с помощью ацетоацетил-КоА : ацетат/бутират : КоА трансферазы. Необходимо отметить, что при спиртообразовании в качестве альтернативы ацетону может образовываться изопропиловый спирт. В этом случае реакция катализируется изопропанол дегидрогеназой и НАДН.

В классической схеме АБЕ ферментации при кислотообразовании одна молекула глюкозы преобразуется в 0,8 молекулы бутирата + + 0,4 молекулы ацетата + 2 молекулы СО₂ + + 2,4 молекулы Н₂ [19]. При спиртообразовании одна молекула глюкозы превращается в 0,3 молекулы ацетона + 0,65 молекулы бутанола + + 1,4 молекулы Н₂ + 2,3 молекулы СО₂ [19].

Длительность кислотообразующего и спиртообразующего этапов может быть изменена с помощью варьирования концентраций Н₂, СО₂, органических кислот и минеральных добавок. Поскольку преобразование пирувата в ацетил-КоА включает использование железосерных белков (ферредоксин оксидоредуктаз), то, как пример, важной минеральной добавкой

является железо. Изменение концентрации железа существенно влияет на процесс синтеза конечных продуктов [20–30].

Длительность процесса ферментации АБЭ составляла 2–6 дней в зависимости от выбора субстрата и условий культивирования. При завершении процесса периодической ферментации концентрация растворителей находилась в пределах 12–20 г/л. В этом случае растворители выделяли из среды с помощью дистилляции. При использовании процесса непрерывного культивирования в классической ферментации АБЭ получить коммерчески выгодные конечные продукты невозможно из-за токсичности растворителей и бифазности ферментации. Для решения этой проблемы процесс непрерывного культивирования был соединен с процессом восстановления *in situ* и проведено многоступенчатое непрерывное брожение [3].

3. Продукты бутирата и бутанола

Существуют несколько видов бактерий, которым свойственно маслянокислое брожение и его разновидность – ацетонобутиловое брожение. Процесс ацетонобутилового брожения является анаэробным и осуществляется микроорганизмами, которые принадлежат к родам *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Sarcina*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* и *Megasphaera*, из которых наиболее изучены роды *Clostridium*, *Butyrivibrio* и *Butyribacterium* [31, 32] (табл. 2).

Для производства бутанола в промышленных масштабах используют микроорганизмы рода *Clostridium*: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* и *C. saccharoperbutylacetonicum*.

Бактерии *Clostridia* палочковидные, спорообразующие грамположительные и, как правило, строгие анаэробы. Штаммы клостридий могут быть изолированы из почвы, сточных вод, остатков процесса жизнедеятельности животных, картофеля, корней азотсвязывающих зернобобовых культур, молока, сыра и т.д. Большинство масляно-кислых бактерий синтезируют масляную и уксусную кислоты на этапе кислотообразования, а на этапе спиртообразования – бутанол и ацетон. Штаммы – продуценты ацетона и бутанола, сейчас большей частью классифицированы как *C. acetobutylicum*. Некоторые виды продуцентов синтезируют также и дополнительные продукты, такие

как этанол, лактат, изопропанол.

C. butyricum, *C. tyrobutyricum*, *C. thermobutyricum*, *C. beijerinckii* и *C. populeti* – основные штаммы для получения масляной кислоты и бутанола. *C. beijerinckii* синтезирует растворители приблизительно с таким же показателем, как *C. acetobutylicum*, однако вместо ацетона синтезирует изопропанол. *C. aurantibutyricum* кроме бутанола и ацетона, синтезирует еще и изопропанол. Основным источником углерода для роста бактерий *C. tyrobutyricum* служит лактоза, а продуктами ферментации – масляная кислота, водород и углекислый газ [32, 33]. *C. tetanomorphum* является относительно новым полученным продуцентом, который синтезирует почти эквимолярное количество бутанола и этанола и не синтезирует других растворителей [20].

Различные виды *Clostridium* имеют разную производительность и выход соответствующих кислот, растворителей и их предшественников. Выход соответствующих продуктов синтеза зависит как от среды культивирования, факторов роста, pH, температуры, так и от самого штамма [20]. В табл. 3 приведены продукты синтеза и продуктивность некоторых основных штаммов.

В процессе биосинтеза бутанола при его концентрации 1,0–2,0 % существенно блокируется рост клеток, что приводит к прекращению ферментации [13]. Бутанол, скорее всего, влияет на оболочки клеток, изменяя их функции. При этом замедляется транспорт аналогов сахара в клетку, разрушаются фосфолипидные компоненты, что приводит к увеличению текучести клеточных мембран. Добавление 7–13 г/л бутанола в среду приводит к ингибированию роста у 50 % продуцентов, а при увеличении концентраций ацетона и этанола (до 40 г/л) темпы роста снижаются всего лишь на 50 % [3, 36, 37].

Одним из путей решения этой проблемы является направленная селекция штаммов, толерантных к бутанолу.

Создание на основе *C. beijerinckii* NCIMB 8052 с помощью мутагенеза нового штамма *C. beijerinckii* ВА 101, который более терпим к растворителям, служит одним из таких примеров [3]. Еще одним примером может служить получение измененного штамма *C. acetobutylicum*

ATCC 824 с мутацией в гене *lyt-1*. Этот штамм способен к дальнейшему росту при концентрации бутанола 15 г/л.

При обработке N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином штамма *C. acetobutylicum* ATCC 824 были получены мутанты *C. acetobutylicum* 903 и *C. acetobutylicum* 904, резистентные к бутанолу и имеющие повышенное кислотообразование [20].

Для увеличения толерантности к бутанолу использовался и метод siРНК. Толерантный к бутанолу мутант штамма *C. beijerinckii* NCIMB 8052 сконструирован с помощью siРНК, которые были нацелены на изменение гена глицерин дегидрогеназы (*gldA*) [3].

4. Субстраты

В процессе ферментации АБЭ стоимость субстрата является ключевым фактором. Как правило, до недавнего времени в АБЭ процессе использовали крахмалосодержащие (кукуруза, картофель, пшеница, маниока и т.д.) или сахаросодержащие (сахарный тростник, свекла, мелассы) субстраты. Возможность сахаролитических клостридий сбрасывать разного рода углеводы, включая моно- и дисахариды, ксилозу и целлюбиозу, и полимеры, например, крахмал и ксилан [38], стимулировало поиски альтернативных, более дешевых субстратов [39]. Такими субстратами в дальнейшем могут выступать лигнин и другие целлюлозосодержащие виды сырья.

В работе Kirscher [3] проведена экономическая оценка производства бутанола из кукурузной муки с использованием штамма-продуцента бутанола *C. beijerinckii* BA101. Установлено, что увеличение выхода бутанола на 19,0 % (0,42–0,50 г бутанола на 1 г глюкозы) приводит к снижению стоимости бутанола на 14,7 %. При использовании «сухого спрея» из соевой мелассы (SDSM) в качестве субстрата для ферментации АБЭ с помощью *C. beijerinckii* BA 101 высокие концентрации SDSM приводили к низкому выходу растворителей. Добавление к субстрату глюкозы в концентрации 25,3 г/л привело к увеличению производства АБЭ на 113 % (10,7–22,8 г/л). На основании результатов исследований сделан вывод, что использование SDSM в качестве субстрата с добавлением глюкозы или сахарозы может быть успешным для производства растворителей. В

Таблица 2. Некоторые виды продуцентов бутанола и бутирата

Продуцент	Источник углерода
<i>Clostridium butyricum</i> <i>tyrobutyricum</i> <i>beijerinckii</i> <i>pasterianum</i> <i>barkeri</i> <i>acetobutylicum</i> <i>thermobutyricum</i> <i>thermopalmarium</i>	Крахмал, ксилоза, лактоза, глюкоза, сахароза, глицерин, целлюлоза
<i>Butyribacterium methylophilicum</i>	Лактат, гексозы, пироват, CO, CO ₂ /H ₂ , метанол
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	Глюкоза

Таблица 3. Продукты синтеза и продуктивность штаммов

Вид и штамм	Продукты, г/л		
	Бутанол	Этанол	Ацетон
<i>C. beijerinckii</i>			
NCIMB 8052*	9,2	0,9	4,4
BA 101*	18,6	0,3	8,6
ATCC 25752**	5,0	–	0,4
<i>C. butylicum</i>			
NRRL B-592**	4,5	–	1,1
NRRL B-593**	4,6	–	0
<i>C. aurantibutyricum</i>			
ATCC 17777**	3,4	–	1,2
NCIB 10659**	3,1	–	0,8
<i>C. acetobutylicum</i>			
ATCC 4259**	1,5	–	0,3
ATCC 824**	1,3	–	0,4
ATCC 8529**	0,3	–	0,09

Примечание. В качестве источника углерода использовали глюкозу. * [34]; ** [35].

табл. 4 приведены виды клостридий и некоторые альтернативные субстраты.

Kirscher [3] установил, что бутанол можно получать из сырья с низкой стоимостью, такого как кожура арахиса и другие сельскохозяйственные отходы, и сделал вывод об универсальности штамма *C. beijerinckii* BA 101.

Кроме того, был изучен еще один субстрат – ксилан, получаемый из волокон кукурузы. Ги-

Таблица 4. Некоторые альтернативные виды субстратов [17]

Субстрат	Источники углеводов	Виды клостридий	Ссылка
Яблочный жмых	Фруктоза, глюкоза, сахароза	<i>C. beijerinckii</i>	[40]
Топинамбур	Полифруктоза	<i>C. beijerinckii</i>	[41]
Сыворотка	Лактоза	<i>C. acetobutylicum</i>	[42]
		<i>C. beijerinckii</i>	[43]
Не кондиционный картофель	Глюкоза, крахмал	<i>C. beijerinckii</i>	[44]
Соевая мелласа	Декстроза, сахароза	<i>C. beijerinckii</i>	[45]
Гидролизат древесины	Глюкоза, манноза, лигноцеллюлоза	<i>C. acetobutylicum</i>	[46]
Торф	Глюкоза, ксилоза, лигноцеллюлоза	<i>C. beijerinckii</i>	[47]
Стоки производства пальмового масла	Лигноцеллюлоза, масло, глюкоза, ксилоза	<i>C. aurantibutyricum</i>	[48]
Органические бытовые отходы	Глюкоза, ксилоза, лигноцеллюлоза	<i>C. acetobutylicum</i>	[49]

дроллиз ксилановых волокон кукурузы и ферментация АБЭ выполнены в единой интегрированной системе оборудования, что привело к высоким выходам растворителей – 0,44 г на 1 г субстрата и производительности 0,47 г/л·ч⁻¹.

В процессе непрерывного культивирования штамма *C. beijerinckii* P260 с использованием в качестве источника углерода гидролизата пшеничной соломы было достигнуто увеличение производительности бутанола на 214 % [3]. Установлено стимулирующее действие на рост *C. beijerinckii* BA101, а также на синтез бутанола, фурфурола и фурфурол-гидроксиметила.

5. Сырьевая база

Одной из основных задач биотехнологических исследований в области энергетики является создание экономически эффективной схемы производства биотоплива [50]. Вполне понятно, что экономически целесообразно использовать для получения биотоплива дешевое и возобновляемое сырье, например растительную биомассу (древесные отходы, солому и другие виды непищевого растительного сырья).

Информация о регуляторных путях, определяющих форму и размер клеточных стенок, дает возможность получить растения с улучшенными характеристиками для производства биотоплива, с легко ферментируемыми или более толстыми клеточными стенками. По-

нимание процессов роста и развития клеток позволяет создавать растения с улучшенными свойствами для производства биотоплива. Сокращение предварительной обработки сырья может существенно снизить цену на биотопливо. Новые представления о структуре растений уже дали возможность для разработки высокоэффективного сырья для биотоплива [51].

Проведен скрининг растений, используемых в качестве сырья для биотоплива. Одним из перспективных растений признан тополь [52]. Определены образцы тополя, которые давали высокий выход сахаров без какой-либо предварительной обработки. К сожалению, пока не получен ответ, какие именно признаки фенотипа тополя повышают эффективность выделения сахара.

Возможно также получение уже подготовленного сырья для сбраживания, например целлюлозы, которую можно напрямую перерабатывать в биотопливо. В этом направлении работает ряд авторов [53], занимающихся созданием микроорганизмов, которые синтезируют легкоконвертируемую целлюлозу. Найдены новые микроорганизмы (цианобактерии), использующие солнечный свет как источник энергии для производства полисахаридов и целлюлозы. Такие цианобактерии синтезировали относительно чистую целлюлозу в форме геля, которая легко расщеплялась.

Важным шагом в подготовке сырья было создание энзимов, способных влиять на процесс выработки лигнина – ключевого компонента клеточной стенки растений. Предложена модель, при которой метилирование предшественника лигнина может быть одним из способов ингибирования синтеза лигнина [54], так как чем меньше лигнина, тем легче работать с клеточными стенками.

Необходимо отметить исследования по интегрированию генов микроорганизмов в растения [55]. Экспрессирование генов энзимов, деградирующих целлюлозу в растениях, приводило к нестабильности клеточной оболочки во время роста растения.

Известен способ повышения выхода растворителей при культивировании бактерий *C. acetobutylicum* на мучных средах за счет предварительного разжижения крахмала рециркулируемой бражкой, содержащей активные амолитические ферменты [56].

Одним из направлений подготовки сырья является ферментация или осахаривание. Процесс происходит при нагревании сырья (соломы) и добавлении специальных ферментов [53].

В качестве относительно дешевого сырья использовали арабиноксилановые волокна зерновых культур, усиливая синтез осахариванием или гидролизацией с помощью энзимов [57]. Добавление ро-кумулиновой и ферулиновой кислот в энзиматическую среду с лигноцеллюлозой оказывало стимулирующий эффект на рост микроорганизмов [39].

Существует возможность использования в качестве сырья для синтеза биотоплива отходов сточных вод животноводческих комплексов и больших городов [10]. Добавление глюкозы к среде с избыточной концентрацией ила приводило к увеличению роста бактерий и запуску биоконверсии [58]. Экономически выгодное получение бутанола возможно и при использовании ростков зерновых культур [59–64].

Одним из направлений в исследованиях по подготовке сырья является выделение новых видов клостридий, которые могли сбразивать альтернативное сырье. Обнаружен новый вид клостридий – *C. carboxidivorans* [65], использующий в качестве источника углерода синтетический газ. *C. carboxidivorans* связывает CO₂

и конвертирует их в ацетил-КоА. Все гены классической схемы ферментации АБЭ присутствуют в геноме клостридий этого вида.

6. Схемы получения биобутанола

Энергоемкость бутанола близка к энергоемкости бензина. Бутанол как жидкий высококалорийный энергоноситель может частично или полностью заменить бензин благодаря хорошей смешиваемости с углеводородами, высокому октановому числу и низкой летучести (табл. 1).

6.1. Классическая ферментация

Одним из методов получения бутанола является классическая ферментация АБЭ (рис. 2). С помощью подбора субстрата, рН, температуры, вида и штамма микроорганизмов можно контролировать увеличение или уменьшение выхода конечных продуктов.

Некоторые виды клостридий изначально имели измененный энзиматический путь синтеза конечных продуктов, вследствие этого выход растворителей значительно отличался от классического. Затраты на сырье в себестоимости продукта, полученного классическим путем составляли 60 % и были экономически невыгодными [50]. По классической схеме ферментации АБЭ максимально известные уровни биосинтеза бутилового спирта и ацетона у разных авторов в лабораторных условиях составляли: 15,0 и 10 г/л [66], 14 и 7,6 г/л [67], 15,1 и 6,3 г/л [68] соответственно. Результаты получены при использовании искусственных сред, экзотических иноулиновых субстратов (бугорков земляной груши, георгины, корней цикория и др.) и гидролизатов отходов зерновых культур [69].

6.2. Ферментация мутагенными штаммами

Следующим шагом к увеличению выхода конечных продуктов в классической ферментации АБЭ было использование направленного мутагенеза известных штаммов [70]. Основными мутагенами являлись N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) и этилметансульфонат (ЭМС).

Под воздействием алкилирующих агентов получен стабильный штамм *C. beijerinckii* ВА 101 – «суперпродукент» бутанола [25], а также

штаммы-мутанты *C. acetobutylicum*, накапливающие на мучных средах 9–10 г/л бутанола, 4,3–4,9 г/л ацетона и 1,3–1,9 г/л этанола [71].

Из штамма *C. acetobutylicum* S получен новый штамм *C. acetobutylicum* S-3716 путем индуцированного мутагенеза с последующим отбором мутантных клонов на селективных средах. Штамм *C. acetobutylicum* S-3716 позволял получить до 15,5 г/л бутанола и до 6,5 г/л ацетона на средах с мелассой и добавлением минеральных солей. При этом конверсия углеводов в целевые продукты достигала 40 % [72].

6.3. Использование иммобилизованных продуцентов

Различные методы иммобилизации разработаны для многих культур, продуцирующих растворители [73], и испытаны при использовании клостридий в производстве бутанола. Иммобилизация продуцентов давала преимущество в культивировании и увеличивала выход необходимых продуктов. При этом продлевалась активность и стабильность биокатализа, уменьшалось время ферментации, увеличивалась толерантность культуры к высоким концентрациям субстрата и конечных продуктов, улучшалась фильтрация и сепарация. Эффективность иммобилизации зависела не только от способа иммобилизации, но и от материала, используемого для абсорбции. Для процесса непрерывного культивирования эффективность иммобилизации была еще связана с конструкцией биореактора.

Использование иммобилизованных клеток для культивирования *C. beijerinckii* ATCC 55025 и *C. beijerinckii* VA 101 в биореакторе увеличило производительность процесса, при этом концентрация бутанола достигала 11,5 и 9,4 г/л, соответственно [16]. Использование иммобилизованных культур *C. tyrobutyricum* и *C. acetobutylicum* позволило получить скорость накопления бутанола 4,64 г/л·ч⁻¹ и выход 42 % от массы глюкозы [13].

6.4. Ферментация через промежуточный продукт (масляную кислоту)

Оптимизация процесса ферментации АБЭ и получение бутанола через промежуточный продукт — масляную кислоту позволило существенно увеличить выход, скорость накопле-

ния и концентрацию бутанола [13].

Предварительные результаты показали, что большая концентрация масляной кислоты создавала тормозящий эффект на рост клеток. Относительно низкие уровни концентрации масляной кислоты повышали эффективность ферментации АБЭ и увеличивали выход бутанола. Оптимальной концентрацией масляной кислоты в среде определена величина 4 г/л [16].

6.5. Сокультивирование

Увеличение выхода бутанола возможно и в процессе совместного культивирования с бактериями других видов. Совместное культивирование при условии хорошо подобранных партнеров давало возможность увеличить скорость и глубину гидролиза субстрата, ускорить биосинтез энзимов, увеличить их активность и ускорить образование метаболитов. Культивирование *C. acetobutylicum* с культурами *C. cellulolyticum* или *C. thermocellum* приводило к конверсии целлюлозы, однако при этом уровень синтеза растворителей был низким, возможно из-за недостатка сахара и масляной кислоты в среде [17]. Для повышения концентрации масляной кислоты проведены исследования со штаммами — продуцентами бутанола *C. acetobutylicum* и *C. beijerinckii*, которые сокультивировали со штаммами — продуцентами масляной кислоты *C. butyricum* и *C. pasteurianum*. Выход растворителей в таком процессе сокультивирования оказался не выше, чем для монокультуры. Совместное культивирование *C. formicoaceticum* и *Lactococcus lactis* [74] приводило к увеличению ацетата в среде вплоть до 75 г/л. При этом бактерии адаптировались к повышенным концентрациям ацетата с помощью натурального отбора (толерантные штаммы). Такой процесс сокультивирования использован для получения ацетата из отходов молочного производства [75].

6.6. Использование генетически измененных штаммов

Генетические манипуляции с клостридиями направлены на изменение генов выбранного штамма для повышения выхода бутанола, увеличения толерантности штамма, расширения диапазона используемого сырья для сбразива-

ния, избирательного производства бутанола, не смешанного с получением других растворителей и кислот.

Разработаны векторы рFNK1, которые позволили увеличить эффективность трансформации штамма *C. acetobutylicum* ATCC 824 [32]. Одной из первых была использована интеграционная плазмидная технология для ингибирования метаболических путей, ведущих к получению с помощью *C. acetobutylicum* ATCC 824 ацетата и бутирата. Число копий плазмид, обычно используемых для *C. acetobutylicum*, составляло приблизительно 7–20 копий на клетку [76].

Плазмидные конструкции содержали фрагменты гена фосфотрансацетилазы (*pta*) или бутираткиназы (*buk*), которые были интегрированы в гомологичные области хромосомы, что приводило к механизму инактивации одного или другого гена. Инактивация гена *pta* снижала фосфотрансацетилазную и ацетаткиназную активность, что приводило к значительному понижению выхода ацетата. Инактивация гена *buk* снижала бутираткиназную активность, и, как следствие, понижала синтез бутирата и увеличивала выход бутанола [77].

Метилирование челночного вектора с помощью метилтрансферазы ϕ 3Т1 фага ϕ 3Т значительно снижало или предотвращало деградацию плазмидной ДНК, которая могла произойти из-за атак рестриктаз *C. acetobutylicum* [78].

Характеристики промоутеров множества кластридий идентифицированы с помощью репортерной системы, которая основывалась на гене *lacZ* [79] из *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (кодирует β -галактозидазу) и гене *lucB* [80] из *Photinus pyralis* (кодирует люциферазу). Эффективные системы нокдауна разработаны только для пяти генов (*buk*, *pta*, *adhE*, *solR*, *spo0A*) *C. acetobutylicum* [81–84]. Для кластридий разработана и другая система нокдауна генов [85]. Мобильные группы II интронов *Lactococcus lactis* создавали комплекс между ДНК мишенями и РНК интрона в РНП комплексе (интронкодирующий белок и вырезанный интрон РНК комплекса) [86]. В результате получались управляемые гены мишени, а также возможность предсказания целевых сайтов и дизайн праймеров для интрона [87]. С помощью такой системы создано несколько мутантных штаммов. В настоящее время эта система

является самой эффективной для нокдауна генов [85].

Первым эффективным результатом метаболической инженерии было увеличение производства ацетона. Энзим, формирующий ацетон, рекомбинантного штамма *C. acetobutylicum* с амплифицированными *adc* (кодирует ацетоацетат декарбоксилазу) и *ctfAB* (кодирует КоА трансферазу) генами в процессе ферментации, становился активным намного раньше, чем обычно, поэтому происходила ранняя индукция формирования ацетона. Это привело к увеличению концентрации ацетона, бутанола и этанола на 95, 37 и 90 % соответственно по сравнению с родительским штаммом [88]. Амплификация гена *adhE* (кодирует альдегид дегидрогеназу) не привела к увеличению производительности растворителей. Однако когда родительский штамм производил менее 10 г/л бутанола, то гиперэкспрессия *adhE* увеличивала выход этанола [89, 84].

Для понимания регуляционной системы формирования растворителей дальнейшие исследования были направлены на выяснение характеристики экспрессии гена *solR* (кодирует регулятор продуцирующих генов растворителей) мутантного штамма. Ген *solR* являлся транскрипционным репрессором и негативным регулятором метаболизма продукции растворителей. Удаление региона гена *solR* увеличивало выход бутанола [90–92].

Изучено также влияние siРНК на формирование ферментов *C. acetobutylicum* [93]. Для генов *pta* и *buk* разработаны siРНК, использование которых привело к сокращению активности бутираткиназы и фосфотрансбутирилазы на 85 и 70 % соответственно.

Толерантность к растворителям является ответом на стресс бактерий *C. acetobutylicum* и включает в себя гиперэкспрессию многих генов. Избыточная экспрессия белков теплового шока GroES и GroEL позволила увеличить выход растворителей. Скрининг геномной библиотеки для идентификации отдельных генов можно использовать для повышения толерантности штаммов к растворителям [94–97].

Расшифровка генома *C. acetobutylicum* ATCC 824 позволила начать генетические манипуляции и послужила толчком к изучению механизмов действия различных генов [98]. Результаты

Таблица 5. Ферментация разных генетически измененных штаммов *C. acetobutylicum* [3]

Надсинтез гена	Угнетение гена	Ацетат	Бутират	Ацетон	Бутанол	Этанол	Суммарное количество растворителей	БЭ/А	Комментарии	Ссылка
Контроль <i>adc, ctfAB</i>	—	4,2 0,6	6,7 0	4,5 8,7	9,5 13	0,74 1,4	14,7 23,1	2,28 1,66	Выход растворителей на 50 % выше (г/л) на глюкозе	[88]
Контроль <i>adhE</i>	—	3,2 1,9	3,2 0,4	3,8 4,2	5,5 8,7	0,7 1,9	16,4 14,8	1,63 2,53	БЭ/А увеличен	[98]
<i>adhE</i>	pSOL1	6,4	14,9	0	0	0	0	—	Ацетон не производился/ <i>adhE</i> отвечает за АБЭ продукцию	[89]
<i>adhE</i>	pSOL1	6,1	8,7	0	6,2	0,4	6,6	—		
Контроль —	<i>pta</i>	6,7 5,2	9,5 14	4,6 4,2	9,7 9,9	0,5 0,6	14,8 14,7	2,2 2,5	Уровень бутирата имеет решающее значение для синтеза бутанола	[82]
—	<i>buk</i>	9	3,3	2,3	10,8	0,7	13,8	5		
Контроль		3,1	3,1	3,8	5,5	0,7	10,0	1,63	Повышенный выход растворителей на глюкозе	[84]
	<i>solR</i>	1,7	1,9	8,1	17,8	1,0	26,9	2,32		
	<i>buk</i>	6,7	1,6	4,4	16,7	2,6	23,7	4,38	Достигнут высокий уровень бутанола	[99]
<i>adhE</i>	<i>buk</i>	6,8	1,6	3,8	16,7	4,5	25	5,58		
Контроль —	<i>solR</i>	3,6 4,1	3,6 1,4	5 5,6	11,7 14,6	0,73 4,4	17,4 24,6	2,5 3,4	Управление регуляторными генами производства растворителей. Достигнут высокий уровень концентрации бутанола	[90]
<i>adhE</i>	<i>solR</i>	5,1	1,1	8,2	17,6	2,1	27,9	2,4		
Контроль <i>adhE</i>	—	4 7	4 0	4,4 1,4	10,4 10	0,2 8,8	15 20,2	2,4 13,4	asRNA регулирование, достигнут высокий уровень выхода этанола	[100]
—	<i>atB</i>	6,8	10	0,3	1,2	0,2	1,7	4,7		
Дикий тип		4,5	2,2	3	11	1,1	15,1	4	Штамм, толерантный к растворителю	[95]
Контроль <i>groESL</i>	—	5,4 4,5	3,5 3,5	6 8	13 17	1,1 1,1	20,1 26,1	2,4 2,3		

Примечание. БЭ/А – (бутанол+этанол)/ацетон (г/г).

ферментации при генетических манипуляциях с бактериями *C. acetobutylicum* представлены в табл. 5. Процесс синтеза растворителей тесно связан с процессом споруляции. Транскрипционный фактор, ответственный за активацию споруляции (*Spo0A*), также инициирует синтез растворителей в *C. acetobutylicum* с помощью активации генов транскрипции ацетоацетата декарбоксилазы (*adc*), алкогольдегидрогеназы (*adhE*) и КоА трансферазы (*ctfAB*) [3].

На основе информации о геноме может быть построена метаболическая геномная модель. Эта модель должна пройти процесс проверки путем сравнения теоретических данных и полученных от реальной ферментации. Стратегия развития интегрированного процесса получения биотоплива представлена на рис. 3.

Для выявления генов-мишеней и путей для манипуляции с ними, кроме генетического анализа, необходимо изучить транскриптомное

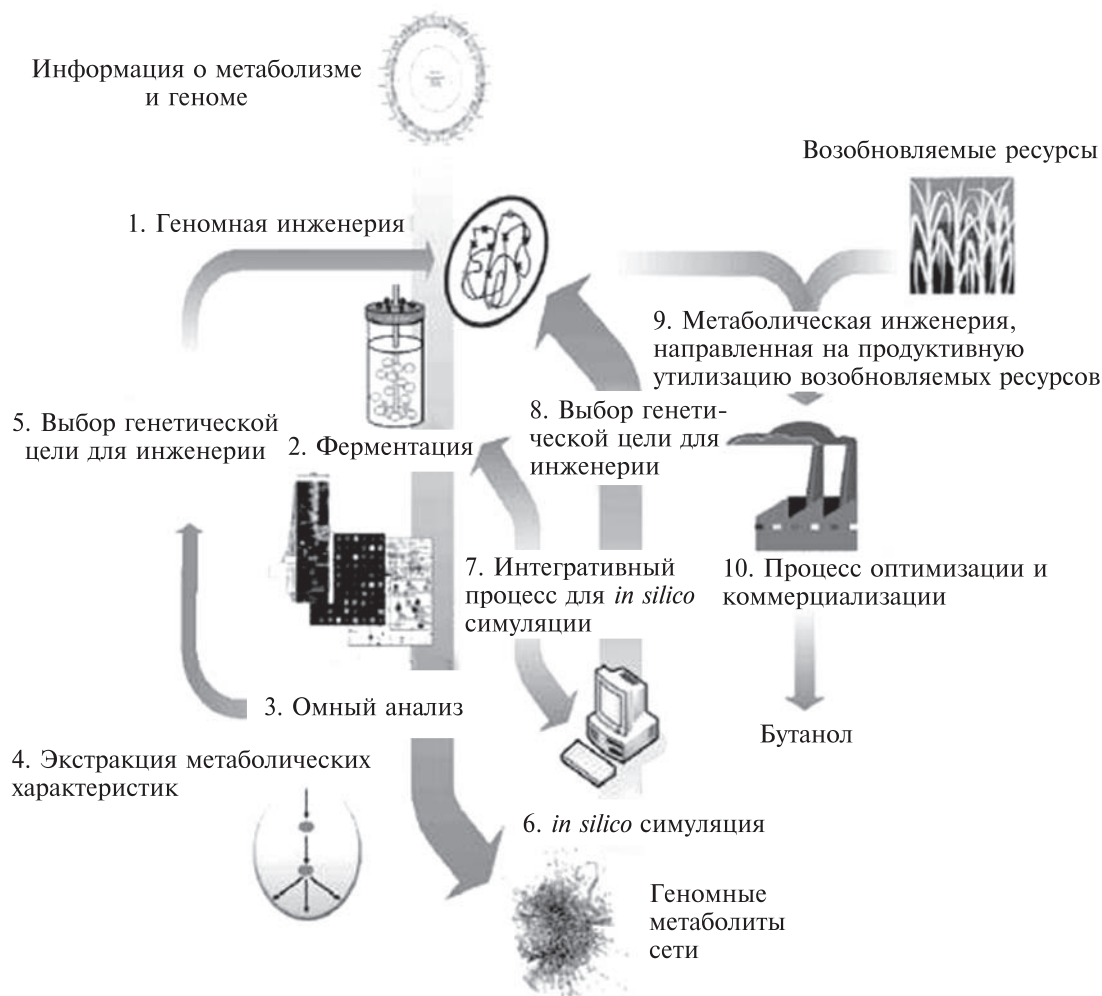


Рис. 3. Стратегия развития интегрированного биопроцесса для получения биотоплива [3]

и протеомное профилирование штаммов в различных генотипических и экологических условиях. Интеграция всех этих результатов может привести к созданию штамма с повышенным выходом бутанола.

6.7. Сбраживание целлюлозы

Некоторые кластридии синтезируют ксиланазу и поэтому способны использовать ксилан — главный компонент гемицеллюлозы — в качестве основного источника углерода. Сухая растительная биомасса содержит 15–40 % гемицеллюлоз. Кроме сбраживания, кластридии способны осуществлять гидролиз целлюлозы с помощью ферментативного комплекса, который находится в целлюлосоме кластридий [50, 101].

Большинство целлюлитических кластридий в качестве продуктов ферментации производят уксусную и масляную кислоты, двуокись углерода, водород, этанол, ацетат, лактат и формиат. Эти продукты могут быть использованы в дальнейшей переработке [102]. Для экономически выгодного ацетонобутилового брожения необходимы сольвентогенные штаммы, которые используют возобновляемое и дешевое сырье. Таким сырьем может выступать биомасса непригодных растений или отходы сельского хозяйства.

В работе Березиной [103] показано, что штаммы *C. acetobutylicum* 6, *C. acetobutylicum* 7 и *C. acetobutylicum* VKPM В-4786 обладают высокой гемицеллюлозной активностью, что открывает

возможность использования для производства бутанола дешевой растительной биомассы, частичной замены пшеничной муки на биомассу в традиционных средах.

Ястремской и др. [104] при многократных «пересевах» селективирован штамм *C. thermocellum* 5СТ с высокой целлюлолитической активностью. Такой штамм позволяет получать термостабильные энзимы, поэтому перспективен для использования в биотехнологических процессах для производства растворителей.

6.8. Аэробные продуценты

Классическая ферментация АБЭ штамма рода *Clostridium* проходит в анаэробных условиях. Одним из путей повышения максимального выхода бутанола и производительности процесса было создание процесса синтеза бутанола в аэробных условиях с помощью *E. coli*. Соответствующие гены клостридий, отвечающие за синтез бутанола, пересажены в *E. coli*. Как результат, получен штамм, синтезирующий бутанол в аэробных условиях, хотя и в небольших количествах [105].

Получены и другие штаммы-продуценты, которые синтезировали бутанол в аэробных условиях [106]. Так, на основе дрожжей *Saccharomyces* созданы новые штаммы с помощью переноса соответствующих генов из биосинтетической схемы получения бутанола в клостридиях и добавления нескольких энзимов из других микроорганизмов (*S. cerevisiae*, *E. coli*, *C. beijerinckii* и *Ralstonia eutropha*). Проанализированы различные сочетания энзимов микроорганизмов и их влияние на процесс синтеза бутанола. Наиболее продуктивные штаммы содержали 3-гидросибутирил-КоА дегидрогеназы, полученные из *C. beijerinckii*. Подбор соответствующих энзимов дал возможность повысить концентрацию бутанола в культуральной среде в 10 раз.

Результатом исследований Lin et al. [107] было создание штаммов *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus buchneri* с включением гена *thl*, полученного из *Clostridium beijerinckii* P260. Такие рекомбинантные штаммы синтезировали 28 и 66 мг/л бутанола соответственно.

Авторы работы [108] создали новый штамм-продуцент на основе *E. coli*, который синтезировал 30 г/л бутанола. Кроме основных генов *Clostridium* spp., участвующих в синтезе бутанола,

в *E. coli* был встроен ген транс-эноул-КоА-редуктазы (Ter) из *Treponema denticol*. Этот энзим имел специфическую активность по отношению к кротонил-КоА редуктазе и использовал НАДН. Такой путь синтеза бутанола с использованием транс-эноул-КоА-редуктазы позволял осуществить синтез по альтернативной схеме, без вовлечения ферредоксина или флавопротеина.

В результате этих исследований установлено, что НАДН и ацетил-КоА являются основными регуляторами, которые могут увеличивать выход растворителей. Кроме получения в процессе синтеза высокой концентрации бутанола, был достигнут еще и высокий уровень экономичности (70–88 % от теоретического).

7. Очистка и выделение

Культуральная жидкость после процесса культивирования содержит смесь бутанола и других продуктов. Для получения чистого бутанола необходимо каким-то образом разделить эту смесь. Одним из возможных процессов выделения бутанола является интегрирование стадии выделения бутанола с процессом непрерывной ферментации – так называемая экстрактивная ферментация. Проведение процесса по такой технологии позволило минимизировать ингибирующее действие бутанола и уменьшить энергозатраты на концентрирование целевого продукта.

Существуют три основных способа выделения отдельных компонентов из смеси конечных продуктов ферментации: ректификация, первапорация и противоточная жидкостная экстракция (рис. 4).

Процесс первапорации – выделение органических продуктов из энзиматической среды. Он основан на мембранном способе разделения жидкости (испарение через мембрану). В этом процессе смесь жидких компонентов (питательный поток) приводилась в контакт с одной стороны мембраны, а пермиат – продукт, обогащенный целевыми компонентами смеси, которые проникают через мембрану, удалялся в виде пара с обратной стороны мембраны. Первапорация отличается относительно низким удельным энергопотреблением по сравнению с мембранными технологиями, использующими пористые мембраны. Разделение продуктов

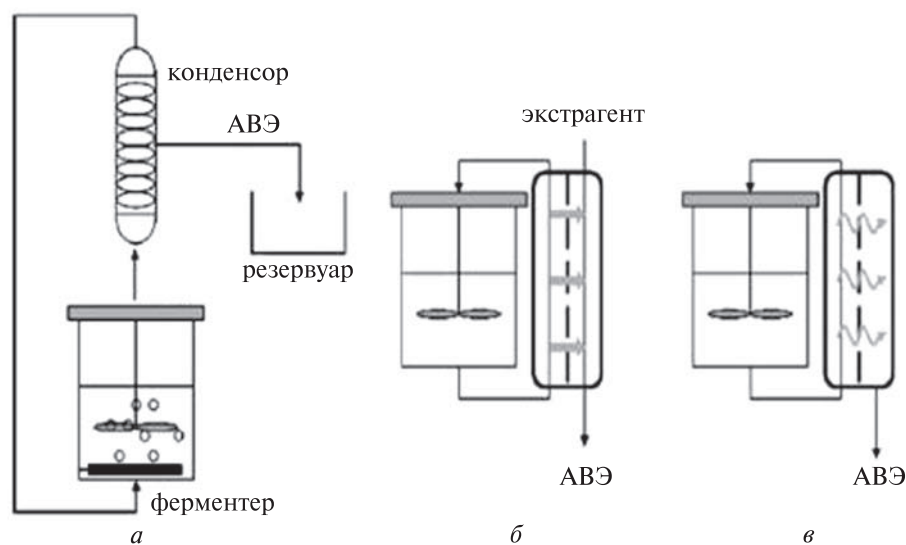


Рис. 4. Схема непрерывного технологического процесса ферментации и экстракции бутанола: а – ректификация, б – жидкостная экстракция, в – первапорация [3]

ферментации идет на молекулярном уровне, что повышает избирательность выхода продукта, а также его чистоту.

Для поддержания и обеспечения стационарного разделения первапорацию проводили различными методами: с помощью вакуума или в потоке газа-носителя. В промышленности благодаря простоте реализации и минимальной потребности в оборудовании, обычно используется именно вакуумная первапорация. Процесс первапорации включает в себя три последовательные стадии: селективная сорбция на входной поверхности мембраны; селективная диффузия через мембрану; десорбция в паробразную фазу на выходной поверхности. Для очистки бутанола использовали различные виды мембран. Разработанные специально для очистки бутанола мембраны дали возможность в два раза повысить выход и скорость накопления продукта [109–111].

Вторым способом является получение очищенного бутанола с помощью ректификации. В этом процессе раздел смеси продуктов ферментации проходил за счет противоточного массо- и теплообмена между паром и жидкостью. Ректификация проводилась как при непрерывной, так и при периодической ферментации. Разделение энзиматической смеси на практически чистые компоненты происходило за счет различных температур кипения продук-

тов, путем многократных испарений жидкости и конденсации паров. Интегрирование ректификации в ферментационный процесс увеличило биоконверсию сахаров в два раза и позволило использовать повышенные концентрации сахара для сбраживания [112–115].

При разделении бутанола на установке противоточного действия используется различие в коэффициентах распределения веществ. Бутанол хорошо растворяется в органических растворителях (экстрагент) и гораздо хуже в водной фазе (энзиматическая смесь), поэтому бутанол избирательно конденсировался в экстрагенте. Для выделения и очистки бутанола чаще всего использовали известные экстрагенты, включая деканол и олеиловый спирт. Для ограничения токсического воздействия экстрагента на культуры культивационная среда была отделена мембраной (процесс «перстракшон»). Высокие показатели скорости накопления бутанола получены при интегрировании жидкостной экстракции с использованием деканола и олеилового спирта в процессе непрерывного культивирования *S. acetobutylicum* [116–118].

Заключение

Все биотехнологические процессы существенно зависят от продуктивности штамма и условий ферментации. В производстве бутано-

ла эту проблему решают различными способами: селекцией и генной инженерией штаммов-продуцентов, оптимизацией энзиматической среды и самого процесса ферментации. Объемы выхода бутанола при использовании различных источников углерода можно увеличить за счет оптимизации метаболических путей синтеза.

В дополнение к инженерии метаболических путей можно оптимизировать глобальные регуляторы синтеза и факторы транскрипции, которые сопровождают клеточные белки, увеличивающие выход бутанола и способствующие толерантности штаммов.

Разработка новых подходов к процессу ферментации на основе М-штаммов может оказать существенное влияние на экономику процесса получения биобутанола.

Одним из наиболее важных факторов не только для получения биобутанола, но и для всей индустрии биотоплив является использование дешевых субстратов. Важное значение будет иметь также стоимость производства биомассы (сырья), ее транспортировки и хранения. Особое место в получении биотоплив отводится использованию целлюлозной и лигноцеллюлозной биомассы. Процесс производства бутанола может стать конкурентным на основе системного подхода к изучению всех аспектов ферментации, метаболической инженерии штаммов с учетом определения полных последовательностей геномов и выбора альтернативного дешевого сырья.

O. Tigunova, S. Shulga, Y. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: Shulga5@i.ua

ALTERNATIVE TYPE OF FUEL – BIOBUTANOL

Butanol – an alternative fuel that on amid dwindling global (accessible) oil reserves can serve as a source of energy. In the industrial-scale butanol is produced by chemical synthesis, although initially butanol production was due to microbiological synthesis. For cost-efficient production, a strain of microorganisms must have over production of butanol. In the review of butanol synthesis pathway with the help of microorganisms, their regulation, the principles and techniques of increasing the productivity of the most promising strains and producer strains for industrial production.

O. O. Tigunova, S. M. Shulga, Y. B. Blume

АЛЬТЕРНАТИВНИЙ ВИД ПАЛИВА – БИОБУТАНОЛ

Бутанол – альтернативне паливо, на тлі світових (доступних) запасів нафти, які виснажуються, є потенційним джерелом енергії. У промислових масштабах бутанол одержують хімічним синтезом, хоча спочатку виробництво бутанола було пов'язано з мікробіологічним синтезом. Для економічно вигідного виробництва штамами мікроорганізмів повинні мати здатність до надсинтезу бутанола. В огляді розглянуто шляхи синтезу бутанола мікроорганізмами і їх регуляція, найбільш перспективні штами-продуценти для промислового виробництва та методи підвищення продуктивності штамів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Пирог Т.П., Игнатова О.А.* Загальна біотехнологія : підручник. – К., 2009. – 336 с.
2. *International patent US 5 753 474.* Continuous two stage, dual path anaerobic fermentation of butanol and other organic solvents using two different strains of bacteria / Ramey D.E. – Filed 20.12.1996; Publ. 19.05.1998.
3. *Lee S.Y., Park J.H., Jang S.H. et al.* Fermentative butanol production by Clostridia. [Review] // *Biotechnol. and Bioeng.* – 2008. – **101**, № 2. – P. 209–228.
4. *International patent WO2007/041269.* Fermentative production of four carbon alcohols // Donaldson G.K., Eliot A. C., Flint D. et. al. Filed 25.10.2006; Publ. 26.04.2007.
5. *Kirscher M.* n-Butanol // *Chem. Marker Rep.* – 2009. – **269**, № 4. – P. 42.
6. *Durre P.* Biobutanol : an attractive biofuel // *Biotechnol. J.* – 2007. – **2**. – P. 1525–1534.
7. *Brekke K.* Butanol – an energy alternative? // *Ethanol Today.* – 2007. – March. – P. 36–39.
8. *Atsumi S., Hanai T., Liao J.C.* Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels // *Nature.* – 2008. – **451**. – P. 86–90
9. *Аблаев А.Р.* Большая нефть и биотопливо // *Биотехнология.* – 2011. – **3**. – С. 8–15.
10. *Ольховская У.* Биотоплива второго поколения: за и против // *Chem. J.* – 2008. – Декабрь. – С. 38–42.
11. *Степаненко П.* Из истории биобутанола // *Chem. J.* – 2008. – Сентябрь. – С. 30–43.
12. *Тигунова О.О., Шульга С.М.* Нові штами – продуценти біобутанола. 1. Виділення та ідентифікація // *Biotechnol. Acta* – 2013. – **6**, № 1. – С. 97–105.
13. *Олійничук С., Кизюн Г., Шиян П., Сосницький В.* Сучасні й перспективні технології виробництва

- біопалива на світовому ринку // Харчова і переробна промисловість. – 2009. – 6, № 358. – С. 11–13
14. *Tigunova O., Shulga S.* Obtaining of new butanol producers // Abst. 15th Eur. Congr. Biotechnol. – Istanbul, 2012. – 29. – P. S43.
 15. *Rawey D.* Butanol : The other alternative fuel // Agriculture Biofuels: Technology, Sustainability and Profitability. – 2007. – P. 137–147
 16. *Gholizadeh L.* Enhanced butanol production by free and immobilized *Clostridium* sp. cells using butyric acid as co-substrate. Master thesis. Biotechnology (Bioprocess Engineering – Biofuels) – University College of Bores School of Engineering, 2009. – 115 p.
 17. *Contreras A.M.L.* Utilization of lignocellulosic substrates by solvent-producing Clostridia : PhD thesis. – Wageningen, 2003. – 144 p.
 18. *Mitchell W.J.* Biology and physiology // Clostridia : Biotechnology and medical application. – Weinheim, 2001. – P. 49–104.
 19. *Rogers P., Gottschalk G.* Biochemistry and regulation of acid and solvent production in Clostridia // The Clostridia and Biotechnology / Ed. D.R. Woods. – Stoneham, 1993. – P. 25–30
 20. *Jones D.T., Woods D.R.* Acetone-Butanol Fermentation Revisited // Microbiol. Rev. – 1986. – 50, № 4. – P. 484–524.
 21. *Croux C., Canard B., Goma G., Soucaille P.* Autolysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // J. Gen. Microbiol. – 1992. – 138. – P. 861–869.
 22. *Data R., Zeikus J.G.* Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids // Appl. Environ. Microbiol. – 1985. – 49, № 3. – P. 522–529.
 23. *International patent No 4,560,658.* Production of butanol by fermentation in the presence of carbon monoxide / Data R., Zeikus J.G. – Filed 05.12.1983; Publ. 24.12.1985.
 24. *Durre P.* Fermentative butanol production // Ann. New York Acad. Sci. – 2008. – 1125. – P. 353–362.
 25. *International patent US 6358717 B1.* A method of producing butanol using a mutant strain of *Clostridium beijerinckii* // Formanek J., Chen Ch.-K., Blaschek H., Annous B. – Filed 13.05.1998; Publ. 19.05.2002.
 26. *Lee J., Mitchell W.J., Tangney M., Blaschek H.P.* Evidence for the presence of an alternative glucose transport system in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the solvent-hyperproducing mutant BA 101 // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – 71, № 6. – P. 3384–3387.
 27. *International patent US 2010 0285549 A1.* Recombinant microorganism having butanol production capacity and butanol production method / Muramatsu M., Obata S., Yoneda S. et.al. – Filed 06.15.2010; Publ. 11.11.2010.
 28. *MacDonald D.L., Goldfine H.* Effect of solvents and alcohols on the polar lipid composition of *Clostridium butyricum* under conditions of controlled lipid chain composition // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – 57, № 12. – P. 3517–3521.
 29. *Qureshi N., Blaschek H.P.* Recent advances in ABE fermentation: hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA 101 // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – 27, № 5. – P. 287–291.
 30. *Tashiro Y., Takeda K., Kobayashi G., Sonomoto K.* High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding // J. Biotechnol. – 2005. – 120, № 2. – P. 192–206.
 31. *Zigova J., Sturdik E.* Advances in biotechnological production of butyric acid // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – 24. – P. 153–160.
 32. *Ying Zhu M.S.* Enhanced butyric acid fermentation by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor / Diss. – Ohio State University, 2003. – 288 p.
 33. *Huang Y.L., Wu Z., Zhang L. et al.* Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor // Bioresource Technol. – 2002. – 82, № 1. – P. 51–59.
 34. *Formanek J., Mackie R., Blaschek P.H.* Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semidefined p2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – 63, № 6. – P. 2306–2310.
 35. *George H.A., Jonson J.L., Moore W.E. et al.* Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum* // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – 45, № 3. – P. 1160–1163.
 36. *Paredes C., Rigoutsos I., Papoutsakis E.T.* Transcriptional organization of the *Clostridium acetobutylicum* genome // Nucl. Acid Res. – 2004. – 32. – P. 1973–1981.
 37. *Paredes C., Alsaker K.V., Papoutsakis E.T.* A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology // Nat. Rev. – 2005. – 3. – P. 969–978
 38. *Mitchell W.L.* Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia // Adv. Microbial Physiol. – 1998. – 39. – P. 31–130.
 39. *Ezeji T., Qureshi N., Blaschek P. H.* Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation // Biotechnol. and Bioeng. – 2007. – 27, № 6. – P. 1460–1469.
 40. *Voget C.E., Mignone C.F., Ertola R.J.* Butanol pro-

- duction from apple pomace // *Biotechnol. Lett.* – 1985. – 7. – P. 43–46.
41. Marchal R., Ropars M., Vandecasteele J.P. Conversion into acetone and butanol of lignocellulosic substrates pretreated by steam explosion // *Biotechnol. Lett.* – 8. – P. 365–370.
 42. Maddox I.S., Qureshi N., Gutierrez N.A. Production of n-butanol by fermentation of wood hydrolysate // *Biotechnol. Lett.* – 1983. – 5. – P. 175–178.
 43. Schoutens G.H., Nieuwenhuizen M.C.H., Kossen N.W.F. Butanol from whey ultrafiltrate: batch experiments with *Clostridium beijerinckii* LMD 27.6 // *Appl. Mol. Biotechnol.* – 1984. – 19. – P. 203–206.
 44. Nimcevic D., Schuster M., Gapes J.R. Solvent production by *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 growing on different potato media // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – 50. – P. 426–428.
 45. Qureshi N., Lolas A., Blaschek H.P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101 // *J. Ind. Microbiol.* – 2001. – 26. – P. 260–295.
 46. Maddox I.S., Murray A.E. Production of n-butanol by fermentation of wood hydrolysate // *Biotechnol. Lett.* – 1983. – 5. – P. 175–178.
 47. Forsberg C., Schellhorn H., Gibbins L. et al. The release of fermentable carbohydrate from peat by steam explosion and its use in the microbial production of solvents // *Biotechnol. Bioeng.* – 1986. – 28. – P. 176–184.
 48. Sombrutai W., Takagi M., Yoshida T. Acetone-butanol fermentation by *Clostridium aurantibutyricum* ATCC 17777 from a model medium for palm oil mill eluent // *J. Ferment Bioeng.* – 1996. – 81. – P. 543–547.
 49. Lopez-Contreras A.M., Claassen P.A.M., Mooibroek A., de Vos W.M. Utilisation of saccharides in extruded domestic organic waste by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 to produce acetone, butanol and ethanol // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – 54. – P. 162–167.
 50. Зорин В.В., Петухова И.И., Прищепов Ф.А. и др. Кафедра биохимии и технологии микробиологических производств УГНТУ в решении задач топливно-энергетического комплекса, био- и органического синтеза // *Нефтегаз. дело.* – 2008 – 6, № 2. – С. 169–176.
 51. Basu D., Le J., Zakharova T. et al. A SPIKE1 Signaling Complex Controls Actin-Dependent Cell Morphogenesis through the Heteromeric WAVE and ARP2/3 Complexes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2008 – 105, № 10. – P. 4044–4049.
 52. Виноградова О.С. Певні характеристики рослин визначають збільшення кількості цукру для виробництва біопалива // *Біотехнологія.* – 2011. – 4, № 3. – С. 103–104.
 53. Шульга С.М., Тигунова О.О., Блюм Я.Б. Лігноцелюлоза як альтернативна сировина для одержання біобутанолу // *Biotechnol. Acta.* – 2013. – 6, № 2. – P. 9–20.
 54. Виноградова О.С. Створення нових ензимів для вирощування рослин-продуцентів біопалива // *Біотехнологія.* – 2010. – 3, № 3. – С. 104–106.
 55. Ohmiya K., Sakka K., Kimura T., Morimoto K. Application of microbial genes to recalcitrant biomass utilization and environmental conservation // *J. Biosci. Bioeng.* – 2003. – 95, № 6. – P. 549–561.
 56. А.с. СССР № 1604852. Способ сбраживания крахмалосодержащей среды для получения ацетона, бутанола и этанола // Лукина Г.П., Абишев С.К., Любимова И.К. др., заявл. 13.03. 1995, опубл. 27.05.1997.
 57. Qureshi N., Li X.L., Hughes S. et al. Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum* // *Biotechnol. Prog.* – 2006. – 22, № 3. – P. 673–680.
 58. Kobayashi G., Eto K., Tashiro Y. et al. Utilization of excess sludge by acetone-butanol-ethanol fermentation employing *Clostridium saccharoperbutyl-aceticum* N 1-4 (ATCC 13564) // *J. Biosci. and Bioeng.* – 2005. – 99, № 5. – P. 517–519.
 59. Campos E.J., Qureshi N., Blaschek H.P. Production of acetone butanol ethanol from degermed corn using *Clostridium beijerinckii* BA101 // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2002. – 98–100. – P. 553–561.
 60. Qureshi N., Ezji T.C. Butanol, ‘a superior biofuel’ production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology // *Biofuels, Bioproduct and Biorefining.* – 2008. – 2, № 4. – P. 319–330.
 61. Huang Y.L., Mann K., Novak J.M., Yang S.-T. Acetic acid producing from fructose by *Clostridium formicoaceticum* immobilized in a fibro-bed bioreactor // *Biotechnol. Progr.* – 2008. – 14, № 5. – P. 800–806.
 62. Shang-Tian Y., Ramey D. Final Report: A novel fermentation process for butyric acid and butanol production from plant biomass. – U.S. Department of Energy Morgantown – WV, 2005. – 103 p.
 63. Akin D.E. Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass // *Biofuels, Bioproduct and Biorefining.* – 2008. – 2, № 4. – P. 288–303.
 64. International patent US 20100064746. Conversion system for biomass / Medoff M. – Filed 20.06.2007; Publ. 18.03.2010.
 65. Bruant G., Levesque M.-J., Peter C. et al. Genomic analysis of carbone monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* Strain p7^T // *Plos ONE.* – 2010. – 5, № 9. – P. 1–12.
 66. Pietruszka M., Pielech-Przybylska K., Stanislá J., Szopa W. Synthesis of higher alcohols during alcoholic fermentation of rye mashes // *Food Chem. and Bio-*

- technol. – 2010. – **74**, № 1081. – P. 51–64
67. *International patent US 4649112. Utilization of xylan and corn fiber for direct fermentation by clostridium acetobutylicum / Data R., Lemmel S.A. – Filed 11.10.1984; Publ. 10.05.1987.*
 68. *French patent 2559160. Acetone and butanol by fermentation of inulin / Blanchet D., Marchal R., Vandecasteele J. P. – Filed 02.06.1984; Publ. 08.09.1985.*
 69. *Лукина Г.П., Ежова И.Е., Гуськова Н.П. Способ повышения выхода н-бутанолового спирта в ацетонбутиловом производстве // Микробиологическая промышленность. – 1983. – 6. – С. 37–38.*
 70. *Jensen T.L., Kvist Th., Mikkelsen M.J., Westermann P. Production of 1,3-PDO and butanol by a mutant strain of *Clostridium pasteurianum* with increased tolerance towards crude glycerol // AMB Express. – 2012. – 2, № 44. – P. 1–7.*
 71. *Любимова И.К., Великая М.А., Лукина Г.В. и др. Биосинтез растворителей мутантами *Clostridium acetobutylicum*, устойчивыми к 2-дезоксид-Д-глюкозе // Биотехнология. – 1993. – 8. – С. 10–12.*
 72. *Патент 2080382. Штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* – продуцент н-бутилового спирта и ацетона / Лукина Г.П., Абилов С.К., Ежова И.Е. и др., заявл.: 13.03.1995; опублик. 27.05.1997.*
 73. *Kourkouta Y., Bekatorou A., Banat I.M. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review // Food microbiol. – 2004. – 21. – P. 377–397.*
 74. *Huang Y., Yang S.-T. Acetate production from whey lactose using co-immobilized cell of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor // Biotechnol. Bioeng. – 1998. – 60, № 4. – P. 498–506.*
 75. *Talabardon M., Schwitzgubel J.-P., Peringer P., Yang S.-T. Acetic acid production from lactose by an anaerobic thermophilic coculture immobilized in a fibrous-bed bioreactor // Biotechnol. Prog. – 2000. – 16, № 6. – P. 1008–1017.*
 76. *Lee S.Y., Mermelstein L.D., Papoutsakis E.T. Determination of plasmid copy number and stability in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // FEMS Microbiol. Lett. – 1993. – 108, № 3. – P. 319–323.*
 77. *Nolling J., Breton G., Omelchenko M.V. et al. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum* // J. Bacteriol. – 2001. – 183, № 16. – P. 4823–4838.*
 78. *Mermelstein L.D., Papoutsakis E.T. In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage w3TI methyl-transferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // Appl. Environ. Microbiol. – 1993 – 59. – P. 1077–1081.*
 79. *Tummala S.B., Welker N.E., Papoutsakis E.T. Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – 65. – P. 3793–3799.*
 80. *Feustel L., Nakotte S., Durre P. Characterization and development of two reporter gene systems for *Clostridium acetobutylicum* // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 70. – P. 798–803.*
 81. *Green E.M., Bennett G.N. Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1996. – 57–58. – P. 213–221.*
 82. *Green E.M., Boynton Z.L., Harris L.M. et al. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // Microbiology. – 1996. – 142. – P. 2079–2086.*
 83. *Harris L.M., Welker N.E., Papoutsakis E.T. Northern, morphological, and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // J. Bacteriol. – 2002. – 184. – P. 3586–3597.*
 84. *Nair R.V., Green E.M., Watson D.E. et al. Regulation of the sol locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor // J. Bacteriol. – 1999. – 181. – P. 319–330.*
 85. *Heap J.T., Pennington O.J., Cartman S.T. et al. The clostron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium* // J. Microbiol. Meth. – 2007. – 70. – P. 452–464.*
 86. *Mohr G., Smith D., Belfort M., Lambowitz A.M. Rules for DNA targetsite recognition by a lactococcal group II intron enable retargeting of the intron to specific DNA sequences // Genes Dev. – 2000. – 14. – P. 559–573.*
 87. *Karberg M., Guo H., Zhong J. et al. Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria // Nat. Biotechnol. – 2001. – 19. – P. 1162–1167.*
 88. *Mermelstein L.D., Welker N.E., Bennett G.N., Papoutsakis E.T. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // BioTechnology. – 1992. – 10. – P. 190–195.*
 89. *Nair R.V., Papoutsakis E.T. Expression of plasmid-encoded aad in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production // J. Bacteriol. – 1994. – 176. – P. 5843–5846.*
 90. *Harris L.M., Blank L., Desai R.P. et al. Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated solR gene // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – 27. – P. 322–328.*
 91. *Thormann K., Feustel L., Lorenz K. et al. Control of*

- butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation // J. Bacteriol. – 2002. – **184**. – P. 1966–1973.
92. Scotcher M.C., Bennett G.N. SpoIIE regulates sporulation but does not directly affect solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // J. Bacteriol. – 2005. – **187**. – P. 1930–1936.
 93. Desai R.P., Nielsen L.K., Papoutsakis E.T. Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints // J. Biotechnol. – 1999. – **71**. – P. 191–205.
 94. Tomas C.A., Welker N.E., Papoutsakis E.T. Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – **69**. – P. 4951–4965.
 95. Tomas C.A., Bonarius H., Alsaker K. et al. DNA-array based transcriptional analysis of *Clostridium acetobutylicum* sporulation (SK01) and degenerate (M5) mutants // J. Bacteriol. – 2003. – **185**. – P. 4539–4547.
 96. Borden J.R., Papoutsakis E.T. Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for *Clostridium acetobutylicum* // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – **73**. – P. 3061–3068.
 97. Alper H., Moxley J., Nevoigt E. et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production // Science. – 2006. – **314**. – P. 1565–1568.
 98. Nair R.V., Bennett G.N., Papoutsakis E.T. Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // J. Bacteriol. – 1994. – **176**. – P. 871–885.
 99. Harris L.M., Desai R.P., Welker N.E., Papoutsakis E.T. Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: Need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? // Biotechnol. Bioeng. – 2000. – **67**. – P. 1–11.
 100. Tummala S.B., Junne S.G., Papoutsakis E.T. Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcoholic Clostridium acetobutylicum fermentations // J. Bacteriol. – 2003. – **185**. – P. 3644–3653.
 101. Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., Howard S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production // Afr. J. Biotechnol. – 2003. – **2**, № 12. – P. 602–619.
 102. Ren Z., Ward T.E., Logan B.E., Regan J.M. Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic Clostridium species // J. Appl. Microbiol. – 2007. – **103**, № 6. – P. 2258–2266.
 103. Березина О.В. Целлюлазная и гемицеллюлазная активности сольвентогенных клостридий // Биотехнология будущего : Сб. статей в рамках Международ. симпоз. «ЕС – Россия: перспективы сотрудничества в области биотехнологии в 7-й Рамочной Программе». – М.: ОАО Авиаиздат, 2006. – С. 4–5.
 104. Ястремская Л.С., Васильченко О.А. Селекция анаэробного целлюлолитического термофильного штамма *Clostridium thermocellum* 5CT // Биотехнология. – 2011. – **4**, № 2. – С. 80–85.
 105. Atsumi S., Cann A.F., Connor M.R. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production // Metab. Eng. – 2008. – **10**, № 6. – P. 305–311.
 106. Steen E.J., Chan R., Prasad N. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol // Microb. Cell Factor. – 2008. – **7**, № 36. – P. 1–8.
 107. Liu S., Bischoff K.M., Qureshi N. et al. Functional expression of the thiolase gene thl from *Clostridium beijerinckii* P260 in Lactococcus lactis and Lactobacillus buchneri // N Biotechnol. – 2010. – **27**, № 4. – P. 283–288.
 108. Shen C.R., Lan E.I., Dekishima Y. et al. High titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli* enabled by driving forces // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – **10**. – P. 1–47.
 109. Qureshi N., Blaschek H.P. Production of acetone butanol ethanol (ABE) by a hyper-producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA 101 and recovery by pervaporation // Biotechnol. Prog. – 1999. – **15**. – P. 594–602.
 110. Qureshi N., Blaschek H.P. Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA 101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2000. – **84–86**. – P. 225–235.
 111. Izak P., Schwarz K., Ruth W. et al. Increased productivity of *Clostridium acetobutylicum* fermentation of acetone, butanol, and ethanol by pervaporation through supported ionic liquid membrane // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – **78**. – P. 597–602.
 112. Qureshi N., Blaschek H.P. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping // Renewable Energy. – 2001. – **20**. – P. 557–564.
 113. Maddox I.S., Qureshi N., Roberts-Thomson K. Production of acetone–butanol–ethanol from concentrated substrate using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process // Process Biochem. – 1995. – **30**(3). – P. 209–215.
 114. Ezeji T.S., Qureshi N., Blaschek H.P. Production of

- butanol by *Clostridium beijerinckii* BA 101 and in situ recovery by gas stripping // Word. J. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – **19**. – P. 595–603.
115. Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P. Acetone-butanol-ethanol (ABE) production from concentrated substrate: Reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – **63**. – P. 633–658.
116. Evans P.J., Wang H.Y. Enhancement of butanol formation by *Clostridium acetobutylicum* in presence of decanol-oleyl alcohol mixed extractants // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – **54**, № 7. – P. 1662–1667.
117. Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P. Bioproduction of butanol from biomass: From genes to bioreactors // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – **18**. – P. 220–227.
118. Ecket G., Schugerl K. Continuous acetone-butanol production with direct product removal // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1987. – **27**. – P. 221–228.

Поступила 28.05.13