

ВИКОРИСТАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ
В ТЕХНОЛОГІЇ БРОДІННЯ

Данілова К. О.¹, к.т.н., с.н.с., заст. зав. відділом,
<https://orcid.org/0000-0001-6204-9975>

Олійничук С. Т.¹, д.т.н., с.н.с., гол. наук. співр.,
<https://orcid.org/0000-0002-2885-6754>

Грушецький Р. І.¹, д.т.н., с.н.с., зав. відділом,
<https://orcid.org/0000-0002-1513-4015>

¹Інститут продовольчих ресурсів НААН, Київ, Україна

<https://doi.org/10.31073/foodresources2020-15-10>

Собівартість біотехнологічної продукції, зокрема етилового спирту, залежить від таких факторів, як вихід продукції з одиниці сировини і витрат енергоресурсів. Збільшення фізіологічної активності дріжджів-продуцентів етилового спирту шляхом іммобілізації сприяє оптимізації цих факторів. Іммобілізація клітин – це процес, який використовується для закріплення клітини на твердому носії з метою підвищення ефективності їх використання. Мета роботи – обґрунтування процесу зброджування цукровмісної сировини в біоетанол ферментними системами іммобілізованих клітин *Saccharomyces cerevisiae* з багаторазовим використанням дріжджової біомаси. Проведення скринінгу носіїв для іммобілізації дріжджових клітин показало ступінь іммобілізації клітин на рівні 89,7%, 71,4% та 78,7% для насадки на основі полівінілового спирту, делігніфікованої целюлози сорго та часточок стебла сорго, відповідно. З урахуванням вартості носія та простоти його використання найбільш перспективним носієм для іммобілізації дріжджових клітин визначено частки стебла цукрового сорго. Найвищий відсоток адсорбованих клітин на носії був при використанні дріжджів, вирощених на м'ясному суслі концентрацією 12 % СР. Дослідження ефективності асиміляції цукрів іммобілізованими дріжджами в залежності від швидкості розбавлення середовища показали, що за низьких значень швидкості асиміляція цукрів становить 73%, однак вихід етилового спирту зменшується і становить 96-98%. Зі зростанням кількості цукрів в середовищі та скороченні терміну його перебування в реакторі рівень асиміляції цукрів дріжджовими клітинами знижується і за швидкості 0,19 становить всього 46% від введеного цукру. За умови швидкості розбавлення середовища на рівні 0,1-0,13 досягається стан системи, за якого не відбувається надмірного виносу клітин з середовища, при цьому ефективність ферментації цукрів в етанол є оптимальною. За рахунок іммобілізації дріжджів на твердому носії зменшується їх приріст у порівнянні з вільними клітинами, а швидкість споживання зброджуваних цукрів збільшується. Це сприяє збільшенню виходу спирту за рахунок зменшення витрат цукрів на синтез біомаси.

Ключові слова: іммобілізація, м'ясне сусло, дріжджі, стебло цукрового сорго, швидкість розбавлення середовища, асиміляція цукрів, етанол

USE OF IMMOBILIZED MICROORGANISMS IN FERMENTATION TECHNOLOGY

Kateryna Danilova¹, PhD, Sen. Res., Deputy Head Department
<https://orcid.org/0000-0001-6204-9975>

Serhii Oliynichuk¹, D-r of Science, Sen. Res., Chief Researcher
<https://orcid.org/0000-0002-2885-6754>

Roman Grushetskiy¹, D-r of Science, Sen. Res., Head of Department,
<https://orcid.org/0000-0002-1513-4015>

¹Institute of Food Resources NAAS, Kyiv, Ukraine

<https://doi.org/10.31073/foodresources2020-15-10>

*The biotechnological production cost, in particular ethanol, depends on such factors as the product yield per unit of raw material and energy consumption. Increasing the physiological activity of ethanol yeast-producers by immobilization helps to optimize these factors. Immobilization of cells is the process of fixing cells on a solid medium in order to increase the efficiency of their use. The purpose of the work is to reasoning the fermentation process of sugar-containing raw materials in bioethanol by enzyme systems of immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* with repeated use of yeast biomass. Screening of medium for yeast cell immobilization showed the degree of cell immobilization at 89.7%, 71.4% and 78.7% for polyvinyl alcohol nozzle, delignified cellulose of sorghum and sorghum stem particles, respectively. Considering medium cost and ease of use the most promising medium for the immobilization of yeast cells is determined by the sugar sorghum stems particles. The highest percentage of adsorbed cells on the carrier was when using yeast grown on molasses mash with concentration of 12% dry matter. Studies of the efficiency of sugars assimilation by immobilized yeast depending on the dilution rate of the medium showed that at low values of the rate sugars assimilation is 73%, but the yield of ethyl alcohol decreases and is 96-98%. With the increase in the amount of sugars in the environment and the reduction of its residence time in the reactor, the level of assimilation of sugars by yeast cells decreases and at a rate of 0.19 is only 46% of the introduced sugar. Provided the dilution rate of the medium at the level of 0.1 - 0.13, a system state is achieved, in which there is no excessive cells removal from the medium, while the efficiency of sugars fermentation into ethanol is optimal. On account of immobilization yeast cells on a solid medium, their growth decreases compared to free cells, and the rate of consumption of fermented sugars increases. This increases the yield of alcohol by reducing the cost of sugars for biomass synthesis.*

Key words: immobilization, molasses mash, yeast, sugar sorghum stems, dilution rate of the medium, sugars assimilation, ethanol

Постановка проблеми. За діючою технологією переробки цукровмісної сировини в біоетанол на кожну тисячу дал спирту вирощується 2 тонни біомаси дріжджів, які інактивуються в процесі перегонки бражки і виводяться з виробничого циклу разом з післяспиртовою бардою. На вирощування 1 тонни біомаси дріжджів витрачається 200 кг цукру. Тобто біоетанольний завод потужністю 6 тис. дал в добу продукує 12 тонн дріжджової біомаси і витрачає 2,4 тонни цукру, з якого не отримується етиловий спирт.

Серед факторів, що мають визначальний вплив на собівартість цільової біотехнологічної продукції, є її вихід з використаної сировини і питомі витрати енергоресурсів. Досягнення успіху в оптимізації кожного з цих факторів тісно пов'язане з фізіологічною активністю дріжджів-продуцентів етилового спирту, збільшення якої можна досягти шляхом іммобілізації дріжджів на різних носіях в зоні ферментації [1].

Іммобілізація клітин – це процес, який використовується для закріплення клітини на твердому носії з метою підвищення ефективності їх використання.

Мікроорганізми, зафіксовані на твердих носіях або включені до матриці за

допомогою адсорбції або механічних включень у гелі та хімічних методів є основою для розширення шляхів використання мікроорганізмів і вироблених ними біокаталізаторів (ферментів) у різних технологічних процесах за рахунок суттєвого подовження роботи біокаталізаторів у стандартних умовах.

Масштабні дослідження щодо застосування іммобілізованих клітин почали проводити ще з 70-х років ХХ століття. Так, у 1974 році японська фірма «Танабе Сейяко» здійснила промисловий синтез аспарагінової кислоти з використанням іммобілізованих клітин *Escherichia coli* та показала переваги цього методу перед синтезом за допомогою іммобілізованої аспартази чи вільних клітин [2].

Застосування іммобілізованих клітин має певні переваги як перед вільними клітинами, так і перед іммобілізованими ферментами. До таких переваг можна віднести наступні:

- зменшення затрат на виділення та очистку продуктів реакції, відділених від біомаси чи ферменту;
- відсутність затрат на виділення та очистку ферментів;
- висока стабільність ферментів в іммобілізованих клітинах;
- можливість створення безперервних та напівбезперервних автоматизованих процесів у промисловому виробництві;
- здатність до тривалої регенерації кофакторів (за використання живих іммобілізованих клітин) [2].

Є і певні труднощі, пов'язані з застосуванням даних технологій – поліферментні системи іммобілізованих клітин в процесі біотрансформації сировини дають певну кількість побічних продуктів, що не завжди є бажаним. Також слід відмітити, що за використання іммобілізованих клітин в більшості випадків потрібно підтримувати їх цілісність та життєздатність, а також утримувати в тій фазі розвитку, яка забезпечить синтез необхідних ферментів.

На даний час у світі існує досить велика кількість промислових біотехнологічних процесів, у яких використовуються іммобілізовані клітини (синтез амінокислот, органічних кислот, антибіотиків тощо) [3, 4].

Ферментативна активність іммобілізованих клітин використовується також при очищенні стічних вод, особливо від токсичних сполук [5-7].

За останні роки все більшою увагою користуються дослідження в царині технології іммобілізованих препаратів – пробіотиків [8]. Не менш важливими є і розробки щодо створення та використання біосенсорів для визначення органічних субстратів [9, 10].

У виробництві продуктів бродіння іммобілізовані клітини мікроорганізмів вже давно знайшли свою нішу і використовуються в промисловому виробництві пива та у виноробстві.

Так, компанія Miller Brewing зі США провела ряд попередніх досліджень з використанням дослідної установки Meura Delta, а також біореактором виробництва Schott Engineering з псевдозрідженим шаром [11]. Компанією Labbat Brewing Company у 2002 році запатентовано спосіб отримання пива у газліфтному біореакторі з внутрішньою циркуляцією та обмеженою подачею кисню з використанням іммобілізованих флокулюючих дріжджів [12].

Першим успішним дослідно-промисловим проектом отримання етанолу з використанням дріжджів, іммобілізованих у кальцій - альгінатному гелі було проведено Дослідницькою Асоціацією Розвитку Альтернативи Нафти (RAPAD) в Японії з участю компанії Kyowa Hakko Kogyo Co, LTD, у 1984 році [13].

Широко застосовуються дріжджі, адсорбовані на діетиламіноетил-целюлозі та делігніфікованих целюлозних матеріалах у виноробстві та пивоварінні [14].

Застосування біореакторів спочатку з використанням як носія альгінату кальцію, а пізніше керамічної підкладки «Bioceramic®» в компанії Kirin (Японія) для мультистадійного безперервного процесу зброджування дозволяє скоротити основний

процес зброджування пивного сусла до 3-5 діб [15].

У виробництві спирту та пивоварінні застосовують іммобілізовані біокаталізатори не лише з використанням сахароміцетів, а й для проведення біологічного підкислення бражки [16,17,18].

Успішне застосування іммобілізованих біокаталізаторів залежить від правильного вибору компонентів системи – методу іммобілізації, носія та типу реактора.

Метою роботи є обґрунтування процесу зброджування цукровмісної сировини в біоетанол ферментними системами іммобілізованих клітин сахароміцетів з багаторазовим використанням дріжджової біомаси. Об'єктом досліджень є технологія спиртової бражки з цукровмісної сировини з використанням іммобілізованих продуцентів спирту.

Предметом дослідження є промислові штами дріжджів – продуценти етилового спирту, середовище для культивування дріжджів, матриці для іммобілізації продуцентів.

Матеріали та методи.

Для визначення ефективності використання різних типів іммобілізуючих матриць було створено лабораторну установку (рис. 1).

Установка складається з ємності (1) з субстратом для зброджування, який через перистальтичний дозуючий насос (2) подається в скляний ферментер (3) з зафіксованим у ньому носієм з іммобілізованими дріжджами. Рідина проходить крізь шар носія, зріла бражка виводиться в прийомну колбу (5), а гази бродіння через краплевловлювач (4) та водяний затвор (6) вилучаються з процесу.

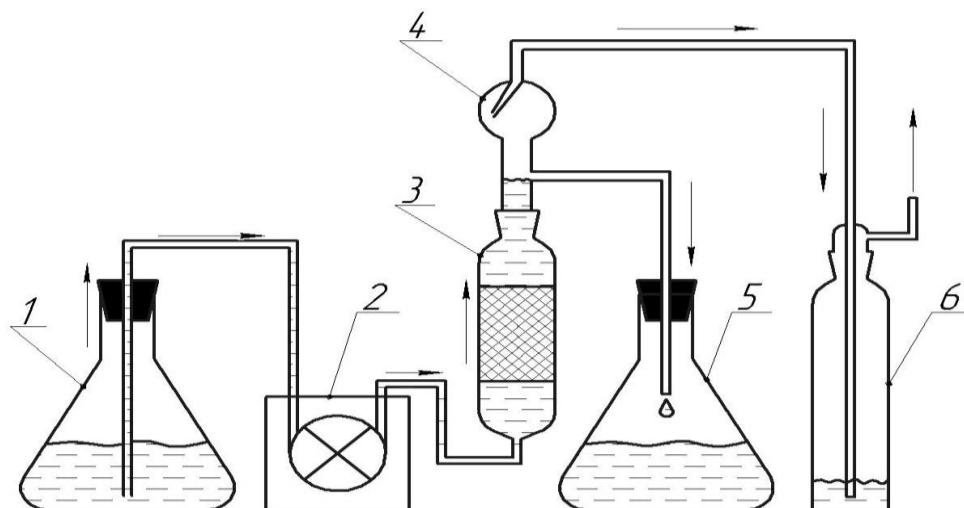


Рис. 1. Принципова схема лабораторної установки для виробництва етанолу з використанням іммобілізованих мікроорганізмів:

1 – колба з суслом; 2 – перистальтичний насос; 3 – ферментатор з сорбційним агентом;
4 – краплевловлювач; 5 – прийомна колба; 6 – водяний затвор

В якості насадок для іммобілізації мікроорганізмів використовувались такі:

- Пластикова насадка циліндричного типу (рис.2, А);
- Підкладка на основі полівінілового спирту, що являє собою пористу губку циліндричної форми (рис.2, Б);
- Носій на основі делігніфікованої целюлози, отриманої зі стебла цукрового сорго (рис. 2, В);
- Часточки стебла цукрового сорго (рис.2, Г).



А. Пластикові насадки для очистки стічних вод



Б. Пористий носій на основі ПВС



В. Делігніфікована целюлоза стебла цукрового сорго



Г. Часточки стебла цукрового сорго

Рис. 2. Сорбційні агенти для іммобілізації дріжджових клітин

Для забезпечення мікробіологічної чистоти експерименту проводилась попередня підготовка іммобілізуючих насадок:

- пластикову насадку знезаражували кип'ятінням впродовж 15-20 хв.;
- пористий носій на основі ПВС промивали дистильованою водою, потім спиртовим розчином та стерильною водою;
- делігніфіковану целюлозу цукрового сорго та подрібнені стеблі цукрового сорго кип'ятили з дистильованою водою впродовж 25-30 хв.

В роботі використовували загальноприйняті в цукровій та спиртовій промисловості методи досліджень [19].

Результати досліджень. Як продуцент спирту етилового використовували дріжджі *Saccharomycetes cerevisiae* раси К-7 (У 5007). Засівні дріжджі готували методом розведення з чистої культури в дві стадії. Для генерації дріжджів використовували стерильне мелясне сусло з концентрацією СР на рівні 17-18%, підкислене до рН 4,8, з додаванням азотного та фосфорним живленням у вигляді карбаміду та ортофосфornoї кислоти з розрахунку, відповідно, 0,1% та 0,05 % до маси наважки меляси.

Фіксування дріжджових клітин на іммобілізованому носії проводилось циклами шляхом введення мелясного сусла з культурою дріжджів у товщу носія. Ефективність закріплення клітин на носії встановлювали за співвідношенням початкового вмісту біомаси в середовищі та біомаси на виході з ферментера. Застосування пластикових насадок було визнано неефективним, оскільки фіксація дріжджів на носії була незначною, а основна їх маса накопичувалась в нижній частині ферментера. Результати досліджень зазначено в таблиці 1.

Таблиця 1

Ефективність іммобілізації дріжджів штаму K-7 на різних типах носіїв

Показник	Носій		
	Насадка на основі полівінілового спирту	Делігніфікована целюлоза стебла сорго	Стебло сорго з розміром часток 7*8*8мм
Концентрація біомаси дріжджів, г/л:			
- до іммобілізації	5,8	7,0	9,4
- після іммобілізації	0,6	2,0	2,0
Ступінь іммобілізації, %	89,7	71,4	78,7

Різниця в концентрації біомаси дріжджів до введення в ферментер для кожного типу матриці пояснюється тим, що для кожного дослідження культура розмножувалась в окремих ємностях, а час передпідготовки фіксуючої матриці варіювався залежно від сировини. Дані таблиці 1 свідчать про високу ефективність застосування обраних матриць. Всі досліджені носії володіли високою фіксуючою здатністю. Ступінь іммобілізації клітин дріжджів становив 71,4-89,7 %, залежно від іммобілізуючого агента. Висока ефективність фіксування клітин на насадці, основою якої був полівініловий спирт, частково нівелюється досить високою вартістю виготовлення. Дрібнодисперсний помел целюлози, виділеної з стебла цукрового сорго, спричиняв затримання вуглекислого газу в товщі носія та, відповідно, зменшення площі поверхні контакту фаз. Тому для іммобілізації дріжджових клітин нами рекомендовано використовувати подрібнені частки стебла цукрового сорго.

Збільшення концентрації біомаси дріжджів характеризують абсолютною (валовою) та максимальною відносною (питомою) швидкістю її розмноження μ . Для безперервного культивування важливим показником є швидкість розбавлення середовища D , яка показує частку корисного об'єму апарата, де розмножується культура дріжджів, що заповнюється свіжим середовищем впродовж 1 години. Питома швидкість розмноження залежить від концентрації субстрату чи іншого лімітуючого фактору. Однак за відсутності таких лімітуючих факторів, як вміст інгібіторів, вміст фосфорного та азотного живлення, вміст стимуляторів росту дріжджів, дріжджові клітини здатні ефективно розмножуватись навіть за досить високих концентрацій етанолу в середовищі. Відповідно, за умови безперервного зброджування саме вміст живильних речовин в суслі, а не концентрація етилового спирту буде лімітуючим фактором [2].

В досліджах використовували дріжджі, вирощені на м'ясному суслі концентрацією 12, 15, 20 % СР. Середовище з вмістом біомаси дріжджів 20–25 г/дм³ насосом прокачували через біореактор, наповнений делігніфікованою целюлозою за однакової швидкості. Після прокачування всього об'єму середовища визначали в ньому вміст біомаси. За різницею маси дріжджів у вихідному середовищі та середовищі після біореактора визначали ступінь закріплення клітин на носієві. Отримані результати представлені на рис.3.

Наведені дані свідчать, що з підвищенням концентрації сусли для культивування дріжджів зростала кількість біомаси в суслі після біореактора. Це пояснюється тим, що дріжджі, маючи від'ємний електрокінетичний потенціал, адсорбують на своїй поверхні меланоїдини з позитивним зарядом. З підвищенням концентрації сусли збільшується і ступінь адсорбції меланоїдинів і зменшується електрокінетичний потенціал дріжджів по відношенню до носія. Найвищий відсоток адсорбованих клітин був при використанні дріжджів, вирощених на суслі концентрацією 12 % СР.

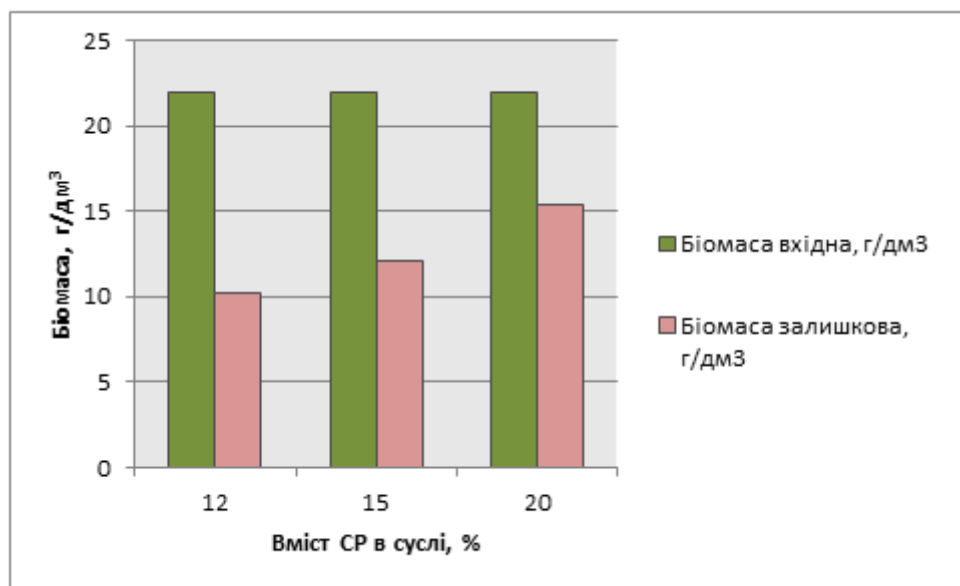


Рис. 3. Ефективність іммобілізації дріжджових клітин на носіїв за різної концентрації СР в м'ясному суслі

Наступними дослідженнями було визначено ефективність асиміляції цукрів іммобілізованими дріжджами за різної швидкості розбавлення середовища. Для проведення іммобілізації дріжджових клітин на носій використовували м'ясне сусло концентрацією 12% СР, підкислене та збагачене поживними речовинами. На початок процесу іммобілізації кількість біомаси в ньому становила 22,4 г/дм³. Іммобілізацію дріжджів на насадку проводили шляхом введення інокуляту через верхній отвір реактора в центральну його частину, прокачування субстрату проводили до отримання мінімальної кількості клітин у вихідному розчині. Закріплення дріжджів на насадці становило 86,3%.

В якості субстрату було використано сусло з концентрацією сухих речовин 24%, підкислене та збагачене поживними речовинами. Ефективність асиміляції цукрів поживного середовища за різних швидкостей розбавлення середовища відображено результатами, наведеними в таблиці 5.

Таблиця 2

Ефективність асиміляції цукрів іммобілізованими дріжджами за різної швидкості розбавлення середовища

Показник	Швидкість розбавлення середовища, год ⁻¹					
	0,04	0,07	0,10	0,13	0,16	0,19
Цукор, введений з суслом, г в годину	9,91	16,99	24,07	31,15	38,23	45,31
Незброджений цукор у вихідному розчині, г в годину	2,65	5,28	7,94	10,72	16,67	24,47
Асиміляція цукрів, % від введеного за годину	73,3	68,9	66,7	65,6	56,4	46,0
Час перебування сусла в реакторі, год	24,3	14,2	10,0	7,7	6,3	5,3
Вміст етанолу у вихідному розчині, %об.	6,80	6,50	6,50	6,30	5,40	4,40
Вихід етанолу, % до спожитого цукру	96,1	97,8	100,0	100,0	100,0	100,0
Швидкість асиміляції цукрів, г/г дріжджів за годину	0,19	0,31	0,42	0,54	0,57	0,55

З таблиці 2 видно, що за низьких значень швидкості розбавлення середовища асиміляція цукрів є досить високою – до 73,3% при 0,04. Зі зростанням кількості цукрів в середовищі та скороченні терміну його перебування в реакторі рівень асиміляції цукрів дріжджовими клітинами знижується і за швидкості розбавлення середовища 0,19

становить 46,0 % від введеного цукру. Однак, за низьких показників швидкості розбавлення середовища вихід етилового спирту становить 96,1 – 97,8 % від розрахованого за кількістю спожитого цукру. Це свідчить про те, що за швидкості розбавлення середовища 0,04 та 0,07 створюються оптимальні умови для накопичення додаткової біомаси, що, в свою чергу, знижує вихід спирту.

З підвищенням швидкості розбавлення середовища в реакторі з іммобілізованими дріжджами до 0,19 час перебування в реакції скорочується в 4,6 разів, а асиміляція цукрів знижується в 1,6 разів у порівнянні з швидкістю розбавлення 0,04. Це свідчить про більш високу продуктивність 1г біомаси в іммобілізованому стані.

Таким чином можна стверджувати, що при зброджуванні сусла з вмістом 24% СР на основі цукровмісної сировини рівноважний стан в середовищі досягається за швидкості розбавлення середовища 0,10-0,13 в одному реакторі. При цьому повнота асиміляції цукрів становить 65,6-66,7%, тому для повноти зброджування сировини необхідне встановлення доброджувачів.

Дані щодо виносу клітин в процесі зброджування мелясного сусла в реакторі з іммобілізованими дріжджами наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Виніс клітин дріжджів за різної швидкості розбавлення середовища

Показник	Швидкість розбавлення середовища, год ⁻¹					
	0,04	0,07	0,10	0,13	0,16	0,19
Загальна кількість клітин у вихідному розчині, млн./см ³	15,6	14,4	5,2	3,4	5,9	8,8
Кількість мертвих клітин, % до загальної кількості винесених	0,5	0,4	0,8	1,1	5,4	5,6
Кількість клітин, що брунькуються, % до загальної кількості винесених	24,8	12,9	5,3	2,1	0,5	0,0

З даних таблиці 3 видно, що за швидкості розбавлення середовища на рівні 0,04 та 0,07 виніс клітин з середовища є досить високим, що можна пояснити більшим приростом дріжджів на сорбційній поверхні. При цьому кількість мертвих клітин становить 0,5 – 0,4 % від винесених, а кількість клітин, що брунькуються, 24,8 та 12,9 %, відповідно. Можна стверджувати, що така швидкість розбавлення середовища сприяє нарощуванню біомаси в реакторі, що призводить до неможливості закріплення нових клітин на носіїві та зростанню виносу клітин з поживним середовищем.

Збільшення ж швидкості розбавлення середовища до рівня 0,16 та вище не дає можливості для нарощення біомаси, однак за таких умов дріжджі не встигають максимально асимілювати поживні речовини, кількість мертвих клітин у вихідному середовищі зростає.

Висновки. Проведення скринінгу носіїв для іммобілізації дріжджових клітин показало ступінь іммобілізації клітин на рівні 89,7%, 71,4% та 78,7% для насадки на основі ПВС, делігніфікованої целюлози сорго та часточок стебла сорго, відповідно. З урахуванням вартості носія та простоти його використання найбільш перспективним носієм для іммобілізації дріжджових клітин сахароміцетів визначено частки стебла цукрового сорго. З підвищенням концентрації мелясного сусла для культивування зростала кількість біомаси дріжджів в суслі після біореактора. Найвищий відсоток адсорбованих клітин був при використанні дріжджів, вирощених на суслі концентрацією 12 % СР. Дослідження ефективності асиміляції цукрів іммобілізованими дріжджами в залежності від швидкості розбавлення середовища показали, що за низьких значень швидкості асиміляція цукрів становить 73%, однак вихід етилового спирту зменшується і становить 96-98%. Зі зростанням кількості цукрів в середовищі та скороченні терміну його

перебування в реакторі рівень асиміляції цукрів дріжджовими клітинами знижується і за швидкості 0,19 становить всього 46% від введенного цукру. Встановлено, що за швидкістю розбавлення середовища 0,04-0,07 відбувається нарощування біомаси дріжджів реакторі, що призводить до неможливості закріплення нових клітин на носіїв. Збільшення ж швидкості розбавлення середовища до рівня 0,16 та вище не дає можливості для нарощення біомаси, однак за таких умов дріжджі не встигають максимально асимілювати поживні речовини. За умови швидкості розбавлення середовища на рівні 0,1-0,13 досягається стан системи, за якого не відбувається надмірного виносу клітин з середовища, при цьому ефективність ферментації цукрів в етанол є оптимальною.

Таким чином, за рахунок іммобілізації дріжджів на твердому носії зменшується їх приріст у порівнянні з вільними клітинами, а швидкість споживання зброджуваних цукрів збільшується. Це сприяє збільшенню виходу спирту за рахунок зменшення витрат цукрів на синтез біомаси.

Бібліографія

1. Грушецький Р. І., Олійнічук С. Т., Данілова К. О. Актуальні напрямки розвитку спиртової галузі в умовах приватизації. *Продовольчі ресурси*. 2020. №14. С.61-67.
2. Синицын А. П., Райнина Е. И., Лозинский В. И., Спасов С. Д. Имобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1994. 288 с.
3. Герасименко В. Г., Герасименко М. О., Цвіліховський М. І. Біотехнологія: Підручник; За ред. В.Г. Герасименка. К.: Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
4. Stasiak-Różańska L., Błażej S., Miklaszewska A. Application of Immobilized Cell Preparation Obtained from Biomass of Gluconacetobacter Xylinus Bacteria in Biotransformation of Glycerol to Dihydroxyacetone. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2011, 10(1). P. 35-49
5. Козар М. Ю., Щурська К. О., Саблій Л. А., Кузьмінський Є. В. Очищення стічних вод солодового заводу з одержанням біоводню. *Восточно-Европейский журнал передовых технологий*. 2013. №10(66). С.33-36
6. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Волошина И. Н., Гречирчак Н. Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2005. Т. 41, № 1. С. 58-63.
7. Саблій Л. А., Кузьмінський Є. В., Жукова В. С., Бляшина М. В. Технологія біологічного очищення стічних вод української антарктичної станції «Академік Вернадський». *Український антарктичний журнал*. 2014. № 13. С.281-287.
8. Старовойтова С.О. Сучасні аспекти технології іммобілізованих пробіотиків. *Biotechnologia Acta*. 2012. Т. 5, № 4. С. 9-20.
9. Каленюк Г. О., Тарасенко Ю. О., Геращенко І. І. Мікробні амперометричні сенсори для детектування етанолу та глюкози. *Поверхность*. 2015. 7. С. 329-339.
10. Пилипенко Л. М., Данилова О. І., Пилипенко І. В., Гайдукевич Д. К. Біосенсори в контролі якості харчових продуктів. *Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій*. 2014. Вип. 46(2). С. 251-255.
11. Samejima H., Nagashima M., Azuma M., Noguchi S. and Inuzuka K. Semicommercial Production of Ethanol Using Immobilized Microbial Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1984. 434. P. 394-405.
12. Ronnie Willaert Beer production using immobilised cell technology. *Minerva Biotechnologica*. 2000. 12(4). P. 319-330.
13. Farshid Ghorbani, Habibollah Younesi, Abbas Esmaeili Sari, Ghasem Najafpour, Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*. 2011. V. 36 (2). P. 503-509.
14. Fei Shen, Yongmei Zeng, Shihuai Deng, Ronghou Liu (2011) Bioethanol production from sweet sorghum stalk juice with immobilized yeast. *Procedia Environmental Sciences*. 11. P. 782-789
15. Патент US5070019A. Hill Frank Huels. Immobilization of yeast in alginate beads for

production of alcoholic beverages. Заявник і патентовласник Chemische Werke AG; Опубл. 03.03.1991.

16. Патент US5869117A Immobilized-cell carrageenan bead production and a brewing process utilizing carrageenan bead immobilized yeast cells / Ronald James Neufeld, Denis J. C. M. Poncelet, Sylvain D. J. M. Norton Заявник: Labatt Brewing Company Limited, опубл. 09.02. 1999

17. Vucurovic Vesna M., Razmovsky Radojka N. Ethanol fermentation of molasses by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized onto sugar beet pulp. *Acta periodica technologica*. 2012.4. P. 325-332.

18. Hairui Ji, Jianliang Yu, Xu Zhang, Tianwei Tan. Characteristics of an immobilized yeast cell system using very high gravity for the fermentation of ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. 168. P. 21

19. Польшалина Г.В. Технохимический контроль спиртового и ликеро-водочного производства. Москва: Колос, 1999. 334 с.

References

1. Grushetskij R., Olijnicuk S., Danilova K. (2020). Aktualni napryamky rozvytku spyrtovoj galuzi v umovah privatizatsij [Actual directions of alcohol industry development in the conditions of privatization] *Prodovolchi Resursy* [Food Resources].14, P.61-67.

2. Sinitsyn, A., Rainina, E., Lozinskij, V., Spasov, S. (1994) Immobilizovannye kletki mikroorganizmov. [Immobilized cells of microorganisms]. Moscow: Izd-vo MGU. 288 p. [in Russian].

3. Gerasymenko V.(Ed), Gerasymenko M., Tsviliovskij M. (2006) *Biotehnologiya* [Biotechnology]. Kyiv: INKOS. 647 p. [in Ukraine].

4. Stasiak-Róžańska L., Błażej S., Miklaszewska A. (2011) Application of Immobilized Cell Preparation Obtained from Biomass of *Gluconacetobacter Xylinus* Bacteria in Biotransformation of Glycerol to Dihydroxyacetone, *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 10(1), P. 35-49

5. Kozar M., Schurska K., Sablii L., Kuzminskij E. (2013) Ochyschennya stichnyh vod solodovogo zavodu z oderghannyam biovodnyu [Purification of wastewater of malt factory with biohydrogen production] *Vostochno-evropeiskij zhurnal peredovyh tehnologij* [East-Vest Journal of advanced technology]. 10(66), P. 33-36 [in Ukraine].

6. Pirog T., Shevchuk T., Voloshina I., Grechirchak N. (2005) Ispolzovanie immobilizovannyh na keramzite kletok nefteokislyayushhikh mikroorganizmov dlya ochistki vody ot nefi [Use of immobilized on the expanded clay cells of oil-oxidizing microorganisms for purification of water from oil] *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology]. 41(1). P. 58-63 [in Russian].

7. Sablii L., Kuzminskii E., Ghukova V., Blyashyna M. (2014) Tehnologiya biologichnogo ochyshchennya stichnyh vod ukrayinskoyi antarktychnoyi stanczii “Akademik Vernadskii” [Technology of biological purification of wastewater for Ukrainian antarctic station “Akademik Vernadskii”] *Ukrayinskij antarktychnyj zhurnal* [Ukrainian Antarctic Journal]. 13. H.281-287. [in Ukraine].

8. Starovoitova S. (2012) Suchasni aspekty tehnologij immobilizovanyh probiotykv [Modern aspect technology of Immobilized probiotic]. *Biotechnologia Acta*. 5(4). P. 9-20. [in Ukraine].

9. Kalenyuk O., Tarasenko Yu., Geraschenko I. (2015) Mikrobni amperometrychni sensory dlya detektuvannya etanolu ta glyukozy [Microbial amperometric sensors for detection of ethanol and glucose] *Poverhnost* [Surface].7. P.329-339 [in Ukraine].

10. Pylypenko L., Danylova O., Pylypenko I., Gayidukevich D. (2014) Biosensory v kontroli yakosti harchovyh produktiv [Biosensors of quality control of food products] *Naukovi praczi Odeskoyi naczionalnoyi akademiyi harchovyh tehnologiyi* [Scientific articles of Odessa National Academy of Food Products]. 46(2). P. 251-255 [in Ukraine].

11. Samejima H., Nagashima M., Azuma M., Noguchi S. and Inuzuka K. (1984) Semicommercial Production of Ethanol Using Immobilized Microbial Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 434. P. 394–405.
12. Ronnie Willaert (2000) Beer production using immobilised cell technology. *Minerva Biotechnologica*. 12(4). P. 319-330.
13. Farshid Ghorbani, Habibollah Younesi, Abbas Esmaeili Sari, Ghasem Najafpour (2011) Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*. 36(2). P. 503-509.
14. Fei Shen, Yongmei Zeng, Shihuai Deng, Ronghou Liu (2011) Bioethanol production from sweet sorghum stalk juice with immobilized yeast. *Procedia Environmental Sciences*. 11. P. 782-789.
15. Hill Frank Huels. Patent US5070019 (A) Immobilization of yeast in alginate beads for production of alcoholic beverages. Applicant and Patent Attorney Chemische Werke AG; Bjul. 03.03.1991.
16. Ronald James Neufeld, Denis J. C. M. Poncelet, Sylvain D. J. M. Norton. Patent US5869117A. Immobilized-cell carrageenan bead production and a brewing process utilizing carrageenan bead immobilized yeast cells. Applicant and Patent Attorney Labatt Brewing Company Limited; Bjul. 09.02.1999.
17. Vucurovic Vesna M., Razmovsky Radojka N. (2012) Ethanol fermentation of molasses by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized onto sugar beet pulp. *Acta periodica technologica*. 4. P. 325-332.
18. Hairui Ji, Jianliang Yu, Xu Zhang, Tianwei Tan. (2012) Characteristics of an immobilized yeast cell system using very high gravity for the fermentation of ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 168. P. 21.
19. Polygalina G. (1999) *Tehnohimicheskij control spirtovogo i likero-vodochnogo proizvodstva* [Technochemical control of alcohol and alcoholic beverage production] Moskva: Kolos. 334 p.