

**ІММОБІЛІЗАЦІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ЯК ОДИН З НАПРЯМІВ РОЗВИТКУ
БІОТЕХНОЛОГІЇ: ПЕРЕВАГИ, МЕТОДИ, НОСІЇ****Коваль О.О., н.с.***відділу технології продуктів бродіння
Інституту продовольчих ресурсів НААН, м. Київ, Україна
ORCID 0000-0003-1035-5895*<https://doi.org/10.31073/foodresources2020-14-09>

Сучасна біотехнологія іммобілізації мікроорганізмів бере участь у вирішенні актуальних проблем в багатьох сферах – біосинтезі цільових продуктів, створенні біосенсорів, очистці стічних вод тощо. Метою даної статті є узагальнення інформації щодо використання іммобілізованих мікроорганізмів за отримання цільових продуктів в умовах ферментації органічної сировини. Система іммобілізованих клітин здатна підвищити продуктивність процесу та застосовувати наявну біомасу повторно впродовж певної кількості циклів, знизивши таким чином затрати на виробництво кінцевого продукту. Визначено основні переваги використання іммобілізованих мікроорганізмів, описано основні способи закріплення клітин на носіїв та вимоги до них. Висвітлено переваги та недоліки використання різних типів іммобілізаційних систем в харчовій промисловості. Проведено стислий огляд прикладів успішного промислового застосування іммобілізованих мікроорганізмів у виробництві продуктів бродіння. Визначено основні критерії носіїв для іммобілізації клітин та зазначено короткий опис найбільш широко застосовуваних типів носія. Зазначено, що використання носіїв на основі целюлози є перспективним з огляду на простоту їх отримання та низьку вартість. Застосування іммобілізованих мікроорганізмів стає все більш поширеним, оскільки має істотні переваги як для виробництва цільового продукту, так і в плані екології. Однак, все більш актуальним при цьому стає питання оптимізації виробничих процесів з їх використанням. Зокрема, вирішення питань збільшення тривалості використання продуцентів, а також отримання недорогих іммобілізаційних матриць з високим терміном експлуатації сприятиме ще більш інтенсивному впровадженню технологій іммобілізованих мікроорганізмів в харчову промисловість.

Ключові слова: іммобілізація, мікроорганізми, ферментація, агенти іммобілізації, продукти бродіння

**THE IMMOBILIZATION OF MICROORGANISMS AS ONE OF THE DIRECTIONS OF
BIOTECHNOLOGY DEVELOPMENT: ADVANTAGES, METHODS, CARRIERS****Koval Olga, Research Fellow,***Department of Technology of Fermentation Products
The Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
ORCID 0000-0003-1035-5895*<https://doi.org/10.31073/foodresources2020-14-09>

Modern biotechnology of microorganisms` immobilization is engaged in solving actual problems in many areas - biosynthesis of target products, creation of biosensors, wastewater treatment, etc. The aim of this article is to summarize information on the use of immobilized microorganisms to obtain target products under conditions of fermentation of organic raw

materials. The system of immobilized cells is able to increase the productivity of the process and re-use the available biomass for a certain number of cycles, thus reducing the cost of production of the final product. The main advantages of the use of immobilized microorganisms are determined; the main methods of fixing the cells on the carrier and the requirements to them are described. The advantages and disadvantages of using different types of immobilization systems in the food industry are described. A brief overview of examples of successful industrial applications of immobilized microorganisms in the production of fermentation products is conducted. The main criteria of carriers for cell immobilization are determined and a brief description of the most widely used types of carriers is given. It is noted that the use of carriers based on cellulose is promising because of the ease of obtaining and low cost. The use of immobilized microorganisms is becoming increasingly common, as it has significant advantages both for the production of the target product and in terms of ecology. However, the issue of optimizing production processes with their use is becoming increasingly important. In particular, solving the problems of increasing the duration of use of producers as well as obtaining inexpensive immobilization matrices with a long service life will contribute to even more intensive introduction of technologies of immobilized microorganisms in the food industry.

Key words: immobilization, microorganisms, fermentation, immobilization agents, fermentation products

Постановка проблеми. Сучасна біотехнологія іммобілізації мікроорганізмів бере участь у вирішенні багатьох актуальних проблем. Система іммобілізованих клітин здатна підвищити продуктивність процесу та застосовувати наявну біомасу повторно впродовж певної кількості циклів, знизивши таким чином затрати на виробництво кінцевого продукту.

Застосування біокаталізу з використанням іммобілізованих мікроорганізмів використовують як для отримання речовин порівняно низької вартості, необхідних у великих кількостях, так і для невеликих партій сполук, вартість яких може бути високою.

Однак, незважаючи на досить солідні напрацювання, іммобілізація клітин чи їх складових і досі є одним з перспективних напрямків розвитку галузі біотехнології, зокрема у плані виробництва продуктів бродіння.

Мета статті. Узагальнити міжнародний досвід досліджень і розробок стосовно застосування іммобілізованих мікроорганізмів в харчовій, зокрема бродильній промисловості та визначити можливість їх застосування у вітчизняному виробництві.

Обговорення. На даний час у світі існує досить велика кількість промислових біотехнологічних процесів, у яких використовуються іммобілізовані клітини (синтез амінокислот, органічних кислот, антибіотиків тощо) [1, 2].

Застосування мікроорганізмів, закріплених на певних типах носіїв, можливе в різних біотехнологічних процесах, в тому числі для біотрансформації сировини та біосинтезу цільового продукту [3]. Ферментативна активність іммобілізованих клітин використовується також при очищенні стічних вод, особливо від токсичних сполук [1, 4-6].

За останні роки все більшою увагою користуються дослідження в царині технології іммобілізованих препаратів – пробіотиків [7]. Не менш важливими є і розробки щодо створення та використання біосенсорів для визначення органічних субстратів [8,9].

Переваги. Масштабні дослідження щодо застосування іммобілізованих клітин почали проводити ще з 70-х років ХХ століття.

Для іммобілізації застосовують різні види мікроорганізмів, використовуючи при цьому як живі, так і мертві, чи різною мірою пошкоджені клітини. Вибір стану клітини та способу іммобілізації обумовлений завданням дослідника, тобто який процес необхідно здійснити – одностадійний чи поліферментний, який потребує наявності одного чи кількох кофакторів [10].

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 в промисловому виробництві;
- здатність до тривалої регенерації кофакторів (за використання живих іммобілізованих клітин) [10].

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.

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 Kuowa Nakko 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 «Biosceramic®» в компанії Kirin (Японія) для мультистадійного безперервного процесу зброджування пивного сусла дозволяє скоротити основний процес бродіння до 3-5 діб (рис. 1) [15].

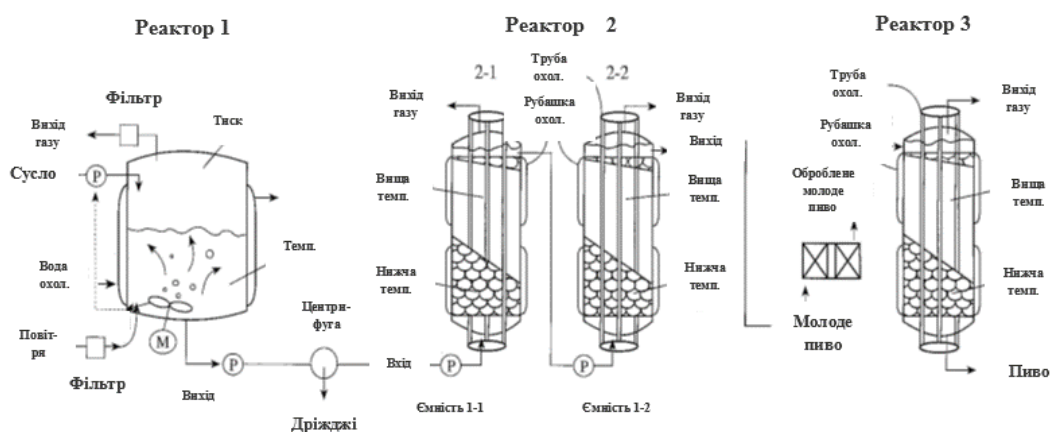


Рис. 1. Система тристадійного біореактора для безперервного процесу основного бродіння та дозрівання пива, компанія Kirin (Японія) [15].

Компанія Ozeki Corporation (Японія) застосовувала клітини дріжджів, іммобілізовані в альгінатному гелі, для виробництва саке) [15].

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

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

До методів іммобілізації застосовують певні вимоги, якими зазвичай керуються при розробці технологічного процесу, за якого будуть використовувати клітиновмісні біокаталізатори:

1. Використовуваний спосіб не повинен значною мірою зачіпати ферментативні системи клітини, необхідні для реалізації даної технології; бажано звести до мінімуму контакт з токсичними для клітини речовинами, а також запобігти небажаному впливу температурного та осмотичного стресу;

2. Бажано здійснювати іммобілізацію таким чином, щоб в результаті клітини надійно утримувались носієм;

3. Бажано, щоб працездатність стадії іммобілізації була мінімальною, як і обсяг маніпуляцій з клітинами, що є істотним для збереження стерильності;

4. Необхідна максимальна операційна стабільність біокаталізаторів, для їх тривалої експлуатації;

5. Важливим моментом є забезпечення клітин живленням та відведенням продуктів життєдіяльності, тобто носій не повинен створювати значних дифузійних перешкод для масообмінних процесів;

6. Істотною для промислового впровадження іммобілізованих біокаталізаторів є також економічна ефективність, тобто невисока вартість та доступність вихідних складових [3].



Рис. 2. Основні методи іммобілізації клітинних систем [18].

Для іммобілізації клітин запропоновано досить велику кількість методів утримання клітини в носіїві, однак основну масу їх розділяють на 4 групи, враховуючи принцип іммобілізації та природу утримуючого носія (рис. 2) – адсорбція чи прикріплення до підготовленого носія адгезією або приєднувачим агентом; фізичне вловлювання пористою

матрицею; утримування клітин за бар'єром та самоагрегація флокуляцією чи з'єднуючим агентом [18,19].

Переваги та недоліки застосування іммобілізаційних систем різних типів, що застосовуються в харчовій промисловості показано в таблиці 1.

Таблиця 1

**Характеристика іммобілізаційних систем,
застосовуваних в харчовій промисловості (за R. Willaert) [15]**

Система	Переваги	Недоліки
Утримування поверхнею	Простий, швидкий та дешевий технічний прийом	Слабкі зв'язки
	Міцний носій	Відокремлення біоплівки
		Ефлюєнт не вільний від клітин
		Складність контролю
Вловлювання пористим носієм		
- гель	Проста, м'яка техніка	Слабка механічна міцність
	Агрегати придатні до споживання	Руйнування носія продуктами реакції
	Велика кількість біомаси	Втрата клітин
		Обмеження масообміну
- підготований носій	Пряма інокуляція з основного середовища	Нижча кількість біомаси
	Більша стійкість до стискання та руйнування, ніж у гелів	Ефлюєнт не вільний від клітин
	Можливість конвекційного масопереносу	
Утримання за бар'єром		
- мікрокапсуляція	Ефлюєнт вільний від клітин	Погіршення життєздатності клітин через застосування токсичних агентів та суворих умов
- підготовлена мембрана	Можливість конвекційного масопереносу	Засмічення та поляризація мембрани
	М'яка техніка	Швидке зношування
	Ефлюєнт вільний від клітин	
Самоагрегація	Природний технічний прийом	Флокуляція важко контролюється
		Висока густина
		Лімітується низькою швидкістю розведення

Носії для іммобілізації. За останні 30 років було створено велику кількість типів матриць для іммобілізації, які включали як пористі, так і непористі сформовані матеріали, такі як деревна стружка, діатоміт, пемза, кераміка, нержавіюча сталь, пориста цегла, пористе скло, пористий силікон, діетиламіноетилцелюлоза, ПВХ стружка, поліуретанові куби, бавовна, скловолокно та ін. [15].

Агенти для іммобілізації можуть бути органічними чи неорганічними, природними, синтетичними. Використовують також комбіновані системи, тобто на підкладку з одного матеріалу наносять поверхневий шар або плівку іншого. Перевагою носіїв органічної природи є їх хімічна стабільність, можливості зміни хімічних властивостей їхньої поверхні та варіювання структури пор, можливість надання часткам носія заданої геометричної форми. Найбільш широко для іммобілізації клітин застосовуються такі полімерні носії, як

альгінат кальцію, карагінан, поліакриламід, желатин, епоксидна смола, агар, хітозан та силіказоль.

Неорганічні адсорбенти мають високу біологічну стабільність, доступні та дешеві, легко регенеруються. Природні неорганічні носії є більш крихкими, їх пористість та хімічні властивості змінюються більш важко [3].

Основні критерії до вибору основи для іммобілізації клітин мікроорганізмів:

- Здатність зберігати біокаталітичну активність клітин
- Інертність по відношенню до субстрату, елементів живлення та продуктів реакції
- Збереження фізичної цілісності та нерозчинності в умовах процесів біотрансформації
- Проникність для реагентів та продуктів реакції
- Велика питома площа поверхні на одиницю об'єму
- Високий коефіцієнт дифузії для субстратів, елементів живлення та продуктів реакції
- Забезпечення відповідного гідрофільно-гідрофобного балансу для елементів живлення, реагентів та продуктів реакції
- Стійкість до мікробної деградації та виняткова механічна стійкість
- Забезпечення хімічної та термічної стабільності за умов біотрансформації та зберігання
- Достатня еластичність для урахування росту клітин
- Наявність функціональних груп для утворення хімічних зв'язків (cross-linking)
- Безпечність для впровадження в харчові та фармацевтичні біопроцеси
- Не токсичність та наявність в достатній кількості з стійкою якістю та прийнятною вартістю
- Простота застосування в процедурах іммобілізації
- Екологічна безпечність за умов утилізації та/або придатність до повторного використання
- Ефективна система виробництва, легкість оперування та високий вихід.

У дослідженнях біотрансформації цукрів в етанол найчастіше використовуються такі агенти іммобілізації, як альгінат кальцію, карагінан, похідні целюлози, пористі носії на основі ПВС та целюлозовмісна сировина природного походження.

Альгінат кальцію (Calcium alginate), $[(C_6H_7O_6)_2Ca]_n$, – сіль альгінової кислоти, яка за хімічною будовою являє собою поліуронід, що складається з послідовно з'єднаних залишків гексуринових кислот, а саме D-мануринової та L-гулуринової, формуючи довгі ланцюги, а їх склад залежить від різновиду водоростей (дорівнює в середньому 20 ланкам) і впливає на фізичні властивості активної субстанції. Кожен іон кальцію з'єднується з двома молекулами альгінату, мол. м. розрахована на одну молекулу альгінату, тому еквівалент іона кальцію дорівнює $n=1/2$. Макромолекулярна маса змінюється від 10 000 до 600 000. Одержують унаслідок комплексної переробки бурих водоростей родини *Laminaria*. Несумісний з лугами та їх солями [20].

Альгінат кальцію здатен захоплювати дріжджові клітини і така система може бути використана для швидкої ферментації. Основна частина методик описана стосовно лабораторних умов застосування [21,22]. Для застосування в промислових масштабах основною проблемою є спосіб утворення часток, оскільки важливою частиною процесу є перемішування дріжджової суспензії та розчину альгінату натрію з наступним осадженням солями кальцію. Ефективним є застосування альгінату кальцію в якості матриці для іммобілізації є у виробництві пива, ігристих вин тощо [23].

Однак промислова установка повинна мати спеціально сконструйоване обладнання для забезпечення отримання кульок матриці. За таких умов також зростає потенційна небезпека забруднення дріжджів контамінуючою мікрофлорою, що у випадку виробництва паливного етанолу може вплинути на продуктивність.

Іншою проблемою є слабка фізична міцність кульок альгінату, що ускладнює експлуатування потужних ферментаційних колон. Третя складність – це дифузійні

обмеження, які знижують доступність субстрату до контактування з дріжджами всередині кульки. І, нарешті, у випадку забруднення системи безперервний процес припиняється і вся партія матеріалу з колони видаляється без можливості повторного використання [24].

Карагінани – сімейство лінійних сульфатованих полісахаридів, які отримують з червоних морських водоростей. Температура гелеутворення к–карагінана – від 35°C до 65 °C, ступінь гістерезису – 10-15°C. Іони калію та кальцію підвищують температуру гелеутворення [25].

Простота полімеризації к–карагінану дозволяє застосовувати його в якості носія для дріжджів у пивоварінні [26], однак без додаткової обробки його механічна міцність є незначною. Зшивка глутаровим альдегідом та обробка гексаметилендіаміном підвищує міцність носія, однак знижує життєздатність клітин [10,27].

Полівініловий спирт (ПВС) – штучний, водорозчинний, термопластичний, плівкоутворюючий полімер, що характеризується високою міцністю на розрив та гнучкістю. Ці властивості залежать від вологості повітря, оскільки полімер адсорбує вологу. Вода діє на ПВС як пластифікатор. За умов високої вологості у ПВС зменшується міцність на розрив, але збільшується пластичність [28].

В якості носія підкладки на основі полівінілового спирту мають ряд переваг, обумовлених стійкістю останнього у ферментаційному середовищі – відсутність вимивання компонентів чи небажаного розм'якшення гелевої матриці. Це дозволяє ефективно застосовувати такий носій у виробництві пива [29].

Однак тривале застосування біокатализаторів на даній основі при виготовленні ігристих вин показало погіршення хімічного складу та органолептичних властивостей вихідного продукту. також формування матриці з використанням криогенної обробки негативно впливає на життєздатність клітин дріжджів [15].

Носії на основі целюлози та її похідних. Целюлоза або полі-1,4-β-D-глюкопіранозил-D-глюкопіраноза – полімер, що відрізняється високим ступенем гідрофільності, наявність великої кількості гідроксильних груп дає можливість легко її модифікувати шляхом введення різноманітних замінників. Для посилення механічної міцності целюлозу гранують шляхом часткового гідролізу, в результаті якого руйнуються її аморфні ділянки, на місце яких для збереження пористості між кристалічними ділянками вводять хімічні зшивки [10]. Досить легко гранульована целюлоза перетворюється в різноманітні іонообмінні похідні. Так, діетиламіноетилензаміщена целюлоза, мікрочастинки якої міцно з'єднані шляхом агломерації з полістиролом пропонуються для використання в якості матриці, придатної для іммобілізації сахароміцетів [30]. Використання ліофілізованих гідроксиетилцелюлозних гелів для іммобілізації клітин *S. cerevisiae* є ефективним за періодичного способу зброджування глюкозовмісних середовищ [31].

Ще більш низьку вартість формування мають підкладки на основі недегініфікованих целюлозовмісних матеріалів, тобто залишків відходів рослинництва (стебло, качани, лушпиння тощо).

Згідно даних досліджень, такий вид матриці, як губка з люфи (*Luffa cylindrica*) є ефективним та забезпечує іммобілізацію флокулюючих дріжджів до 99% [32]. Застосування ж комбінованого носія на основі волокон люфи та альгілату кальцію було ефективним при безперервному способі зброджування суслу впродовж 30 днів без втрати в продуктивності [33].

Потенціал для використання в якості агента для іммобілізації дріжджів за зброджування цукровмісної сировини в етанол має жом цукрових буряків [34], окремі фракції стебла кукурудзи [35], часточки серцевини качана кукурудзи [36] тощо.

Поширення за останні роки, зокрема в Україні, цукрового сорго як сировини для виробництва сиропів та етанолу дозволяє звернути увагу на використання відходів його переробки (подрібненого стебла) в якості не лише твердого палива, а і як матриці для іммобілізації мікроорганізмів. Результати досліджень носіїв на основі стебла цукрового

сорго показали доцільність його використання в лабораторних умовах для зброджування соку цукрового сорго [37] та штучних цукровмісних середовищ [38].

Простота отримання та низька вартість є перевагою для використання матриць на основі целюлози та целюлозовмісної сировини в якості агента для іммобілізації.

Висновки. Можливості клітинного метаболізму дозволяють здійснювати складні синтези, трансформації, деструкції, тощо. Основною умовою оптимального перебігу процесу є підтримка цілісності і життєздатності клітин, збереження їх у тій фазі розвитку, у якій синтезуються необхідні клітинні ферменти.

За таких умов застосування іммобілізованих мікроорганізмів стає все більш поширеним, оскільки має істотні переваги як для виробництва цільового продукту, так і в плані екології. Однак, все більш актуальним при цьому стає питання оптимізації виробничих процесів з їх використанням. Зокрема, вирішення питань збільшення тривалості використання продуцентів, а також отримання недорогих іммобілізаційних матриць з високим терміном експлуатації сприятиме ще більш інтенсивному впровадженню технологій іммобілізованих мікроорганізмів в харчову промисловість.

Бібліографія

1. Герасименко В. Г., Герасименко М. О., Цвіліховський М. І. Біотехнологія: підручник. Київ. Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
2. 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 scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*. 2011. Vol. 10, No. 1. p. 35–49.
3. Синицын А. П., Райнина Е. И., Лозинский В. И., Спасов С. Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Москва. Изд-во МГУ, 1994, 288 с.
4. 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.
5. 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.
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. 41, No. № 1. с. 58-63.
7. Старовойтова С. О. Сучасні аспекти технології іммобілізованих пробіотиків. *Biotechnology Acta*. 2012. Т. 5, No. № 4. с. 9-20.
8. Каленюк Г. О., Тарасенко Ю. О., Геращенко І. І. Мікробні амперометричні сенсори для детектування етанолу та глюкози. *Поверхность*. 2015. No. 7. с. 329-339.
9. 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. т. 46, No. 2. с. 251-255.
10. Аркадьева З. А., Безбородов А. М., Егоров Н. С. Промышленная микробиология. Учебное пособие для вузов, Москва. Высшая школа, 1989, 688 с.
11. Mensour N. A., Margaritis A., Briens C. L. New developments in the brewing industry using immobilised yeast cell bioreactor systems. *Journal of the Institute of Brewing*. 1997. Vol. 103, No. 6. P. 363–370. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00965.x>.
12. Patent USA, EP1397481A2 Combination continuous/batch fermentation processes. Inventor. N. A. Mensour, P. H. Pilkington; Current Assignee Labatt Breving Co Ltd, 2002.
13. Nagashima M., Azuma M., Noguchi S., Inuzuka K., Samejima H. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 1984. Vol. 26, No. 8. P. 992–997. <https://doi.org/10.1002/bit.260260826>.
14. Willaert R. Beer production using immobilised cell technology. *Minerva Biotechnologica*.

2000. Vol. 12. P. 319–330.

15. Nedović V., Willaert R., Leskošek-Čukalović I., Obradović B., Bugarski B. Applications of cell immobilisation biotechnology / ed. V. Nedović, ed. R. Willaert. Dordrecht. Springer Netherlands, 2005. p. 259–273 https://doi.org/10.1007/1-4020-3363-X_15.

16. European Patent Application, EP 0601362 A1 Process for the production of non-alcoholic beer and device for effecting this process / Inventor: Back, Werner, W. J. Swinkels, T. T. Viljava; Current Assignee: Cultor Ltd. 1994.

17. Патент РФ, RU 2239658 C1. Способ получения биокатализатора для производства спиртосодержащих игристых напитков. И. М. Грачева, А. Л. Зубов, В. И. Лозинский, Г. И. Эль-Регистан; Патентообладатель Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН; заявл. 19.02.2003., опублик. 10.11.2004. 3 с.

18. Gallo M., Speranza B., Corbo M. R. Novel microbial immobilization techniques. Food Engineering Series. 2016. p. 35–55. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42457-6_3

19. Karel S. F., Libicki S. B., Robertson C. R. The immobilization of whole cells: engineering principles. Chemical Engineering Science. 1985. Vol. 40, No. 8. p. 1321–1354.

20. Альгинат кальцію. Фармацевтична енциклопедія. <http://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3416/kalciyu-alginat>.

21. Shen F., Zeng Y., Deng S., Liu R. Bioethanol production from sweet sorghum stalk juice with immobilized yeast. Procedia Environmental Sciences. 2011. Vol. 11. p. 782–789. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.12.120>.

22. Ghorbani F., Younesi, H. Esmaeili Sari A., Najafpour G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *saccharomyces cerevisiae*. Renewable Energy. 2011. Vol. 36, No. 2. p. 503–509. <http://10.1016/j.renene.2010.07.016>.

23. Patent USA, US5070019 (A) Immobilization of yeast in alginate beads for production of alcoholic beverages; Inventor: F. Hill; Current Assignee: Huels AG. 1991.

24. Patent USA US5079011 (A) Method using immobilized yeast to produce ethanol and alcoholic beverages; Inventor: H. Lommi, J. Ahvenainen; Current Assignee: GEA LIQUID PROCESSING SCANDINAVIA AS Danisco Finland Oy. 1992.

25. Training manual on gracilaria culture and seaweed processing in china department of aquatic products. Department of Aquatic Products, Ministry of Agriculture, China, May 1990 <http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/aquaculture/a0845t/volume2/docrep/field/003/ab730e/AB730E00.htm>.

26. Patent USA US5869117A Immobilized-cell carrageenan bead production and a brewing process utilizing carrageenan bead immobilized yeast cells Inventor: R. J. Neufeld, D. J. C. M. Poncelet, S. D. J. M. Norton; Current Assignee: Labatt Breving Co Ltd. 1999.

27. Godia F., Casas C., Castellano B., Sola C. Immobilized cells: behaviour of carrageenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 1987. Vol. 26, No. 4. p. 342–346. <https://doi.org/10.1007/BF00256666>.

28. Бойко В. В. Синтез поливинилового спирта в водно-спиртовых средах: автореф. дис. канд. хим. наук: 02.00.06 Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской Академии Наук, 2004. 20 с.

29. Bezbradica D., Obradovic B., Leskosek-Cukalovic I., Bugarski B., Nedovic V. Immobilization of yeast cells in pva particles for beer fermentation. Process Biochemistry. 2007. Vol. 42, No. 9. p. 1348–1351. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.04.009>.

30. Fujii N., Sakurai A., Onjoh K., Sakakibara M. Influence of surface characteristics of cellulose carriers on ethanol production by immobilized yeast cells. Process Biochemistry. 1999. Vol. 34, No. 2. p. 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00085-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00085-5).

31. Winkelhausen E., Velickova E., Amartei S. A., Kuzmanova S. Ethanol production using immobilized *saccharomyces cerevisiae* in lyophilized cellulose gel / // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2010. Vol. 162, No. 8. p. 2214–2220. <http://10.1007/s12010-010-8995-z>.

32. Behera S., Mohanty R. C., Ray R. C. Ethanol fermentation of sugarcane molasses by *zymomonas mobilis* mtcc 92 immobilized in luffa cylindrica l. sponge discs and ca-alginate

matrices. *Brazilian journal of microbiology*. 2012. Vol. 43, No. 4. p. 1499–507. [http: 10.1590/S1517-838220120004000034](http://10.1590/S1517-838220120004000034).

33. Bangrak P., Limtong S., Phisalaphong M. Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-reinforced alginate carriers. *Brazilian journal of microbiology*. 2011. Vol. 42, No. 2. p. 676–84. [http: 10.1590/S1517-838220110002000032](http://10.1590/S1517-838220110002000032).

34. Vucurovic V., Razmovski R. Ethanol fermentation of molasses by *saccharomyces cerevisiae* cells immobilized onto sugar beet pulp. *Acta periodica technologica*. 2012. No. 43. p. 325–333. <https://doi.org/10.2298/APT1243325V>.

35. Razmovski R., Vučurović V. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. *Fuel*. 2012. Vol. 92, No. 1. p. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.07.046>.

36. Laopaiboon L., Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice in repeated-batch fermentation by *saccharomyces cerevisiae* immobilized on corncob. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 28, No. 2. p. 559–566. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0848-6>.

37. Ariyajaroenwong P., Laopaiboon P., Jaisil P., Laopaiboon L. Repeated-batch ethanol production from sweet sorghum juice by *saccharomyces cerevisiae* immobilized on sweet sorghum stalks. *Energies*. 2012. Vol. 5, No. 4. p. 1215–1228. <https://doi.org/10.3390/en5041215>.

38. Ji H., Yu J., Zhang X., Tan T. Characteristics of an immobilized yeast cell system using very high gravity for the fermentation of ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012. Vol. 168, No. 1. p. 21–28. [http: 10.1007/s12010-011-9280-5](http://10.1007/s12010-011-9280-5).

References

1. Herasymenko V. H., Herasymenko M. O., Tsvilikhovskyi M. I. (2008). *Biotehnolohiia: pidruchnyk*. [The Biotechnology: Textbook] Kyiv. Firma «INKOS». 647 p. [In Ukrainian].

2. L. Stasiak-Róžańska, S. Błazejak, A. Miklaszewska (2011). Application of immobilized cell preparation obtained from biomass of *gluconacetobacter xylinus* bacteria in biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*. Vol. 10, No. 1. p. 35–49.

3. Sinitsyn A. P., Raynina E. I., Lozinskiy V. I., Spasov S. D. (1994). *Immobilizovannyye kletki mikroorganizmov*. [Immobilized Cells of Microorganisms] Moskva. Izd-vo MGU, 288 p. [In Russian].

4. Kozar M. Yu., Schurska K. O., Sablii L. A., KuzmInskiy E. V. (2013). Ochischennyya stichnih vod solodovogo zavodu z oderzhannyam biovodnyu. [Wastewater of a malting plant treatment to obtain biohydrogen] *Vostochno-Evropeyskiy zhurnal peredovyih tehnologiy*. №10(66). p.33-36 [In Ukrainian].

5. Sablii L. A., Kuzminskiy Ye.V., Zhukova V. S., Bliashyna M. V. (2014). *Tekhnolohiia biolohichnoho ochyshchennia stichnykh vod ukrainskoi antarktychnoi stantsii «Akademik Vernadskyi»*. [Technology of biological treatment of the Ukrainian Antarctic station "Academician Vernadsky" wastewater] *Ukrainskyi antarktychnyi zhurnal* №13. p. 281-287 [In Ukrainian].

6. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Voloshina I. N., Grechirchak N. N. (2005). Ispolzovanie immobilizovannykh na keramzite kletok nefteokislyayuschih mikroorganizmov dlya ochistki vodyi ot nefti. [Use of cells of oil-oxidizing microorganisms immobilized on expanded clay for water purification from oil] *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 41, No. № 1. p. 58-63 [In Russian].

7. Starovoitova S. O. (2012). Suchasni aspekty tekhnolohii immobilizovanykh probiotyviv. [Modern aspects of immobilized probiotics technology] *Biotechnologia Acta*. Vol. 5, No. 4. p. 9-20 [In Ukrainian].

8. Kaleniuk H. O., Tarasenko Yu. O., Herashchenko I. I. (2015). Mikrobni amperometrychni sensory dlia detektuvannia etanolu ta hliukozy [Microbial amperometric sensors for the detection of ethanol and glucose] *Poverkhnost*. No. 7. p. 329-339. [In Ukrainian].

9. Pylypenko L. M., Danylova O. I., Pylypenko I. V., Haidukevych D. K. (2014) Biosensory v kontroli yakosti kharchovykh produktiv [Biosensors in food quality control]. *Naukovi pratsi*

- Odeskoi natsionalnoi akademii kharchovykh tekhnolohii. vol. 46, No. 2. с. 251-255 [In Ukrainian].
10. Arkadeva Z. A., Bezborodov A. M., Egorov N. S. (1989). *Promyshlennaya mikrobiologiya. uchebnoe posobie dlya vuzov* [Industrial microbiology. Textbook for universities] Moskva. Vysshaya shkola. 688 p. [In Russian].
11. Mensour N. A., Margaritis A., Briens C. L. (1997). New developments in the brewing industry using immobilised yeast cell bioreactor systems. *Journal of the Institute of Brewing*. Vol. 103, No. 6. P. 363–370. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00965.x>.
12. Patent USA, EP1397481A2 (2002). Combination continuous/batch fermentation processes. Inventor N. A. Mensour, P. H. Pilkington; Current Assignee Labatt Breving Co Ltd.
13. Nagashima M., Azuma M., Noguchi S., Inuzuka K., Samejima H. (1984) Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 26, No. 8. P. 992–997. <https://doi.org/10.1002/bit.260260826>.
14. Willaert R. (2000). Beer production using immobilised cell technology. *Minerva Biotechnologica*. Vol. 12. P. 319–330.
15. Nedović V., Willaert R., Leskošek-Čukalović I., Obradović B., Bugarski B. (2005). Applications of cell immobilisation biotechnology / ed. V. Nedović, ed. R. Willaert. Dordrecht. Springer Netherlands, p. 259-273 https://doi.org/10.1007/1-4020-3363-X_15.
16. European Patent Application, EP 0601362 A1 (1994) Process for the production of non-alcoholic beer and device for effecting this process Inventor: Back, Werner, W. J. Swinkels, T. T. Viljava; Current Assignee: Cultor Ltd.
17. Patent RF, RU 2239658 S1. (2004). Sposob polucheniya biokatalizatora dlya proizvodstva spirtosoderzhaschih igristyih napitkov [The method of obtaining a biocatalyst for the production of alcoholic beverages]. I. M. Gracheva, A. L. Zubov, V. I. Lozinskiy, G. I. El-Registan; Patentobladatel Institut elementoorganicheskikh soedineniy im. A.N. Nesmeyanova RAN; zayavl. 19.02.2003., opubl. 10.11.2004. 3 s. [In Russian].
18. Gallo M., Speranza B., Corbo M. R. (2016). Novel microbial immobilization techniques. *Food Engineering Series*. p. 35–55. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42457-6_3.
19. Karel S. F., Libicki S. B., Robertson C. R. (1985) The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science*. Vol. 40, No. 8. p. 1321–1354.
20. Calcium alginate. *Pharmaceutical encyclopedia*. <http://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3416/kalciyu-alginat>.
21. Shen F., Zeng Y., Deng S., Liu R. (2011). Bioethanol production from sweet sorghum stalk juice with immobilized yeast. *Procedia Environmental Sciences*. Vol. 11. p. 782–789. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.12.120>.
22. Ghorbani F., Younesi, H. Esmaeili Sari A., Najafpour G. (2011) Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*. Vol. 36, No. 2. p. 503–509. <http://10.1016/j.renene.2010.07.016>.
23. Patent USA, US5070019 (A) (1991). Immobilization of yeast in alginate beads for production of alcoholic beverages; Inventor: F. Hill; Current Assignee: Huels AG.
24. Patent USA US5079011 (A) (1992). Method using immobilized yeast to produce ethanol and alcoholic beverages; Inventor: H. Lommi, J. Ahvenainen; Current Assignee: GEA LIQUID PROCESSING SCANDINAVIA AS Danisco Finland Oy.
25. Training manual on gracilaria culture and seaweed processing in china department of aquatic products. (1990). Department of Aquatic Products, Ministry of Agriculture, China, May <http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/aquaculture/a0845t/volume2/docrep/field/003/ab730e/AB730E00.htm>.
26. Patent USA US5869117A (1999). Immobilized-cell carrageenan bead production and a brewing process utilizing carrageenan bead immobilized yeast cells; Inventor: R. J. Neufeld, D. J. C. M. Poncellet, S. D. J. M. Norton; Current Assignee: Labatt Breving Co Ltd.
27. Godia F., Casas C., Castellano B., Sola C. (1987). Immobilized cells: behaviour of carrageenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 26, No. 4. p. 342–346. <https://doi.org/10.1007/BF00256666>.

28. Boyko V. V. (2004). Sintez polivinilovogo spirta v vodno-spirtovyih sredah: avtoref. dis. kand. him. nauk: 02.00.06. [Synthesis of polyvinyl alcohol in aqueous-alcoholic media: author's ref. dis. Cand. Chem. Science: 02.00.06] Institut sinteticheskikh polimernykh materialov im. N.S. Enikolopova Rossiyskoy Akademii Nauk, 20 p. [In Russian].
29. Bezbradica D., Obradovic B., Leskosek-Cukalovic I., Bugarski B., Nedovic V. (2007). Immobilization of yeast cells in pva particles for beer fermentation. *Process Biochemistry*. Vol. 42, No. 9. p. 1348–1351. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.04.009>.
30. Fujii N., Sakurai A., Onjoh K., Sakakibara M. (1999). Influence of surface characteristics of cellulose carriers on ethanol production by immobilized yeast cells. *Process Biochemistry*. Vol. 34, No. 2. p. 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00085-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00085-5).
31. Winkelhausen E., Velickova E., Amartei S. A., Kuzmanova S. (2010). Ethanol production using immobilized *saccharomyces cerevisiae* in lyophilized cellulose gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 162, No. 8. p. 2214–2220. <http://10.1007/s12010-010-8995-z>.
32. Behera S., Mohanty R. C., Ray R. C. (2012) Ethanol fermentation of sugarcane molasses by *zymomonas mobilis* mtcc 92 immobilized in luffa cylindrica l. sponge discs and ca-alginate matrices. *Brazilian journal of microbiology*. Vol. 43, No. 4. p. 1499–507. <http://10.1590/S1517-838220120004000034>.
33. Bangrak P., Limtong S., Phisalaphong M. (2011) Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-reinforced alginate carriers. *Brazilian journal of microbiology*. Vol. 42, No. 2. p. 676–84. <http://10.1590/S1517-838220110002000032>.
34. Vucurovic V., Razmovski R. (2012) Ethanol fermentation of molasses by *saccharomyces cerevisiae* cells immobilized onto sugar beet pulp. *Acta periodica technologica*. No. 43. p. 325–333. <https://doi.org/10.2298/APT1243325V>.
35. Razmovski R., Vučurović V. (2012). Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. *Fuel*. Vol. 92, No. 1. p. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.07.046>.
36. Laopaiboon L., Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice in repeated-batch fermentation by *saccharomyces cerevisiae* immobilized on corncob. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 28, No. 2. p. 559–566. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0848-6>.
37. Ariyajaroenwong P., Laopaiboon P., Jaisil P., Laopaiboon L. Repeated-batch ethanol production from sweet sorghum juice by *saccharomyces cerevisiae* immobilized on sweet sorghum stalks. *Energies*. 2012. Vol. 5, No. 4. p. 1215–1228. <https://doi.org/10.3390/en5041215>.
38. Ji H., Yu J., Zhang X., Tan T. (2012) Characteristics of an immobilized yeast cell system using very high gravity for the fermentation of ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 168, No. 1. p. 21–28. <http://10.1007/s12010-011-9280-5>.