

Využití imobilizovaných buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ke kontinuální výrobě ethanolu

663.13 663.5

I. Perspektivy využití

Ing. VĚRA IVANOVA, CSc.^{a)}, Doc. Ing. MOJMÍR RYCHTERA, CSc., Prof. Ing. GABRIELA BASAŘOVÁ, DrSc., Vysoká škola chemickotechnologická v Praze

Klíčová slova: imobilizované buňky, kvasinky, bakterie, ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*

Ve světovém měřítku došlo v posledních dvou desetiletích nejen k nahromadění základních teoretických poznatků o fermentační výrobě ethanolu a jeho izolaci, ale i k realizaci nových technických řešení. Částečně k tomu přispěla snaha světových monopolů zajistit výrobu náhradního energetického zdroje místo ropy. I když se trend ve vývoji tohoto směru v současné době poněkud zastavil, je orientace na ethanol jako surovinu pro chemický průmysl a jako palivo stále dost významná. Jeho největší předností je možnost levné výroby z obnovitelných a druhotných surovin. Ekonomika výroby ethanolu závisí na několika faktorech, především na vlastní surovině a její úpravě, na použitém mikroorganismu, na volbě bioreaktorového systému, na způsobu izolace ethanolu z fermentačního média a konečně na využití vedlejších a odpadních produktů.

Světový význam se zaměřuje hlavně na zvýšení produktivity fermentačních systémů a účinnosti destilačních technik (hledají se však i další vhodnější izolační metody). Dále se budeme zabývat jen první částí problému týkající se různých možností zintenzivnění fermentačních procesů. Klíčovým problémem zde zůstává stále otázka mikroorganismu, a to především jeho schopnosti tvořit ethanol vysokou rychlostí i při koncentracích nad 10 % obj. produktu. Problematika tzv. tolerance mikroorganismu k ethanolu byla diskutována i na stránkách tohoto časopisu [1]. I když možnosti genového a buněčného inženýrství jsou velké, nepodařilo se zatím tento problém pro velkoobjemovou výrobu spolehlivě vyřešit. Mikroorganismy získané těmito technikami jsou velmi náročné na podmínky a jejich provozní stabilita je většinou nízká. Proto se aplikovaný i základní výzkum zaměřuje na metody, kterými by bylo možno snížit inhibiční účinky ethanolu. Jde např. o kontinuální odstraňování ethanolu z media tak, aby jeho koncentrace nepřestoupila např. 5 % obj. Ethanol se odstraňuje odpařováním (systémy Vakuferm [2, 3], Biostil [4]), přičemž se kvasinky a medium částečně recirkulují, nebo se aplikují vhodné mikrofiltrační či ultrafiltrační membrány, které usnadní oddělení kvasinek [5, 6, 7]. Bez povšimnutí by

neměly zůstat i způsoby tzv. extraktivní fermentace, kdy se vznikající ethanol částečně odstraňuje extrakcí vhodným rozpouštědlem [8]. Zvyšování produktivity lihového kvašení se uskutečňuje především důslednou kontinuální procesy při vysokých koncentracích produkčních mikroorganismů v médiu, např. systémy firmy ALCON Biotechnol. Ltd., Hoechst AG & Uhde GmbH [9–11]. Do této skupiny výzkumu patří i imobilizované buněčné systémy. Kromě celé řady rodů a druhů kvasinek se dnes již vážně uvažuje i o použití některých bakterií, které mají větší toleranci k ethanolu a vyznačují se vysokou fermentační rychlostí. Metabolismus sacharidů u těchto mikroorganismů je různý než u kvasinek a ve většině případů i složitější, což bývá spojeno i se vznikem jiných metabolitů jako jsou např. vyšší alkoholy (1-butanol, 2,3-butandiol, 2-propanol), organické kyseliny (butanová, mravenčí, propanová, 2-hydroxypropanová), polyoly (arabitol, glycerol, xylitol), ketony (aceton), plyny (kromě oxidu uhličitého též methan, vodík) [12].

Mezi průmyslovými producenty ethanolu zaujímají hlavní místo kvasinky rodu *Saccharomyces*. Nevýhodou těchto mikroorganismů je jejich nižší účinnost při hydrolýze některých oligosacharidů a polysacharidů (např. škrobu, celulosy, inulinu aj.). Kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* mohou hydrolyzovat jen nižší dextriny [13]. K fermentaci škrobu v anaerobních podmínkách lze využít kvasinek *Saccharomyces diastaticus*, které se vyznačují α -amylasovou aktivitou (E.C.3.2.1.3) a hydrolyzují α -1,4 vazby škrobu a dextrinů, dále pak i kvasinky *Saccharomyces uvarum*, které fermentují melibiosu [14]. Nejpoužívanějšími druhy kvasinek v lihovarství jsou například *Saccharomyces cerevisiae*, v některých zemích *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces marxianus*.

Některé kvasinky se vyznačují zajímavým metabolismem pentos, při kterém vzniká jako hlavní produkt ethanol. S jejich pomocí by tedy bylo možno využít i hydrolyzáty lignocelulosových materiálů k produkci ethanolu. Sem patří např. některé mutanty *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida shehatae*, *Candida tenuis*, *Pichia stipitis*, *Pichia segobiensis* a *Pachysolen tannophilus* [14–18].

Ethanol je konečným produktem metabolismu někte-

a) nyní: Mikrobiologický ústav BAN, Sofia, BLR

rých termofilních a mesofilních striktně nebo fakultativně anaerobních bakterií, např. *Thermoanaerobium brockii* [19], *Methanobacterium thermoautotrophicum* [19], *Clostridium thermocellum* [20], *Clostridium thermohydrosulphuricum* [21] a v neposlední řadě zatím nejeperpektivnější bakterie *Zymomonas mobilis* [22–28]. Při použití termofilních kmenů je technologicky významná skutečnost, že se sníží spotřeba chladicí vody. Další výhodou je vysoká produktivita a velké spektrum využitelných substrátů. Nevýhody většiny termofilních bakterií spočívají ve větším množství již zmíněných vedlejších produktů. I metabolismus glukosy u mesofilní, fakultativně anaerobní bakterie *Zymomonas mobilis* je značně odlišný od kvasinek a je znám jako Entner-Doudoroffova dráha [29]. Tyto bakterie se vyznačují nižší produkcí biomasy a dobrou výtežností ethanolu, rostou i za anaerobních podmínek, pro produkci ethanolu nepotřebují kyslík, mají dost vysokou toleranci k ethanolu. V poslední době byly získány vysoce produktivní kmeny metodami genového inženýrství [30]. Přesto se v průmyslové praxi tento mikroorganismus zatím nepoužívá. V roce 1989 dokončil firma BioCom v USA provozní odzkoušení bakterie *Zymomonas mobilis* v objemech kolem 100 m³. Přitom se však uvažuje pouze o vsádkové fermentaci, popř. „fed-batch“, protože kontinuální systémy nejsou pro používaný kmen vhodné [31]. I při dosažení pozitivních výsledků nelze očekávat rychlé zavedení bakterií do průmyslového měřítka, protože tato změna si vyžádá značný zásah do struktury závodů. Průmyslové zkušenosti a znalosti chování těchto mikroorganismů ve vztahu k surovině nejsou zatím velké.

Další možnosti intenzifikace lihovarské výroby je třeba hledat ve využití imobilizovaných buněk produkčních mikroorganismů. Imobilizace buněk, jejich jednotlivých buněčných struktur a enzymů je v několika posledních letech jedním z nejvíce studovaných problémů v biochemii, mikrobiologii a biotechnologii. Z úspěšného vyřešení řady problémů (nosič, metoda imobilizace, mikroorganismus, bioreaktor) lze očekávat řadu ekonomicky výhodných aplikací v organické syntéze, analytické chemii, ve fermentačním průmyslu, při biotransformaci steroidů.

Imobilizované buňky mají při použití řadu výhod, přičemž však závisí na tom, jaké imobilizační techniky bylo použito. Jde hlavně o tyto přednosti:

- lze dosáhnout velkého množství buněk v jednotce fermentačního objemu (u primárních metabolitů se tak zvýší jejich produktivita),
- buňky není třeba dále oddělovat od média,
- měrná rychlost růstu mikroorganismu je prakticky konstantní (případ, kdy imobilizací dojde k zastavení růstu, není vhodný pro produkci ethanolu),
- je možno pracovat v kontinuálním režimu s velkou zředovací rychlostí bez ohrožení stability procesu,
- kontaminace systému ze suroviny prakticky neohrožuje stav imobilizovaných buněk.

Vlastnosti biokatalyzátoru s vázanými buňkami s ohledem na použití ve větším měřítku jsou určeny především způsobem imobilizace. Ten by měl být jednoduchý, zahrnující malý počet technologicky schůdných operací a poskytující dlouhodobě stabilní preparáty s vysokou specifickou aktivitou, dobrými průtokovými a mechanickými vlastnostmi, které lze dobře využít při kontinuálních výrobcích. Primárně však musí být řešena otázka vhodného mikroorganismu (a to i z hlediska imobilizace).

Je velmi obtížné komplexně srovnat jednotlivé imobilizační techniky uvažované pro danou aplikaci. V úvahu se musí brát mechanické a hydrodynamické vlastnosti částic, vliv zpracované suroviny, způsob aktivace biokatalyzátoru, jeho stabilita, chování v bioreaktoru a celá řada ekonomických kritérií.

Produkce ethanolu imobilizovanými buňkami je předmětem mnoha článků a odborných studií [např. 32–35]. Nejvíce se osvědčila metoda zabudování buněk do gelu alginátu vápenatého, carrageenanu, polyakrylamidu („entrapment“). Vliv na produkci ethanolu mají teplota, pH, hustota buněčné populace v biokatalyzátoru, koncentrace gelu, koncentrace substrátu, produktu, složení fermentačního média [36]. Produkce může být za určitých podmínek významně snížena vlivem inhibice produktem nebo i substrátem, podobně jako u volných buněk [37, 38].

Rychlost produkce ethanolu imobilizovanými buňkami nevykazuje v závislosti na pH, teplotě stejného maxima jako při použití volných buněk [32]. Uvažujeme-li nejčastější způsob imobilizace, tj. metodu entrapmentu, je nutno se na začátku zmínit o základní charakteristice systému při lihovém kvašení:

1. Životní cyklus probíhá normálně. 2. Vlivem růstu buněk a produkci oxidu uhličitého dochází k určitému narušení povrchu pelet, čímž se malá část buněk z pelet uvolňuje. 3. Pelety se při lihovém kvašení intenzivně pohybují (závisí na množství náplně v reaktoru), což je způsobeno tvorbou bublinek oxidu uhličitého na povrchu pelet, které vynášejí pelety vzhůru a po oddělení bublinek zase klesají ke dnu kolony (obrušování pelet při vzájemných srážkách). 4. Některé gely jsou stabilizovány kationty, např. alginát ionty vápníku, carrageenan ionty draslíku. Odstraněním těchto kationtů se gel rozpadá. Zvlášť v případě gelu alginátu vápenatého je třeba pečlivě kontrolovat složení média, např. z hlediska obsahu látek vázajících vápník, tj. např. fosforečnany a citráty [39]. Úplné vyloučení fosforečnanů z média při lihovém kvašení je téměř nemožné. Se vzrůstem koncentrace látek tvořících gel, např. alginát sodný, se pelety sice stávají pevnější a únik buněk je menší, ale proces je zřetelně limitován difúzí. Zvýšení koncentrace alginátu sodného má tedy za následek snížení produkce ethanolu [33]. Při zkoumání problematiky přenosu hmoty se musí brát v úvahu existence poměrně složitěho systému: rozpuštěný substrát — gel — buněčná stěna kvasinek — buněčné membrány — intracelulární struktura buněk [40, 41]. Snížená koncentrace buněk v peletách má celkem malý vliv na produkci ethanolu, protože buňky se v peletách rychle rozmnožují, a tím se udržuje téměř konstantní koncentrace buněk v gelu (rovnováha mezi růstem a uvolňováním buněk) [42]. Mikroskopické pozorování řezů pelet ukazuje, že největší hustota buněk je v blízkosti povrchu, kde je nejvyšší koncentrace substrátu. Podle některých autorů je koncentrace buněk u povrchu až desetkrát vyšší než ve středu pelet a šířka této účinné zóny je 0,5 až 1,0 mm [43]. Optimální průměr alginátových kuliček je 2 až 3 mm. Pro výrobu ethanolu pomocí vázaných buněk je nutno zhodnotit nejprve metody používané pro imobilizace kvasinkových buněk. Nejvíce je prostudována metoda zakotvení kvasinkových buněk do polymerní matrice. Při použití polyakrylamidového gelu byly experimentálně ověřeny koncentrace monomeru akrylamidu a množství buněk, které má být imobilizováno. Při polymeraci akrylamidu se tvoří lineární řetězce polymeru. Přídavek bifunkčního činidla, které má dvě nenasyčené dvojné vazby, způsobuje tvorbu příčných vazeb mezi řetězci polymeru. Stupeň zesíťování je funkcí poměru monomeru akrylamidu a bifunkčního činidla. Tato metoda je výhodná, ale při jejím použití jsou některé enzymy inaktivovány působením monomeru, bifunkčního činidla, persíranu draselného nebo teplem polymerační reakce [44].

Jiná vhodná matrice pro imobilizaci kvasinkových buněk je tvořena κ -carrageenanem (nebo jinými druhy carrageenanu), který se skládá ze strukturních jednotek β -D-galaktosulfátu a 3,6-anhydro- α -D-galaktosy. κ -carrageenan je snadno dostupný polysacharid, izolovaný z mořských řas a protože je netoxický, používá se jako potravinářská přísada. κ -carrageenan tvoří gel při chlazení jako v případě agaru nebo při styku s vodným roztokem obsahujícím kationty jako K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , dále aminy a některá organická rozpouštědla [35]. Carrageenanový materiál se vyskytuje v mnoha druzích. V potravinářském průmyslu se u nás používá gelu — carrageenan, který byl použit např. při imobilizaci bakterie *Escherichia alcalescens* pro produkci asparagové kyseliny [45] a prověřen rovněž k imobilizaci kvasinek při lihovém kvašení [46]. Jako polymerní matrice se dále používá alginát vápenatý. Alginová kyselina je polysacharid buněčných stěn velkého počtu řas, složený z jednotek uronové kyseliny spojených β -1 \rightarrow 4 glykosidickými vazbami. Uronové zbytky jsou většinou zbytky anhydro-1,4- β -D-manuronové kyseliny, ale vyskytují se i zbytky D-guluronové kyseliny. Při tvorbě polymerní matrice se používá sodná sůl alginové kyseliny, která stykem s vápenatými kationty tvoří nerozpustný gel alginátu vápenatého. Gel se tvoří za mírných podmínek,

proto je dobrým médiem pro imobilizaci celých mikrobiálních buněk, buněčných organel a enzymů. Tento biopolymer se používá často, protože je snadno dostupný, inertní, netoxický pro imobilizované buňky, poměrně stálý ve slabě kyselém a zásaditém prostředí a jeho použití je jednoduché. Problémem je negativní vliv fosforečnanů kultivačního média. Byla prokázána závislost difúze substrátu na koncentraci alginátu a na průměru pelet. Gel tvoří malou difúzní bariéru pro neutrální substráty s molekulovou hmotností do 5000. Ionť vápníku a koncentrace alginátu nemají vliv na difúzi nízkomolekulárních sloučenin, koncentrace alginátu ovlivňuje však difúzi vysokomolekulárních látek [47].

Uvažujeme-li využití imobilizovaných buněk v průmyslovém měřítku k výrobě ethanolu, pak jmenované tři gely splňují nejlépe požadavky kladené na fyzikální charakter biokatalyzátoru. Z tohoto hlediska hodnotíme jednak makroskopickou strukturu — velikost, tvar a distribuci funkčních skupin, jednak pevnost a odolnost materiálu vůči mechanickému namáhání [48]. Tyto vlastnosti ovlivňují sedimentační schopnosti suspenze biokatalyzátoru a průtokové charakteristiky kolon. Současně ovlivňují i pokles aktivity v důsledku mechanických ztrát biokatalyzátoru. Gely na bázi polyakrylamidu lze aplikovat v jakémkoliv typu reaktoru; jím se svými vlastnostmi blíží některé polymery polysacharidové, jako např. α -carageenan. Kalcium-alginátové gely, podobně jako některé gely anorganické se mohou postupně rozpouštět, což závisí na složení média.

Nejčastějším typem reaktoru pro lihové kvašení s vázanými buňkami je náplňový reaktor nebo reaktor s fluidní vrstvou [73]. Imobilizační metody vedou k vysokým měrným aktivitám biokatalyzátoru a je proto nutno zajistit i vysoký průtok média reaktorem. Jestliže u vertikálního kolonového uspořádání přivádíme médium zdola, pak zvýšením průtokové rychlosti nedochází ke zvyšování odporu vrstvy. Kolonový reaktor představuje podle stupně plnění systém s vysokou koncentrací buněk v jednotce objemu. Investiční náklady jsou podstatně nižší než u míchaných reaktorů stejného výkonu (menší objem reaktoru), kdežto provozní náklady bývají u kolonových reaktorů často vyšší. To souvisí se stabilitou náplně. Srovnání bylo provedeno s míchaným reaktorem a volnými buňkami [48].

Kromě uvedených imobilizačních technik se v literatuře uvádí ještě způsob vnitřního zpevnění např. alginátu vápenatého [49]. Tato metoda využívá inkorporace polyakrylamidu do gelu, což vede k jeho zpevnění, aniž by se snížila pórovitost povrchu. Tato metoda dává možnost gel různě tvarovat [50, 55]. Byly vyvinuty metody imobilizace na nosičích aktivovaných titanem, při nichž dochází k nahrazení OH-skupin hydroxidů titanu NH_2 -skupinami povrchu buněk [51, 52]. Na povrchu buněk byly také adsorbovány kationty Al^{3+} , které snižují negativní potenciál buněk a umožňují adhezi na sklo; ve většině případů však dochází ke snížení aktivity buněk [53, 54].

Velký počet prací se soustřeďuje na použití různých typů reaktorů, např. reaktor s porézním biokatalyzátorem [56, 57], s biokatalyzátorem získaným adsorpcí buněk na vhodném materiálu — filmový bioreaktor [58, 59, 61], fluidní bioreaktor s pěnovými a metalickými nosiči [60], horizontální bioreaktor s buňkami imobilizovanými do pektinového gelu [62] apod. Většina těchto metod imobilizace a navržené reaktory jsou většinou zatím ve stadiu laboratorních zkoušek.

Produktivita ethanolu v kolonovém reaktoru s alginátovou nebo carrageenanovou náplní se pohybují od 30 do 220 g/l.h v závislosti na použité zředovací rychlosti, typu imobilizace a na koncentraci cukru v médiu. Pro celkový přehled uvádíme tabulku produktivit ethanolu pro kontinuální systém a pro několik imobilizačních technik. Výsledky v tab. 1 jsou vztaženy na objem biokatalyzátoru v koloně.

Kromě kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *S. uvarum* byly imobilizovány i některé bakterie, především *Zymomonas mobilis*.

Z uvedeného stručného přehledu jsou patrné značné výhody využití imobilizovaných buněk pro produkci ethanolu. Provozní zkušenosti jsou zatím však malé. Vysoké produktivity dosahované v laboratorních podmínkách nemusí být dosaženy ve větších měřítkách. Japonští autoři

Tabulka 1. Produktivity ethanolu při použití různých materiálů a bioreaktorů

	Typ bioreaktoru	Produktivita [g/l.h]**	Čas provozu [dny]	Literatura
Alginát vápenatý	kolona	35,0	300	30
Alginát vápenatý	kolona	53,8	?	32
Alginát vápenatý	2 kolony	33,0	180	34
Alginát vápenatý	kolona	37,8	20	43
Alginát vápenatý + glutaraldehyd	kolona	220,0	30	63
α -karageenan	kolona	50,0	180	64, 35
α -karageenan	kolona	40,0	180	28
α -karageenan	kolona	61,5	20	65
α -karageenan	filmový bioreaktor	63,0	?	66
α -karageenan + polyakrylamid	kolona	50,5	?	50
Ultrafiltrací membrána	rotační bioreaktor	26,8	18	67
Alginát vápenatý*	kolona	57,2	?	68
α -karageenan*	kolona	53,0	?	69
Alginát vápenatý*	tříkolonový systém	98,5	?	70
Adsorpcí*	kolona	152,0	?	71
Adsorpcí*	kolona	132,0	?	36

* *Zymomonas mobilis*, v ostatních případech kvasinky rodu *Saccharomyces*

** vztaženo na objem biokatalyzátoru

popsali kontinuální fermentační systém s kvasinkami imobilizovanými do alginátu vápenatého. Dvoukolonový systém měl celkový objem 10 m³ a pracoval bez přerušování několik měsíců [34]. Kontinuální fermentační způsoby používající imobilizované buňky mohou pracovat i při zředovacích rychlostech až 11 h⁻¹ (vztaženo na objem média v reaktoru), účinná náplň reaktoru může tvořit až 75 % jeho celkového objemu a skutečná výtěžnost dosahuje za optimálních podmínek i 96 % teoretického výtěžku. Prokvašená zápara obsahuje menší množství volných buněk, což má význam při snížení spotřeby substrátu na produkci biomasy. Udržování vyšší zředovací rychlosti zvyšuje produktivitu systému. Vyšší rychlosti procesu a větší buněčná hustota umožňují práci i při slabé kontaminaci média. Nevýhoda imobilizovaných systémů spočívá v jejich přípravě a nákladech na nosič. Podle některých autorů je však proces z hlediska ekonomického až o 60 % výhodnější [72].

Klíčové problémy řešení lze shrnout do těchto bodů:

- Stabilní a levný nosič (možnost použití biokatalyzátoru až jeden rok) a biokatalyzátor.
- Vysokoprodukční mikroorganismus.
- Vysoká aktivita a stabilita biokatalyzátoru.
- Jednoduchá příprava pelet, optimální tvar.
- Vhodný typ bioreaktoru.

O výsledcích našeho výzkumu bude pojednáno v II. a III. části našeho příspěvku.

Literatura

- [1] JIRKŮ V.: Kvas. prům., 33, 1987, s. 106
- [2] RAMALINGAM E., FINN R. K.: Biotechnol. Bioeng. 19, 1977, s. 583
- [3] CYSEWSKI G. R.: Biotechnol. Bioeng. 19, 1977, s. 1125
- [4] COOK R. M.: Biostil. A process for the production of ethanol from concentrated substrates. Bio-energy 80 (Symposium), Atlanta, Georgia, 1980
- [5] CHERYAN M., MEHAIA M. A.: 8th Int. Biotechnol. Symp. Paris, July 17–22, 1988
- [6] MINIER M., GRATELOUP R., BLANC-FERRAS E., GOMA G.: 8th Intern. Biotechnol. Symp. Paris, July 17–22, 1988
- [7] RYCHTERA M., MELZOC H., MARKVICHOV N. S., BASAROVÁ G., MANAKOV M. N.: 8th Int. Biotechnol. Symp. Paris, July 17–22, 1988
- [8] MINIER M., GOMA G.: Biotechnol. Bioeng. 24, 1982, s. 1565
- [9] WÖHNER G., FAUST U., PRÄVE P.: 3rd Eur. Symp. Biotechnol., Munic 1984, Abstr. Proc., Vol. II, s. 397
- [10] FAUST U., PRÄVE P., SCHLINGMANN M.: Process Biochem May/June 1983, s. 31
- [11] KOSARIC N., WIECZOREK A., COSENTINO G. P., MAGEE R. J., PRENOSIL J. E.: In „Biotechnology“, Vol. 3 [H.-J. Rehm; G. Reed; eds], Verlag Chemie Weinheim 1983, s. 277

- [12] WIEGEL J.: *Experientia* **36**, 1980, s. 1434
- [13] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A.: *Kvasinky a kvasinkovitě mikroorganismy*, ALFA Bratislava 1982, s. 54
- [14] STEWART G. G., RUSSELL I.: In „The Yeast Genetics“ (Spencer J. F. T., Spencer D., Smith A. R. W.), Springer Verlag 1983
- [15] TOIVOLA A., YARROW D., VAN DEN BOSCH E., VAN DIJKEN J. P., SCHEFFERS W. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1984, s. 1221
- [16] SUIHKO M. L., ENARI T. M.: *Biotechnol. Lett.* **3**, 1981, s. 723
- [17] DELLWEG H., DEBUS D., METHNER H., SCHULZE D., SASCHWAG J.: 5th Symp. Ind. Microbiol., W. Berlin 1982
- [18] KLEIN C., RIZZI M., SCHULZE C., DELLWEG H.: 8th Intern. Biotechnol. Symp. Paris, July 17–22, 1988
- [19] BEN-BASSAT A., LAMED R., ZEIKUS J. G.: *J. Bacteriol.* **146**, 1981, s. 192
- [20] THOMAS K. NG., BEN-BASSAT A., ZEIKUS J. G.: *J. Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1981, s. 1337
- [21] WIEGEL J., LJUNGAHL L. G.: *Arch. Microbiol.* **128**, 1981, s. 343
- [22] DAVISON B. H., SCOTT C. D.: *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 17*, 1986, s. 629
- [23] KLEIN J., KRESSDORF B., VORLOP K. D.: *ACHEMA '88 Symp.*, Frankfurt a. Main, 1988
- [24] ROGERS P. L., LEE K. J., TRIBE D. E.: *Process Biochem.* (Aug. Sept.) 1980, s. 7
- [25] AU Appl. 85/9.046, 25 Jan 1985
- [26] DOELLE H. W., MILLICHIP R., WELLS III, W.: 8th Inter. Biotechnol. Symp. Paris, July 17–22, 1988
- [27] STRANDBERG G. W., DONALDSON T. L., ARCURI E. J.: *Biotechnol. Lett.* **4**, 1982, s. 347
- [28] WADA M., KATO J., CHIBATA I.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 1979, s. 241
- [29] KROWEL P. G., GROOT W. J., KOSSEN N. W. E., VAN DER LAAN W. F. M.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **5**, 1983, s. 46
- [30] LARSSON P. O., MOSBACH K.: *Biotechnol. Lett.* **1**, 1979, s. 501
- [31] DOELLE H. W.: *soukromé sdělení* (1988)
- [32] WILLIAMS D., MUNNECKE D. M.: *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1981, s. 1813
- [33] CHIANG L. C., HSIAO Y., FLICKINGER M. C., CHEN L. F., TSAO G. T.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **4**, 1982, s. 96
- [34] NAGASHIMA M., AZUMA M., NOGUCHI S., INUZUKA K., SAMEJIMA H.: *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1984, s. 992
- [35] WADA M., KATO J., CHIBATA I.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 1981, s. 67
- [36] CHIBATA I., TOSA T.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**, 1981, s. 197
- [37] TYAGI R. D., GHOSE T. K.: *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 1982, s. 781
- [38] FURUSAKI S., SEKI M., FUKUMURA K.: *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 1983, s. 2921
- [39] BRINK L. E. S., TRAMPER J.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **8**, 1986, s. 281
- [40] KASCHE V., KAPUNE A., SCHWEGNER H.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **1**, 1979, s. 41
- [41] KASCHE V.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **5**, 1983, s. 2
- [42] BANDYOPADHYAY K. K., GHOSE T. K.: *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 1982, s. 805
- [43] LEE T. H., AHU J. C., RYU D. D. Y.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **5**, 1983, s. 41
- [44] SIESS M. H., DIVIES C.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 1981, s. 10
- [45] MAREK M., KÁŠ J., MALANIK V., PŠENIČKA I.: *Seminar on Biotechnol. in the Chem. Ind.*, Varna, 1986
- [46] MELZIOCH K.: *Kandidátská dizertační práce*, VŠCHT Praha 1988
- [47] KIERSTAN M., DARCY G., BEILLY J.: *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 1982, s. 1507
- [48] BAILEY J. E., OLLIS D. F.: In „Biochemical Engineering Fundamentals“, McGraw Hill Book Co. 1986 (Bailey J. E., Ollis D. F., eds.), s. 603
- [49] FLINK J., JOHANSEN A.: *Biotechnol. Lett.* **7**, 1985, s. 765
- [50] KUU W. Y., POLACK J. A.: *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 1983, s. 1995
- [51] CABRAL J. M. S., CARDOSO J. P., NOVAIS J. M.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **3**, 1981, s. 41
- [52] KENNEDY J. F., BAKER S. A., HUMPHREY J. D.: *Nature* **261**, 1976, s. 242
- [53] VAN HAECHT J., BOLIPOMBO M., ROUXHET P.: *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1985, s. 217
- [54] MOZES N., ROUXHET P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1985, s. 92
- [55] JOHANSEN A., FLINK J. M.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **8**, 1986, s. 145
- [56] DEL BORCHI M., CONVERTI A., PARISI F., FERRAILOLO G.: *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1985, s. 761
- [57] PARISI F., DEL BORCHI M., CONVERTI A., PEREGO P., FERRAILOLO G.: 3rd Eur. Congr. Biotechnol. Munic 1984, Abstr. Proc. FII, s. 461
- [58] JOSHI S., YAMAZAKI H.: *Biotechnol. Lett.* **6**, 1984, s. 797
- [59] SHARMA S., YAMAZAKI H.: *Biotechnol. Lett.* **6**, 1984, s. 301
- [60] BLACK G. M., WEBB C., METTEWS T. M., ATKINSON B.: *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1984, s. 134
- [61] LUENG K.-L., JOSHI S., YAMAZAKI H.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **5**, 1983, s. 181
- [62] NAVARRO A., MARANGONI H., PLAZA J., CALLIRI D.: *Biotechnol. Lett.* **6**, 1984, s. 465
- [63] SIVA R. H. et al.: *Biotechnol. Lett.* **4**, 1982, s. 359
- [64] WADA M., KATO J., CHIBATA I.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 1980, s. 275
- [65] GÓDIA F., CASAS C., SOLÀ C.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **35 B**, 1985, s. 139
- [66] MITANI Y., NISHIZAWA Y., NAGAI S.: *J. Ferment. Technol. Japan* **62**, 1984, s. 249
- [67] MARGARITIS A., WILKE C. R.: *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1978, s. 727
- [68] KLEIN J., KRESSDORF B.: 3rd Eur. Congress Biotechnol., Munic 1984, Abstr. Proc. FII, s. 375
- [69] GROTE W., LEE K. J., ROGERS P. L.: *Biotechnol. Lett.* **2**, 1980, s. 481
- [70] KLEIN J., KRESSDORF B.: *Biotechnol. Lett.* **5**, 1983, s. 497
- [71] ARCURI E. J., WORDEN R. M., SHUMATE S. E. II: *Biotechnol. Lett.* **2**, 1980, s. 499
- [72] SATO T., MORI T., TOSA T., CHIBATA I., FURUI N., YAMASHIDA K., SUNI A.: *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 1975, s. 1797
- [73] PÁCA J.: *Kvas. prům.*, **33**, 1987, s. 335

Lektoroval Ing. Miroslav Kahler, CSc.

Ivanova, V. - Rychtera, M. - Basařová, G.: Využití imobilizovaných buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ke kontinuální výrobě ethanolu. I. Perspektivy využití. *Kvas. prům.*, **35**, 1989, č. 2, s. 41–44.

V článku jsou diskutovány z teoretického i praktického hlediska současné možnosti produkce ethanolu imobilizovanými kvasinkami a bakteriemi.

Иванова, В. - Рихтера, М. - Басаржова, Г.: Использование иммобилизованных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для непрерывного производства этанола. I. Перспективы использования. *Квас. прум.*, **35**, 1989, № 2, стр. 41–44.

Работа посвящена теоретическим и практическим аспектам современных возможностей использования иммобилизованных дрожжевых и бактериальных клеток для спиртового брожения.

Ivanova, V. - Rychtera, M. - Basařová, G.: The Use of Immobilized Cells of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* for Continuous Ethanol Production. I. Prospects of Application. *Kvas. prům.*, **35**, 1989, No. 2, pp. 41–44.

Theoretical and practical viewpoints for production of alcohol by immobilized yeasts and bacteria are discussed.

Ivanova, V. - Rychtera, M. - Basařová, G.: Applikation der immobilisierten Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* bei der kontinuierlichen Äthanolproduktion. I. Perspektive der Applikation. *Kvas. prům.*, **35**, 1989, Nr. 2, S. 41–44.

Der vorliegende Artikel diskutiert aus theoretischem und praktischem Gesichtspunkt die existierende Methoden zur Alkoholproduktion bei Verwendung der immobilisierten Hefe- und Bakterienzellen.