

CHEMICKÉ ASPEKTY IMOBILIZOVANÝCH SYSTÉMOV V BIOTECHNOLÓGIÁCH

MARIÁN NAVRÁTIL a ERNEST ŠTURDÍK

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: navratil@chelin.chtf.stuba.sk

Došlo dňa 13.IX.1999

Kľúčové slová: imobilizácia, techniky imobilizácie, imobilizačné metódy, imobilizačné materiály, bioaktívny komponent, biotechnológia, fermentácia

Obsah

1. Úvod
2. Bioaktívna časť imobilizovaných systémov
3. Metódy a nosiče pre imobilizáciu
 - 3.1. Uzavretie biokomponentu do nosiča
 - 3.2. Viazanie na povrch nosiča
 - 3.3. Kovalentné uchytenie
 - 3.4. Ďalšie imobilizačné metódy
4. Aplikácie imobilizovaných systémov v biotechnológii
 - 4.1. Potravinárske aplikácie imobilizovaných systémov
 - 4.2. Ostatné biotechnológie využívajúce imobilizované systémy
5. Záver

1. Úvod

Biotechnológie využívajúce imobilizované systémy znamenali v posledných pätnástich rokoch prudký rozvoj. Imobilizácia ako proces ukotvenia bioaktívneho komponentu má v porovnaní s klasickými metódami využívajúcimi voľné enzýmy, bunky, bunkové organely a tkanivá mnoho výhod. Pri použití imobilizovaných buniek odpadá nutnosť separovania biomasy z fermentačného média, je možné jej opakované použitie v ďalšej fermentácii, často v omnoho vyššej koncentrácii ako pri použití voľných buniek¹. Nasadenie imobilizovaných buniek môže v značnej miere prispieť ku kontinuálizácii celého fermentačného procesu.

Tento článok si dáva za úlohu definovať najznámejšie imobilizačné metódy, popísať materiály využívané jednotlivými technikami a charakterizovať interakcie biokomponent – nosič. V závere ponúka orientačný prehľad aplikácií imobilizovaných systémov v potravinárskych i nepotravinárskych technológiách.

2. Bioaktívna časť imobilizovaných systémov

Ako prvé bioaktívne komponenty boli v imobilizovaných systémoch použité enzýmy. Prvá zmienka o použití imobi-

lizovaného biokatalyzátora pochádza z roku 1908, keď Michaelis a Ehrenreich imobilizovali invertázu a proteolytické enzýmy na drevné uhlie a niektoré anorganické nosiče². Po tejto pionierskej práci sa ďalšie práce objavujú až v polovici päťdesiatych rokov. Referencie o použití imobilizovaných biokatalyzátorov na biotechnologické produkcie sú staré takmer 30 rokov³. Dnes sú však ako biokomponenty omnoho atraktívnejšie celé bunky, kde odpadajú náklady na izoláciu a purifikáciu enzýmu. Ako ďalšie možné varianty pripadajú do úvahy subcelulárne organely, huby, rastlinné pletivá a živočíšne tkanivá. Veľmi účinná je imobilizácia viacerých biokatalyzátorov súčasne, ktorej hovoríme koimobilizácia. Nasledovné odstavce stručne charakterizujú jednotlivé typy biokomponentov a uvádzajú niekoľko príkladov ich aplikácie.

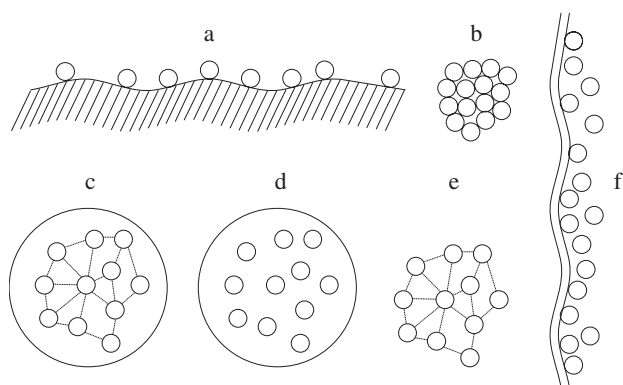
Použitie enzýmov v imobilizovaných systémoch má oproti iným bioaktívnym komponentom niekoľko výhod, z ktorých najdôležitejšie sú ich špecificita, nenákladné získavanie produktu a jednoduché prevádzkové vlastnosti. Ďalšou, nie nepodstatnou výhodou sú menšie nároky na objem reaktora (z dôvodu, že na rozdiel od buniek nie je prítomná nekatalytická biomasa) a nižšia citlivosť na kontamináciu reakčného prostredia. Medzi dôležité aplikácie imobilizovaných izolovaných enzýmov patrí použitie lipáz na produkciu monoacylglycerolov⁴ alebo štruktúrnych lipidov obsahujúcich esenciálne masné kyseliny⁵, produkcia rôznych sacharidov ako L-fruktóza alebo L-manóza za použitia imobilizovaných enzýmov⁶, či uplatnenie imobilizovanej aminoacylázy na produkciu L-fenylalanínu⁷.

Celé bunky v imobilizovaných systémoch v poslednej dobe takmer nahradili použitie enzýmových preparátov z dôvodu už spomínanej redukcie nákladov na izoláciu enzýmu. Navyše sa enzýmy v celých bunkách vyznačujú vyššou stabilitou ako enzýmy imobilizované v čistom stave. Preto sa väčšina prác z tejto oblasti zaoberá imobilizovanými bunkami či už baktérií alebo kvasiniek. Za celú plejádu aplikácií imobilizovaných buniek možno spomenúť produkciu etanolu bunkami *Saccharomyces cerevisiae*⁸, *Kluyveromyces marxianus*⁹ a *Zymomonas mobilis*¹⁰ alebo produkciu organických kyselín (kyseliny glutámovej bunkami rodu *Brevibacterium*¹¹, citrónovej kvasinkami *Candida guilliermondii*¹², kyseliny mliečnej mliečnymi baktériami *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*¹³, propiónovej¹⁴ a octovej¹⁵ baktériami rodu *Propionibacterium*).

Použitie mikroskopických húb sa spája hlavne s produkciou organických kyselín (kyselina glukónová¹⁶, citrónová¹⁷, fumarová¹⁸ s využitím húb rodu *Aspergillus* alebo *Rhizopus*) a antibiotík (cefalosporíny¹⁹, penicilíny²⁰). Huby sú tiež významnými producentmi enzýmov, napr. amyláz²¹.

Farmaceutiká, dochucovadlá a farbivá rastlinného pôvodu sú známe už dlhý čas. Dôvodom, prečo nedošlo k masovejšiemu rozšíreniu rastlinných pletív v imobilizovaných systémoch je obtiažne získavanie produktu z rastlinných buniek. Napriek tomu sú zmienky o použití imobilizovaných pletív vyšších rastlín na produkciu antrachinónu²² alebo skopolínu²³.

Využitie imobilizovaných živočíšnych buniek prináša ešte viacej problémov spojených hlavne s potrebou komplexnej-



Obr. 1. Najpoužívanejšie imobilizačné techniky (a – adsorpcia na pevný nosič, b – flokulácia, c – uchytenie do gélu so sieťovaním, d – uchytenie do gélu, e – kovalentné viazanie, f – zadržanie za membránu)

šieho média, citlivých buniek a ich pomalého rastu. Napriek tomu možno nájsť v literatúre odkazy s použitím prevažne cicavčích buniek v imobilizovaných systémoch na produkciu imunoglobulínov²⁴ alebo monoklonálnych protilátok²⁵.

3. Metódy a nosiče pre imobilizáciu

Imobilizácia je proces, v ktorom sa za použitia jednej z imobilizačných metód zabráni biologickému materiálu pohybovať sa nezávisle od svojho okolia. Rozoznávame päť základných typov imobilizačných metód, z ktorých môžu vzniknúť ďalšie ich vzájomnou kombináciou a modifikáciou (obr. 1):

- uzavretie do nosiča,
- viazanie na povrch nosiča,
- kovalentné uchytenie,
- zadržanie za membránu,
- flokulácia.

Nakoľko sa jednotlivé imobilizačné metódy líšia mechanizmom i samotnou podstatou imobilizácie, je veľmi ťažké ich navzájom porovnávať. Každá z metód je však charakteristická určitými vlastnosťami. Úspešnosť metódy je však v značnej miere závislá na správnom výbere nosiča²⁶. Preto sa použitie imobilizačných materiálov posudzuje podľa mnohých kritérií, z ktorých najdôležitejšie sú pevnosť, tvar, stabilita, hydrofilita, pórovitosť, reaktivita, obnoviteľnosť a ekonomická náročnosť²⁷. Výhody a nevýhody jednotlivých imobilizačných metód zhrňuje tabuľka I.

3.1. Uzavretie biokomponentu do nosiča

Uzavretie, zväčša do matrice gélu, je v podstate „uväznenie“ molekúl enzýmu alebo buniek do trojrozmerného matrixu, ktorého póry sú menšie ako enzým, príp. bunka. Uzavretie do gélu kvôli jeho nenáročnosti na prípravu, miernosti a širokej použiteľnosti je pravdepodobne najpoužívanejšou zo všetkých imobilizačných metód. V originálnej anglickej literatúre sa tento typ často označuje ako „entrapment“.

Pre imobilizáciu metódou uzavretia je k dispozícii široká paleta nosičov zo skupiny polysacharidov, proteínov alebo syntetických polymérov.

Tabuľka I

Hlavné výhody a nevýhody rôznych imobilizačných techník (A-NN – adsorpcia/neutrálny nosič, A-NN – adsorpcia/nabitý nosič, F – flokulácia, U-PP – uzavretie/prírodný polymér, U-SP – uzavretie/syntetický polymér, KV – kovalentné viazanie, UM – uzavretie za membránu)

Klasifikácia	A-NN	F	U-PP	U-SP	U
	A-CN			KV	
Výhody					
jednoduchosť	×	×	×	(×)	×
miernosť	×	×	×	×	×
nízka cena	×				
obnoviteľnosť	×	×			×
trvácnosť					×
Nevýhody					
uvoľňovanie buniek	×		×		
difúzne limitácie			×	×	×
vysoká cena				×	×
toxická				×	×
citlivosť na zmeny pH		×			

Tabuľka II

Prehľad materiálov používaných pre uzavretie biokomponentu do gélu

Typ	Typické materiály
Jednoduché makromolekuly gelujúce zvýšením alebo znížením teploty	agar, agaróza, chitozan, želatína, vaječný bielok, glyoxilagaróza
Iontropné gély a makromolekuly s bi- a multivalentnými kationmi	alginát, pektán, κ-karagénan
Syntetické polyméry pripravované chemickou alebo fotochemickou geláciou	epoxidové živice, polyakrylamid, polymetakrylamid, polyuretán

Matrica, do ktorej sa bunky uzavierajú, je zvyčajne označovaná ako gél. Je jasné, že gél, v ktorom je biokomponent imobilizovaný, vytvára difúziu bariéru pre prienik substrátu a produktu. Preto je nutné vzhľadom na ich rozmery zvoliť aj správny typ gélu. Difúzne limitácie môžu byť niekedy aj výhodou, keď póry gélu zamedzia prístupu nežiadúcej vysokomolekulovej látky k bioaktívnemu komponentu. Avšak aj bunky samotné predstavujú bariéru pre prístup substrátu. Sú ňou bunkové steny alebo plazmatické membrány, ktorých permeabilizáciou môžeme dosiahnuť zvýšenie permeability imobilizovaného systému.

Materiály použité pre imobilizáciu typu „entrapment“ môžeme rozdeliť na 3 základné skupiny rovnako, ako to prezentuje tabuľka II.

Jednotlivé typy použitých gélových nosičov budú podrobnejšie popísané v nasledujúcich odstavcoch.

Agar

Agar je prírodný polymerický komplexný polysacharid získavaný z rôznych rodov morských rias. Je priamo dostupný v predajnej sieti zásobujúcej mikrobiologické laboratória. Priemerná cena 1 kg agaru pre potravinárske účely bola v roku 1993 19,72 USD, čím je najdrahším z bežných hydrokoloidných gélov²⁸. Pre imobilizáciu sa používa 2–4 % roztok agaru rozpusteného pri zvýšenej teplote (zvyčajne okolo 50 °C), ktorý po vychladení stuhne na gél. Existuje niekoľko spôsobov prípravy agarových imobilizátov: vylíatie agaru so suspenziou buniek na platňu v potrebnej hrúbke a narezanie na malé kocky, prípadne kvapkanie suspenzie do ľadového tlmivého roztoku. Vo všeobecnosti sa však agarové gély vyznačujú pomerne nízkou mechanickou pevnosťou.

Príkladom použitia agaru ako imobilizačného materiálu môže byť produkcia termostabilnej α -amylázy imobilizovanými baktériami *Bacillus brevis*²⁹ alebo konverzia D-xylózy na xylitol bunkami *Saccharomyces cerevisiae*³⁰.

Agaróza

Agaróza je jednou zo zložiek agaru. Pri separácii a purifikácii sú odstránené niektoré esterové skupiny. Je dostupná v rôznych stupňoch čistoty s príslušnými fyzikálnymi vlastnosťami. Spracováva sa podobne ako agar.

Agaróza bola napríklad použitá na imobilizáciu glutamát-racemázy pri produkcii D-glutamátu z L-glutamátu³¹ alebo pri produkcii γ -dekalaktónu imobilizovanými bunkami *Sporidibolus salmonicolor*³¹.

κ -Karagénan

κ -Karagénan je podobne ako agar komplexný polysacharid izolovaný z morských rias. V poslednej dobe sa karagénan stáva materiálom čoraz obľúbenejším, lebo oproti agaru je možné ho tepelne sterilizovať. Karagénan je používaný v potravinárskom priemysle aj ako zahusťovadlo a gélotvorný prostriedok. V géli býva zvyčajne zastúpený v koncentrácii okolo 4 %. Spracováva sa podobne ako agar kvapkaním do ľadovej vody. Samotný karagénan má však veľmi nepriaznivé mechanické vlastnosti, preto býva zvyčajne stabilizovaný vhodnou koncentráciou draslíka (2–4 %).

Guličky κ -karagénanu o veľkosti 1,2–2,5 mm s koimobilizovanými bunkami *Zymomonas mobilis* a glukoamylázou boli použité pri etanolovej fermentácii škrobu³³. Gély s koncentráciou κ -karagénanu 2, 4 a 6 % boli použité na imobilizáciu buniek *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* pri produkcii kyseliny propiónovej³⁴.

Proteíny

Prírodné proteíny vďaka schopnosti koagulovať slúžia tiež ako materiály pre uzavretie biokatalyzátora do svojej štruktúry. Z proteínov je možné na imobilizačné účely použiť napríklad kolagén alebo vaječný bielok. Ďalším z prírodných proteínov využívaných pre účely imobilizácie je želatína. Nakoľko proteíny v dôsledku svojej štruktúry obsahujú veľké množstvo karboxylových a aminoskupín, umožňujú ľahko naviazať biokomponent prostredníctvom kovalentnej väzby. Jedným zo spôsobov použitia je pokrytie pevného nosiča vrstvou

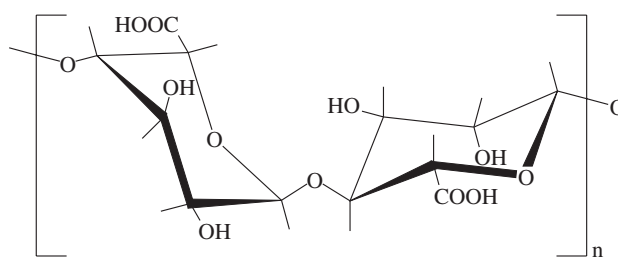
želatíny aktivovanej sťahovacím činidlom a následného naviazania enzýmu alebo buniek³⁵.

Alginát

Alginát sa už dlhé roky používa ako gelujúce činidlo v pudingoch, ovocných plnkách, dezertných rôsloch a štrukturovaných potravinách, ako látka viažúca vodu v mrazených potravinách, emulgátor v šalátových dressingoch a stabilizátor v pive, ovocných džúsoch, šťavách a omáčkach³⁶. Po chemickej stránke je to kyselina alginová, respektíve jej sodná soľ. Kyselina alginová je heteropolymér L-glukurónovej a L-manurónovej kyseliny, ale pomer jednotlivých kyselín kolíše v závislosti od zdroja. Štruktúru manuronát-glukurónátového komplexu znázorňuje obrázok 2.

Ionotropná gelácia alginátu sodného s multivalentným kationom, zvyčajne vápenatým, je pravdepodobne najpoužívanejšou metódou imobilizácie. Ionotropná gelácia je na realizáciu veľmi nenáročná. Prakticky sa uskutočňuje tak, že suspenzia biokomponentu v roztoku alginátu sodného (1–4 %) sa kvapká do roztoku chloridu vápenatého (s koncentráciou 0,125–0,5 mol.dm⁻³). Táto metóda poskytuje veľmi jednoduchú prípravu guľčiek o veľkosti 0,5–3 mm, avšak chelatujuce činidlá (citrátové alebo fosfátové tlmivé roztoky) účinne rozrušujú štruktúru buniek. Pomerne slabá štruktúra gélu tiež zapríčiňuje únik buniek, hlavne pri dlhotrvajúcom procese spojenom s rastom buniek. Bunky sú tiež pri miešaní náchylné na mechanické poškodenie. Jednoduchou metódou na zvýšenie stability je vysušenie guľčiek, pri ktorom dôjde k nevratnému zmenšeniu ich objemu. Určité zvýšenie stability bolo dosiahnuté tiež použitím trivalentných kationov³⁷. Aplikáciou dusičnanu hlinitého sa dosiahlo dvojnásobné zvýšenie stability gélu. Vytvrdenie guľčiek je možné dosiahnuť aj aplikáciou bivalentného činidla, napríklad glutardialdehydu³⁸.

Alginát môže byť použitý na imobilizáciu akéhokoľvek typu buniek zo zachovaním maximálnej biokatalytickej aktivity. Bol použitý na imobilizáciu baktérií, kvasiniek, húb a vyšších rastlín. V literatúre existuje nespočetné množstvo odkazov na použitie alginátu ako imobilizačného materiálu. Za všetky možno spomenúť napríklad sekundárnu fermentáciu pri výrobe šumivého vína s imobilizovanými kvasinkami³⁹, produkciu halofilnej α -amylázy imobilizovanými bunkami *Halobacterium salinarium*⁴⁰, produkciu xylitolu rekombinantným kmeňom *Saccharomyces cerevisiae*⁴¹, produkciu L-alanínu baktériami z rodu *Pseudomonas*⁴², alebo etanolovú fermentáciu kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*^{43–45}.



Obr. 2. Štruktúra manuronát-glukurónátového bloku tvoriaceho alginátového polyméru. Kyselina glukurónová (vľavo) je v komplexe viazaná 1,4-glykozidovou väzbou, rovnako ako kyselina manurónová (vpravo)

Pektát

Pektát patrí do skupiny pektínových biopolymérov, ktoré nachádzajú svoje uplatnenie aj v potravinárskom priemysle ako želirujúce látky v džemoch a marmeládach. Na rozdiel od alginátu, pektáty majú rastlinný pôvod a vyrábajú sa deesterifikáciou pektínov – rastlinných polysacharidov²⁷. Rovnako ako alginát, aj pektát je svojim princípom ionotropnej gelácie veľmi nenáročný a pomerne lacný. Ako materiál pôsobí pri imobilizácii na biokatalyzátor veľmi mierne, takmer úplne bez negatívnych biochemických, resp. fyziologických zmien. Pektát vápenatý nie je len alternatívou alginátového gélu. V porovnaní s ním vykazuje aj lepšie mechanické vlastnosti, je menej citlivý na chelatujúce ióny a ďalšie chemické látky rozrušujúce štruktúru gélu. Možno preto býva operačná stabilita pektátových imobilizátov vyššia v porovnaní s alginátovými gémi^{46,47}.

Napriek svojim vlastnostiam nie je zďaleka tak rozšírený ako alginát. Pektátový gél bol použitý na imobilizáciu buniek *Kluyveromyces marxianus* ako zdroja β -galaktozidázy pri hydrolyze laktózy⁴⁶ alebo na imobilizáciu baktérií mliečného kvasenia s koncentráciou až 10^{14} buniek / l gélu pri fermentácii so zvýšenou aktivitou tvorby laktátu⁴⁸.

Chitozan

Alternatívnym prístupom k použitiu polyaniónov (alginát, pektát) je použitie polykatiónov s následným sieťovaním polyvalentným aniónom. Umožňuje riešiť problémy spojené s cheláciou vápnika v géloch alginátu vápenatého. Biokomponent je primiešaný do viskózneho chitozanu rozpusteného v zriedenej kyseline octovej a kvapkaný do 1,5 % roztoku polyfosforečnanu sodného. Nezanedbateľný je vplyv pH na stabilitu a kvalitu guľičiek. Ďalšie zvýšenie stability chitozanového gélu možno dosiahnuť sieťovaním glutaraldehydom.

Chitozan ako nosič bol použitý napríklad pri produkcii γ -dekalaktónu z ricinolénovej kyseliny bunkami *Sporidiobolus salmonicolor*³².

Polyakrylamid

Polyakrylamidy sú syntetické polyméry, ktoré sa vyrábajú so širokým rozmedzím vlastností závislých na kvalite zložiek a podmienkach počas ich prípravy. Podobný typ gélu sa používa napríklad pri elektroforetickej separácii molekúl. Pri príprave gélu reaguje monomér s polyfunkčným sieťovacím činidlom. Monomér je zvyčajne akrylamid, hoci niekedy je možné použiť aj metakrylamid. Bifunkčným činidlom je obyčajne *N,N'*-metylén-bis-akrylamid, skrátene BIS. Poškodeniu buniek môžeme čiastočne zamedziť použitím tetrametyletyléndiamínu (TEMED) a peroxosíranom sodným (SPS) alebo amónnym, ktorý je iniciátorom polymerizácie. SPS zvýši rýchlosť polymerizácie a skrátí dobu styku biokomponentu s toxickým monomérom akrylamidom. Polymerizácia sa uskutočňuje vždy v prítomnosti vhodného tmivého roztoku. Štruktúra polyakrylamidu (PAA) obsahuje dutiny schematicky znázornené na obrázku 3, do ktorých sa pri imobilizácii uchyť biokatalyzátor.

2 % sieťovaný polyakrylamidový gél bol použitý na imobilizáciu bakteriálneho kmeňa *Bacillus mycoides* pri produkcii alkalickéj proteázy⁴⁹, 10%-ný PAA pri produkcii celobiázy

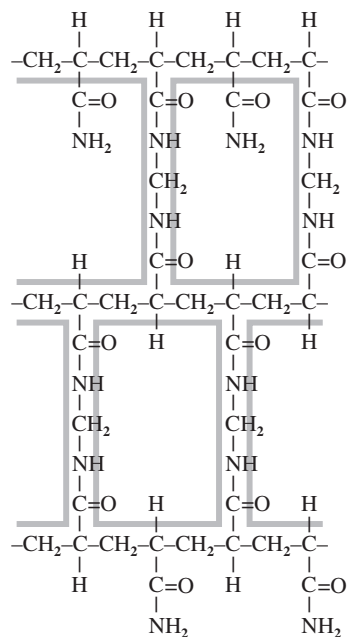
imobilizovanou kultúrou *Aspergillus niger*⁵⁰ alebo na zvýšenie produkcie lipázy kvasinkami *Candida rugosa*⁵¹.

Ďalšie syntetické polyméry

Z ďalších syntetických polymérov možno ešte spomenúť pomerne rozšírený polyuretán, prípadne 2-hydroxy-etylmetakrylát (HEMA), ktorý polymerizuje pôsobením γ žiarenia. Značnú pozornosť si v poslednej dobe získal polyvinylalkohol, ktorý či už po pôsobení chemických činidiel, foto-sieťovaním⁵² alebo zmrazením (kryogél)⁹ predstavuje kvalitný nosič pre imobilizáciu.

3.2. Viazanie na povrch nosiča

Imobilizácia adsorpciou je proces založený na vytvorení vzájomnej väzby nosič–bunka, resp. nosič–enzým. Z väzieb sa najčastejšie uplatňujú iónové a vodíkové väzby, obyčajne značne slabšie ako kovalentné väzby. Elektrostatické sily sú významné hlavne v počiatkovej fáze adsorpcie – vonkajší povrch buniek je zvyčajne nabitý a spravidla obsahuje aj množstvo ionizovateľných skupín. Z dôvodu, že ako nosiče sa používajú najmä prírodné alebo inertné materiály, vyvoláva tento typ imobilizácie len veľmi nízke poškodenie biologického materiálu, a preto sa imobilizácia adsorpciou považuje za jednu z najmiernejších imobilizačných metód. Je však metódou pomerne nešpecifickou, a tak jednak kvalita nosiča i stav biokomponentu majú na jej účinnosť značný vplyv. Ďalším z problémov pri viazaní na nosič je postupné uvoľňovanie buniek z jeho povrchu. Tieto môžu spôsobiť vážne problémy dané znižovaním biokatalytickej účinnosti imobilizátu i kontamináciou systému. Prudké miešanie alebo intenzívna produkcia plynnej fázy môžu tiež spôsobiť významnú stratu na aktivite v dôsledku uvoľňovania biokatalyzátora.



Obr. 3. Schematické znázornenie štruktúry akrylamid-*N,N'*-metylén-bis-akrylamidového kopolyméru (PAA) a jeho štruktúrnych charakteristík

V porovnaní s uzavretím do gélu možno jednoduchou adsorpciou pojať na gram nosiča omnoho menej biokatalyzátora. Navyše u pórovitých nosičov musí byť veľkosť pórov zvolená vhodne k použitému bioaktívnemu komponentu. Materiály používané na imobilizáciu adsorpciou môžeme rozdeliť na 3 hlavné skupiny: anorganické nosiče, organické materiály a iónovo-výmenné živice.

Imobilizácia zväčša na anorganické nosiče sa môže uskutočniť v troch modifikáciách:

- adsorpciou bioaktívneho katalyzátora priamo na povrch nosiča,
- kovalentné naviazanie biokatalyzátora na nosič,
- pokrytie povrchu nosiča polymérom.

Samotná absorpcia umožňuje len pomerne slabú väzbu biokatalyzátora na nosič. Žiaduce sú preto nosiče s veľkým počtom funkčných skupín, aby sa predchádzalo nežiadúcemu uvoľňovaniu buniek z povrchu nosiča.

Na kovalentné naviazanie sa používajú bifunkčné a polyfunkčné činidlá, ktoré cez svoju molekulu zabezpečia naviazanie biokomponentu k nosiču. Najpoužívanejším z nich je glutardialdehyd⁵³ (GDA). Spôsob naviazania enzýmu na nosič pomocou GDA je znázornený na obrázku 4.

Na účely pokrytia nosiča vrstvou polyméru bolo odskúšané použitie organických silánov, polyetylénimínu^{7,13}, polytri-metylpropántriakrylátu alebo poly-(*N*-benzyl-4-vinylpyridí-niumchlorid-ko-styrénu)⁵⁴.

Anorganické nosiče

Výhody anorganických nosičov ako značná mechanická odolnosť, rezistencia voči rozpúšťadlám a biologickému poškodeniu, ich dostupnosť a pomerne nízka cena z nich spravili najatraktívnejšie materiály používané pre imobilizáciu adsorpciou. Zvolený nosič musí byť v reakčnom prostredí inertný, ľahko manipulovateľný, regenerovateľný a ekonomicky nenákladný. Anorganické materiály sú zvyčajne veľmi rigidné, preto sú odolnejšie voči obrusovaniu a deformácii. Z literatúry je známych mnoho materiálov ako kremeňové a korundové nosiče, uhličitan vápenatý, pórovité sklo, síran vápenatý, difosforečnan vápenatý, keramika, sklená vata, sinterované sklo a oxidy a hydroxidy kovov²⁷.

Kremeň, v pôvodnej literatúre označovaný aj ako „silica“ sa nachádza v dvoch formách: v prírode ako kryštalický minerál a synteticky pripravený amorfný materiál. Práve jeho amorfná forma sa používa ako materiál pre imobilizácie. Jednotlivé typy sa môžu od seba významne líšiť veľkosťou pórov, ako aj počtom hydroxylových skupín, ktoré sa uplatňujú pri samotnej imobilizácii. Jeho použitie bolo zaznamenané napríklad pri produkcii koenzýmov imobilizovanou NAD⁺-kinázou⁵⁵, či na imobilizáciu glyoxalázy pri produkcii S-laktoylglutatiónu z metylglyoxálu a glutatiónu⁵⁶.

Sklo si pre svoju inertnosť získalo svoje miesto v imobilizovaných systémoch, hlavne vo forme s uniformnou veľkosťou pórov, označovanou ako controlled-pore-glass (CPG). Na trhu je dostupná široká paleta CPG s nominálnou veľkosťou pórov 75–3000 Å (Sigma, 1998). Dostupné sú aj sklá nesúce funkčné skupiny. Pórovité sklo bolo použité napríklad na imobilizáciu pululanázy a aminoglukozidázy⁵⁷ alebo na imobilizáciu cykldextrín-glykozyltransferázy na produkciu β-cyklo-dextrínu zo škrobu⁵³. Osvedčilo sa aj na imobilizáciu buniek, o čom svedčí viazanie buniek *Phanerochaete*

chryso-sporium za účelom produkcie lignínperoxidázy⁵⁸.

Keramické nosiče, podobne ako sklo, boli použité na imobilizáciu enzýmov aj buniek v širokej palete foriem a tvarov. Najčastejšie sú však používané v tvare guľičiek s vysokým špecifickým povrchom. Ako príklady použitia môžu slúžiť produkcia štrukturovaných lipidov imobilizovanou lipázou⁵ a výroba sójovej omáčky za použitia imobilizovaných baktérií mliečného kvasenia⁵⁹. Duté keramické guľičky s priemerom 50–75 μm boli použité aj pri vývoji novej metódy imobilizácie buniek označovanej ako hydrodynamická depozícia⁶⁰.

Značnú pozornosť získali aj sol-gély, materiály prevažne na báze kremíka, ktoré zaujali hlavne svojou mechanickou pevnosťou a odolnosťou voči otieraniu⁶¹. Z ďalších anorganických materiálov je známe použitie alumíny (oxidu hlinitého)^{59,62,63}, uhličitanu vápenatého, síranu vápenatého, difosforečnanu vápenatého⁴, pórovitého vulkanického minerálu kyslíku⁶⁴ alebo pórovitej nehrdzavejúcej ocele⁶⁵.

Organické nosiče

Použitie organických materiálov pre imobilizáciu už nie je natoľko rozšírené, ako to bolo v prípade materiálov anorganických. Z ich použitia plynie množstvo nevýhod. Spravidla nie sú úplne inertné a nie sú odolné voči mikrobiálnej degradácii. Avšak v závislosti na svojom pôvode sú zvyčajne pomerne lacné.

Z organických materiálov používaných pre imobilizáciu treba na prvom mieste uviesť celulózu. Je to polydisperzný polymér rastlinného pôvodu, ktorého základnou jednotkou je glukóza. Deriváty celulózy viažu enzýmy priamo iónovými väzbami, ale umožňujú aj kovalentné viazanie, pri ktorom nosič interaguje s aminoskupinami enzýmu. Hydroxylové skupiny zabezpečujú hydrofilný charakter nosiča, a tým chránia imobilizovaný enzým²⁷. Mimo celulózy⁶⁶⁻⁶⁸ sú v imobilizovaných systémoch využívané aj jej deriváty ako karboxymetylcelulóza, dietylamoetylcelulóza⁶⁹, trietylamoetylcelulóza⁷⁰ a nitrocelulóza⁷¹. Z ďalších možno spomenúť použitie drevených kociek⁷² alebo hoblín⁷³ ako nosiča pre imobilizáciu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* pri produkcii etanolu, piliny na imobilizáciu kvasiniek *Candida guilliermondii* na produkciu kyseliny citrónovej alebo semená obilnín na imobilizáciu mycélia *Aspergillus niger* pri produkcii glukooamylázy⁷⁴.

3.3. Kovalentné uchytenie

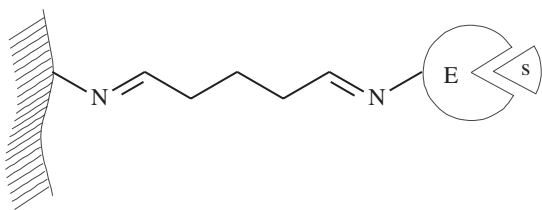
Z teoretického hľadiska je medzi kovalentným viazaním biokomponentu na nosič a sieťovaním napr. buniek navzájom zásadný rozdiel. V praxi to však už nie je také jednoznačné, lebo sa môžu bunky viazať na nosič práve tak ako navzájom medzi sebou. V literatúre je množstvo odkazov na kovalentné viazanie enzýmov, avšak ani viazanie celých buniek nie je nič mimoriadne. Kovalentné viazanie má však jednu nevýhodu: či už sa viažu enzýmy alebo bunky, sú vystavované reaktívnym skupinám, ktoré sa často vyznačujú toxickým efektom. Preto pri kovalentnom viazaní spravidla dochádza k zníženiu biokatalytickej aktivity. Ako je známe, samotné bunkové steny obsahujú množstvo reaktívnych skupín, ktoré sa potenciálne môžu podieľať na vytvorení kovalentných väzieb.

Z činidiel pre kovalentné naviazanie sa najčastejšie používa glutardialdehyd⁵³ a 1-etyl-3-(3-dimetyl-aminopropyl)-karbo-

diimid⁷, použité však boli aj bisdiazobenzidín-2,2'-disulfónová kyselina, *N*-etyl-5-fenylizoxazolium-3'-sulfonát, toluén-2-izokyanát-4-izotiokyanát, hexametyléndiizokyanát alebo 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzén. Z množstva reakcií, ktoré sa pri kovalentnom viazaní uplatňujú, spomenieme len nasledovné⁷⁵. Reakčné mechanizmy jednotlivých techník sú uvedené na obrázku 5.

- kyanogénbromidová technika,
- karbodiimidová metóda,
- väzba cez acylové skupiny pôsobením hydrazínu a kyseliny dusitej,
- viazanie s použitím kyanurochloridu,
- väzba cez diazóniové skupiny z aromatických aminoskupín,
- naviazanie cez tiolové skupiny.

Alternatívnym spôsobom viazania je využitie koordinačných vlastností kovov. Príkladom je úprava povrchu materiálu chloridom titaničitým, kde pri imobilizácii vznikne sendvičovo-



Obr. 4. Schematická väzba aminoskupiny enzýmu na aminoskupinu anorganického nosiča prostredníctvom glutaraldehydu

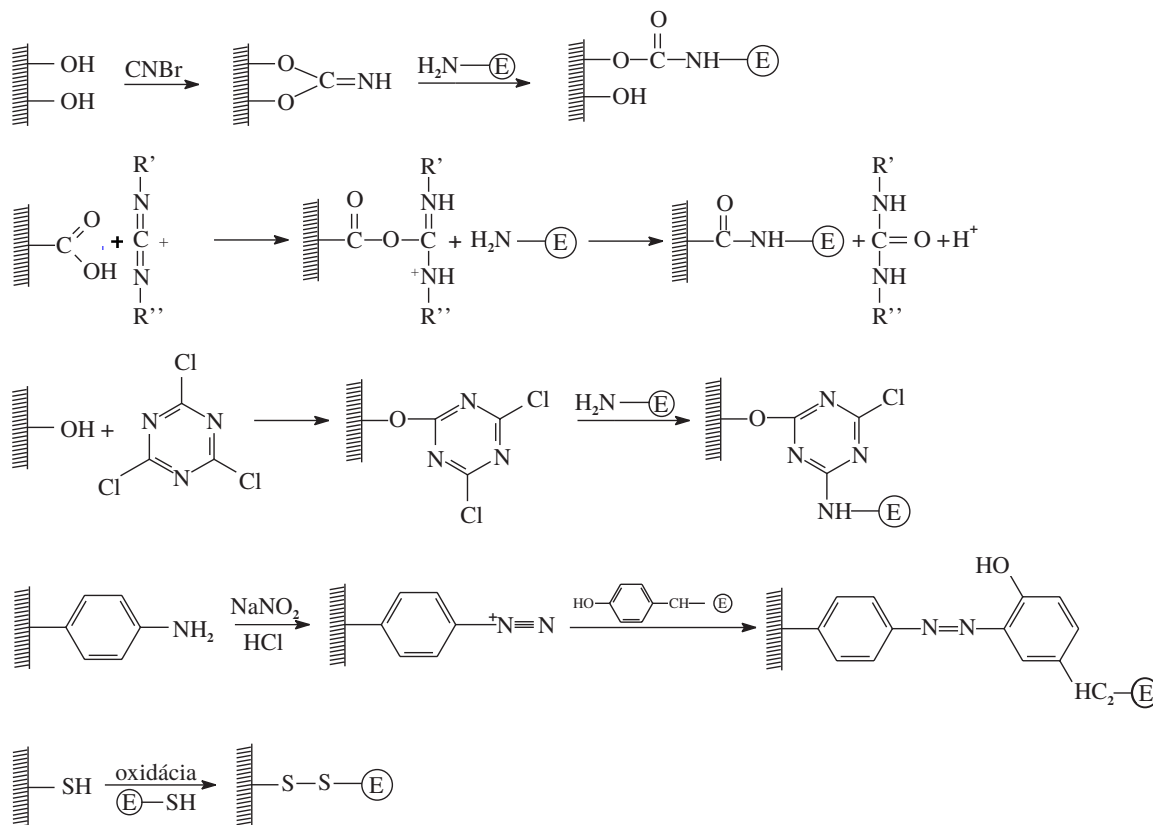
vý chelát medzi nosičom a biologickým materiálom prostredníctvom atómu titánu. Väzbu medzi enzýmom a povrchom popísal vo svojej práci Cabral a je znázornená⁷⁶ na obrázku 6.

3.4. Ďalšie imobilizačné metódy

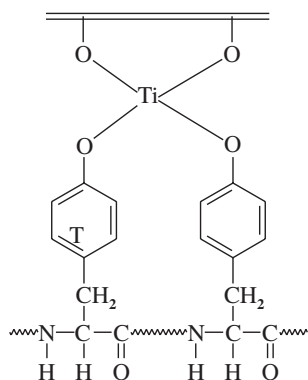
Za ďalšie imobilizačné metódy možno spomenúť zadržanie biokatalyzátora za membránou (obrázok 1f). Zatiaľ čo tento typ imobilizácie je veľmi bežný pri konštrukcii biosenzorov, v biotechnológiách využívajúcich imobilizované systémy sa vyskytuje len ojedinele. Membrány bývajú väčšinou zložené z polymérov (napr. polyvinylchlorid, polypropylén, polysulfón). Membrány môžu mať podobu plátov alebo zásobníkov s dutými vláknami. Zásobníky s dutými vláknami poskytujú membránam vyššiu mechanickú stabilitu a vyšší pomer povrch–objem⁷⁵.

Modifikácia tejto metódy s použitím gélových materiálov sa nazýva enkapsulácia. Je to metóda, pri ktorej sa biokatalyzátor, zvyčajne v tlmivom alebo stabilizačnom roztoku obalí tenkou semipermeabilnou membránkou gélu⁷⁷.

Už dlho je známe, že niektoré kmene liehovarníckych a pivovarských kvasiniek majú zvýšenú schopnosť flokulácie. Flokulácia sa považuje za pasívnu formu imobilizácie, pri ktorej sa jednotlivé bunky naadsorbujú jedna na druhú⁷⁸ (obrázok 1b). Furuta predstavil produkciu glukoamylázy flokulujúcimi kvasinkami *Saccharomyces diastaticus*⁷⁹. Ďalším rozšírením flokulačných možností je aplikácia polyelektrolytov alebo iných povrchovo aktívnych látok na vyvolanie umelej flokulácie⁸⁰.



Obr. 5. Reakcie uplatňujúce sa pri kovalentnom uchytení enzýmu na povrch nosiča



Obr. 6. Sendvičový komplex enzým–sklený nosič vytvorený prostredníctvom atómu titánu

4. Aplikácie imobilizovaných systémov v biotechnológii

Oblasti použitia imobilizovaných systémov môžu byť rozdelené do dvoch hlavných skupín: potravinárske a nepotravinárske aplikácie. Prvá skupina zahŕňa produkciu fermentovaných potravinárskych produktov ako pivo, víno, etanol, mäso, mlieko a mliečne výrobky. Druhá skupina pokrýva produkciu špecifických metabolitov vrátane alkoholov, antibiotík, organických kyselín, aminokyselín, sacharidov a enzýmov, ktoré môžu nájsť svoje uplatnenie vo farmaceutickom, chemickom i potravinárskom priemysle.

4.1. Potravinárske aplikácie imobilizovaných systémov

Čo sa týka pivovarnického priemyslu, potenciál technológií imobilizovaných buniek zaznamenal v minulosti pozornosť pri mnohých príležitostiach. Od roku 1987 sa na ne zamerala aj Európska konvencia pre pivovarníctvo⁸¹ (EBC). V poslednom čase bolo publikovaných množstvo prác o implementácii imobilizovaných kvasiniek do tradičných pivovarníckych procesov primárnej a sekundárnej fermentácie⁸²⁻⁸⁵.

Napriek tradičnej povahe vína, technológia imobilizovaných buniek si našla svoje uplatnenie aj na tomto poli. Imobilizované systémy môžu zvýšiť účinnosť alkoholovej a jablčno-mliečnej fermentácie^{86,87}. Niektoré práce popisujú fľašovú fermentáciu šumivého vína s využitím imobilizovaných buniek³⁹. Kritický pohľad na produkciu vína imobilizovanými systémami ponúka prehľadový článok autorského kolektívu Diviès a kol.⁸⁸

Udržanie určitej kvality mäsa a mäsových výrobkov môže byť nevedomky alebo zámerne ovplyvnené mikrobiálnou aktivitou buď prirodzenej mikroflóry alebo vybraných typov mikroorganizmov. Avšak len nedávno technológia imobilizovaných buniek našla svoje uplatnenie aj v mäso spracujúcom priemysle⁸⁹. McLoughlin a Champagne ponúkajú vyčerpávajúci prehľad možností využitia imobilizovaných buniek v procese spracovania mäsa. Ide najmä o imobilizáciu štartovacích kultúr pri výrobe fermentovaných mäsových produktov⁹⁰.

Imobilizované bunky môžu nájsť svoje uplatnenie aj v procese výroby mlieka a mliečnych výrobkov. Na tomto poli sa

imobilizované bunky používajú na predúpravu surového mlieka, produkciu mliečnych štartovacích kultúr, výrobu jogurtov a syrov, fermentáciu smotany a mrazených dezertov s alebo bez obnovy bunkovej biomasy⁹¹.

4.2. Ostatné biotechnologické využívajúce imobilizované systémy

Mnohé imobilizované systémy našli svoje uplatnenie pri produkcii sacharidov a ich derivátov. Patrí sem výroba vysokokonzentrovaných fruktózových sirupov^{92,93}, glukózy a galaktózy hydrolýzou laktózy⁴⁶. Mnoho prác sa tiež zaoberá produkciou enzýmov, napr. amylolytických²⁹, proteáz⁴⁹, lipáz⁵¹ alebo katalázy⁹⁴. Aminokyseliny ako dôležité farmaceutické a krmovinárske aditíva sú tiež vyrábané využitím imobilizovaných systémov. Patrí sem produkcia kyseliny asparágovej⁵⁴, glutámovej¹¹, alanínu⁴², tryptofánu⁹⁵, lyzínu⁹⁶, serínu⁹⁷ alebo arginínu⁹⁸. Aj organické kyseliny zaznamenali mnohé prípady aplikácie^{17,33,99,100}. Ďalšie práce popisujú tiež produkciu glycerolu¹⁰¹ a sorbitolu¹⁰², aromatických látok, polysacharidov, alkaloidov alebo pigmentov¹⁰³.

5. Záver

Táto práca približuje spôsoby a metódy zavádzania imobilizovaných systémov využívajúcich enzýmy alebo celé bunky do jednotlivých odvetví potravinárskeho i nepotravinárskeho priemyslu. Jej zámerom bolo charakterizovať najznámejšie metódy imobilizácie spolu s materiálmi, pre jednotlivé metódy typickými. Kapitoly o metódach imobilizácie sa neobmedzujú len na suché vymenovanie používaných materiálov, ale naznačujú aj ich pôvod, princíp použitia a ďalšie parametre spolu s príkladmi praktických aplikácií v biotechnologických produkciách.

V prvej časti článku sú naznačené biologické materiály, používané pri realizácii technológií s imobilizovanými systémami. Druhá, najobsiahlejšia časť je venovaná metódam a hlavne najpoužívanejším materiálom pri jednotlivých imobilizačných technikách. Tretia, záverečná časť je veľmi stručným prehľadom zavádzania imobilizovaných systémov do technologickej praxe.

Táto práca bola podporovaná finančnými zdrojmi z grantov EU č. 2/5059/98, 1/7347/20 a 1/6252/99.

LITERATÚRA

1. Bittar E. E., Danielsson B., Büllow L.: *Advances in Molecular and Cell Biology*, sv. 15A. JAI Press, Greenwich 1996.
2. Michaelis L., Ehrenreich M.: *Biochem. J.* 10, 283 (1908).
3. O'Neill S. P., Dunnill P., Lilly M. D.: *Biotechnol. Bioeng.* 13, 337 (1971).
4. Rosu R., Uozaki Y., Iwasaki Y., Yamane T.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 445 (1997).
5. Shimada Y., Sugihara A., Maruyama K., Nagao T., Nakayama S., Nakano H., Tominaga Y.: *J. Ferment. Bioeng.* 81, 299 (1996).
6. Bhuiyan S. H., Itami Y., Izumori K.: *J. Ferment. Bioeng.* 84, 558 (1997).

7. Lee P. M., Lee K. H., Siaw Y. S.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 58, 65 (1993).
8. Joekes I., Moran P. J. S., Rodrigues J. A. R., Wendhausen R., Tonella E., Cassiola F.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 73, 54 (1998).
9. Gough S., Mchale A. P.: Bioproc. Bioeng. 19, 33 (1998).
10. Kannan T. R., Sangiliyandi G., Gunasekaran P.: Enzyme Microb. Technol. 22, 179 (1998).
11. Nampoothiri M., Pandey A.: Biores. Technol. 63, 101 (1998).
12. Tisnadjaja D., Gutierrez N. A., Maddox I. S.: Enzyme Microb. Technol. 19, 343 (1996).
13. Senthuran A., Senthuran V., Mattiasson B., Kaul R.: Biotechnol. Bioeng. 53, 214 (1997).
14. Rickert D. A., Glatz C. E., Glatz B. A.: Enzyme Microbiol. Technol. 22, 409 (1998).
15. Czaczyk K., Trojanowska K., Albrecht A.: Folia Microbiol. 40, 337 (1995).
16. Vassilev N., Vassileva M. C., Spassova D. I.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 285 (1993).
17. Sakurai A., Itoh M., Sakakibara M., Saito H., Fujita M.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 70, 157 (1997).
18. Cao N. J., Du J. X., Gong C. S., Tsao G. T.: Appl. Environ. Microbiol. 62, 2926 (1996).
19. Srivastava P., Kundu S.: J. Gen. Appl. Microbiol. 44, 113 (1998).
20. Mussenden P., Keshavarz T., Saunders G., Bucke C.: Enzyme Microb. Technol. 15, 2 (1993).
21. Fiedurek J., Szczodrak J.: Starch/Staerke 5, 196 (1995).
22. Dornenburg H., Knorr D.: J. Biotechnol. 50, 55 (1996).
23. Roisin C., Gilletmanceau F., Saucedo J. E. N., Fliniaux M., Jacquindubreuil A., Barbotin J. N.: Plant Cell Reps. 16, 349 (1997).
24. Yamaji H., Fukuda H.: J. Ferment. Bioeng. 83, 489 (1997).
25. Riley M. R., Muzzio F. J., Reyes S. C. (ed.): Biotechnol. Progr. 13, 301 (1997).
26. Svec F., Gemeiner P., v kniže: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (Tombs M. P., ed), sv. 13. Intercept, Hants 1996.
27. Gemeiner P., Rexová-Benková L., Švec F., Norrlöw O., v kniže: *Immobilized biosystems. Theory and Practical Applications* (Veliky I. A., McLean R. J. C., ed), str. 1. Chapman and Hall, London 1994.
28. Seisun D.: *Hydrocolloids – Global Market Summary and Overview., International Conference on Food Hydrocolloids, Barcelona 1999.*
29. Stefanova M. E., Tonkova A. I., Dobрева E. P., Spasova D. I.: Folia Microbiol. 43, 42 (1998).
30. Lebeau T., Jouenne T., Junter G. A.: Biotechnol. Lett. 19, 615 (1997).
31. Mansur M., Garcia J. L., Guisan J. M., Garcíacalvo E.: Biotechnol. Lett. 20, 57 (1998).
32. Lee S. L., Cheng H. Y., Chen W. C., Chou C. C.: Proc. Biochem. 33, 453 (1998).
33. Sun M. Y., Nghiem N. P., Davison B. H., Webb O. F., Bienkowski P. R.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 70, 429 (1998).
34. Czaczyk K., Trojanowska K., Albrecht A.: Folia Microbiol. 40, 337 (1995).
35. Doran P. M., Bailey J. E.: Biotechnol. Bioeng. 28, 73 (1986).
36. Sanderson G. R., Ortega D., Sifferman E.: US 5,596,084 (1997).
37. Rochefort W. E., Rehg T., Chau P. C.: Biotechnol. Lett. 8, 115 (1986).
38. Rymowicz W., Kautola H., Wojtatowicz M., Linko Y. Y., Linko P.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 1 (1993).
39. Yokotsuka K., Yajima M., Matsudo T.: Am. J. Enol. Viticult. 48, 471 (1997).
40. Bagai R., Madamwar D.: Appl. Biochem. Biotechnol. 62, 213 (1997).
41. Roca E., Meinander N., Hahnhagerdal B.: Biotechnol. Bioeng. 51, 317 (1996).
42. Santoyo A. B., Rodriguez J. B., Carrasco J. L. G., Gomez E. G., Rojo I. A., Teruel L. M. A.: Enzyme Microb. Technol. 19, 176 (1996).
43. Roca E., Flores J., Nunez M. J., Lema J. M.: Enzyme Microb. Technol. 19, 132 (1996).
44. Yadav B. S., Rani U., Dhamija S. S., Nigam P., Singh D.: J. Basic Microbiol. 36, 205 (1996).
45. Roukas T.: J. Food Eng. 27, 87 (1996).
46. Tomáška M., Gemeiner P., Materlín I., Šturdík E., Handriková G.: Biotechnol. Appl. Biochem. 21, 347 (1995).
47. Tóth D., Tomašovičová D., Gemeiner P., Kurillová L.: Folia Microbiol. 34, 515 (1989).
48. Richter K., Ruhlemann I., Berger R.: Acta Biotechnol. 12, 229 (1992).
49. Abdelnaby M. A., Ismail A. M. S., Ahmed S. A., Fattah A. F. A.: Biores. Technol. 64, 205 (1998).
50. Abdelfattah A. F., Osman M. Y., Abdelnaby M. A.: Chem. Eng. J. 2, 189 (1997).
51. Benjamin S., Pandey A.: Proc. Biochem. 32, 437 (1997).
52. Slokoska L., Angelova M., Pashova S., Petricheva E., Konstantinov C.: Proc. Biochem. 34, 73 (1999).
53. Steighardt J., Kleine R.: Appl. Microbiol. Technol. 39, 63 (1993).
54. Kawabata N., Hatanaka H., Odaka H.: J. Ferment. Bioeng. 79, 317 (1995).
55. Simon L. M., Kotorman M., Szajani B.: Enzyme Microb. Technol. 14, 997 (1992).
56. Inoue Y., Tsuchiyama H., Tran L. T., Kosugi N., Kimura A.: J. Ferment. Bioeng. 73, 116 (1992).
57. Englbrecht U., Schmidt H. L.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 53, 397 (1992).
58. Rogalski J., Dawidowicz A. L., Wojtaswasilewska M.: Acta Biotechnol. 12, 191 (1992).
59. Iwasaki K., Nakajima M., Sasahara H.: Proc. Biochem. 28, 39 (1993).
60. Salter G. J., Kell D. B., Ash L. A., Adams J. M., Brown A. J., James R.: Enzyme Microb. Technol. 12, 419 (1990).
61. Lev O., Tsionsky M., Rabinovich L., Glezer V., Sampath S., Pankratov I., Gun J.: Anal. Chem. 67, 22 (1995).
62. Chatterjee S., Grethlein A. J., Worden R. M., Jain M. K.: J. Ferment. Bioeng. 81, 158 (1996).
63. Isono Y., Araya G., Hoshino A.: Proc. Biochem. 30, 743 (1995).
64. Love G., Gough S., Brady D., Barron N., Nigam P., Singh D., Marchant R., Mchale A. P.: Bioproc. Eng. 18, 187 (1998).
65. Elsayed A. M. M., Abdulwahid K., Coughlin R. W.: Biotechnol. Bioeng. 40, 617 (1992).
66. Krisch J., Szajani B.: Biotechnol. Lett. 18, 393 (1996).

67. Park Y. S., Ohta N., Okabe M.: *J. Ferment. Bioeng.* 78, 265 (1994).
68. Gemeiner P., Štefuca V., Báleš V.: *Enzyme Microb. Technol.* 15, 551 (1993).
69. Lee D. C., Lee S. G., Kim H. S.: *Enzyme Microb. Technol.* 18, 35 (1996).
70. West T. P., Strohfus B.: *Microbios* 88, 177 (1996).
71. Bric J. M., Bostock R. M., Silverstone S. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 535 (1991).
72. Guenette M. E., Duvnjak Z.: *Acta Biotechnol.* 15, 381 (1995).
73. Razmovski R., Pejin D.: *Folia Microbiol.* 41, 210 (1996).
74. Fiedurek J., Szczodrak J.: *Starch/Staerke* 47, 196 (1995).
75. Barker S. A., v knihe: *Biosensors. Fundamentals and Applications* (Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S., ed.), str. 85. Oxford University Press, New York 1987.
76. Cabral J. M. S., Cardosa J. P., Novais J. M., Kennedy J. F.: *Enzyme Microb. Technol.* 6, 365 (1984).
77. Lim F.: US 4,352,883 (1982).
78. Vaniersel M. F. M., Meersman E., Arntz M., Rombouts F. M., Abee T.: *J. Inst. Brew.* 104, 131 (1998).
79. Furuta H., Arai T., Hama H., Shiomi N., Kondo A., Fukuda H.: *J. Ferment. Bioeng.* 84, 169 (1997).
80. Callander I. J., Barford J. P.: *Biotechnol. Lett.* 5, 153 (1983).
81. Masschelein C. A.: *Proc. Eur. Brew. Conv. 22nd Congress, Zürich 1989*, str. 785.
82. Pilkington P. H., Margaritis A., Mensour N. A., Russell I.: *J. Inst. Brew.* 104, 19 (1998).
83. Masschelein C. A., Ryder D. S., Simon J. P.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 155 (1994).
84. Šmogrovicová D., Dömény Z., Gemeiner P., Malovíková A., Šturdík E.: *Biotechnol. Tech.* 11, 261 (1997).
85. Dömény Z., Šmogrovicová D., Gemeiner P., Šturdík E., Pátková J., Malovíková A.: *Biotechnol. Lett.* 20, 1041 (1998).
86. Crapisi A., Nuti M. P., Spettoli P., Zamorani A.: *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 310 (1987).
87. Kosseva M., Beschkov V., Kennedy J. F., Lloyd L. L.: *Proc. Biochem.* 33, 793 (1999).
88. Diviès C., Cachon R., Cavin J. F., Prevost H.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 135 (1994).
89. Kearney L., Upton M., McLoughlin A. J.: *Appl. Microbiol. Technol.* 33, 648 (1990).
90. McLoughlin A. J., Champagne C. P.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 179 (1994).
91. Champagne C. P., Lacroix C., Sodini-Gallot I.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 109 (1994).
92. Kirk L. A., Doelle H. W.: *Biotechnol. Lett.* 16, 533 (1994).
93. Ge Y. B., Zhou H., Kong W., Tong Y., Wang S. Y., Li W.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 69, 203 (1998).
94. Petruccioli M., Piccioni P., Fenice M., Federici F.: *Biotechnol. Lett.* 16, 939 (1994).
95. Dallmann K., Orosz L. S., Szajani B.: *Biotechnol. Lett.* 19, 123 (1997).
96. Velizarov S. G., Rainina E. I., Sinitsyn A. P., Varfolomeyev S. D., Lozinsky V. I., Zubov A. L.: *Biotechnol. Lett.* 14, 291 (1994).
97. Tanaka T., Yamamoto K., Towprayoon S., Nakajima H., Sonomoto K., Yokozeki K., Kubota K., Tanaka A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 564 (1989).
98. Fujimura M., Chibata I., Kato J., Tosa T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 79 (1984).
99. Cao N. J., Du J. X., Gong C. S., Tsao G. T.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63, 387 (1997).
100. Goksungur Y., Guvenc U.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 131 (1999).
101. Benito G. G., Ozores M., Pena M.: *Biores. Technol.* 49, 209 (1994).
102. Jang K. H., Jung S. J., Chang H. S., Chun U. H.: *Proc. Biochem.* 31, 485 (1996).
103. Norton S., Vuilleumard J. C.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 193 (1994).

M. Navrátil and E. Šturdík (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Chemical Aspects of Immobilized Systems in Biotechnologies**

Biotechnological applications using immobilized systems have recorded fast development in last years. The paper tries to deal with chemical aspects of immobilized biotechnologies. It is aimed primarily at definition of immobilization techniques and their modifications. For every method, the principle of immobilization and the most frequently used carriers are described. The appropriate matrix materials such as agar, agarose, κ-carrageenan, alginate, pectates, protein carriers, chitosan, polyacrylamide and other synthetic carriers are characterized more in detail. Basic principles of covalent coupling are presented as chemical equations. Several examples of applications of immobilized systems in both food and non-food biotechnological processes are mentioned.