

APLIKÁCIA BIOSENZOROV PRI MONITOROVANÍ FERMENTAČNÝCH PROCESOV

MILAN VALACH^a a ERNEST ŠTURDÍK^b

^a Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, ^b Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská Technická Univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
valach@fpharm.uniba.sk

Došlo 29.10.07, prepracované 27.5.08, prijaté 4.6.08.

Kľúčové slová: biosenzory, monitorovanie, vzorkovanie, fermentačné procesy

Obsah

1. Úvod
2. Vzorkovanie
3. Monitorovanie fermentácií
4. Prietokový systém analýzy
5. Využitie biosenzorov pri monitorovaní fermentačných procesov
6. Záver

1. Úvod

Monitorovanie bioprocessov je primárnym zdrojom dát, ktoré slúžia na identifikáciu kľúčových procesových parametrov, preto zohráva nezastupiteľnú úlohu pri ich optimalizácii a aktívnom zasahovaní do priebehu procesu^{1,2}. Bežne využívané monitorovacie zariadenia umožňujú sledovanie niektorých základných parametrov bioprocessov napr. koncentráciu rozpustného kyslíka a oxidu uhličitého, pH, teplotu, redoxný potenciál, otáčky miešadla, tvorbu peny a pod. Z novších aplikácií analytických techník v monitorovaní bioprocessov možno spomenúť „on-line“ sledovanie koncentrácie biomasy *in situ* s využitím optickej denzitometrie a fluorimetrie^{3,4} alebo sledovanie množstva tvorby inklúzných teliesok počas produkcie proteínov pomocou merania impedancie⁵. Uvedené parametre poskytujú však len nepriame informácie o priebehu fermentačných procesov. Veľmi cenné informácie nám poskytuje hlavne monitorovanie koncentrácie substrátov a produktov počas priebehu bioprocessov a práve na tieto účely sa štandardne využíva metóda HPLC, ktorá je založená na účinnej separácii jednotlivých zložiek komplexných médií. Najnovším trendom

v aplikovanom „on-line“ monitorovaní rôznych analytov sa stáva využitie biosenzorov.

Biosenzory ako analytické detektory predstavujú príkladné spojenie interdisciplinárnych poznatkov biológie, biochémie, fyzikálnej a analytickej chémie. Spoločnou črtou princípu práce biosenzorov je interakcia biologického komponenta so stanovovaným substrátom, ktorá je zdrojom impulzu spracovateľného prevodníkom na elektronický signál úmerný koncentrácii stanovovaného analytu⁶. Výhody týchto zariadení sú rýchlosť, špecifickosť a mobilita stanovenia s minimálnou resp. žiadnou predúpravou analyzovaných vzoriek. Vôbec prvým biosenzorom bol detektor skonštruovaný Clarkom a Lyonsom⁷ v roku 1962. L. C. Clark je však skôr známy ako vynálezca kyslíkového senzora⁸. Pôvodný motív na využitie Clarkovho kyslíkového článku bolo sledovanie koncentrácie rozpustného kyslíka v krvi počas klinických zásahov. Spomínaný autor na povrch kyslíkového senzora imobilizoval enzým glukózooxidázu a tento prvý biosenzor stanovoval koncentráciu glukózy na základe úbytku kyslíka spotrebovaného pri enzymatickej reakcii. Takýmto analytickým zariadením sa rozšíri špecifita i rozsah stanoviteľných substrátov oproti senzorum založeným na princípe fyzikálnochemického prevodníka. Rôznymi kombináciami biologickej časti s prevodníkom možno docieľiť veľké množstvo rôznych konštrukcií. Nezanedbateľnými prednosťami sú tiež možnosti jednoduchšej automatizácie či kontinualizácie merania a hlavne cenová nenáročnosť. Informácie o chovaní sa biosystému získané v čo najkratšom čase sú nevyhnutné pre dokonalejšie modelovanie a účinnejšie riadenie procesu⁹. Včasným zásahom do bioprocessu na základe rýchlo získaných informácií možno vo veľkovýrobnej praxi predísť značným ekonomickým stratám.

2. Vzorkovanie

Úlohou vzorkovania je rýchly a spoľahlivý odber reprezentatívnej vzorky fermentačného média. Špecifickým problémom pri vzorkovaní prebiehajúceho bioprocessu je potreba zachovať aseptickosť prostredia, ktorá je nevyhnutnou podmienkou pre optimálne pokračovanie celého procesu. Najjednoduchším riešením je priamy odber vzorky pomocou katétra zavedeného do fermentora¹⁰. Aby vzorka poskytovala reprezentatívne údaje o zložení fermentačného média v momente odberu, musia byť metabolické reakcie rýchlo zastavené, napr. prídavkom chloramínu¹¹, rýchlym znížením teploty, alebo znížením pH (cit.¹²). Aplikácia biosenzorov v monitorovaní však neumožňuje takto chemicky upravovať vzorku, pretože inaktivačné činidlá by nepriaznivo ovplyvňovali aj analytické charakteristiky samotného biosenzora. Okrem toho

väčšina štandardných analytických metód vyžaduje odstránenie tuhých zložiek z analyzovanej matrice, preto je význam priameho odberu vzoriek z fermentačného zariadenia spojený s následnou inaktiviáciou metabolických aktivít diskutabilný¹³. Z uvedeného dôvodu sa pri vzorkovaní fermentačných procesov častejšie využívajú metódy, pri ktorých je vzorkovanie spojené so separáciou biomasy. Medzi najpoužívanejšie patria dialýza¹⁴ a mikrofiltrácia. Semipermeabilný efekt pórovitej membrány umožňuje efektívne separovať biomasu a iné vysokomolekulové komponenty pri odbere vzoriek z fermentačného média, čím dochádza hneď po odbere vzorky k zamedzeniu metabolickej aktivity, ktorá by mohla ďalej ovplyvňovať zloženie odoberanej vzorky.

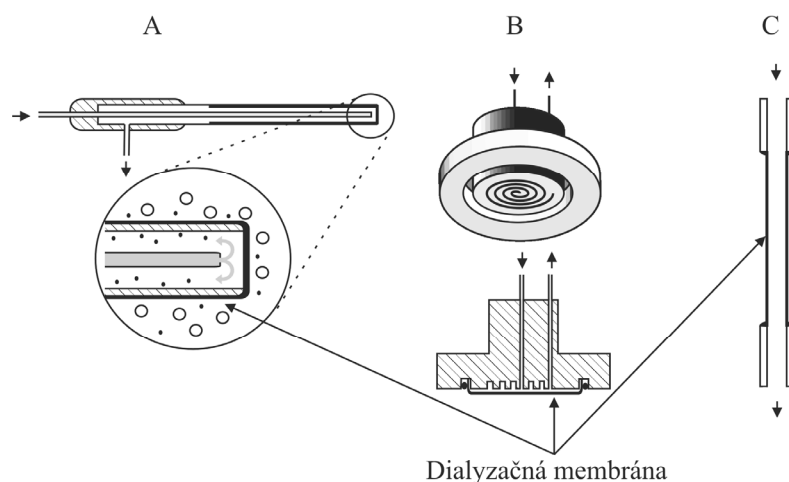
Pri dialýze sa ako hnacia sila separácie uplatňuje len koncentračný gradient, umožňujúci prechod separovaných zložiek z fermentačného média do akceptornej fázy, ktorá obyčajne pozostáva len z vody alebo z príslušného tlmivého systému. Vzhľadom na nekvantitatívny charakter dialyzačnej separácie vyžadujú tieto systémy presné určenie koeficientov prechodu separovaných zložiek pri používaných prevádzkových parametroch systému. Preto si takéto zariadenia vyžadujú dôkladnú kalibráciu. V literatúre bolo opísané zariadenie úspešne pracujúce na báze spojenia dialyzačnej sondy s biosenzormi pri simultánnom monitorovaní glukózy a laktátu v prietokovom usporiadaní¹⁵. Taktiež bol pripravený senzor na kombinované stanovenie glukózy, glutamátu a cholínu využívajúci príslušné oxidázy imobilizované na mikroelektródach umiestnených na spoločnom sklenenom čipe vytvárajúcom prietokovú celú. Takto pripravený systém bol spojený s mikrodialyzačnou sondou¹⁶. Rôzne typy konštrukcie dialyzačných sond sú znázornené na obr. 1.

Pri filtrácii je hnacou silou separácie tlakový gradient pred resp. za filtračnou membránou. Porozita mikrofiltráčnej membrány (0,1–10 μm) umožňuje prechod všetkých

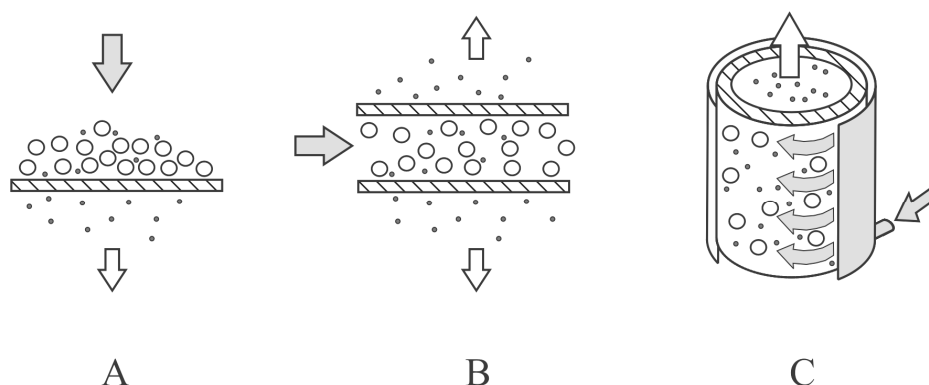
rozpusťných zložiek. Pri použití ultrafiltrácie (póry < 100 nm) porozita membrány limituje aj prechod rozpustných makromolekulových komponentov. Koncentračné pomery vo vzorkách pripravených filtráciou zodpovedajú (na rozdiel od dialýzy) skutočným koncentráciám zložiek rozpustených vo fermentačnom médiu. Hlavnou nevýhodou filtrácie je zanášanie filtračnej membrány. Tento problém je možné minimalizovať pomocou tangenciálnej a „cross-flow“ filtrácie, pri ktorých prúdi filtrované médium paralelne s povrchom filtračnej membrány, na rozdiel od kolmého prúdenia pri štandardnej filtrácii (obr. 2).

Práve *ex-situ* filtrácia bola použitá aj pri uplatnení biosenzora postaveného na báze inkorporácie enzýmu alkoholdehydrogenázy do polypyrolismiového polyméru pri monitorovaní etanolovej fermentácie. Autori inkorporovali senzor do prietokového sekvenčného analyzátora umožňujúceho plne automatické a reprodukovateľné riedenie vzoriek a štandardov. Celý monitorovací systém bol potom veľmi prakticky prepojený na fermentor pomocou kombinácie uzavretej slučky so vstavaným „cross-flow“ filtračným zariadením a jednoduchkej odbublínovacej komory (odstraňovanie CO_2 vzniknutého počas fermentácie). Životaschopnosť tohto zariadenia bola otestovaná pri „on-line“ monitorovaní vínneho kvasenia vo vinárskych závodoch v maďarskej tokajskej oblasti (celkový objem fermentora 45 hl)¹⁷. Na „on-line“ monitorovanie etanolovej fermentácie pomocou biosenzora bolo tiež úspešne použité aj filtračné zariadenie s tangenciálnym tokom pri vädzaného média¹⁸.

Všeobecne však možno povedať, že medzi najpoužívanejšie automatizované spôsoby vzorkovania fermentačných procesov patria hlavne filtračné metódy a dialyzačné zariadenia. Menej využívané postupy separácie biomasy sú založené na mikrocentrifugácii, ktorá nachádza uplatnenie v plne automatických zariadeniach pre „on-line“ monitorovanie¹⁹.



Obr. 1. Konštrukcie sond používaných na dialyzačné vzorkovanie; A – koaxiálna sonda, B – planárna sonda, C – sonda na báze dutého vlákna



Obr. 2. **Principiálne zobrazenie rôznych spôsobov filtrácie;** A – klasická filtrácia s kolmým tokom média na filtračnú membránu, B – „cross-flow“ filtrácia s rovnobežným tokom, C – filtrácia s tangenciálnym tokom. Tmavá šípka označuje tok suroviny a svetlá tok filtrátu

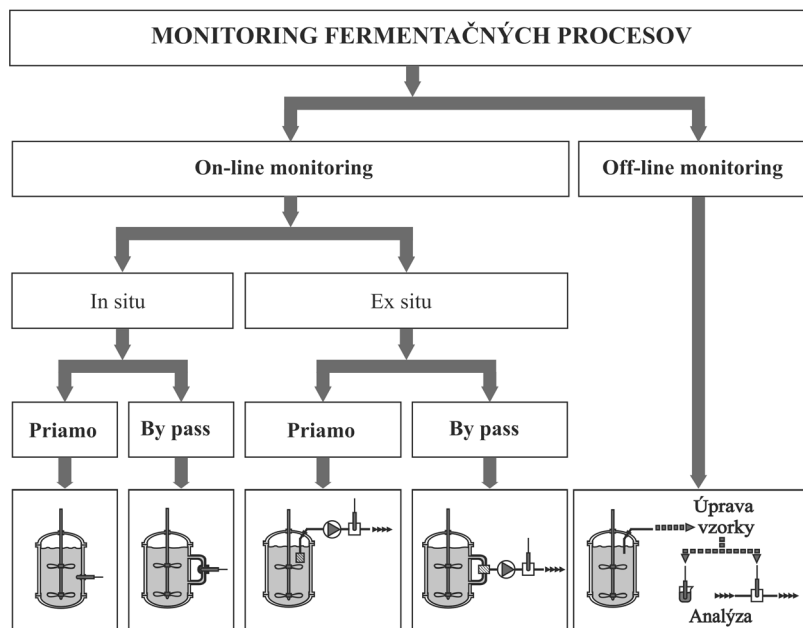
3. Monitorovanie fermentácií

Na základe spôsobu integrácie senzorov do sledovania fermentačného procesu môžeme monitorovacie techniky rozdeliť na „off-line“ a „on-line“. „Off-line“ technika monitorovania fermentačných procesov je založená na manuálnom odbere vzorky z monitorovaného systému, pričom následné spracovanie vzorky a samotné stanovenie prebieha na inom mieste zväčša v laboratóriu. Hlavnou nevýhodou „off-line“ systému je dlhé časové oneskorenie medzi momentom odberu vzorky a analýzou, ktoré v mnohých prípadoch znemožňuje efektívne zasahovať do priebehu procesov vyznačujúcich sa vysokou dynamikou. Napríklad pri sledovaní priebehu fermentačných procesov s použitím baktérií by vo väčšine prípadov časové oneskorenie nemalo presahovať niekoľko minút vzhľadom na krátku generačnú dobu. Pri použití rýchlych biokonverzných enzýmových systémov by sa časové oneskorenie malo približovať k sekundám. Miernou modifikáciou „off-line“ monitoringu je „at-line“ monitoring²⁰, pri ktorom je meracie zariadenie umiestnené v tesnej blízkosti sledovaného procesu, ale stále je potrebná manuálna manipulácia s analyzovaným materiálom. „On-line“ monitorovanie rieši časové oneskorenie „off-line“ monitorovania priamou aplikáciou detekčného člena do fermentačnej nádoby (*in-situ* usporiadanie), kde sú na detektor kladené vysoké stabilitné nároky. *In-situ* aplikácie biosenzorov sú veľmi zriedkavé. Je to dané problémami s ich sterilizáciou, nízkou stabilitou biokomponentov voči pôsobeniu určitých fyzikálno-chemických faktorov. Pri *ex-situ* „on-line“ usporiadaní je detektor umiestnený mimo fermentačného zariadenia vo vhodnom prietokovom usporiadaní, ktoré je pripojené cez vzorkovací modul slúžiaci zároveň aj na predúpravu vzorky. Takéto usporiadanie umožňuje zabezpečiť pre funkciu biosenzora optimálne podmienky (obr. 3).

4. Prietokový systém analýzy

Najrozšírenejšou prietokovou technikou využívanou v analytickej praxi je metóda prietokovej injekčnej analýzy (Flow Injection Analysis – FIA). Metóda bola zavedená v polovici 70. rokov Růžičkom a Hansenom²¹. Modifikácie FIA vzhľadom na svoju jednoduchú automatizovateľnosť a reprodukovateľnosť dominujú medzi prietokovými metódami využívanými pre „on-line“ monitorovanie rôznych procesov. FIA je založená na včlenení malého objemového pulzu analyzovanej vzorky (5–100 μ l) do laminárneho toku mobilnej fázy (obr. 4). V priebehu transportu medzi dávkovacím ventilom a detekčnou časťou dochádza k postupnej disperzii pulzu vzorky v mobilnej fáze, čo spôsobuje zníženie maximálnej koncentrácie v zóne vzorky a zároveň rozšírenie zóny. Tento proces vedie k automatickému nariadeniu vzorky, ktoré je v mnohých prípadoch potrebné pre analýzu s využitím biosenzorov s ohľadom na ich obmedzený dynamický rozsah. Kontakt vzorky s detektorom trvá reprodukovateľný časový úsek, pričom nie je potrebné ustálenie rovnováhy, čo umožňuje skrátiť čas analýzy. Okrem biosenzorov sa vo FIA aplikáciách používajú najčastejšie IR²², spektrofotometrické²³, MS²⁴, PIF (photochemically induced fluorescence)²⁵, a vodivostné²⁶ detektory.

Veľmi úspešnou metodikou vyvinutou pri odstraňovaní nedokonalostí klasického FIA systému je sekvenčná injekčná analýza (Sequential Injection Analysis – SIA), kde je spojitý tok nosného média nahradený sekvenciou: nosné médium, vzorka prípadne potrebné činidlá na detekciu v jednom prúde, čo je v tomto prípade umožnené automatickým nasávaním jednotlivých zložiek cez selekčný ventil pomocou piestového čerpadla umožňujúceho priamy aj spätný tok²⁷ (obr. 4). Pomocou tejto metodiky možno aj jednoducho a veľmi reprodukovateľne riediť vzorky, prípadne štandardy priamo počas analýzy v automatizovanom režime naprogramovaním patričnej sekvencie jednotlivých



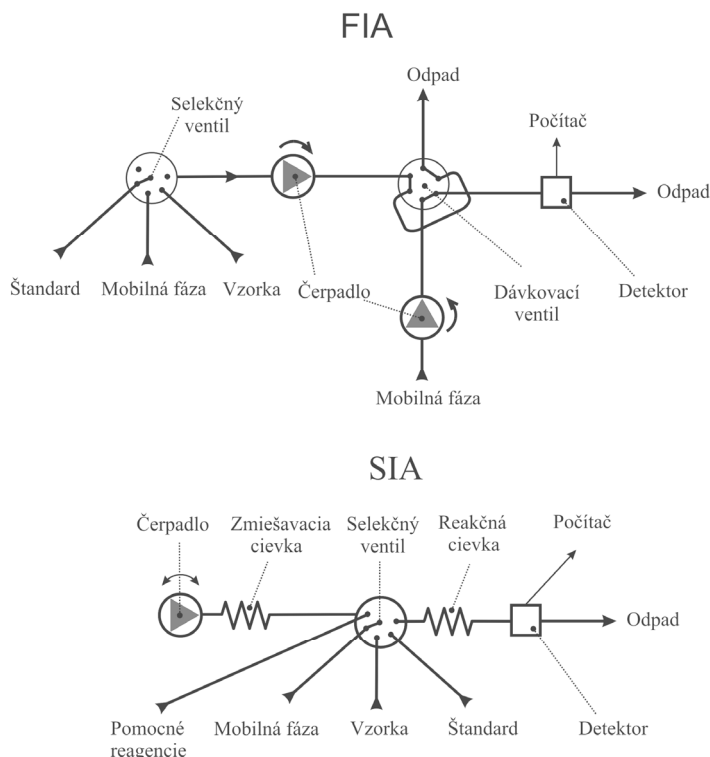
Obr. 3. Schematické znázornenie možností spôsobov monitorovania fermentačných procesov

krokov²⁸. Naproti tomu v klasických FIA zostavách muselo byť riadenie vzoriek často riešené pomocou delenia toku^{29,30} alebo s použitím rôznych zmiešavacích komôr³¹, čo značne komplikovalo celú zostavu. Rozšírenie prietokových injekčných techník v posledných rokoch dokumentuje ich významné postavenie v snahách o automatizáciu, zrýchlenie a miniaturizáciu zariadení slúžiacich na reprodukovateľnú aplikáciu, prípadne predúpravu analyzovaných matric³².

Najnovším trendom miniaturizácie prietokových meracích systémov je vývoj takzvaných „lab on a chip“ zariadení. Vo všeobecnosti ide o prípravu sofistikovane navrhnutých čipov obsahujúcich zostavu mikro kanálikov vyrobených kombináciou technológie fotolitografie a leptania³³, poprípade s použitím lasera³⁴. Keďže pri práci s takýmito zariadeniami sa manipuluje s extrémne malými objemami či už vzoriek, činidiel alebo nosných médií, je samozrejme potrebné požívať adekvátne vybavenie pre vytváranie prietoku cez opísané zariadenia. Najčastejšie sa používajú piestové SIA mikrodávkovacie zariadenia dodávajúce do systému presné objemy na úrovni nanolitrov³⁵ alebo tiež elektroosmoticky indukovaný tok³⁶ vyvolaný usmerneným pohybom iónov, pri ktorom zároveň dochádza aj k elektroforetickej separácii analyzovanej vzorky³⁷. Detekčný systém používaný v biočipoch býva veľmi často založený na elektrochemickom princípe, pričom na zvýšenie selektivity detekcie slúži tiež uplatnenie biokomponentov poskytujúcich špecifické interakcie (princíp biosenzora).

5. Využitie biosenzorov pri monitorovaní fermentačných procesov

Biosenzor je zariadenie pozostávajúce z biologickej časti, ktorá sa nachádza v tesnom kontakte s fyzikálnochemickým prevodníkom alebo je súčasťou prevodníka. Podľa definície a klasifikácie IUPAC by sa mali okrem biosenzorov rozlišovať bioanalytické systémy, ktoré vyžadujú pri meraní ďalšie operácie a biosondy, ktoré sú buď na jedno použitie alebo nemôžu sledovať koncentráciu analytu kontinuálne. Fyzikálnochemický prevodník je schopný detegovať zmeny, ktoré vznikajú po interakcii biokomponenta so substrátom, takže biointerakcia sa prevádza na vhodný analytický signál, ktorým obyčajne býva elektrický prúd alebo potenciál (obr. 5). Najfrekvencovanejším prevodníkom je ampérometrický prevodník v spojení so sledovaním priebehu redoxných procesov. Tento prevodník je polarizovaný určitým potenciálom a biokomponent pri oxidácii substrátu odovzdáva elektróny elektróde (pri redukcii opačne) nie vždy len priamo, ale často aj prostredníctvom iných molekúl, ktorými môžu byť kosubstrát, kofaktor alebo mediátor, pričom veľkosť tečúceho prúdu je priamo úmerná koncentrácii analytu. Potenciometrický prevodník umožňuje merať zmenu potenciálu, vyvolanú koncentračným gradientom iónov, ktoré vznikajú činnosťou enzýmov imobilizovaných na povrchu elektród. Zmena potenciálu je úmerná logaritmu koncentrácie analytu. Kalorimetrické biosenzory, nazývané aj termistory, poskytujú univerzálny detekčný princíp, pretože uvoľňovanie alebo spotreba tepla je typická pre všetky bioche-

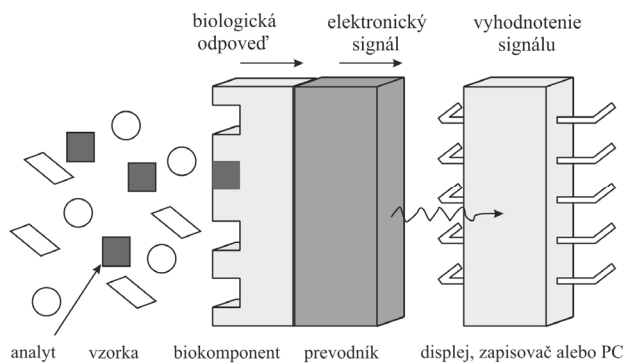


Obr. 4. Schéma dvoch základných systémov používaných pri prietokovom spôsobe analýzy; FIA – prietoková injekčná analýza, SIA – sekvenčná injekčná analýza

mické deje. Prístroj je konštruovaný tak, že jedna vetva je referenčná a v druhej vetve je imobilizovaný biokatalyzátor, pričom sa zaznamenáva rozdiel teplôt (rádovo 10^{-3} °C), ktorý je úmerný koncentrácii stanovovanej látky³⁸. Biosenzory s optickým prevodníkom fungujú tak, že biokatalyzátor produkuje alebo spotrebúva látku s optickými vlastnosťami a koncentrácia analytu sa určuje na základe merania vhodnej optickej veličiny, napríklad absorpcie, emisie svetla, fluorescencie, atď. Okrem opísaných spôsobov detekcie biointerakcií sa ešte v menšej miere používajú aj konduktometrické a piezoelektrické prevodníky.

Biologická časť (enzýmy, bunky, protilátky, atď.) sa vyznačuje špecifitou interakcie so stanovovanou látkou. Citlivosť senzora pritom závisí na biologickej časti, ale aj na použítom prevodníku. Pri enzymatických biosenzoroch plní funkciu biologickej časti senzora enzým alebo aj viac enzýmov. Takéto senzory sa vyznačujú väčšinou výbornou selektivitou a sú určené na špecifické sledovanie jedného substrátu, resp. malej skupiny látok podobnej povahy. Publikovaný bol prietokový systém založený na špecifických enzýmoch izolovaných z mikroorganizmov (*Erwinia sp.*, *Gluconobacter sp.*) schopný monitorovať súčasne hladinu glukózy, glycerolu a etanolu vo vzorkách vína. Využitý bol ampérometrický spôsob detekcie, pričom jednotlivé senzory boli namontované v spoločnej prietokovej

cele a boli zapojené do viacerých potenciostatov. Každý potenciostat poskytoval signál prislúchajúci jednému senzoru t.j. jednému analytu. Z hľadiska konštrukcie boli jednotlivé senzory pripravené zmiešaním enzýmu s redoxným polymérom (mediátor elektrónového transportu) a sieťovacím číničom na povrchu uhlíkovej elektródy³⁹. Na ampérometrickom spôsobe detekcie bol založený aj senzor schopný enantioselektívneho stanovenia D-amino-kyselín nachádzajúcich sa vo vzorkách mlieka. Senzor bol



Obr. 5. Základný princíp funkcie biosenzora

Tabuľka I
Príklady použitia biosenzorov pri monitorovaní rôznych analytov

Analyt	Biologický komponent	Prevod signálu	Typ imobilizácie	Aplikácia	Lit.
Etanol	alkoholdehydrogenáza	ampérometrický	Inkorporácia do polypyrol-osmiového polyméru	fermentačná výroba vína	17
Glukóza	glukózadehydrogenáza	ampérometrický	zosieťovanie s hydrogélom	analýza vzoriek vína	39
Acetát	acetátkináza pyruvátkináza laktátdehydrogenáza	ampérometrický	zosieťovanie na povrchu uhlíkovej elektródy	fermentačná výroba vína	42
Glycerol	glycerolkináza	kalorimetrický	väzba na modifikované sklené guľičky	konverzia glycerolu na 1,3-propándiol	41
D-Aminokyseliny	oxidáza D-aminokyselín	ampérometrický	zosieťovanie na povrchu uhlíkovej elektródy + nafion	analýzy ovocných džúsov a mlieka	40
Glutamát					
Kys. jablčná	malátdehydrogenáza	ampérometrický	väzba na modifikované sklené guľičky	jablčno-mliečna fermentácia	43
Kys. mliečna	laktátoxidáza	ampérometrický	zosieťovanie na povrchu nylonovej membrány	jablčno-mliečna fermentácia	43
BSK ^a	<i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	ampérometrický	inkorporácia do sol-gélu	hodnotenie kvality odpadových vôd	46
Metylparatión	<i>Flavobacterium sp.</i>	optický	adsorpcia na filter zo sklenených vlákien	analýza organofosfátových pesticídov	54

^a Biologická spotreba kyslíka

vyrobený progresívnou „screen-printed“ technológiou nanášania jednotlivých aktívnych vrstiev na seba⁴⁰. Pomocou biosenzora postaveného na báze enzýmového termistora s glycerolkinázou (EC 2.7.1.30) imobilizovanou na upravených sklenených guľôčkach bola monitorovaná hladina substrátu počas mikrobiálnej konverzie glycerolu na 1,3-propándiol. Výborná operačná aj skladovacia stabilita tohto senzora umožňovali jeho aplikáciu v plne automatizovanom FIA systéme vybavenom dokonca aj zariadením pre automatické riedenie vzoriek⁴¹. Na monitorovanie acetátu vo vzorkách octu a hroznového vína bol pripravený trojenzýmový senzor imobilizáciou acetátkinázy (EC 2.7.2.1), pyruvátkinázy (EC 2.7.1.40) a laktátdehydrogenázy (EC 1.1.1.27) zosieťovaním na povrchu uhlíkovej elektródy pomocou polyetylénglykoldiglycidyléteru. Takýto senzor pracoval na ampérometrickom princípe detekcie a vyznačoval sa veľmi dobrou selektivitou⁴². V prietokovom FIA usporiadaní boli použité aj senzory na monitorovanie jablčno-mliečnej fermentácie počas výroby vína. Pracovali na ampérometrickom spôsobe detekcie. Obsah kyseliny mliečnej bol monitorovaný senzorom, ktorý obsahoval imobilizovanú laktátoxidázu (1.13.12.4) na povrchu nylonovej membrány a kyselina jablčná bola detegovaná s využitím malátdehydrogenázy (EC 1.1.1.40) imobilizovanej na povrchu upravených sklenených guľôčok integrovaných do miniatúrneho prietokového reaktora⁴³.

Mikrobiálne biosenzory obsahujú v úlohe biologickej zložky mikrobiálne bunky buď intaktne, permeabilizované, inak upravené alebo mŕtve. Tieto senzory sú menej špecifickejšie ako enzýmové, keďže bunky obsahujú viac druhov enzýmov katalyzujúcich rôzne reakcie, preto sa okrem detekcie jedného analytu používajú aj pri nešpecifických stanoveniach širších skupín látok alebo ich konkrétnych vlastností (napr. toxicita). Úspešne sa používajú pri hodnotení kvality odpadových vôd meraním biologickej spotreby kyslíka (BSK) (cit.⁴⁴). V tomto prípade efektívne nahrádzajú klasické kultivačné merania, ktoré boli veľmi časovo náročné (BSK₅ – 5 dní, resp. BSK₇ – 7 dní), čo samozrejme neumožňovalo adekvátnu kontrolu niektorých prebiehajúcich procesov. Naproti tomu sa meranie BSK pomocou biosenzorov skraca len na pár minút⁴⁵. Keďže pri stanovení BSK ide o sledovanie širšej skupiny látok prevažne organickej povahy, tak sa na prípravu biosenzorov založených na Clarkovom kyslíkovom senzore používa častejšie viacero druhov mikroorganizmov súčasne kvôli schopnosti detekcie čo najširšej palety substrátov. Najčastejšie sú pritom používané bunky *Trichosporon cutaneum*⁴⁶, *Bacillus subtilis*⁴⁷, *Pseudomonas sp.*^{48,49} ale aj zmesové kultúry získané z aktivovaných kalov⁵⁰. Okrem živých buniek boli tiež úspešne pripravené aj senzory s použitím tepelne usmrtených buniek^{51,52} s porovnateľnými výsledkami. Ďalej boli mikrobiálne senzory úspešne aplikované aj pri monitorovaní iných analytov.

Biosenzor postavený na báze buniek *Gluconobacter oxydans* bol použitý na stanovenie obsahu cukrov v lignocelulóзовých hydrolyzátoch⁵³. Na optickom princípe detekcie bol pripravený senzor na detekciu organofosfátových pesticídov s použitím buniek *Flavobacterium sp.*, ktoré boli uchytené na filtri zo sklenených vlákien a spojené s miniatúrnym spektrofotometrom pomocou optického vlákna⁵⁴.

Dôležitým obmedzením masového používania biosenzorov pri monitorovaní rozličných biotechnologických procesoch je ich nízka tepelná a operačná stabilita. Dlhodobá stabilita imobilizovaného biokomponenta má mnoho spoločného aj so stabilitou konformácie imobilizačnej matrice alebo s jej denaturáciou počas prevádzky a skladovania, hoci vplyv môžu mať aj iné slabšie interakcie. Z tohto dôvodu je zaujímavou výzvou pri vytváraní imobilizačného materiálu hľadanie vhodných aditív, ktoré by obmedzili proces zmenšovania pórov. Jedným s takýchto aditív je napríklad hydroxyetylkarboxymetyl celulóзовý polymér používaný pri vytváraní hybridného organicko-anorganického silikátového gélu⁵⁵. Príklady úspešnej aplikácie biosenzorov pri monitorovaní rôznych analytov sú prehľadne zosumarizované v tabuľke I.

6. Záver

Možnosť aktívneho riadenia a udržiavania fermentačných procesov na úrovni maximálnej produktivity je veľmi úzko spätá s efektívnym monitorovaním ich priebehu. Dôležité je pritom, aby namerané údaje boli získané v čo najkratšom časovom horizonte po odbere vzorky, pretože len v takom prípade majú relevantnú výpovednú hodnotu o momentálnom stave celého systému. Ideálnym riešením eliminácie časového oneskorenia výsledkov analýz vzoriek získavaných klasickou „off-line“ cestou je aplikácia „on-line“ monitorovania, resp. jeho modifikácií. Podstatou „on-line“ monitorovania je najčastejšie použitie prietokových techník odberu vzorky, jej reprodukovateľnej úpravy a tiež samotnej analýzy spojenej podľa možností v jednom prúde tesne za sebou. Pri odbere vzorky je dôležitá dôkladná separácia biomasy ako i enzýmových aktivít zapríčínujúcich skreslenie nameraných výsledkov. Pri samotnej analýze by mali byť pritom používané čo najselektívnejšie detekčné systémy, aby bolo možné sledovať potrebné analyty aj bez použitia ďalších separačných techník predlžujúcich dobu stanovenia. V úlohe špecifických detektorov sa stále častejšie používajú biosenzory, pre ktoré nie je potrebná prakticky žiadna predúprava prúdu analyzovanej vzorky okrem riedenia.

Podakovanie patrí Vedeckej grantovej agentúre MŠ SR a SAV za podporu riešenia projektov VEGA 1/4299/07 a 1/4452/07, a tiež agentúre APVV za podporu projektu VMSP-P-0052-07.

LITERATÚRA

1. Dochain D., Perier M.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 56, 147 (1997).
2. Montague G.: *Monitoring and Control of Fermenters*, 51. IchemE, UK 1995.
3. Vallejo L. F., Brokelmann M., Marten S., Trappe S., Cabrera-Crespo J., Hoffmann A., Gross G., Weich H. A., Rinas U.: *J. Biotechnol.* 94, 185 (2002).
4. Veal D. A., Deere D., Ferrari B., Piper J., Attfield P. V.: *J. Immun. Meth.* 243, 191 (2000).
5. Upadhyay P., Patra A. K., Mukhopadhyay R., Panda A. K.: *Biotechnol. Lett.* 23, 839 (2001).
6. Mulchandani A., Bassi A. S.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 15, 105 (1995).
7. Clark L. C., Lyons C.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102, 29 (1962).
8. Clark L. C.: *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 2, 41 (1956).
9. Schügerl K.: *J. Biotechnol.* 85, 149 (2001).
10. Baxter P. J., Christian G. D., Růžička J.: *Chem. Anal.* 40, 455 (1995).
11. Hakanson H., Nilsson M., Mattiason B.: *Anal. Chim. Acta* 249, 61 (1991).
12. Larsson G., Tornkvist M.: *J. Biotechnol.* 49, 69 (1996).
13. Vaidyanathan S., Macoloney G., Vaughan J., McNeil B., Harvey L. M.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 19, 277 (1999).
14. Moscone D.: *Compr. Anal. Chem.* 44, 579 (2005).
15. Petrou P. S., Moser I., Jobst G.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 613 (2003).
16. Gáspár S., Wang X., Suzuki H., Csöregi E.: *Anal. Chim. Acta* 525, 75 (2004).
17. Niculescu M., Erichsen T., Sukharev V., Kerényi Z., Csöregi E., Schuhmann W.: *Anal. Chim. Acta* 463, 39 (2002).
18. Buttler T., Johansson K., Gorton L., Marko-Varga G.: *Anal. Chem.* 65, 2628 (1993).
19. Turner C., Thornhill N. F., Fish N. M.: *Biotechnol. Tech.* 7, 19 (1993).
20. Arnold S. A., Gaensakoo R., Harvey L. M., McNeil B.: *Biotechnol. Bioeng.* 80, 405 (2002).
21. Růžička J., Hansen E. H.: *Anal. Chim. Acta* 99, 37 (1978).
22. Kornmann H., Valentinotti S., Duboc P., Marison I., von Stockar U.: *J. Biotechnol.* 113, 231 (2004).
23. Alves E. R., Fortes P. R., Borges E. P., Zagatto E. A. G.: *Anal. Chim. Acta* 564, 231 (2006).
24. Li H. Q., Jiku F., Schröder H. F.: *J. Chromatogr., A* 889, 155 (2000).
25. Coly A., Aaron J.-J.: *Anal. Chim. Acta* 392, 255 (1999).
26. Karmarkar S. V.: *J. Chromatogr., A* 850, 303 (1999).
27. Paseková H., Polášek M., Solich P.: *Chem. Listy* 93, 354 (1999).
28. Economou A., Panoutsou P., Themelis D. G.: *Anal. Chim. Acta* 572, 140 (2006).

29. Luca G. C., Reis B. F.: *Spectrochim. Acta, Part A* 60, 579 (2004).
30. Sakai T., Piao S., Teshima N., Kuroishi T., Grudpan K.: *Talanta* 63, 893 (2004).
31. Gálvez A. M., Mateo J. V. G., Calatayud J. M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, 535 (2002).
32. Růžička J., Hansen E.: *Trends Anal. Chem.* 17, 69 (1998).
33. McCreedy T.: *Trends Anal. Chem.* 19, 396 (2000).
34. Cheng J.-Y., Wei C.-W., Hsu K.-H., Young T.-H.: *Sens. Actuators, B* 99, 186 (2004).
35. Greenwood P. A., Greenway G. M.: *Trends Anal. Chem.* 21, 726 (2002).
36. Culbertson C. T., Ramsey R. S., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* 72, 2285 (2000).
37. Zhang Q., Xu J.-J., Chen H.-Y.: *J. Chromatogr., A* 1135, 122 (2006).
38. Sethi S. R.: *Biosens. Bioelectron.* 9, 243 (1994).
39. Niculescu M., Mieliauskiene R., Laurinavicius V., Csöregi E.: *Food Chem.* 82, 481 (2003).
40. Wcislo M., Compagnone D., Trojanowicz M.: *Bioelectrochemistry* 71, 91 (2007).
41. Štefuca V., Voštiar I., Šefčovičová J., Katrlík J., Mastihuba V., Greifová M., Gemeiner P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 1170 (2006).
42. Mieliauskiene R., Nistor M., Laurinavicius V., Csöregi E.: *Sens. Actuators, B* 113, 671 (2006).
43. Esti M., Volpe G., Micheli L., Delibato E., Compagnone D., Moscone D., Palleschi G.: *Anal. Chim. Acta* 513, 357 (2004).
44. Liu J., Mattiasson B.: *Water Res.* 36, 3786 (2002).
45. Rastogi S., Rathee P., Saxena T. K., Mehra N. K., Kumar R.: *Curr. Appl. Phys.* 3, 191 (2003).
46. Jia J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 1023 (2003).
47. Qian Z., Tan T. C.: *Water Res.* 33, 2923 (1999).
48. Yoshida N., Hoashi J., Morita T., McNiven S. J., Nakanura H., Karube I.: *J. Biotechnol.* 88, 269 (2001).
49. Chee G.-J., Nomura Y., Ikebukuro K., Karube I.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 67 (2005).
50. Liu J., Olsson G., Mattiasson B.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 562 (2004).
51. Qian Z., Tan T. C.: *Water Res.* 32, 801 (1998).
52. Tan T. C., Lim E. W. C.: *Sens. Actuators, B* 107, 546 (2005).
53. Tkáč J., Gemeiner P., Švitel J., Benikovský T., Šturdík E., Vala V., Petruš L., Hrabárová E.: *Anal. Chim. Acta* 420, 1 (2000).
54. Kumar J., Jha S. K., D'Souza S. F.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 2100 (2006).
55. Xiao W. J., Choi M. M. F.: *Anal. Chim. Acta* 514, 219 (2004).

M. Valach^a and E. Šturdík^b (^a*Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava* ^b*Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Application of Biosensors in Monitoring Fermentation Processes**

The article is focused on principal aspects of monitoring fermentation processes. Problems of sampling associated with the separation of biomass are explained mainly on the basis of various types of filtration and flow dialysis methods. The analytical flow methods FIA and SIA are briefly described with respect to their use in on-line monitoring. Some applications of biosensors in practical measurements are presented.