

## ПРАКТИКА ВИКОРИСТАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ КЛІТИН: РОЗВИТОК МЕТОДУ ТА ЙОГО ПОТЕНЦІАЛ

Ошиток Д. В., Краввич А. С.

### ВСТУП

Клітини широко визнані як молекулярні фабрики, що відіграють вирішальну роль у виробництві цінних хімічних речовин, включаючи ферменти, гормональні речовини та фармацевтичні субстанції<sup>1,2</sup>. Однак традиційне використання суспендованих вільних клітин у біотехнологічних процесах пов'язане зі значними труднощами. Хоча ці клітини невеликі за розміром і легко суспендуються в культурах, відокремлення їх від середовища стає складним завданням. Використання такого обладнання, як центрифуги, для відокремлення клітин часто призводить до високих інвестиційних витрат, споживання значної кількості енергії та потенційних ризиків забруднення при повторному завантаженні в біореактор. Крім того, культури клітин в процесі безперервної ферментації стикаються з проблемою низької щільності клітин у біореакторах, що знижує продуктивність.

Для подолання цих проблем дослідники звернулися до технології іммобілізації клітин як до перспективного рішення. Іммобілізація клітин передбачає фізичне утримання неушкоджених клітин у певній області простору зі збереженням їхньої каталітичної активності<sup>3</sup>. Спочатку розроблена на основі іммобілізації ферментів, іммобілізація клітин має певні переваги та виклики через складнощі, пов'язані з живими клітинами. Однак цілі клітини мають унікальні властивості та функції, які пропонують більше можливостей для іммобілізації, такі як самофлокуляція дріжджів, самоагрегація багатоклітинних рослинних клітин і формування біоплівки бактерій. Крім того, іммобілізовані клітини, прикріплені до поверхні або вирощені в біоплівках чи агрегатах, демонструють вищу толерантність до стресів навколишнього

---

<sup>1</sup> Verbelen PJ, De Schutter DP, Delvaux F, Verstrepen KJ and Delvaux FR, Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett.* 2006. № 28 (19). P. 1515–1525.

<sup>2</sup> Zhuang W, Liu XJ, Yang J, Wu JL, Zhou JW, Chen Y et al., Immobilization of *Clostridium acetobutylicum* onto natural textiles and its fermentation properties. *J Microbial Biotechnol.* 2017. № 10 (2). P. 502–512.

<sup>3</sup> Moon YM, Gurav R, Kim J, Hong YG, Bhatia SK, Jung HR et al. Whole-cell immobilization of engineered *Escherichia coli* JY001 with barium-alginate for Itaconic acid production. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2018. № 23 (4). P. 442–447.

середовища порівняно з вільними клітинами, що робить їх більш стійкими в різних умовах біопроцесу<sup>4</sup>.

Застосування іммобілізованих клітин у промислових процесах привертає значну увагу в останні десятиліття завдяки численним перевагам над традиційними методами. Технологія іммобілізації дозволяє утримувати клітини в біореакторах, що дає змогу досягати високої щільності клітин і полегшує їх вилучення в разі потреби. Ця технологія не тільки долає труднощі, пов'язані з поділом клітин, але й полегшує інгібування зворотного зв'язку, спричинене продуктами метаболізму, та зменшує несприятливу конкуренцію між різними мікроорганізмами в системах спільного культивування. Синергетичні ефекти іммобілізованих мікроорганізмів можуть бути посилені, що призводить до покращення продуктивності біопроцесу.

### 1. Методи іммобілізації

Методи іммобілізації з використанням допоміжних матеріалів широко застосовуються для іммобілізації клітин<sup>5</sup>. Ці методи, включаючи прикріплення, захоплення та інкапсуляцію, застосовуються до різних типів клітинних систем, таких як мікроорганізми, рослинні клітини, клітини ссавців і комах. Вибір допоміжних матеріалів є вирішальним рішенням у процесі іммобілізації клітин. В ідеалі, носії повинні мати певні характеристики: бути легкодоступними в достатній кількості і за низькою ціною, механічно, хімічно і термічно стабільними під час тривалої роботи і зберігання, мати велику площу поверхні, доступну для клітин і субстратів, містити достатню кількість функціональних груп для зв'язування клітин, не знижувати клітинну активність і не викликати лізис клітин, бути простими в обробці під час іммобілізації, піддаватися переробці або безпечній утилізації, а також мати низьку спорідненість з забруднювачами. Інші критерії, такі як фізичні властивості, здатність до біологічного розкладання, розчинність і можливість мікробного росту, є більш специфічними для конкретного застосування.

Протягом багатьох років були розроблені різні типи допоміжних матеріалів для іммобілізації клітин. До них відносяться полімерні матриці, такі як альгінат, агар, желатин, κ-карагенан, хітозан, пектин, поліакриламід, епоксидна смола і золь кремнезему, а також пористі або непористі попередньо сформовані носії, такі як деревна стружка,

---

<sup>4</sup> Pimtong V, Ounaeb S, Thitiprasert S, Tolieng V, Sooksai S, Boonsombat R et al., Enhanced effectiveness of *Rhizopus oryzae* by immobilization in a static bed fermentor for L-lactic acid production. *Process Biochem.* 2017. № 52. P. 44–52.

<sup>5</sup> D'Souza, S. F. Trends in immobilized enzyme and cell technology. *Indian J. Biotechnol.* 2002. № 1. P. 321–338.

нержавіюча сталь, бавовняна тканина, пористі частинки скла, целюлоза і пористий діоксид кремнію.

Імобілізація клітин має низку переваг у різних сферах застосування<sup>6</sup>. Вона дозволяє повторно використовувати клітини, зменшує ризик вимивання або втрати клітин під час безперервних процесів, а також дає змогу контролювати розподіл і просторову організацію клітин. Імобілізовані клітини також демонструють підвищену стабільність і стійкість до суворих умов навколишнього середовища порівняно з вільними клітинами. Ця стабільність робить їх придатними для тривалої експлуатації та багаторазового використання. Крім того, іммобілізовані клітини можна легко відокремити від реакційної суміші, що спрощує подальшу обробку і відновлення продукту.

Деякі з найпоширеніших застосувань іммобілізованих клітин включають:

1. Біокаталіз: Імобілізовані ферменти або цілі клітини можна використовувати як каталізатори в різних біокаталітичних реакціях, таких як біотрансформації, біоперетворення та ферментативний синтез. Імобілізація підвищує стабільність ферментів, полегшує їх відокремлення від реакційної суміші та уможливорює повторне використання.

2. Біомедичне застосування: Імобілізовані клітини використовуються в тканинній інженерії та регенеративній медицині для виробництва штучних тканин і органів. Вони також можуть бути використані в системах доставки ліків і біологічно активних пристроях, що імплантуються.

3. Використання в якості біосенсорів: Імобілізовані клітини або ферменти інтегруються в біосенсорні пристрої для виявлення і вимірювання різних аналітів, включаючи глюкозу, холестерин і забруднювачі навколишнього середовища. Імобілізація підвищує стабільність і чутливість біосенсорів.

### **1.1. Адсорбція**

Адсорбція – це один із способів прикріплення до поверхні, який ґрунтується на електростатичних взаємодіях (силах Ван-дер-Ваальса) між зарядженими носіями та іммобілізованими клітинами. Гідрофобні поверхні зазвичай мають сильнішу адгезивну здатність, ніж гідрофільні. Прикладом іммобілізації на основі адсорбції є прикріплення клітин ссавців до «мікроносіїв», які є спеціальними матрицями, що

---

<sup>6</sup> Górecka, E. and Jastrzebska, M. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnol. Food Sci.* 2011. № 75. P. 65–86.

забезпечують велику площу поверхні для прикріплення клітин<sup>7</sup>. Хоча адсорбція приваблює простотою використання, вона має низьку ефективність іммобілізації і може призвести до динамічного балансу між відривом і прикріпленням клітин, що утворює нестабільну систему з «вільними» клітинами та іммобілізованими.

## 1.2. Ковалентне зв'язування

Ковалентне зв'язування – це ще один метод поверхневого прикріплення, коли цілі клітини прикріплюються до поверхні матеріалу шляхом утворення ковалентного зв'язку в присутності зв'язуючого агента, наприклад, глутарового альдегіду або карбодііміду. Ковалентне зв'язування дозволяє досягти вищої ефективності іммобілізації, ніж адсорбція, але рідше використовується для іммобілізації клітин через невідповідність функціональних груп на поверхні клітин і носія<sup>8</sup>. Токсичність сполучних агентів також може призвести до втрати життєздатності клітин, що робить ковалентне зв'язування більш придатним для промислових процесів з іммобілізованими нежиттєздатними клітинами<sup>9</sup>.

## 1.3. Формування біоплівки

Формування біоплівки передбачає прикріплення клітин, зокрема бактерій, до відповідних абіотичних або біотичних поверхонь, що призводить до розвитку біоплівки. Матеріали, що підтримують біоплівку, можуть включати целюлозні матеріали, такі як діетиламіноетил-целюлоза, деревина і тирса, а також неорганічні матеріали<sup>10</sup>. Біоплівкові реактори мають переваги у вигляді компактної конструкції, високої концентрації біомаси, низької схильності до утворення осаду та стійкості до забруднення. Вони добре підходять для виробництва біоенергії та очищення стічних вод від токсичних сполук, що повільно біологічно розкладаються<sup>11</sup>.

---

<sup>7</sup> Hirtenstein, M., Clark, J., Lindgren, G., and Vretblad, P. Microcarriers for animal cell culture: a brief review of theory and practice. *Dev. Biol. Stand.* 1980. № 46. P. 109–116.

<sup>8</sup> Akkoyun, T., Arslan, A., Turhan, I., and Karhan, M. Immobilization techniques in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011. № 22. S. 61.

<sup>9</sup> Tampion, J. and Tampion, M. D. (eds). *Immobilized Cells: Principles and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

<sup>10</sup> Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hebraud, M. et al. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 2007. № 68. P. 605–612.

<sup>11</sup> Guo, C. L., Zhu, X., Liao, Q., Wang, Y. Z. et al. Enhancement of photo-hydrogen production in a biofilm photobioreactor using optical fiber with additional rough surface. *Bioresour. Technol.* 2011. № 102. P. 8507–8513.

#### 1.4. Захоплення

Захоплення – це широко вивчений і застосовуваний підхід до іммобілізації клітин, коли клітини захоплюються або гелевими матрицями, або пористими частинками. Захоплення гелевою матрицею передбачає суспендування клітин у гелевих розчинах, які формуються у вигляді кульок або плівок, щоб захопити клітини. Для гелевих матриць зазвичай використовують полісахаридні гелі, такі як альгінат, к-карагенан та агароза. Ці гелі забезпечують тривимірну мережу, яка іммобілізує клітини, не заважаючи при цьому дифузії поживних речовин і метаболітів<sup>12</sup>. Процес гелеутворення може бути досягнутий за допомогою фізичних або хімічних методів зшивання. Фізичне зшивання передбачає охолодження розчину гелю для індукції гелеутворення, тоді як хімічне зшивання передбачає додавання зшиваючих агентів, таких як хлорид кальцію або геніпін.

Захоплення пористими частинками передбачає іммобілізацію клітин у порах попередньо сформованих частинок<sup>13</sup>. Частинки можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як полімерні намистини, скляні намистини або керамічні матеріали. Розмір пор і розподіл всередині частинок можна контролювати для оптимізації іммобілізації клітин. Клітини зазвичай вводяться в пористі частинки за допомогою адсорбції або ковалентного приєднання. Захоплення пористими частинками має такі переваги, як висока здатність завантаження клітин, покращений масообмін і захист клітин від зсувних сил.

#### 1.5. Інкапсуляція

Іншим поширеним методом іммобілізації клітин є інкапсуляція, коли клітини інкапсулюються в напівпроникні мембрани або гідрогелі. Інкапсулюючі матеріали створюють захисний бар'єр навколо клітин, забезпечуючи при цьому обмін поживними речовинами, киснем і продуктами життєдіяльності. Капсули на основі альгінату широко використовуються для інкапсуляції завдяки їх біосумісності та легкості гелеутворення. Інші інкапсуляційні матеріали включають хітозан, агарозу та полі(етиленгліколь) (ПЕГ). Інкапсульовані клітини можна використовувати в різних сферах, таких як біореактори, біосенсиори та клітинна терапія<sup>14</sup>.

---

<sup>12</sup> Wijffels, R. H. *Immobilized Cells*, Springer, Berlin. 25 Selimoglu, S. M. and Elibol, M. Alginate as an immobilization material for MAb production via encapsulated hybridoma cells. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010. № 30. P. 145–159.

<sup>13</sup> Mavituna, F. in *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology* / eds V. Nedovic and R. Willaert. Springer, 2004. P. 121–139.

<sup>14</sup> Park, J. K. and Chang, H. N. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol. Adv.* 2000. № 18. P. 303–319.

## 2. Вибір матеріалів-носіїв

Технологія іммобілізації клітин стала перспективним підходом у галузі біологічної ферментації завдяки своїм численним перевагам, зокрема простоті використання, довготривалій життєздатності клітин, відтворюваності, стабільності та високій толерантності. Іммобілізовані клітини демонструють підвищений ріст і метаболічну продуктивність у складних середовищах порівняно з вільно-клітинною ферментацією. Вибір матеріалів-носіїв відіграє вирішальну роль у визначенні метаболічних властивостей іммобілізованих клітин. В останні роки полімерні мембранні матеріали привертають значну увагу завдяки своїм механічним властивостям та гнучкій опорній структурі. У цьому розділі представлено огляд сучасних досягнень в іммобілізації клітин з використанням різних матеріалів у біологічній ферментації з акцентом на полімерних матеріалах-носіях. Також обговорюються проблеми і майбутні перспективи, пов'язані з іммобілізованими клітинами в біологічній ферментації.

### 2.1. Природні органічні полімерні матеріали-носії

Природні органічні полімерні матеріали, включаючи колаген, фібрин, гіалуринову кислоту, хітозан і альгінат, широко використовуються як носії для іммобілізації клітин у синтезі біопродуктів. Ці матеріали нетоксичні та мають хорошу біосумісність. Наприклад, альгінат натрію був застосований у мікробній ко-культури *Clostridium thermocellum* і *C. thermolacticum* для виробництва етанолу, що призвело до значного збільшення виробництва етанолу порівняно з вільноклітинною ферментацією<sup>15</sup>. Пектинат кальцію та хітозан також застосовуються для іммобілізації певних штамів мікроорганізмів під час процесів ферментації, що призводить до покращення конверсії та стабільності<sup>16</sup>. Однак природні полімерні матеріали часто страждають від низької механічної міцності та еластичності, а також схильності до розкладання, що обмежує їх ширше застосування. Для подолання цих обмежень і підвищення стабільності та ефективності процесів ферментації ефективною є стратегія включення синтетичних біосумісних полімерів з міцною структурою основного ланцюга.

---

<sup>15</sup> Xu L and Tschirner U, Immobilized anaerobic fermentation for bio-fuel production by *Clostridium* co-culture. *Bioproc Biosyst Eng.* 2014. № 37 (8). P 1551–1559.

<sup>16</sup> Panesar PS, Kennedy JF, Knill CJ and Kosseva MR, Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. № 74 (1). P. 35–42.

## 2.2. Синтетичні органічні полімерні матеріали-носії

Синтетичні органічні полімерні матеріали-носії, включаючи поліакриламід, полімолочну кислоту, поліамінокислоти та полівініловий спирт, мають високу механічну міцність та стабільність. Ці матеріали широко використовуються для мікробної ферментації. Наприклад, пористі поліамідні кульки використовуються для іммобілізації штамів *Propionibacterium sp.* для виробництва пропіонової кислоти, що призводить до підвищення продуктивності порівняно з ферментацією у вільних клітинах<sup>17</sup>. Поліакриламідні гелі застосовують для іммобілізації *L. rhamnosus* під час молочнокислого бродіння, що призводить до високих показників конверсії<sup>18</sup>. Полівініловий спирт (ПВС) і поліетиленгліколь (ПЕГ) – інші нетоксичні, недорогі полімери з високою механічною міцністю, які застосовуються для іммобілізації клітин у процесах ферментації, що призводить до підвищення активності та стабільності іммобілізованих клітин.

## 2.3. Неорганічні матеріали-носії

Неорганічні матеріали-носії, такі як активоване вугілля та біовугілля, мають пористу структуру з високою адсорбційною здатністю. Біовугілля – це вуглецевий, пористий і хімічно стабільний матеріал, який можна отримати шляхом термохімічного перетворення біомаси в умовах обмеження доступу кисню. Цей матеріал використовується для іммобілізації різних штамів мікроорганізмів у різних процесах ферментації. Активоване вугілля застосовували для іммобілізації *C. acetobutylicum*, що призвело до покращення виробництва біогенного водню<sup>19</sup>. Біовугілля було використано для іммобілізації *C. beijerinckii* F-6, що призвело до збільшення виробництва бутанолу та водню<sup>20</sup>. Пориста і хімічно стабільна природа цих речовин забезпечує сприятливе середовище для росту і метаболічної активності клітин. Неорганічні матеріали-носії мають унікальні переваги з точки зору

---

<sup>17</sup> Belgrano FD, Diegel O, Pereira N and Hatti-Kaul R, Cell immobilization on 3D-printed matrices: a model study on propionic acid fermentation. *Bioresour Technol.* 2018. № 249. P. 777–782.

<sup>18</sup> Petrov KK, Yankov DS and Beschkov VN, Lactic acid fermentation by cells of *Lactobacillus rhamnosus* immobilized in polyacrylamide gel. *World J Microb Biot.* 2006. № 22 (4). P. 337–345.

<sup>19</sup> Liu JY, Zhou WC, Fan SQ, Qiu BY, Wang YY, Xiao ZY et al., Coproduction of hydrogen and butanol by *Clostridium acetobutylicum* with the biofilm immobilized on porous particulate carriers. *Int J Hydrog Energ.* 2019. № 44 (23). P. 11617–11624.

<sup>20</sup> Wu JW, Dong LL, Zhou CS, Liu BF, Xing DF, Feng LP et al., Enhanced butanol-hydrogen coproduction by *Clostridium beijerinckii* with biochar as cell's carrier. *Bioresour Technol.* 2019. № 294. P. 122141.

адсорбційної здатності, гідрофобності та перенесення електронів, що сприяє покращенню продуктивності ферментації<sup>21</sup>.

#### 2.4. Композитні матеріали-носії

Композитні матеріали-носії, утворені шляхом поєднання різних матеріалів, привертають увагу в іммобілізації клітин завдяки своїм синергетичним властивостям. Ці матеріали можуть поєднувати переваги різних компонентів для підвищення ефективності іммобілізації клітин та продуктивності ферментації. Розроблено різні типи композитних матеріалів-носіїв, включаючи полімерно-неорганічні композити, полімерно-біополімерні композити та біополімерно-неорганічні композити.

Полімер-неорганічні композити передбачають включення неорганічних матеріалів, таких як кремнезем, цеоліти або наночастинки металів, у полімерні матриці. Такі композити мають підвищену механічну міцність, термічну стабільність і поверхневі властивості порівняно з чистими полімерними матеріалами. Наприклад, полімер-кремнеземні композити були використані для іммобілізації клітин *Saccharomyces cerevisiae* для виробництва етанолу, що дозволило підвищити ефективність ферментації та збільшити вихід етанолу<sup>22</sup>.

Полімер-біополімерні композити поєднують переваги синтетичних полімерів та природних біополімерів. Наприклад, для іммобілізації лактобактерій використовують композитні кульки з полівінілового спирту та альгінату, які мають покращену механічну стабільність та масообмінні властивості порівняно з чистими альгінатними кульками<sup>23</sup>. Ці композити забезпечують сприятливе мікросередовище для росту клітин і метаболічної активності, що призводить до покращення продуктивності ферментації.

Біополімерно-неорганічні композити передбачають включення неорганічних матеріалів у природні біополімерні матриці. Ці композити можуть запропонувати підвищену механічну міцність, стабільність та адсорбційну здатність порівняно з чистими біополімерами. Наприклад, композити на основі альгінату з біовугіллям або активованим вугіллям використовуються для іммобілізації мікробних штамів у різних процесах

---

<sup>21</sup> Paz-Ferreiro J, Nieto A, Mendez A, Askeland MPJ and Gasco G, Biochar from biosolids pyrolysis: a review. *Int J Env Res Public Health*. 2018. № 15 (5). P. 956.

<sup>22</sup> Jovanovic-Malinovska R, Cvetkovska M, Kuzmanova S, Tsvetanov C and Winkelhausen E, Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in novel hydrogels based on hybrid networks of poly(ethylene oxide), alginate and chitosan for ethanol production. *Maced J Chem Eng*. 2010. № 29 (2). P. 169–179.

<sup>23</sup> Radosavljevic M, Levic S, Belovic M, Pejin J, Djukic-Vukovic A, Mojovic L et al., Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in polyvinyl alcohol/calcium alginate matrix for production of lactic acid. *Bioproc Biosyst Eng*. 2020. № 43 (2). P. 315–322.

ферментації, що призводить до покращення виходу та стабільності біопродуктів. Композитні матеріали-носії забезпечують універсальну платформу для іммобілізації клітин, пропонуючи адаптовані властивості для конкретних процесів ферментації. Поєднання різних матеріалів дозволяє покращити механічну міцність, стабільність, масообмін та контроль мікросередовища, що в кінцевому підсумку призводить до підвищення продуктивності ферментації.

### 3. Виклики та перспективи

Технологія іммобілізації клітин продемонструвала великий потенціал для подолання обмежень вільного культивування клітин і ферментації в біореакторах. Однак існує кілька викликів, які необхідно подолати для успішної індустриалізації іммобілізованих клітинних систем. Ці виклики включають в себе наступні:

1. Складність технології і її висока вартість: Підготовка та експлуатація іммобілізованих клітинних культур часто є складними і трудомісткими, що призводить до додаткових витрат. Ці фактори роблять технологію економічно не вигідною в широкомасштабному застосуванні для деяких процесів.

2. Витік клітин: Багато систем іммобілізації клітин страждають від витоку клітин через нестабільність підтримуючих матриць, неконтрольований ріст клітин або реакції газовиділення. Вивільнені клітини можуть знизити ефективність виробництва та забруднити готовий продукт.

3. Дифузійний бар'єр: Іммобілізаційні матриці і висока щільність клітин можуть створювати дифузійний бар'єр для кисню і поживних речовин. Це стає серйозним обмеженням для аеробних систем, де такий процес перенесення кисню зменшує швидкість та ефективність промислового процесу.

4. Виділення готового продукту: Більшість біопродуктів, що становлять інтерес, утримуються всередині культивованих клітин, тому для їх вилучення необхідно збирати клітини з підтримуючих матриць. Це робить безперервне культивування клітин або повторне використання культивованих клітин непрактичним.

Ці проблеми перешкоджають широкому промислому впровадженню іммобілізованих клітинних систем, і на сьогоднішній день повідомляється лише про декілька успішних великомасштабних процесів. Хоча самоіммобілізовані клітинні системи, такі як самофлюкулюючі дріжджі, виявилися багатообіцяючими, їх застосування обмежене кількома видами клітин, а контроль над розміром і морфологією клітинних агрегатів залишається складним завданням<sup>24</sup>.

---

<sup>24</sup> Bai, F. W., Anderson, W. A., and Moo-Young, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* 2008. № 26. P. 89–105.

Майбутні дослідження повинні бути спрямовані на подолання цих обмежень і подолання розриву між дослідницькими умовами і широко-масштабним застосуванням. Це включає розробку масштабованих засобів і методів, відповідних конструкцій біореакторів і вирішення економічних аспектів. Крім того, необхідне покращення фізико-хімічних характеристик іммобілізаційних матриць<sup>25</sup>.

Перспективним є подальший розвиток технології самоіммобілізації<sup>26</sup>. Це вимагає чіткого розуміння механізмів агрегації клітин, включаючи ідентифікацію генів, відповідальних за агрегацію, і розробку ефективних підходів до контролю розміру і морфології клітинних агрегатів. Методи генної інженерії можуть бути використані для видозміни клітинних ліній, які не здатні до самофлокуляції, що потенційно підвищить продуктивність біологічного виробництва<sup>27</sup>.

В промисловому виробництві, технологія біоінкапсуляції може знайти застосування в різних галузях, включаючи сільське господарство, харчову промисловість, косметику, фармацевтику та медицину. Вивчення і розробка цих застосувань представляють нові напрямки досліджень в області іммобілізації клітин.

## ВИСНОВКИ

Технологія іммобілізації клітин була предметом досліджень протягом кількох десятиліть з метою подолання обмежень, пов'язаних з вільним культивуванням клітин і ферментацією. Хоча ця технологія продемонструвала багатообіцяючі можливості застосування в різних випадках, її комерційне впровадження залишається обмеженим. Проблеми і недоліки, пов'язані з іммобілізованими клітинними системами, перешкоджають їх широкому промисловому розвитку і застосуванню.

Складність і вартість підготовки та експлуатації іммобілізованих клітинних культур, а також проблеми витоку клітин, дифузійних бар'єрів і необхідності вилучення продуктів з матриць підтримки створили значні перешкоди для широкого використання цієї технології. Ці проблеми були визнані вже давно, проте багато сучасних досліджень не вирішують і не долають їх належним чином, що призводить до нереалістичних оцінок потенціалу технології.

---

<sup>25</sup> Keshavarz, T. and Nedovic, V. (2006) In focus: immobilization editorial. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* № 81. P. 483–484.

<sup>26</sup> He, L. Y., Zhao, X. Q., and Bai, F. W. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with the FLO1-derivative gene isolated from the flocculating yeast SPSC01 for constitutive flocculation and fuel ethanol production. *Appl. Energy.* 2012. № 100. P. 33–40.

<sup>27</sup> Wang, F. Z. Construction of flocculent industrial yeast by the yeast flocculation gene FLO1. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2009. № 45. P. 525–530.

Щоб прокласти шлях у майбутнє технології іммобілізації клітин, важливо зосередитися на подоланні розриву між умовами дослідницького рівня та вимогами широкомасштабних застосувань. Це вимагає розробки засобів і методів масштабування, відповідних конструкцій біореакторів і врахування економічних аспектів. Крім того, для подолання обмежень, пов'язаних з витоком клітин і дифузійними бар'єрами, необхідний прогрес у фізико-хімічних характеристиках іммобілізаційних матриць.

Крім того, багатообіцяючими є дослідження і розробка технології самоіммобілізації. Розуміння механізмів агрегації клітин, включаючи ідентифікацію відповідних генів, і розробка ефективних підходів до контролю розміру і морфології клітинних агрегатів сприятимуть підвищенню продуктивності біологічного виробництва. Методи генної інженерії можуть бути використані для створення клітинних ліній, що розширює можливості застосування самоіммобілізуючих клітинних систем.

Крім промислового виробництва, застосування технології біоінкапсуляції в різних галузях, таких як косметика, фармацевтика і медицина, є новим дослідницьким напрямком, який потребує вивчення і розвитку.

На закінчення, незважаючи на те, що існують проблеми і обмеження, пов'язані з технологією іммобілізації клітин, вона залишається привабливим підходом з доведеними перевагами для процесів біовиробництва. Подолання цих проблем і зосередження уваги на масштабованості, самоіммобілізації та дослідженні різноманітних застосувань матиме вирішальне значення для майбутнього розвитку і ширшого впровадження технології іммобілізації клітин.

## **АНОТАЦІЯ**

Технологія іммобілізації клітин з'явилася як потенційне рішення для подолання обмежень у традиційних процесах культивування вільних клітин та ферментації. У цій науковій роботі представлено комплексний огляд проблем, перспектив та рекомендацій для майбутніх досліджень у галузі іммобілізації клітин. Обговорюються технічні проблеми, пов'язані з вільною культурою клітин і ферментацією, включаючи неможливість досягти високої щільності клітин у біореакторах, що призводить до нижчої продуктивності порівняно з хімічними реакторами. Було висвітлено різні методи іммобілізації клітин, які демонструють багатообіцяючі можливості застосування, проте їх комерційне впровадження залишається обмеженим. Основними перешкодами на шляху до індустріалізації є складність, тривалість і додаткові витрати, пов'язані з підготовкою та експлуатацією іммобілізованих клітинних культур.

Витік клітин з підтримуючих матриць, дифузійні бар'єри для кисню та поживних речовин, а також необхідність вилучення продуктів з

імобілізованих клітин визначені як критичні проблеми. Ці проблеми перешкоджають широкому розвитку і застосуванню імобілізованих клітинних систем. Для подолання цих викликів у документі підкреслюється необхідність подолання розриву між дослідницькими умовами і великомасштабним застосуванням. Це вимагає розробки засобів для збільшення масштабів, відповідних конструкцій біореакторів і врахування економічних чинників. Крім того, покращення фізико-хімічних характеристик імобілізаційних матриць може допомогти запобігти витоку клітин і покращити масообмін. Потенціал технології самоімобілізації досліджується як перспективний підхід. Однак обмежений контроль над розміром і морфологією клітинних агрегатів обмежує її широке застосування. Для оптимізації самоімобілізованих клітинних систем пропонується використовувати методи генної інженерії та глибше розуміння механізмів агрегації клітин.

Крім того, в статті висвітлено нові тенденції технології біоінкапсуляції та її потенційне застосування в сільському господарстві, харчовій, косметичній, фармацевтичній та медичній галузях. Майбутні дослідження в цих галузях можуть призвести до нових досягнень і можливостей. На закінчення, хоча технологія імобілізації клітин пропонує значні переваги для біовиробництва, для її широкого промислового впровадження необхідно вирішити кілька проблем. Рекомендації для майбутніх досліджень включають розширення експериментальних умов, покращення характеристик матриці та вивчення технологій самоімобілізації та біоінкапсуляції. Подолання цих викликів дозволить розкрити весь потенціал імобілізації клітин у різних сферах застосування.

### Література

1. Verbelen P. J., De Schutter D. P., Delvaux F., Verstrepen K. J., Delvaux F. R. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett.* 2006. № 28 (19). P. 1515–1525.
2. Zhuang W., Liu X. J., Yang J., Wu J. L., Zhou J. W., Chen Y. et al. Immobilization of *Clostridium acetobutylicum* onto natural textiles and its fermentation properties. *J Microbial Biotechnol.* 2017. № 10 (2). P. 502–512.
3. Moon Y. M., Gurav R., Kim J., Hong Y. G., Bhatia S. K., Jung H. R. et al. Whole-cell immobilization of engineered *Escherichia coli* JY001 with barium-alginate for Itaconic acid production. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2018. № 23 (4). P. 442–447.
4. Pimtong V., Ounaeb S., Thitiprasert S., Tolieng V., Sooksai S., Boonsombat R. et al. Enhanced effectiveness of *Rhizopus oryzae* by immobilization in a static bed fermentor for L-lactic acid production. *Process Biochem.* 2017. № 52. P. 44–52.
5. D'Souza S. F. Trends in immobilized enzyme and cell technology. *Indian J. Biotechnol.* 2002. № 1. P. 321–338.

6. Górecka E., Jastrzebska M. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnol. Food Sci.* 2011. № 75. P. 65–86.
7. Hirtenstein M., Clark, J., Lindgren G., Vretblad P. Microcarriers for animal cell culture: a brief review of theory and practice. *Dev. Biol. Stand.* 1980. № 46. P. 109–116.
8. Akkoyun T., Arslan A., Turhan I., Karhan M. Immobilization techniques in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011. № 22. P. S61.
9. Tampion J., Tampion M. D. (eds). *Immobilized Cells: Principles and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.
10. Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hebraud M. et al. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods* 2007. № 68. P. 605–612.
11. Guo C. L., Zhu X., Liao Q., Wang Y. Z. et al. Enhancement of photo-hydrogen production in a biofilm photobioreactor using optical fiber with additional rough surface. *Bioresour. Technol.* 2011. 102. P. 8507–8513.
12. Wijffels R. H. *Immobilized Cells*, Springer, Berlin, 2001; Selimoglu S. M., Elibol M. Alginate as an immobilization material for MAb production via encapsulated hybridoma cells. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010. № 30. P. 145–159.
13. Mavituna F. in *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology* (eds V. Nedovic and R. Willaert), Springer, 2004. P. 121–139.
14. Park J. K. and Chang, H. N. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol. Adv.* 2000. № 18. 303–319.
15. Xu L. and Tschirner U, Immobilized anaerobic fermentation for bio-fuel production by *Clostridium* co-culture. *Bioproc Biosyst Eng.* 2014. № 37 (8). P. 1551–1559.
16. Panesar P. S., Kennedy J. F., Knill C. J., Kosseva M. R. Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. № 74 (1). P. 35–42.
17. Belgrano F. D., Diegel O., Pereira N., Hatti-Kaul R. Cell immobilization on 3D-printed matrices: a model study on propionic acid fermentation. *Bioresour Technol.* 2018. № 249. P. 777–782.
18. Petrov KK, Yankov DS and Beschkov VN, Lactic acid fermentation by cells of *Lactobacillus rhamnosus* immobilized in polyacrylamide gel. *World J Microb Biot.* 2006. № 22 (4). P. 337–345.
19. Liu J. Y., Zhou W. C., Fan S. Q., Qiu B. Y., Wang Y. Y., Xiao Z. Y. et al. Coproduction of hydrogen and butanol by *Clostridium acetobutylicum* with the biofilm immobilized on porous particulate carriers. *Int J Hydrog Energ.* 2019. № 44 (23). P. 11617–11624.
20. Wu J. W., Dong L. L., Zhou C. S., Liu B. F., Xing D. F., Feng L. P. et al. Enhanced butanol-hydrogen coproduction by *Clostridium beijerinckii* with biochar as cell's carrier. *Bioresour Technol.* 2019. № 294. P. 122141.

21. Paz-Ferreiro J., Nieto A., Mendez A., Askeland M. P. J., Gasco G. Biochar from biosolids pyrolysis: a review. *Int J Env Res Public Health*. 2018. № 15 (5). P. 956.
22. Jovanovic-Malinovska R., Cvetkovska M., Kuzmanova S., Tsvetanov C., Winkelhausen E. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in novel hydrogels based on hybrid networks of poly(ethylene oxide), alginate and chitosan for ethanol production. *Maced J Chem Eng*. 2010. № 29 (2). P. 169–179.
23. Radosavljevic M., Levic S., Belovic M., Pejcin J., Djukic-Vukovic A., Mojovic L. et al. Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in polyvinyl alcohol/calcium alginate matrix for production of lactic acid. *Bioproc Biosyst Eng*. 2020. № 43 (2). P. 315–322.
24. Bai F. W., Anderson W. A., Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv*. 2008. № 26. P. 89–105.
25. Keshavarz T., Nedovic V. In focus: immobilization editorial. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 2006. № 81. P. 483–484.
26. He L. Y., Zhao X. Q., Bai, F. W. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with the FLO1-derivative gene isolated from the flocculating yeast SPSC01 for constitutive flocculation and fuel ethanol production. *Appl. Energy*. 2012. № 100. P. 33–40.
27. Wang F. Z. Construction of flocculent industrial yeast by the yeast flocculation gene FLO1. *Appl. Biochem. Microbiol*. 2009. № 45. P. 525–530.

**Information about the authors:**

**Oshytok Daria Viacheslavivna,**

<https://orcid.org/0000-0001-6369-9179>

Student at the Department of Technology of Biologically Active  
Compounds, Pharmacy and Biotechnology  
Lviv Polytechnic National University  
12, Stepana Bandery str., Lviv, 79013, Ukraine

**Krvavych Anna Serhiivna,**

<https://orcid.org/0000-0002-7402-2689>

Candidate of Technical Sciences,  
Senior Lecturer at the Department of Technology of Biologically Active  
Substances, Pharmacy and Biotechnology  
Lviv Polytechnic National University  
12, Stepana Bandery str., Lviv, 79013, Ukraine