

RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, TOMASZ JANKOWSKI

## UNIERUCHAMIANIE KOMÓREK DROBNOUSTROJÓW METODĄ KAPSUŁKOWANIA – STAN OBECNY I MOŻLIWOŚCI ROZWOJU TEJ METODY

### Streszczenie

W pracy przedstawiono podstawowe informacje na temat unieruchamiania komórek drobnoustrojów. Scharakteryzowano właściwości alginianu jako najpowszechniej stosowanego materiału do unieruchamiania komórek oraz omówiono podstawowe techniki kapsułkowania materiałów komórkowych. Przedstawiono także przykłady praktycznego wykorzystania kapsułkowanych komórek.

**Słowa kluczowe:** unieruchomienie, alginian, kapsułki z ciekłym rdzeniem, kulki pełnożelowe, bakterie fermentacji mlekowej.

### Pojęcie i zalety unieruchomienia (immobilizacji) komórek mikroorganizmów

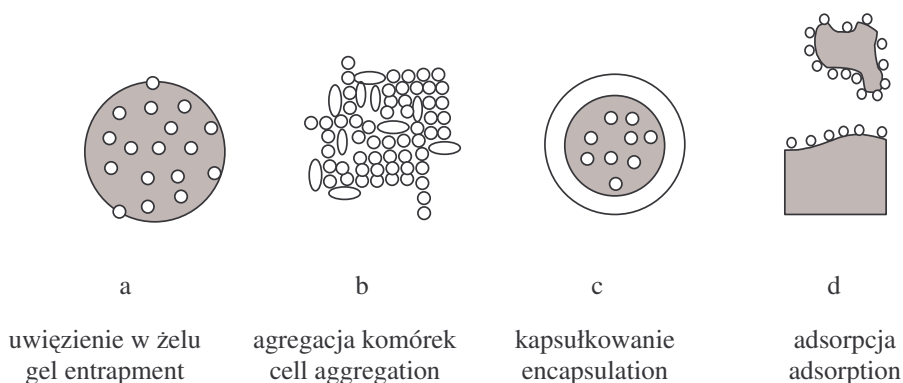
Unieruchomienie komórek polega na ich umieszczeniu w pewnej ograniczonej, zdefiniowanej przestrzeni z zachowaniem ich aktywności katalitycznej i żywotności [56]. Technika ta jest alternatywą dla unieruchamiania enzymów, gdyż przez wyeliminowanie procesów oczyszczania wewnątrzkomórkowych enzymów następuje obniżenie kosztów produktu końcowego. Unika się także problemów związanych z utratą aktywności oczyszczonych enzymów [6].

Unieruchomione komórki można wykorzystywać w procesach ciągłych lub wielokrotnie w procesach okresowych bez obawy, że zostaną wymyte z bioreaktora. Inne korzyści to: możliwość prowadzenia hodowli o dużych gęstościach komórek, większa odporność unieruchomionych mikroorganizmów na niekorzystne czynniki, takie jak np. zmiana parametrów hodowlanych – pH, temperatura, obecność toksyn czy wahania stężenia substancji pokarmowych, ochrona przed stresem spowodowanym mieszaniem mechanicznym czy napowietrzaniem. Unieruchomienie komórek gwarantuje stabilność przemian biochemicznych, umożliwia ich intensyfikację i zapewnia ekonomiczną opłacalność [23].

Wiele drobnoustrojów wykazuje zdolność adhezji do powierzchni. W naturalnym środowisku drobnoustrojów występuje zwykle niedostatek substancji odżywczych. Stężenie substancji pokarmowych jest jednak zwykle nieco wyższe w pobliżu powierzchni, stąd komórki przyczepione do powierzchni mają przewagę metaboliczną w stosunku do komórek zawieszonych swobodnie w roztworze. Można więc stwierdzić, że mikroorganizmy w swym naturalnym środowisku częściej występują jako unieruchomione na powierzchni niż w postaci zawiesiny wolnych komórek [53].

### Metody unieruchamiania drobnoustrojów

Metody unieruchamiania zostały przedstawione na rys. 1. i obejmują [28, 30, 49]:



Rys. 1. Metody unieruchamiania komórek.

Fig. 1. Methods of cell immobilization.

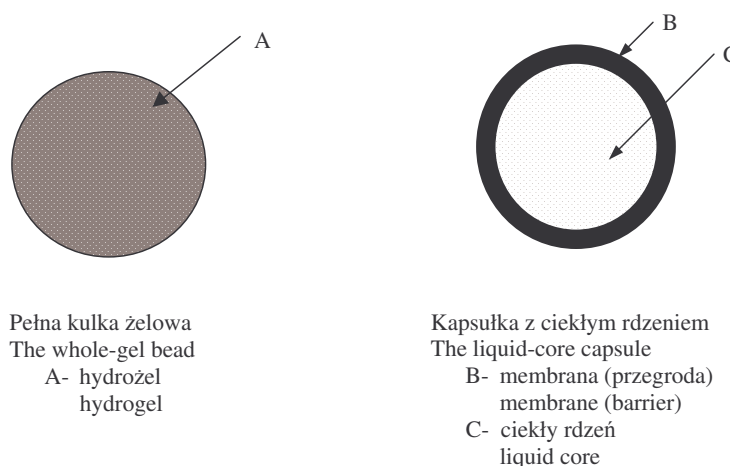
- uwięzienie w usieciowanej matrycy,
- agregowanie się komórek (samoflokulacja lub poprzez zastosowanie związków sieciujących),
- zamknięcie za przegrodą półprzepuszczalną (np. kapsułkowanie),
- przyczepianie lub adsorpcja do odpowiednio spreparowanych porowatych nośników czy adhezja do powierzchni.

Najczęściej stosowaną metodą w biotechnologii jest pułapkowanie w pełnych matrycach żelowych w kształcie kuli. Komórki są uwięzione w trójwymiarowej matrycy, w której wielkości porów są mniejsze od wymiarów komórek. Metoda ta jest dobrze poznana, zarówno pod względem warunków wpływających na formowanie nośników, ich właściwości, a także zastosowania do hodowli wielu drobnoustrojów [42].

Ostatnio pojawia się coraz więcej doniesień na temat unieruchamiania mikroorganizmów poprzez kapsułkowanie za porowatą przegrodą. Zaletą tej metody, w porównaniu z unieruchamianiem w kulkach z pełnego żelu, jest większa przeżywalność komórek umieszczonych w ciekłym rdzeniu kapsułki [2]. Kapsułkowanie i unieruchomienie mikroorganizmów w kulkach z pełnego żelu

umożliwia uzyskanie większego zagęszczenia biomasy, w porównaniu z metodami przyczepiania komórek na powierzchni nośnika.

Na rys. 2. przedstawiono porównanie budowy kulek pełnożelowych i kapsułek.



Rys. 2. Schematyczne porównanie podstawowych typów nośników do unieruchamiania komórek.

Fig. 2. A schematic comparison of the main systems applied to immobilize cells.

Kapsułka składa się z rdzenia otoczonego przez ścianę lub przegrodę o jednorodnej bądź niejednorodnej grubości. Rdzeń może być zbudowany z jednego lub kilku składników, natomiast ściana może mieć budowę jedno- lub wielowarstwową. Technikami wykorzystywanymi do formowania kapsułek są: odparowanie rozpuszczalnika, żelowanie za pomocą jonów, suszenie rozpyłowe, powlekanie, ekstruzja, koacercwacja, denaturacja termiczna i suszenie sublimacyjne [40, 51].

### **Materiały do unieruchamiania komórek drobnoustrojów i stawiane im wymagania**

Materiałami służącymi do produkcji matryc pełnożelowych i membran kapsułek są związki chemiczne syntetyczne i pochodzenia naturalnego, które żelują poprzez wytworzenie pomiędzy cząsteczkami wiązań wodorowych, hydrofobowych, kowalencyjnych lub oddziaływań jonowych [27]. Muszą one spełniać następujące wymagania [22]:

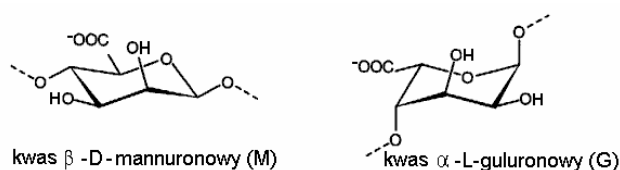
- brak cytotoksyczności w stosunku do unieruchamianych komórek (biokompatybilność),
- łagodna procedura tworzenia żelu (temperatura, nietoksyczne odczynniki sieciujące),
- odpowiednia porowatość tworzonego żelu,
- odpowiednie właściwości mechaniczne oraz chemiczna odporność na działanie składników pożywek mikrobiologicznych,

- dostępność i niski koszt.

Materiał nośnika wpływa na żywotność komórek, ich funkcjonowanie, wzrost i podziały [55]. Syntetyczne polimery (np. żywice epoksydowe, poliuretany, poliakrylamidy), tworzą żełe w warunkach bardzo niekorzystnych dla mikroorganizmów, co sprawia, że w uformowanych nośnikach śmiertelność komórek często przekracza 90%. Często toksyczny jest odczynnik sieciujący, nie zaś sam syntetyczny polimer [32].

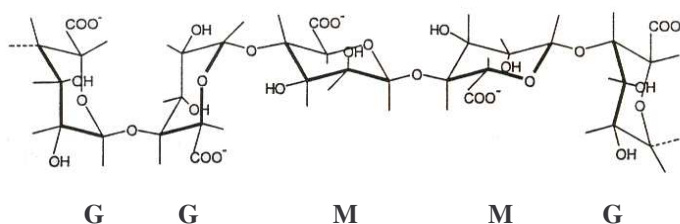
W biotechnologii i przemyśle spożywczym do produkcji matryc do unieruchamiania używa się głównie białek, polisacharydów i alkoholu poliwinylowego. Alkohol poliwinylowy jest syntetycznym związkiem nietoksycznym, może jednak wywoływać spadek żywotności unieruchomionych komórek i utratę ich aktywności [12]. Najpowszechniej stosowanymi związkami są polisacharydy pochodzenia naturalnego, takie jak: alginiany, karageny, agar, agarozę i chitozan [24, 32, 55]. Ich zalety to biokompatybilność oraz dopuszczenie tych związków do stosowania jako dodatków do żywności [17].

Najczęściej stosowanym materiałem do unieruchamiania biokatalizatorów są alginiany [39]. Alginiany to jednowartościowe sole kwasu alginowego, tworzące hydrofilowe koloidy. W biotechnologii, przemyśle spożywczym i farmaceutycznym stosuje się głównie alginian sodu [57]. Alginiany są naturalnymi polisacharydami ściany komórkowej morskich, brązowych glonów (*Phaeophyceae*), a także występują w śluzach niektórych gatunków bakterii [15]. Częsteczką alginianu jest liniowym kopolimerem zbudowanym z dwóch typów monomerów: kwasu  $\alpha$ -L-guluronowego (G) i  $\beta$ -D-mannuronowego (rys. 3). Częsteczki monomerów są epimerami i mają odwrotne ułożenie przestrzenne w położeniu C5. Umożliwia to utworzenie wiązań glikozydowych 1,4 usytuowanych w przestrzeni, w czterech możliwych pozycjach (rys. 4).



Rys. 3. Monomery alginianu.

Fig. 3. Alginate monomers.



Rys. 4. Fragment łańcucha częsteczki alginianu.

Fig. 4. A fragment of the alginate molecule

Badania prowadzone za pomocą rezonansu magnetycznego, mikroskopii sił atomowych oraz metodami chemicznymi wykazały, że monomery w alginianie ułożone są w bloki. W cząsteczce obok regionów zbudowanych jedynie z kwasu guluronowego (G) lub mannuronowego (M) występują też bloki mieszane (MG) (rys. 5) [ 8, 13].

MMMMGGGGGGMGMGGGGGGGGMGMGMGMGMGM

Rys. 5. Ułożenie monomerów w łańcuchu alginianu.

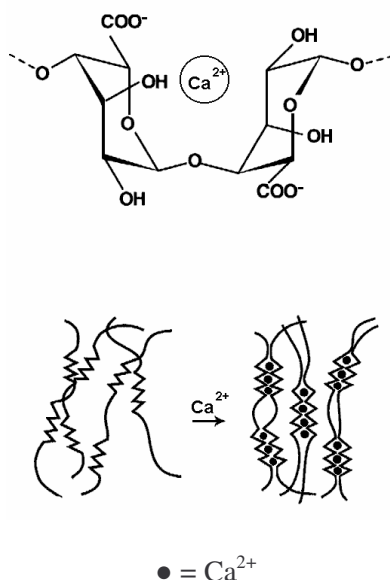
Fig. 5. The arrangement of monomers within the alginate chain.

Zawartość monomerów w cząsteczce i długość poszczególnych bloków zależy od rodzaju glonów i tkanek, z których ekstrahowany jest alginian. Alginiany bogate w kwas mannuronowy otrzymywane są z glonów z gatunków *Macrocystis pyrifera* i *Ascophyllum sp.*, natomiast alginiany o dużej zawartości frakcji kwasu guluronowego otrzymuje się z glonów gatunku *Laminaria hyperborea*.

Skład chemiczny różnych typów alginianów determinuje ich właściwości, a w szczególności właściwości otrzymanych z nich żeli. Alginiany o dużej zawartości bloków G mają tendencję do formowania sztywnych i kruchych żeli, które ulegają synerezie (kurczenie się żelu z wydzieleniem wody). Z kolei alginiany o dużej zawartości bloków M i mieszanych formują słabe, ale elastyczne żele, które łatwo się deformują lecz są odporne na synerezę [40].

Struktura przestrzenna monomerów i sposób w jaki wiążą się one ze sobą powoduje, że geometria bloków G, M i sekwencji mieszanych znacznie się od siebie różni. Bloki M mają kształt rozciągniętej wstążki, natomiast bloki G są regularnie pozaginane. Jeżeli dwa bloki G ustawią się w szeregu jeden obok drugiego, tworzą się między nimi puste przestrzenie. Mają one wymiary odpowiadające idealnie rozmiarom jonów wapnia. Bloki G wykazują większe powinowactwo do jonów wapnia niż do jonów sodu w szerokim zakresie ich wzajemnych, względnych stężeń [5]. Tak więc jony wapnia dodane do roztworu alginianu sodu wiążą ze sobą dwie cząsteczki alginianu i tworzy się żel (rys. 6). Bloki M wykazują jedynie słabe powinowactwo do jonów wapnia i nie żelują w ich obecności, tworząc ciekłe regiony w żelu. Alginian sodu tworzy także żele w obecności innych jonów metali wielowartościowych, takich jak: bar, kobalt, cynk, miedź, żelazo, glin. Metale te nie są jednak powszechnie stosowane z uwagi na m.in. problemy z biokompatybilnością wytworzonych z ich udziałem żeli [18, 36].

Popularność alginianu wapnia jako materiału do wytwarzania matryc do unieruchamiania (najczęściej w postaci pełnych kulek żelowych) wynika z bardzo taniej i łatwej procedury tworzenia żelu, która stwarza łagodne i nietoksyczne warunki dla unieruchamianego materiału [46].



Rys. 6. Schemat reakcji żelowania alginianu sodu [38].

Fig. 6. A schematic comparison of the sodium alginate gelling reaction.

### Zastosowanie kapsułek oraz metody ich wytwarzania

Unieruchamianie substancji aktywnych nie ogranicza się jedynie do komórek drobnoustrojów w procesach biotechnologicznych, ale jest bardzo rozpowszechnione w medycynie [44], przemyśle farmaceutycznym [45], rolnictwie [48], przemyśle spożywczym [25], kosmetycznym i chemicznym [29] oraz ochronie środowiska [12].

Kapsułkowanie jest wykorzystywane na szeroką skalę w medycynie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i chemicznym, w systemach kontrolowanego uwalniania substancji czynnych (np. enzymów, leków) i konstruowaniu sztucznych organów [26]. Zakapsułkowane środki farmakologiczne są uwalniane stopniowo, w ilościach umożliwiających utrzymanie ich stężenia w organizmach ludzi i zwierząt na poziomie leczniczym przez dłuższy okres. Szczególnie interesującą aplikacją, która zapoczątkowała kapsułkowanie komórek zwierzęcych, jest unieruchamianie w kapsułkach fragmentów trzustki produkujących insulinę (tzw. wysepek Langerhansa) w terapii cukrzycy. Podawanie insuliny za pomocą iniekcji nie zapewnia równego poziomu glukozy we krwi i z czasem prowadzi do uszkodzeń wielu tkanek i organów, głównie nerek. Rozwiązaniem może być zastosowanie „sztucznej trzustki” czyli wszczepienie kapsułek z komórkami wytwarzającymi insulinę ludziom, u których trzustka nie produkuje tego hormonu lub produkuje jej zbyt mało. Membrana kapsułek powinna mieć odpowiednią porowatość umożliwiającą swobodny dopływ do komórek tlenu oraz substancji odżywczych i transport na zewnątrz kapsułek produktów

przemiany materii i przede wszystkim heksamerów insuliny o masie cząsteczkowej  $36 \cdot 10^3$  Da. Jednocześnie membrana powinna stanowić barierę uniemożliwiającą wnikanie przeciwciał do wnętrza kapsułek i w ten sposób chroniącą komórki unieruchomione w ich rdzeniu przed działaniem układu odpornościowego. Kapsułkowanie umożliwia więc zaprzestanie stosowania leków immunosupresyjnych, nawet gdy wszczep stanowią ksenogeniczne komórki trzustki. Komórki w kapsułkach są w stanie zachować żywotność nawet przez kilka miesięcy [21].

Metoda wytwarzania kapsułek do unieruchamiania wysepek Langerhansa została po raz pierwszy opisana przez Lima i Suna [33]. Formowanie membrany odbywało się w procesie obejmującym 3 etapy. Komórki zawieszono w roztworze alginianu sodu wkroplono do roztworu zawierającego jony wapnia, otrzymując pełne kulki żelowe. Następnie przenoszono je do roztworu polilizyny. Koacerwacja dwóch polielektrolitów – ujemnie naładowanego alginianu i niosącej ładunek dodatni polilizyny prowadziła do powstania membrany koacerwacyjnej. Proces formowania kapsułek kończyło pokrycie ich warstwą polietylenoiminy i upłynnienie rdzenia alginianowego za pomocą cytrynianu sodu. Modyfikacja dokonana przez O'Shea i wsp. [43] polegała na zastąpieniu polietylenoiminy kolejną warstwą alginianu, w celu osiągnięcia większej biokompatybilności. W większości prac badawczych, dotyczących wytwarzania kapsułek, modyfikowano metodę opisaną przez Lima i Suna, np. zastępując polilizynę chitozanem, czy też zwiększając liczbę kolejnych warstw membrany, nawet do pięciu. Identyczne mechanizmy formowania kapsułek, polegające na koacerwacji anionowego siarczanu celulozy z kationowym chlorkiem polimetyloamonowym lub alginianu, siarczanu celulozy, chlorku wapnia i polimetylenoguanidyny (żelowanie jonowe i koacerwacja) opisał Hunkeler [21].

W biotechnologii dominuje unieruchamianie komórek i innych substancji aktywnych w pełnych żelach, głównie z alginianu wapnia. Wynika to z prostoty i niskiego kosztu tej metody. Istnieją jednak prace badawcze, w których stosuje się z powodzeniem kapsułkowanie materiałów biologicznych, np. produkcja przeciwciał monoklonalnych [20, 50, 61], hodowla komórek zwierzęcych [59], wspólne unieruchomienie drożdży i enzymu [35] oraz kapsułkowanie komórek bakterii [16, 47]. Większość tych aplikacji wykorzystuje identyczne metody preparowania kapsułek, znane z zastosowań medycznych, czy odwołuje się do informacji z tej dziedziny, odnośnie formowania membrany. Zastosowanie przez Posillico [50] kapsułek preparowanych zgodnie z metodą opisaną przez Lima i Suna umożliwiło hodowlę komórek hybrydomy do produkcji przeciwciał monoklonalnych na skalę przemysłową. Przeszkodą w masowej produkcji kapsułek była wysoka cena odczynników (polilizyna) oraz skomplikowana procedura wytwarzania kapsułek, np. rozpuszczanie alginianowego rdzenia w cytrynianie uszkadza często kapsułki i prowadzi do ich pęcznienia [44].

### Perspektywy wykorzystania kapsułkowania do produkcji skoncentrowanych starterów bakterii fermentacji mlekowej

Interesującym przykładem zastosowania unieruchomionych drobnoustrojów jest hodowla bakterii fermentacji mlekowej w pełnych żelach, w której łączy się etap namnażania komórek z ich zagęszczaniem. Początkowo unieruchomione bakterie były najczęściej wykorzystywane do produkcji kwasu mlekowego [52]. Zastosowanie bakterii unieruchomionych w pełnych żelach okazało się także korzystne w produkcji starterów mleczarskich, ponieważ zagęszczenie komórek hodowanych w żelach alginianowych było do 100 razy wyższe niż w tradycyjnych hodowlach zawiesinowych (tab. 1).

Tabela 1

Przykłady hodowli unieruchomionych komórek bakterii fermentacji mlekowej w pełnych kulkach żelowych [1, 7, 34, 37].

Cell densities of lactic acid bacteria immobilized in the whole-gel beads.

Gatunek bakterii Bacteria species	Typ fermentacji Type of fermentation	Materiał do unieruchamiania Material used to immobilize cells	Uzyskana gęstość komórek Cell density obtained
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i>	ciągła	alginian wapnia	$2 \times 10^{10}$ jtk $\text{g}^{-1}$ kulek żelowych
	ciągła	alginian wapnia	$1,6 \times 10^{10}$ jtk $\cdot \text{cm}^{-3}$ kulek żelowych
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var <i>diacetylactis</i>	ciągła	alginian wapnia	90-175 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ kulek żelowych
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	okresowo-dolewowa	karagen	$2,5 \times 10^{10}$ jtk $\cdot \text{cm}^{-3}$ kulek żelowych
	okresowa	alginian wapnia	$6 \times 10^{10}$ jtk $\text{g}^{-1}$ kulek żelowych
<i>Bifidobacterium longum</i>	okresowo-dolewowa	karagen	$4,7 \times 10^{10}$ jtk $\text{g}^{-1}$ kulek żelowych

Z uwagi na wysokie koszty separacji komórek z zawiesin (czasami dochodzące do 60% ogólnych kosztów), unieruchomienie komórek w żelach jest ekonomicznie uzasadnione. Żelowe nośniki mają wymiary milimetrowe, dlatego po hodowli mogą być oddzielone od pożywki wraz z komórkami za pomocą zwykłych sit. Separacja nie wymaga zatem stosowania kosztownych, specjalistycznych urządzeń (wirówki, filtry). Unieruchomienie w żelach umożliwia łatwe wydzielenie komórek bakterii fermentacji mlekowej z pożywek zawierających dużą frakcję cząstek stałych, np. z pożywek serwatkowych. W celu oddzielenia komórek od żelu, rozpuszcza się żelowe matryce w buforach cytrynianowych lub fosforanowych (alginiany) lub rozdrabnia mechanicznie (karageny). Można także liofilizować unieruchomione komórki łącznie z



żelowym nośnikiem, gdy kultury starterowe są przeznaczone do produktów, w których stosuje się zagęstniki hydrokoloidowe [7].

Podstawową wadą pełnych kulek żelowych jest ucieczka komórek z nośników do pożywki. Przyczyną tego zjawiska są znaczne opory w transporcie substratów i produktów pomiędzy matrycą i nośnikiem. W rezultacie prawie cała biomasa koncentruje się w pobliżu powierzchni kulek. Intensywny wzrost komórek na obrzeżach matrycy powoduje erozję żelu, czego wynikiem jest uszkodzenie nośnika i uwalnianie się komórek [31].

Obiecującym sposobem przezwyciężenia tych niedogodności może być zastosowanie kapsułkowania. Zainteresowanie kapsułkowaniem wzrasta, o czym świadczą prace dotyczące charakterystyki różnych typów kapsułek pod względem warunków ich formowania, cech mechanicznych i dyfuzyjnych [3, 9, 10, 41]. Kapsułki próbuje się zastosować do unieruchamiania enzymów np. oksydazy glukozowej, katalazy czy ureazy [4, 19]. W literaturze spotyka się także pojedyncze prace dotyczące kapsułkowania komórek bakterii fermentacji mlekowej do produkcji kwasu mlekowego [60]. Nieliczne są jednak informacje dotyczące wykorzystania kapsułkowania do produkcji skoncentrowanych kultur bakterii fermentacji mlekowej [11].

Wykorzystanie w pełni potencjału kapsułkowania w biotechnologii będzie możliwe po opracowaniu prostych i tanich metod produkcji kapsułek, z jak najmniejszą liczbą etapów formowania membrany, korzystających z niedrogich odczynników, dzięki czemu możliwa będzie wydajna produkcja kapsułek na dużą skalę. Przeszkodą w bezpośrednim przeniesieniu do biotechnologii procedur kapsułkowania stosowanych w medycynie, oprócz dużego stopnia ich skomplikowania, jest także wytrzymałość mechaniczna otrzymywanych kapsułek. Komórki stosowane do celów terapeutycznych nie dzielą się i nie rosną w kapsułkach, po wszczepieniu do organizmu kapsułki nie są narażone na naprężenia mechaniczne. Wystarczająca jest więc wytrzymałość kapsułek na ściskanie rzędu 0,5 N. Kapsułki odporne na ściskanie siłą 7 N określane są jako bardzo wytrzymałe [21]. Wydaje się, że wytrzymałość tego rzędu byłaby niewystarczająca w procesach biotechnologicznych, biorąc pod uwagę siły ścinające, powstające podczas mieszania w fermentorach czy warunki panujące w złożach upakowanych kapsułek. Prowadzi się więc badania nad warunkami formowania membrany kapsułek poprzez kompleksowanie różnych substancji np. kationowego chitozanu z polianionitami: alginianami, karagenami czy gumą ksantanową w celu opracowania nowych metod kapsułkowania [14, 54, 58].

## **Podsumowanie**

Wykorzystanie kapsułek do produkcji skoncentrowanej biomasy bakterii może być alternatywą dla hodowli zawiesinowych i hodowli komórek unieruchomionych w pełnych hydrożelach. Komórki umieszczone w kapsułkach mają lepsze warunki wzrostu niż w nośnikach pełnożelowych i nie wymagają złożonych technik separacji.

Opracowanie w przyszłości nowych, tanich metod wytwarzania kapsulek o dużej wytrzymałości mechanicznej i odporności na czynniki hodowlane powinno przyczynić się do zwiększenia popularności metody kapsułkowania komórek drobnoustrojów.

### Literatura

- [1] Audet P., St-Gelais D., Roy D.: Production of mixed cultures of non-isogenic *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* using immobilized cells. *Milchwissenschaft*, **50**, 1995, 18-22.
- [2] Berger A., Marison I., Stark D., von Stockar U., Widmer F., Heinzen Ch.: Production and characterization parameters of liquid core capsules (LCC) for biological and non-biological applications. In: "Bioencapsulation in biomedical, biotechnological and industrial applications" IX International BRG Workshop and 62th ICB Seminar Proc., Warsaw, Poland 2001, S. III-3.
- [3] Blandino A., Macías M., Cantero D.: Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl<sub>2</sub> concentration on gelation kinetics. *J. Bioscie. Bioengin.*, **88**, 1999, 686-689.
- [4] Blandino A., Macías M., Cantero D.: Modelling and simulation of a bienzymatic reaction system co-immobilised within hydrogel-membrane liquid-core capsules. *Enzyme Microb. Technol.*, **31**, 2002, 556-565.
- [5] Braccini I., Grasso R. P., Pérez S.: Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydr. Res.*, **317**, 1999, 119-130.
- [6] Castillo E., Rodríguez M., Casas L., Quintero R. and López-Munguía A.: Design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 1991, 127-133.
- [7] Champagne C. P., Lacroix C. and Sodini-Gallot I.: Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **14**, 1994, 109-134.
- [8] Decho A. W.: Imaging an alginate polymer gel matrix using atomic force microscopy. *Carbohydr. Res.*, **315**, 1999, 330-333.
- [9] Dembczyński R., Jankowski T.: Characterization of small molecules diffusion in hydrogel-membrane liquid core capsules. *Bioch. Engin. J.*, **6**, 2000, 41-44.
- [10] Dembczyński R., Jankowski T.: Determination of pore diameter and molecular weight cut-off of hydrogel-membrane liquid-core capsules for immunoisolation. *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, **12**, 2001, 1051-1058.
- [11] Dembczyński R., Jankowski T.: Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. *Enzymes Microb. Technol.*, **31**, 2002, 111-115.
- [12] Dos Santos V. A. P., Vasilevska T., Kajuk B., Tramper J., Wijffels R. H.: Production and characterization of double-layer beads for coimmobilization of microbial cells. *Biotechnol. Ann. Rev.*, **3**, 1997, 227-244.
- [13] Draget K. I., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O.: Alginate based new materials. *Inter. J. Biol. Macromol.*, **21**, 1997, 47-55.
- [14] Dumitriu S., Chornet E., Vidal P. F., Moresoli C.: Polyionic hydrogels as support for immobilization of lipase. *Biotechnol. Techniques*, **9**, 1995, 833-836.
- [15] Ertesvåg H., Valla S.: Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degrad. Stabil.*, **59**, 1998, 85-91.
- [16] Förster M., Mansfeld J., Dautzenberg H., Schellenberger A.: Immobilization in polyelectrolyte complex capsules: Encapsulation of a gluconate-oxidizing *Serratia marcescens* strain. *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 1996, 572-577.
- [17] Groboillot A., Boadi D. K., Poncelet D., Champagne C.P., Neufeld R. J.: Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **14**, 1994, 75-107.
- [18] Gröhn P., Klöck G., Zimmermann U.: Collagen-coated Ba<sup>2+</sup>-alginate microcarriers for the culture of anchorage-dependent mammalian cells. *BioTechniques*, **22**, 1997, 970-975.
- [19] Hearn E., Neufeld R. J.: Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease. *Process Biochem.*, **35**, 2000, 1253-1260.

- [20] Hsu Y. L., Chu I. M.: Poly(ethylenimine)-reinforced liquid-core capsules for the cultivation of hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1992, 1300-1309.
- [21] Hunkeler D.: Polymers for bioartificial organs. *Trends Polym. Sci.*, **5**, 1997, 286-293.
- [22] Hunkeler D., Prokop A., Powers A., Haralson M., Di Mari S., Wang T. A.: Screening of polymers as biomaterials for cell encapsulation. *Polym. News*, **22**, 1997, 232-240.
- [23] Húska J., Závadská I., Tóth D., Gemeiner P.: Performance of immobilized cells for dihexyl sulfosuccinate biotransformation. *Folia Microbiologica*, **42**, 1997, 505-508.
- [24] Jankovský M., Vašáková L.: Immobilization in alginate gels. *Veterinary Medicine - Czech*, **5**, 1996, 159-164.
- [25] Jankowski T.: Mikrokapsułkowanie składników żywności. W: *Food product development – opracowywanie nowych produktów żywnościowych - pod red. J. Czapskiego*, Wyd. AR Poznań 1995, 259-276.
- [26] Jankowski T.: Biohybrydowe, sztuczne narządy w terapii chorób układowych. *Biotechnologia*, **44**, 1999, 45-58.
- [27] Jen A. C., Wake M. C., Mikos A. G.: Review: Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 1996, 357-364.
- [28] Kennedy J. F., Cabral J. M. S.: Immobilized living cells and their applications. In: *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 4, Chibata and Wingard L. B., Jr., Eds., Academic Press, New York 1983, 189.
- [29] King A. H.: Encapsulation of food ingredients. A review of available technology focusing on hydrocolloids. In: *ACS Symposium Series No. 590. "Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients"*. Risch S. J. and Reineccius G. A., Eds., Washington 1995, 26-39.
- [30] Klein J., Vorlop, K. D.: Immobilization techniques – cells. In: *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2, Moo-Young M., Cooney C. L., Humphrey A. E. Eds., Pergamon Press, Oxford, New York 1985.
- [31] Lacroix Ch., Pavillon P.-C.: Control and modulation of probiotic cultures characteristics using immobilized cell technology. In: "Cell physiology and interactions of biomaterials and matrices" COST 840 and X International BRG Workshop on Bioencapsulation, Physiology and morphology of immobilized cells, Prague, Czech Republic 2002, 50.
- [32] Leenen E. J. T. M., Dos Santos V.A. P., Grolle K. C. F., Tramper J., Wijffels R.: Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewaters treatment. *Water Resources*, **30**, 1996, 2985-2996.
- [33] Lim F., Sun A. M.: Microencapsulated islets as a bioartificial endocrine pancreas. *Science*, **210**, 1980, 908-910.
- [34] Maitrot H., Paquin C., Lacroix Ch. and Champagne C.P.: Production of concentrated freeze-dried cultures of *Bifidobacterium longum* in κ-carrageenan-locust bean gum gel. *Biotechnol. Tech.*, **11**, 527-531.
- [35] Mansfeld J., Förster M., Hoffmann T., Schellenberger A.: Coimmobilization of *Yarrowia lipolytica* cells and invertase in polyelectrolyte complex microcapsules. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 1995, 11-17.
- [36] Mofidi N., Aghai-Moghadam M., Sarbolouki M. N.: Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochem.*, **35**, 2000, 885-888.
- [37] Morin N., Bernier-Cardou M., Champagne C.P.: Production of concentrated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suspensions in calcium alginate beads. *App. Envir. Microbiol.*, **58**, 1992, 545-550.
- [38] Morris V. J. Gelation of polysaccharides. In: *Gum and stabilizers for the food industry*. Philips G. O., Wedlock W., Williams P. A., Eds., Pergamon Press, Oxford 1984, **2**, 57.
- [39] Navrátil M., Sturdik E.: Bioactive components in productions using immobilized biosystems. *Biologia*, **54**, 1999, 635-648.
- [40] Neau S. H., Goskonda S. R., Upadrashta S. M., Thies C. A., Tripp S. I.: Encapsulation of a volatile oil by ionic gelation of alginate. *Am. J. Pharm. Educ.*, **57**, 1993, 126-129.
- [41] Nussinovitch A., Gershon Z., Nussinovitch M.: Liquid-core hydrocolloid capsules. *Food Hydrocolloids*, **10**, 1996, 21-26.
- [42] Nussinovitch A., Gershon Z., Nussinovitch M.: Temperature stable liquid core hydrocolloid capsules. *Food Hydrocolloids*, **11**, 1997, 209-215.
- [43] O'Shea G. M., Goosen M. F. A., Sun A. M.: Prolonged survival of transplanted islets of langerhans encapsulated in a biocompatible membrane. *Bioch. Bioph. Acta*, **804**, 1984, 133-135.

- [44] Orive G., Ponce S., Hernández R. M., Gascón A. R., Igartua M., Pedraz J. L.: Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different types of alginates. *Biomaterials*, **23**, 2002, 3825-3831.
- [45] Østberg T., Graffner Ch.: Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration. I. Pilot investigations of production method. *Acta Pharmaceutica Nordica*, **4**, 1992, 201-208.
- [46] Palmieri G., Giardina P., Desiderio B., Marzullo L., Giamberini M., Sannia G.: A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 1994, 151-158.
- [47] Park J. K., Jung J. Y.: Production of benzaldehyde by encapsulated whole-cell benzoylformate decarboxylase. *Enzyme Microb. Technol.*, **30**, 2002, 726-733.
- [48] Pepperman A., Kuan J.-Ch. W.: Controlled release formulations of alachlor based on calcium alginate. *J. Contr. Release*, **34**, 1995, 17-23.
- [49] Pilkington P. H., Margaritis A., Mensour N. A.: Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **18**, 1998, 237-255.
- [50] Posillico E. G.: Microencapsulation technology for large-scale antibody production. *Biotechnology*, **4**, 1986, 114-117.
- [51] Pothakamury U. R., Barbosa-Cánovas G. V.: Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 1995, 397-406.
- [52] Roukas T., Kotzekidou P.: Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 1998, 199-204.
- [53] Ryder D. S., Immobilized yeast in brewing: to immobilize or not to immobilize – that is the question ? In: “Cell physiology and interactions of biomaterials and matrices” COST 840 and X International BRG Workshop on Bioencapsulation, Physiology and morphology of immobilized cells, Prague, Czech Republic 2002, IL-1,1.
- [54] Sakiyama T., Chu Ch.-H., Fuji T., Yano T.: Preparation of a polyelectrolyte complex gel from chitosan and κ-carrageenan and its pH-sensitive swelling. *J. App. Polym. Scie.*, **50**, 1993, 2021-2025.
- [55] Shoichet M. S., Li R. H., White M. L., Winn S. R.: Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose. *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 1995, 374-381.
- [56] Sundaram P. V., Pye E. K.: *Enzyme Engineering 2*, Plenum Press, New York. 1974, 449.
- [57] Takka S., Acartürk F.: Calcium alginate microparticles for oral administration: III: The effect of crosslink agents and various additive polymers on drug release and drug entrapment efficiency. *Pharmazie*, **54**, 1999, 137-139.
- [58] Tay L.-F., Khoh L.-K., Loh Ch.-S., Khor E.: Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1993, 449-454.
- [59] Wang F. F., Wu C. R., Wang Y. J.: Preparation and application of poly(vinylamine)/alginate microcapsules to culturing of a mouse Erythroleukemia cell line. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1992, 1115-1123.
- [60] Yoo I., Seong G. H., Chang H. N., Park J. K.: Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 1996, 428-433.
- [61] Yoshioka T., Hirano R., Shioya T., Kako M.: Encapsulation of mammalian cell with chitosan-CMC capsule. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1990, 66-69.

## CELL ENCAPSULATION – CURRENT PRACTICE AND FUTURE APPLICATIONS

### S u m m a r y

In the paper, the basic information on cell immobilization by encapsulation was described. Properties of the alginate, the most popular material used for immobilization, were characterized. The main encapsulation techniques were reviewed, as were some examples of the encapsulated cell applications.

---

**Key words:** immobilization, alginate, liquid-core capsules, whole-gel beads, and lactic acid bacteria. ☒