República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1101646-9 A2

(22) Data do Depósito: 27/04/2011

(43) Data da Publicação: 06/02/2018

(54) Título: PROCESSO E SISTEMA PARA PRODUÇÃO DE PRODUTO CELULAR ENCAPSULADO

(51) Int. Cl.: C12N 11/04

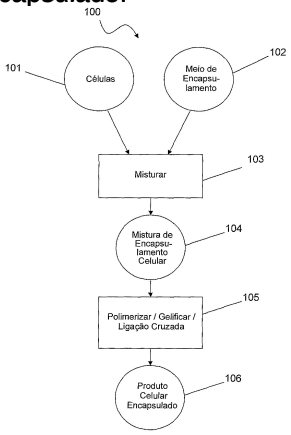
(30) Prioridade Unionista: 14/02/2011 US 13/027,267

(73) Titular(es): GEOSYNFUELS, LLC.

(72) Inventor(es): LISA BECKLER ANDERSEN; JOHN H. EVENS, IV; CHRISTINE A. SINGER

(74) Procurador(es): DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA

(57) Resumo: PROCESSO E SISTEMA PARA PRODUÇÃO DE PRODUTO CELULAR ENCAPSULADO. A presente invenção refere-se a um processo para a produção de um produto celular encapsulado, o processo compreende as etapas de concentrar células a partir de um meio de propagação usando um sistema de filtração de fluxo tangencial. Misturando as células concentradas com um meio de encapsulamento para formar uma mistura de encapsulamento celu- lar. Polimerizando, gelificando, ou cruzando transversalmente a mistura de encapsulamento celular para formar um produto celular encapsulado.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"APARELHO E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UM PRODUTO CELULAR ENCAPSULADO".**

CAMPO

O presente documento de patente se refere a um aparelho e processo para o encapsulamento de células em um meio de encapsulamento tal como uma matriz de polímero.

ANTECEDENTES

Embora seja conhecido que células podem ser encapsuladas em uma matriz de polímero, muito pouco é conhecido sobre a tentativa de produzir células encapsuladas em um nível industrial. O escalamento de qualquer processo geralmente apresenta numerosos obstáculos e o escalamento da produção de células encapsuladas não é diferente. Enquanto provetas e centrífugas podem ser suficientes para criar uma pequena quantidade de células capturadas em um laboratório, técnicas e equipamentos de laboratório não podem ser escalados para produzir efetivamente grandes quantidades de células encapsuladas para uso em biorreatores industriais de larga escala.

Apesar das vantagens alcançadas pelo uso de células encapsuladas, não existem aparelhos e processos projetados para produzir um produto celular encapsulado em larga escala. Por exemplo, seria benéfico ser capaz de produzir produtos celulares encapsulados para abastecer reatores na escala de 20.000 L (ou 75.000 gal.) ou uma série de tais reatores.

Nagashima *et al.* em Continuous Ethanol Fermentation Using Immobilized Yeast Cells publicado em 1984 em Biotecnology and Bioengineering, Volume 26, páginas 992-997 descreve a produção de leveduras encapsuladas em alginato de cálcio, mas somente para abastecer um reator de pesquisa relativamente pequeno (1000 L). Em sua descrição, a preparação de levedura encapsulada em contas de alginato de cálcio "foi realizada umidecendo com gotas de solução de alginato de cálcio contendo células de levedura vivas a partir do bocal superior em solução de cloreto de cálcio nos reatores. A preparação de contas celulares foi completada dentro de várias

horas." O aparelho e métodos descritos por Nagashima *et al.* não seria adequada para produzir grandes quantidades de contas.

Similarmente, sistemas comercialmente disponíveis para a produção de contas de qualquer tamanho são limitados. LentiKat's Biotechnologies publicou um sistema comercial para a produção de contas, entretanto, o sistema da LentiKat's somente fornece uma produção em pequena escala adequada para experimentos pequenos e não para produção industrial.

Além disso, muitos dos processos usados para encapsular células em uma matriz de polímero em escala laboratorial não seriam praticáveis em larga escala, dado o seu consumo de produtos usados para encapsular as células. O uso ineficiente do meio de encapsulamento e outros suprimentos não é uma grande preocupação quando feito em pequena escala. Entretanto, tal uso ineficiente de recursos pode ser extremamente custoso quando a escala aumenta. Para este propósito, são necessários processos e aparelhos que podem produzir eficientemente produtos celulares encapsulados. Em adição, são necessários processos e aparelhos que podem ser aumentados de escala e efetivamente produzir produtos celulares encapsulados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em vista do precedente, um objeto de acordo com um aspecto do presente documento de patente é fornecer aparelhos e processos aperfeiçoados para produzir um produto celular encapsulado. Os aparelhos e processos podem ser usados para produzir produtos celulares encapsulados em uma escala larga ou pequena. Preferivelmente, os aparelhos e processos direcionam, ou pelo menos melhoram um ou mais dos problemas descritos acima. Para esta finalidade, é fornecido um processo para a produção de um produto celular encapsulado. O processo compreende as etapas de: concentrar células a partir de um meio de propagação usando um sistema de filtração de fluxo tangencial; misturar as células concentradas com um meio de encapsulamento para formar uma mistura de encapsulamento celular; e polimerizar a mistura de encapsulamento celular para formar um produto celular encapsulado.

Em uma modalidade dos processos descritos aqui, as células

são concentradas no retentado do sistema de filtração de fluxo tangencial. Em modalidades que concentram as células no retentado do sistema de filtração de fluxo tangencial, uma porção do retentado pode ser usada como um inóculo para uma produção subsequente de um produto celular encapsulado. Em modalidades que incluem o uso de retentado, o retentado pode ser cíclico entre um recipiente de contenção de retentado e o sistema de filtração de fluxo tangencial. Em certas modalidades, o retentado pode ser continuamente cíclico até que o retentado alcance uma concentração celular de mais que 180 gramas de massa úmida de células por litro.

Em outras modalidades, a etapa de mistura é realizada com um dispositivo que ajuda a preservar a viabilidade das células. Em uma modalidade um agitador alternativo é usado. Em outra modalidade, um disco alternativo é usado.

Em outro aspecto, é fornecido um sistema para a produção de um produto celular encapsulado. O sistema compreende: um biorreator; um sistema de filtração de fluxo tangencial em comunicação com o biorreator; e um recipiente de contenção de retentado em comunicação com o sistema de filtração de fluxo tangencial.

Em outra modalidade do sistema, o sistema ainda inclui um agitador alternativo operativamente arranjado para misturar uma suspensão celular a partir do recipiente de contenção de retentado com um meio de encapsulamento.

Em ainda outra modalidade do sistema, o biorreator é um biorreator quimiostático. Um biorreator quimiostático é um tipo de biorreator que permite modalidades do sistema de serem operadas continuamente.

Em outra modalidade, é fornecido um processo para a produção de um produto celular encapsulado. O processo compreende as etapas de: concentrar células a partir de um meio de propagação; misturar as células concentradas com um meio de encapsulamento usando um agitador alternativo para formar uma mistura de encapsulamento celular; e polimerizar a mistura de encapsulamento celular para formar um produto celular encapsulado.

Em uma modalidade do processo, as células são concentradas para mais do que 180 gramas de massa úmida de células por litro. Em outra modalidade, o meio de encapsulamento tem uma viscosidade de cerca de 1000 a 3500 centistokes (cSt.), ou mais preferivelmente 2000 a 3000 centistokes (cSt.). Em ainda outra modalidade, a mistura de encapsulamento celular tem uma viscosidade de cerca de 1000 a 3500 cSt. ou mais preferivelmente 1500 a 2500 cSt.

Em outro aspecto, é fornecido um processo em batelada para a produção de um produto celular encapsulado. O processo compreende as etapas de: propagar as células em um biorreator para formar uma primeira batelada de células; concentrar as células a partir da primeira batelada de células; misturar as células concentradas com um meio de encapsulamento para formar uma mistura de encapsulamento celular; polimerizar a mistura de encapsulamento celular para formar um produto celular encapsulado; e propagar as células em um biorreator para formar uma segunda batelada de células usando as células da primeira batelada de células como inóculo.

Em ainda outra modalidade, o biorreator não é esterilizado entre propagar a primeira batelada de células e propagar a segunda batelada de células.

Em outras modalidades, a etapa de concentração é realizada por um sistema de filtração de fluxo tangencial e as células são concentradas em um retentado. Em outras modalidades, o retentado pode ser cíclico entre um recipiente de contenção de retentado e o sistema de filtração de fluxo tangencial. Em certas modalidades, a etapa de ciclização é realizada até que o retentado alcance uma concentração celular de mais que 180 gramas de massa úmida de células por litro.

Em ainda outra modalidade, o inóculo compreende cerca de 5% a 10% do volume da primeira batelada de células.

Em outro aspecto, é fornecido um processo para a produção de um produto celular encapsulado. O processo compreende as etapas de: misturar uma solução aquosa com um meio de encapsulamento concentrado para formar um meio de encapsulamento, em que a mistura é realizada sem

a adição de calor suficiente para esterilizar o meio de encapsulamento; misturar as células com o meio de encapsulamento sem aquecimento para formar uma mistura de encapsulamento celular; e polimerizar a mistura de encapsulamento celular para produzir um produto celular encapsulado.

Em uma modalidade, um agente de esterilização é adicionado à solução aquosa. O meio de encapsulamento concentrado é então esterilizado através da solução aquosa quando os dois são misturados juntos. Em certas de tais modalidades, o agente de esterilização é cloreto de sódio.

Em outras modalidades, o processo pode ser variado pela inclusão de vários aditivos adicionais. Por exemplo, algumas modalidades incluem a etapa adicional de adicionar antibióticos ao meio de encapsulamento. Em outras modalidades, os nutrientes são adicionados ao meio de encapsulamento. Em ainda outras modalidades, as vitaminas são adicionadas ao meio de encapsulamento.

Em ainda outra modalidade, é realizada uma etapa adicional de irradiar o meio de encapsulamento concentrado. Ao invés de ou em adição à irradiar o meio de encapsulamento concentrado, o meio de encapsulamento pode ser irradiado.

Em outra modalidade, o meio de encapsulamento concentrado compreende alginato de sódio. Em uma modalidade, quando o meio de encapsulamento concentrado compreende alginato de sódio, o alginato de sódio é misturado com a solução aquosa para produzir um meio de encapsulamento com uma viscosidade de cerca de 1000 a 3500 centistokes ou mais preferivelmente 2000-3000 centistokes. Em ainda outra modalidade, o meio de encapsulamento tem uma concentração de alginato de sódio de 3,0% ou menos de peso por volume, preferivelmente 2,5% ou menos, e ainda mais preferivelmente cerca de 2,0% de peso por volume.

Em outra modalidade, a mistura de encapsulamento celular tem uma viscosidade de cerca de 1000 a 3500 centistokes ou mais preferivelmente 1500 a 2500 centistokes.

Em ainda outro aspecto, é fornecida uma conta de alginato para encapsulamento de uma célula. A conta compreende: alginato polimerizado

em uma concentração de 3% ou menos de peso por volume; e uma célula encapsulada. Em outras modalidades, a concentração de alginato é preferivelmente 2,5% ou menos de peso por volume, e mais preferivelmente cerca de 2,0% de peso por volume.

Os aparelhos e métodos para produzir células capturadas descritos aqui fornecem soluções escaláveis que podem ser usadas para produção em massa. Aspectos, objetos, características desejáveis, e vantagens adicionais dos dispositivos e métodos divulgados aqui serão mais bem compreendidos a partir da descrição detalhada e desenhos que seguem, nos quais várias modalidades são ilustradas a título de exemplo. Isto é para ser expressamente compreendido, entretanto, que os desenhos são somente para o propósito de ilustração e não têm a intenção de uma definição dos limites das modalidades reivindicadas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 ilustra um processo geral para a produção de um produto celular encapsulado.

A figura 2 ilustra um processo para a produção de um meio de encapsulamento a partir de um polímero de encapsulamento seco.

A figura 3A ilustra uma modalidade de um processo para produzir uma suspensão celular concentrada.

A figura 3B ilustra uma modalidade de um sistema para a produção de uma suspensão celular concentrada como mostrado na figura 3A.

A figura 4 é uma vista do corte parcial de um biorreator exemplar para propagar células.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS

Consistente com seu significado biológico ordinário, o termo "célula" é usado aqui para se referir à menor unidade de vida que é uma coisa viva. "Célula" inclui ambas as células Procarióticas e Eucarióticas. A título de exemplo, "célula" inclui, mas não está limitada a células de bactérias, leveduras, fungos, algas, insetos, ou mamíferos para nomear algumas.

Células que podem ser encapsuladas incluem células únicas, incluindo todas as células derivadas de qualquer membro dos reinos de vida

de planta, animal, fungo, protista, eubactéria ou archaebacteria. Células únicas podem ser células derivadas ou removidas a partir de uma planta viva, animal, ou fungo, de outra forma conhecidas como células primárias. Células primárias podem ser derivadas, por exemplo, a partir de tecidos de mamíferos, tecidos de insetos, tecidos de nematódeos, tecidos de *Arabidopsis*, tecidos da planta de tomate, ou tecidos de planta de tabaco. Células primárias também podem ser isoladas a partir de fungos ou protistas.

Células únicas para encapsulamento também podem ser derivadas a partir de linhagens de cultura celular estabilizadas. Por exemplo, células podem ser derivadas a partir de linhagens celulares cultivadas tais como a linhagem de célula mamífera HeLa, linhagens celulares de plantas, linhagens celulares de algas, linhagens celulares de insetos tal como as células Sf9, e linhagens celulares a partir de nematódeos, insetos, anfíbios, répteis, e outros animais e plantas.

As células também podem ser fabricadas. Por exemplo, as células podem ser derivadas a partir de fusões de duas células diferentes, tal como células hibridoma.

Em adição às células únicas, agrupamentos funcionais de células ou tecidos celulares podem ser imobilizados por encapsulamento. Tecidos celulares poderiam incluir quaisquer tecidos derivados a partir de plantas, protistas, fungos ou animais. Por exemplo, agrupamentos de células tal como um ácino (um tecido) a partir de um pâncreas humano ou espaço juncionalmente conectado ou grupos funcionalmente conectados de outra forma de células neurais e gliais podem ser encapsulados.

O termo "micróbio" é usado aqui para se referir ao seu significado ordinário de um organismo que é unicelular. Como exemplos não limitativos, "micróbio" inclui leveduras, bactérias, fungos, *archaea*, protistas, plâncton e planária para nomear alguns. O termo "micróbio" está completamente abrangido pelo termo "célula".

O termo "encapsular" ou "encapsulamento" é usado aqui para se referir a envolver células em um meio de encapsulamento. O "encapsulamento" de células é realizado em um meio de encapsulamento que é poroso

o suficiente para permitir que nutrientes e outros produtos necessários pela célula fluam para dentro, e subprodutos produzidos pela célula fluam para fora, enquanto previnem a célula de escapar. "Encapsulamento" como usado aqui inclui processos geralmente conhecidos como imobilização de células, embora uma pessoa possa imobilizar células em outras vias que não sejam o encapsulamento, por exemplo, pela adsorção a um substrato. Mais geralmente, "encapsulamento" inclui qualquer tipo de processo que forma um invólucro ou cápsula em torno das células, incluindo as técnicas de imobilização celular.

Os meios de encapsulamento para o encapsulamento de células podem incluir ambos os materiais naturais e sintéticos. A título de exemplo não limitativo, o meio de encapsulamento inclui numerosos polímeros naturais e sintéticos. Materiais naturais incluem alginato, um produto natural da alga marrom (seaweed), carragenina, gomas de xantano, quitosana, agarose, ágar, colágeno, celulose e seus derivados, hialuronato, pectina, fibrina, proteína, ácidos nucleicos e gelatina. Materiais sintéticos usados para encapsulamento incluem resina epóxi, resinas de ligação fotocruzáveis, álcool polivinílico, poliacrilamida, poliéster, poliestireno, ácido poliacrílico, óxido polietileno, polifosfazeno e poliuretano.

Em algumas aplicações, dois ou mais materiais podem ser usados como o meio de encapsulamento, por exemplo, alginato e álcool polivinílico ou copolímeros de óxido polietileno e óxido polipropileno ou de óxido polietileno e ácido polilático poderiam ser usados como uma matriz de encapsulamento.

As células encapsuladas em uma matriz polimérica podem ser usadas para muitos processos industriais diferentes, incluindo, por exemplo, fermentação, e tratamento de licor residual. A matriz de encapsulamento de células inclui numerosos benefícios sobre o uso de células 'livres'. Células 'livres' são células que não estão encapsuladas ou imobilizadas de qualquer forma. Uma das maiores vantagens dos sistemas de células encapsuladas sobre sistemas de células 'livres' são as altas densidades celulares que um sistema de células encapsuladas pode alcançar. Altas densidades celulares

são desejáveis em numerosos processos fermentativos diferentes como a produção de produtos químicos bio-baseados, tal como ácido 3-hidroxipropiônico, ácido glucárico, ácido levulínico, xilitol, ácido acético, ácido cítrico, ácido lático, etanol, e semelhantes. A alta densidade celular alcançada pelos sistemas de células encapsuladas por matriz é benéfica por alcançar altas produtividades volumétricas, enquanto sistemas de células livres não são capazes de alcançar tais altas densidades celulares.

Outra vantagem do encapsulamento com matriz de células é que o encapsulamento facilita a operação contínua, de preferência do que uma batelada, de processos bioquímicos, tais como processos de fermentação, sem retirar por lavagem os biocatalisadores celulares. Processos de fermentação contínuos experimentam menos tempo de parada comparado a processos em batelada. Menos tempo de parada fornece uma vantagem econômica a sistemas contínuos. Em adição ao menos tempo de parada, a prevenção da lavagem das células em um sistema contínuo representa uma grande economia de custos, uma vez que a propagação de células para um processo industrial é caro.

Em certas aplicações, o uso de sistemas de células encapsuladas fornece vantagens em adição à alta densidade celular e prevenção da lavagem. Em aplicações em que o meio em contato com as células contém compostos que são deletérios às células, o encapsulamento de células em uma matriz confere resistência aumentada aos compostos deletérios. Por exemplo, a fermentação do hidrolisado de biomassa de planta para produzir biocombustíveis é geralmente complicado pela presença de diversos compostos diferentes que são provenientes do processo de fermentação. O encapsulamento de células microbianas em uma matriz polimérica, alginato de cálcio, por exemplo, confere resistência aumentada aos compostos e assim melhora o processo fermentativo.

O presente documento de patente ensina processos novos e melhorados e aparelhos para produzir um produto de célula encapsulada. Previamente, processos para produzir produtos de célula encapsulada foram feitos sob medida para uma finalidade de uso específica, ou quando realiza-

dos em uma escala relativamente pequena, ou ambos. O presente documento de patente ensina processos novos que aumentam a capacidade de produção de produtos de célula encapsulada.

A figura 1 ilustra um processo geral para a produção de um produto de célula encapsulada 106. Na modalidade do processo 100 mostrado na figura 1, as células 101 são combinadas com um meio de encapsulamento 102 na etapa de mistura 103, para produzir uma mistura de encapsulamento celular 104. As células 101 são preferencialmente fornecidas em uma suspensão que foi preparada para o encapsulamento. Uma solução do meio de encapsulamento 102 é misturada junto com as células suspensas 101 para produzir a mistura de encapsulamento celular 104. Uma vez que a mistura de encapsulamento celular é produzida, ela é polimerizada, gelificada ou feita ligação cruzada na etapa 105 para produzir um produto celular encapsulado 106.

As células 101 podem ser células bacterianas, de levedura, fúngicas, de algas, de insetos, ou de mamíferos, ou qualquer outro tipo de célula como explicado acima. As células 101 podem também compreender uma combinação de tais células. As células 101 podem também ser parte de um grupo funcional de células ou tecido, ou ser um produto de fusão celular tal como uma célula hibridoma. As células 101 podem também ser uma mistura de células crescendo simbioticamente, por exemplo, uma mistura de células de algas ou uma mistura de células de levedura ou fúngicas. O tipo, combinação, e densidade das células 101 são dependentes do uso desejado do produto de célula encapsulada final 106.

As células 101 podem ser fornecidas ao processo 100 em um número de formas diferentes dependendo do produto de célula encapsulada 106 desejado a ser criado. Se um produto de célula encapsulada 106 com uma alta densidade celular é desejado, preferivelmente as células 101 são fornecidas em uma suspensão celular concentrada. Quando as células 101 estão em uma suspensão celular concentrada, a etapa de mistura 103 pode ser realizada de forma a manter a alta densidade celular no produto de célula encapsulada 106 resultante. Uma alta concentração de células no produto

de célula encapsulada 106 é vantajosa para muitos processos bioquímicos, incluindo, por exemplo, aplicações de fermentação. Por exemplo, uma alta concentração de células de leveduras ou de bactérias pode ser exigida para produzir uma alta taxa de fermentação em um reator.

Em outras modalidades, as células 101 podem estar em uma suspensão relativamente diluída. As células 101 podem ser fornecidas em uma suspensão diluída de forma que a etapa de mistura 103 e a etapa de polimerização 105 sejam capazes de encapsular uma única célula em um produto de célula encapsulada 106. Outras combinações de suspensões celulares 101 e etapa de mistura 103 podem ser combinadas para fornecer variações diferentes de produto de célula encapsulada 106.

Em outras modalidades, as células 101 podem ser um grupo funcional de células ou um tecido, tal como um único ácino humano a partir de um pâncreas humano. As células 101 também poderiam incluir espaços juncionalmente conectados ou grupos funcionalmente conectados de outra forma de células neurais e gliais. O tecido pode ser fornecido em uma suspensão diluída de forma que a etapa de mistura 103 e etapa de polimerização 105 são capazes de encapsular uma única seção de um tecido, tal como um único ácino em um produto de célula encapsulada 106.

O meio de encapsulamento 102 pode ser de um número de diferentes materiais. Por exemplo, as células podem ser encapsuladas usando alginato de cálcio, um produto natural de alga marrom (seaweed). Outros materiais ambos naturais e sintéticos podem ser usados incluindo compostos poliméricos tal como alginato de sódio, carragenina, gomas de xantano, agarose, ágar, celulose e seus derivados, colágeno, hialuronato, pectina, gelatina, resina epóxi, resinas de ligação fotocruzáveis, álcool polivinílico, poliacrilamida, poliéster, poliestireno, acetato polivinílico e poliuretano para nomear alguns. Em algumas modalidades, mais do que um meio de encapsulamento 102 pode ser combinado. Por exemplo, alginato e álcool polivinílico podem ser combinados como o meio de encapsulamento 102.

Uma vez que ambas, uma solução aquosa do meio de encapsulamento 102 e uma suspensão celular concentrada 101, são preparadas, e-

las são misturadas 103 juntas em um recipiente. A etapa de mistura 103 pode ser realizada usando qualquer método que produza a mistura de encapsulamento de célula 104 desejada. É importante realizar a etapa de mistura 103 com o mínimo de dano às células 101 e ao meio de encapsulamento 102. Para esta finalidade, a etapa de mistura 103 deveria minimizar as forças de cisalhamento nas células 101 e meio de encapsulamento 102. Em adição, o meio de encapsulamento 102 pode ser altamente viscoso, complicando adicionalmente a mistura. Em modalidades exemplares, a etapa de mistura 103 é realizada usando um agitador alternativo, ou um disco alternativo para misturar as células 101 com o meio de encapsulamento 102. Misturadores rotantes padrão irão fornecer tensões de cisalhamento nas células 101 e não são apropriados para a mistura em soluções altamente viscosas.

A etapa de mistura 103 preferencialmente também mistura as células 101 e meio de encapsulamento 102 para dispensar as células 101 através do meio de encapsulamento e conseguir uma viscosidade preferida. Em algumas modalidades, pode ser desejável misturar até que uma dispersão substancialmente uniforme seja conseguida. Entretanto, em outras modalidades, as células 101 e meio de encapsulamento 102 podem não ser misturados até a homogeneidade.

Uma vez que as células 101 e o meio de encapsulamento tenham sido misturados em uma quantidade desejada, preferivelmente até a homogeneidade, a mistura de encapsulamento celular 104 pode ser polimerizada, gelificada, ou feita ligação cruzada na etapa 105 para gerar um produto de célula encapsulada 106. Antes da etapa de polimerização 105, a mistura de encapsulamento celular 104 pode ser formada em qualquer número de produtos estruturalmente diferentes. Por exemplo, a mistura de encapsulamento celular 104 pode ser moldada em contas esféricas ou encadeadas, aplicada a uma estrutura de suporte tal como uma malha aberta, colmeia, ou luffa, aplicado às paredes do reator, ou moldada em outras formas tridimensionais antes de gelificar, fazer ligação cruzada ou polimerizar 105 para produzir o produto final 106.

A natureza do agente de polimerização, gelificação ou de ligação

cruzada é específica aos polímeros usados como o agente de encapsulamento. No caso de alginato de sódio, a ligação cruzada dos polímeros de alginato é realizada pelo contato com diferentes cátions divalentes ou trivalentes.

Existem muitas técnicas para melhorar a eficiência de um produto de célula encapsulada 106. Uma maneira de melhorar a eficiência é fornecendo uma alta área de superfície para razão de volume. Polimerizando a mistura de encapsulamento celular 104, aumenta sua área de superfície exposta e pode, portanto, aumentar a eficiência do um produto de célula encapsulada 106. Por exemplo, para auxiliar em um processo bioquímico, tal como um processo de fermentação, células de levedura em uma solução de alginato de sódio podem ser polimerizadas na forma de pequenas contas esféricas, as quais fornecem uma alta área de superfície para razão de volume. Alternativamente, células de levedura em uma solução de alginato de sódio podem ser polimerizadas na forma de filamentos ou encadeadas.

A mistura de encapsulamento celular 104 pode ser formada em contas usando um procedimento de formação de gota. As contas resultantes podem ser de diferentes tamanhos e possuem diferentes tamanhos de poros. Existem muitos dispositivos para produzir contas. Uma pessoa pode produzir contas a partir de um fluxo contínuo usando atração eletrostática para produzir gotículas, usando vibração para produzir gotículas, usando ar para produzir gotículas, e usando um atomizador de disco rotatório, para nomear alguns. Por exemplo, se a matriz é alginato de sódio, as contas são facilmente polimerizadas colocando em contato as contas com uma solução de cloreto de cálcio.

Em outras modalidades, a mistura de encapsulamento celular 104 pode ser formada em filamentos finos ou encadeados. Neste caso, os filamentos e encadeados podem ser ligeiramente mais largos do que o diâmetro das células capturadas. Os filamentos ou encadeamentos podem ser depositados aleatoriamente para formar uma estrutura porosa que pode ser usada em um biorreator. Existem muitos meios pelos quais produzem filamentos finos ou encadeados, tal como pela extrusão através de agulha de

calibre estreito seguido pelo contato com um agente polimerizante ou por electro-spinning. No caso de extrusão, uma suspensão de células em uma matriz de alginato pode ser extrusada sob pressão através de um, ou, preferencialmente, um conjunto de pinos ocos de calibre em uma solução de cloreto de cálcio para produzir uma grande massa de filamentos ou encadeados.

Em outra modalidade, a mistura de encapsulamento celular 104 pode ser aplicada como um revestimento a uma estrutura de suporte natural ou sintética, com alta área de superfície. Em uma implementação desta modalidade, a estrutura de suporte somente necessita ser capaz de suportar a mistura de encapsulamento celular 104 e ela mesma. Por exemplo, a estrutura de suporte pode compreender uma esponja de cerâmica, colmeia, material de embalagem de reator ou outra estrutura de suporte que aumente a área de superfície por massa da mistura de encapsulamento celular 104 quando ela é aplicada. Em ainda outra modalidade, a mistura de encapsulamento celular 104 pode também, ou na alternativa, ser aplicada a partes de superfícies do reator, tal como, as paredes ou a superfície dos dispositivos de mistura.

Um aspecto importante do produto de célula encapsulada 106 é que a matriz polimerizada resultante é insolúvel em meio aquoso ou no meio em que o produto é para ser usado. Em alguns casos, agentes químicos contidos no meio podem enfraquecer ou romper os polímeros ou os agentes de ligação cruzada no um produto de célula encapsulada 106. Por exemplo, diversos ânions, tal como citrato, fosfato, e sulfato podem quelar íons de cálcio do alginato de cálcio, eliminando assim a ligação cruzada e tornando o alginato solúvel. Por causa disso, ânions de citrato, fosfato, e sulfato devem estar em baixa concentração ou eliminados do meio que está em contato com um produto de célula encapsulada com alginato de cálcio.

Outro aspecto importante do produto de célula encapsulada 106 é que a matriz polimerizada resultante contém poros que retém as células encapsuladas, mas são permeáveis a moléculas diferentes que são exigidas pela célula para manutenção ou fermentação. Por exemplo, no caso do en-

capsulamento de levedura em contas de alginato de sódio para a fermentação de açúcares para etanol, o tamanho do poro do produto de célula encapsulada 106 deve ser pequeno o suficiente para reter as células de levedura enquanto permite o movimento irrestrito de açúcares para dentro da conta e etanol para fora.

As células 101 podem ser encapsuladas em um meio de encapsulamento 102 usando um número de métodos. Todos os métodos de encapsulamento de célula envolvem a etapa de mistura 103, enquanto as células 101 são misturadas com o meio de encapsulamento 102 em uma forma líquida, seguida pela etapa de gelificação, ligação cruzada ou polimerização 105, a qual completa o encapsulamento das células na matriz de encapsulamento.

Alginato é ideal para uso como um meio de encapsulamento 102. Sais de alginato são solúveis em meio aquoso acima de pH 4, mas são convertidos para ácido algínico quando o pH é abaixado para baixo de cerca de 4. Um gel de alginato insolúvel em licor é formado na presença de íons formadores de gel, por exemplo, cálcio, bário, estrôncio, zinco, cobre (II), alumínio, e misturas dos mesmos, em concentrações apropriadas. Géis de alginato são hidrogéis, isto é, polímeros de alginato de ligação cruzada que contêm grandes quantidades de licor sem dissolução. Essas propriedades tornam os géis de alginato ideais como um meio de encapsulamento 102.

Muitas matrizes poliméricas se originam como sólidos secos e são geralmente suspensos em uma solução aquosa antes do uso. Alguns polímeros podem requerer suspensão em um solvente orgânico antes do uso. Porque o grau de polimerização, gelificação, ou ligação cruzada é uma função do comprimento do polímero e concentração em solução, alguns polímeros são usados mais rotineiramente como uma matriz de encapsulamento do que outros. Outras considerações para uma escolha de polímero incluem: a facilidade relativa da matriz de gelificar, de polimerizar, ou de formar ligação cruzada para produzir um produto final; e a toxicidade celular relativa dos polímeros por si só e dos agentes de formação de ligação cruzada e de polimerização. Mais considerações incluem a estabilidade térmica da matriz

na aplicação específica. Ainda mais considerações incluem a facilidade de uso e o custo e a disponibilidade comercial.

Para muitas das razões declaradas acima, alginatos são comumente usados para encapsulamento celular. Alginatos são biopolímeros marinhos hidrofílicos com a habilidade de formar géis estáveis ao calor que podem se desenvolver e preparar em temperaturas baixas e moderadas. Alginatos são uma família de polímeros não ramificados de resíduos de ácido β-D-manurônico e ácido α-L-gulurônico ligados por ligações 1-4 glicosídicas. Ácido algínico é substancialmente insolúvel em licor, mas forma sais solúveis em licor com metais alcalinos, tais como sódio, potássio e lítio. Preparações de alginato de sódio estão comercialmente disponíveis.

Ao preparar alginato de sódio para uso como um meio de encapsulamento, um número de fatores deve ser considerado. Por exemplo, comprimento da cadeia, viscosidade e concentração devem todos afetar a efetividade do produto final encapsulado. Em adição, diferentes produtos de alginato de sódio têm diferentes taxas de ácido manurônico e ácido gulurônico o que ocorre naturalmente em alginatos diferentes. Alginatos com taxas de ácido manurônico e ácido gulurônico específicas devem ser desejáveis para aplicações específicas.

Como um exemplo não limitativo do processo 100 no uso para fermentar açúcares em etanol, uma pasta densa de células de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* deve ser usada como as células 101 e uma solução de alginato de sódio, um polímero natural a partir da alga marrom, pode ser usada para o meio de encapsulamento 102. Em outras modalidades, outras células de levedura podem ser usadas tal como leveduras dos gêneros *Candida, Kluyveromyces, Pachysolen, Pichia, Saccharomyces*, ou outros. Quando as leveduras são misturadas com o meio de encapsulamento 102, a concentração das células de levedura é preferivelmente de cerca de 10 a 200 gramas de massa úmida de células por litro ou cerca de 25% de massa úmida de células por litro após a concentração.

Preferivelmente, alginato de sódio é misturado para uma concentração de 1 a 6 gramas por litro no meio de encapsulamento 102. Em

uma modalidade, a concentração de alginato de sódio pode ser menos do que 3% p/v em licor. A pasta de levedura e a solução de alginato são preferivelmente misturadas juntas à homogeneidade na etapa 103 do processo para formar uma mistura de encapsulamento celular 104. Preferivelmente, quando o meio de encapsulamento 102 é alginato de sódio, a viscosidade do meio de encapsulamento 102 é de cerca de 1500 a 3500 cSt e mais preferivelmente de 2000 a 3000 cSt. A viscosidade da mistura de encapsulamento celular 104 é preferivelmente de 1000 a 3500 cSt e mais preferivelmente de 1500-2500 cSt. Uma vez que o meio de encapsulamento celular 104 é criado, ele pode ser polimerizado 105. Em uma modalidade, a polimerização é realizada passando o meio de encapsulamento celular 104 através de um dispositivo de 96-pinos ocos para produzir gotículas que são gotejadas dentro de uma solução de cloreto de cálcio.

Em outra modalidade, as células misturadas com o meio de encapsulamento são células bacterianas, incluindo a bactéria *Escherichia coli, Zymomonas mobilis*, ou outras. Quando as bactérias são misturadas com a solução da matriz, a concentração de células bacterianas é preferencialmente de cerca de 80 a 625 gramas de massa úmida de células por litro.

A figura 2 ilustra um processo para a produção do meio de encapsulamento 102 a partir de um produto de encapsulamento concentrado 201. O produto de encapsulamento concentrado 201 pode começar no estado sólido ou líquido e pode ter a faixa completa de viscosidades entre eles. Em uma modalidade, o produto de encapsulamento concentrado 201 é um pó seco. Outras modalidades do processo podem começar com um polímero ou outro meio que está na forma líquida. Estocando o produto de encapsulamento concentrado 201 em uma forma de pó seco, ou o mais concentrado e desidratado quanto possível, é vantajoso porque as substâncias tipicamente têm uma vida de prateleira aumentada na forma seca. Além disso, a forma seca concentrada reduz o volume de estocagem e permite transporte mais fácil e barato. Entretanto, em outras modalidades, o processo mostrado na figura 2 pode começar com um produto de encapsulamento concentrado 201 em qualquer estado viscoso do sólido ao líquido.

Na modalidade mostrada na figura 2, um produto de encapsulamento concentrado 201 é fornecido e solubilizado com uma solução aquosa 208 na etapa de mistura 202. A etapa de mistura cria um meio de encapsulamento solubilizado o qual pode funcionar como um meio de encapsulamento 102. Entretanto, em outras modalidades, a solução solubilizada pode ser ainda processada por outras etapas adicionais como explicado abaixo. Uma vez que o meio de encapsulamento 102 é criado, ele pode ser misturado com as células 101 como mostrado na figura 1.

Em uma modalidade preferida, o produto de encapsulamento concentrado 201 é um polímero. Mais preferivelmente, o produto de encapsulamento concentrado 201 pode ser alginato de sódio. O alginato de sódio está disponível em várias formas a partir de um número de fontes incluindo: WEGO Chemical and Mineral Co., 239 Great Neck Road Great Neck, NY 11021 (www.wegochem.com); Sigma-Aldrich, 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 (www.sigmaaldrich.com); e MP Biomedicals, 29525 Fountain Pkwy. Solon, OH 44139 (www.mpbio.com).

A modalidade mostrada na figura 2 ilustra a adição de uma solução aquosa 208 para solubilizar o produto de encapsulamento concentrado 201 na etapa de mistura 202. Em uma modalidade do processo 200, o produto de encapsulamento concentrado 201 é introduzido em um estado seco dentro de um recipiente de mistura contendo um líquido pelo uso de um eductor de mistura. Na modalidade preferida, a solução aquosa é licor. Entretanto, em outras modalidades a solução aquosa pode ser uma combinação de licor e outros aditivos que podem aumentar o desempenho do meio de encapsulamento final 102.

A etapa de mistura 202 é realizada para produzir um meio de encapsulamento 102 com a concentração desejada. Em uma modalidade exemplar do processo 200, pó de alginato de sódio é usado como o meio de encapsulamento concentrado 201. O pó de alginato de sódio pode ser adicionado à solução aquosa 208 para uma concentração de cerca de 1% p/v a 6% p/v. Preferivelmente, o alginato de sódio usado é um produto granulado de cerca de 320 mPa a 1400 mPa, em que a viscosidade da solução de al-

ginato de sódio aquosa usada para o encapsulamento é de 1500 a 3500 centistokes (cSt). Um alginato de sódio granulado é preferido porque um produto granulado é solubilizado mais facilmente em licor entre cerca de 15 a 30 °C.

O produto de encapsulamento concentrado 201 pode conter contaminantes microbianos tal como bactérias. Para reduzir o nível de contaminação do produto de encapsulamento concentrado 201, um número de diferentes procedimentos de esterilização 205, 210 e 213 são opcionalmente possíveis por diferentes modalidades do processo 200. Em adição, outras modalidades podem ter antibióticos adicionados 207 e 211 antes ou após a mistura 202.

Em uma modalidade do processo 200, irradiação gama opcional 210 pode ser usada para esterilizar o meio de encapsulamento concentrado 201. A irradiação gama pode ser usada em 8 a 20 kilogray (kGy) para irradiar o meio de encapsulamento concentrado.

Em outras modalidades, a solução aquosa 208, que é estéril, pode ser usada como o veículo para esterilizar o meio de encapsulamento concentrado 201 durante a etapa de mistura 202. A solução aquosa 208 pode ter um agente de esterilização química 203 ou antibiótico 212 adicionado antes da mistura 202 com o produto de encapsulamento concentrado 201 para reduzir o nível de contaminação microbiana na mistura resultante. Em tal modalidade, um agente esterilizante 203 é misturado 205 com a solução aquosa 208 antes da etapa de mistura 202. Em certas modalidades, antibióticos 212 podem também ser adicionados à solução aquosa 208 antes da etapa de mistura 202. A solução aquosa 208 distribui o agente de esterilização 203 e/ou antibiótico 212 dentro do meio de encapsulamento concentrado 201 durante a etapa de mistura 202. Ao misturar primeiro o agente de esterilização 203 e/ou antibióticos 212 pode ser mais efetivamente uniformemente distribuídos ao meio de encapsulamento concentrado 201.

Em outras modalidades do processo 200, o meio de encapsulamento pode ser esterilizado após a mistura 202 pelo uso de irradiação ultravioleta 213 para reduzir a contaminação microbiana da mistura final 102.

Embora o uso imediato do meio de encapsulamento seja sempre preferível, etapas de esterilização opcionais 205, 210 e 213 podem ser desejáveis para aumentar a vida de prateleira do meio de encapsulamento solubilizado para estocagem. Em adição, certas modalidades podem adicionar antibióticos ou antes ou após a etapa de mistura 202. Devido os produtos de encapsulamento concentrados geralmente não serem estéreis e sua vida de prateleira após a solubilização ser encurtada pelo crescimento de microorganismos indesejados, pode ser desejável tratar o meio de encapsulamento concentrado com algumas das etapas opcionais descritas. Além disso, porque o crescimento de organismos indesejados na solução pode diminuir a viscosidade do meio de encapsulamento 102, várias etapas de esterilização podem ajudar a prevenir mudanças indesejadas na viscosidade.

Embora as etapas de esterilização opcionais 205, 210 e 213 tenham sido descritas separadamente acima, em várias modalidades as etapas de esterilização podem ser usadas em qualquer combinação. Em adição, a etapa de esterilização 205, 210 e 213 pode ser usada em qualquer combinação com a adição opcional de antibióticos.

O presente documento de patente ensina a nova ideia de usar métodos de esterilização não térmicos 205 e métodos de mistura 202. A fim de obter alguns produtos de encapsulamento concentrados 201 em solução, a mistura pode ser aquecida e agitada em uma placa de agitação ou, mais comumente, aquecida em uma autoclave de laboratório a 121°C por 15 a 45 minutos. Entretanto, aquecendo polímeros de alginato pode causar alguma quantidade de hidrólise do alginato e, dessa forma, muda as propriedades da solução de alginato, incluindo sua viscosidade.

Métodos térmicos são também geralmente usados para esterilizar a solução. Se a etapa de mistura 202 e etapas de esterilização 205, 210 e 213 são realizadas usando um método não térmico, uma concentração substancialmente mais baixa do produto de encapsulamento concentrado 201 é necessária no meio de encapsulamento final. Por exemplo, se a etapa de esterilização 205 é realizada usando um método térmico tal como autoclave, uma concentração de alginato de sódio de cerca de 3,5% (p/v) de al-

ginato de sódio para licor é requerida para maximizar o rendimento de etanol do produto celular encapsulado resultante. Entretanto, se a etapa de mistura 202 e as etapas de esterilização 205, 210 e 213 usarem um método não térmico tal como esterilização química, menos do que 3% de alginato de sódio e preferivelmente menos do que 2,5% e mais preferivelmente cerca de 2% de alginato de sódio (p/v) de alginato de sódio para licor é necessário para maximizar o rendimento de etanol do produto encapsulado resultante. Apesar da baixa concentração do alginato de sódio no produto celular encapsulado final, o desempenho do produto celular encapsulado não é diminuído.

Ao reduzir a concentração do produto de encapsulamento 201 que é requerido para produzir o meio encapsulado 102, sem afetar o rendimento do produto celular encapsulado 106, realizando as etapas de esterilização 205, 210 e 213 usando um método não térmico fornece uma economia de custo substancial em relação aos métodos térmicos. Em particular, quando o processo da figura 2 é aumentado de escala para uma escala industrial, a redução na concentração do produto de encapsulamento 201 necessária para criar o meio de encapsulamento 102 pode fornecer reduções de custos significativas.

Vários produtos de esterilização química podem ser usados como agente de esterilização 203. Por exemplo, em certas modalidades o agente de esterilização 203 pode ser selecionado do grupo consistindo em Lactrol (de PhibroChem), Lactosídeo (de Lallemand Ethanol Technologies); FermaSure (de DuPont); FermGuard (de Ferm Solutions); FermGuard Xtreme (de Ferm Solutions); cloreto de sódio; e Cloranfenicol. Em adição, mais do que um agente de esterilização 203 pode ser combinado junto.

Em uma modalidade que usa cloreto de sódio como um agente de esterilização 203, a concentração do cloreto de sódio pode ser de cerca de 1 a 2000 partes por milhão (ppm). A solução de cloreto de sódio pode ser o produto comercial FermaSure.

Em outra modalidade projetada para reter a esterilidade do meio de encapsulamento 102, os antibióticos penicilina e virginiamicina podem ser

adicionados após a esterilização. Preferivelmente, o produto comercial Lactosídeo pode ser adicionado em uma concentração de cerca de 1 a 5 ppm. Em outras modalidades, outros antibióticos podem ser usados incluindo antibióticos industrialmente produzidos tal como FermGuard Xtreme em concentrações de 1 a 5 ppm.

Como explicado acima, de preferência do que adicionar um agente de esterilização 203 ou em adição a adicionar um agente de esterilização 203, certas modalidades do processo 200 podem esterilizar o meio de encapsulamento concentrado 201 usando irradiação ultravioleta 213. Preferivelmente, a mistura do meio encapsulada 102 é irradiada com luz ultravioleta de 10 a 50 mWs/cm² ou de 10 a 50 mJ por cm² para alcançar esterilização.

Em adição à esterilização opcional 205 e opcionalmente misturar em antibióticos, o meio de encapsulamento 102 pode ainda ser processado em uma etapa de mistura de nutriente / vitamina 207. As vitaminas e os nutrientes 204 podem ser adicionados dentro do meio de encapsulamento 102 na preparação para a mistura com as células 101 como mostrado na figura 1. Criando um meio de encapsulamento 102 que já contenha as vitaminas e os nutrientes essenciais para o crescimento da célula, as células 101 podem tornar-se encapsuladas em um ambiente que realce o crescimento, a produção e a eficiência das células 101.

Em uma modalidade, as vitaminas e os nutrientes 204 podem ser pó de maceração de milho ou licor de maceração de milho. O pó de maceração de milho pode ser usado em uma concentração de 1 a 5 por cento de peso / volume. A licor de maceração de milho pode ser usada em uma concentração de 1 a 5 por cento de volume / volume.

Em outras modalidades, as vitaminas individuais ou uma mistura de vitaminas também podem ser adicionadas. Em uma modalidade, a vitamina biotina pode ser adicionada na etapa de mistura em uma concentração de 2 ng/L a 2 microgramas/L. Em outra modalidade, as vitaminas biotina e tiamina podem ser adicionadas na etapa de mistura em uma concentração de 4 ng por litro a 400 microgramas por litro.

A figura 2 mostra a esterilização 205, a mistura de antibiótico 211, e a mistura de nutriente / vitamina 207 como etapas adicionais opcionais. Entretanto, em outras modalidades, a esterilização 205, a mistura de antibiótico 207 e a mistura de nutriente / vitamina 207 podem ser realizadas em uma única etapa de mistura 202 e/ou no mesmo recipiente de mistura. Por exemplo, o produto de encapsulamento concentrado pode ser dissolvido dentro do meio de crescimento, em uma mistura de vitaminas que incluem biotina e ou tiamina, ou dentro do meio de crescimento suplementado com vitaminas, ou dentro de uma solução natural contendo biotina e ou tiamina. A etapa de mistura 202 pode ser realizada no mesmo recipiente ou em recipientes separados.

O processo 200 para fazer um meio de encapsulamento 102 e o processo 100 para misturar o meio de encapsulamento 102 com as células 101 para fazer um produto celular encapsulado 104 ambos exigem respectivamente a etapa de mistura 202 e 103. Em uma modalidade preferida, a etapa de mistura 202 e 103 pode acontecer no mesmo recipiente. Preferivelmente, a mistura 103 do meio de encapsulamento 102 e das células 101 ocorre no mesmo recipiente descartável em que o polímero de encapsulamento é solubilizado e esterilizado.

O seguinte exemplo será referido como o Exemplo 1 e demonstra a aplicação de uma modalidade do processo da figura 2 para produzir um meio de encapsulamento 102 a partir de alginato de sódio. No Exemplo 1, o processo mostrado na figura 2 foi usado para produzir cinco (5) bateladas diferentes de um meio de encapsulamento. Cada uma das cinco (5) bateladas diferentes começou com um produto de alginato de sódio diferente como o meio de encapsulamento concentrado 201. Cada um dos cinco (5) produtos de alginato de sódio teve um comprimento de polímero diferente. A viscosidade de alginato de sódio é proporcional ao comprimento do polímero e, consequentemente, o Exemplo 1 é fornecido para ilustrar o efeito de variar a viscosidade do produto de encapsulamento concentrado 201 (tal como o alginato de sódio) no etanol, produzindo a eficiência do produto celular encapsulado polimerizado 106. Como mostrado pelo Exemplo 1, variando a visco-

sidade do produto de encapsulamento concentrado pode afetar a eficiência da produção de etanol de um micróbio encapsulado em um biorreator produzindo o etanol.

No Exemplo 1, todas as bateladas variantes foram misturadas com *Zymomonas mobilis* 8b como mostrado na figura 1, polimerizadas em contas, e usadas para fermentar o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar. Cada uma das cinco (5) bateladas usou um produto de alginato de sódio diferente com uma viscosidade diferente como o produto de encapsulamento concentrado 201. Os produtos de alginato de sódio com viscosidades variantes foram então solubilizados misturando-os com licor na etapa de mistura 202 adicionando 3,5% (peso (p) / volume (v)) de alginato de sódio para licor. Em todos os casos, o carregamento da biomassa de *Zymomonas* foi de 3% e a inoculação era de 0,2 g de contas por ml de solução do hidrolisado. A solução do hidrolisado foi suplementada com 1,2 g/L do fosfato de diamônio e 0,5 p/v de extrato de levedura. As incubações foram a 30°C por 71 horas a 50 rpm em um agitador rotatório.

A Tabela 1 mostra as concentrações de etanol depois da incubação de *Zymomonas mobilis* 8b encapsulada em 5 produtos diferentes de alginato no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar. Os dados são mostrados como a média das determinações triplicadas. As viscosidades para os diferentes produtos de alginato de sódio (1% em 1% de ácido acético a 20°C) na faixa de 100 ou 200 mPa, para ainda tanto quanto possível de 1236 mPa. Os dados mostram que os dois alginatos que resultaram nas concentrações de etanol mais elevadas foram os produtos de alginato de sódio de 324 mPa e 620 mPa produzidos por Wego Chemical e Mineral Co. Consequentemente, uma modalidade preferida para usar o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar de fermentação, inclui o alginato com um meio para baixar a viscosidade de aproximadamente 324 mPa para 620 mPa.

Tabela 1. Concentração final de etanol como uma função da viscosidade do alginato.

Alginato	Etanol (g/L)
Sigma chemical	13,6
MP BIO	14,5

Tabela 1. Concentração final de etanol como uma função da viscosidade do alginato.	
Wego (324 mPa)	15,6
Wego (620 mPa)	16,9
Wego (1236 mPa)	14,2

Variar a viscosidade do produto de encapsulamento concentrado pode ser vantajosa por um número de razões. Por exemplo, se as contas devem ser usadas em um reator de estado sólido, um conta mais duro pode ser desejável para manter melhor sua forma sob o peso da biomassa e de outros contas. Consequentemente, viscosidades diferentes podem ser desejadas dependendo da finalidade para a qual o meio de encapsulamento está sendo produzido. Fatores que afetarão a viscosidade desejada do meio de encapsulamento incluem mas não estão limitados ao tipo do hidrolisado que está sendo fermentado, a célula que está sendo encapsulada e o tipo de reator que o meio de encapsulamento eventualmente terminará acima de.

Um segundo exemplo, Exemplo 2, de uma modalidade do processo da figura 2 para produzir um meio de encapsulamento 102 a partir de alginato de sódio será discutido agora. O Exemplo 2 é fornecido para ilustrar o efeito de variar a concentração do alginato de sódio (ou outro meio de encapsulamento) na eficiência do etanol do produto celular encapsulado polimerizado. Como mostrado pelo Exemplo 2, variar a concentração do alginato de sódio no meio de encapsulamento afeta a eficiência de produção do etanol de um micróbio encapsulado em um biorreator produzindo o etano.

No Exemplo 2, o processo mostrado na figura 2 foi usado para produzir cinco (5) bateladas diferentes de um meio de encapsulamento que começam com o mesmo produto de alginato de sódio, mas que variam a concentração de alginato de sódio no meio de encapsulamento final. As bateladas variantes foram então cada uma misturada com *Zymomonas mobilis* 8b como mostrado na figura 1, polimerizada em contas, e usada para fermentar o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

A concentração final de alginato de sódio, ou outro produto de encapsulamento, depende do volume de agente de solubilização adicionado e também do volume de pasta celular concentrada e outros aditivos tais co-

mo os produtos químicos de esterilização e vitaminas e nutrientes que estão presentes no produto celular encapsulado final 106.

No Exemplo 2, cada uma das cinco bateladas usou o mesmo alginato de sódio que o produto de encapsulamento concentrado 201. O alginato de sódio foi então solubilizado misturando-o com quantidades variantes de licor de 0,05% a 10% (peso (p) / volume (v)) de alginato de sódio para licor. Em todos os casos, o carregamento da biomassa de *Zymomonas* foi de 3% e a inoculação foi de 0,2 gramas de contas por mililitro da solução do hidrolisado. As incubações foram a 30 °C por 48 horas a 80 rpm em um agitador rotatório. Os dados são mostrados como a média das determinações em triplicata.

A Tabela 2 mostra as concentrações de etanol depois da incubação de *Zymomonas mobilis* 8b, encapsulada em 5 concentrações diferentes de alginato de sódio de Wego 324 mPa, no hidrolisado do bagasso de cana-de-açúcar. Os dados são mostrados como a média das determinações em triplicata. Os dados mostram que o percentual de alginato que resultou na concentração final de etanol mais elevada depois da fermentação foi de cerca de 2% (p/v) de alginato de sódio para licor ou cerca de 2 gramas de alginato de sódio por 100 ml de solução aquosa. Consequentemente, uma modalidade preferida para o uso do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar fermentado, inclui a mistura de alginato de sódio para uma concentração de cerca de 1% - 2% (p/v) de alginato de sódio para licor e mais preferivelmente cerca de 1,75% - 2% (p/v) de alginato de sódio para licor e ainda mais preferivelmente 2% (p/v) de alginato de sódio para licor.

Tabela 2. Concentração final de etanol como uma função da concentração de alginato.

Concentração de Alginato (% p/v)	Etanol (g/L)
1	4,5
1,5	4,4
1,75	4,5
2	4,7
3,5	4,3

Em adição à realização do processo mostrado na figura 2 para

criar um meio de encapsulamento 102 que tenha a viscosidade inicial desejada, é também importante manter a viscosidade do meio de encapsulamento 102 se ele não for usado imediatamente. Como mencionado acima, a viscosidade do meio de encapsulamento 102 pode ser reduzida pelo crescimento de organismos indesejados. Consequentemente, pode ser vantajoso executar individualmente algumas das etapas de esterilização opcionais ou individualmente ou em combinação se o meio de encapsulamento for armazenado por qualquer comprimento de tempo antes do uso.

Um terceiro exemplo, Exemplo 3, de uma modalidade do processo da figura 2 será discutido agora. O Exemplo 3 mostra os efeitos benéficos de incluir a etapa de esterilização opcional 205 no processo da figura 2 se o meio de encapsulamento 102 tiver que ser armazenado antes do uso.

No Exemplo 3, seis (6) bateladas separadas de soluções de 2% p/v de alginato de sódio (Wego 324 mPa) foram preparadas como meios de encapsulamento 102. Uma das bateladas não foi esterilizada por completo e cada uma das outras cinco (5) bateladas foi esterilizada 205 com um agente de esterilização diferente 203. Os agentes de esterilização 203 foram selecionados a partir do grupo incluindo: Lactosídeo; FermaSure; FermGuard; FermGuard Xtreme; e cloranfenicol. Cada uma das 6 bateladas foi então permitida incubar por 120 horas em temperatura ambiente. As viscosidades subsequentes após a incubação foram determinadas usando um viscosímetro do tipo Copo de Zahn. Os dados mostram que o uso de um antibiótico comercial que seja geralmente reconhecido como seguro (GRAS) ajuda em manter a viscosidade da solução do alginato elevada.

Tabela 3. Viscosidades de Alginato após tratamento antimicrobiano.

Tratamento	Concentração (ppm)	Viscosidade (cSt)
Nenhum	-	37
Lactosídeo	2	463
FermaSure	15	482
FermGuard	2	449
FermGuard Xtreme	2	36
Cloranfenicol	50	605

As células são geralmente preparadas em algum método antes do encapsulamento em uma matriz de encapsulamento. Uma preparação é preparar uma certa densidade de células para o encapsulamento. Dependendo do uso final do produto celular encapsulado da matriz 106, as células encapsuladas em uma matriz podem estar ou em uma alta densidade ou em uma baixa densidade. Por exemplo, nos processos de fermentação para produzir ácidos orgânicos, antibióticos, ou etanol, é desejável para as células estarem em uma alta densidade no estado 'livre' no reator da fermentação, consequentemente também seria vantajoso para as células estarem em alta densidade na matriz de encapsulamento.

A fim de conseguir uma alta densidade celular em um reator de fermentação, por exemplo, as células devem primeiramente ser concentradas a uma alta densidade antes de misturar com uma matriz de encapsulamento. Um método comum de laboratório para conseguir a alta densidade celular como um meio de preparar um concentrado celular para o encapsulamento em uma matriz de encapsulamento é centrifugar uma cultura celular para aumentar a concentração celular. A suspensão celular concentrada é então misturada com o meio de encapsulamento. Embora as centrífugas contínuas e as grandes centrífugas de batelada estejam disponíveis na indústria, ambos os sistemas de centrifugação são inadequados para a produção de quantidades muito grandes de células concentradas em períodos curtos de tempo.

A figura 3A ilustra uma modalidade de um processo 300 para produzir uma suspensão celular concentrada 305. Em uma modalidade, o processo 300 pode ser usado para criar uma suspensão celular concentrada 305 para uso como as células 101 no processo 100 da figura 1. Conforme mostrado na figura 3, uma célula de semente ou células 302 são combinadas com um caldo de nutrientes 301 e as células 302 são permitidas propagar por todo o caldo de nutriente 301. As células são então concentradas 304 em uma suspensão celular concentrada 305.

A figura 3B ilustra uma modalidade de um sistema para a produção de uma suspensão celular concentrada conforme mostrado na figura 3A.

A propagação celular é realizada preferivelmente em um biorreator 311. O processo 300 pode ser um processo em batelada ou um processo contínuo e o tipo do biorreator 311 pode ser selecionado conformente. Em um processo em batelada, o biorreator 311 é preferivelmente um tipo de biorreator projetado para o processamento da batelada tal como um reator de cama embalada ou um reator de tanque agitado. Em uma modalidade preferida do processo 300 usando uma modalidade de operação de batelada, a propagação 303 de uma batelada subsequente de células iniciais enquanto a batelada precedente estiver sendo concentrada 304.

Outras modalidades do processo 300 podem usar um processo contínuo em vez de um processo em batelada. Em uma modalidade preferida de um processo contínuo 300, o biorreator 311 é um biorreator quimiostático, entretanto, outros tipos de reatores contínuos podem ser usados. Nas modalidades do processo 300 que são contínuos, meio de crescimento fresco é continuamente adicionado, enquanto o meio que contém as células é removido continuamente. Assim, sob condições de processamento contínuo, uma fonte contínua de suspensão celular é produzida para o encapsulamento final.

Os numerosos tipos de biorreatores são introduzidos no mercado por várias companhias incluindo: Xcellerex, Inc., 170 Locke Drive Marlborough, MA 01752-7217; Sartoius AG, Weender Landstrasse 94-108, D-37075 Goettingen, Alemanha; Thermo-Scientific (HyClone) 925 West 1800 South Logan, UT 84321; e Millipore, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821.

A fim criar uma grande suspensão celular para uso em aplicações industriais ou em outras de larga escala, o biorreator 311 usado para propagar as células pode também ser grande em tamanho. Por exemplo, células podem ser propagadas em um biorreator 311de pelo menos 10 litros (L), ou mais preferivelmente pelo menos 200 litros, ou ainda mais preferivelmente pelo menos 2000 litros.

A concentração das células no biorreator 311 depois da propagação celular 303 variará dependendo de muitos fatores tais como o tipo da célula, o caldo de nutriente, e o tipo de biorreator. Tipicamente as concentra-

ções celulares após a propagação celular 303 variam entre cerca de 1 e cerca de 25 gramas de massa úmida por litro de meio de crescimento. Existem numerosas aplicações, tais como a fermentação da biomassa, que são mais eficazes se a densidade das células pode ainda ser aumentada.

Nas modalidades mostradas nas figuras 3A e 3B, as células são ainda concentradas na etapa de concentração celular 304 em um dispositivo de concentração celular 312. É importante que etapa de concentração celular 304 não afete significativamente a viabilidade das células 302.

Em uma modalidade preferida, etapa de concentração celular 304 é realizada concentrando as células em uma membrana e colhendo-as. Em tal modalidade preferida, o dispositivo de concentração celular 312 é preferivelmente um sistema de filtração de fluxo tangencial.

Em um sistema de filtração de fluxo tangencial, também conhecido como um sistema de filtração de fluxo transversal, a alimentação é passada através de um filtro de membrana (tangencial) em pressão positiva em relação ao lado permeável. Uma proporção do material que é menor do que o tamanho do poro da membrana passa através da membrana como permeato ou filtrado; todo o restante é retido no lado da alimentação da membrana como o retentato.

Um sistema de filtração de fluxo tangencial separa células do meio de crescimento e coleta as células na membrana ou no filtro. As células podem então ser colhidas a partir da membrana e serem coletadas. O sistema das filtrações do fluxo tangencial pode produzir uma pasta de célula, enquanto mantém viabilidades elevadas da célula.

Em ainda outra modalidade do processo 300, uma suspensão celular concentrada 305 é conseguida operacionalmente integrando a propagação da célula processa 303 com o processo 304 de concentração celular 304. Em um processo integrado 300, a colheita das células concentradas no retentado de filtração do fluxo tangencial é usada para produzir o produto celular encapsulado e pode ser usada como o inóculo para propagação de bateladas em série.

Em um sistema preferido 310 projetado para funcionar como um

sistema integrado 300, o dispositivo de concentração celular 312 pode ser operacionalmente e funcionalmente conectado ao biorreator 311 de modo que as células possam ser facilmente transferidas entre o biorreator 311 e o dispositivo da concentração 312. Embora, a propagação integrada 303 e a concentração 304 possam ser usados para batelada ou o processamento contínuo, conectar o biorreator 311 com o dispositivo de concentração celular 312 é especialmente desejável quando o processo 300 é projetado como um processo contínuo. Em outras modalidades não integradas, o biorreator 311 e o dispositivo de concentração 312 podem não ser conectados e as células 302 são transferidas externamente entre os dois dispositivos.

Em outra modalidade, o dispositivo de concentração celular 312 ainda inclui um recipiente de armazenagem da concentração celular. O recipiente de armazenagem da concentração celular permite que o dispositivo de concentração celular 312 faça repetidamente um ciclo com as células concentradas para trás através do processo de concentração e dessa forma ainda aumentando a concentração das células. Como uma modalidade exemplar, um sistema de filtração de fluxo tangencial é conectado a um recipiente de armazenagem do retentado. As células fazem repetidamente um ciclo para trás através do sistema de filtração de fluxo tangencial do recipiente de armazenagem do retentado para aumentar repetidamente a concentração celular. Em tal modalidade, as células podem ter a concentração de cerca de 80 a 625 gramas de massa úmida de células massa úmida por litro.

Em outras modalidades, outros dispositivos de concentração celular 312 podem ser usados tal como uma centrífuga. Outros meios pelos quais produzir suspensões celulares concentradas é recorrem ao comportamento de floculação natural de algumas células. No caso de flocular a levedura, por exemplo, floculações sedimentada que estabelecem na parte inferior de um biorreator contém uma alta concentração celular. Estas floculações podem ser colhidas e misturadas com um meio de encapsulamento ou ter a matriz de encapsulamento adicionada a elas. Um inconveniente a este método de concentração celular é que somente um baixo número de espécies celulares floculam ou floculam sob condições em que produtos valiosos

são produzidos.

Em outras modalidades, células livres são permitidas sedimentar em um recipiente de reator para aumentar a densidade celular. As células sedimentadas podem então ser colhidas em alta densidade para a mistura subsequente com um meio de encapsulamento. Um inconveniente deste método é uma perda de viabilidade celular depois da sedimentação. Um outro inconveniente é que determinadas células são móveis e não sedimentam facilmente.

Em determinadas modalidades do processo 300, as células podem ser propagadas crescendo as células em bateladas em um biorreator sob condições específicas para a geração de biomassa celular. A propagação repetida das células em uma único recipiente do biorreator pode ser realizada sem o benefício da esterilização do recipiente do biorreator entre as bateladas de propagação neste processo.

Nas modalidades do processo 300 que são projetadas para serem um processo em batelada, uma porção das células da etapa de concentração celular 304 pode ser reutilizada na etapa opcional 306 como um inóculo para a próxima batelada de propagação celular. Em uma modalidade preferida em que um inóculo é usado, de 2% a 20% e mais preferivelmente de 5% a 10% das células da concentração celular são recicladas do dispositivo de concentração celular 312 para o biorreator 311 para atuar como um inóculo para a próxima batelada de propagação celular 303. Usando uma porção da batelada de células anterior como um inóculo para uma batelada de células subsequente, o biorreator pode processar numerosas bateladas de células sem nenhuma esterilização adicional. Nas modalidades em que um inóculo é usado, meio de crescimento fresco pode ser adicionado ao inóculo da célula pela introdução através de um filtro estéril no biorreator de propagação.

Nas modalidades do processo 300 que são projetadas para serem funcionadas como um processo contínuo, uma porção de células a partir de um processo anterior pode também ser usada como um inóculo para ter o processo contínuo começado.

Um dispositivo de filtração do fluxo tangencial é a modalidade preferida do dispositivo de concentração celular 312. Concentrar as células usando um dispositivo de filtração do fluxo tangencial é particularmente bem adequada para a produção de grandes volumes de contas de alginato de cálcio tendo uma ou mais células fermentativas encapsuladas aqui. A Tabela 4 mostra exemplos de filtração do fluxo tangencial para concentrar células fermentativas propagadas, tais como *Pachysolen* e *Zymomonas mobilis* 8b de NREL.

Tabela 4. Concentração de células microbianas por filtração de fluxo tangencial.

Exemplos	Concentração TFF			Rendimentos de Massa Celular		
Célula Propagada	Volume do Filtrado (L)	Volume do Retentado (L)	Fator de Concentração	Propagação Estimada de Massa Úmida (g/L)	Retentado Atual de Massa Úmida (g/L)	Células Viáveis
Pachysolen sp.	9,30	0,63	15	24,8	396,2	96,0%
Zymomonas mobilis 8b (NREL)	11,40	0,77	15	10,4	182,3	94,5%
Zymomonas mobilis 8b (NREL)	10,75	0,52	21	10,4	230,8	>99%
Zymomonas mobilis 8b (NREL)	179,00	18,00	10	18,5	206,1	>99%
Zymomonas mobilis 8bm (NREL)	205,20	11,80	17	11,7	218,8	>99%

Como mostrado na Tabela 4, as células podem ser concentradas entre 10 e 21 vezes de sua concentração normal de propagação usando um dispositivo de filtração do fluxo tangencial. Em outras modalidades, as células podem ser concentradas ainda mais do que 21 vezes de suas concentrações de propagação normais. Além disso, usando um sistema de filtração de fluxo tangencial tem muito pouco efeito na viabilidade total das células. Uma alta concentração de células na suspensão celular é desejável para criar um produto encapsulado celular com uma alta concentração celu-

lar. Produtos celulares encapsulados com altas concentrações celulares superam baixas concentrações celulares em muitas situações incluindo um reator de fermentação.

Depois da concentração celular 304, as células concentradas 305 são recuperadas e talvez usadas em um processo 100 como mostrado na figura 1 para produzir um produto celular encapsulado 106. Como mostrado na figura 1, as células concentradas são completamente misturadas 103 com um meio de encapsulamento 102 tal como alginato de sódio. A concentração celular desejada dentro do meio de encapsulamento é ou dependente do organismo ou do substrato. Por exemplo, um carregamento apropriado do alvo para *Pachysolen tannophilus* em alginato de sódio para o hidrolisado da fermentação é pelo menos 5 g de células / 100mL do meio de alginato de sódio.

Misturando 103 o meio de encapsulamento 102 com a suspensão celular concentrada 305 pode ocorrer no mesmo dispositivo ou recipiente que é usado para a suspensão do alginato ou a mistura pode ocorrer em um dispositivo separado. Por exemplo, o alginato de sódio pode ser preparado em um saco de mistura e então as células 101 podem ser assepticamente adicionadas ao mesmo saco para formar a mistura celular encapsulada 104.

Referindo de volta à figura 1, a etapa de mistura 103 pode misturar mais de um tipo de célula no mesmo meio de encapsulamento 102 de forma que o produto celular encapsulado contenha uma pluralidade de tipos de células com propriedades complementares. Por exemplo, as células que são particularmente boas em fermentar cinco açúcares de carbono podem ser combinadas no mesmo produto celular encapsulado com células que são particularmente boas em fermentar seis açúcares de carbono.

Ao combinar células com as propriedades complementares, as células podem ser combinadas dentro do mesmo veículo de encapsulamento, ou as células podem ser encapsuladas separadamente e as células encapsuladas separadamente combinadas no mesmo reator de fermentação. Por exemplo, se os contas de alginato do cálcio são usados como veículo de

encapsulamento, as células complementares diferentes podem ser combinadas dentro do mesmo conta. Como um exemplo, para fermentar eficazmente o hidrolisado de madeira leve, que contém os açúcares manose, galactose, glicose e xilose, ao etanol, um pode combinar *Zymomonas mobilis*, cepa 8b de NREL, que fermenta glicose e xilose ao etanol, com *Saccharomyces cerevisiae*, que fermenta manose e galactose, em um único conta do produto. Dessa forma, propriedades fermentativas vantajosas de espécies microbianas diferentes são combinadas em um único conta do produto.

Na modalidade preferida do processo 300, um recipiente descartável é reutilizado para bateladas de propagação celular individuais. Uma modalidade de um recipiente descartável é um saco do biorreator descartável de polímero plástico em uma estrutura de plástico ou de metal. O recipiente descartável pode preferivelmente ser usado para entre 1 e 10 bateladas individuais de propagação celular e mais preferivelmente ser usada para 3 a 4 bateladas de propagação celular. Em determinadas modalidades quando um recipiente descartável é reutilizado para bateladas de propagação celular múltiplas, o recipiente não é esterilizado entre as bateladas. Em outra modalidade, 5% a 10% da biomassa celular a partir da batelada de propagação anterior pode ser usada como um inóculo para as bateladas subsequentes. Se um sistema de filtração de fluxo tangencial é usado como dispositivo de filtração, uma porção do retentado concentrado pode ser usada como inóculo e ser transferida para o biorreator de propagação a partir do recipiente de armazenagem do retentado.

A figura 4 ilustra um exemplo de um biorreator que usa um saco reutilizável e descartável. A figura 4 é uma modalidade de um biorreator 400 que inclui uma estrutura 401 e um saco descartável e/ou reutilizável 402. O biorreator 400 é uma modalidade de um biorreator 311 que pode ser usado no sistema 300 da figura 3.

Usando um biorreator 400 que inclui um saco descartável 402 fornece diversas vantagens sobre outros projetos de biorreator. Os sacos descartáveis 402 previnem procedimentos caros de Clean In Place (CIP) e procedimentos de validação de desinfecção que devem ser usados ao usar

os tanques de fermentação de aço inoxidável. Além disso, um saco descartável pode ajudar a controlar problemas de contaminação porque pode ser descartado e substituído por um novo saco estéril a qualquer momento. Enquanto o saco descartável 402 puder ser substituído em cada batelada, como explicado acima do saco descartável pode também ser usado para um número de bateladas antes de ser descartado. Em uma modalidade preferida de um processo 300 incluindo um biorreator 311 incluindo um saco descartável 402, o saco descartável 402 é usado para 3 a 4 bateladas antes de ser descartado. Reutilizado o saco descartável reduz o custo de retorno de substituir o saco descartável 402.

O biorreator 400 incluindo o saco reutilizável 402 do pode ser usado para ambos os processamentos de batelada e contínuo (quimiostático).

Os processos e os instrumentos descritos aqui são projetados para serem de partícula mesmo quando aumentados de escala para criar um produto celular encapsulado em uma escala industrial. Por exemplo, os processos e os instrumentos descritos aqui podem ser umentados de escala até reatores industriais de serviço ou uma série de reatores industriais. Os reatores industriais podem ser na escala de 20.000 L (75.000 gal.) ou ainda maiores.

Embora as modalidades tenham sido descritas em referência aos desenhos e aos exemplos específicos, será prontamente apreciado por aqueles habilitados na técnica que muitas modificações e adaptações dos processos e dos instrumentos descritos aqui são possíveis sem sair do espírito e do escopo das modalidades como reivindicado em seguida. Assim, deve ser compreendido claramente que esta descrição é feita somente a título de exemplo e não como uma limitação do escopo das modalidades como reivindicado abaixo.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de um produto celular encapsulado **caracterizado pelo** fato de que o processo compreende as seguintes etapas:

a. concentrar as células a partir de um meio de propagação;

b. misturar as células concentradas com um meio de encapsulamento usando um agitador alternativo para formar uma mistura de encapsulamento celular; e

c. polimerizar a mistura de encapsulamento celular para formar um produto celular encapsulado.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o biorreator é um biorreator quimiostático.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que as células são concentradas para mais que 180 gramas de massa úmida de células por litro.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o meio de encapsulamento tem uma viscosidade de cerca de 1000 a 3500 centistokes.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a mistura de encapsulamento celular tem uma viscosidade de cerca de 1000 a 3500 centistokes.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender a etapa de adicionar nutrientes.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que os nutrientes são adicionados através de um filtro estéril.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender a etapa de adicionar vitaminas.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender a etapa de adicionar antibióticos.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que as células concentradas são células de leveduras.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**

pelo fato de que as células concentradas são células de bactérias.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o meio de encapsulamento é um alginato.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o meio de encapsulamento contém menos do que 3% de alginato de sódio em peso por volume.

14. Sistema para a produção de um produto celular encapsulado, **caracterizado pelo** fato de que o sistema compreende:

um biorreator;

um meio de concentração celular em comunicação com o biorreator; e

um agitador alternativo operativamente arranjado para misturar uma suspensão celular a partir do meio de concentração celular com um meio de encapsulamento.

15. Sistema, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que o meio de concentração é um sistema de filtração de fluxo tangencial.

16. Sistema, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que o biorreator é um biorreator quimiostático.

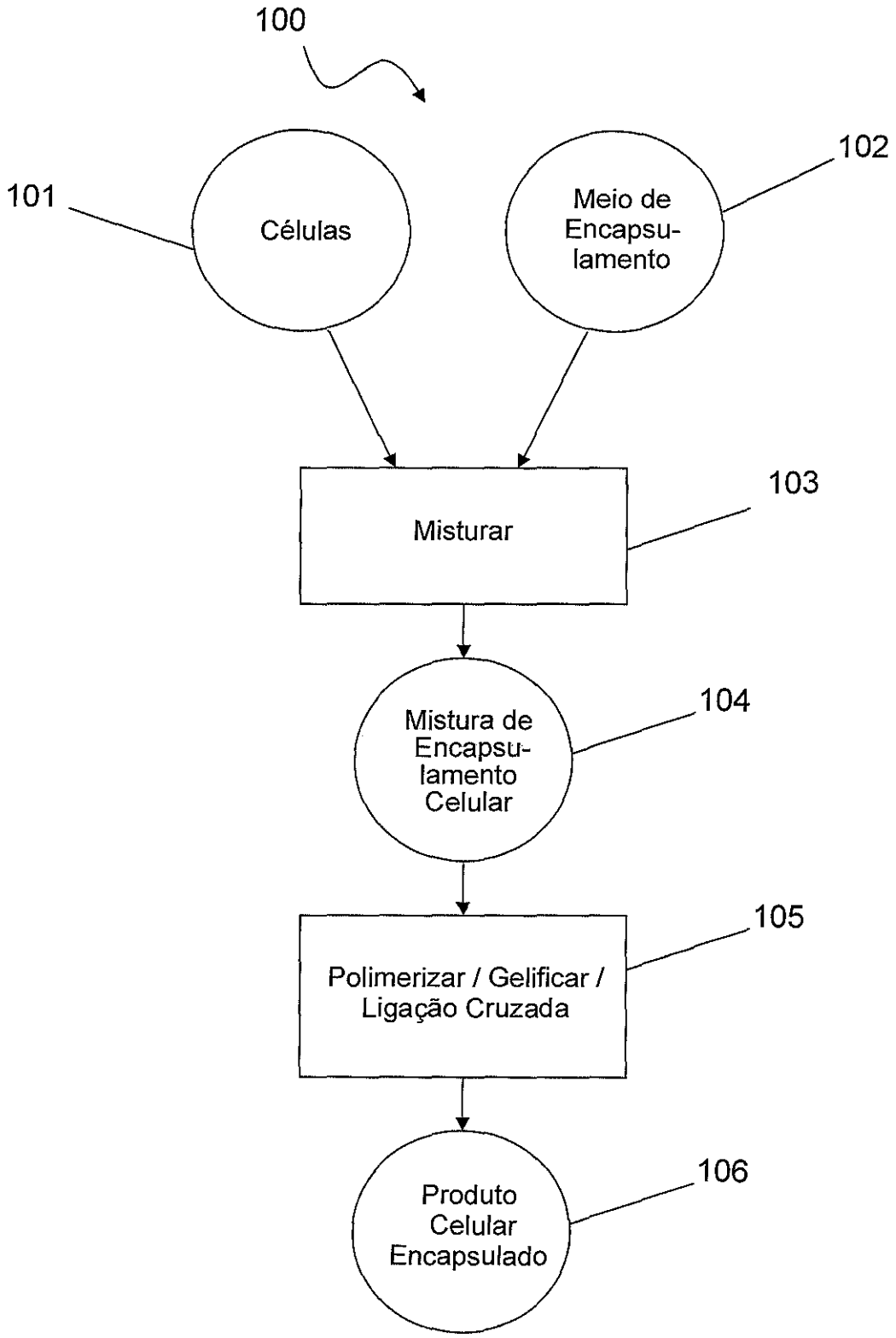

100
101
Células
102
Meio de Encapsu-lamento
Misturar
103
Mistura de Encapsu-lamento Celular
104
Polimerizar / Gelificar / Ligação Cruzada
105
Produto Celular Encapsulado
106

FIG. 1

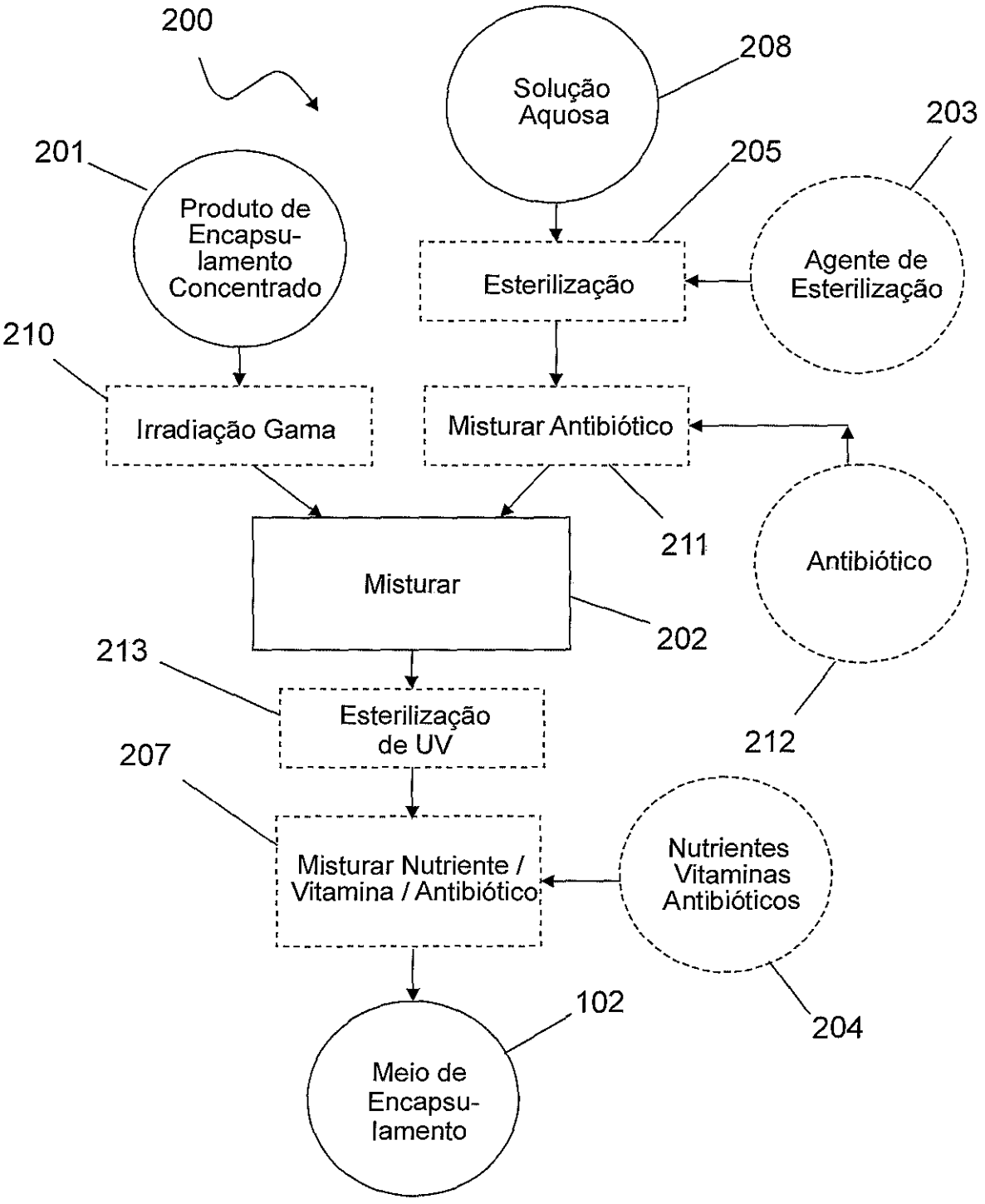

200
Solução Aquosa
208
203
201
205
Produto de Encapsu-lamento Concentrado
Esterilização
Agente de Esterilização
210
Irradiação Gama
Misturar Antibiótico
211
Misturar
202
Antibiótico
213
Esterilização de UV
212
207
Misturar Nutriente / Vitamina / Antibiótico
Nutrientes Vitaminas Antibióticos
204
102
Meio de Encapsu-lamento

FIG. 2

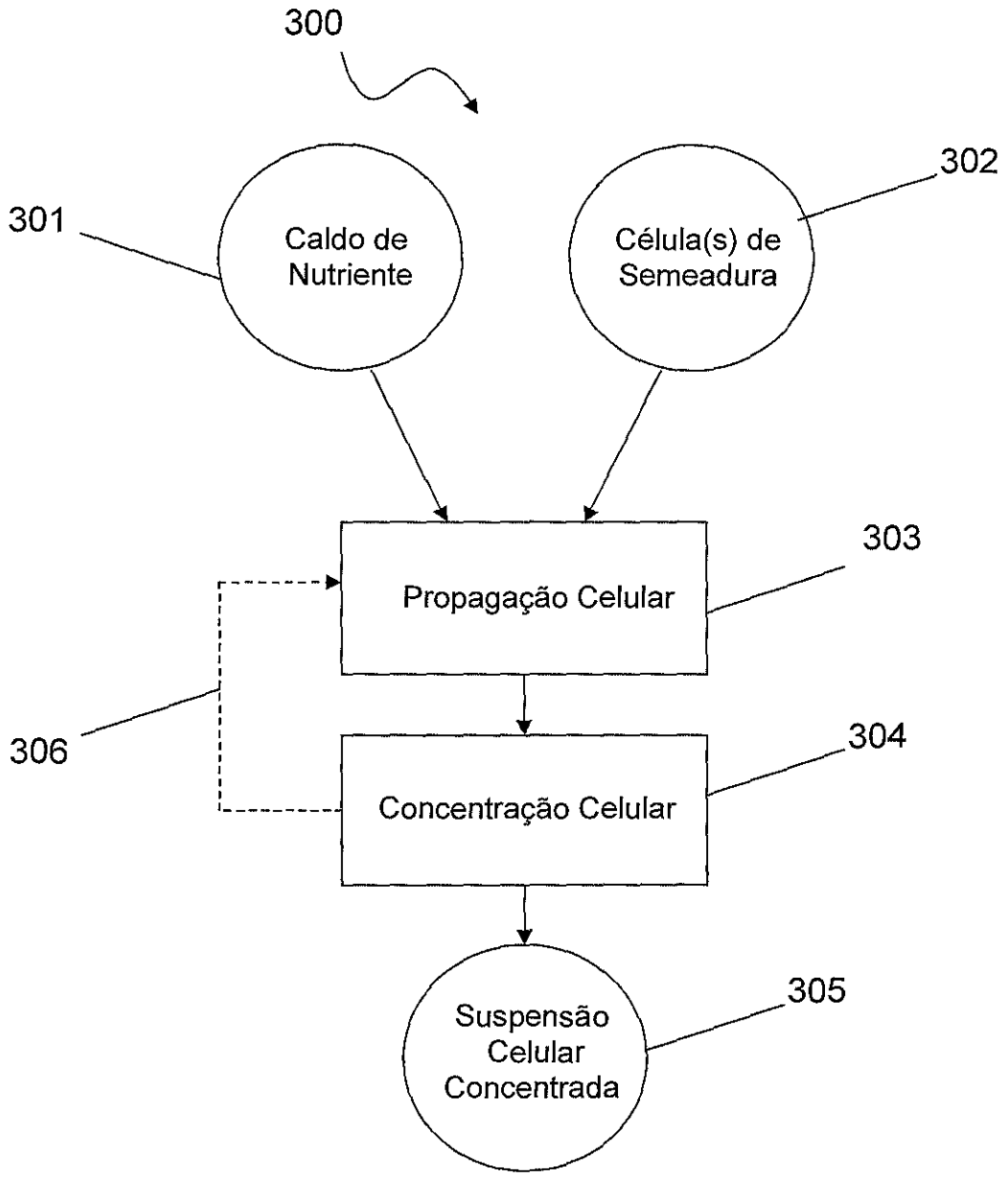

300
301
Caldo de Nutriente
302
Célula(s) de Semeadura
303
Propagação Celular
306
304
Concentração Celular
305
Suspensão Celular Concentrada

FIG. 3A

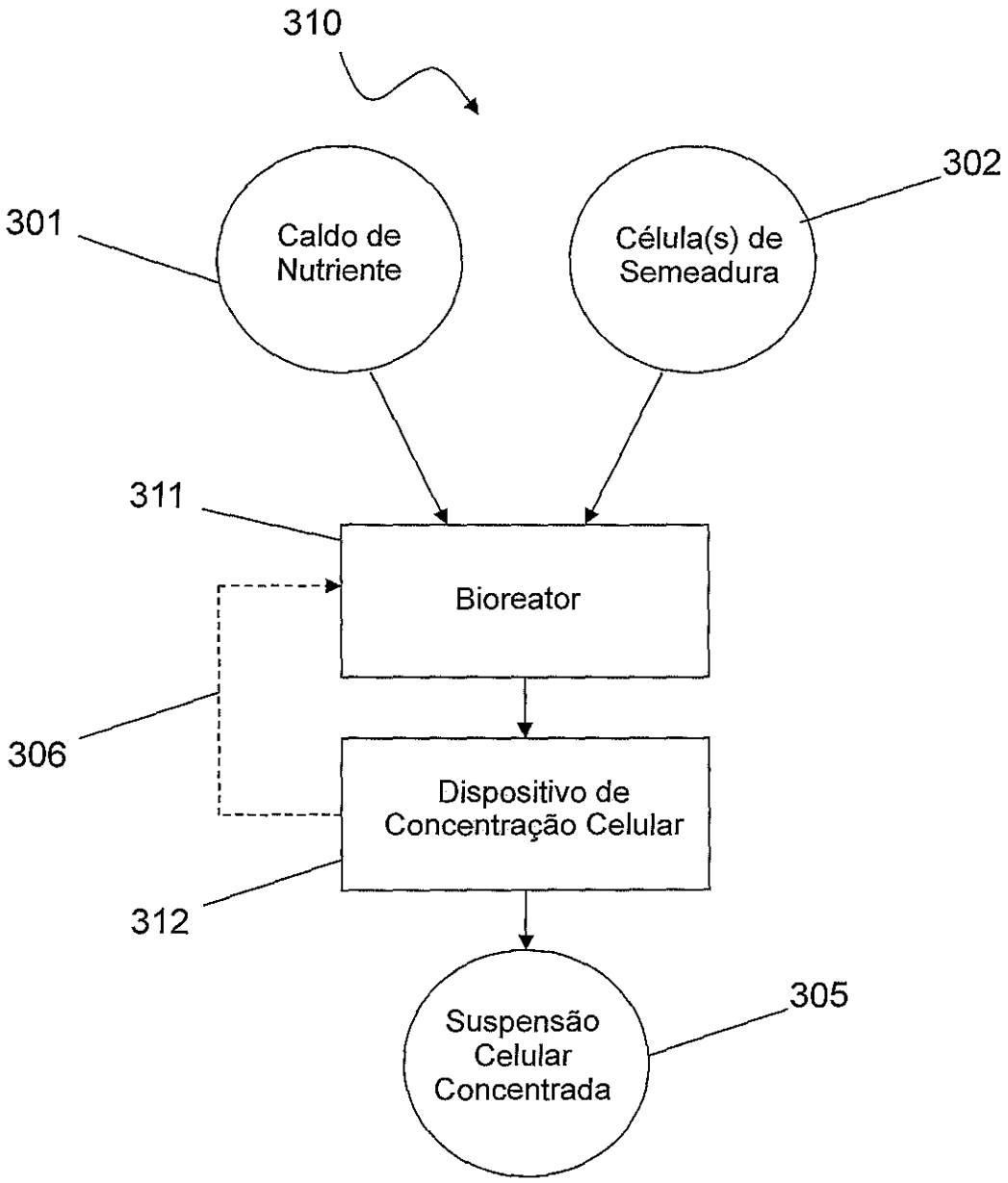

310
301
Caldo de Nutriente
302
Célula(s) de Semeadura
311
Bioreator
306
Dispositivo de Concentração Celular
312
Suspensão Celular Concentrada
305

FIG. 3B

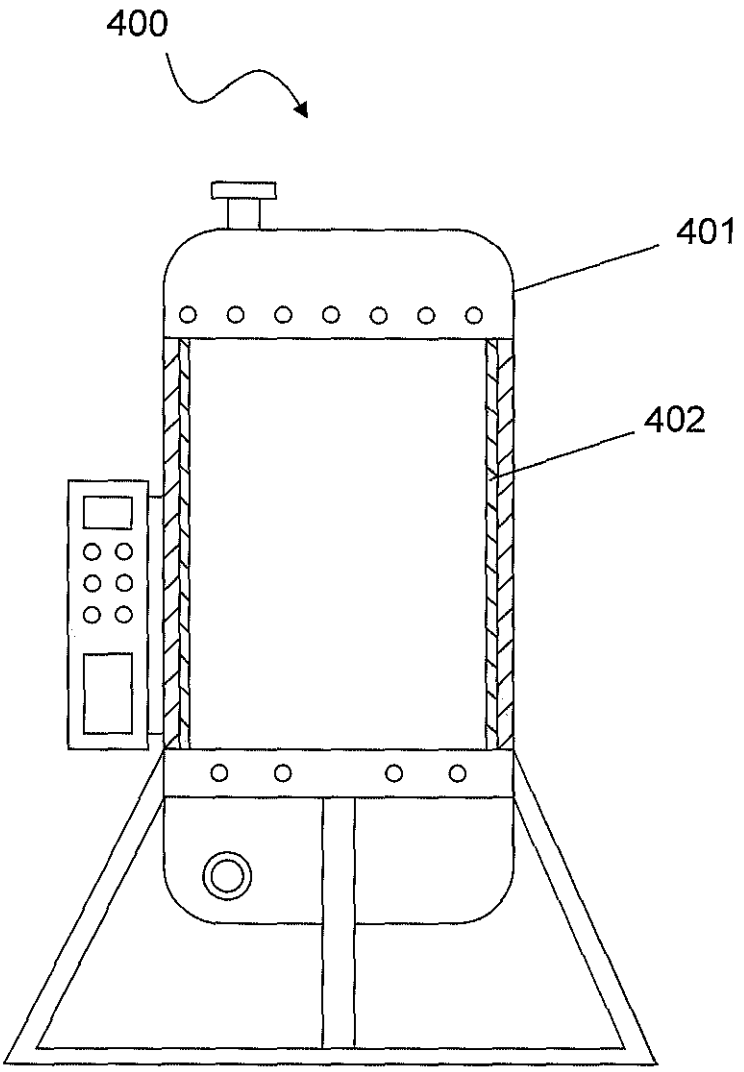


FIG. 4

RESUMO

Patente de Invenção: **"APARELHO E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UM PRODUTO CELULAR ENCAPSULADO".**

A presente invenção refere-se a um processo para a produção de um produto celular encapsulado, o processo compreende as etapas de concentrar células a partir de um meio de propagação usando um sistema de filtração de fluxo tangencial. Misturando as células concentradas com um meio de encapsulamento para formar uma mistura de encapsulamento celular. Polimerizando, gelificando, ou cruzando transversalmente a mistura de encapsulamento celular para formar um produto celular encapsulado.