



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

(21) BR 10 2012 001579-0 A2

(22) Data de Depósito: 24/01/2012
(43) Data da Publicação: 17/09/2013
(RPI 2228)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 11/08

(54) Título: PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO DE MATRIZES POLIMÉRICAS SINTÉTICAS PARA APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE

(73) Titular(es): José Luiz de Lima Filho

(72) Inventor(es): José Luiz de Lima Filho, Maria do Carmo de Barros Pimentel, Pabyton Gonçalves Cadena

(57) Resumo: PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO DE MATRIZES POLIMÉRICAS SINTÉTICAS PARA APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE. A presente invenção refere-se a um inovador processo de ligação covalente de biocatalisadores, como enzimas, proteínas e polipeptídios em poliamidas parcialmente hidrolisáveis em meio ácido como matrizes poliméricas sintéticas, de baixa contaminação microbiana devido a sua natureza hidrofóbica, com grande resistência para empacotamento ou revestimento de biorreatores de leito fixo. Adicionalmente, a presente invenção também apresenta modelos destes biorreatores construídos na vertical ou na horizontal aplicados ou não em série e seu uso na produção de xarope de açúcar invertido a partir de soluções de sacarose.

PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO DE MATRIZES POLIMÉRICAS SINTÉTICAS PARA
APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE

RELATÓRIO DESCRITIVO

5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um processo inovador de ligação de um biocatalizador (enzimas entre outros), em matrizes poliméricas sintéticas ativadas, de baixa contaminação microbiana, com alta resistência mecânica ao empacotamento em colunas e como revestimento de superfícies de biorreatores. Adicionalmente, a presente invenção também apresenta modelos destes biorreatores e aplicações na indústria açucareira.

Antecedentes da Invenção

Biocatalizadores são amplamente utilizados na indústria, mas estes em suas formas purificadas ou parcialmente purificadas não podem ser reutilizados e são altamente sensíveis a solventes, temperatura, pH e contaminação microbiana. Diante disto, nos últimos 30 anos viu-se um enorme avanço nos processos para tornar estes biocatalisadores, como as enzimas, insolúveis em água ligando-os em matrizes poliméricas sintéticas, mas em anos recentes houve um aumento no uso destas enzimas ligadas (Imobilizadas) a polímeros em processos industriais (AHMAD et al., 2001). O processo de imobilização de enzimas possui inúmeras vantagens para superar as limitações acima citadas como: aumento significativo da estabilidade; proteção contra desnaturação; redução significativa nos custos operacionais (AKGÖL et al., 2001); possibilidade de reusos (DAVID et al., 2006); desenvolvimento de biorreatores facilitando a obtenção dos produtos da reação (BERENSMEIER et al., 2004); e redução significativa de contaminantes nos produtos finais (SANJAY e SUGUNAN, 2005). Apesar das vantagens citadas, o uso de enzimas imobilizadas na indústria tem sido limitado (LEÃO, 1996), diante disto, a presente invenção propõe um processo inovador e simples para a imobilização de biocatalizadores com aplicação na construção de biorreatores.

Dentre os métodos utilizados para a imobilização de enzimas, a ligação covalente é permanente e mais estável entre a matriz polimérica e a enzima ocorrendo através de diversos radicais, tais como: aminas, hidroxilas, carboxilas e grupos fenólicos (CHEN et al., 2000) conferindo a enzima maior estabilidade operacional e ao armazenamento (LEÃO, 1996), produção de um derivado imobilizado (enzima ligada à matriz polimérica) mais estável, fazendo a enzima mais resistente a variações de temperatura, pH e a solventes orgânicos. A extensão dessas melhorias depende das condições experimentais, da natureza da enzima, das características do polímero e principalmente do processo usado para ligação da enzima (BAYRAMOĞLU et al., 2003; CHEN et al., 2000).

Certas patentes e artigos científicos apresentam métodos de imobilização de enzimas em matrizes poliméricas:

A patente US 20107811796 (2010) descreve a imobilização de enzimas em fibras de algodão usando polietilenoimina como ligante inseridas em biorreator para a produção de galactooligossacarídeos. O documento é diferente da presente invenção porque foi usado um polímero natural de fácil contaminação microbiana e a polietilenoimina para ligação direta com a enzima. A presente proposta utiliza polímeros sintéticos e polietilenoimina como revestimento destes polímeros em uma das etapas de ativação.

A patente US 20100209968 A1 (2010) relata uma metodologia de imobilização de enzimas em membrana de *Nafion*[®] que apesar de ser um polímero sintético não é uma poliamida ativada em meio ácido e permite difusão intraparticular acumulando produtos de reação o que facilita a contaminação do sistema.

A patente BR PI 0912418-7 A2 (2009) apresenta um método para imobilização de enzimas por enclausuramento em lipossomas para aplicação em células combustíveis, biossensores ou biorreatores. Entretanto, o documento difere da presente invenção porque não utiliza ligação covalente e não usa polímeros sintéticos desde que lipossomas são constituídos de lipídeos naturais.

As patentes, US 20097521504 (2009) e US 20080108745 A1 (2008), descrevem um método de imobilização irreversível de enzimas em poliuretano. O polímero

sintético foi preparado em meio aquoso onde a enzima estava dissolvida, ficando a mesma dentro da matriz do polímero hidrofílico enclausurada. A presente invenção usa poliuretano hidrofóbico na forma de espuma rígida ativado com a enzima posteriormente ligada covalentemente na superfície polimérica, que permite acesso
5 livre do substrato ao centro ativo da enzima insolúvel.

A patente BR PI 0804590-9 A2 (2008) descreve um processo de adsorção ou oclusão de amilases em gel de alginato (polímero natural extraído de algas marrons) para hidrólise do amido. Mas o alginato apresenta baixa resistência mecânica, alta probabilidade de contaminação microbiana e pode ser dissolvido por eletrólitos fortes
10 tais como fosfatos.

Artigos científicos sobre a imobilização covalente de invertase em pérolas de nylon-6 revestidas com glutaraldeído (VALLEJO-BECERRA et al., 2008) ou polietilenoimina (AMAYA-DELGADO et al., 2006) têm sido publicados, mostrando um tempo de ligação da enzima às pérolas de nylon de 4 a 24 h. Os artigos acima citados
15 diferem da presente invenção por não ativar as pérolas de nylon com ácido, desta forma, não há formação de grupamentos carboxila na superfície para interação iônica com os grupamentos amina da polietilenoimina (JONSSON et al., 1998). Adicionalmente, o tempo de imobilização da enzima presente na invenção foi otimizado para apenas 2 h, muito menor do que os tempos acima citados.

A patente US 20060127971 A1 (2006) descreve um biorreator do tipo *Vortex flow* com agitação contendo enzimas imobilizadas em agarose e pectina, polímeros naturais de baixa resistência mecânica e alta contaminação microbiana. O reator estudado não se caracteriza como um biorreator de leito fixo, utilizado na presente invenção, por não apresentar empacotamento do suporte.
20

A patente PCT WO 2004035773 A1 (2004) relata um processo de imobilização por adsorção ou ligação covalente, especialmente de proteínas e enzimas, em matriz polimérica insolúvel contendo grupos epóxi, em meio de solventes orgânicos como acetona, tolueno, iso-octano entre outros. Na presente invenção, todos os tratamentos do suporte ocorrem em meio aquoso, menos agressivos para o ambiente
25 e os radicais do polímero são carbonilas diferentes de radicais epóxi.
30

A patente PCT WO 2004081208 (2004) demonstra um método de imobilização de enzimas por ligação covalente cruzada à sílica gel, zeólitas ou carbono ativado. Na presente invenção são propostas poliamidas parcialmente hidrolisáveis em meio ácido como suporte para imobilização por ligação covalente simples, já que o glutaraldeído, nas condições experimentais, não está polimerizado, demonstrando claramente diferenças do documento acima relatado.

A patente BR PI 0305416-0 A2 (2003) descreve um método de imobilização de enzima em suporte inerte por troca iônica em resinas de poliestireno, o que difere da presente invenção que utiliza ligação covalente da enzima em poliamida ativada em meio ácido.

A patente BR PI PI0105605-0 A2 (2001) descreve um método de obtenção de suporte insolúvel em água para imobilização da enzima invertase. O suporte é preparado com substâncias húmicas do solo, purificadas com reagentes a base de aminopropil sílica. O documento difere da presente invenção por utilizar suporte natural, a imobilização da enzima ocorre em temperatura ambiente por 48 h, muito maior que a presente invenção que utiliza apenas 2 h a baixa temperatura.

Uma interessante aplicação biotecnologia para o uso de enzimas imobilizadas é o uso de biorreatores que possuem redução do consumo de reagentes, condições suaves de pressão e temperatura, velocidade de fluxo adequado, redução de custos e baixa inibição pelos produtos reação (BÉLAFI-BAKÓ et al., 2006; AZEVEDO et al., 2004). Os biorreatores de leito fixo, devido ao empacotamento em recipientes e fixação das enzimas ligadas a suportes insolúveis em água, podem ser construídos por diversos métodos para melhor produtividade (BORZANI et al., 2001). Biorreatores deste tipo funcionam por contato facilitando as reações com enzimas imobilizadas devido a um aumento de eficiência da transferência de massa, circulação contínua do substrato o que evita a formação de regiões “mortas” (BERENSMEIER et al., 2004).

Biorreatores de leito fixo são construídos com células livres e/ou imobilizadas, estes diferem primariamente da presente invenção, pois não utilizam biocatalisadores purificados ou parcialmente purificados em sua composição. Entretanto, patentes e

artigos científicos têm apresentado enzimas imobilizadas em matrizes poliméricas em biorreatores de leito fixo:

A patente BR PI PI0705359-2 A2 (2007) descreve um processo de obtenção de frutooligossacarídeos pela enzima frutossiltransferase ligada a alginato de sódio ou nióbio ou grafite em biorreator operando com temperaturas entre 40-60 °C e pH entre 4,0 e 6,0. O documento difere da presente invenção por não utilizar como suporte poliamidas ativadas. O biorreator desenvolvido opera apenas nas temperaturas entre 40-60 °C não levando em consideração biocatálise a temperatura ambiente. Adicionalmente, o alginato de sódio proposto como suporte apresenta baixa resistência para aplicação em biorreator de grande escala e pode sofrer contaminação como previamente descrito.

Biorreatores enzimáticos apresentam alto potencial biotecnológico e tem sido usados em diversos processos industriais como, por exemplo, na produção de xarope de açúcar invertido a partir de caldo de cana-de-açúcar. Esta cultura é muito representativa para a economia brasileira, pois o Brasil é um dos maiores produtores mundiais com safra 2011-2012 estimada em 611 milhões de toneladas. O xarope de açúcar invertido contém glicose e frutose, originados da hidrólise ácida ou enzimática da sacarose (açúcar encontrado na cana-de-açúcar e beterraba entre outros). O xarope é largamente empregado na produção de alimentos no qual a coloração desta solução não interfere no padrão visual dos mesmos: panificação, laticínios, bebidas, biscoitos, caramelos e chocolates (GRATÃO et al., 2004) e também fármacos e cosméticos. O xarope de açúcar invertido é mais denso, comparado com o de sacarose, isto minimiza a cristalização e o crescimento de microrganismos (EMREGUL et al., 2006), evita processos dispendiosos de dissolução dos cristais, armazenagem e transporte de açúcares sólidos, possui 20% a mais de poder adoçante, apresenta alta afinidade pela água diminuindo o ponto de congelamento, propriedade útil para produtos que são congelados (GRATÃO et al., 2004).

A hidrólise ácida da sacarose, muito comumente usada na indústria, ocorre em alta temperatura podendo causar perda de açúcar por degradação, levando à formação do hidroximetil furfural (HMF) que além de escurecer o xarope também é

tóxico quando em concentrações acima de 75mg/kg de massa corporal causando distúrbios no baço, fígado e sangue. A produção de xarope de açúcar invertido pode ocorrer por via enzimática utilizando a enzima invertase ou sacarase (β -D-fructofuranidase E.C. 3.2.1.26), uma hidrolase que catalisa a degradação da sacarose em α -D-glicose e β -D-frutose (xarope de açúcar invertido). O processo enzimático é muito mais saudável, sem produção de subprodutos tóxicos e menor impacto ambiental, também ocorre em condições mais brandas de temperatura e pressão.

A Invertase tem sido covalentemente imobilizada em diversos suportes diferentes das matrizes poliméricas propostas nesta invenção, tais como: compósitos de hidrogéis (ÖZTOP et al., 2010); gel Polivinil álcool (US 20090061499 A1, 2009); sílica mesoporosa (SZYMAŃSKA e BRYJAK, 2009); resina de troca iônica *Duolite A-568* (MARQUEZ et al., 2008); pérolas aniônicas de poliestireno (TOMOTANI e VITOLO, 2007); gelatina de poli(acrilamida) (EMREGUL et al., 2006); gel de sílica co-condensada com 3-aminopropil(trietoxi)silano (APTES) (DAVID et al., 2006); filme de polióxido de fenileno (GANCARZ et al., 2006); micro poros de montmorilonita K-10 (SANJAY e SUGUNAN, 2006); filme de poli (hidroxi etil metacrilato-co-glicidil metacrilato) (pHEMA-GMA) (BAYRAMOĞLU et al., 2003; DANISMAN et al., 2004); palha de arroz tratada com 2% de polietilenoimina (PEI) (D'SOUZA e GODBOLE, 2002); microesferas magnetizadas de polivinilálcool (AKGÖL et al., 2001); polianilina (CHEN et al., 2000); dímero granular de co-acil poliamina ácida ativada com carbodiimida (TÜMTÜRK et al., 2000).

Certas patentes e artigos científicos apresentam a produção de açúcar invertido por via enzimática em biorreatores de leito fixo:

A patente WO 2007104268 A1 (2007) descreve um método para a produção de bioativos a partir de biorreatores com invertase ou células imobilizadas em polivinil álcool como suporte. O documento difere da presente invenção em relação à matriz polimérica usada e ao processo de imobilização incluir temperatura de 80 °C o que pode inativar a enzima por desnaturação.

A patente BR PI 0414761-8 A2 (2004) descreve um processo usando caldo de cana-de-açúcar como matéria prima para a conversão enzimática da sacarose em

reator, mas difere da presente invenção por imobilizar por adsorção a invertase em quitosana, este um polímero natural susceptível a contaminação microbiana, e também por não utilizar a ligação covalente, podendo ocorrer lixiviamento da enzima adsorvida reduzindo a eficiência catalítica do processo. Finalmente, o documento propõe um tempo de permanência do substrato no biorreator de 10 minutos em baixa velocidade de fluxo, mas a invertase é inibida pelos produtos de reação, desta forma é preferível rápida circulação do substrato (altas velocidades de fluxo) para aumentar a eficiência catalítica, o que é proposto na presente invenção.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo ensinamentos da presente invenção, comprovando que a proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica e com alto potencial tecnológico para processos industriais.

Descrição da Invenção

Para fins desta invenção, um biocatalisador pode ser uma enzima, proteína ou polipeptídeo.

Para os fins desta invenção, “enzima livre” é uma enzima que está dissolvida em uma solução tampão. A enzima livre não está ligada a um suporte. Ainda, o pH ótimo e a temperatura ótima de uma enzima são condições experimentais nas quais a enzima expressa o máximo de atividade.

Para fins desta invenção, a unidade de atividade catalítica de uma enzima é expressa em unidades internacionais “U” que é definida como a concentração de enzima capaz de produzir 1 μmol de produto por minuto em pH e temperatura definidos.

Para os fins desta invenção, “suporte” é qualquer material sólido onde uma enzima pode ser ligada (imobilizada). “Derivado imobilizado” é o produto formado pelo biocatalisador ligado ao suporte.

Os inventores têm identificado um novo processo no tratamento de polímeros sintéticos para aplicação em biocatálise e construção de biorreatores enzimáticos. Na presente invenção, são consideradas matrizes poliméricas insolúveis em água, polímeros sintéticos que possuem em sua composição química ligações poliamidas

parcialmente hidrolisáveis em meio ácido. O que originará radicais carboxilas e aminas importantes para a imobilização covalente da enzima. Estas matrizes são suportes. Como exemplos de matrizes poliméricas com estas características químicas, podem ser exemplificados os poliuretanos rígidos hidrofóbicos e os nylons rígidos hidrofóbicos.

5 Por serem hidrofóbicos, os tratamentos descritos a seguir são superficiais e a biocatálise é concentrada na superfície da matriz polimérica, isto não compromete a atividade catalítica da enzima e dificulta a contaminação microbiana do sistema. Adicionalmente, não foi observado difusão do substrato intraparticular devido às características químicas do suporte.

10 Seguem abaixo descrições da invenção, em algumas de suas modalidades preferidas, em relação às figuras de 1 a 5.

1. Modelo químico com as reações de tratamento do suporte, 1 – Hidrólise ácida; 2 – Interação iônica irreversível do suporte com a polietilenoimina; 3 - Revestimento do suporte pela polietilenoimina; 4 – Adição do glutaraldeído monomérico; 5 –
15 Funcionalização do suporte pelo glutaraldeído monomérico; 6 - Imobilização covalente da enzima em contato com seu substrato para produção do derivado imobilizado.
2. Esquema de construção de um biorreator vertical e sua aplicação em sistema em série: 1 – Reservatório de armazenamento do substrato; 2 – Bomba; 3 –
20 Tubulações; 4 – Reservatório de armazenamento do produto; 5 – Jaqueta térmica (opcional); 6 – Biorreator; 7 – Derivado imobilizado (de revestimento ou empacotado); 8 – Tela; 9 – Tubulações entre os biorreatores; 10 – Sistema em série onde vários biorreatores podem ser acoplados (opcional).
3. Efeito do tipo de fluxo ascendente (■) e descendente (●) sobre a conversão da
25 sacarose com a enzima invertase a 20 °C e pH 5,0 (100% = 100g/L de xarope de açúcar invertido produzido).
4. Esquema de construção de um biorreator horizontal com “parafuso interno sem fim” – Parte externa: 1 – Biorreator; 2 – Bomba; 3 – Suporte para a bomba; 4 – Reservatório para substrato ou produto; 5 – Tubulação; 6 – Base de apoio; 7 –

Aquecedores (opcional); 8 – Reservatórios para água aquecida (opcional); 9 – Base de apoio; 10 – Reservatório para substrato ou produto; 11 – Tubulações.

5. Esquema de construção de um biorreator horizontal com “parafuso interno sem fim” – Parte interna: 1 – Jaqueta térmica (opcional); 2 – Bomba; 3 – Suporte para a bomba; 4 – Reservatório interno com derivado imobilizado (revestimento ou empacotado); 5 – “Parafuso sem fim” recoberto com derivado imobilizado; 6 – Haste do parafuso; 7 – Entrada ou saída de substrato; 8 – Água aquecida (opcional); 9 – Base de apoio; 10 - Reservatórios para água aquecida (opcional); 11 – Aquecedores (opcional); 12 – Base de apoio; 13 – Entrada ou saída de substrato; 14 – Biorreator.

Uma modalidade preferida, conforme descrita na figura 1, descreve as etapas de imobilização covalente do biocatalisador no suporte. Este, por ser sintético, evita a contaminação microbiana e por ser insolúvel em água não permite o acúmulo de substrato ou produtos de reação. O derivado imobilizado pode ser armazenado a 4 °C por 8 meses sem apresentar contaminação microbiana preferencialmente em solução de 100 mM tampão citrato de sódio pH 5,0. As etapas de imobilização em batelada são sumarizadas a seguir:

- Primeiramente o suporte foi submetido a um tratamento com ácido clorídrico, preferencialmente o ácido estava na concentração de 1-4 M a temperatura ambiente (25 °C) e o melhor tempo de tratamento foi de 6 horas seguido de exaustiva lavagem com água.
- Em seguida, o suporte foi submetido a um tratamento com polietilenoimina (PEI) preferencialmente a uma concentração de 10% (v/v) diluída em 100 mM tampão citrato de sódio pH 5,0 por 2 horas a 37 °C sob suave agitação, também seguido de exaustiva lavagem com o mesmo tampão.
- O suporte foi ativado com uma solução aquosa de glutaraldeído preferencialmente a 2,5% (v/v) por 2 horas a 4 °C e exaustivamente lavado com 100 mM tampão fosfato de sódio pH 7,0.
- A enzima foi covalentemente imobilizada no suporte ativado preferencialmente a 4 °C em solução de substrato a 10% (p/v) em 100 mM tampão citrato de

sódio pH 5,0 por 2 horas sob suave agitação. Após esta etapa, o suporte com a enzima imobilizada foi exaustivamente lavado com cloreto de sódio 1 M e o mesmo tampão utilizado no processo de imobilização.

A presença do substrato enzimático na solução de imobilização evitou a ligação da enzima ao suporte pelo seu centro ativo, desta forma, a enzima testada, a invertase quando imobilizada na ausência de substrato obteve atividade relativa de 272.49 ± 1.89 U/g de suporte e atividade específica de 40.75 ± 0.28 U/mg de proteína. Quando imobilizada na presença de substrato a atividade específica foi de 832.74 ± 1.48 U/g de suporte e atividade específica de 175.72 ± 0.31 U/mg de proteína, o que representa uma diferença na atividade relativa de 306% e na atividade específica de 431%. Adicionalmente, estudamos o efeito da temperatura (Tabela 1) e do pH (Tabela 2) para a enzima testada, a invertase imobilizada, obtemos como temperatura ótima 50 °C e como pH ótimo 5,0 para a atividade de enzimática.

Tabela 1: Efeito da temperatura sobre a atividade relativa da invertase livre e imobilizada.

<i>Temperatura</i>	<i>Enzima livre (U/mL)</i>	<i>Enzima imobilizada (U/g de suporte)</i>
30 °C	179,39 ± 15	137,49 ± 2
40 °C	194,36 ± 13	164,45 ± 1
50 °C	1879,42 ± 15	278,84 ± 1
60 °C	1599,75 ± 21	207,82 ± 4
70 °C	1592,91 ± 00	174,67 ± 1

Tabela 2: Efeito do pH sobre a atividade relativa da invertase livre e imobilizada.

<i>pH</i>	<i>Enzima livre (U/mL)</i>	<i>Enzima imobilizada (U/g de suporte)</i>
3,5	521,74 ± 14	-
4,0	579,00 ± 21	101,00 ± 03
4,5	686,59 ± 26	125,20 ± 10
5,0	618,41 ± 07	295,50 ± 16
5,5	532,66 ± 06	159,87 ± 03
6,0	276,99 ± 12	112,11 ± 02

Na segunda modalidade preferida é representada na figura 4 onde um biorreator enzimático vertical é construído com o derivado imobilizado empacotado

ou de revestimento. O suporte pode ser aplicado na forma de spray na superfície do biorreator e facilmente removido por jato de areia. O derivado imobilizado pode ser produzido fora do biorreator (reações em batelada) pelas etapas já descritas ou dentro do biorreator onde o suporte será primeiramente introduzido no mesmo e submetido a todas as etapas para a ativação e imobilização do biocatalisador, neste caso, os reagentes químicos e o biocatalisador são introduzidos no sistema em baixas velocidades de fluxo e submetidos ao mesmo tempo de tratamento do que o sistema em batelada. Em ambas as formas de tratamento, o biorreator deverá ser empacotado com o derivado imobilizado e preferencialmente aquecido para aumentar a eficiência catalítica. Caso o Biorreator seja utilizado em uma temperatura de 20 °C com a enzima testada, a invertase, houve uma retenção de 20% da atividade a 50 °C. Ainda, podem-se utilizar materiais metálicos para a construção do biorreator e utilizar aquecimento natural alocando-o em locais quentes. Adicionalmente, o biorreator de leito fixo vertical possui fluxo ativo por bomba, por exemplo, bomba peristáltica. As etapas de produção deste biorreator enzimático são descritas a seguir:

- O biorreator é composto de um cilindro que pode ser metálico (por exemplo, inox), plástico ou cerâmico com uma conexão na sua porção inferior e outra na sua porção superior. Estas conexões possuem uma tela com porosidade suficiente para impedir o escape do derivado imobilizado e não aumentar a pressão do sistema. Como exemplo, podemos citar telas de nylon utilizadas em construção civil.
- O cilindro pode ser revestido por uma jaqueta térmica do mesmo material que construiu o biorreator com circulação de água para manter o mesmo aquecido, já que a temperatura ótima de catálise da invertase imobilizada na matriz polimérica insolúvel em água foi de 50 °C, outras temperaturas podem ser utilizadas. Para outros biocatalisadores outras temperaturas devem ser consideradas.
- Caso uma jaqueta térmica não seja utilizada, o substrato pode ser previamente aquecido antes de entrar no biorreator, obtendo os mesmos efeitos do uso de uma jaqueta térmica.

- Como tubulações de conexão do biorreator para os reservatórios de retirada do substrato e de armazenamento do produto, podem ser utilizadas tubulações metálicas ou plásticas.
- O substrato pode recircular pelo sistema para aumentar a concentração de xarope de açúcar invertido produzido.

Neste tipo de biorreator, o fluxo ascendente apresentou a maior atividade catalítica como pode ser observado na figura 5. O estudo da velocidade de fluxo foi realizado com um biorreator permitindo a recirculação do substrato, o aumento da velocidade de fluxo também aumentou a atividade catalítica (Tabela 3), mas grandes velocidades aumentam a pressão do sistema, desta forma, é recomendável um ajuste preciso entre a velocidade de fluxo e a pressão do sistema. Caso um sistema em série de biorreatores seja utilizado, é recomendável um estudo prévio da velocidade do sistema para cada planta montada levando em consideração se haverá recirculação ou não do substrato.

Tabela 3: Efeito da velocidade de fluxo sobre a conversão da sacarose com a enzima invertase a 20 °C e pH 5,0 (100% = 100g/L de xarope de açúcar invertido produzido).

Tempo (min)	Velocidade de fluxo (L.h ⁻¹)					
	0,03	0,06	0,12	0,24	0,48	
0	0	0	0	0	0	0
30	3,45 ± 1,3	2,34 ± 0,4	0,63 ± 0,38	3,74 ± 1,42	10,23 ± 0,0	
60	3,45 ± 0,4	3,21 ± 0,2	2,61 ± 0,11	3,87 ± 0,24	10,64 ± 1,5	
90	4,38 ± 0,1	3,92 ± 0,2	4,59 ± 0,17	4,38 ± 0,67	12,63 ± 0,4	
120	5,08 ± 0,3	5,25 ± 0,1	5,97 ± 0,02	7,66 ± 0,38	14,23 ± 1,1	

A terceira modalidade preferida é representada nas figuras 4 (visão externa) e 5 (visão interna) onde um biorreator enzimática horizontal é construído com o derivado imobilizado empacotado ou de revestimento tanto nas paredes como no “parafuso sem fim”. O suporte também pode ser aplicado na forma de spray e facilmente removido com jato de areia como anteriormente descrito. O derivado imobilizado pode ser produzido tanto dentro como fora do biorreator. O “parafuso sem fim” deverá ser recoberto com o derivado imobilizado para aumentar a área de contato. O

biorreator pode ser alocado em locais quentes ou então utilizar jaqueta térmica para aquecimento. O substrato pode entrar no biorreator por fluxo passivo, neste caso, o substrato pode ser posicionado em um nível de altura acima do biorreator e a força de propulsão será a da gravidade ou então por fluxo ativo com bomba. O biorreator possui suporte para acoplar uma bomba. As etapas de produção deste biorreator enzimático são descritas a seguir:

- O biorreator é composto de um cilindro metálico preferencialmente de inox com uma conexão na sua porção inferior e outra na sua porção superior para a entrada de substrato e saída de produto. Estas conexões possuem uma tela com porosidade suficiente para impedir o escape do derivado imobilizado e não aumentar a pressão do sistema. Como exemplo, podemos citar telas de nylon utilizadas em construção civil.
- No centro do cilindro existe um “parafuso sem fim” revestido com o derivado imobilizado, este parafuso pode girar opcionalmente por força de uma bomba.
- O cilindro pode ser revestido por uma jaqueta térmica de material cerâmico ou metálico com circulação de água para manter o mesmo aquecido caso seja necessário.
- Caso uma jaqueta térmica não seja utilizada, o substrato pode ser previamente aquecido antes de entrar no biorreator, obtendo os mesmos efeitos do uso de uma jaqueta térmica.
- Tubulações metálicas ou plásticas podem ser utilizadas no sistema tanto para a jaqueta térmica como para passagem do substrato.
- O substrato pode recircular pelo sistema para aumentar a concentração dos produtos de reação.
- Finalmente, podem ser acoplados vários biorreatores formando um sistema em série.

Caso o sistema seja aplicado na indústria açucareira na produção de xarope de açúcar invertido, podem ser usados vários tipos de solução de sacarose como, por exemplo, açúcar cristal, açúcar mascavo, padrões analíticos de sacarose, caldo de cana-de-açúcar, melão diluído.

Etapas de pré-tratamento do caldo de cana-de-açúcar são necessárias para a remoção de impurezas e se necessário, concentrar o caldo para a catálise enzimática. Da mesma forma, a quantidade de reatores utilizados depende da concentração final de açúcar invertido a ser produzida.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO de imobilização de biocatalisadores em matrizes poliméricas caracterizado pelas matrizes poliméricas serem sintéticas e parcialmente hidrolisáveis em meio ácido;
5
2. PROCESSO de imobilização segundo a reivindicação 1 onde o biocatalisador preferencialmente é uma enzima, proteína ou polipeptídeo;
3. PROCESSO de imobilização segundo a reivindicação 1 onde a matriz polimérica é uma poliamida parcialmente hidrolisável em meio ácido preferencialmente poliuretanos rígidos hidrofóbicos e nylons rígidos hidrofóbicos;
10
4. PROCESSO, segundo a reivindicação 1 onde os tratamentos para a imobilização da enzima na matriz polimérica podem ser realizados dentro de um biorreator;
5. PRODUTO caracterizado por um biorreator cilíndrico de leito fixo com a enzima imobilizada segundo a reivindicação 1 empacotada ou de revestimento;
- 15 6. PROCESSO segundo a reivindicação 5 caracterizado pelo fato destes biorreatores enzimáticos serem aplicados em série na vertical com fluxo ativo para aumentar a eficiência catalítica;
7. PRODUTO caracterizado por um biorreator cilíndrico metálico com a enzima imobilizada segundo a reivindicação 1 onde será empacotada, de revestimento ou contida em um “parafuso sem fim” deste biorreator;
20
8. PROCESSO segundo a reivindicação 7 onde estes biorreatores enzimáticos serem aplicados na horizontal com fluxo ativo ou passivo para aumentar a eficiência catalítica;
9. PROCESSO de produção de xarope de açúcar invertido em biorreator usando enzimas imobilizadas em matrizes poliméricas parcialmente hidrolisáveis em meio ácido;
25
10. PROCESSO de imobilização segundo a reivindicações 1 e 9 onde a enzima é preferencialmente a invertase ou sacarase.

Figura 2

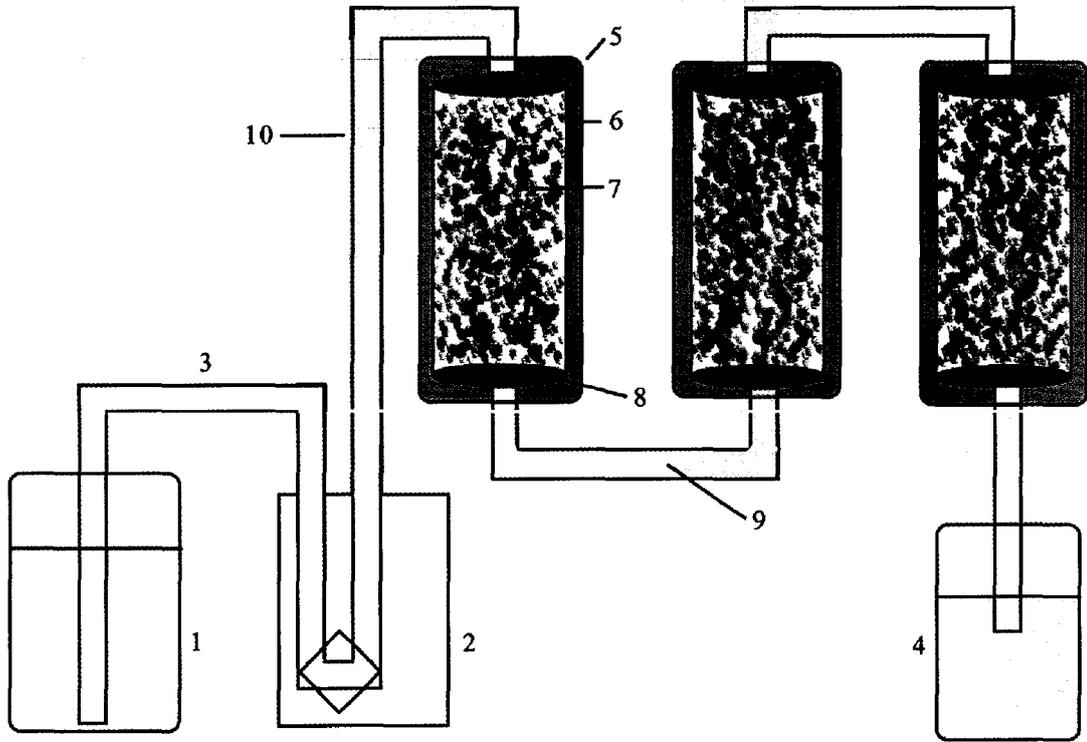


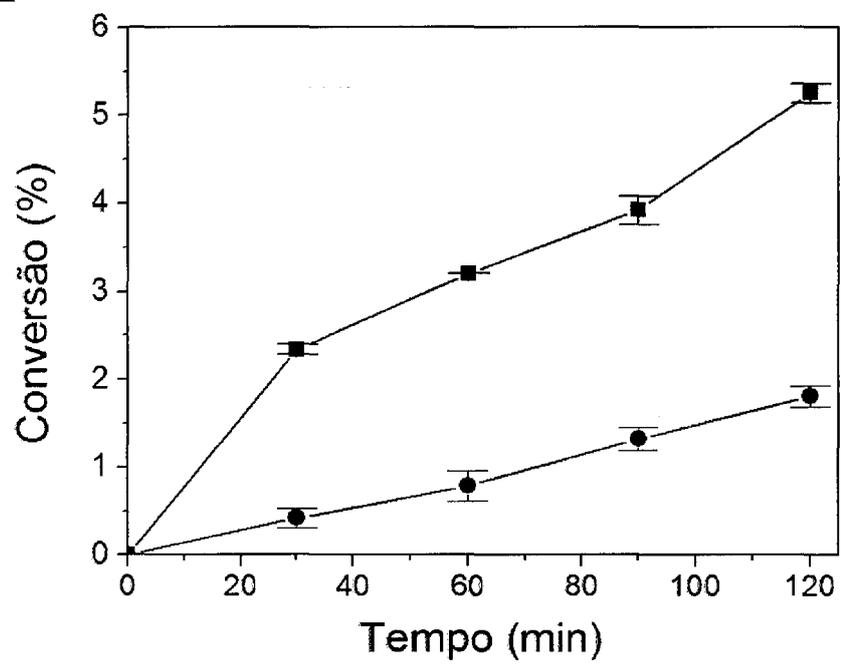
Figura 3

Figura 4

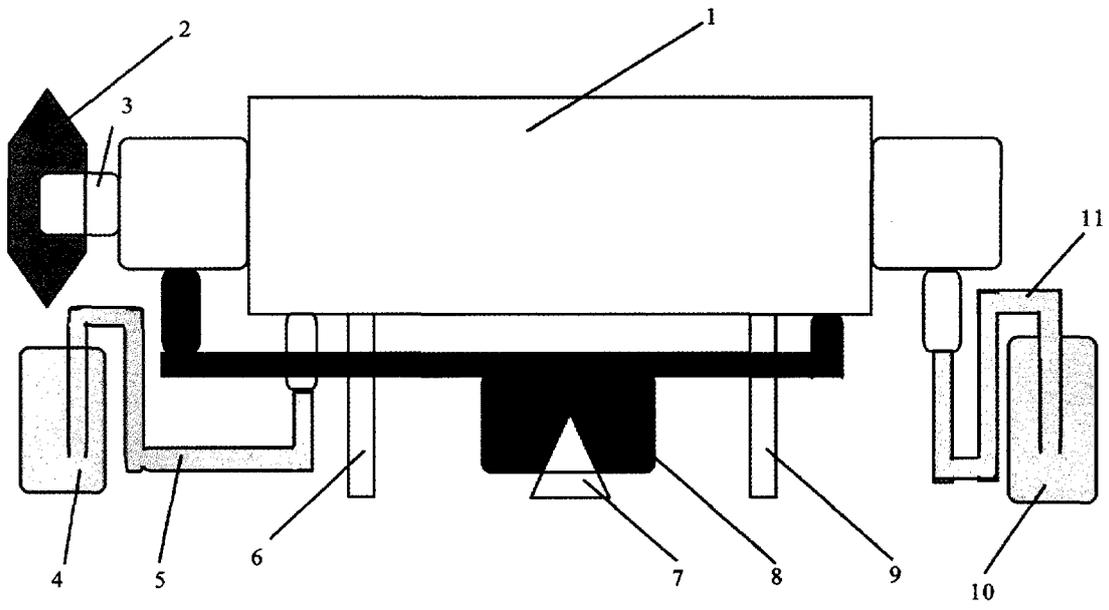
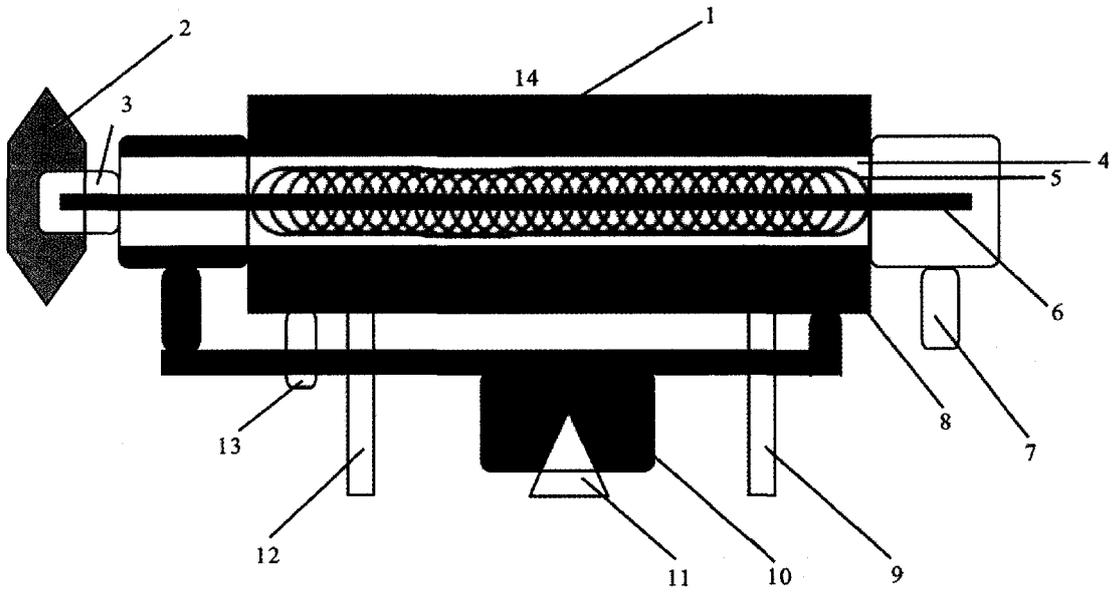


Figura 5



RESUMO

PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO DE MATRIZES POLIMÉRICAS SINTÉTICAS PARA APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE. A presente invenção refere-se a um inovador processo de ligação covalente de biocatalisadores, como enzimas, proteínas e polipeptídios em poliamidas parcialmente hidrolisáveis em meio ácido como matrizes poliméricas sintéticas, de baixa contaminação microbiana devido a sua natureza hidrofóbica, com grande resistência para empacotamento ou revestimento de biorreatores de leito fixo. Adicionalmente, a presente invenção também apresenta modelos destes biorreatores 5 construídos na vertical ou na horizontal aplicados ou não em série e seu uso na produção de xarope de açúcar invertido a partir de soluções de sacarose.