



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL



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

CARTA PATENTE N.º PI 0414761-8

Patente de Invenção

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito : PI 0414761-8

(22) Data do Depósito : 29/09/2004

(43) Data da Publicação do Pedido : 07/04/2005

(51) Classificação Internacional : C12P 19/02

(30) Prioridade Unionista : 29/09/2003 US 60/507,149

(54) Título : MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO DE XAROPE INVERTIDO A PARTIR DE SUCO DE CANA-DE-AÇÚCAR BRUTO

(73) Titular : Instituto Tecnológico Y de Estudios Superiores de Monterrey. Endereço: Ave. Eugenio Garza Sada Sur 2501, Monterrey, Nuevo Leon, México (MX).

(72) Inventor : SERGIO R. SERNA-SALDIVAR, Cientista Pesquisador(a). Endereço: Rosales 329A, Col. Santa Engracia, San Pedro Garza García, Nuevo Leon, México. Cidadania: Mexicana.; MARCO A. RITO-PALOMARES, Cientista Pesquisador(a). Endereço: Lomas de la Rivera 5408, Lomas de Cumbres 2do Sector, Monterrey, Nuevo Leon, México. Cidadania: Mexicana.

Prazo de Validade : 20 (vinte) anos contados a partir de 29/09/2004, observadas as condições legais.

Expedida em : 20 de Maio de 2014.

Assinado digitalmente por
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes

15 de Novembro
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
de 1889

"MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO DE XAROPE INVERTIDO A PARTIR DE SUCO DE CANA-DE-AÇÚCAR BRUTO"

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se a um método para converter suco ou concentrado de cana-de-açúcar em xarope invertido (glicose-frutose) utilizando invertase imobilizada.

Histórico da invenção

[002] Devido à sua doçura e forma líquida, os xaropes invertidos são amplamente utilizados por diferentes segmentos da indústria alimentícia, tais como as indústrias de refrigerantes e de panificação. Xaropes são preferidos ao açúcar cristalizado, por oferecerem vantagens no processamento. Devido à sua doçura e apresentação líquida e similaridade com os xaropes de milho em concentrações de 42 e 55 de frutose (os números indicam o teor de frutose como porcentagem em peso do teor de açúcar total), os xaropes invertidos estão em alta demanda para a fabricação de refrigerantes. Atualmente, o açúcar refinado representa 60-62% do açúcar total produzido no mundo a partir de cana-de-açúcar e de outras fontes de açúcar que não de cana-de-açúcar. 19,2 milhões de hectares de cana-de-açúcar e de outras fontes que não de cana-de-açúcar são plantados por ano, produzindo uma média de 142 milhões de toneladas métricas de açúcar cristalizado. Em 2002, o México foi o sexto produtor mundial [FAO 2003] com aproximadamente 5,2 milhões de toneladas de produção de açúcar bruto. Recentemente, porém, a indústria ficou sob pressão financeira devido à concorrência de preço de fabricantes estrangeiros de glicose e xaropes de milho com alta frutose, bem como de outras fontes que não de cana-de-açúcar. Sendo assim, existe

a necessidade de se desenvolver processos mais eficientes para refinar suco de cana-de-açúcar e para produzir xarope invertido, que represente um produto comercial e estrategicamente atraente. Além disso, seria vantajoso readaptar e modificar as usinas de cana-de-açúcar existentes para produzir xarope invertido de forma eficiente sem eliminar a capacidade de a usina produzir açúcar de mesa ou sacarose.

[003] Durante as décadas passadas, as indústrias alimentícias e biotecnológicas utilizaram de forma crescente enzimas imobilizadas para diversos processos. As principais vantagens da tecnologia de enzima imobilizada são os custos de produção mais baixos e melhoria na capacidade de produção devido à possibilidade de se recuperar e reutilizar os catalisadores biológicos, que são especialmente adequados para processos contínuos de alto rendimento. Além disso, a enzima imobilizada é mais estável e o produto pode ser essencialmente isento de contaminação traço pela enzima, o que torna fácil a purificação do produto resultante (Messing 1975, Rosevear 1984).

[004] Uma das desvantagens de enzimas imobilizadas é a possível redução de sua vida produtiva devido à inativação da enzima causada por contaminantes de substrato. Suco de cana-de-açúcar bruto, em particular, contém quantidades significativas de inibidores de invertase, tais como compostos proteínáceos e outros compostos nitrogenosos, tanto solúveis como insolúveis, fenólicos, flavonóides, antrocianinas, ceras, e minerais (Clarke e Godshall 1988, Donovan 1993).

[005] Num processo de refinação de cana-de-açúcar

convencional, o suco de cana-de-açúcar bruto é normalmente tratado com cal, desaerado e clarificado (remoção de sólidos suspensos, geralmente por sedimentação) e o suco semi-refinado resultante ou licor de fundente é purificado por clarificação (carbonatação por adição de cal e dióxido de carbono ou fosfatação através de adição de cal e ácido fosfórico) e descoloração (Clarke e Godshall 1988, Donovan 1993). Esse tratamento convencional, porém, seria inadequado como preparação para a etapa de conversão utilizando invertase imobilizada. A adição de etapas adicionais de refinação antes da conversão tornaria a economia de tal processo desfavorável ou até mesmo proibitiva. A adequada purificação prévia do substrato é importante para garantir um uso mais eficiente do reator de invertase imobilizada. Um tipo de processo (Donovan et al., patente americana No. 6.406.548; Monclin 1995, patente americana No. 5.468.300) propõe filtrar o suco de cana contendo sacarose através de ultrafiltração, ultracentrifugação e nanofiltração. O suco resultante pode ser utilizado em operações de evaporação e cristalização para produzir cristais de açúcar branco. A patente americana No. 5.468.300 de Monclin, descreve um método para produzir açúcar a partir de cana de açúcar sem utilizar processos de refinação convencionais, porém utilizando ultracentrifugação ou ultrafiltração e remoção de descolorantes através de adsorção. Adicionalmente, Monclin emprega modificadores de viscosidade. O pedido de patente sul-africana publicado No. ZA200107964 também propõe o uso de microfiltração, ultrafiltração e troca aniônica como etapas de refinação para suco ou concentrado de cana-de-açúcar antes de sua cristalização em açúcar de mesa. Porém, nenhuma dessas

referências propõe a conversão do suco de cana-de-açúcar assim refinado em xarope invertido mediante o uso de um reator de invertase imobilizada.

[006] Reatores de enzima com invertase imobilizada são capazes de produzir soluções de açúcar invertido. A invertase (beta-D-fructofuranosidase fructohidrolase EC 3.2.2.26) hidrolisa a sacarose em frutose e glicose. A sacarose pode também ser convertida em glicose e frutose através de hidrólise ácida. Os processos em escala industrial para fabricação de soluções de glicose-frutose a partir de sacarose geralmente utilizam hidrólise ácida, que é cara por poder ser praticada apenas num processo em batelada ou semi-contínuo. Além disso, a hidrólise ácida que é conduzida a um pH de 2-3 produz um xarope invertido de baixa qualidade contendo furfural e outros compostos coloridos indesejados. O uso de refinação e conversão de sacarose num processo contínuo, especialmente o que se inicia com suco de cana-de-açúcar bruto e que é adaptado para ser praticado em escala industrial para a produção de xaropes invertidos não foi anteriormente reportado.

[007] Numerosos métodos para preparar enzimas imobilizadas e utilizá-las para outras finalidades foram descritos, tais como os métodos e usos descritos por Nystrom na patente americana No. 3.935.068; por Long na patente americana No. 3.935.069; por Amotz et al. na patente americana No. 3.980.521; por Monsan na patente americana No. 4.405.715; por Morimoto et al., na patente americana No. 4.543.330; por Sutthoff na patente americana No. 4.110.164; por Leuba et al. na patente americana No. 4.918.016; por Harder et al nas patentes americanas Nos. 5.314.814 e

5.405.764 e por Kasumi et al.(1977) e Tsumura et al.(1978). Mesing (1975) e Rosevear (1984) relataram que a atividade catalítica de enzimas imobilizadas é mantida por períodos mais longos de tempo em comparação com enzimas utilizadas em solução. Porém, novamente, nenhuma dessas referências propõe adaptar essas técnicas a um processo para a produção de xarope invertido a partir de suco de cana-de-açúcar, muito menos do que a praticada em escala industrial.

[008] Martinez, na patente americana No. 6.013.491 descreve métodos para preparar e utilizar levedura aderida a um suporte de celulose fibrosa para converter sacarose em glicose e frutose e Ramos Lazcano na patente americana No. 5.270.177 descreve um método para a produção de xaropes de glicose-frutose a partir de sacarose utilizando uma cepa de levedura recombinante. Alguns sistemas de suporte permitem a regeneração de atividade de invertase quando a coluna é tratada com compostos químicos (Torres et al.2003).

Sumário da invenção

[009] Um objeto da presente invenção consiste em prover um processo novo para fabricar xaropes invertidos (glicose-frutose) a partir de suco de cana-de-açúcar bruto. Um objeto mais específico da presente invenção consiste em prover um processo contínuo para fabricar xaropes invertidos a partir de suco de cana-de-açúcar bruto, processo este que pode ser praticado economicamente em larga escala.

[0010] O suco de cana-de-açúcar bruto sem necessidade de tratamentos convencionais prévios (tais como um ou mais de tratamento com cal, desaeração e clarificação através de carbonação ou fosfatação ou sedimentação) é primeiramente preferivelmente refinado para remover sólidos, bem como

materiais solúveis, que podem contaminar a enzima ou de outra forma reduzir o desempenho e eficiência de um reator contendo um leito de enzima imobilizada.

[0011] Essas etapas de purificação podem preferivelmente ser executadas utilizando-se uma combinação de (i) pelo menos dois estágios de filtração e (ii) uma troca aniônica, todos numa operação unitária contínua. O suco pode ser então bioenzimaticamente convertido em xarope invertido numa coluna contendo um leito de invertase imobilizada. Os estágios de filtração podem incluir uma combinação de filtração mais grosseira (ex: filtração de partícula) e filtração mais fina (ex: microfiltração) ou uma combinação de microfiltração (mais grossa) e ultrafiltração (mais fina), todas as três, ou uma ou duas delas em combinação ainda com outra etapa de filtração. A única restrição é que o filtro mais grosso deve ser usado primeiro e que nenhuma etapa de filtração deve empregar um filtro tão fino que possa reter moléculas de açúcar (tal como frutose ou glicose ou sacarose) que são os constituintes ou precursores de constituintes desejados do produto final. Assim, nenhuma etapa de filtração deve reter substâncias que tenham um peso molecular igual ou inferior a 400 (correspondendo a um tamanho de cerca de 0,003 μm). Preferivelmente, a etapa de filtração em dois estágios deve reter substâncias com um peso molecular de 4000 ou ainda maior, como por exemplo, 10.000 kDa, tornando assim possível utilizar tecnologias de membrana menos rigorosas e sistemas de filtração mais baratos. Deveria preferivelmente haver uma etapa de pasteurização especialmente quando não é empregada ultrafiltração. A pasteurização pode ser opcionalmente praticada mesmo quando a ultrafiltração é empregada. Se a

pasteurização é necessária ou não dependerá do retardo de tempo entre a extração de suco e a conclusão da etapa de filtração em dois estágios. Preferivelmente, a pasteurização é combinada com concentração.

[0012] É vantajoso para o presente processo que o suco de cana-de-açúcar refinado seja parcialmente concentrado (preferivelmente até cerca de 50-55° Brix) antes de entrar no estágio de conversão enzimática. Isso significa que pode haver uma etapa de concentração imediatamente antes da conversão enzimática ou anteriormente no processo, como por exemplo, simultaneamente com a etapa de troca aniônica ou entre essas duas etapas (ex: concentrando-se toda ou alguma parte de uma porção de refluxo da saída da etapa de troca aniônica) ou antes da troca aniônica (no final de toda filtração) ou antes da conclusão da filtração (entre uma etapa anterior e posterior de filtração). A etapa de concentração pode ser vantajosamente combinada com uma etapa de pasteurização.

[0013] É também preferido submeter novamente o suco filtrado parcialmente concentrado (ou não concentrado) a outro estágio de purificação por troca aniônica antes do estágio de conversão enzimática, ou uma porção de refluxo do suco refinado pode ser concentrada (ou adicionalmente concentrada) antes de ser redirecionada para o estágio de troca aniônica.

[0014] O material de partida para a presente invenção é preferivelmente suco de cana-de-açúcar bruto (ou seja, recentemente extraído sem processamento) obtido após comprimir a cana-de-açúcar. É convertido em xarope invertido utilizando-se uma enzima de invertase imobilizada,

preferivelmente num processo totalmente contínuo. O suco de cana-de-açúcar é refinado antes da conversão para remover sólidos e substâncias (tanto solúveis como insolúveis) que poderiam inibir ou de outra forma inativar ou impedir o desempenho da etapa de conversão bioenzimática. Convenientemente, uma primeira fração de contaminantes sólidos pode ser removida através de um processo de filtração praticado em pelo menos dois estágios, tal como filtração ou microfiltração de partícula. Uma segunda fração de contaminantes sólidos e uma primeira fração de contaminantes solúveis pode ser removida através de uma segunda técnica de filtração, tal como microfiltração (ou ultrafiltração). O mais preferivelmente, tanto a microfiltração como a ultrafiltração são empregadas, de fato nessa ordem, opcionalmente também em combinação com uma etapa de filtração de partícula comum que poderia ser executada primeiro. Em seguida, uma coluna carregada com uma resina de troca aniônica pode ser utilizada para remover contaminantes solúveis adicionais.

[0015] Numa concretização preferida típica, o suco de cana-de-açúcar possui um teor de açúcar de 15-23° Brix após extração de cana-de-açúcar. 92-96% do teor de açúcar da cana-de-açúcar, conforme extraído, é sacarose. O açúcar, por sua vez, representa 75-92% do teor de sólidos do suco de cana-de-açúcar. O suco de cana-de-açúcar é passado pelo menos uma vez por uma unidade de microfiltração equipada com uma membrana de 0,2 μm e uma unidade de ultrafiltração equipada com uma membrana com um peso molecular de corte de 10.000 daltons. As etapas de microfiltração e ultrafiltração também removem muitos microorganismos, deixando o suco com uma carga

microbiana reduzida. Essas etapas de purificação são selecionadas por sua capacidade de remover contaminantes, enquanto minimizam a perda de açúcar. O suco de cana-de-açúcar ultrafiltrado (semi-purificado) resultante é passado pelo menos uma vez por uma coluna carregada com uma resina de troca aniônica que possui forte afinidade por contaminantes fenólicos e nitrogenosos, tal como a resina Diaion WA 30 (Sigma Aldrich St. Louis Missouri). Essas etapas de purificação são selecionadas para remover contaminantes, porém não açúcar.

[0016] Numa concretização preferida alternativa o suco de cana-de-açúcar é primeiramente filtrado utilizando-se um filtro de partícula (peneira) que deixe passar partículas não maiores que 250 microns ou mesmo por malha 100 para assim remover aquelas partículas sólidas. (A. HONIRON (Jeanerette, Louisiana). A peneira rotativa auto-limpante pode ser utilizada para essa finalidade). O suco resultante deste estágio é preferivelmente pasteurizado e preferivelmente simultaneamente parcialmente concentrado, como por exemplo, a 40-50° Brix, e então filtrado fino por pelo menos um filtro mais fino, preferivelmente um dispositivo de membrana de microfiltração. O suco resultante de microfiltração é submetido à troca aniônica. Uma vantagem desta concretização é que uma etapa relativamente cara, a de ultrafiltração, é substituída por uma série de etapas relativamente baratas, filtração de partícula preferivelmente combinada com pasteurização, sendo esta última para reduzir a carga microbiana já que (ao contrário da ultrafiltração) a filtração normal não remove bactérias ou outros microorganismos.

[0017] Neste ponto, o suco de cana-de-açúcar refinado pode ser parcial ou adicionalmente concentrado, se uma etapa de concentração tiver sido executada anteriormente (até cerca de 50-55° Brix). O produto de xarope invertido acabado deve ter 68° Brix ou mais (tipicamente até cerca de 70°) para inibir o crescimento de microorganismos e para reduzir os custos de transporte. O suco de cana-de-açúcar, após as etapas de filtração e preferivelmente após passagem por uma coluna de troca aniônica, pode ser concentrado em até 70° Brix (preferivelmente até cerca de 50-55° Brix) utilizando evaporadores convencionais, tais como os geralmente empregados nas indústrias de cana-de-açúcar ou xarope, embora ainda seja passível de purificação através de coluna de troca aniônica. O suco de cana-de-açúcar tratado pode preferivelmente ser também refinado (ex: através de uma ou mais colunas de troca aniônica adicionais) antes de passar por um reator de leito carregado com invertase imobilizada. Durante a evaporação, todos os contaminantes são concentrados; assim, se desejado, o concentrado pode ser vantajosamente passado uma ou várias vezes mais pela mesma coluna ou por uma coluna de resina aniônica diferente. Diversos testes em escala de bancada mostram que esta etapa adicional de refinação por troca aniônica de pós-concentração reduziu 42% dos fenólicos residuais e 24% das proteínas residuais respectivamente num suco de cana-de-açúcar concentrado a 50-55° Brix após uma passagem por coluna de troca aniônica, e então novamente submetido a uma segunda etapa de troca aniônica. Esta etapa adicional produz xaropes de cor mais clara e ainda prolonga a meia-vida de enzima imobilizada no reator de conversão. Alternativamente, ou

adicionalmente a etapas múltiplas de troca aniônica, uma porção de refluxo do suco tratado com troca aniônica pode ser concentrado antes de seu retorno à coluna de troca aniônica.

[0018] Antes de ingressar na coluna de hidrólise enzimática, o suco de cana-de-açúcar concentrado opcionalmente tratado com troca aniônica preferivelmente possui os seguintes valores:

[0019] teor de açúcar : 15-25°Brix, se não concentrado, e até cerca de 50° Brix se concentrado;

[0020] teor de sacarose : 92-96% em peso do teor de açúcar total;

[0021] teor de sólidos não de açúcar residuais (dissolvidos) : inferior a 1% em peso

[0022] teor de compostos fenólicos residuais (dissolvidos) : 53,24 ppm;

[0023] teor mineral residual : 0,08% ou menos em peso.

[0024] Acredita-se que o processo da invenção também reduz muito os teores de flavonóides, antocianinas e ceras do suco de cana-de-açúcar.

[0025] As condições do reator e a taxa de escoamento podem ser ajustadas para atingir conversões excedendo 90%. É importante obter pelo menos 90% de conversões, senão a sacarose residual pode cristalizar e degradar a qualidade do xarope. A invertase opera otimamente a um pH de 4,6 a 6,0 e a uma temperatura de 45 a 60°C; assim, é preferido que a etapa de conversão seja conduzida sob controle de temperatura e pH. O xarope invertido resultante pode ser ainda opcionalmente concentrado utilizando-se evaporadores convencionais (tipicamente até cerca de 70°Brix), pH ajustado (dentro da faixa de 4,0 a 5,0) ou também refinado utilizando-se uma

coluna aniônica, tal como a descrita acima ou outros meios de adsorção, tal como um sistema que emprega carvão ativado para fins de ilustração. A concentração, que conduz a um volume reduzido e teor de Brix aumentado, tem o efeito de inibir o desenvolvimento de microorganismos e reduzir custos de transporte. O tratamento adicional pós-conversão irá remover a proteína residual e os compostos coloridos indesejáveis restantes.

[0026] Em outro aspecto, a invenção é direcionada a um aparelho compreendendo equipamento para executar as operações unitárias contínuas anteriormente citadas, a saber, uma unidade de microfiltração, uma unidade de microfiltração conectada em série a e a jusante da unidade de microfiltração para receber o suco microfiltrado e produzir suco ultrafiltrado, uma coluna de troca aniônica com ou sem capacidade de refluxo (a corrente de refluxo saindo da coluna opcionalmente conectada como entrada para um estágio de concentração e a saída sendo retornada à coluna), uma coluna de troca aniônica recebendo suco ultrafiltrado e produzindo suco de cana-de-açúcar tratado com troca aniônica e um reator de coluna contendo invertase, montado sobre um suporte sólido.

[0027] As vantagens da presente invenção incluem, sem limitação, a capacidade de efetuar a conversão em xarope invertido de forma eficiente e contínua, utilizando um processo prontamente adaptado à escala industrial, e a capacidade de prolongar a vida da enzima e operação ininterrupta do reator de coluna, melhorando assim a eficiência do processo.

[0028] Objetivos, características e vantagens adicionais

da invenção serão mais prontamente entendidas a partir da descrição detalhada abaixo.

Breve descrição dos desenhos

[0029] A Fig. 1 é um diagrama de fluxo de um processo para fabricar xarope invertido de acordo com a presente invenção.

[0030] A Fig. 2 é um diagrama de fluxo de outro processo para fabricar xarope invertido de acordo com a presente invenção.

[0031] A Fig. 3 é um gráfico da atividade restante de invertase nativa e modificada plotada contra o tempo de incubação.

[0032] A Fig. 4 é um gráfico de invertase modificada (2U/ml) recuperada mediante o uso de diferentes membranas de diálise.

Descrição detalhada da invenção

[0033] Numa concretização, a presente invenção refere-se a um processo novo para produção de xarope invertido utilizando suco de cana-de-açúcar bruto obtido através de processos de extração convencionais. A invenção compreende um primeiro estágio (purificação e concentração parcial opcional do suco de cana-de-açúcar bruto) e um segundo estágio (conversão enzimática do suco de cana-de-açúcar refinado utilizando invertase imobilizada e concentração opcional adicional do xarope invertido resultante conforme ilustrado na Fig. 1). Após obter o suco de cana-de-açúcar bruto através dos procedimentos de extração tradicionais (trituração, tratamento com cal e/ou outras etapas de refinação convencionais para remover sólidos grossos, melhorando assim a limpidez e para remover cor, podem ser e são preferivelmente omitidas, exceto possivelmente por uma etapa

de sedimentação para remover sólidos grossos), o suco é filtrado e purificado com troca aniônica em preparação para a etapa de conversão. Etapas de refinação adicionais podem se seguir à etapa de conversão.

[0034] O suco de cana-de-açúcar é submetido a operações de remoção de sólidos, tais como microfiltração e ultrafiltração ou filtração e microfiltração de partícula visando remover contaminantes insolúveis finos e uma primeira fração significativa de contaminantes solúveis. Uma unidade de microfiltração equipada com membrana de filtração com $0,2\mu\text{m}$ serialmente seguida por uma unidade de ultrafiltração equipada com uma membrana para separar contaminantes com pesos moleculares superiores a 10.000 daltons (que correspondem a tamanhos superiores a $0,005\mu\text{m}$) são particularmente preferidas. Cortes de peso molecular mais baixos são aceitáveis, conforme acima descrito, uma vez que não causam a retenção de moléculas de açúcar nem levam a custos de equipamentos e processo desnecessariamente aumentados. (Conforme aqui utilizado "substancialmente reter açúcares contidos no suco de cana-de-açúcar significa reter pelo menos 85% e preferivelmente pelo menos 90% do teor de açúcar original do suco). Essas duas técnicas de separação praticadas em série reduzem significativamente (tipicamente em mais de 90%) o teor de proteína insolúvel no suco de cana-de-açúcar bruto original conforme determinado com a técnica de Biuret (Gornall et al, 1949). Alternativamente, uma combinação de filtração de partícula utilizando uma passagem por filtro, como por exemplo, malha 100 seguido de microfiltração, conforme descrito logo acima, pode ser praticada. Preferivelmente, o suco será pasteurizado e

opcional e simultaneamente concentrado em, por exemplo, 35-50° Brix entre a primeira e segunda etapa de filtração. A etapa de pasteurização é de maior benefício nas concretizações em que a ultrafiltração não é empregada.

[0035] Cada uma dessas etapas de processo pode ser executada mais de uma vez, produzindo remoção de sólidos ainda melhores. Porém, mesmo após essas técnicas sofisticadas de depleção de sólidos, o produto de suco de cana-de-açúcar ainda conterá componentes solúveis que afetam desfavoravelmente o desempenho da invertase e/ou reator. Por este motivo, o suco de cana-de-açúcar parcialmente refinado é ainda submetido a uma etapa de troca aniônica para reduzir componentes solúveis indesejáveis. Uma ampla variedade de materiais de troca aniônica podem ser utilizados, como por exemplo, dietilaminoetil celulose, estireno, acrílico e agarose. A agarose é preferida do ponto de vista de custo; a celulose é preferida por seu bom desempenho e baixo custo.

[0036] A remoção de componentes solúveis indesejáveis pode ser preferivelmente executada através de uma coluna de troca aniônica que possui uma forte afinidade por fenólicos e compostos nitrogenosos. Essa etapa de troca aniônica provou ser altamente eficiente para clarificar o suco e remover outros componentes indesejáveis em preparação para a conversão enzimática.

[0037] A pasteurização pode ser conduzida a uma temperatura tão baixa quanto 61,5°C ou a uma temperatura mais elevada, como por exemplo 72°C. Deve-se ter cautela para não afetar desfavoravelmente a qualidade do xarope invertido; sendo assim, deve-se utilizar, após a conversão, temperaturas mais baixas de concentração e pasteurização.

EXEMPLO I

[0038] Com particular referência à Fig. 1, a cana-de-açúcar foi extraída utilizando-se técnicas convencionais no estágio de extração 1. O extrato bruto 101 (características mostradas na Tabela 1) a uma taxa de escoamento de 12,0 L/h foi submetido a um sistema "Quick Stan Benchtop" contendo uma unidade de microfiltração (2 na Fig. 1) fabricado por A/G Technology modelo No. QSM-04SAP, equipado com uma membrana de filtração de 0,2 μm sob condições de queda de pressão máxima de 30 psi para produzir um suco de cana-de-açúcar microfiltrado 201 tendo as características ilustradas na segunda coluna da Tabela 1. Os contaminantes 202 em sua maioria eram proteínas, peptídeos, fenólicos e outros compostos coloridos. O suco microfiltrado 201 foi então submetido à ultrafiltração utilizando uma unidade fabricada por A/G Technology, modelo No. QSM-04SAP (3 na Fig. 1) sob condições de queda de pressão máxima de 30 psi para produzir suco de cana-de-açúcar ultrafiltrado 301. Os contaminantes 302 em sua maioria foram proteínas, peptídeos, fenólicos e outros compostos coloridos. O suco ultrafiltrado 301 foi então submetido à coluna de troca aniônica (4 na Fig. 1) sob condições de pH de 5,5 utilizando uma coluna de vidro, uma resina de troca aniônica fraca (Daiaon WA 30) comercializada pela Sigma Aldrich (St. Louis Missouri). A resina tinha um tamanho médio de partícula de 16-50 μm , era uma resina porosa ativada com alquilamina e tinha uma capacidade de 1,5 meq/ml (Supelco). A resina foi previamente tratada com uma solução de fosfato de sódio 0,05 M com pH ajustado em 5. A coluna de vidro utilizada para carregar a resina tinha 30 cm de comprimento e um diâmetro interno de 2,5 cm. O leito de

resina carregada de 15 cm de comprimento foi tratada com um tampão de acetato de sódio até que o pH da solução de saída atingisse 4,5. O suco de cana-de-açúcar ultrafiltrado foi passado uma vez pela coluna. Nesta etapa, aproximadamente 50% dos compostos fenólicos foram removidos, conforme avaliado pelo procedimento analítico Folin Ciocalteu (Swain and Hillis, 1959).

[0039] O suco de cana-de-açúcar tratado com troca aniônica 401 tinha as características apresentadas na coluna da Tabela 1.

[0040] Neste ponto, toda a corrente 401 pode ser concentrada no estágio de concentração (5 na Fig. 1) e passada pela mesma coluna de troca aniônica, ou uma porção de refluxo da mesma, corrente 401A pode ser concentrada, antes de seu retorno à mesma coluna (corrente 501 na Fig. 1) que poderia ser retornada à coluna num ponto intermediário dependendo do teor de impurezas da corrente de refluxo concentrada. Alternativamente, a corrente 401 pode ser concentrada e passada por uma segunda coluna de troca aniônica (não mostrada). Redirecionar o concentrado 501 através da coluna de troca aniônica 4 (ou passá-lo por outra coluna de troca aniônica) remove os contaminantes solúveis adicionais, resultando numa corrente adicionalmente purificada (não separadamente mostrada na Fig.1). A corrente 401 torna-se então a alimentação ao reator de coluna (6 na Fig. 1).

EXEMPLO 2

[0041] A invertase (Grau VII, número de catálogo I 4504, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) foi imobilizada por adsorção simples sobre grânulos de quitosana (Chitopearl BCW

3505, Wako Chemicals, USA, Inc.). O tamanho do grânulo foi de 350-390 μm e tinha uma capacidade de troca iônica de 0,2-0,3 meg/ml com uma superfície específica de 150-200 m^2/g . Os grânulos de quitosana foram lavados três vezes com água destilada e uma solução de acetato de sódio 0,02 M (pH 4,5). Adicionou-se invertase aos grânulos de quitosana a aproximadamente 2.000 unidades enzimáticas/g de grânulos e a suspensão resultante foi mantida sob agitação durante 60 minutos à temperatura ambiente. A solução foi filtrada e os grânulos de quitosana contendo a invertase imobilizada foram lavados uma vez com uma solução de acetato de sódio 0,02M (pH 4,5).

[0042] O material enzimático imobilizado sobre os grânulos de quitosana foi utilizado para carregar uma coluna encamisada com 20 cm de comprimento (Tipo XK-16 Pharmacia) com um diâmetro interno de 16 mm. O comprimento do sistema de suporte de enzima imobilizada foi ajustado em 120 mm. Grânulos de zircônio foram colocados sobre o topo e fundo da coluna. Zircônio foi utilizado como material inerte simplesmente para evitar perdas de suporte de coluna. Em operações comerciais, bandejas de malha especial são utilizadas em lugar de zircônio ou de outros materiais inertes. A coluna foi equilibrada a uma temperatura de 50°C fazendo-se circular água quente pela camisa da coluna. O concentrado de cana-de-açúcar refinado 401 com 50-55°Brix foi bombeado pela coluna a uma taxa de escoamento ajustada para causar um tempo de permanência de 10 min. A quantidade de açúcares no substrato e no produto foi determinada através do método colorimétrico com ácido dinitrosalicilato e através de cromatografia líquida de alto desempenho equipada com um

detector de índice de refração. Sob essas condições, mais de 95% da sacarose foi convertida em glicose e frutose (xarope invertido). A relação de glicose para frutose na corrente de produto foi de 1:1. As características restantes de corrente de produto 601 são também estabelecidas na Tabela 1. Finalmente, o produto de xarope invertido 601 foi concentrado a 68-70° Brix no evaporador 7 e opcionalmente também refinado para atender às especificações exigidas pela indústria. Esses ajustes finais podem ser executados utilizando-se operações unitárias convencionais e técnicas de refinação tais como o uso de coluna de adsorção carregada com um filtro de carbono ativado para melhorar a cor do xarope.

EXEMPLO 3

[0043] Este Exemplo é uma simulação tipo lote de um processo contínuo de uma concretização preferida alternativa da presente invenção. Com particular referência à Fig. 2, cana-de-açúcar foi extraída utilizando-se técnicas convencionais no estágio de extração 21. No primeiro estágio de filtração 22, o extrato bruto 1001 tendo as características mostradas na Tabela 2, foi primeiramente passado por uma peneira No. 100 (malha 100) à pressão ambiente. Contaminantes sólidos relativamente grossos 2002 foram coletados pelo filtro e descartados. O primeiro suco filtrado 2001 é primeiramente pasteurizado na etapa 23 a 61,5°C durante 0,5 hora (ou a uma temperatura mais alta, como por exemplo, 72°C por um tempo mais curto, como por exemplo, 15 segundos) e ao mesmo tempo evaporativamente concentrado a 50°Brix. O suco pasteurizado/concentrado 3001 foi passado por cartucho de microfiltração 24 (2800 cm², CFP-2E-6A fabricado pela Amersham Biosciences Buckinghamshire, UK) e tendo uma

membrana com diâmetro de poro de 0,2 μ m equipada com uma bomba (E-trac WFCHT fabricada pela Inverter) operada a uma pressão de 13 psi para remover partículas sólidas finas (cinzas finas, compostos coloridos) bem como para reduzir leveduras e carga bacteriana, e proteínas de alto peso molecular (peso molecular de cerca de > 100 kD) que são descartadas (4001).

[0044] Periodicamente, após 6-8 horas de uso, a unidade de microfiltração foi regenerada lavando-se a mesma duas vezes com NaOH 0,2M a 50°C. O NaOH precisou ser lavado (três vezes) com água ou neutralizado com HCl 1N.

[0045] O suco microfiltrado, corrente filtrada fina 4002, representa o produto intermediário filtrado em dois estágios. As características deste produto intermediário são mostradas na Tabela 2. O produto intermediário ainda apresentava uma cor marrom escura indesejável, indicando a presença de fenólicos e de outros compostos coloridos.

[0046] O produto intermediário 4002 foi então submetido à troca aniônica na etapa 25: foi alimentado no topo de uma coluna de 500 ml (volume de trabalho de 450 ml) equipada com resina microgranular de troca aniônica Whatman DE52, com uma capacidade de 0,88-1,08 meq/g (Whatman, New York, USA). Tampão fosfato de sódio foi utilizado para equilibrar a coluna a um pH de 5 antes de alimentar o produto intermediário 4002.

[0047] O produto de troca aniônica 5001 resultante da coluna tinha as características mostradas na Tabela 2. Os contaminantes removidos 5002 incluíam ácidos fenólicos e outros compostos coloridos, deixando um produto límpido amarelo-pálido 5001. Essas etapas também teriam reduzido o teor de invertase inibindo os compostos nitrogenosos, porém

as medições não foram executadas neste Exemplo.

[0048] O produto de troca aniônica 5001 foi então submetido à hidrólise enzimática na etapa 27 utilizando uma coluna na qual invertase (Maxivert L10000 de *Saccharomyces cerevisiae* com uma atividade de 10.000 U/ml, DSM, França) foi imobilizada sobre Chitopearls™ utilizados como suporte. A carga do suporte com enzima foi executada conforme descrito no Exemplo 4.

[0049] A coluna foi mantida a 60°C, pH 5 e a conversão em xarope invertido ocorreu quando o produto de troca aniônica se movimentou pela coluna. Chitopearls™ foram selecionadas entre outros suportes em parte por sua eficiência, baixo custo e baixo custo de operação e em parte porque tinham alguma capacidade de troca iônica que também melhorou a cor do xarope. Um líquido incolor 7001 emergiu da coluna catalítica.

[0050] Após a invertase ser consumida (devido ao crescimento bacteriano como resultado do uso intermitente totalizando aproximadamente 7 dias) o suporte foi lavado com NaOH 1N para eluir a invertase, lavado três vezes com água destilada e carregado com enzima fresca conforme acima descrito. O suporte possui uma longa vida útil e pode ser limpo, carregado com enzima fresca e reutilizado diversas vezes antes de ser substituído. A restrição ao crescimento bacteriano poderia prolongar o período de operação da invertase.

[0051] O xarope invertido resultante da coluna catalítica tinha as características apresentadas na Tabela 2.

[0052] O xarope invertido pode ser concentrado a 68-70°Brix após a conversão enzimática. A concentração pós-

conversão pode ser efetuada num evaporador a vácuo a 60°C para evitar formação de cor do xarope invertido causada pelo efeito de temperaturas mais altas.

[0053] A concentração pré-conversão produzirá um produto com 40-50°Brix imediatamente antes da conversão (que pode ser executada utilizando-se uma porção ou todo produto da coluna de troca aniônica conforme ilustra a Fig. 2, corrente 5001A na etapa 26 e corrente concentrada 5002 de volta ao topo ou um ponto intermediário não mostrado da etapa 25). Os diversos locais dos estágios de concentração no processo possuem diferentes vantagens e desvantagens. A concentração de pré-conversão permite trabalhar com volumes reduzidos e diminuir a taxa de crescimento de microorganismos devido à alta concentração de solutos; porém, a viscosidade aumentada da solução afetará negativamente o desempenho das membranas de microfiltração (e ultrafiltração, se houver) causando um aumento na queda de pressão.

EXEMPLO 4: IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA

[0054] Uma solução de 2500 U/mL de invertase (Maxinvert L10.000, DSM, França) em tampão fosfato 50 mM pH 5 foi modificada de acordo com o protocolo reportado por Hsieh (2000). 30 mg de invertase (412 U/mg) foram dissolvidos em 29 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 5,0, misturados com 1 ml de periodato de sódio 30 mM durante 3 horas a 4°C no escuro. Periodato de sódio não reagido foi removido adicionando-se 0,2 ml de etilenoglicol e misturando-se durante 30 minutos. A invertase oxidada com periodato resultante foi dialisada contra tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. A Figura 3 (um gráfico da atividade restante a 55°C em 1M sacarose pH 6 de invertase nativa e modificada (2U/ml) previamente incubada à mesma

temperatura plotada contra tempo de incubação) mostra que a invertase modificada possui uma atividade mais alta do que a enzima nativa e que a etapa de modificação aumentou a vida útil da enzima. Por exemplo, a enzima nativa perdeu 75% de sua atividade inicial em 6 horas, ao passo que a enzima modificada levou cerca de 72 horas.

[0055] Durante o processo de modificação, utilizou-se diálise para eliminar os reagentes necessários para a modificação (periodato de sódio e etilenoglicol). A diálise poderia ser conduzida utilizando-se uma membrana de corte de peso molecular de 10 kDa (uma membrana com corte de peso molecular mais alto poderia ser utilizada, como por exemplo, excedendo 25 kDa). Os resultados mostrados na Figura 4 (um gráfico da atividade a 55°C em solução de sacarose 1M a um pH 6 de invertase modificada (2U/ml) recuperados por diferentes membranas de diálise tendo um corte de peso molecular de 10 kDa, 15 kDa e 25 kDa, demonstram que a atividade da enzima modificada não é influenciada pelo tipo de membrana de diálise.

[0056] Outros experimentos foram executados utilizando-se a enzima modificada para selecionar o suporte mais conveniente para imobilização. Alumina, Sephabeads® e Chitopearls™ foram utilizados para esta finalidade. Grânulos de quitosana foram selecionadas como suporte para imobilização de enzima, por serem fáceis de preparar, seu uso ser mais barato e sua preparação mais rápida do que outros suportes comumente utilizados. Além disso, os grânulos de quitosana tinham uma vida útil muito mais longa e utilizaram menos enzima, tornando eficiente o processo de imobilização. Finalmente, conforme demonstrado no Exemplo 3, este suporte

possui alguma capacidade de troca iônica que também melhora a cor clara do xarope produzido.

[0057] Antes da imobilização, Chitopearls™BCW 3505 (Fuji Spinning Co., Ltd., Japão) foram lavados três vezes com água destilada. O excesso de água foi decantado e 40 g(40 ml) de Chitopearls™ foram carregados numa coluna de vidro de 30 cm de comprimento e com um diâmetro interno de 1,5 cm (volume de trabalho de 50 ml) equipada com camisa de temperatura e tampas permeáveis de malha e tela em ambas as extremidades da coluna. A invertase modificada foi imobilizada por absorção simples, ou seja, passando-se a solução enzimática pela coluna para obter uma concentração de 1000-3000 IU/g. Antes do uso, 50 nM NaH₂PO₄, tampão pH 5 foi passado pela coluna até que a solução de saída tivesse um pH de 5. A temperatura de operação foi fixada em 60°C. A enzima imobilizada foi utilizada para converter soluções de teste (sacarose em água contendo 34-50% sacarose) em xarope invertido. A taxa de conversão foi alta, iniciando com 100%. Após 3 dias de operação contínua, a conversão foi ainda maior que 80%. Adicionalmente, devido às propriedades de troca iônica dos Chitopearls™, o xarope invertido resultante foi quase cristalino (L=66,14, a*=0,39, b*=2,11). Nenhuma diferença substancial na queda de pressão foi observada ao se aumentar a concentração de açúcar, já que o tamanho e forma dos Chitopearls™ permite um fácil escoamento pela coluna, indicando que mais suco concentrado poderia ser utilizado. Nesta escala, o escoamento foi fixado na faixa de 5-12 ml/min.

EXEMPLO 5 - EFEITO DE TROCA IÔNICA SOBRE A DESCOLORAÇÃO

[0058] O suco de cana-de-açúcar microfiltrado foi passado

por uma resina de troca aniônica fraca (resina de troca aniônica microgranular pré-intumescida Whatman DE52, Whatman, New York, USA) para remover compostos fenólicos e proteínas.

[0059] Antes do uso, a resina de troca aniônica microgranular pré-intumescida Whatman DE52 foi ativada adicionando-se 50 mM NaH_2PO_4 , tampão pH 5 até obter hidratação completa. Quando a resina estava hidratada e pronta para uso, carregou-se 40g da mesma numa coluna plástica com 15 cm de comprimento e diâmetro interno de 2 cm (volume de trabalho de 50 ml) equipada com um filtro de fundo. O escoamento de suco de cana-de-açúcar microfiltrado (descendente) foi fixado em 8 ml/min utilizando-se uma bomba peristáltica. Compostos coloridos de 2 L de suco de cana-de-açúcar microfiltrado foram removidos utilizando-se 40g de resina, produzindo um líquido translúcido amarelado claro. Os parâmetros de cor foram medidos com um colorímetro Minolta utilizando um padrão branco como fundo e uma fonte luminosa D65. Parâmetros CIE $L^*a^*b^*$ (coordenadas de espaço de cor) indicam uma cor mais luminosa da amostra após troca iônica, alterando os valores L de 34,02 para 63,72. A coloração avermelhada também diminuiu com uma alteração de +3,92 para -2,85 dos valores a^* . Essa coluna foi regenerada utilizando-se 2 volumes de leito (100 ml) de solução NaOH 1N seguido de 2 volumes de leito de água desmineralizada e 2 volumes de leito de NaH_2PO_4 50 mM, tampão pH 5. NaOH residual (100 ml, 1,0 N) foi eliminado através de neutralização com HCl 1N.

EXEMPLO 6 : CONVERSÃO DE SACAROSE EM ESCALA PILOTO

[0060] A invertase foi imobilizada em Chitopearls™ conforme descrito no Exemplo 2 e carregada numa coluna de vidro com 70 cm de comprimento e diâmetro interno de 7 cm

(2700ml de volume de trabalho) equipada com camisa de troca térmica e com tampas permeáveis em ambas as extremidades da coluna. Antes do uso, 50 mM NaH_2PO_4 , tampão pH 5 foi passado pela coluna até que a solução de saída tivesse um pH de 5. A temperatura de operação foi fixada em 60°C utilizando água quente. O suco inicial foi desviado até que se tornasse estável. O sistema foi testado primeiramente com uma solução de sacarose de 32°Brix a 9,6 L/h utilizando uma bomba centrífuga (Fasco, Modelo 71632363). Com um tempo de permanência de 14 segundos, a conversão média total foi de 96,0%. A concentração de frutose e glicose no xarope invertido foi determinada com o método colorimétrico de ácido dinitrosalicílico (DNS) relatado por Miller (1959). G.L.Anal.Chem. 1959, 31:426-428.

EXEMPLO 7: PRODUÇÃO DE XAROPE INVERTIDO A PARTIR DE SUCO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM ESCALA PILOTO SEM PASTEURIZAÇÃO OU ULTRAFILTRAÇÃO

[0061] O suco de cana-de-açúcar foi extraído utilizando-se técnica convencional, que consiste em triturar a cana-de-açúcar com um triturador mecânico. O suco de cana-de-açúcar bruto foi passado manualmente, conforme exigido durante os testes em lotes de 1 L, por uma peneira No. 100 (equivalente 100 Tyler) para remover partículas sólidas grossas que poderiam afetar outros estágios do processo. Sólidos (incluindo cinzas, pedras e materiais orgânicos) ficaram retidos na peneira, enquanto o suco de cana-de-açúcar pré-filtrado passava por ela e era coletado em tanques reservatórios para processamento adicional. Este Exemplo é também ilustrado na Fig. 2, porém não foi executada nenhuma pasteurização ou concentração opcional (nenhuma etapa 22). Os

números de referência a várias correntes neste Exemplo 7 não implica que as correntes poderiam ter a caracterização dada na Tabela 2 para um experimento diferente.

[0062] O suco de cana-de-açúcar primeiramente filtrado foi então filtrado mais fino por uma membrana de microfiltração (Amersham Biosciences, CFP-2-E-6A) equipada com uma bomba (Inversor AC E-Trac WFCHT). A unidade consistiu de uma membrana de microfiltração de 2800 cm² de 0,2 μ m. As pressões de entrada e saída foram mantidas a 13 e 0 psi, respectivamente, e a velocidade da bomba mantida a 200 rpm. Sob essas condições, a taxa de escoamento pelo cartucho foi de 900 L/h, enquanto o suco de cana-de-açúcar retido (4001) tinha um escoamento de 895,2 L/h, que foi reciclado ao tanque reservatório do qual o suco de cana-de-açúcar foi retirado. O suco de cana-de-açúcar microfiltrado (4002) tinha um escoamento médio de 4,8 L/h e foi coletado em tanques reservatório para processamento adicional. Após o uso, a membrana precisou ser lavada com 20 L de NaOH 0,2N a 50°C para remover todos os sólidos ligados à superfície e para higienização. NaOH residual (20, 0,2 N) foi eliminado por neutralização com 4L de HCl 1N. O equipamento de microfiltração não tinha capacidade suficiente e uma unidade maior deveria ter sido utilizada. Porém, esta é uma questão de otimização, no estado da técnica.

[0063] O suco de cana-de-açúcar microfiltrado (4002) passou descendentemente por uma coluna de vidro com 70 cm de comprimento e 7cm de diâmetro interno carregada com resina Whatman DE52 (volume de trabalho 1350 cc) previamente tratada, conforme descreve o Exemplo 5. O suco microfiltrado (4002) foi bombeado pela ação de uma bomba peristáltica

(Stenner 170DM5) a uma taxa média de escoamento de 1,1 L/h, produzindo um líquido translúcido amarelado claro (5001) na saída da unidade que foi coletado em tanques reservatório para processamento adicional. As alterações colorimétricas no suco de cana-de-açúcar foram determinadas utilizando-se escala CIE $L^*a^*b^*$ (colorímetro Minolta), gerando os seguintes parâmetros: de $L^* 41,7$, $a^* +6,75$, $b^* +24,42$ no suco de cana-de-açúcar na entrada para $L^* 61,17$, $a^* -1,52$, $b^* +14,94$ na saída.

[0064] O tempo de operação dependeu do teor fenólico da cana-de-açúcar e da compressão descendente da coluna causada pela resina devido à queda de pressão diferencial do escoamento de suco do topo para o fundo. Isso indica a necessidade de otimizar o tipo de resina, possivelmente mudando para uma mais eficiente: candidatas são Dowex 66 da Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA ou até mesmo ChitopearlsTM, empregadas na etapa de conversão, que possuem capacidade de troca iônica considerável e que possivelmente suportam melhor a pressão na coluna. O tempo de operação médio utilizando as condições aqui descritas foi de 5 horas, tempos maiores de operação produziram um produto com maiores quantidades de compostos fenólicos devido à perda progressiva de capacidade de troca de resina, afetando as propriedades ópticas. Diversas colunas aniônicas podem ser utilizadas para operar em base semi-contínua, mudando de uma para outra assim que a saturação da resina for atingida. A saturação da resina pode ser determinada indiretamente, medindo-se os parâmetros CIE $L^*a^*b^*$ na descarga. Após a resina ter perdido a maior parte de sua capacidade de troca iônica devido à saturação com compostos fenólicos, ela é regenerada com NaOH 1,0N conforme

descrito no Exemplo 3.

[0065] O suco de cana-de-açúcar tratado com troca iônica (5001) foi passado pela coluna de conversão enzimática (27) descrita no Exemplo 6. O suco de cana-de-açúcar tratado com troca iônica efetivamente flui para cima pela ação da bomba centrífuga de fluxo ajustável (Fasco, Modelo 71632363). Quando o fluxo de suco de cana-de-açúcar pela coluna foi fixado em 12 L/h (com tempo de permanência de 10,5 segundos), a conversão média total foi de 89,7%, e quando foi fixado em 6 L/h (com tempo de permanência de 21 segundos), a conversão média total foi de 98,0%. O xarope invertido foi coletado em tanques reservatório para processamento adicional.

[0066] Após conversão, o xarope invertido (7001) pode ser concentrado utilizando-se um evaporador equipado com uma bomba de vácuo. O evaporador seria carregado com xarope invertido de 20°Brix até que o volume operacional fosse atingido. Após carga, o evaporador de batelada é fechado e ligado. O evaporador seria ajustado para operar a uma temperatura média de 55°C e a uma pressão de -0,9bars que poderiam ser atingidas num período de tempo de acordo com as características do evaporador. O fluxo de entrada de xarope invertido seria ajustado automaticamente pelo sistema de controle do evaporador ao mesmo tempo que a água condensada sai no seu fluxo determinado. O xarope invertido no evaporador deve ser concentrado até atingir 70°Brix. A concentração de açúcar (°Brix) deve ser determinada com um refratômetro (tal como o SPER SCIENTIFIC, 0% - 80%).

[0067] Nesta concretização, a invenção compreende a etapa de converter suco/concentrado de cana-de-açúcar (preferivelmente previamente depletado de contaminantes,

conforme acima descrito, utilizando pelo menos uma filtração em dois estágios que combinadamente elimina contaminantes maiores que 0,2 μm e preferivelmente até mesmo os maiores que 0,005 μm) utilizando invertase imobilizada, colocada num reator de leito carregado (fixo, móvel ou fluidizado). Existem vários relatos (Akgol et al., 2001, Bahar e Tuncel 2002, D'Souza e Godbole 2002, Tanriseven e Dogan 2001, Tumturk et al., 2000 e Torres et al., 2003) que mostram diferentes formas de se imobilizar invertase sobre suportes diferentes. Qualquer um dos anteriormente citados, pode, em princípio, ser utilizado sujeitos a restrições de custo. As técnicas e suportes adicionais de imobilização de invertase são bastante conhecidos e descritos na literatura patentária, consideradas na seção de histórico da invenção.

[0068] Existe uma ampla variedade de sistemas de suporte imobilizado baseados em adsorção, captação, encapsulação, troca iônica, reticulação e ligação covalente. Os sistemas de suporte mais amplamente utilizados empregam agar, alginatos, quitosana, diversos polímeros, poliacrilamida, celulose, celulose substituída, pectina, carbono e alumina (Akgol et al. 2001, Bahar e Tuncel 2002, D'Souza e Godbole 2002, Rosevear 1984, Tanriseven e Dogan 2001 e Tumturk et al., 2002) como material de suporte. Glutaraldeído e polietilenoimina estão entre os agentes mais populares e eficazes para imobilizar enzimas sobre suportes sólidos e carregá-las sobre colunas (Avrameas et al., 1969 e Torres et al., 2003).

[0069] Existem diferentes fontes de invertase com diferentes graus de atividade. A invertase tem sido imobilizada com sucesso em diferentes sistemas. A invertase

de Grau VII a partir de levedura tendo uma atividade específica de 2000 IU/g é preferida. É importante otimizar condições para fazer um uso mais eficiente do reator enzimático. Os parâmetros de processo que poderiam ser principalmente considerados são temperatura operacional e pH. Uma faixa de temperatura preferida é de 45-60°C e uma faixa de pH preferido é de 4,5-6,0. A temperatura ótima é de 50°C e pH 4,5. Suportes preferidos são alumina, quitosana e acrilamidas tendo as seguintes faixas de características: tamanho 30-590 μm e superfície específica de 150-200 m^2/g .

[0070] Com a finalidade de demonstrar a eficácia da invenção, três suportes de imobilização diferentes foram testados: captação, adsorção e reticulação. A técnica de imobilização de adsorção é a mais simples de todas. Opcionalmente, o produto de xarope invertido pode ser também concentrado o que pode ser realizado através de evaporação convencional em pelo menos 68°Brix e/ou ainda refinado, se necessário, para remover proteína residual, compostos fenólicos e compostos coloridos indesejáveis por adsorção sobre uma coluna de troca aniônica sob condições tais como acima descrito e/ou sobre uma coluna de carbono ativado.

[0071] Todo processo pode ser incrementado e automatizado com os equipamentos e instrumentos de automação existentes. Entre as vantagens do presente processo estão (i) a capacidade de operar num processo em linha de corrente completamente contínuo de extrato de cana-de-açúcar bruto em produto de xarope invertido; (ii) a capacidade de operar utilizando um número reduzido de operações unitárias e/ou operações unitárias mais eficientes para obter um produto de xarope invertido. Em outras palavras, embora, em princípio,

seja possível obter açúcar refinado de mesa, dissolvê-lo em água e carregá-lo num reator de invertase immobilizada para convertê-lo em xarope invertido, o custo global de tal processo (custo de refinação do açúcar de mesa mais o custo de conversão do mesmo em xarope invertido) seria desfavorável, de fato proibitivo. De forma similar, embora seja possível adicionar etapas de refinação convencionais e preaquecer o suco de cana-de-açúcar antes que ele ingresse na operação de remoção de sólidos/solúveis aqui descrita, tal pré-tratamento não é necessário e sua adição deve ser contrabalançada em relação ao custo aumentado de sua execução e o benefício daí decorrente.

[0072] Embora a presente invenção tenha sido mostrada e descrita com respeito às concretizações preferidas, diversas alterações e modificações, que podem ser óbvias para um habilitado na técnica ao qual se refere a invenção, são consideradas dentro do escopo e espírito da presente invenção, conforme as reivindicações a seguir. Todos os documentos citados e relacionados abaixo foram aqui incorporados por referência em sua totalidade (excluindo os sites da web).

TABELA 1

Características de suco de cana-de-açúcar seqüencialmente purificado por microfiltração, ultrafiltração e resinas de troca aniônica. n.m.=não medido por método analítico

	SUCO DE CANA-DE-AÇÚCAR				
	Bruto	MICROFIL- TRADO Membrana 0,2 α	ULTRAFIL- TRADO 10.000 MWCO	COLUNA DE TROCA ANIÔNICA	COLUNA DE INVERTASE
ÍNDICE DE EXTRAÇÃO DE SACAROSE					
Índice de refração	18,2	17,7	16,3	16,0	n.m.
Rotação específica	69,3	67,4	61,5	60,3	n.m.
Condutividade (milimhos)	1,56	1,62	1,58	1,50	n.m.
Pol/Índice DeExtração	16,8	16,4	15,0	15,0	n.m.
Pureza	92,4	92,5	92,2	92,1	n.m.
COR ^a					
a*	1,03	3,16	2,42	-1,23	n.m.
b*	5,19	29,17	24,72	7,85	n.m.
L	25,18	51,81	56,65	65,73	n.m.
E	25,72	59,54	61,85	66,20	n.m.
Tom	78,9	83,9	84,4	98,8	n.m.
Composição Química					
pH	5,46	5,49	5,51	5,60	5,60
Cinzas (%)	0,37	0,31	0,23	0,08	0,26
Proteína (ppm)	778	77	53	15	50
Fenólicos (ppm)	532,96	436,50	353,45	130,85	436
Redução Açúcares (g/l)	9,25	8,78	8,68	8,69	n.m.
Sacarose (g/l)	202,26	179,47	176,20	173,41	13,75
Glicose (g/l)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	79,83
Frutose (g/l)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	79,83

^aL = luminosidade; a*(+) = cor vermelha; a*(-) = cor verde;

$b^*(+)$ = amarelo; $b^*(-)$ = azul; E (índice de cor) = $(L^2 + a^2 + b^2)^{1/2}$

TABELA 2

Características de suco de cana-de-açúcar sequencialmente purificado por filtração de partícula, microfiltração e troca aniônica. n.m.=não medido por método analítico

	SUCO DE CANA-DE-AÇÚCAR				
	Bruto	PARTÍCULA FILTRADA MALHA 100	MICROFILTRADO Membrana 0,2 μ (produto Interme- diário)	COLUNA DE TROCA ANIÔ- NICA	COLUNA DE INVERTASE
ÍNDICE DE EXTRAÇÃO DE SACAROSE					
Índice de refração	18,2	18,2	18,2	18,2	n.m.
Rotação específica	69,3	68-69	67,4	60,3	n.m.
Condutividade (milimhos)	1,56	1,56	1,62	1,50	n.m.
Pol/Índice de Extração	16,8	16,8	16,4	15,0	n.m.
Pureza	92,4	92,4	92,5	92,1	n.m.
COR ^b					
a*	1,03	1-3	6,75	-1,52	0,39
b*	5,19	6-28	24,42	14,94	2,11
L	25,18	26-50	41,7	61,17	66,14
E	25,72	26-50	48,79	62,99	66,17
Tom	78,9	80 \pm 2	73,95	95,84	79,34
Composição Química					
pH	5,48	5,48	5,49	5,60	5,60
Cinzas (%)	0,37	0,37	0,31	0,08	0,26
Proteína (ppm)	778	menos de 778	77	15	50
Fenólicos (ppm)	532,96	menos de 532	436,50	130,85	436
Redução Açúcares (g/l)	9,25	9,10	9,15	9,20	
Sacarose (g/l)	202	195	193	190	19
Glicose (g/l)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	85,5
Frutose (g/l)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	85,5

bL = luminosidade; $a^*(+)$ = cor vermelha; $a^*(-)$ = cor verde;
 $b^*(+)$ = amarelo; $b^*(-)$ = azul; E (índice de cor) = $(L^2 + a^2 + b^2)^{1/2}$

REFERÊNCIAS

- Akgol, S. Kacar, Y., Denzli, A., and Arica, M.Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic poly (vinyl alcohol) microspheres. *Food Chem.* 74:281-288, 2001.
- Avrameas et al. The cross linking of proteins with glutarealdehyde and its use for the preparation of immuno-adsorbents. *Immunochemistry* 6:53-66, 1969.
- Bahar, T., and Tuncel, A. Immobilization of invertase onto cross linked poly(p-chloromethyl styrene) beads. *J. Appl. Polym. Sci.* 83:1268-1279, 2002.
- Clarke, M.A. and Godshall, M.A. Chemistry and processing of sugarbeet and sugarcane. Sugar Series 9, Elsevier Sci. Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp.265-291, 1988.
- Donovan, M. Sugar. In: Encyclopedia of Food Science. Food Technology and Nutrition. Vol.7., R. Macrae, R. Robinson and M. Sadler (eds.) Academic Press, London, UK pp.4441-4464, 1993.
- D'Souza, S.F. and Godbole, S.S. Immobilization of invertase on rice husks using polyethyleneimine. *J. Biochem. Biophys. Methods* 52:59-62, 2002.
- Food Agriculture Organization, <http://apps.fao.org/>, 2003.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal Biological Chemistry* 177:751-765, 1949.
- Messing, R. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. Academic Press. New York, NY, USA, Chap.1 and 2, p 1-38, 1975.

- Kasumi T.Tsuji, Hayashi K. and Tsumura, N., *Agr. Biol.Chem.* 41(10), 1977 (RECD 1978) 1865-1872.
- Rosevear, A. *J.Chem.Biotechnol.* 34B:127-150, 1984.
- Swain, T., and Hillis, W.E. The phenolics constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic compounds. *J.Sci.Food Agric.* 10:63-68, 1959.
- Tanriseven, A., and Dogan, S.2001. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Proc. Biochem.* 36:1081-1983, 2001.
- Torres, R.Mateo, C., Fuentes, M., Palomo, J.M. Oriz, C., Fernandez Lafuente, R., Guisan, J.M., Tam, A. and Daminati, M.Reversible immobilization of invertase on sepabeads coated with polyethyleneimine: optimization of the biocatalyst's stability. *Biotechnology Progress* 18(6): 1221-1226, 2002.
- Tsumura N., Kasumi, T., and Ishikawa M. Immobilization of glucose isomerase in microbial-cells. *Starch/Staerke* 30:420-423, 1978.
- Tumturk, T., Arslan, F., Disli, A., and Tufan, Y.Immobilization of invertase attached to a granular dimer acid-co-alkyl polyamine. *Food Chem.* 69:5-9, 2000.
- Miller, G.L. *Anal.Chem.* 1959, 31: 426-428, 1959.
- Hsieh, H.J.Liu, P.Ch.Liao, W.J.Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology Letters*, 22:1459-1464, 2000.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um produto de xarope invertido a partir de suco de cana-de-açúcar bruto, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(a) submeter o citado suco de cana-de-açúcar bruto a uma primeira filtração para remover uma primeira fração de contaminantes sólidos de dito suco, produzindo assim um primeiro suco de cana-de-açúcar filtrado;

(b) submeter o primeiro suco de cana-de-açúcar filtrado a filtração mais fina para remover uma segunda fração de contaminantes sólidos de dito primeiro suco filtrado e uma primeira fração de contaminantes solúveis de dito primeiro suco filtrado e assim produzir um suco de cana-de-açúcar filtrado mais fino;

(c) passar o suco de cana-de-açúcar filtrado mais fino por uma coluna de troca aniônica para remover uma segunda fração de contaminantes solúveis de dito suco de cana-de-açúcar filtrado mais fino, produzindo assim um suco de cana-de-açúcar tratado com troca aniônica;

(d) contatar dito suco de cana-de-açúcar tratado com troca aniônica com uma enzima invertase imobilizada para converter um mínimo de 90% de sacarose contida em dito suco tratado numa mistura de glicose e frutose e assim produzir dito produto de xarope invertido.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o citado suco de cana-de-açúcar bruto ser isento dos tratamentos convencionais prévios com cal, desaeração e clarificação através de carbonação ou fosfatação.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o suco de cana-de-açúcar bruto submetido à

primeira filtração em dita etapa (a), ter sido submetido apenas a uma etapa de sedimentação ou centrifugação após sua extração de cana-de-açúcar para remover sólidos grossos.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o suco de cana-de-açúcar submetido à primeira filtração em dita etapa (a) ser suco de cana-de-açúcar bruto não submetido a nenhuma das etapas de processamento após sua extração de cana-de-açúcar e antes de dita etapa (a).

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de o suco de cana-de-açúcar submetido a dita etapa (a) ter um teor de açúcar de entre 16 e 23° Brix do qual um mínimo de 90% é sacarose.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de a etapa (c) ser repetida antes de proceder à etapa (d).

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de compreender ainda a etapa de: (e) concentrar dito suco tratado com troca aniônica antes de proceder à etapa (d).

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de dita etapa (e) ser executada imediatamente antes de executar dita etapa (c) uma vez.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de compreender a etapa de: (a) refinar ainda o produto de xarope invertido produzido em dita etapa (d).

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de o produto de xarope invertido produzido em dita etapa (d) ter um teor de açúcar na faixa de cerca de 50° a 70° Brix do qual um mínimo de 90% é uma

mistura de frutose e glicose.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de, antes de ser submetido à dita etapa (d), o suco tratado com troca aniônica possui um teor máximo de sólidos de 1% com base no teor de açúcar; um teor fenólico máximo de 130 ppm; um teor de proteína máximo de 15 ppm; e um teor máximo de minerais de 0,08%, com base no teor de açúcar.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de o suco tratado com troca aniônica ter um teor de açúcar de 40-50° Brix antes de ser submetido a dita etapa (d).

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de dita etapa (c) uma porção de refluxo do suco tratado com troca aniônica ser concentrada antes de ser retornada à coluna de troca aniônica.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de dita etapa (d) ser executada sob condições de pH e temperatura controlados.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de uma ou mais de ditas etapas de (a) a (d) ser executada como operação unitária contínua.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de todas as ditas etapas de (a) a (d) serem executadas como operações unitárias contínuas.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de dita primeira etapa de filtração (a) compreender passar dito suco por um filtro de partículas tendo malha não maior que 100 Mesh US (100 Tyler).

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado

pelo fato de dita etapa de filtração mais fina (b) compreender microfiltração.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 ou 19, caracterizado pelo fato de compreender ainda pasteurizar e concentrar o dito primeiro suco de cana-de-açúcar filtrado.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de dita primeira etapa de filtração (a) compreender microfiltração.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18 e 19, caracterizado pelo fato de dita etapa de filtração mais fina compreender ultrafiltração tendo um limite de retenção de peso molecular de 10.000 Da.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de compreender ainda a etapa de: (h) evaporativamente concentrar até a faixa de 35° a 55° Brix dito primeiro suco de cana-de-açúcar filtrado da etapa (a) antes da etapa (b).

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de o dito suco de cana-de-açúcar ser concentrado antes ou depois de qualquer uma das etapas (a) a (d).

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de compreender a etapa de (i) pasteurizar o suco de cana-de-açúcar em algum ponto antes da etapa (d).

26. Método, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de compreender executar a etapa de pasteurização (i) a uma temperatura entre 61,5°C e 72°C por um tempo suficiente para pasteurizar o suco de cana-de-

açúcar.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 ou 26, caracterizado pelo fato de compreender executar a etapa de pasteurização (i) no dito primeiro suco filtrado.

28. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de a etapa (a) compreender filtração de partícula e a etapa (b) compreender microfiltração seguida de ultrafiltração.

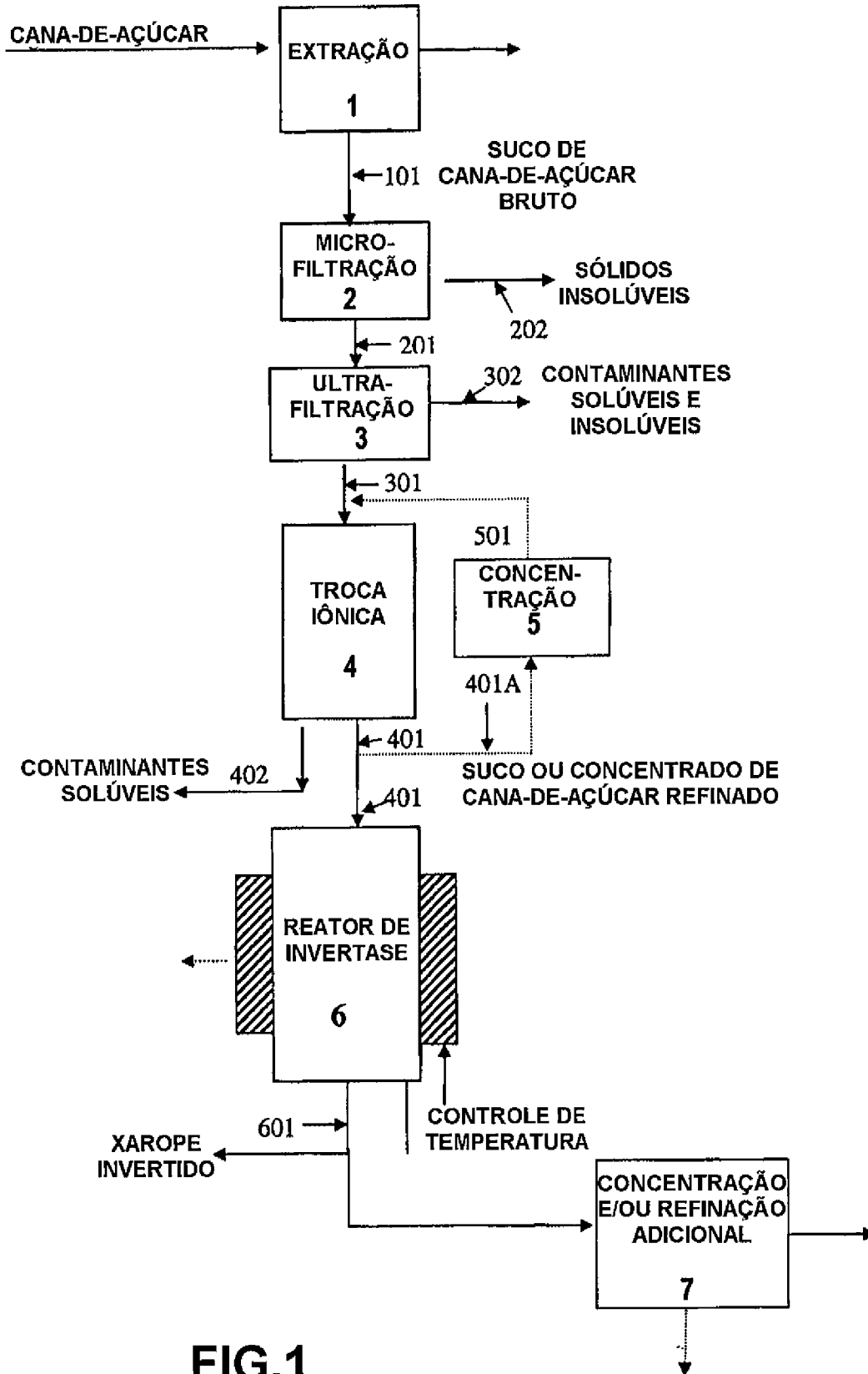


FIG.1

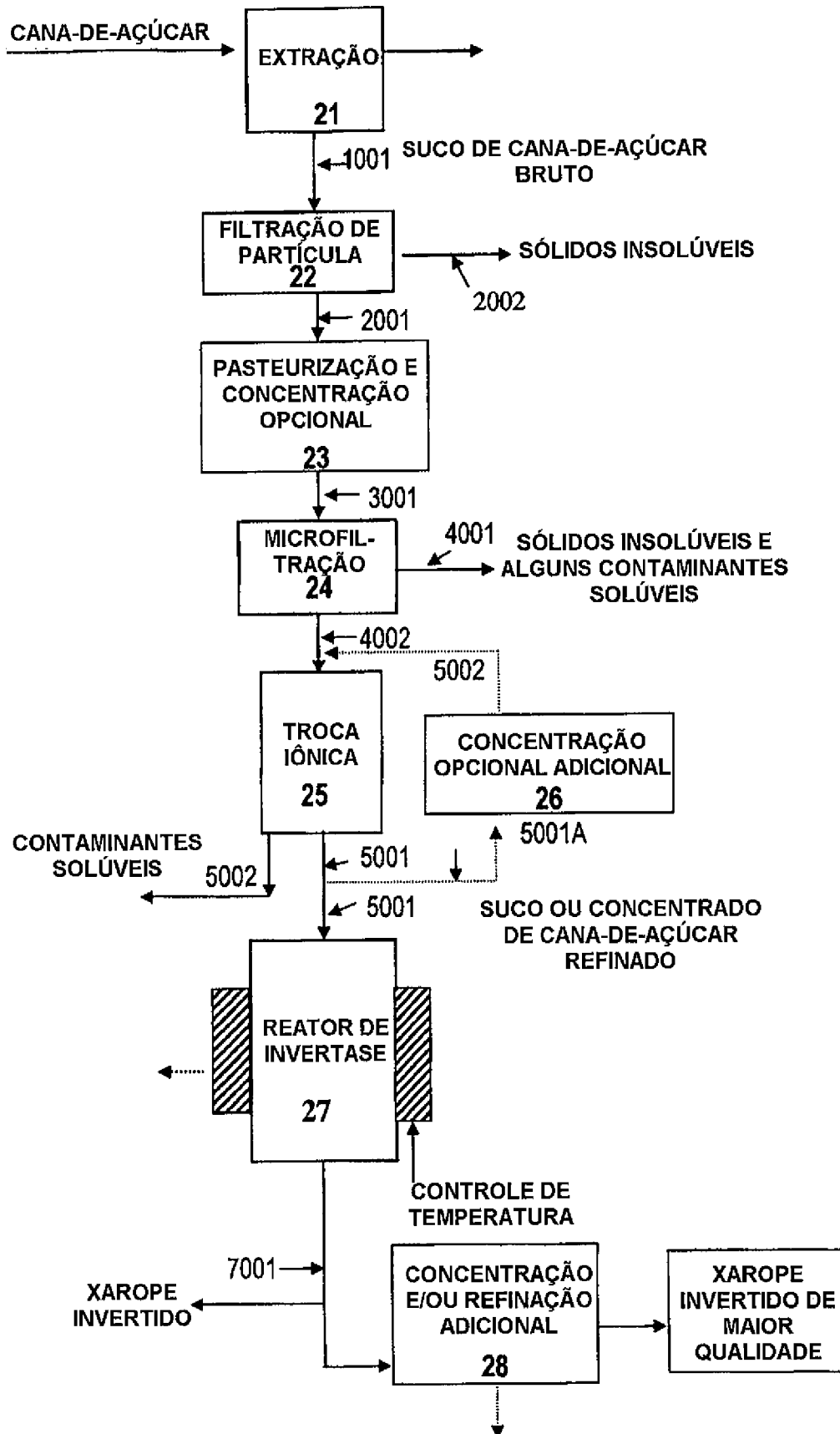


FIG.2

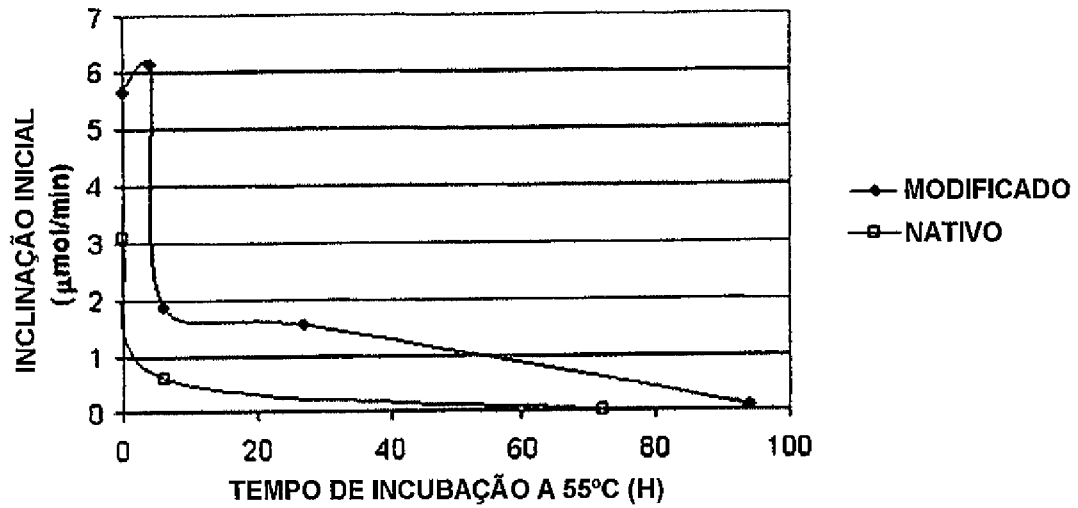


FIG.3

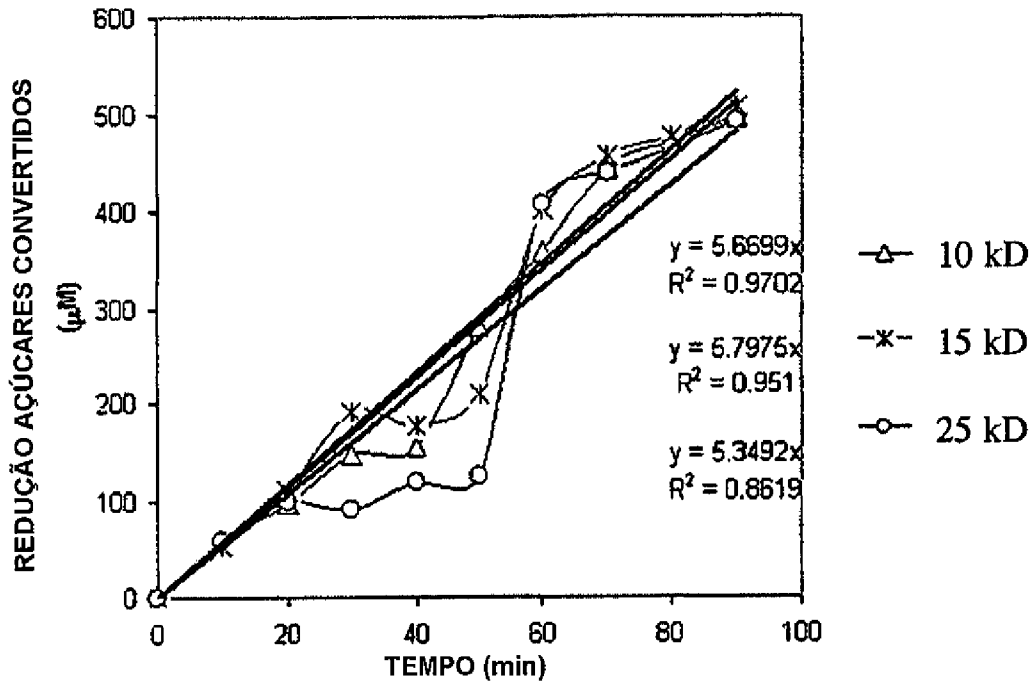


FIG.4

RESUMO

"MÉTODO PARA PRODUIR UM PRODUTO DE XAROPE INVERTIDO A PARTIR DE SUCO DE CANA-DE-AÇÚCAR BRUTO"

A presente invenção refere-se a um processo novo no qual suco de cana-de-açúcar é primeiramente refinado em várias etapas e então bioenzimaticamente convertido em xarope invertido refinado ou solução concentrada de glicose-frutose utilizando um reator carregado com invertase imobilizada. As etapas de refinação preferivelmente incluem uma primeira filtração (filtração ou microfiltração de partícula) seguida de uma segunda filtração (microfiltração ou ultrafiltração) e então pelo menos uma passagem por uma coluna carregada com uma resina de troca aniônica. O suco de cana-de-açúcar refinado pode ser opcionalmente concentrado e/ou pasteurizado antes de passar por um reator carregado com invertase imobilizada para converter sacarose em glicose-frutose.