



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

**(11) PI 0400893-6 B1**

**(22) Data do Depósito:** 11/03/2004

**(45) Data de Concessão:** 15/12/2015

**(RPI 2345)**



\* B R F I D 4 0 0 8 9 3 B 1 \*

---

**(54) Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA, OLIGOSSACARÍDEOS E FRUTOSE A PARTIR DA SACAROSE

**(51) Int.Cl.:** C12P 19/08; C12R 1/01

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

**(72) Inventor(es):** FRANCISCO MAUGERI FILHO, CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT, HELEN TREICHEL, MARIA ISABEL RODRIGUES, SAARTJE HERNALSTEENS

“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA, OLIGOSSACARÍDEOS E FRUTOSE A PARTIR DA SACAROSE”.

A presente invenção se refere a um processo de obtenção de dextrana clínica, frutose e oligossacarídeos a partir de sacarose, utilizando a enzima dextran-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 F. Os produtos citados são obtidos através de síntese enzimática, hidrólise química, fracionamento e separação de oligossacarídeos e frutose, através de colunas de adsorção, com leito de zeólita bária, e de permeação em gel. A dextrana clínica tem diversas aplicações principalmente na indústria farmacêutica (sendo utilizada como expansor volumétrico de sangue e 5 auxiliador da circulação sanguínea entre outros), os oligossacarídeos são muito aplicados em alimentos, como fibras solúveis e alimentos pré-bióticos, ou seja, compostos que estimulam a flora benéfica, microrganismos ditos pró-bióticos, dos intestinos de humanos e animais em geral. Também são utilizados em cosméticos, sendo cada vez maior o número de aplicações possíveis. A frutose é um produto secundário gerado durante a síntese, em que a sacarose é quebrada para a formação da dextrana, gerando a frutose livre. Devido à sua importância econômica a frutose é recuperada 15 neste processo, obtendo-se portanto, um aproveitamento completo do açúcar utilizado.

Os primeiros estudos a respeito de dextranas datam do século XIX, são relacionados aos grandes problemas que estes polímeros, produzidos pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* causavam na indústria álcool-açucareira. A dextrana é um polímero composto de unidades de glicose, ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,6) na cadeia linear e  $\alpha$ -(1,4),  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,2) nas ramificações. 20

A estrutura química da dextrana é dependente do microrganismo produtor, sendo a dextrana mais estudada aquela produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F, devido à sua estrutura praticamente linear contendo 25

quase exclusivamente unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -(1,6) e devido às características não patogênicas do microrganismo.

Inicialmente a produção de dextrana era realizada em processo “convencional”, em uma única etapa, na qual a produção de dextrana ocorria em presença do microrganismo, no entanto este processo resultava em sérios problemas operacionais devido à alta viscosidade do meio de cultura contendo dextrana. Somente na década de 80 foi desenvolvido o processo “enzimático”, ocorrendo primeiro a produção de enzima pelo microrganismo e somente após a recuperação da enzima, a produção de dextrana.

10 Monsan & Lopez (1981) estudaram a produção da enzima dextranase pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F, chegando à conclusão que a fermentação em sistema de batelada alimentada era a mais produtiva, mantendo-se o pH 6,7, pela adição de uma solução de sacarose e hidróxido de sódio a 20 g/L.h. Após 5 horas o pH foi ajustado a 5,0 e o caldo centrifugado e estocado a 4°C.

15 A dextrana produzida pela enzima de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F, quando o único substrato é a sacarose, tem peso molecular muito alto chegando a 90 milhões de Daltons. No entanto para o uso em alimentos, cosméticos e fármacos é necessário dextranas de peso molecular controlado, já que cada aplicação envolve uma faixa de peso molecular.

20 A produção de dextrana com distribuições de pesos moleculares distintas ocorre via diferentes procedimentos, entre eles têm-se, a adição de aceptores, como maltose e oligossacarídeos de cadeias curtas e a fermentação com culturas mistas de *Leuconostoc mesenteroides* e *Lipomyces starkeyi*, este segundo produtor de dextranase. Outra forma de promover a redução do peso molecular é pela hidrólise ácida, mas para a

obtenção de produtos de diversos pesos moleculares, são necessárias ainda, uma fase de fracionamento e uma fase de polimento por cromatografia de permeação em gel.

Aplicações importantes de zeólitas estão em processos de secagem, separação e purificação. Também são utilizadas como catalisadores no refino de petróleo e em processos de troca iônica, sendo seu maior mercado a indústria de detergentes, onde é utilizada como sequestrante de íons de Cálcio e Magnésio, em substituição aos polifosfatos. Em 1984, Neuzil et al. patentearam um processo de separação de glicose e frutose por adsorção seletiva utilizando zeólitas X, que adsorvem preferencialmente glicose (U. S. Patent 4,442,285).

Também já foi estudada a separação de glicose e frutose para obtenção de xarope de alto teor de frutose utilizando resinas trocadoras de cátions (Zerolit s55 SRC 14 e Duolite C-204, forma cálcica) e Zeólitas CaX e CaY. A resina Duolite  $\text{Ca}^{2+}$  se mostrou como a de maior capacidade e seletividade, sendo a zeólita CaY, muito similar a esta.

Quanto à aplicação de dextranas, há um número expressivo de patentes que utilizam dextranas em diversas áreas industriais. Na área de cosméticos a dextrana é utilizada na formulação de diversos produtos. Em produtos contendo ácidos carboxílicos, a dextrana de peso molecular entre 5 e 2000 KDaltons é utilizada devido à capacidade de aumentar o poder esfoliante do ácido sem aumentar a irritação da pele (U. S. Patent 6,440,432). Além disso as dextranas são adicionadas a cosméticos e alimentos (como catchup, maionese, iogurtes, e etc.) para melhorar a textura dos mesmos (U. S. Patent 6,242,226).

Na área farmacêutica dextranas são utilizadas há muito tempo, primeiro como expansor volumétrico de plasma (70 KDaltons) e como agente anti-trombótico (40 KDaltons), havendo formulações comerciais incluindo dextranas, como Macrodex

(6% Dextrana 70) e Rheomacrodex (10% Dextrana 40) ambos da Pharmacia, Inc. (Piscataway, N.J.). Dextranas também apresentam propriedades antiadesivas nas células epiteliais do sistema respiratório, prevenindo, por exemplo, à infecção por *Pseudomonas* (U.S. Patent 5,514,664), sendo descoberto também que dextranas de peso molecular  
5 menor que 500 KDaltons melhoram a aparência do muco pulmonar (U.S. Patent 6,339,075).

A seguir faz-se referência às Figuras e Tabelas que acompanham este relatório descritivo, para melhor entendimento e ilustração do mesmo, onde se vê:

A Figura 1 mostra uma ilustração do processo de obtenção da enzima

10 A Figura 2 mostra uma ilustração do processo de fracionamento da dextrana por ultrafiltração.

A Figura 3 mostra uma ilustração esquemática do processo de fracionamento de dextrana.

A Figura 4 mostra um gráfico da Produção de dextrana-sacarose por  
15 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

A Figura 5 mostra a Curva de evolução da hidrólise ácida.

A Figura 6 mostra o Perfil de separação de frutose por zeólita: eluição de dextrana e oligossacarídeos, sendo (●) dextrana/oligossacarídeos e (•) frutose.

A Tabela 1 mostra o Pré-tratamento do melaço e AMM (Água de  
20 Maceração de molho).

A Tabela 2 mostra a Distribuição percentual de peso molecular nas frações ricas em dextrana clínica e oligossacarídeos, após fracionamento.

Neste processo de obtenção de dextrana clínica, oligossacarídeos e frutose a partir de sacarose, deve-se primeiramente produzir, extrair e estocar a enzima  
25 responsável pela síntese, dextrana-sacarose. Esta enzima é então aplicada na síntese do

polímero (dextrana), que é em seguida hidrolisado, fracionado e tem-se, finalmente, a separação das frações de polissacarídeos dos oligossacarídeos e monossacarídeos.

A - Produção de enzima dextrana-sacarose: o inóculo é preparado inoculando o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512-F em meio de cultura constituído de 50 g/L de açúcar cristal comercial, 20 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de fosfato de potássio dibásico, 0,2 g/L de sulfato de magnésio, 0,01 g/L de sulfato de manganês, 0,01 g/L de sulfato ferroso, 0,02 g/L de cloreto de cálcio, 0,01 g/L de cloreto de sódio ajustado para pH 6,7 e incubado a 27°C por 12 horas. Em seguida o inóculo é adicionado ao meio de cultura industrial contendo melação de cana de açúcar 80 °BRIX em concentrações equivalentes de açúcar entre 20 e 50 g/L, preferencialmente 35 g/L, água de maceração de milho em concentrações entre 5 e 15 g/L, preferencialmente 10 g/L, e fosfato dibásico de potássio em concentrações entre 10 e 30 g/L, preferencialmente 20 g/L, em fermentador. Tanto o melação quanto a água de maceração de milho podem ser pré-tratados com carvão ativado, a fim de se obter uma solução clarificada de cada componente. A clarificação pode ser realizada segundo a tabela 1. Para a fermentação, a agitação deve ser entre 100 e 300 rpm, preferencialmente 200 rpm e a aeração entre 0,2 e 1 vvm, preferencialmente 0,5 vvm. O pH é mantido com adição de solução constituída de 200 g/L de sacarose e 40 g/L de NaOH, durante um período de 6 horas. Após esse tempo, a alimentação é interrompida e a fermentação é encerrada quando o pH atingir 5,2.

B - Recuperação da enzima: O caldo fermentado é clarificado por centrifugação a 9.000 g por 15 minutos, a uma temperatura entre 4 e 10°C. Para a recuperação da enzima realiza-se primeiramente uma concentração por ultrafiltração, com membrana com limite de exclusão entre de 20.000 e 100.000 Da, mantendo-se a temperatura de 4°C, para em seguida proceder-se à precipitação da enzima, a 4°C, com a

adição lenta de solução 50% de polietileno-glicol em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,2, contendo 0,05 g/L de cloreto de cálcio, também resfriado, até ocorrer a precipitação da enzima. Em seguida centrifuga-se a mistura a 12.000 g, a 4°C durante 10 minutos. O precipitado é rediluído no mesmo tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,2, contendo 0,05 g/L de cloreto de cálcio. A solução enzimática assim obtida pode ser congelada para futuras sínteses ou ser liofilizada. O esquema geral de produção da enzima está ilustrado pela figura 1.

**C - Síntese de dextrana de alto peso molecular:** As reações de polimerização são realizadas em reator encamisado, equipado com um agitador mecânico, por tempo variando entre 1,5 a 4 horas, preferencialmente 2,5 horas, entre 20 e 30°C, preferencialmente 23°C, e o pH 5,2 mantido através do uso de tampão fosfato. A concentração inicial de sacarose pode variar de 40 a 100 g/L, preferencialmente 50 g/L, e a concentração enzimática pode ser entre 20 e 70 UDS/mL, preferencialmente 40 UDS/mL. A reação é paralisada quando não houver mais sacarose no meio reacional.

**D - Redução do peso molecular da dextrana:** A hidrólise da dextrana ocorre pela adição de ácido sulfúrico 3 N em quantidade apropriada para propiciar pH entre 1,0 e 2,0 e pela manutenção da temperatura entre 72 e 76°C. O processo é interrompido através de resfriamento rápido em banho de gelo, e simultânea neutralização com solução de hidróxido de sódio 1,5 N, após um tempo de reação entre 4 a 8 horas, preferencialmente 5 horas.

**E - Fracionamento primário e recuperação da fração clínica:** O produto da hidrólise é submetido ao processo de fracionamento, para separação dos polímeros de diferentes pesos moleculares. O fracionamento pode ser feito de duas formas: por filtração seletiva em ultrafiltros e por precipitação em soluções alcoólicas.

No fracionamento por filtração têm-se dois ultrafiltros operando simultaneamente, sendo um com membrana de limite de exclusão de 100 KDaltons e outro com membrana de 30 KDaltons. Desta forma temos que o retentado do primeiro ultrafiltro possui moléculas com peso molecular acima de 100 KDaltons que devem ser recicladas para hidrólise, e o permeado deste primeiro ultrafiltro (que é simultaneamente o retentado do segundo ultrafiltro com membrana de 30 KDaltons), tendo moléculas com peso molecular entre 30 e 100 KDaltons, que representa a dextrana clínica. O permeado do segundo ultrafiltro é formado principalmente de dextranas com peso molecular abaixo de 30 KDaltons, que são os oligossacarídeos destinados ao uso como pré-bióticos. A figura 2 ilustra o processo de fracionamento da dextrana por ultrafiltração seletiva.

O processo de fracionamento por precipitação em solução alcoólica pode ser descrito como a seguir: primeiro adiciona-se à dextrana hidrolisada, etanol 95%, até concentração final entre 35 e 48% (X%), preferencialmente 39%, para a precipitação da dextrana de alto peso molecular (PM > 100.000 Da). Após a adição de etanol, a solução é mantida em temperatura constante (15 a 25°C) por 1 hora. O precipitado é separado por filtração ou centrifugação a 9.000 g por 15 minutos a 10°C e novamente diluído a 5% para sofrer novo processo de hidrólise e fracionamento. O sobrenadante, rico em dextrana clínica e em dextrana de baixo peso molecular, sofre a adição de mais etanol 95% até atingir concentrações entre 45 e 49% (Y%), preferencialmente 46%, de etanol, para que ocorra a precipitação da fração clínica. A fração presente no sobrenadante desta segunda fase é composta principalmente por oligossacarídeos de peso molecular menor que 30.000 Da. O precipitado contém principalmente dextrana clínica (dextranas 70 e 40) que devem ser separadas e purificadas numa etapa de polimento final em

peneira molecular. A seqüência completa de separação dos diferentes pesos moleculares está ilustrada na figura 3.

F - Recuperação da frutose e oligossacarídeos: Esta etapa é dividida em duas fases, sendo a primeira a diafiltração, para retirar oligossacarídeos e frutose da  
5 solução de dextrana bruta, antes da hidrólise, e a segunda corresponde à separação da frutose da solução contendo frutose e oligossacarídeos, realizada por adsorção em coluna de zeólita, encamisada e mantida a 40°C. A coluna de leito fixo é empacotada com uma zeólita sintética com estrutura similar à do tipo faujasita, que pode apresentar como cátion de compensação o sódio, cálcio ou, preferencialmente, o bário, conforme  
10 descrito por Silva (1998). A zeólita possui tamanho de partícula entre 0,053 e 0,125 mm. A coluna foi operada em forma de pulso, volume de injeção entre 10 e 30%, preferencialmente 20%, do volume da coluna, tendo como eluente água deionizada, na velocidade superficial de 0,5 a 2,5 cm.min<sup>-1</sup>, preferencialmente 0,5 cm.min<sup>-1</sup>.

G - Polimento da dextrana clínica: Para uma separação e purificação das  
15 dextranas 40 e 70 dentro dos padrões exigidos (menos de 10% de dextranas fora da faixa permitida) é necessário o uso de colunas de peneira molecular, como a utilização de gel Superdex 75 e 200, operando e utilizando como eluente água ultra-pura. As colunas utilizadas foram operadas à temperatura ambiente, na forma de pulso de 10 a 30% do volume da coluna, tendo como eluente água deionizada (Milli-Q) na vazão de  
20 0,5 a 2,5 cm.min<sup>-1</sup>.

### **Exemplo 1:**

#### ***Produção e recuperação de dextrana-sacarose por fermentação***

A enzima é produzida por fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F em meio composto por: melaço na quantidade equivalente para fornecer  
25 32 g/L de açúcares redutores totais, 10 g/L de água de maceração de milho, ambos pré-

tratados com 8% de carvão ativado a 70°C por uma hora, 5 g/L de hidrolisado de levedura e 5 g/L de fosfato de potássio. O pH inicial foi acertado em 6,7, e as condições de aeração e agitação foram, respectivamente 0,5 vvm e 250 rpm. O pH foi controlado durante as 6 primeiras horas de fermentação com uma solução 20% de sacarose diluída em NaOH 1N. A fermentação foi encerrada quando o pH atingiu 5,2. Ao fim da fermentação, obteve-se aproximadamente 70 unidades de dextrana-sacarose (UDS) por mililitro de meio bruto (figura 3). O meio fermentado foi centrifugado à 9.000 g por 20 minutos, a 10°C e então concentrado por ultrafiltração tangencial, com membrana com limite de exclusão de 20 KDa. Após a ultrafiltração é feita a precipitação da enzima, a 4°C, com a adição lenta de solução 50% de polietileno-glicol em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,2, contendo 0,05 g/L de cloreto de cálcio, também resfriado, até ocorrer a precipitação da enzima. Em seguida centrifuga-se a mistura a 10.000 g, a 4°C durante 10 minutos. O precipitado é re-diluído no mesmo tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,2, contendo 0,05 g/L de cloreto de cálcio, de acordo com esquema da figura 1, e estocado para futuras aplicações. Tem-se uma recuperação final de aproximadamente 80% atividade enzimática presente no caldo livre de células.

### **Exemplo 2:**

#### ***Produção e Hidrólise de dextrana***

Adicionou-se 40 UDS/mL em uma solução de sacarose 5%, incubou-se a 23°C por 2,5 horas, a pH 5,2, em tanque agitado. Após a síntese, obteve-se aproximadamente 18 g/L de dextrana de alto peso molecular (acima de 100 KDaltons), ou seja 70 a 80% de toda a dextrana produzida; a produção de frutose foi aproximadamente de 23 g/L. Fez-se primeiramente uma diafiltração com membrana de limite de exclusão 30 KDaltons, para separar oligossacarídeos com PM abaixo de 30 KDaltons. Com o retentado efetuou-se então, a hidrólise ácida, utilizando-se uma

temperatura de 76°C e pH 1,0, acertado com ácido sulfúrico, em reator de vidro encamisado, com agitação constante, por um período de 4,5 horas, como ilustra a figura 4. Ao final do processo a solução foi resfriada e em seguida neutralizada até pH 6,5.

**Exemplo 3:**

5 ***Fracionamento após hidrólise***

Após a hidrólise, a solução composta de aproximadamente 18 g/L de dextrana, possui uma distribuição de peso molecular seguindo as porcentagens descritas a seguir: 15 a 18% de dextrana de alto peso molecular (peso molecular acima de 100 KDaltons), 25 a 30% de dextrana clínica (peso molecular entre 30 e 100 KDaltons) e de 10 50 a 55% de dextrana de baixo peso molecular (peso molecular menor que 30 KDaltons). No fracionamento seguiu-se o método proposto no fluxograma representado na Figura 2. A temperatura foi 15°C, a condição para a separação inicial da dextrana de alto peso molecular é a adição de etanol até atingir 39% (X), e para a obtenção de dextrana clínica é necessária adição até 46% (Y) de etanol. Na primeira precipitação 15 obteve-se, no sobrenadante, 0,5% de dextrana de alto peso molecular, 9% de dextrana clínica e 90,5% de oligossacarídeos; no precipitado obteve-se 41% de dextrana de alto peso molecular, 41% de dextrana clínica e 18% de oligossacarídeos. Houve portanto um arraste considerável de dextrana clínica pela dextrana de alto peso molecular. Esta fração foi re-submetida à hidrólise ácida, nas mesmas condições anteriores. No 20 sobrenadante original adicionou-se então etanol até completar 46%, para a precipitação da fração clínica da dextrana. Obteve-se um precipitado rico em dextrana clínica, com a composição contida na tabela 2. Neste processo o rendimento final de dextrana clínica (Dextrana 40 e 70) foi de 20%, em relação à dextrana inicial, ou seja de aproximadamente 7% da sacarose inicial. Para a separação de dextrana 40 e dextrana 70 25 uma etapa com peneira molecular é necessária.

**Exemplo 4:*****Recuperação da frutose***

A solução de permeado obtida após diafiltração com membrana de limite de exclusão 30 KDa, contém oligossacarídeos e frutose. Para a separação da frutose  
 5 utilizou-se uma coluna de leito fixo, contendo zeólita Y trocada com bário como íon de compensação, com partículas entre 0,053 e 0,125 mm de diâmetro, a 40°C, com injeção de 10% do volume da coluna e eluição com água deionizada numa velocidade superficial de 0,5 cm/min. A figura 5 ilustra os resultados obtidos. Calculando-se os coeficientes que medem o grau de separação temos um coeficiente de separação de  
 10 2,54. Neste processo, obteve-se aproximadamente 70% da frutose na forma pura.

**Exemplo 5:*****Purificação da dextrana clínica***

Para a eliminação de oligossacarídeos presentes na fração clínica, e separação das frações de dextrana 40 e 70, utilizou-se a metodologia de permeação em  
 15 gel, em colunas HILOAD 16/60 (Pharmacia Biotech), empacotadas com gel Superdex 75 ou 200. Desta forma, a amostra contendo uma fração de dextrana de peso molecular menor de 30.000 Da foi separada e purificada até os padrões desejados, ou seja, obtendo-se no final soluções de dextrana clínica com menos de 10% de dextrana fora da faixa desejada.

20

**Tabela 1**

	Melaço	AMM
<b>Carvão Ativo (%)</b>	<b>6-10</b>	<b>4-8</b>
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>60-80</b>	<b>60-80</b>
<b>Tempo (h)</b>	<b>1-2</b>	<b>1-2</b>

**Tabela 2**

X%	Y%	Precipitado			Sobrenadante		
		Alto	Medio	Baixo	Alto	Medio	Baixo
39%	46%	3	40	57	0,2	3,8	96

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de dextrana clínica, oligossacarídeos e frutose a partir da sacarose, **caracterizado por ser composto de sete (07) etapas principais, sendo:**

5 a) **Produção da enzima dextrana-sacarose;** em que primeiramente o inóculo é preparado inoculando o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512-F em meio de cultura constituído de 50 g/L de açúcar cristal comercial, 20 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de fosfato de potássio dibásico, 0,2 g/L de sulfato de magnésio, 0,01 g/L de sulfato de manganês, 0,01 g/L de sulfato ferroso, 0,02 g/L de cloreto de cálcio, 0,01 g/L de cloreto de sódio ajustado para pH 6,7 e incubado a 10 27°C por 12 horas, sendo que o referido inóculo é em seguida adicionado a um meio de cultura industrial contendo melão de cana de 15 açúcar 80 °BRIX em concentrações equivalentes de açúcar entre 20 e 50 g/L, água de maceração de milho em concentrações entre 5 e 15 g/L, e fosfato dibásico de potássio em concentrações entre 10 e 30 g/L, em fermentador, onde para a fermentação, a agitação deve ser entre 100 e 300 rpm, a aeração entre 0,2 e 1 vvm, o pH mantido com adição de 20 solução constituída de 200 g/L de sacarose e 40 g/L de NaOH, durante um período de 6 horas, sendo que após esse tempo, a alimentação é interrompida e a fermentação é encerrada quando o pH atingir 5,2;

25 b) **Recuperação da enzima;** em que a enzima é obtida por intermédio da clarificação do caldo fermentado obtido na etapa a) por centrifugação a 9.000 g por 15 minutos, a uma temperatura compreendida entre 4 e 10°C; seguida de uma concentração por ultrafiltração com membrana com limite de exclusão entre de 20.000 e 100.000 Da, mantendo-se a temperatura de 4°C, para posteriormente proceder-se à precipitação da enzima, a 4°C, com a adição lenta de solução 50% de polietileno-glicol

em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,2, contendo 0,05 g/L de cloreto de cálcio, também resfriado, até ocorrer a precipitação da enzima, onde a mistura obtida é centrifugada em seguida a 12.000 g, a 4°C durante 10 minutos, sendo que o precipitado é rediluído no mesmo

5 tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,2, contendo 0,05 g/L de cloreto de cálcio;

c) **Síntese de dextrana de alto peso molecular**; em que a obtenção da dextrana bruta e frutose se dá a partir da enzima obtida na etapa b), tendo as reações de polimerização realizadas em reator encamisado,

10 equipado com um agitador mecânico, pelo tempo variando entre 1,5 a 4 horas, a temperatura entre 20 e 30°C, e o pH 5,2 mantido através do uso de tampão fosfato, sendo que a concentração inicial de sacarose varia em uma faixa compreendida entre 40 a 100 g/L e a concentração enzimática varia em uma faixa compreendida entre 20 e 70 UD S/mL,

15 em que a reação é paralisada quando não há mais sacarose no meio reacional;

d) **Redução do peso molecular da dextrana**; em que a obtenção da dextrana clínica e oligossacarídeos se dá pela hidrólise ácida da solução de dextrana obtida na etapa c), onde a referida hidrólise ocorre pela

20 adição de ácido sulfúrico 3 N em quantidade apropriada para propiciar pH entre 1,0 e 2,0 e pela manutenção da temperatura entre 72 e 76°C; sendo que o processo é interrompido através de resfriamento rápido em banho de gelo, e simultânea neutralização com solução de hidróxido de sódio 1,5 N, após um tempo de reação entre 4 a 8 horas;

e) **Fracionamento primário e recuperação da fração clínica**; em que o fracionamento da solução de dextrana obtida na etapa d) é realizado por filtração ou precipitação em solução alcoólica; sendo a filtração realizada com o auxílio de dois ultrafiltros, sendo um com membrana de

25 limite de exclusão de 100 KDaltons e outro com membrana de 30

Kdaltons; em que o processo de fracionamento por precipitação em solução alcoólica ocorre com a adição inicial de etanol 95% até concentração final entre 35 e 48%, seguida de outra precipitação com etanol 95% até atingir concentrações entre 45 e 49%, para que ocorra a precipitação da fração clínica, e após a adição de etanol, a solução sendo mantida em temperatura constante (15 a 25°C) por 1 hora; onde o precipitado é separado por filtração ou centrifugação a 9.000g por 15 minutos a 10°C, com o mesmo contendo principalmente dextrana clínica (dextranas 70 e 40) que devem ser separadas e purificadas numa etapa de polimento final em peneira molecular;

- f) **Recuperação da frutose e oligossacarídeos;** sendo que a recuperação da frutose, obtida durante a síntese de dextrana bruta, é realizada com a utilização de zeólitas; onde esta etapa é dividida em duas fases, sendo a primeira a diafiltração, para retirar oligossacarídeos e frutose da solução de dextrana bruta, antes da hidrólise, e a segunda corresponde à separação da frutose da solução contendo frutose e oligossacarídeos, realizada por adsorção em coluna de zeólita, encamisada e mantida a 40°C; onde a coluna de leito fixo é empacotada com uma zeólita sintética com estrutura similar à do tipo faujasita, podendo apresentar como cátion de compensação o sódio, cálcio ou bário; e onde a coluna é operada em forma de pulso, com volume de injeção entre 10 e 30% do volume da coluna, tendo como eluente água deionizada, na velocidade superficial de 0,5 a 2,5 cm.min<sup>-1</sup>; e
- g) **Polimento da dextrana clínica;** sendo que o dito polimento é realizado empregando colunas de peneira molecular, utilizando como eluente água ultra-pura na vazão de 0,5 a 2,5 cm.min<sup>-1</sup> e operadas à temperatura ambiente, na forma de pulso de 10 a 30% do volume da coluna, para a obtenção de frações de dextrana clínica dentro dos

padrões exigidos para comercialização de dextranas 40 e 70 (menos de 10% de dextranas fora da faixa permitida).

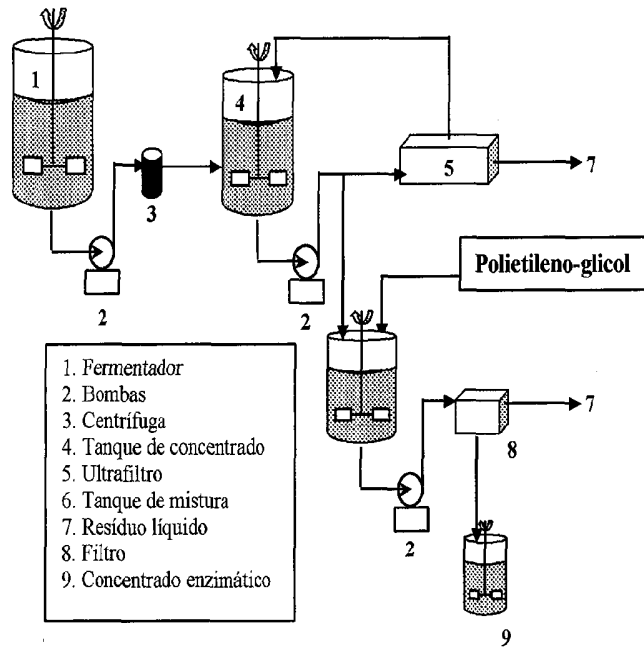


Figura 1

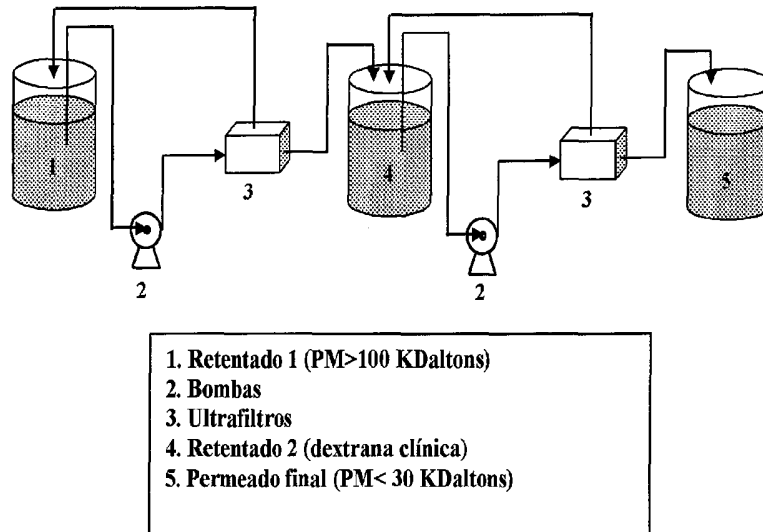


Figura 2

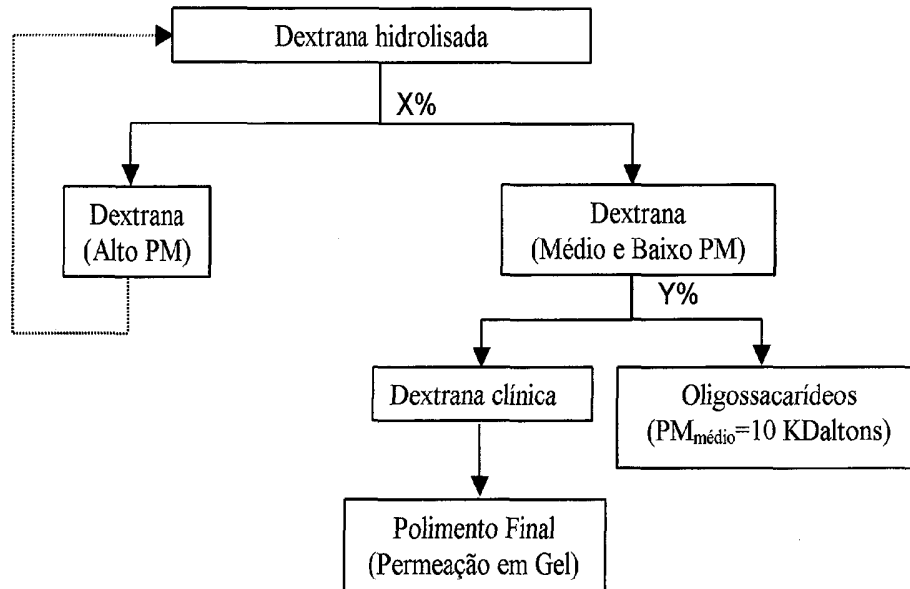


Figura 3

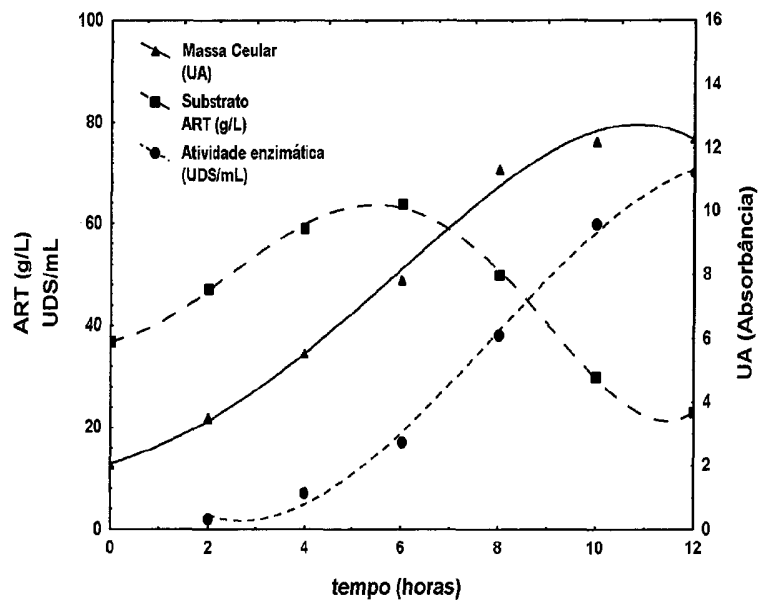


Figura 4

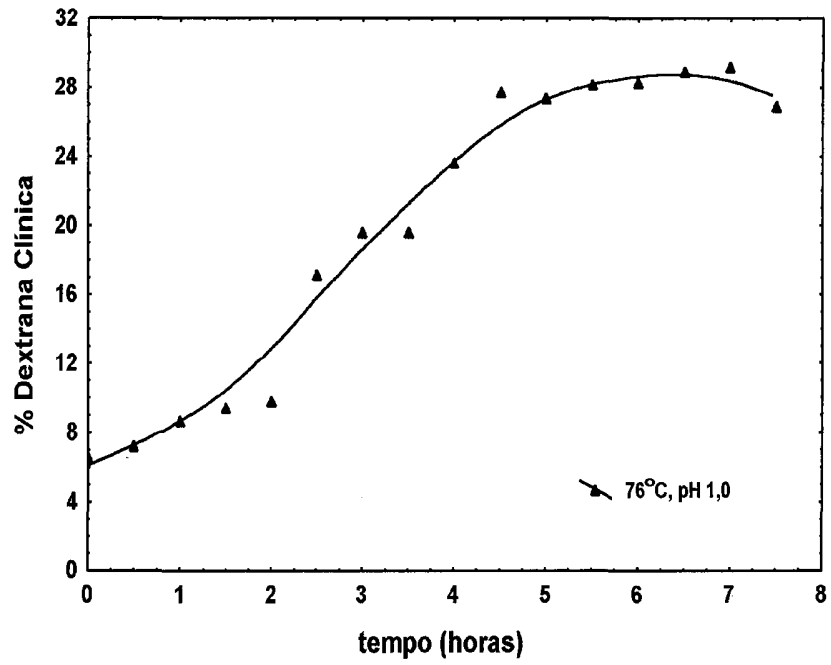


Figura 5

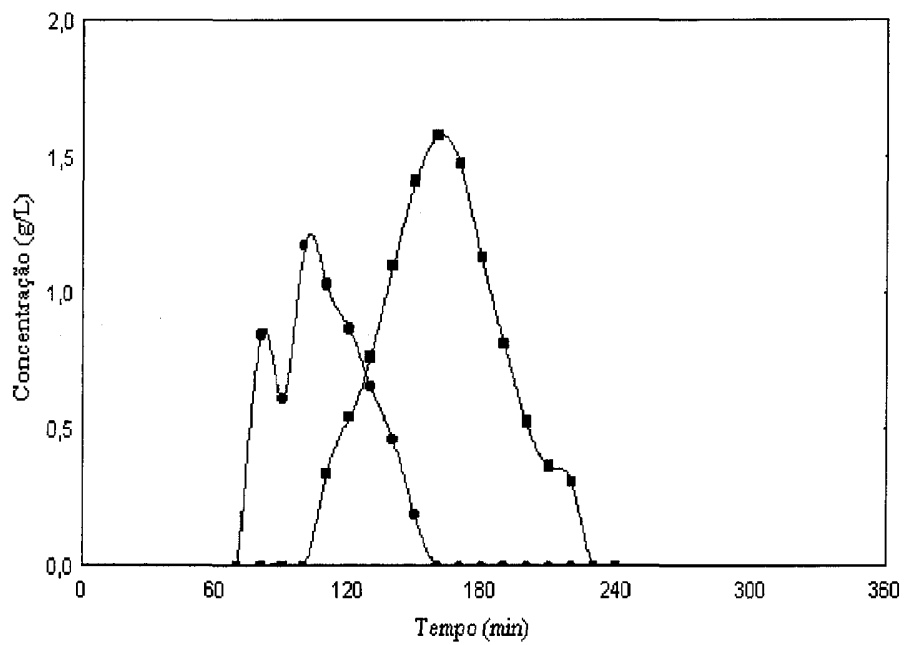


Figura 6

## RESUMO

“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA, OLIGOSSACARÍDEOS E FRUTOSE A PARTIR DA SACAROSE”. A presente invenção se refere a um processo de obtenção de dextrana clínica, frutose e oligossacarídeos a partir de sacarose, utilizando a enzima dextrana-sacarose de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 F. Os produtos citados são obtidos através de síntese enzimática, hidrólise química, fracionamento e separação de oligossacarídeos e frutose, através de colunas de adsorção, com leito de zeólita bária, e de permeação em gel. A dextrana clínica tem diversas aplicações principalmente na indústria farmacêutica (sendo utilizada como expansor volumétrico de sangue e auxiliador da circulação sanguínea entre outros), os oligossacarídeos são muito aplicados em alimentos, como fibras solúveis e alimentos pré-bióticos, ou seja, compostos que estimulam a flora benéfica, microrganismos ditos pró-bióticos, dos intestinos de humanos e animais em geral. Também são utilizados em cosméticos, sendo cada vez maior o número de aplicações possíveis. A frutose é um produto secundário gerado durante a síntese, em que a sacarose é quebrada para a formação da dextrana, gerando a frutose livre. Devido à sua importância econômica a frutose é recuperada neste processo, obtendo-se, portanto, um aproveitamento completo do açúcar utilizado.