



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014028870-4 B1



(22) Data do Depósito: 23/05/2013

(45) Data de Concessão: 29/12/2020

(54) Título: SOLUÇÃO E PROCESSO

(51) Int.Cl.: C08B 37/00; C08L 5/00; D01D 5/06; D01F 9/00.

(30) Prioridade Unionista: 24/05/2012 US 13/479,990.

(73) Titular(es): DUPONT INDUSTRIAL BIOSCIENCES USA, LLC.

(72) Inventor(es): JOHN P. O'BRIEN.

(86) Pedido PCT: PCT US2013042329 de 23/05/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/177348 de 28/11/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/11/2014

(57) Resumo: SOLUÇÃO E PROCESSO. Soluções formadas pela combinação de poli(Alfa(1-3) glucano) com CS2 em solução de hidróxido de metal alcalino aquoso demonstraram produzir a forma xantada do poli(Alfa(1-3) glucano). Soluções assim formadas demonstraram ser úteis para fiação de solução na fibra de poli(Alfa(1-3) glucano) quando a fibra fiada é coagulada em um banho de coagulação acídico. As fibras assim produzidas exibiram propriedades físicas desejadas. O poli(Alfa(1-3) glucano) empregado foi sintetizado por fermentação.

“SOLUÇÃO E PROCESSO”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção é direcionada a um processo para formação de fibras de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) pela fiação de solução de uma solução de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado em um hidróxido de metal alcalino aquoso e à solução propriamente dita. O poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) empregado foi sintetizado por fermentação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Polissacarídeos são conhecidos desde os primórdios da civilização principalmente na forma de celulose, um polímero formado da glicose através de processos naturais via ligações $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídeo; vide, por exemplo, Applied Fibre Science, F. Happey, Ed., Chapter 8, E. Atkins, Academic Press, New York, 1979. Numerosos outros polímeros de polissacarídeo também são aqui descritos.

[003] Apenas celulose entre os muito conhecidos polissacarídeos obteve proeminência comercial como uma fibra. Particularmente, algodão, uma forma altamente pura de celulose de ocorrência natural, é muito conhecido por seus atributos benéficos em aplicações têxteis.

[004] Sabe-se ainda que a celulose exibe extensão de cadeia suficiente e rigidez de cadeia principal em solução para formar soluções cristalinas líquidas; vide, por exemplo O'Brien, U.S. Pat. No. 4,501,886. Os ensinamentos do estado da arte sugerem que a extensão de cadeia de polissacarídeo suficiente pode ser obtida apenas em polissacarídeos $\beta(1\rightarrow4)$ ligados e que qualquer desvio importante dessa geometria de cadeia principal reduziria a razão de aspecto molecular para abaixo daquele exigida para a formação de uma fase ordenada.

[005] Mais recentemente, polímero de glucano, caracterizado por ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ glicosídeo, foi isolado pelo contato com uma solução

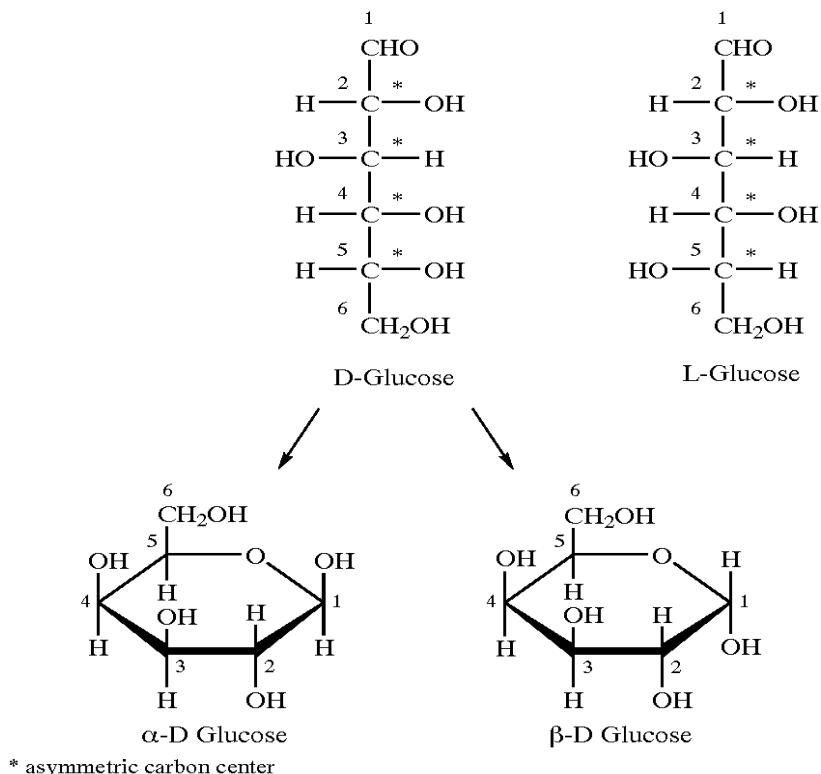
aquosa de sucrose com GtfJ glucosiltransferase isolado de *Streptococcus salivarius*, Simpson et al., *Microbiology*, vol 141, pp. 1451-1460 (1995). Filmes de peso molecular baixo, altamente orientados, altamente cristalinos de $\alpha(1\rightarrow3)$ -D-glucano foram fabricados para fins de análise de difração de raio-X, Ogawa et al., *Fiber Diffraction Methods*, 47, pp. 353-362 (1980). Em Ogawa, o polímero de glucano insolúvel é acetilado, o glucano acetilado dissolveu para formar uma solução a 5% em clorofórmio e a solução fundiu em um filme. O filme é em seguida submetido ao estiramento em glicerina a 150° C. que orienta o filme e estira-o em um comprimento 6.5 vezes o comprimento original do filme fundido em solução. Após o estiramento o filme é desacetilado e cristalizado por tempera em água superaquecida a 140° C. em um recipiente de pressão. É bastante conhecido no estado da técnica que a exposição de polissacarídeos em tal ambiente aquoso quente resulta em clivagem de cadeia e perda de peso molecular com degradação concomitante de propriedades mecânicas.

[006] Polissacarídeos baseados em glicose e glicose propriamente dita são particularmente importantes devido ao seu papel proeminente em processos de fotossíntese e metabólicos. Celulose e amido, ambos baseados em cadeias moleculares de polianidroglicose são os polímeros mais abundantes na terra e são de grande importância comercial. Tais polímeros oferecem materiais que são compatíveis ao meio ambiente por todo o seu ciclo de vida e são construídos a partir de energia renovável e fontes de matéria prima.

[007] O termo “glucano” é um termo do estado da técnica que se refere a um polissacarídeo compreendendo unidades de monômero de beta-D-glicose que são ligadas em oito possíveis modos. A celulose é um glucano.

[008] Dentro de um polímero de glucano as unidades monoméricas de repetição podem ser ligadas em uma variedade de configurações seguindo um padrão de encadeamento. A natureza do padrão de encadeamento

depende em parte de como o anel fecha quando um anel aldohexose fecha para formar um hemiacetal. A forma de cadeia aberta de glicose (um aldohexose) apresenta quatro centros assimétricos (vide a seguir). Por isso existem 24 ou 16 formas de cadeia aberta possíveis das quais D e L glicose são duas. Quando o anel está fechado um novo centro assimétrico é criado em C1 produzindo assim 5 carbonos assimétricos. Dependendo de como o anel fecha, para glicose, polímero $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -ligado, por exemplo amido, ou polímero $\beta(1 \rightarrow 4)$ -ligado, por exemplo celulose, pode ser formado após posterior condensação formando polímero. A configuração em C1 no polímero determina se ela é um polímero alfa- ou beta-ligado e os números entre parêntese seguindo alfa ou beta referem-se aos átomos de carbono através dos quais o encadeamento ocorre.



[009] As propriedades exibidas por um polímero de glucano são determinadas pelo padrão de encadeamento. Por exemplo, as

propriedades muito diferentes de celulose e amido são determinadas pela respectiva natureza das suas configurações de encadeamento. Amido ou amilose consiste em glicose $\alpha(1\rightarrow4)$ ligada e não forma fibras entre outras coisas pois ela é intumescida ou dissolvida pela água. Por outro lado, a celulose consiste em glicose $\beta(1\rightarrow4)$ ligada e produz um material estrutural excelente sendo tanto cristalino como hidrofóbico e é comumente usado para aplicações têxteis como fibra de algodão, assim como para estruturas na forma de madeira.

[010] Como outras fibras naturais, o algodão foi desenvolvido sob limitações sendo que a estrutura do polissacarídeo e propriedades físicas não foram otimizadas para aplicações têxteis. Particularmente, fibra de algodão é de comprimento de fibra curto, variação limitada em seção transversal e finura de fibra e é produzida em um processo de intensiva mão de obra e uso intensivo do solo.

[011] O'Brien, documento patentário US No. 7,000,000 descreve um processo de preparação de fibra de soluções cristalinas líquidas de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) acetilado. A fibra assim preparada foi em seguida desacetilada em uma fibra de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano).

DESCRÍÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[012] Benefício considerável aumenta o processo deste que melhora uma fibra de poli ($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) altamente orientada e cristalina sem sacrifício de peso molecular pela fiação de solução de fibra da nova solução deste.

[013] Em um aspecto a presente invenção é direcionada a uma solução compreendendo 0.75 a 2 molar de hidróxido de metal alcalino aquoso e um teor de sólidos de 5 a 20% em peso de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado; sendo que o peso molecular numérico ponderal do poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado é de pelo menos 10,000 Daltons; e, sendo que o grau de

xantogenação do poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado situa-se na faixa de 0.1 a 1.

[014] Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um processo compreendendo a formação de uma solução por dissolução em 0.75 a 2 molar de hidróxido de metal alcalino aquoso, CS₂, e 5 a 20% em peso do peso total da solução resultante de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) caracterizado por um peso molecular numérico ponderal de pelo menos 10,000 Da, fazendo com que dita solução escoe através de uma fieira, formando assim uma fieira; e colocando dita fibra em contato com um coagulante líquido ácidico; sendo que em dito processo a razão em peso de CS₂ para poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) situa-se na faixa de 0.1 a 1.0.

BREVE DESCRIÇÃO DO DESENHO

[015] A figura 1 é um diagrama esquemático de um equipamento adequado para abertura de ar ou fiação por via úmida das soluções de hidróxido de metal alcalino aquoso de PAGX deste.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[016] Quando uma faixa de valores é aqui provida, pretende-se com isso englobar os pontos finais da faixa desde que não conste indicação expressamente diferente. Valores numéricos aqui usados apresentam a precisão do número de figuras importantes providas, segundo o protocolo padrão em química para figuras importantes conforme destacado na norma ASTM E29-08 seção 6. Por exemplo, o número 40 engloba uma faixa de 35.0 a 44.9, enquanto o número 40.0 engloba uma faixa de 39.50 a 40.49.

[017] O termo “teor de sólidos” é um termo do estado da técnica. Ele é usado aqui para referir-se à porcentagem em peso de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado (PAGX) na solução de hidróxido de metal alcalino aquoso deste (MOH (aq)). Ele é calculado a partir da fórmula:

$$SC = \frac{Wt(PAGX)}{Wt(PAGX) + Wt(MOH(aq))} \times 100$$

onde SC representa “teor de sólidos” e $Wt(PAGX)$, $Wt(MOH(aq))$ são respectivamente pesos do poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantato(PAGX), e do hidróxido de metal alcalino aquoso. O termo “teor de sólidos” é sinônimo com a concentração em peso de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado com relação ao peso total da solução.

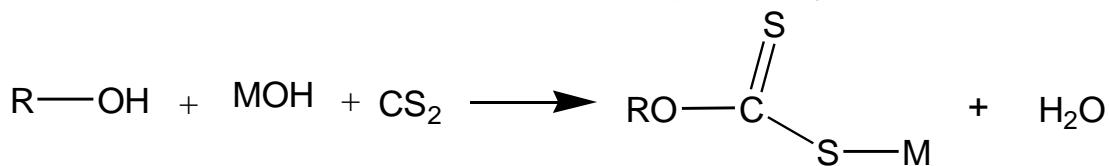
[018] Porcento em peso é representado pelo termo “% em peso.”

[019] A fórmula “MOH” deve ser empregada para referir-se ao hidróxido de metal alcalino adequado para a prática da invenção. A fórmula “MOH(aq)” deve ser empregada para referir-se à solução de hidróxido de metal alcalino aquoso adequado para a prática da invenção. Entende-se que a expressão “concentração do MOH(aq)” refere-se à molaridade da solução de hidróxido de metal alcalino aquoso deste.

[020] Um polímero, incluindo glucano, e poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) (PAG) particularmente, é constituído de uma pluralidade de assim chamadas unidades de repetição covalentemente ligadas entre si. As unidades de repetição em uma cadeia polimérica são dirradicais, sendo que a forma radical provê a ligação química entre unidades de repetição. Para fins da presente invenção, o termo “unidades de repetição de glicose” refere-se à forma diradical de glicose que é ligada a outros dirradicais na cadeia polimérica, formando assim dita cadeia polimérica.

[021] O termo “glucano” refere-se a polímeros, incluindo oligômeros e polímeros de baixo peso molecular que são inadequados para a formação de fibra. Para fins da presente invenção, o polímero glucano adequado para a prática da invenção é um poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) ou poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado, caracterizado por um peso molecular numérico ponderal de pelo menos 10,000 Daltons, preferivelmente de pelo menos 40,000 - 100,000 Daltons.

[022] PAGX adequado é caracterizado por um grau de xantogenação na faixa de 0.1 a 1. O termo “xantogenação” é um termo do estado da técnica que se refere à reação de um grupo hidroxila com CS₂ em hidróxido de metal alcalino, de acordo com a seguinte reação:



[023] No caso do PAG adequado para uso no processo da invenção, cada unidade de repetição de hexose cíclica oferece três hidroxilas para reação potencial para formar o xantato de acordo com o esquema de reação acima. O termo “grau de xantogenação” refere-se à porcentagem media de sítios hidroxila disponíveis em cada unidade de repetição que atualmente sofreram reação formando o xantato. O grau máximo teórico de xantogenação de molécula de polímero PAG adequado que pode sofrer é 3 – isto é, todo sítio hidroxila único no polímero sofreu reação.

[024] De acordo com a presente invenção, polímeros PAGX adequados sofreram xantogenação no grau de 0.1 a 1. Isso significa que em média entre um sítio hidroxila por dez unidades de repetição, e 10 sítios hidroxila por dez unidades de repetição sofreram a reação de xantogenação enquanto o máximo teórico deveria ser 30 sítios hidroxila por dez unidades de repetição.

[025] Em um aspecto, a presente invenção é direcionada a uma solução compreendendo 0.75 a 2 molar hidróxido de metal alcalino aquoso e um teor de sólidos de 5 a 20% em peso de PAGX; sendo que o peso molecular numérico ponderal do PAGX é de pelo menos 10,000 Daltons; e sendo que o grau de xantogenação do PAGX situa-se na faixa de 0.1 a 1.

[026] Em uma concretização, o hidróxido de metal alcalino (MOH) é hidróxido de sódio. Em uma outra concretização, a concentração do

NaOH situa-se na faixa de 1.0 a 1.7 M.

[027] Em uma concretização, a concentração de sólidos situa-se na faixa de 7.5 a 15%.

[028] O PAG adequado para uso no processo da presente invenção é um glucano caracterizado por um peso molecular numérico ponderal (M_n) de pelo menos 10,000 Da sendo que pelo menos 90 moles porcento das unidades de repetição no polímero são unidades de repetição de glicose e pelo menos 50% das ligações entre unidades de repetição de glicose são $\alpha(1 \rightarrow 3)$ glicosídeo. Preferivelmente pelo menos 95 moles porcento, o mais preferivelmente 100 moles porcento das unidades de repetição são unidades de repetição de glicose. Preferivelmente pelo menos 90%, o mais preferivelmente 100% das ligações entre unidades de glicose são $\alpha(1 \rightarrow 3)$ glicosídeo.

[029] O isolamento e purificação de vários polissacarídeos são descritos por exemplo, *The Polissacarídeos*, G. O. Aspinall, Vol. 1, capítulo 2, Academic Press, New York, 1983. Quaisquer meios de produção do $\alpha(1 \rightarrow 3)$ polissacarídeo adequado para a invenção em rendimento satisfatório e 90% de pureza são adequados. Em um tal método, descrito no documento patentário 7,000,000, poli($\alpha(1 \rightarrow 3)$ -D-glicose) é formado pelo contato de uma solução aquosa de sucrose com gtfJ glucosiltransferase isolada de *Streptococcus salivarius* de acordo com os métodos ensinados no estado da técnica. Em um tal método alternativo o gtfJ é gerado por E. Coli geneticamente modificado conforme descrito detalhadamente *infra*.

[030] O PAG adequado para uso na presente invenção também pode compreender unidades de repetição ligadas por uma ligação de glicosídeo que não aquela $\alpha(1 \rightarrow 3)$, incluindo $\alpha(1 \rightarrow 4)$, $\alpha(1 \rightarrow 6)$, $\beta(1 \rightarrow 2)$, $\beta(1 \rightarrow 3)$, $\beta(1 \rightarrow 4)$ ou $\beta(1 \rightarrow 6)$ ou qualquer combinação deste. De acordo com a presente invenção, pelo menos 50% do glicosídeo no polímero são $\alpha(1 \rightarrow 3)$ glicosídeo. Preferivelmente pelo

menos 90%, o mais preferivelmente 100%, das ligações entre unidades de glicose são $\alpha(1 \rightarrow 3)$ glicosídeo.

[031] A solução deste é preparada mediante adição de um PAG adequado a MOH(aq), contendo disulfito de carbono e mediante agitação para obter mistura completa. PAGX é formado *in situ* sob essas condições. O teor de sólidos de PAGX na solução varia de 5 a 20% em peso com relação ao peso total da solução. Se o teor de sólidos de PAGX estiver abaixo de 5%, a capacidade formadora de fibra da solução será grandemente afetada. Soluções com teores de sólidos acima de 15% tornam-se cada vez mais problemáticas de serem formadas, exigindo cada vez mais técnicas de formação de solução refinadas.

[032] Em qualquer determinada concretização o limite de solubilidade de PAGX é uma função do peso molecular do PAGX, a concentração do MOH(aq), o grau de xantogenação, a duração de mistura, a viscosidade da solução quando esta está sendo formada, as forças de cisalhamento às quais a solução está sujeita e a temperatura na qual a mistura ocorre. Em geral, misturas de maior cisalhamento e temperatura mais elevada são associadas a maior solubilidade. A temperatura máxima para mistura é limitada a 46 °C, o ponto de ebulição do CS₂. Do ponto de vista de solubilidade e capacidade de fiação, as concentrações ideais do MOH(aq) e CS₂ podem se alterar dependendo de outros parâmetros no processo de mistura.

[033] Na prática da invenção, verificou-se que a reação da CS₂ com o PAG para formar o xantato ocorre quantitativamente em aproximadamente uma a três horas sob temperatura ambiente. O xantato assim formado também foi observado ser quimicamente instável, que se degrada completamente em uma variedade de subprodutos após aproximadamente 36 horas de tempo de solução. Portanto cabe ao versado na técnica empregar a solução deste para fiação de fibra após o tempo necessário para formação do xantato mas antes que a degradação significativa possa ocorrer. Para a solução deste preparada sob temperatura

ambiente, a fiação é portanto realizada preferivelmente entre 1 a 3 horas de tempo de solução, dependendo do tempo de reação para formação de xantato. O termo “tempo de solução” refere-se ao tempo transcorrido desde quando os ingredientes da solução foram primeiramente combinados. Portanto, em uma concretização preferida do respectivo processo, os ingredientes são combinados, deixados descansar por 1 a 3 horas e em seguida fiados formando fibra conforme descrito detalhadamente acima. Em uma concretização de certa forma menos preferida quimicamente, mas mais preferida do ponto de vista prático, um tempo de solução na ordem de 1-5 horas é também adequado.

[034] A presente invenção é também direcionada a um processo compreendendo a formação de uma solução por meio de dissolução em 0.75 a 2 molar de hidróxido de metal alcalino aquoso, CS_2 , e 5 a 15% em peso do peso total da solução resultante de PAG caracterizado por um peso molecular numérico ponderal de pelo menos 10,000 Da; fazendo com que dita solução escoe através de uma fieira, formando portanto uma fibra; e colocando dita fibra em contato com um coagulante líquido acídico; sendo que em dito processo uma razão em peso de CS_2 para PAG situa-se na faixa de 0.1 a 1.0.

[035] Em uma concretização, o metal alcalino (M) é sódio.

[036] Em uma outra concretização de seu processo, um PAG adequado é um em que 100% das unidades de repetição são glicose, e 100% das ligações entre unidades de repetição de glicose are $\alpha(1 \rightarrow 3)$ glicosídeo.

[037] No processo deste, o teor de sólidos mínimo de PAGX necessário na solução a fim de obter formação de fibra estável varia de acordo com o peso molecular da PAGX, assim como o grau de xantogenação. Verificou-se na prática da invenção que 5% de teor de sólidos é um limite mais baixo aproximado em relação à concentração necessária para a formação de fibra estável. Em > 15%, especialmente em mais de 20% de sólidos, quantidades excessivas de PAGX não dissolvido estão presentes, causando

uma degradação no desempenho de fiação de fibra. Uma solução com um teor de sólidos de pelo menos 7.5% é preferida. Um teor de sólidos que varia de aproximadamente 7.5% a aproximadamente 15% em uma solução 1.0 a 1.7 M de NaOH é preferido. É preferido um PAGX caracterizado por um peso molecular numérico ponderal na faixa de 40,000 – 100,000 Daltons e grau de xantogenação na faixa de 0.1 - 1.

[038] Fiação da solução deste pode ser feita por meios conhecidos no estado da técnica e conforme descrito em O'Brien, *op. cit.* A solução de fiação viscosa pode ser forçada por meios tais como introdução de um pistão ou a ação de uma bomba através de uma fieira mutil-furos ou outra forma de matriz. Os furos de fieira podem ser de qualquer formato de seção transversal incluindo o formato Redondo, multi-lobal e similar como são conhecidos no estado da técnica são conhecidos no estado da técnica. O filamento extrudado pode então ser passado por meios convencionais em um banho de coagulação sendo que está presente um coagulante líquido que converte o PAGX de volta para PAG, fazendo com que o polímero coagule em uma fibra de acordo com a presente invenção.

[039] Coagulantes líquidos adequados incluem mas não estão limitados a ácido acético glacial, ácido acético aquoso, ácido sulfúrico, combinações de ácido sulfúrico, sulfato de sódio, e sulfato de zinco. Em uma concretização, o coagulante líquido é mantido a uma temperatura na faixa de 0 – 100 °C, e preferivelmente na faixa de 15 – 70 °C.

[040] Em uma concretização, o banho de coagulação compreende ácido acético glacial. Verificou-se na prática da invenção que resultados satisfatórios são obtidos pelo emprego como um excesso de coagulante líquido de ácido acético glacial. Durante o curso de fiação, o ácido acético glacial neutraliza o NaOH aquoso e regenera PAG de PAGX como a fibra fiada através do banho de coagulação.

[041] Em uma concretização preferida, a extrusão é realizada

diretamente no banho de coagulação. Em tal circunstância, conhecida no estado da técnica como “fiação por via úmida” a fieira é parcialmente ou totalmente imersa no banho de coagulação. As fieiras e equipamentos associados devem ser construídos com ligas resistentes à corrosão tais como aço inoxidável ou platina/ouro.

[042] Em uma concretização, a fibra assim coagulada é então passada em um segundo banho para neutralizar e diluir ácido residual em relação ao banho de coagulação. O banho secundário contém preferivelmente H₂O, metanol, ou NaHCO₃ aquoso a 5% ou uma mistura destes. NaHCO₃ aquoso é preferido. Em uma concretização, um pacote de fibra enrolada é impregnado em um ou mais banhos de lavagem neutralizantes por um período de tempo de até quatro horas em cada banho. Uma sequência de banhos compreendendo respectivamente NaHCO₃ aquos a 5% metanol, e H₂O, foi considerada ser satisfatória.

[043] A presente invenção é também descrita em mas não limitada pelas seguintes concretizações específicas.

EXEMPLOS

PREPARAÇÃO DE ENZIMA GLUCOSILTRANSFERASE (GTFJ)

MATERIAIS

[044] Tubos de diálise (Spectrapor 25225-226, peso molecular de corte 12000) foram obtidos pela VWR (Radnor, PA).

[045] Dextran e etanol foram obtidos pela Sigma Aldrich. Sucrose foi obtida da VWR.

[046] Antiespumante Suppressor 7153 foi obtido pela Cognis Corporation (Cincinnati, OH).

[047] Todos os outros produtos químicos foram obtidos do comumente usado.

MEIO DE SEMENTE

[048] O meio de semente, usado para crescer fermentos lácticos para os fermentadores presentes em : extrato de levedura (Amberx 695, 5.0 gramas

por litro (g/L)), K₂HPO₄ (10.0 g/L), KH₂PO₄ (7.0 g/L), dihidrato de citrato de sódio (1.0 g/L), (NH₄)₂SO₄ (4.0 g/L), MgSO₄ heptahidrato (1.0 g/L) e citrato de amônio férrico (0.10 g/L). O pH do meio foi ajustado a 6.8 utilizando-se 5N NaOH ou H₂SO₄ e o meio foi esterilizado no frasco. Adições pós esterilização incluiram glicose (20 mL/L de uma solução a 50% p/p) e ampicilina (4 mL/L de uma solução concentrada a 25 mg/mL).

MEIO FERMENTADOR

[049] O meio de crescimento usado no fermentador continha: KH₂PO₄ (3.50 g/L), FeSO₄ heptahidrato (0.05 g/L), MgSO₄ heptahidrato (2.0 g/L), dihidrato citrato de sódio (1.90 g/L), extrato de levedura (Aubrex 695, 5.0 g/L), antiespumante Supressor 7153 (0.25 mililitros por litro, mL/L), NaCl (1.0 g/L), CaCl₂ dihidrato (10 g/L), e solução de elementos de traço NIT (10 mL/L). Os elementos de traço NIT continha monohidrato de ácido cítrico (10 g/L), MnSO₄ hidrato (2 g/L), NaCl (2 g/L), FeSO₄ heptahidrato (0.5 g/L), ZnSO₄ heptahidrato (0.2 g/L), CuSO₄ pentahidrato (0.02 g/L) e NaMoO₄ dihidrato (0.02 g/L). Adições pós esterilização incluiram glicose (12.5 g/L de uma solução 50% p/p) e ampicilina (4 mL/L de uma solução concentrada a 25 mg/mL).

CONSTRUÇÃO DE CEPA DE EXPRESSÃO DE ENZIMA GLUCOSILTRANSFERASE (GTFJ)

[050] Um gene que codifica a enzima glucosiltransferase madura (GtfJ; EC 2.4.1.5; GENBANK® AAA26896.1, SEQ ID NO: 3) de *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975) foi sintetizado utilizando-se códons otimizados para expressão em *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park CA). O produto de ácido nucléico (SEQ ID NO: 1) foi subclonado em pJexpress404® (DNA 2.0, Menlo Park CA) para gerar o plasmídeo identificado como pMP52 (SEQ ID NO: 2). O plasmídeo pMP52 foi usado para transformar *E. coli* MG1655 (ATCC 47076) para gerar a cepa identificada como MG1655/pMP52.

[051] DNA recombinante padrão e técnicas de clonagem molecular usadas aqui são bastante conhecidas no estado da técnica e são

descritas por Sambrook, J. e Russell, D., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); e by Silhavy, T. J., Bennan, M. L. and Enquist, L. W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984); e por Ausubel, F. M. et. al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 5th Ed. Current Protocols, John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 2002.

[052] Materiais e métodos adequados para a manutenção e crescimento de culturas microbianas são bastante conhecidos no estado da técnica. Técnicas adequadas para uso nos exemplos seguintes podem ser consideradas como estabelecidas em *Manual of Methods for General Bacteriology* (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, Eds.), American Society for Microbiology: Washington, D.C. (1994)); ou no *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 3^a Edição (Richard H. Baltz, Julian E. Davies, and Arnold L. Demain Eds.), ASM Press, Washington, DC, 2010.

PRODUÇÃO DE GTFJ RECOMBINANTE EM FERMENTAÇÃO

[053] Produção da enzima gtfJ recombinante em um fermentador foi iniciada pela expressão da enzima gtfJ construída conforme descrito supra. Uma alíquota 10 mL do meio de semente foi adicionada em um balão de Erlenmeyer com reentrâncias no fundo de 125 mL descartável foi inoculado com uma cultura de 1.0 mL da *E. coli* MG1655/pMP52 preparada supra, em 20% glicerol. Esta cultura foi deixada crescer a 37 °C durante agitação a 300 revoluções por minuto (rpm) por 3 horas.

[054] Uma cultura de semente para iniciar o fermentador foi preparada com a introdução em um frasco agitador de 2 L com 0.5 L do meio de semente. 1.0 mL da cultura pré-semente foi assepticamente transferida para 0.5 L de meio de semente no frasco e cultivada a 37 °C e 300 rpm por 5 horas. A cultura

de semente foi transferida sob densidade ideal 550 nm (OD_{550}) >2 para um fermentador 14 L (Braun, Perth Amboy, NJ) contendo 8 L do meio fermentador descrito acima sob 37 °C.

[055] Células de *E. coli* MG1655/pMP52 foram deixadas crescer no fermentador e a introdução de glicose (50% p/p de solução de glicose contendo 1% p/p $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) foi iniciada quando a concentração de glicose no meio diminuiu para 0.5 g/L. A introdução foi iniciada a 0.36 gramas de alimentação por minuto (g alimentação/min) e aumentou progressivamente a cada hora para 0.42, 0.49, 0.57, 0.66, 0.77, 0.90, 1.04, 1.21, 1.41 1.63, 1.92, 2.2 g de alimentação/min respectivamente. A taxa foi mantida constante posteriormente pela redução ou paralização temporária da alimentação de glicose quando a concentração de glicose excedia 0.1 g/L. A concentração de glicose no meio foi monitorada utilizando-se um analisador de glicose YSI (YSI, Yellow Springs, Ohio).

[056] Indução de atividade de enzima de glucosiltransferase foi iniciada, quando células atingiram um OD_{550} de 70, com a adição de 9 mL de 0.5 M IPTG (isopropil β -D-1-tiogalacto- piranosídeo). A concentração de oxigênio dissolvido (DO) foi controlada a 25% de saturação de ar. O DO foi controlado primeiramente pela taxa de agitação de impulsor (400 a 1200 rpm) e posteriormente pela taxa de aeração (2 a 10 litros padrão por minuto, slpm). O pH foi controlado a 6.8. NH_4OH (14.5% peso/volume, p/v) e H_2SO_4 (20% p/v) foram usados para controle de pH I. A pressão de retorno foi mantida a 0.5 bars. Em vários intervalos (20, 25 e 30 horas), 5 mL de antiespumante Suppressor 7153 foram adicionados ao fermentador para impedir a espumação. As células foram colhidas por centrifugação 8 horas após adição de IPTG e foram armazenadas a -80 °C como uma pasta de célula .

PREPARAÇÃO DE EXTRATO DE ENZIMA GTFJ BRUTO A PARTIR DA PASTA DE CÉLULA

[057] A pasta de célula acima obtida foi suspensa a 150 g/L em 50 mM de tampão de fosfato de potássio pH 7.2 para preparar uma pasta. A pasta

foi homogeneizada a 12,000 psi (máquina tipo Rannie, APV-1000 ou APV 16.56) e o homogeneizado refrigerado a 4 °C. Sob agitação moderadamente vigorosa, 50 g de uma solução floculante (Aldrich no. 409138, 5% em 50 mM de tampão de fosfato de sódio pH 7.0) foram adicionados por litro de homogeneizado celular. A agitação foi reduzida para leve agitação por 15 minutos. O homogeneizado cellular foi em seguida clarificado por centrifugação a 4500 rpm por 3 horas a 5-10 °C. O sobrenadante contendo extrato de enzima gtfJ bruto foi concentrado (aproximadamente 5X) com uma membrana de peso molecular de corte 30 quilo Dalton (kDa). A concentração de proteína na solução de enzima gtfJ foi determinada pelo teste de proteína de ácido bincicronínico (BCA) (Sigma Aldrich) para ser 4-8 g/L.

PREPARAÇÃO DE POLÍMERO, SOLUÇÕES DE FIAÇÃO E FIBRA

EQUIPAMENTO DE FIAÇÃO E PROCEDIMENTO

[058] A figura 1 é um diagrama esquemático de um aparelho adequado para uso no processo de fiação de fibra deste. A unidade de engrenagem, 1, aciona um êmbolo, 2, a uma taxa controlada em um pistão encaixado em uma célula de fiação 3. A célula de fiação pode conter conjuntos de filtro. Um conjunto de filtro adequado inclui telas de aço inoxidável de malha 100 e 325. Um bloco de fiação, 4 contém a fieira 5, e opcionalmente telas de aço inoxidável como pré-filtros para a fieira. O filamento extrudado 6, dali produzido é direcionado a um banho de coagulação líquida 7. Em todos os exemplos listados na tabela 1 o filamento foi extrudado a partir da fieira diretamente no banho de coagulação líquido – o fundo da fieira foi imerso no banho.

[059] O extrudado pode ser, mas não precisa ser, direcionado para lá e para cá através da via entre guias 8, que são normalmente fabricadas por Teflon® PTFE. Apenas um passa pelo banho mostrado na figura 1. Na saída do banho de coagulação, 7, o filamento assim revenido 9, pode ser opcionalmente direcionado através de uma zona de trefilação utilizando-se um rolo

independentemente acionado 10, em torno do qual o filamento assim revenido é embalado. O filamento revenido pode opcionalmente ser direcionado através de um banho de extração 11, que permite posterior tratamento tal como extração de solvente adicional, lavagem ou trefilação dos filamentos extrudados. O filamento assim preparado é em seguida direcionado através de um mecanismo de atravessamento 12, para distribuir uniformemente a fibra sobre a bobina e coletado em bobinas plásticas utilizando-se um enrolamento 13. Em uma concretização, o processo compreende uma pluralidade de rolos independentemente acionados.

[060] Em uma concretização, o rolo acionado, 10, é removido da trajetória de fibra mas a fibra é no entanto imersa no banho de extração. Os dois são independentes entre si. Em todos os exemplos acima o rolo acionado 10, foi removido da trajetória de fibra.

[061] Em uma concretização, uma pluralidade de filamentos é extrudada através de uma fieira multi-furos e os filamentos assim produzidos são convergentes para formar um fio. Em uma outra concretização, o processo compreende uma pluralidade de fieiras multi-furos de forma que uma pluralidade de fios possa ser preparada ao mesmo tempo.

[062] Em cada exemplo, a bobina enrolada de fibra produzida foi impregnada durante a noite em uma caneca do líquido indicado na tabela 1. A bobina impregnada de fibra foi em seguida secada a ar por pelo menos 24 horas. As propriedades de tração de fibra foram então determinadas de acordo com a norma ASTM D2101-82.

[063] A célula de fiação, o pistão, os tubos conectores e a fieira foram todos feitos de aço inoxidável.

MEDIÇÃO DE PROPRIEDADE FÍSICA DE FIBRA

[064] Propriedades físicas tais como tenacidade, elongação e modulo inicial foram medidos utilizando-se métodos e instrumentos de acordo com a norma ASTM padrão D 2101-82, exceto que o comprimento do corpo de teste era

de 10 polegadas. Resultados indicados são medias em relação a 3 a 5 testes de fio individuais.

[065] As propriedades físicas foram determinadas para cada fibra preparada. Os resultados são mostrados na tabela 1. Estão incluídos o denier da fibra produzida, e as propriedades físicas tais como tenacidade (T) em gramas por denier (gpd), elongação a ruptura (E, %), e módulo inicial (M) em gpd.

GLOSSARIO DE TERMOS

Etiqueta de coluna	Período atual	Explanação
Veloc.jato (fpm)	Velocidade de jato	A velocidade linear da fibra na saída da fieira.
fpm	Pés por minuto	
Coag.	Coagulação	
Temp.	Temperatura	
NA	Não aplicável	O parâmetro não se aplica a este exemplo.
NT	Não testado	
S.S.F.	Fator de estiramento de fiação	S.S.F. = (velocidade de enrolamento)/(veloc.jato)
MeOH	Metanol	

MATERIAIS

Ingrediente	No. estoque	Fonte
Sucrose	BDH8029	VWR
Glicose	G7528	Sigma-Aldrich
Dextran T-10	D9260	Sigma-Aldrich
Ácido bórico	B6768	Sigma-Aldrich
NaOH	SX0590-1	EMD

EXEMPLO 1**PREPARAÇÃO DO POLÍMERO P1**

[066] Vinte litros de solução aquosa foram preparados pela combinação de 1000g de sucrose (VWR #BDH8029), 20 g de Dextran T-10 (Sigma #D9260), e 370.98 g de ácido bórico (Sigma #B6768) foram combinados em aproximadamente 18 l de água. 4N de solução NaOH (EMD #SX0590-1) foram empregados para ajustar o pH para 7.5. Água adicional foi em seguida adicionada para elevar o volume total para até 20 litros. A solução assim preparada foi então introduzida com 180 ml de extrato de enzima preparado *supra* e deixado descansar sob temperatura ambiente por 48 horas. Os sólidos poli(α (1 \rightarrow 3) glucano) resultantes foram coletados em um funil de Büchner utilizando-se uma tela de malha 325 sobre papel de filtro de 40 micrômetros. A torta de filtro foi lavada com água desionizada e filtrada conforme acima. A lavagem com água desionizada foi repetida mais três vezes. Finalmente duas lavagens com metanol foram realizadas; a torta de filtro foi prensada no funil e secada a vácuo sob temperatura ambiente. Rendimento: 237.68 gramas de sólidos fratura escamosa branca.

[067] Pesos moleculares foram determinados por

cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) com um cromatógrafo GPCV/LS 2000TM (Waters Corporation, Milford, MA) equipado com duas colunas Zorbax PSM Bimodal-s silica (Agilent, Wilmington, DE), utilizando-se DMAc da J.T Baker, Phillipsburg, NJ com 3.0% LiCl (Aldrich, Milwaukee, WI) como fase móvel. Amostras foram dissolvidas em DMAc com 5.0% LiCl. Pesos moleculares médios ponderados e numéricos (M_n e M_w) foram de 139,000 e 279,000 Daltons respectivamente.

EXEMPLO 1 SOLUÇÃO DE FIAÇÃO

[068] Um frasco de vidro de gargalo grande de 250 mL foi carregado com 25 g de polímero P1 e 225 g de 5% em peso de hidróxido de sódio. CS₂, (7.5 g), foi em seguida adicionado por uma seringa. O recipiente foi encaixado a uma tampa e a um septo através do qual tinha sido encaixada uma vareta de agitação de polipropileno. Os conteúdos foram manualmente misturados com a vareta de agitação e em seguida deixados descansar sob temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte a solução parcialmente dissolvida (límpida porém contendo uma pequena quantidade de particulados visíveis) foi transferida para uma célula de fiação e pistão contendo pacotes de tela incluindo telas de aço inoxidável de malha 100 e 325. Um pistão foi encaixado sobre a mistura viscosa. A mistura foi em seguida bombeada em vai e vem por 13 ciclos utilizando-se uma unidade de engrenagem motorizada em uma célula de fiação equida de forma idêntica acoplada contiguamente com a primeira célula via um acoplador feito de tubos de aço inoxidável de ¼ polegada.

EXEMPLOS 2 – 4: FIAÇÃO DE FIBRA

Aproximadamente 20 horas após a preparação da solução do exemplo 1, a solução assim preparada foi introduzida no equipamento de fiação conforme descrito *supra*, com relação à figura 1. A solução foi introduzida em uma fieira de 20 furos sendo que cada fura era

caracterizado por uma seção transversal circular com diâmetro de 0.003 pol. e de comprimento 0.006 pol. A tabela 1 mostra as condições de fiação que foram usadas para as fibras preparadas nos exemplos 2 – 4. O equipamento descrito na figura 1, conforme acima descrito, foi modificado pela remoção do rolo acionado, **10**, da trajetória de filamento nos exemplos 1-3. O estiramento de fiação indicado foi obtido pela operação do enrolamento mais rápida do que a velocidade de jato. A solução de exemplo 1 foi dosimetrada nas taxas mostradas na tabela 1 através de um pacote de fiação com um conjunto de filtros consistindo em telas de 100 e 325de malha na fieira. A fieira foi imersa em um banho de coagulação com água contendo, em peso 8% de H_2SO_4 , 23% de Na_2SO_4 , e 0.5% de $ZnSO_4$. O filamento foi extrudado diretamente no banho de resfriamento rápido verticalmente na temperatura indicada na tabela 1. Tempo de permanência adicional no banho de coagulação de 6 pés de comprimento foi aumentado pelo direcionamento da fibra sobre os pinos de guia adicional (**8**) para uma distância de imersão total de 4.1 ou 11 pés como indicado. Nos exemplos 2 e 3, após remoção do banho de coagulação os filamentos assim coagulados foram direcionados a um enrolamento de velocidade controlada com uma guia de atravessamento em velocidades de enrolamento mostradas na tabela 1. No exemplo 4 os filamentos coagulados foram direcionados a um Segundo banho de metanol para os comprimentos e a temperatura indicados na tabela 1. Em cada exemplo, muitas centenas de fios de fibra foram enrolados em uma bobina. Após o enrolamento, as bobinas de fibra de exemplos 2 – 4, foram impregnadas sequencialmente respectivamente em banhos de 5% de $NaHCO_3$, $MeOH$, e H_2O por um período de aproximadamente 4 horas respectivamente. A fibra foi deixada secar a ar antes de ser submetida a medições físicas. Propriedades físicas foram determinadas: resultados são mostrados na tabela 1.

TABELA 1

Exemplo	Polímero ref.	% de sólidos de glucano	Taxa de bombeamento (ml/min)	Vel.jato (fpm)	Coagulação / Banho			Segundo banho			Vel.enrolamento (fpm)	S.S.F.	T (gpd)	E (%)	M (gpd)	DENIER
					Composição N	Compr. (ft)	T (°C)	Composição	Compr. (ft)	T(°C)						
2	P1	9.7	1.60	56	8% H ₂ SO ₄ 23% Na ₂ SO ₄ 0.5% ZnSO ₄	11	51	NA	NA	NA	126	2.3	1.0	3.7	60.2	40
3	P1	9.7	1.60	56	8% H ₂ SO ₄ 23% Na ₂ SO ₄ 0.5% ZnSO ₄	11	51	NA	NA	NA	100	2.3	1.2	4.9	60.5	75
4	P1	9.7	1.60	56	8% H ₂ SO ₄ 23% Na ₂ SO ₄ 0.5% ZnSO ₄	4.1	51	MeOH	2.25	17	63	1.1	1.1	6.8	52.8	80.0
6	P2	7.3	1.50	55	5% H ₂ SO ₄	3	21	NA	NA	NA	61	1.1	1.0	3.8	65.6	55

Exemplo	Polímero ref.	% de sólidos de glucano	Taxa de bombeamento (ml/min)	Vel.jato (fpm)	Coagulação / Banho			Segundo banho			Vel.enrolamento (fpm)	S.S.F.	T (gpd)	E (%)	M (gpd)	DENIER
					Composição N	Compr. (ft)	T (°C)	Composição	Compr. (ft)	T(°C)						
7	P2	7.3	1.50	55	5% H ₂ SO ₄	3	21	MeOH	2.00	21	61	1.1	0.9	4.5	48.2	75
8	P2	7.3	1.50	55	5% H ₂ SO ₄	3	22	MeOH	2.00	23	82	1.5	1.1	4.2	64.6	47
9	P2	7.3	1.50	55	5% H ₂ SO ₄	3	24	MeOH	0.50	24	104	1.9	1.0	2.8	60.4	42
10	P2	7.3	1.50	55	Glacial Acetic	4.3	25	MeOH	1.80	26	57	1.0	1.2	5.4	70.4	60
11	P2	7.3	1.50	55	50/50 Acetic acid/H ₂ O v/v	4.3	25	MeOH	1.80	26	56	1.0	1.0	2.5	62.7	70.0
13	P2	9.85	1.50	55	5% H ₂ SO ₄	4	24	NA	NA	NA	50	0.9	0.8	3.7	50.7	115
14	P2	9.85	1.50	55	5% H ₂ SO ₄	3.5	24	MeOH	1.15	25	60	1.1	1.3	4.7	71.4	75
15	P2	9.85	1.50	55	5% H ₂ SO ₄	3	24	MeOH	1.30	26	80	1.5	1.1	3.8	73.2	60

Exemplo	Polímero ref.	% de sólidos de glucano	Taxa de bombeamento (ml/min)	Vel.jato (fpm)	Coagulação / Banho			Segundo banho			Vel.enrolamento (fpm)	S.S.F.	T (gpd)	E (%)	M (gpd)	DENIER
					Composição N	Compr. (ft)	T (°C)	Composição	Compr. (ft)	T(°C)						
17	P3	7.33	2.10	75	5% H ₂ SO ₄	4.3	12	NA	NA	NA	72	1.0	1.3	5.1	81	75
18	P3	7.33	2.10	75	5% H ₂ SO ₄	4.3	15	MeOH	1.5	17	72	1.0	N/A	N/A	N/A	N/A
19	P3	7.33	2.10	75	5% H ₂ SO ₄	4.3	16	MeOH	1.5	16	89	1.2	N/A	N/A	N/A	N/A
20	P3	7.33	1.60	50	10% H ₂ SO ₄	4.3	17	NA	NA	NA	76	1.5	1.7	4.4	102	45
21	P3	7.33	1.60	50	10% H ₂ SO ₄	4.3	18	NA	NA	NA	100	2.0	N/A	N/A	N/A	N/A
22	P3	7.33	1.60	50	10% H ₂ SO ₄	4.3	18	MeOH	1.9	13	62	1.2	N/A	N/A	N/A	N/A
23	P3	7.33	1.60	50	10% H ₂ SO ₄	4.3	19	H ₂ O	1.66	45	33	0.7	1.8	5.3	85	115
25	P3	13	1.28	45	10% H ₂ SO ₄	4.2	24	NA	NA	NA	51	1.1	N/A	N/A	N/A	N/A

Exemplo	Polímero ref.	% de sólidos de glucano	Taxa de bombeamento (ml/min)	Vel.jato (fpm)	Coagulação / Banho			Segundo banho			Vel.enrolamento (fpm)	S.S.F.	T (gpd)	E (%)	M (gpd)	DENIER
					Composição N	Compr. (ft)	T (°C)	Composição	Compr. (ft)	T(°C)						
26	P3	13	1.28	45	10% H ₂ SO ₄	4.2	22	H ₂ O	1.83	80	27	0.6	N/A	N/A	N/A	N/A
27	P3	13	1.28	45	10% H ₂ SO ₄	4.2	22	H ₂ O	1.83	80	50	1.1	N/A	N/A	N/A	N/A
28	P3	13	1.28	45	10% H ₂ SO ₄	4.2	21	NA	NA	NA	72	1.6	N/A	N/A	N/A	N/A
29	P3	13	3.20	110	10% H ₂ SO ₄	4.2	20	NA	NA	NA	58	0.5	N/A	N/A	N/A	N/A
30	P3	13	3.20	110	10% H ₂ SO ₄	4.2	20	H ₂ O	1.67	80	58	0.5	N/A	N/A	N/A	N/A
31	P3	13	0.24	38	Acético glacial	4.2	24	NA	NA	NA	28	0.7	N/A	N/A	N/A	N/A

NA = Não aplicável N/A = não disponível

EMPLOS 5-11**PREPARAÇÃO DE POLÍMERO P2YY**

[069] Polímero de Poli(α (1 \rightarrow 3) glucano) foi sintetizado, lavado e isolado utilizando-se os materiais e procedimentos empregados para a preparação do Polímero P1 no exemplo 1 exceto que 200 ml do extrato de enzima foi adicionado à solução de sucrose/dextrano/ácido bórico de pH ajustado ao invés de 180 ml. Rendimento: 246.08 gramas de sólidos escamosos brancos.

[070] Mn e Mw foram determinados conforme para o polímero P1 para ser 129,000 e 270,000 respectivamente.

EXEMPLO 5: SOLUÇÃO DE FIAÇÃO

[071] Um frasco de gargalo largo de 250 mL de vidro foi carregado com 18 g de polímero P2 e 225 g de 4.5% em peso hidróxido de sódio. CS₂, (2.7 g), foi então adicionado por seringa. O recipiente foi equipado com uma tampa e um septo através do qual foi encaixada uma vareta de agitação de polipropileno. Os conteúdos foram manualmente misturados com a vareta de agitação e em seguida deixados sob temperatura ambiente durante a noite. Após 72 horas a solução parcialmente dissolvida foi transferida para uma célula de fiação e pistão contendo blocos de tela incluindo telas de aço inoxidável de malha 325. Um pistão foi encaixado sobre a mistura viscosa. A mistura foi em seguida bombeada para lá e para cá por 13 ciclos com uso de uma unidade de engrenagem motorizada em uma célula de fiação equipada de modo idêntico contiguamente acoplada à primeira célula via um acoplador feito de tubos de aço inox de $\frac{1}{4}$ de polegadas.

EXEMPLOS 6 – 11:FIAÇÃO DE FIBRA

[072] As fibras dos exemplos 6 – 11 foram fiadas a partir da solução de fiação do exemplo 5, tal como as fibras dos exemplos 2 – 4, *supra*, sob as condições mostradas na tabela 1. Nos exemplos 6 – 9, o filamento foi

extrudado diretamente em um banho de coagulação contendo 5% de H₂SO₄ (aq.). No exemplo 10, a fibra foi extrudada diretamente em um banho de coagulação contendo ácido acético glacial. No exemplo 11, em 50/50 ácido acético / água (v/v) comprimento adicional no banho de coagulação foi fornecido pelo direcionamento da fibra sobre pinos de guia adicionais (**8**) para uma distância de imersão total de 3, 4.3, ou 4.5 pés. Nos exemplos, 7 – 11, mas não no exemplo 6, após remoção do banho de coagulação, o filamento assim coagulado foi direcionado através de um segundo banho (**11**) de metanol em comprimentos e temperaturas indicadas na tabela 1. A fibra do exemplo 6 foi guiada diretamente ao enrolamento. Do Segundo banho, as fibras coaguladas dos exemplos 7 – 11 foram direcionadas para o enrolamento nas velocidades de enrolamento mostradas na tabela 1. As bobinas de fibra foram impregnadas como nos exemplos 2 – 4.

[073] Propriedades físicas foram determinadas; resultados são mostrados na tabela 1.

EXEMPLOS 12 - 15

EXEMPLO 12 SOLUÇÃO DE FIAÇÃO

[074] Um frasco de vidro de gargalo largo de 250 mL foi carregado com 20 g de Polímero P2 e 180 g de 4.5% em peso de hidróxido de sódio. CS₂, (3.0 g), foi então adicionado por seringa. O recipiente foi equipado com uma tampa e um septo através do qual uma vareta de agitação foi encaixada. Os conteúdos foram manualmente misturados com a vareta de agitação plástica e em seguida deixados descansar por 2 dias. A solução parcialmente dissolvida foi transferida para um cilindro de aço inox de 300 mL equipado telas de aço inox com malha 2x 100, malha 1x 325 e 2x 20. Um pistão foi encaixado sobre a mistura viscosa. A mistura foi em seguida bombeada para lá e para cá por 13 ciclos com uso de uma unidade de engrenagem motorizada em uma célula de fiação equipada de modo idêntico

contiguamente acoplada à primeira célula via um acoplador feito de tubos de aço inox de 1/4 .

EXEMPLOS 13 – 15: FIAÇÃO DE FIBRA

[075] As fibras dos exemplos 13 – 15 foram fiadas a partir da solução de fiação do exemplo 12 tal como as fibras dos exemplos 2 – 4, *supra*, sob as condições mostradas na tabela 1. As fibras foram extrudadas diretamente em 5% de H₂SO₄ (aq.) na temperatura indicada na tabela 1. As fibras assim coaguladas após remoção do banho de coagulação foram direcionadas ao enrolamento nas velocidades de enrolamento mostradas na tabela 1. As fibras coaguladas dos exemplos 14 e 15 foram primeiramente passadas pelo Segundo banho conforme indicado na tabela 1. As bobinas de fibra foram impregnadas e secadas conforme nos exemplos 2 – 4.

[076] Propriedades físicas foram determinadas; resultados estão mostrados na tabela 1.

EXEMPLO 16

PREPARAÇÃO DO POLÍMERO P3

[077] Polímero de Poli(α(1→3) glucano) foi sintetizado, lavado, e isolado com uso dos materiais e procedimentos empregados para a preparação do Polímero P1 no exemplo 1 exceto que 200 ml do extrato de enzima foi adicionado à solução de sucrose/dextrano/ácido bórico de pH ajustado ao invés de 180 ml. Rendimento: 228.52 gramas de sólidos escamosos brancos. M_n foi 132,000 Daltons; M_w foi 301,000 Daltons.

EXEMPLO 16 SOLUÇÃO DE FIAÇÃO

[078] Um frasco de vidro de gargalo largo de 250 mL foi carregado com 18 g de polímero P3 e 225 g de 4.5% em peso hidróxido de sódio. O recipiente foi equipado com uma tampa e um septo através do qual foi encaixada uma vareta de agitação de polipropileno. Os conteúdos foram manualmente misturados com a vareta de agitação e em seguida deixados sob

temperatura ambiente durante a noite. CS₂, (5.4 g), foi então adicionado por seringa na manha seguinte. Após a adição de CS₂ a solução parcialmente dissolvida foi imediatamente transferida para uma célula de fiação e pistão contendo blocos de tela incluindo telas de aço inoxidável de malha 325. Um pistão foi encaixado sobre a mistura viscosa. A mistura foi em seguida bombeada para lá e para cá por 13 ciclos com uso de uma unidade de engrenagem motorizada em uma célula de fiação equipada de modo idêntico contiguamente acoplada à primeira célula via um acoplador feito de tubos de aço inox de 1/4.

EXEMPLOS 17-23 FIAÇÃO DE FIBRA

[079] A tabela 1 fornece as condições de fiação que foram usadas para as fibras preparadas nos exemplos 17-23. O equipamento descrito na figura 1, conforme acima descrito foi modificado pela remoção do rolo acionado, **10**, da trajetória de filamento. O estiramento de fiação foi obtido pela operação do enrolamento mais rápida do que a velocidade de jato. A solução de fiação assim preparada foi dosimetrada nas taxas mostradas na tabela 1 através de um bloco de fiação com um conjunto de filtros consistindo em telas de aço inoxidável de malha 100 e 325 a uma fieira com 20 furos com diâmetro de 003 polegadas e furos comprimento de .006 polegadas. O filamento foi extrudado diretamente em 5% H₂SO₄ por exemplo 17-19 e 10% de H₂SO₄ por exemplo 20-23 na temperatura de banho de coagulação mostrada na tabela 1. Após remoção do banho de coagulação o filamento assim coagulado foi direcionado através de um Segundo banho (**11**) de metanol em comprimentos e temperaturas mostrados na tabela 1,e dai par ao enrolamento. Os filamentos dos exemplos 17, 20, e 21 foram guiados diretamente até o enrolamento. O segundo banho no caso do exemplo 23 foi preenchido com água. A fiação de fibra foi completada em 8 horas a partir da adição de disulfito de carbono.

[080] As bobinas de fibra foram impregnadas em in 5% de

NaHCO_3 por 15 minutos, em seguida impregnadas em água durante a noite. As bobinas foram em seguida removidas e deixadas para secar ao ar antes de serem submetidas a medições físicas.

EXEMPLO 24

SOLUÇÃO DE FIAÇÃO

[081] Um frasco de vidro de gargalo largo de 250 mL foi carregado com 32.9 g de polímero P3 e 220 g de 5% em peso hidróxido de sódio. O recipiente foi equipado com uma tampa e um septo através do qual foi encaixada uma vareta de agitação de polipropileno. Os conteúdos foram manualmente misturados com a vareta de agitação e em seguida deixados sob temperatura ambiente durante a noite. CS_2 , (9.9 g), foi então adicionado por seringa na manhã seguinte. Após a adição de CS_2 a solução parcialmente dissolvida foi imediatamente transferida para uma célula de fiação e pistão contendo blocos de tela incluindo telas de aço inoxidável de malha 325. Um pistão foi encaixado sobre a mistura viscosa. A mistura foi então bombeada para lá e para cá por 11 ciclos com uso de uma unidade de engrenagem motorizada em uma célula de fiação equipada de modo idêntico acoplada contiguamente com a primeira célula via um acoplador feito de tubos de aço inoxidável de $\frac{1}{4}$ de polegada.

EXEMPLOS 25- 31

FIAÇÃO DE FIBRA

[082] A tabela 1 fornece as condições de fiação que foram usadas para as fibras preparadas nos exemplos 25-31. O equipamento descrito na figura 1, conforme descrito acima, foi modificado pela remoção do rolo acionado, **10**, da trajetória de filamento nos exemplos 25-27. Estiramento de fiação foi obtido pela operação do enrolamento mais rápida do que a velocidade de jato. A solução de fiação assim preparada foi dosimetrada nas taxas mostradas na tabela 1 através de um bloco de

fiação com um conjunto de filtro consistindo em telas de aço inoxidável de malha q00 e 325 para uma fieira de 20 furos com diâmetro de .003 polegada e furos de comprimento de .006 polegadas. O filamento foi extrudado diretamente em 10% de H₂SO₄ nos exemplos 25-30 e ácido acético glacial no exemplo 31 na temperatura de banho de coagulação mostrada na tabela 1. Após remoção do banho de coagulação os filamentos assim coagulados dos exemplos 26, 27, e 30 foram direcionados através de um segundo banho (11) de água em comprimentos e temperaturas mostradas na tabela 1, e dai para o enrolamento. Os filamentos dos exemplos 25, 28, 29, e 31 foram guiados diretamente ao enrolamento e não foram passados pelo segundo banho. A fiação de fibra foi completada em 8 horas a partir da adição de dissulfito de carbono à solução de fiação.

[083] As bobinas de fibra foram impregnadas em 5% de NaHCO₃ durante a noite, e em seguida impregnadas em água por mais um dia. As bobinas foram removidas e deixadas secar ao ar antes de serem submetidas a medições físicas.

EXEMPLOS 32 - 44, E EXEMPLOS COMPARATIVOS A - W

[084] 36 soluções foram preparadas para definir os parâmetros de solução que resultaram em soluções adequadas para a fiação de fibra. Para cada um dos exemplos 32-44 e exemplos comparativos A - W, frascos de vidro de 40 ml foram carregados com o hidróxido de metal alcalino aquoso mostrado na tabela 2. A concentração da solução de hidróxido de metal alcalino em % em peso e a quantidade daquela solução de hidróxido de metal alcalino também aparecem indicados na tabela 2. 2 g de Polímero P1 foram então adicionados a cada frasco. Dissulfito de carbono (CS₂) foi adicionado na quantidade mostrada na tabela 2 e o frasco foi equipado com um septo através do qual foi

encaixada uma vareta de agitação de polipropileno. Os conteúdos foram manualmente misturados com o agitador plástico e foram deixados descansar sob temperatura ambiente por pelo menos 12 horas com mistura intermitente. As designações de solubilidade na tabela 2 foram determinadas por inspeção visual. Uma solução límpida foi considerada completamente dissolvida; uma solução límpida com algumas partículas pequenas que flutuam em redor também foi considerada dissolvida; considerou-se que uma solução parcialmente dissolvida poderia ser levada à completa dissolução sob mistura mais intensa. Uma solução turva com bastante partículas não dissolvidas foi considerada não dissolvida.

TABELA 2

Exemplo #	[NaOH]	Solução NaOH peso (g)	CS ₂ (g)	Sólidos de glucano (%)	Solubilidade
32	4.5% em peso	25,00	1,8	6,94	Sol
33	4.5% em peso	18,00	1,8	9,17	Sol
34	4.5% em peso	14,75	1,8	10,78	Sol
35	4.5% em peso	25,00	0,6	7,25	Sol
36	4.5% em peso	18,00	0,6	9,71	Sol
37	4.5% em peso	14,75	0,6	11,53	Sol
38	4.5% em peso	25,00	0,3	7,33	Sol
39	4.5% em peso	18,00	0,3	9,85	Sol
40	4.5% em peso	14,75	0,3	11,73	Sol
41	5% em peso	25,00	1,8	6,94	Sol
Ex.comparativo A	5% em peso	18,00	1,8	9,17	Ins
Ex.comparativo B	5% em peso	14,75	1,8	10,78	Ins
42	5% em peso	25,00	0,6	7,25	Sol
Ex.comparativo C	5% em peso	18,00	0,6	9,71	Ins
Ex.comparativo D	5% em peso	14,75	0,6	11,53	Ins
43	5% em peso	25,00	0,3	7,33	Sol
44	5% em peso	18,00	0,3	9,85	Sol
Ex.comparativo E	5% em peso	14,75	0,3	11,73	Ins
Ex.comparativo F	6% em peso	25,00	1,8	6,94	Ins
Ex.comparativo G	6% em peso	18,00	1,8	9,17	Ins
Ex.comparativo H	6% em peso	14,75	1,8	10,78	Ins

Exemplo #	[NaOH]	Solução NaOH peso (g)	CS ₂ (g)	Sólidos de glucano (%)	Solubilidade
Ex.comparativo I	6% em peso	25,00	0,6	7,25	Ins
Ex.comparativo J	6% em peso	18,00	0,6	9,71	Ins
Ex.comparativo K	6% em peso	14,75	0,6	11,53	Ins
Ex.comparativo L	6% em peso	25,00	0,3	7,33	Ins
Ex.comparativo M	6% em peso	18,00	0,3	9,85	Ins
Ex.comparativo N	6% em peso	14,75	0,3	11,73	Ins
Ex.comparativo O	7.5% em peso	25,00	1,8	6,94	Ins
Ex.comparativo P	7.5% em peso	18,00	1,8	9,17	Ins
Ex.comparativo Q	7.5% em peso	14,75	1,8	10,78	Ins
Ex.comparativo R	7.5% em peso	25,00	0,6	7,25	Ins
Ex.comparativo S	7.5% em peso	18,00	0,6	9,71	Ins
Ex.comparativo T	7.5% em peso	14,75	0,6	11,53	Ins
Ex.comparativo U	7.5% em peso	25,00	0,3	7,33	Ins
Ex.comparativo V	7.5% em peso	18,00	0,3	9,85	Ins
Ex.comparativo W	7.5% em peso	14,75	0,3	11,73	Ins

EXEMPLO 45: DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DE XANTATO DE GLUCANO E

DECOMPOSIÇÃO COM USO DE ESPECTROSCOPIA NMR

[085] 2 g de poli(α(1→3) glucano) foram dissolvidos em 25 ml de hidróxido de sódio aquoso (4.5% em peso). Após completar a dissolução , 0.6 g de dissulfito de carbono foram adicionados e a mistura assim formada foi em seguida mecanicamente agitada e imediatamente transferida com uso de uma seringa e agulha em um tubo de amostra OD de 4.1 mm especial vendido pela New Era Enterprises, Inc. O tubo foi capeado e reduzido a um tubo NMR de 5 mm. 7 polegadas padrão que continha 60µL de D₂O como solvente de bloqueio NMR. Esses tubos concêntricos foram colocados em uma pequena centrífuga, de bancada e fiados por vários minutos para levar a amostra até o fundo do tubo interno e para eliminar todas as bolhas de ar da amostra. Os tubos NMR foram removidos da centrífuga e colocados no magneto de um espetrômetro Bruker 500 MHz Avance II equipado com uma criosonda 5mm CPDUL com gradientes z. A sonda foi sintonizada e o magneto foi calçado

antes de dar início à série de testes consecutivos para investigar a formação e degradação de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano). Cada teste foi adquirido com uso de sequência de pulso zgig Bruker com largura espectral de 33333.3 Hz (265.0 ppm), deslocamento de transmissor de 160 ppm, e pontos de domínio de tempo 32768 para um tempo de aquisição de 0.4916 segundos. Um atraso de 3 segundos foi usado entre pulsos e 3000 varreduras foram adquiridas para cada teste fornecendo um tempo total de 2 horas e 56 minutos para cada teste.

[086] Para suprimir um rolo de linha de base e obter integrais e pico melhores os dados digitais de cada teste foram convertidos em dados análogos de forma que pudesse ser feita uma predição linear retroativa. Os primeiros 12 pontos de cada jogo de dados foram recolocados com uso de processamento de dados de predição linear de Bruker com base nos primeiros 1024 pontos de dados. O decaimento de indução livre também foi multiplicado por uma função exponencial 2.0 Hz antes de ser transformado. Para determinar o grau de substituição de xantato a área integral para o carbono de xantato centrada em 232.5 ppm, foi comparada à área integral (ajustada para 1.00) para os carbonos anoméricos de glucano C1 e 95.6 – 100.9 ppm, usados como calibração interna. Em nenhum ponto desta série de testes observou-se sinal para o ^{13}C de CS_2 livre (193.7ppm) embora estivessem presentes sinais de tritiocarbonato de sódio (269.4ppm) e carbonato de sódio (168.4ppm) como subprodutos da degradação de xantato de glucano no curso do tempo.

Resultados são mostrados na Tabela 3.

TABELA 3

Tempo transcorrido (hs.)	grau de xantogenação
0	0,64 (est.)
3	0,61

Tempo transcorrido (hs.)	grau de xantogenação
6	0,52
12	0,43
24	0,23
36	0,15
54	0,04

REIVINDICAÇÕES

1. SOLUÇÃO, caracterizada por compreender 0,75 a 2 molar de hidróxido de metal alcalino aquoso e um teor de sólidos de 5 a 20% em peso de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado; sendo que o peso molecular numérico ponderal do poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado é de pelo menos 10.000 Da; em que pelo menos 90% em mol das unidades de repetição no poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado são unidades de repetição de glicose e pelo menos 50% das ligações entre as unidades de repetição de glicose são ligações de glicose $\alpha(1\rightarrow3)$, e sendo que o grau de xantogenação do poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) situa-se na faixa de 0,1 a 1.

2. SOLUÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo teor de sólidos de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado situar-se na faixa de 7,5 a 15%.

3. SOLUÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo hidróxido de metal alcalino ser NaOH.

4. SOLUÇÃO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pela concentração de NaOH ser de 1.0 a 1.7 molar.

5. SOLUÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por no poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado 100% das ligações entre unidades de repetição de glicose serem ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ glicosídeo.

6. SOLUÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo peso molecular numérico ponderal do poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) xantado situar-se na faixa de 40.000 – 100.000 Da.

7. PROCESSO, caracterizado por compreender a formação de uma solução por dissolução em 0,75 a 2 molar de hidróxido de metal alcalino aquoso, CS₂, e 5 a 15% em peso do peso total da solução resultante de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano, apresentando um peso molecular numérico ponderal de pelo menos 10.000 Da, em que pelo menos 90% em mol das unidades de

repetição no poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) são unidades de repetição de glicose e pelo menos 50% das ligações entre as unidades de repetição de glicose são ligações de glicose $\alpha(1\rightarrow3)$, fazendo com que dita solução escoe através de uma fieira, formando assim uma fibra; e colocando em contato a dita fibra com um coagulante líquido acídico; sendo que em dito processo a razão em peso de CS₂ para poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) situa-se na faixa de 0,1 a 1,0.

8. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por de 7,5 a 15% em peso de poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) estar dissolvido em dita solução.

9. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo hidróxido de metal alcalino ser NaOH.

10. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pela concentração de NaOH ser 1,0 a 1,7 molar.

11. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por no poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) 100% das unidades de repetição serem glicose, e 100% das ligações entre unidades de repetição serem ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ glicosídeo.

12. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por também compreender permitir a solução descansar por um período de 1 a 8 horas antes da fiação.

13. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o poli($\alpha(1\rightarrow3)$ glucano) apresentar um peso molecular numérico ponderal na faixa de 40.000 – 100.000 Da.

14. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo CS₂ ser adicionado por último.

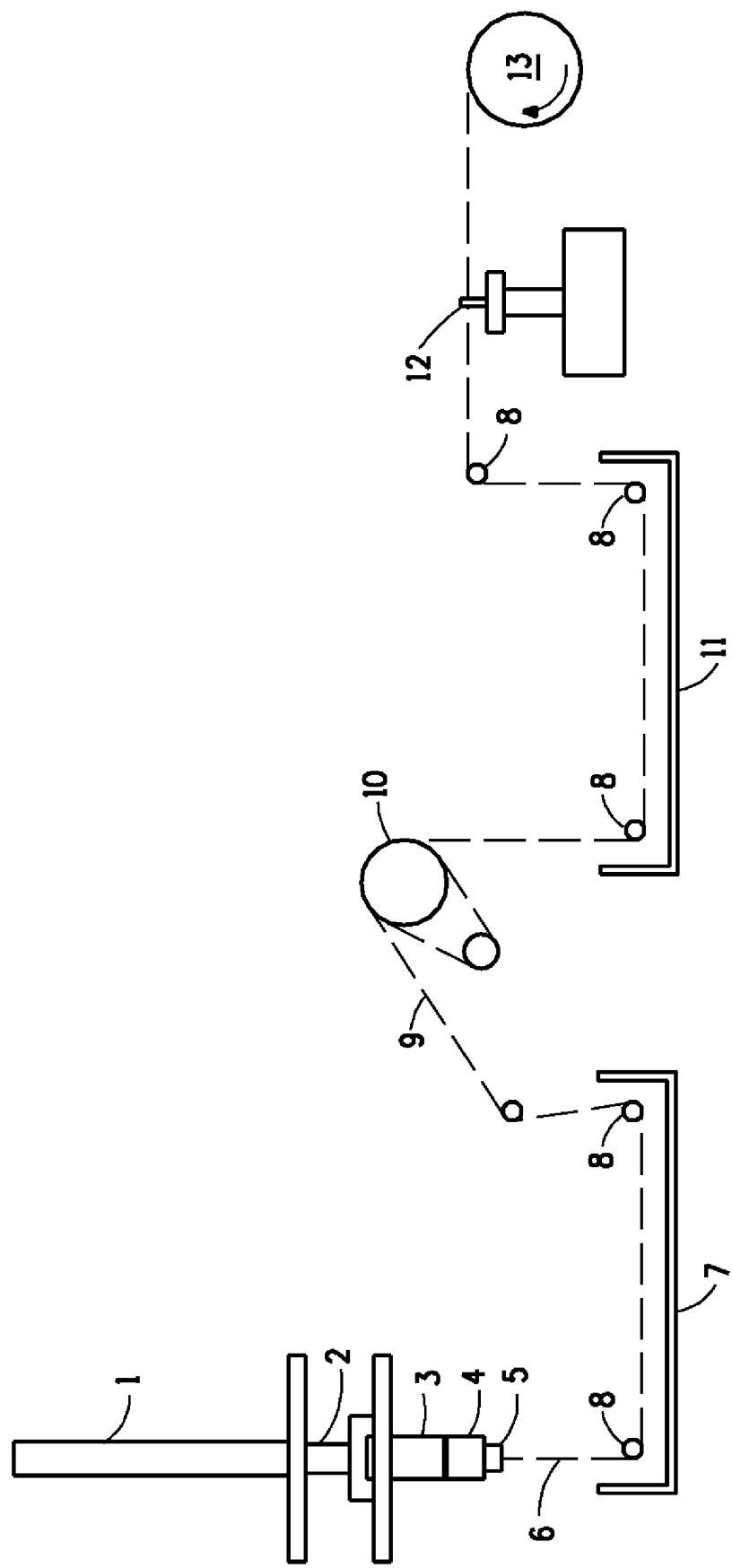


Fig. 1