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

(21) **PI0710065-5 A2**

BRPI0710065A2

(22) Data de Depósito: 23/03/2007
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)

(51) Int.Cl.:
C12M 1/40 2006.01
C12P 7/64 2006.01

(54) Título: **MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS EM UMA COLUNA DE LEITO CARREGADO REGENERADO CONTINUAMENTE**

(30) Prioridade Unionista: 31/03/2006 EP 06006835.0

(73) Titular(es): Cargill, Incorporated

(72) Inventor(es): Andrew James Dell, Esther Hendrika Gerarda Peeters, Marcus Bernardus Kruidenberg

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007002596 de 23/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/112867de 11/10/2007

(57) Resumo: MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS EM UMA COLUNA DE LEITO CARREGADO REGENERADO CONTINUAMENTEA presente invenção refere-se a um processo para a modificação de um substrato que compreende passar o substrato através de uma coluna de leito carregado de um volume específico de enzima imobilizada, em que o substrato entra na coluna na ou próximo a uma extremidade da coluna (a "extremidade de entrada") e o substrato modificado sai na ou proximo à extremidade oposta da coluna (a "extremidade de saída"), uma parte do volume da enzima imobilizada é periodicamente removida na ou próximo à extremidade de entrada da coluna, e uma parte equivalente da enzima mobilizada é periodicamente adicionada na ou próximo à extremidade de saída da coluna.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS EM UMA COLUNA DE LEITO CARREGADO REGENERADO CONTINUAMENTE".**

As reações enzimáticas são usadas de forma crescente para o processamento de materiais em uma escala industrial. Uma etapa comercial importante foi o desenvolvimento de enzimas imobilizadas, isto é, enzimas que estejam fisicamente anexadas a um suporte sólido tanto através de absorção ou por ligações químicas - para facilitar a separação da enzima a partir da solução de reação. A imobilização também permite o uso múltiplo ou repetitivo das enzimas e quase sempre aumenta a estabilidade das enzimas.

Vários tipos de reatores são usados em conjunto com as enzimas imobilizadas: reatores de leito carregado (também referidos como reatores de leito fixo), reatores de leito fluidificado, reatores de batelada agitada, reatores de tanque continuamente agitado, e reatores de membrana. Na produção em grande escala, os reatores de leito carregado são comumente usados para aplicações específicas. Em tais reatores, a enzima imobilizada é embalada em uma coluna ou um leito plano enquanto correntes de substrato e de produto são bombeadas para dentro e para fora do reator, respectivamente. As vantagens principais deste tipo de reator são a adaptação fácil a grandes escalas, alta eficiência, baixos custos, facilidade de operação e também uma área de superfície aumentada por unidade de volume quando comparado a reatores de sistemas de membrana (conforme W.M. Willis e A.G. Marangoni, Enzymatic Interesterification, em: Food Lipids - Chemistry, Nutrition, e Biotechnology, editado por CC. Akoh and D.B. Min, páginas 839 a 875).

Um tipo de reação na qual o uso de enzimas como catalisadores se tornou crescentemente importante, em anos recentes na indústria de óleos e de gorduras é a interesterificação. A interesterificação é a troca de grupos de acila entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou entre dois ésteres (trans esterificação). As enzimas capazes de reações de interesterificação são as lípases tais como as hidrolases do éster de glicerol (EC 3.1.1.3). Essas enzimas são obtidas predominantemen-

te a partir de origens bacteriana, de levedura e de fungos. Esses micro-organismos secretam a lipase em seu ambiente para a digestão de materiais de lipídio para a subsequente absorção. Em um ambiente aquoso a lipase catalisa a hidrólise de triglicerídios para a produção de diaglicerídios, monoacilglicerídios, glicerol e ácidos graxos livres. No entanto, sob condições de limitação de água, também pode ser conseguida a reação reversa, a síntese de ésteres. Por esse motivo, a direção da reação pode ser manipulada através de regular a atividade da água. Em concentrações de água muito baixas predomina a síntese de ésteres, acima de um conteúdo de água de mais do que uns poucos porcentuais a hidrolise é a reação que prevalece, e entre elas, usualmente em um conteúdo de água de menos do que 1% (p/v) a trans-esterificação é mais eficaz.

Owusu-Ansar descreveu em 1994 o uso de lípases imobilizadas em um reator de tanque agitado para a produção em grande escala de equivalentes de manteiga de cacau através da interesterificação catalisada pela lipase (em: B.S. Carmail and Y. Kakuda (eds.) Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids, páginas 360 a 389).

Um processo de esterificação em leito carregado foi descrito no WO 83/03844 no qual triacilglicerídios são dissolvidos em um solvente polar orgânico. A lipase foi imobilizada através de precipitação sobre partículas de kieselguhr, hidroxiapatita ou alumina.

O WO 97/01632 está direcionado a outro processo para a imobilização de uma enzima, especificamente, uma lipase ou uma fosfolipase, para o processamento de óleos de triglicerídios.

A Unilever descreve também um processo em duas etapas para a produção de equivalentes da manteiga de cacau e Betapol com a utilização de colunas de leito carregado ((P. Quinlan & S. Moore, Inform 4, 580-585 (1993); A. Rozendaal & A.R. Macrae, in: F.D. Gansdone & F.B. Padlee (eds.) Lipid Technologies and Applications, 1997, páginas 223 a 263).

X. Xu descreve outros processos com lipases imobilizadas, entre os mesmos um reator de leito empacotado com uma capacidade de 10 kg por dia (em U.T. Bornscheuer, Enzymes in Lipid Modiciation, 2000, páginas

190 a 215).

Os reatores de leito carregado existentes sofrem de um problema de uma diminuição na taxa de conversão com o correr do tempo. Embora algumas enzimas tais como as lipases são bastante estáveis, a eficácia dos mesmos cai com o passar do tempo, o que resulta em taxas de reação mais baixas e qualidade de produto não uniforme. Esse abaixamento da qualidade pode ser contra-atacado através da diminuição da velocidade de fluxo aumentando PE meio disso o tempo de permanência dos reagentes no reator. Uma tal redução na velocidade de fluxo, no entanto, leva a uma taxa de produção não uniforme e embora ela possa reduzir as flutuações na qualidade do produto, ela não pode impedir as mesmas completamente. Alem do mais, esse processo quase sempre usa uma quantidade de reatores separados em série o que requer um controle de fluxo complexo com a finalidade de operar e manter o sistema. A presente invenção resolve esse e outros problemas relacionados através da utilização de um novo tipo de processo de coluna de leito carregado para a modificação enzimática de um substrato.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a um processo para a modificação de um substrato que compreende a passagem do substrato através de uma coluna de leito carregado de um volume específico de enzima imobilizada com um fluxo de substrato em uma direção e uma troca periódica da enzima imobilizada na direção oposta. O substrato entra na coluna no, ou próximo a uma das suas extremidades finais (a "extremidade de entrada") e o substrato modificado é descarregado no ou próximo a outra extremidade (a "extremidade de saída"). Uma parte do volume da enzima imobilizada é periodicamente removida a partir da extremidade de entrada da coluna, enquanto uma porção equivalente de enzima imobilizada é periodicamente adicionada na extremidade de saída, criando por meio disso um fluxo de enzima imobilizada na direção oposta do fluxo do substrato.

Sempre que, neste pedido de patente, é feita referência a "próximo à extremidade de entrada" ou "próximo à extremidade de saída", o ter-

mo "próximo" é destinado a implicar que material (como por exemplo, substrato, substrato modificado, enzima imobilizada) é carregado ou é descarregado a partir do reator (através de uma aberturam válvula ou similar) dentro de uma distância razoável a partir da referida extremidade, como determinado por uma pessoa versada na técnica. Essa pode ser, por exemplo, de 1 a 5% ou 10% do comprimento de uma coluna medido a partir da extremidade real da coluna referida. Ainda mais, expressões tais como "na extremidade" deve ser entendida como incluindo "na ou próximo a extremidade" quando usada com referência a coluna, a não ser que especificada de outra forma.

Descrição Detalhada da Invenção

A partir daqui, neste pedido de patente, os termos "substrato" e "solução de substrato" são usados como sinônimos para a descrição de um composto líquido ou uma mistura de compostos ou uma solução líquida de um composto ou de uma mistura de compostos, que estão destinados a reagir na presença da enzima imobilizada. Por meio disso, é produzido um composto líquido ou uma mistura de compostos, que é referida como "produto" ou "substrato modificado" sinonimamente.

A invenção se refere a um processo para a modificação enzimática de um substrato através da passagem do substrato através de uma coluna de leito carregado de enzima imobilizada. O substrato entra na coluna de leito carregado na ou próximo a uma extremidade da coluna (a partir daqui, neste pedido de patente referida como a "extremidade de entrada") e passa através da coluna na direção da outra extremidade (a partir daqui, neste pedido de patente referida como a "extremidade de saída"), onde o substrato sai da coluna.

De preferência, a coluna é uma coluna vertical com a sua extremidade de entrada no fundo e a sua extremidade de saída no topo da coluna. Nessa modalidade, o substrato irá entrar no leito primeiro ou próximo à sua parte mais baixa e sair da coluna, ou próximo da sua parte mais alta.

Vantajosamente, as correntes do substrato e do substrato modificado podem ser essencialmente contínuas. Isso significa que, enquanto as correntes do substrato e do substrato modificado possam ser paradas para

permitir a mudança periódica de uma parte do volume de enzima imobilizada, não é necessário um tempo de parada prolongado. Isso diferencia o presente processo dos métodos existentes por meio dos quais períodos prolongados de parada são necessários entre outras coisas para a troca do volume total da enzima imobilizada. Isso não somente reduz os custos *em si*, porém também podem evitar as flutuações de custos.

De acordo com a presente invenção, somente uma parte definida da enzima imobilizada é periodicamente removida da coluna. Isso pode ser conseguido, a título de ilustração somente, com o processo que se segue. O fluxo contínuo de substrato é parado. uma válvula de descarga na extremidade de entrada da coluna é aberta e uma parte definida da suspensão que contém o material de enzima imobilizada a partir da extremidade do fundo da coluna é liberada. Depois que uma quantidade definida desta suspensão é descarregada, a válvula de descarga é fechada e uma válvula de alimentação é aberta, permitindo, dessa forma, a entrada de uma suspensão fresca do material de enzima imobilizado para o interior da coluna a partir do recipiente de suprimento.

A suspensão de enzima imobilizada pode ser formada através da adição de uma quantidade definida do substrato modificado para o interior do recipiente de suprimento. Se necessário, para aumentar a misturação e para melhorar o umidecimento dos poros da enzima imobilizada, o recipiente pode estar equipado com um dispositivo de agitação e/ou pode ser operado sob vácuo. Quando uma carga fresca de enzima está para ser adicionada ao reator, o recipiente de suprimento pode ser desaerado e a suspensão, ou uma parte da mesma, esvaziada para o interior da coluna. A válvula de alimentação e em seguida fechada permitindo que a suspensão fresca se assente na extremidade do leito carregado. Finalmente, as válvulas que regulam as correntes do substrato e do produto são reabertas.

O reator pode ser operado sob vácuo. No entanto, e de preferência, ele será operado sob uma pressão determinada ("pressão de projeto"). A pressão de projeto deve ser escolhida para permitir uma queda máxima da pressão sobre todo o comprimento da coluna. A queda da pressão

irá depender das características das partículas da enzima imobilizada (como por exemplo, a distribuição do tamanho de partícula), a velocidade do fluxo do substrato e a altura do leito. Somente a título de exemplo, uma pressão de projeto adequada em um leito de enzima relativamente alto e com uma velocidade de fluxo de substrato relativamente alta pode ser de cerca de 1 MPa (10 Bar). Com uma altura de leito mais baixa e uma velocidade de fluxo mais lenta, aquele valor pode ser mais aproximado de 0,6 MPa (6 Bar). A pressão de projeto apropriada para qualquer determinado reator poderá ser determinada com facilidade por uma pessoa versada na técnica.

Para assegurar que a pressão de projeto não seja excedida pela pressão de alimentação, as bombas de alimentação não devem ter uma capacidade acima da pressão de projeto. Além disso, as estradas do reator devem ser equipadas com válvulas de não-retorno, válvulas de fechamento e abertura e dispositivos de controle da taxa de fluxo.

De forma ideal, a descarga da enzima gasta e a adição da enzima fresca irão ocorrer ao mesmo tempo ou substancialmente ao mesmo tempo. Por isso, é significado que a descarga e a adição devem der executadas durante o mesmo tempo de parada, Também é de preferência que substancialmente a mesma quantidade de material de enzima seja descarregado como a que é adicionada, assegurando dessa forma que o reator mantenha as suas características de leito carregado. Pode ocorrer uma exceção a ambas essas regras, por exemplo, depois da partida inicial do reator devido a uma determinada quantidade de compactação na coluna. Pode por certo ser necessário nessa situação, a adição de um pouco mais de suspensão do que for descarregada ou mesmo a adição de suspensão sem qualquer descarga.

Através da repetição dessa troca de uma parte do material do leito, é assegurado um fluxo gradual da enzima imobilizada a partir do topo para o fundo da coluna. Por consequência, a solução de substrato irá primeiro entrar em contato com a maioria do matéria de enzima já exaurido e no final com a enzima mais fresca.

De forma vantajosa, a mudança periódica de uma parte da en-

zima imobilizada pode ser grandemente automatizada, limitando dessa forma o envolvimento do operador, reduzindo os custos associados e restringindo a probabilidade de quaisquer maus funcionamentos.

Este sistema pode ser comparado com múltiplos reatores pequenos básicos separados em série. Em comparação a essa série, a complexidade da presente invenção é grandemente reduzida, especificamente a quantidade de válvulas de entrada e de saída. Além do mais, a solução processada não terá que ser transportada entre os múltiplos reatores. Isso é especificamente importante quando a solução do substrato e/ou do produto tem que ser mantida em uma temperatura determinada ou quando elas têm uma alta viscosidade. Além disso, um sistema de pequenos reatores requer que um ou mais dos reatores esteja periodicamente fora de serviço enquanto a enzima gasta é removida e a enzima fresca é adicionada. Essa é uma operação manual intensa e durante esse tempo a eficiência de todo o sistema é grandemente reduzida. Por consequência, os custos totais de capital e de operação com relação a esse sistema não são os ideais. O que é mais, o sistema da presente invenção irá permitir uma gradação quase infinita da atividade da enzima a partir da enzima fresca para a enzima gasta. Isso não pode ser conseguido mesmo com um grande número de reatores separados.

O processo da invenção permite uma taxa de fluxo contínua na medida em que, basicamente todo o substrato encontra a mesma quantidade de atividade da enzima durante a passagem do mesmo através do reator. Na medida em que a atividade da enzima imobilizada varia com a idade e com o uso, o contato uniforme do substrato com a enzima nas diversas etapas de atividade é decisivo para assegurar uma qualidade de produto mais constante. Por esse motivo, pode ser aplicada uma taxa de fluxo constante.

A frequência com a qual o material de enzima é substituído irá depender, entre outras coisas, da redução da taxa de atividade da enzima com o passar do tempo e do tempo de permanência desejado da solução de substrato no leito carregado de enzima. O volume do material de enzima trocado e a duração dos intervalos entre essas trocas podem ser adaptados

com facilidade às necessidades do processo e/ou do substrato. Além disso, irá existir uma relação entre a frequência com a qual a enzima é refrescada e o volume de enzima que é refrescado. Com todas as outras variáveis do processo permanecendo constantes, uma pequena quantidade de enzima pode ser refrescada com frequência ou uma grande quantidade de enzima ser refrescada com menos frequência. De preferência, uma porcentagem fixa de todo o volume da coluna será refrescada em uma base diária. De modo ideal, a percentagem será de menos do que 35% do volume total da enzima imobilizada. De preferência, ela será de menos do que 25%, de mais preferência de menos do que 10%, ainda de mais preferência de menos do que 5%. De acordo com uma modalidade possível, entre cerca de 0,3% e cerca de 3% do volume total da enzima imobilizada será refrescada em uma base diária.

Depois de passar através da coluna de leito carregado de enzima imobilizada, deve ser alcançada uma conversão suficiente do substrato. No topo da coluna, a saída do produto pode ser facilitada através de pequenas telas de filtro de conformação cilíndrica. Essas telas regulam o fluxo de saída do produto enquanto o material de enzima imobilizado é mantido no interior do reator. Existem dois tipos de telas: telas de saída para o ar e telas-padrão. Embora as telas padronizadas sejam usadas para o fluxo principal do produto, as telas de saída para o ar ficam mais altas na coluna e facilitam o fluxo de ar ou de gás durante a drenagem e o reenchimento.

As bombas que regulam a entrada e a saída das suspensões do material de enzima devem ser projetadas de tal forma que elas não rompam a enzima imobilizada criando finos adicionais. Isso irá auxiliar um fluxo uniforme e impedir que os finos passem através dos dispositivos de filtragem subsequentes.

A enzima descarregada será uma suspensão de enzima imobilizada usada (ou "gasta") e uma solução do substrato. Essa suspensão pode ser separada e a solução do substrato pode ser reintroduzida para o interior do tanque que proporciona a entrada do substrato para a coluna de reação. A enzima usada pode ser descartada. No entanto, e de preferência, ela será

processada para uso posterior.

A enzima removida a partir da coluna pode por certo ser submetida à reciclagem. Por exemplo, em alguns casos a enzima removida a partir da coluna ainda tem alguma atividade residual, que pode ser acessada se o material imobilizado for quebrado em partículas menores, revelando por meio disso sítios ativos da enzima que não estavam anteriormente totalmente ou quase restritamente acessíveis ao substrato (isso é conhecido como "reativação"). De forma alternativa, a enzima pode ser regenerada e reutilizada. Desse modo, em uma modalidade de preferência do processo de acordo com a invenção, o material de enzima descarregado a partir da coluna é regenerado ou reativado e reutilizado, por exemplo, para o pré-tratamento do substrato antes da entrada do mesmo na coluna ou sendo adicionada ao tanque que supre a entrada de enzima imobilizada. Ela também pode ser reutilizada em outros sistemas como modificação por batelada.

O processo da presente invenção pode ser operado em uma única coluna ou através da passagem através de duas ou mais colunas de enzima imobilizada dispostas em paralelo. A expressão "enzima imobilizada" toma o seu significado normal na técnica, isto é, aquele de uma enzima que está fisicamente fixada a um suporte sólido. Os suportes de preferência incluem os suportes de sílica e de resina. A enzima imobilizada pode estar presente na forma de grânulos, partículas aglomeradas ou qualquer outra forma considerada adequada por uma pessoa versada na técnica.

A escolha da enzima irá depender, por certo, do tipo de reação a ser executada, isto é, da natureza do substrato e da sua modificação desejada. Ela pode ser qualquer oxirredutase, trasnferase, hidrolase, lisase, isomerase ou ligase disponível na técnica. A título de ilustração, as hidrolases adequadas podem incluir as hidrolases de éster carboxílico (EC-3.3.3) tais como esterases de carboxila, lipases de triglicerol, fosfolipase A2, esterases de esterol, lipases de acilglicerol, fosfolipase A1, e hidrolases de éster de cera; e hidrolases de diéster fosfóricos (EC-3.1.4), tais como a fosfolipase C e a fosfolipase D. Essas enzimas podem ser usadas, por exemplo, para catalisar a hidrólise, alcoólise ou a conversão reversa correspondente (con-

densação). Outras enzimas adequadas serão do conhecimento da pessoa versada na técnica, dependendo da modificação específica a ser executada.

O substrato será qualquer material ou substância capaz de ser atuado através de uma enzima. Ele pode incluir, por exemplo, um ou mais lipídios, uma ou mais proteínas, um ou mais carboidratos ou uma mistura dos mesmos. O Termo "lipídio" na forma usada aqui, neste pedido de patente, se refere não somente aos óleos em bruto ou processados e as frações dos mesmos, porém também aos triaglicerídios, diaglicerídios, monoacilglicerídios, fosfolipídios, ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos e as misturas dos mesmos. O Termo "proteína" pode se referir, entre outras, a ambos os polipeptídios complexos e simples, estejam eles no estado de dobrados ou desnaturados, a sequências curtas de peptídios e amino ácidos isolados. O termo "carboidrato" se refere, por exemplo, a unidades isoladas de monossacarídios, dissacaridios, oligossacarídios e polissacarídios tais como amido, celulose e assim por diante. O substrato pode estar misturado com outros reagentes (tais como um álcool ou água), ou com um solvente se necessário. Se desejado, o substrato pode ser refinado antes de ser introduzido na coluna. O refino se refere à remoção das impurezas tais como os resíduos e produtos secundários e irá contribuir para prolongar a duração das enzimas imobilizadas.

Como declarado acima, o processo da presente invenção pode ser usado para a execução de qualquer tipo de reação enzimática. Não obstante, uma quantidade de modalidades possíveis irá ser descrita a seguir em maior detalhe a título de ilustração. Essas modalidades não devem ser interpretadas de qualquer modo como limitando o âmbito da invenção. Ao contrário, as suas informações devem ser entendidas, quando apropriado, para a aplicação da invenção como um todo.

Interesterificação.

Esta modalidade diz respeito à interesterificação de óleos. A interesterificação muda o perfil de acil-glicerol do óleo ou da mistura de óleos por meio da modificação das propriedades físicas do mesmo.

De acordo com esta modalidade, a enzima de escolha é uma

lipase. Ela irá ser imobilizada de forma ideal sobre um suporte de sílica. Uma enzima imobilizada adequada é a lipase Lypozyme TL IM da Novozymes.

O substrato que pode ser usado em um estado refinado ou não refinado dependendo das exigências, irá compreender tipicamente um glicerídio de acila tal como um triacilglicerídio, um diacilglicerídio, um monoacilglicerídio ou uma mistura de dois ou mais dos mesmos. Ele pode ser derivado a partir de uma origem vegetal, animal, peixe, algas ou células simples. De preferência, ele será derivado a partir de uma origem vegetal. Os substratos adequados, por esse motivo, irão incluir, porém não estão limitados a, óleo de babaçu, óleo de palma, óleo de coco, óleo de oliva, óleo se sementes de colza, óleo de canola, óleo se sementes de linho, óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de sementes de algodão, óleo de sementes de girassol, óleo de sementes de abóbora, óleo de milho, óleo de mamona e misturas de dois ou mais dos mesmos. O substrato pode incluir óleos totais e/ou frações de óleo tais como as estearinas ou oleínas.

De acordo com uma modalidade, o substrato será composto por estearina de palma, óleo de coco, óleo de babaçu, ou uma mistura de dois ou mais dos mesmos. De preferência o substrato irá compreender uma mistura de estearina de palma mais óleo de coco ou uma mistura de estearina de palma mais óleo de babaçu. Ainda de mais preferência, a mistura irá incluir de 50 a 80% em peso de estearina de palma e de 50 a 20% em peso de óleo de coco e/ou óleo de babaçu, com base no peso total do substrato. De modo ideal, a mistura irá incluir de 65 a 75% em peso de estearina de palma e de 35 a 25% em peso de óleo de coco ou de 60 a 70% em peso de estearina de palma e de 40 a 30% em peso de óleo de babaçu. De acordo com uma modalidade de maior preferência, o substrato da presente invenção irá consistir nessa mistura.

O substrato será bombeado através da uma ou mais colunas em paralelo cheias com a enzima imobilizada. O substrato e o material de enzima imobilizada irão fluir em direções opostas com a entrada do óleo na ou próximo ao fundo da coluna e o material de enzima fresca sendo adicionado no ou próximo ao topo da coluna. Periodicamente, uma parte da enzima i-

mobilizada Será trocada com material de enzima fresca. Por esse motivo, a enzima na coluna deverá ter um perfil de qualidade quase constante. A enzima imobilizada no topo da coluna será em sua maioria fresca com aproximadamente atividade total e a enzima imobilizada próxima do fundo da coluna estará aproximadamente exaurida de atividade. Por consequência, haverá uma gradação de atividade ao longo do comprimento da coluna.

A reação de interesterificação seve ser executada em uma temperatura definida. Esta temperatura será escolhida com uma quantidade de fatores em consideração:

- como a maioria dos óleos e gorduras inter esterificadas produzidas de acordo com este processo serão destinadas para produtos nutricionais, o processo será de preferência isento de solventes orgânicos. Como tal, o processo deve ser executado em uma temperatura que garanta de os óleos ou as gorduras permaneçam em um estado líquido;

- a temperatura deve ser alta o bastante para permitir uma alta taxa de reação que, por sua vez, irá permitir tempos de permanência mais curtos;

- a temperatura deve ser baixa o bastante para não afetar a estabilidade e a atividade da enzima. As lipases microbianas são um tanto estáveis à temperatura e a imobilização foi considerada como aumentando ainda mais a estabilidade dessas enzimas de tal modo que as temperaturas para muitas das lipases varia a partir de 30°C até 62°C ((W.M. Willis and A.G. Marangoni, em Enzymatic Interesterification, Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, editado por CC. Akoh and D.B. Min). Algumas lipases permitem ainda temperaturas de 60°C até 75°C (WO 97/01632). O desenvolvimento futuro das enzimas poderá incluir ainda variedades mais resistentes à temperatura, como por exemplo, resistentes a 80°C, 90°C, 100°C ou acima. Nessas temperaturas, a maioria dos triacilglicerídios, mesmo os totalmente saturados, irão estar em um estado líquido.

Levando esses fatores em conta, a pessoa versada na técnica será capaz de determinar a temperatura ideal para a reação.

A título de exemplo, a interesterificação da estearina de palma

com óleo de coco pela Lypozyme TL IM (Novozymes) será executada, de preferência, a cerca de 70°C.

Depois do aquecimento dos óleos para a temperatura desejada e mistura, se necessária, eles são direcionados para a válvula de entrada ou para próximo da extremidade de entrada do reator. O reator será de preferência projetado para operar sob vácuo e até uma pressão adequada.

A enzima imobilizada fresca é suprida no topo da coluna em intervalos regulares. Uma quantidade definida de produto de óleo interesterificado pode ser bombeada para dentro do recipiente de suprimento e misturada com a enzima imobilizada para a produção de uma suspensão de fluxo livre. Para aumentar a misturação e melhorar a umidificação dos poros da enzima imobilizada, pode ser aplicado um vácuo para impedir a oxidação do óleo.

Quando uma carga fresca de enzima for para ser adicionada à coluna, o recipiente de suprimento é des-aerado, se aplicável, e a suspensão ou uma parte da mesma é esvaziada para dentro do reator. Se necessário, o recipiente e as tubulações podem ser descarregados com um determinado volume do produto de óleo para assegurar o esvaziamento completo do recipiente. De preferência, o recipiente de suprimento estará situado acima do reator para facilitar o carregamento da enzima.

O processo desta modalidade será de preferência essencialmente contínuo. A única parada será os poucos momentos que duram para a troca de uma parte da enzima a partir da coluna. Essa parada é somente uma fração muito pequena do tempo total de operação do processo.

Alcoólise

A não ser que declarado de outra forma, os detalhes desta modalidade são os mesmos como os da reação de interesterificação descritos acima.

O substrato será uma mistura adequadamente agitada de um ou mais óleos e um ou mais alcoóis. Os alcoóis adequados incluem porem não estão limitados a metanol, etanol, glicerol, monopropileno glicol, etileno glicol, butano diol, eritritol, pentaeritritol, sorbitol, esteróis, estanóis, tocoferóis,

polifenóis, ésteres de tais alcoóis e as misturas de dois ou mais dos mesmos. A enzima imobilizada será de preferência a lipase.

A reação será executada de preferência a 50 a 70°C. Depois de serem recolhidos na saída do reator, os produtos (ésteres de ácidos graxos e glicerol) podem ser isolados. O isolamento pode ser executado através de resfriamento para uma temperatura na qual a separação de fases ocorra seguida pelo isolamento da fase de éster do ácido graxo e uma etapa de secagem. O álcool pode ser recuperado através de evaporação diretamente a partir da mistura ou depois do isolamento dos ésteres do ácido graxo.

Glicerólise

A glicerólise é um tipo específico de alcoólise, como descrita acima. O substrato é uma mistura de um ou mais óleos e glicerol. A enzima é uma lipase imobilizada sobre um veículo que seja inerte contra o glicerol.

O substrato é preparado através da mistura ou da dissolução do glicerol dentro do óleo ou dos óleos na temperatura de reação ou ligeiramente acima. A quantidade de glicerol misturado com o óleo pode ser aumentada através da adição de um emulsificante. Dependendo da proporção de glicerol-óleo, a enzima mais próxima à extremidade de entrada do reator irá atuar tanto como um purificador do substrato como para ajustar a concentração de equilíbrio do glicerol no substrato.

A reação será executada de preferência a 50 a 70°C. O produto recuperado depois da modificação irá depender da proporção de glicerol para o óleo no substrato.

Hidrólise

Nesta modalidade - que se segue a modalidade de interesterificação descrita acima, a não ser que indicado ao contrário - o substrato é uma lecitina ou uma solução de lecitina que possa ser bombeada. Uma solução de lecitina pode ser obtida através da mistura de lecitina com um solvente tal como hexano e água.

A enzima será uma lipase ou uma fosfolipase. Dependendo da enzima, podem ser obtidos produtos diferentes. Desse modo, se for usada uma lipase, o produto será uma mistura de fosfolipídios e mono- e/ou di-

glicerídios. Com a utilização de uma fosfolipase A ou B, em uma temperatura de reação de preferência de 20 a 70°C, irá levar a produção de lisofosfolipídios. Com a utilização da fosfolipase C, em uma temperatura de reação de preferência de 20 a 50°C, irá levar a produção de di- e/ou triglicerídios. Com a utilização da fosfolipase D, em uma temperatura de reação de preferência de 20 a 70°C, irá levar a produção de ácido fosfatídico. Se necessário, pode ser usada uma mistura de enzimas diferentes para ser obtido o produto desejado.

Depois da conversão as misturas de produtos podem ser usadas como estão ou depois de processos de purificação adicionais (como por exemplo, lavagem, secagem, evaporação, fracionamento, etc.).

Isomerização

Outra reação possível que pode ser executada de acordo com o processo da presente invenção é a isomerização. Um exemplo típico de isomerização é a conversão da glicose para frutose. Desse modo, de acordo com uma modalidade, o substrato será de preferência a glicose (ou um xarope de glicose) e a enzima imobilizada será de preferência uma isomerase de glicose (EC 5.3.1.5). A reação deve ser executada idealmente entre 55 a 75°C. O produto será um xarope que contém ambas a glicose e a frutose. Se desejado, o conteúdo de frutose pode ser ainda aumentado através de purificação ou pela divisão da glicose e da frutose em produtos separados.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a modificação de um substrato que compreende a passagem do substrato através de uma coluna de leito carregado de um volume específico de enzima imobilizada, em que:

(a) o substrato entra na coluna na, ou próximo a uma extremidade da coluna (a "extremidade de entrada") e o substrato modificado sai na ou próximo a extremidade oposta da coluna (a "extremidade de saída"),

(b) uma parte do volume da enzima imobilizada é periodicamente removida na ou próximo a extremidade de entrada da coluna, e

(c) uma parte da enzima imobilizada é periodicamente adicionada na ou próximo a extremidade de saída da coluna.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a coluna é substancialmente vertical com a sua extremidade de entrada, ou próxima do fundo da coluna e a sua extremidade de saída, ou próxima do topo da coluna.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que o processo é essencialmente um processo contínuo.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a parte da enzima imobilizada que é removida a partir da coluna é de menos do que 35% do volume total.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a parte da enzima imobilizada que é removida a partir da coluna é substancialmente equivalente em volume a parte da enzima imobilizada que é adicionada.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que as etapas de remoção da enzima imobilizada a partir da e a adição da enzima imobilizada para a coluna ocorre substancialmente de modo concorrente.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a parte removida da enzima imobilizada é usada para o pré-tratamento do substrato antes que ele entre na coluna.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que a parte

removida da enzima imobilizada é regenerada ou reativada antes de ser usada para o pré-tratamento do substrato.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a modificação é uma condensação ou inclui etapas de condensação.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que no qual a modificação é uma interesterificação.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que no qual a modificação é uma isomerização.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a enzima é uma hidrolase.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12, em que a enzima é uma lipase ou uma enzima de modificação de lipídio e o substrato compreende um ou mais óleos em bruto, um ou mais óleos processados ou uma mistura dos mesmos.

14. Processo de acordo com a reivindicação 12, em que o substrato compreende um ou mais triacilglicerídios, diacilglicerídios, monoacilglicerídios, fosfolipídios, ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos ou as misturas de dois ou mais dos mesmos.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14, em que o substrato ainda compreende um álcool.

16. Processo de acordo com a reivindicação 15, em que o álcool é selecionado a partir de: metanol, etanol, glicerol, monopropileno glicol, etileno glicol, butano diol, eritritol, pentaeritritol, sorbitol, esteróis, estanóis, tocoferóis, polifenóis, ésteres de tais alcoóis e as misturas de dois ou mais dos mesmos.

17. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, em que o substrato também compreende água.

18. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que o substrato compreende um ou mais óleos com base em plantas ou frações de óleos com base em plantas.

19. Processo de acordo com a reivindicação 18, em que o subs-

trato compreende estearina de palma, óleo de coco, óleo de babaçu ou uma mistura de dois ou mais dos mesmos.

20. Processo de acordo com a reivindicação 19, em que o substrato compreende de 50% a 80% em peso de estearina de palma e de 50% a 20% em peso de óleo de coco.

21. Processo de acordo com a reivindicação 20, em que o substrato compreende de 65 a 75% em peso de estearina de palma e de 35 a 35% em peso de óleo de coco.

22. Processo de acordo com a reivindicação 19, em que o substrato compreende de 50% a 80% em peso de estearina de palma e de 50% a 20% em peso de óleo de babaçu.

23. Processo de acordo com a reivindicação 22, em que o substrato compreende de 60% a 70% em peso de estearina de palma e de 40% a 30% em peso de óleo de babaçu.

PI0400065-5

RESUMO

Patente de Invenção: **"MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS EM UMA COLUNA DE LEITO CARREGADO REGENERADO CONTINUAMENTE".**

A presente invenção refere-se a um processo para a modificação de um substrato que compreende passar o substrato através de uma coluna de leito carregado de um volume específico de enzima imobilizada, em que o substrato entra na coluna na ou próximo a uma extremidade da coluna (a "extremidade de entrada") e o substrato modificado sai na ou proximo à extremidade oposta da coluna (a "extremidade de saída"), uma parte do volume da enzima imobilizada é periodicamente removida na ou próximo à extremidade de entrada da coluna, e uma parte equivalente da enzima imobilizada é periodicamente adicionada na ou próximo à extremidade de saída da coluna.