



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

(21) **PI0709013-7 A2**

(22) Data de Depósito: 06/03/2007
(43) Data da Publicação: 21/06/2011
(RPI 2111)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 9/00 2006.01
B01J 2/00 2006.01
F26B 17/02 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BIOCATALISADORES COM MATERIAL BIOATIVO NA FORMA DE ENZIMAS IMOBILIZADAS, OU MICROORGANISMOS IMOBILIZADOS EM ÁLCOOL POLIVINÍLICO GEL, E SEU USO, E DISPOSITIVOS PARA SUA PRODUÇÃO**

(30) Prioridade Unionista: 13/03/2006 CZ PUV 2006-17510, 13/03/2006 CZ PUV 2006-17511

(73) Titular(es): Lentikat's A.S.

(72) Inventor(es): Martin Rebros, Michal Rosenberg, Radek Stloukal

(74) Procurador(es): Security, Do Nascimento Souza & Associados Propriedade Intelectual

(86) Pedido Internacional: PCT CZ2007000015 de 06/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/104268 de 20/09/2007

(57) Resumo: Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção sendo um método para a produção industrial de biocatalisadores com material biologicamente ativo na forma de enzimas ou microorganismos imobilizados que são imobilizados no álcool polivinílico gel, e uso dos mesmos com base no fato de que o material biológico ativo, formado pela mistura de catalisador enzimático nativo livre ou pré-tratado (agregado), ou microorganismo de produção, ou parte dos mesmos, e o álcool polivinílico gel, é usado para sua produção industrial, a mistura é gelificada e modelada em uma corrente de ar de secagem à temperatura de 80°C a 15°C, considerando a extensão do material biologicamente ativo, à proporção geométrica de biocatalisador da superfície para o volume mantida maior que 7 mm⁻¹, e consequentemente os biocatalisadores assim preparados podem ser cultivados ou armazenados e em seguida usados em processos biotecnológicos nas condições, que garantem ao processo biotecnológico dado maior produtividade, maior estabilidade de produção e enzimática, uso prolongado e repetido ou controle delinível do processo com consequente separação fácil do biocatalisador. Dispositivo de produção industrial, que proporciona otimização do volume de carreador biológico e da superfície dependendo da extensão de material biologicamente ativo, consistindo em um mecanismo de modelagem (17) montado na frente de um canal de secagem (2), através do qual passa uma correia transportadora continua (1), é equipado com pelo menos um cabeçote de modelagem (17) com duas séries de injetores de agulha de modelagem conectados a um tanque de pressão temperado (15) e um compressor (16), a correia transportadora (1) e um sistema de secagem - a fonte (4) de ar de secagem, que é soprado por meio de um ventilador para dentro de um sistema de distribuição de ar (6) com elementos de aquecimento incorporados (5), que atinge o canal de secagem superior (2), e depois o canal de secagem final inferior (3) e um tanque de reentumescimento (7), entre os quais está montado um dispositivo de limpeza e coleta (9), projetado com base em limpeza mecânica e enxague de alta pressão, que é conectado a uma tubulação com uma bomba de alta pressão integrada (10) e uma bomba de baixa pressão (11) que atingem um reservatório de coleta (8) com resfriamento e depois uma caixa de enxague (13) para limpeza final da correia transportadora continua (1) por jatos conectados à bomba de baixa pressão (14), que é conectada a um tanque de enxague (12) por tubulação.



PI0709013-7

1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “Método para
Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na
Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos
Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos
5 para sua Produção”

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao método para produção industrial
de biocatalisadores com material bioativo na forma de enzimas
imobilizadas, ou microorganismos imobilizados em álcool
10 polivinílico gel, e ao uso dos mesmos, e também a um dispositivo
de produção industrial, quer permite a otimização do volume e da
área de um carreador biológico conforme a extensão do material
biologicamente ativo, que inclui um mecanismo de modelagem
situado na frente de um canal de secagem, através do qual passa a
15 correia transportadora contínua.

Fundamentos da Invenção

A encapsulação de microbactérias usando um carreador do tipo
álcool polivinílico ou um carreador do tipo poliuretano é
conhecida no campo. O método para a produção de um
20 biocatalisador com material biologicamente ativo na forma de
microorganismos, enzimas, esporos e/ou células, que são
colocados em álcool polivinílico gel (chamado de “PVA-gel” no
texto a seguir) está apresentado na patente CZ 249 179. PVA-gel
como gel carreador para material biologicamente ativo é altamente
25 adequado para a produção de catalisadores químicos ou
biológicos. O corpo do gel produzido de acordo com este método
apresenta maior estabilidade mecânica em comparação com os
corpos de gel já conhecidos, particularmente em termos de
resistência à abrasão e resistência à tração. Devido às propriedades
30 mecânicas melhoradas acima mencionadas, é possível a produção
de um corpo de gel no formato de uma lente reativa e
cineticamente adequada. Assim o corpo de gel produzido é firme e
resistente à abrasão por mais de vários meses, mesmo com
agitação de alta revolução, comparado com aqueles já conhecidos.
35 Devido ao formato lenticular caracterizado por um diâmetro

grande e uma altura baixa, material fisicamente, quimicamente ou biologicamente ativo está sempre situado logo abaixo da superfície, o que proporciona sua disposição reativa e cineticamente útil. Os procedimentos biotecnológicos, que
5 utilizam PVA-gel como carreador de material biologicamente ativo, são conhecidos no campo.

As utilizações dos carreadores mencionados acima no processo de remoção de nitrogênio de águas servidas são conhecidas. Tais utilizações estão descritas, por exemplo, nos documentos
10 EP0758680 (derivados de celulose porosa), WO09508513 (álcool polivinílico, vermiculita, poliuretano) e CN1076488 (álcool polivinílico). Os carreadores mencionados são usados (geralmente) na imobilização de lama ativada, que geralmente é antes enriquecida de várias maneiras, em particular com bactérias
15 nitrificantes (vide, por exemplo, os processos PEGASUS ou PEGAZUR), mas também diretamente na imobilização de bactérias nitrificantes ou desnitrificantes puras. Como mencionado na literatura, uma característica muito importante de um carreador é a extensão de sua superfície específica em relação ao volume de
20 um reator, ou mais precisamente em relação ao volume das águas servidas efetivamente processadas. Isto é, este parâmetro está diretamente relacionado com o tamanho do reator e com o tempo de permanência das águas servidas no reator, porque ele pode ser influenciado em particular pela quantidade (ou mais precisamente,
25 pelo peso ou volume) de um carreador com a superfície específica dada que é colocada em um reator. Por exemplo, o processo de remoção de poluição de nitrogênio por meio de bactéria imobilizada em um carreador do tipo polietileno glicol (PEG) no formato de tabletes com dimensões geométricas $S/V = 3$ e 2 , torna
30 possível atingir uma taxa de remoção de nitrogênio de $0,34 \text{ kg/m}^3$ a $1,14 \text{ kg/m}^3$ por dia com um teor de 2% p/v de biomassa molhada de lama ativada em um carreador. (T. Sumino, H. Nakamura, N. Mori, Y. Kawaguchi: Immobilization of Nitrifying Bacteria by Polyethylene Glycol Prepolymer, Journal of Fermentation and
35 Bioengineering, 73(1), 37-42, 1992.)

A vantagem da fermentação bacteriana é seu modo anaeróbico, e por conseguinte a simplicidade dos dispositivos de cultura e menores exigências de esterilidade. Bactérias do gênero *Lactobacillus*, que convertem um substrato de sacarose (glicose, 5 sacarose, lactose) à temperatura de 30°C a 40°C em ácido láctico com diferentes teores da forma de ácido L(+)-, D(-)- e DL de acordo com as propriedades do produtor, são principalmente usadas para produção industrial.

A imobilização de microorganismos por encapsulação em géis 10 carreadores é um dos métodos que proporcionam a biomassa concentrando em um reator sem crescimento da biomassa em um meio completamente fermentado. Este método consiste em encerrar células em cápsulas de géis naturais ou sintéticos. As células devem ser maiores que os poros do carreador para que não 15 ocorra liberação das células, enquanto que ao mesmo garante a livre difusão de um substrato e produtos para as células encapsuladas.

A imobilização de bactérias lácticas em diferentes carreadores já é conhecida. Antes de mais nada, estas são carrageninas, pectatos, 20 alginatos dos géis naturais (Norton, S. et al.: *Enzyme Microbial Technol* 16, 457-466, 1994; Richter, K. et al.: *Acta Biotechnol.* 11, 229-341, 1991; Yan, J. et al.: *Chem. Biochem. Eng. Q.* 15 (2), 59-63, 2001) e poliacrilamida dos carreadores sintéticos (Tuli, A. et al.: *Enzyme Microbial Technol.* 7, 164-168, 1985). Os 25 imobilizados são produzidos na forma de bolas com diâmetro de 3 mm a 5 mm, geralmente por gotejamento do gel relevante em uma solução endurecedora. No entanto, a desvantagem de tais métodos é que o formato de bola dos imobilizados causa limitações de difusão no interior das bolas. O volume de gel total não é usado e 30 como consequência, os microorganismos só crescem sob a superfície da bola.

No entanto, a extensão da superfície específica (geométrica) de um carreador em relação ao seu volume, ou mais precisamente, ao seu formato e medidas, é um parâmetro co-essencial, 35 particularmente por motivos econômicos. Os carreadores, cujo

formado se aproxima de uma bola ou cilindro, onde o diâmetro inferior (d) e a altura (h) têm aproximadamente o mesmo valor, ainda são usados para remover nitrogênio de água de esgoto por células imobilizadas. O valor mínimo da medida do carreador para
5 remover nitrogênio de água de esgoto é 1 mm. Os carreadores geralmente usados medem 3 mm, o que significa que a proporção da superfície para o volume do carreador (S/V) assume valores de aproximadamente 2 mm^{-1} a 6 mm^{-1} . Se for usado um carreador no formato de lente ou no formato de tira, menos biocatalisador pode
10 ser usado em comparação com os processos atuais que usam as células imobilizadas para remoção de compostos de nitrogênio da água potável, de águas industriais e de águas servidas, até mesmo na mesma intensidade ou em uma intensidade maior do processo.

Um outro uso alternativo de um gel carreador em processos
15 biotecnológicos é no método para produção de ácido láctico. Este ácido é bastante usado, particularmente na indústria alimentícia, farmacêutica e química, entre outras. O ácido láctico é produzido por um grande número de microorganismos, mas principalmente por fungos e bactérias filamentosos. Dos fungos filamentosos,
20 *Rhizopus arrhizus*, ou *oryzae* é um bom produtor de ácido láctico. Sua indiscutível vantagem, comparada com as bactérias, é o fato de que ele produz apenas ácido L(+). No entanto, o modo de fermentação é aeróbico (altas exigências de preparação em ar estéril). O modo aeróbico dos fungos filamentosos pode ser uma
25 vantagem no caso de preparação direta de sais de cálcio do ácido láctico, durante a qual podem ocorrer prolongamento de fermentação e redução de rendimentos como resultado de neutralização ineficiente (agitação fraca) no caso de carbonato de cálcio (Mattey M.: *Critical Reviews in Biotechnology* 12, 87-132,
30 1992).

Um outro método adequado de imobilização é o encapsulação de bactérias lácticas em um álcool polivinílico gel. Este método apresenta numerosas vantagens em relação a outros carreadores. Antes de mais nada ele é barato, atóxico para os microorganismos,
35 dificilmente biodegradável, possui propriedades físico-mecânicas

excelentes, não tem efeitos colaterais nos microorganismos e apresenta estabilidade a longo prazo (Pat. DE 198 27 552.8). Além disso, a imobilização de células pelo método de acordo com a invenção acima mencionada é conveniente para o microorganismo produtivo (assegura uma alta viabilidade do microorganismo depois da imobilização e um alto índice de microorganismos sobreviventes depois do procedimento de imobilização), porque a reticulação da matriz ocorre em uma corrente de ar de secagem e assim substitui os procedimentos atualmente usados de reticulação por congelamento (Pat. DE 43 27 923) ou endurecimento em um sistema com ácido bórico (Pat. US 5 290 693). Além disso, o formato de lente dos imobilizados assegura carga ótima do volume total do carreador para o crescimento de microorganismos e a produção de ácido láctico. Os imobilizados preparados por este método podem ser usados repetidamente em modos de operação de fermentação intermitente, semi-contínua e contínua.

Sabe-se de modo geral que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ou outros microorganismos tipo levedura, que são capazes de converter glicose e outros sacarídeos em etanol durante o processo de fermentação, são tradicionalmente usadas para a produção de etanol. Esta fermentação constitui a base da produção de cervejas e vinhos mas também o princípio da produção de etanol para fins industriais, alimentícios e combustível. Recentemente, foi observado um crescente interesse em tecnologias que utilizam bactérias como produtores de etanol. *Zymomonas mobilis* é um dos produtores bacterianos de etanol. Ela é um microorganismo gram-negativo facultativamente anaeróbico. Ela apresenta diversas vantagens em relação a leveduras: crescimento mais rápido de biomassa (porém produção geralmente mais baixa de biomassa), taxas específicas mais altas de utilização de substrato e criação de produto, não precisa de um suprimento de oxigênio monitorado e produz menos metabólitos colaterais. Ela metaboliza glicose e frutose pela via de Entner-Doudoroff, que normalmente ocorre com microorganismos anaeróbicos. Nesta via metabólica um mol

de glicose é convertido em 2 moles de etanol, 2 moles de CO_2 e um mol de ATP. Esta via metabólica minimiza a quantidade de glicose transformada em biomassa e dessa maneira aumenta a produção de etanol. O rendimento real (g álcool/g glicose) aumenta para 0,49 com bactérias, e normalmente é de 0,44 com leveduras).

A fermentação com o auxílio de células de *Zymomonas mobilis* livres pode ocorrer em modos de operação intermitente, semi-contínuo e também contínuo (Rogers P.L., Tribe D.E.: Pat. US 4403034; Rogers P.L., et al., Pat. US 4443543; Salzbrunn W., et al., Pat. US 4876196; Bu'lock J. D., Pat. GB 2075053).

Até hoje, o interesse de pesquisa se concentrou no aumento da produtividade do microorganismo e na modificação da disposição dos dispositivos de fermentação com várias inovações; por exemplo reciclagem das células, o uso de microorganismos floculantes etc. (Arcuri E.J., et al., Pat. US 4413058; Rogers P.L., et al., Pat. US 4443544).

O produto da fermentação (etanol) é acumulado em um meio líquido e é isolado quase que totalmente por destilação. É desejável durante o isolamento do produto reduzir consideravelmente o teor de biomassa por sedimentação, centrifugação, filtração e outros, sem considerar a disposição e a tecnologia usadas. Um teor elevado de insolúveis aumenta as exigências de energia de destilação, causa problemas tecnológicos (entupimento do aparelho de destilação, espumação etc.), aumenta as exigências de manutenção e também pode influenciar a qualidade do produto. Por outro lado, deve-se obter eficiência máxima da produção de etanol. A taxa de produção de etanol é diretamente proporcional à quantidade de biomassa em um fermentador. Isto significa que com condições constantes, um teor aumentado de biomassa provoca redução do tempo necessário para a produção de uma dada quantidade de etanol.

Um dos métodos que possibilita a concentração de biomassa em um reator sem crescimento de biomassa em um meio completamente fermentado é a imobilização de microorganismos

por encapsulação em géis carreadores. Este método baseia-se na encapsulação de células em cápsulas de gel natural ou sintético. O tamanho das células deve ser maior que o tamanho dos poros de um carreador para que não ocorra liberação das células, mas que
5 ao mesmo garante a livre difusão de um substrato e produtos para as células encapsuladas.

A imobilização de bactérias do género *Zymomonas* em diferentes carreadores já é conhecida. Antes de mais nada, estas são carrageninas e alginatos dos géis naturais (Cheetham P.S.J., Pat.
10 US 4393136; Chibata I., Pat. US 4350765; Kikuta M., Pat. US 5990191; Yamada T., et al., Pat. US 4680263) e poliacrilamida dos carreadores sintéticos (Yamada T., et al., Pat. US 4680263; Cheetham P.S.J., Pat. US 4393136). Os imobilizados geralmente são produzidos na forma de bolas com diâmetro de 3 mm a 5 mm,
15 principalmente por gotejamento do gel relevante em uma solução endurecedora. No entanto, a desvantagem de tal método é que o formato de bola dos imobilizados causa limitações de difusão no interior das bolas. O volume de gel total não é usado para carga de células e como consequência, os microorganismos só crescem sob
20 a superfície da bola de carreador, e não carrega o volume total da matriz.

Um método de imobilização adequado é a encapsulação da bactéria *Zymomonas mobilis* em álcool polivinílico gel. Este método possui inúmeras vantagens em relação aos outros
25 carreadores. Antes de mais nada, ele é barato, atóxico para o microorganismo, dificilmente biodegradável, possui propriedades físico-mecânicas excelentes, não tem efeitos colaterais no microorganismo e apresenta estabilidade a longo prazo (Pat. DE 198 27 552.8). Além disso, a imobilização de células pelo método
30 de acordo com a invenção acima mencionada é conveniente para o microorganismo produtivo (assegura uma alta viabilidade do microorganismo depois da imobilização e um alto índice de microorganismos sobreviventes depois do procedimento de imobilização), porque a reticulação da matriz ocorre em uma
35 corrente de ar de secagem e assim substitui os procedimentos

atualmente usados de reticulação por congelamento (Pat. DE 43 27 923) ou endurecimento em um sistema com ácido bórico (Pat. US 5 290 693). Além disso, o formato de lente dos imobilizados assegura utilização ótima do volume total do carreador para o crescimento de microorganismos e a produção de etanol. Os imobilizados preparados por este método podem ser usados repetidamente em modos de operação de fermentação intermitente, semi-contínua e contínua.

Usando o formato de bolas dos imobilizados, a produção de etanol foi de $77 \text{ mg}_{\text{etanol}}/\text{ml}_{\text{gel}}/\text{h}$ com o auxílio de *Zymomonas mobilis* imobilizada em carragenina, com 10% em peso do meio de glicose, em um reator intermitente de 500 ml enchido com 20 ml de imobilizados com um diâmetro dos imobilizados de 4 mm e uma temperatura de 30°C , (Chibata I., Pat. US 4350765). Quando o produtor foi imobilizado em alginato de sódio, onde o peso da célula molhada nos imobilizadas compreendia 20 % ww/v (ww – peso da célula molhada, corresponde a 1/5 do peso da célula seca), a produtividade nas mesmas condições foi de $0,49 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{ww}}/\text{h}$ em um sistema intermitente, que depois de novo cálculo corresponde a $98 \text{ mg}_{\text{etanol}}/\text{ml}_{\text{gel}}/\text{h}$, e no modo contínuo foi de $0,47 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{ww}}/\text{h}$, que depois de novo cálculo corresponde a $94 \text{ mg}_{\text{etanol}}/\text{ml}_{\text{gel}}/\text{h}$ (Cheetham P.S.J., Pat. US 4393136).

Um uso alternativo de um gel carreador em processos biotecnológicos é no método de produção de glicose e frutose com o auxílio da enzima invertase imobilizada. A sacarose é um dissacarídeo de armazenamento presente principalmente na beterraba e na cana-de-açúcar. Ela é usada na indústria alimentícia e também como substrato em processos de fermentação. Ela é composta do monossacarídeo glicose e frutose. A sacarose fornece estes monossacarídeos por meio de hidrólise, por exemplo por hidrólise enzimática usando a enzima invertase. Seu uso resulta na criação de uma mistura de glicose e frutose (açúcar invertido) que, comparada com a sacarose não hidrolisada, oferece inúmeras vantagens: produção reduzida de turvação dos cristais, maior doçura e utilidade em processos de fermentação.

Na prática industrial, preparações enzimáticas de invertase, que não são recicláveis, são usadas para hidrólise de sacarose. Este é o motivo pelo qual a enzima se torna um dos itens mais econômicos na produção de xaropes de glicose-frutose. O método de
5 imobilização adequada para essa enzima proporciona múltiplo uso da mesma, e além disso, é possível fazer todo o processo de produção de forma contínua e com isso aumentar consideravelmente sua eficiência. A técnica usada com mais frequência é a reticulação. Os agentes de reticulação mais
10 comumente usados são poliamida (Sou M. et al. JP58086085, Rohrbach R.P. et al. US 426842), glutaraldeído (Lee D.M et al. US 4749653), polímeros com grupos carboxil não combinados (Mauz O. US 4767620), polímeros com grupos epóxido (Mauz O. US 4931476), imobilização em betumes de foto-reticulação
15 (Kunihiro I. JP55023941) e embutimento em várias matrizes com a ajuda de um agente de reticulação, tal como imobilização em bolas de vidro com a ajuda de glutaraldeído. (Toshiyuki Y. et al. JP58179494). Outros métodos são a ligação covalente de invertase a partículas de sílica gel com a ajuda de glutaraldeído (Thibault
20 P.A. EP 0231668), ligação covalente com a ajuda de ligações dissulfeto a carreadores orgânicos e inorgânicos (Cormier R.A. et al. US 4176006), ligação covalente com a ajuda de organossilano (Hlo G.H. et al. US 4384045), ligação covalente com a ajuda de aldeído a materiais de celulose e lignino (Monsan P. US
25 4405715) e ligação covalente à dialquilaminoalquil celulose (Lapins Ch. D. et al. US 4933284). A invertase também foi imobilizada por adsorção; por exemplo em uma matriz de ossos de animais (Findlay Ch. J. US 5037749). Um outro método é a encapsulação de lisados celulares com alta atividade de invertase
30 em alginato gel (Obana H. et al. JP 57163484, Chang H. N. et al. US 5766907) ou em polímeros de poliuretano (Hartdegen F.J. et al. US 4098645). Técnicas combinadas, tais como por exemplo adsorção de uma enzima em algodão tratado com polietilenoimina e subsequente reticulação por glutaraldeído (Yamazaki H. et al.
35 CA1203187) também têm utilidade prática.

O uso de PVA (álcool polivinílico gel) parece ser uma alternativa muito boa. A invertase foi imobilizada com sucesso em um carreador com um centro sólido coberto com PVA gel (Yamamoto H. e Koet al. JP2005042037). Foto-reticulação de PVA misturado
 5 com polietileno glicol também foi usada para ligação covalente e encerramento da invertase (Ichimura K. JP 58152483, Suchiro T. et al. JP 1252285, Izumida H. et al. JP 1071491). Uma matriz de PVA também pode ser reticulada por ácido bórico, enquanto que a invertase é encapsulada no gel (Guocheng Ch. et al. CN 1076488),
 10 ou por secagem (Ishimura F et al. US 4727030). Também foram usados outros métodos combinados com reticulação (Tsutsumi S. et al. JP 2046288), ou com a adição de vinil acetato (Moriya T. et al., JP 56113290), vinil amina (Moriya T. et al., JP 56113292), ou PVA aminoacetalizado (Yamauchi A. et al. US 4307151).

15 Um uso alternativo de um gel carreador em processos biotecnológicos é no método de produção de glicose a partir de amido com a ajuda da enzima glicoamilase imobilizada. Amido, a matéria de armazenamento nutritivo das plantas, é uma das principais fontes de glicose na indústria alimentícia e também na
 20 indústria de fermentação. O amido compreende dois tipos de moléculas: amilase e amilopectina. A amilase, no milho por exemplo, representa 10 % do amido total. Ela compreende até 1000 unidades glicose, ligadas por ligações α -1,4-glicosídico. Os outros 90% representam amilopectina na qual, além das ligações
 25 α -1,4-glicosídico, também estão incluídas ligações α -1,6-glicosídico. O número de unidades glicose na cadeia é de até 10 000.

O processo de pré-tratamento da matéria-prima amido para uso em processos de fermentação consiste em duas etapas. Na primeira
 30 etapa, a liquefação do amido acontece com a ajuda da endoenzima α -amilase, que aleatoriamente dissocia as ligações α -1,4-glicosídico a uma alta temperatura. Esta reação causa a formação de dextrinas e oligossacarídeos inferiores com diferentes comprimentos de cadeia.

35 Na segunda etapa, as dextrinas e os oligossacarídeos são

dissociados da extremidade não-redutora pela exoenzima glicoamilase formando unidades glicose. A glicoamilase dissocia ambas as ligações α -1,4- e α -1,6-glicosídeo. No entanto, as ligações α -1,6-glicosídeo são hidrolisadas a uma taxa muito mais
5 baixa. A taxa da hidrólise também depende do comprimento de cadeia.

Na prática industrial, é usado de 1 l a 1,2 l de preparação da enzima glicoamilase, que não é reciclável, por tonelada de amido. A imobilização adequada dessa enzima permite seu múltiplo uso,
10 com a possibilidade de fazer todo o processo contínuo. Foi obtido um aperfeiçoamento significativo com a imobilização dessa enzima por reticulação com um agente, tal como poliamina (Symon et al. US 4415663, Lantero et al. US 5472861, DeFilippi US 4343901, Rohrbach et al. US 4268423), glutaraldeído (Lee et
15 al. US 4749653, Nishimura et al. US 4888285, Rorvah et al. K.R. 8601229), agentes acrílicos ou alílicos (Boross et al. US 4794083, Selemenev et al. RU 2204600), por meio do que a enzima é ancorada em uma matriz inorgânica ou orgânica. O uso de métodos de adsorção (Abdullah et al. US 4226937, Kumakura et
20 al. JP 61060700, Motai et al. J.P. 59232092, Selemenev et al. R.U. 2181770, Kimura et al. J.P. 63056297), e também reatores de membrana com glicoamilase imobilizada (Thomas et al. US 5130237) parece ser adequado. Encapsulação, cujo material biológico é encapsulado em uma estrutura de gel e é usado
25 principalmente para imobilização de microorganismos, está totalmente ausente durante a imobilização da glicoamilase. No entanto, sem reticulação em estruturas maiores a enzima é facilmente removida dos poros da matriz.

Um uso alternativo de um gel carreador em processos
30 biotecnológicos é no método de hidrólise de solução de lactose e na produção de D-galactose, D-glicose e galactooligossacarídeos a partir de soluções de lactose com a ajuda de β -galactosidase imobilizada.

Dissacarídeo lactose é sintetizada nas glândulas mamárias da
35 maioria dos mamíferos. Ela é comercialmente produzida a partir

do leite de vaca (com um teor de lactose de 4,5% a 5% em peso) por extração do soro de leite (Baldrick & Bamford, 1997). A lactose presente no leite e em produtos lácteos representa um item nutricional importante. Ela suporta o crescimento de *Bifidobacterium* sp., é a fonte de galactose necessária para a produção de galactolipídios e galactooligossacarídeos, ajuda na absorção de cálcio etc. (Maldonado et al., 1998). Ela tem uma solubilidade baixa e cristaliza a uma concentração de mais de 18% em peso. Parece haver um problema, pois os cristais de lactose causam uma textura semelhante à areia desagradável (Zadow, 1992) na produção de produtos de laticínio, tais como leite condensado e sorvete. Este é o motivo pelo qual a hidrólise de lactose é altamente desejável para esses produtos. Além disso, a hidrólise de lactose também causa uma redução considerável na higroscopicidade de produtos lácteos desidratados, um aumento na doçura e o processo das reações de Maillard é reduzido (Čurda et al., 2001, Zadow, 1992, Rosenberg et al., 1995).

A β -galactosidase é significativa não apenas na hidrólise de lactose no leite, mas também no processamento de soro de leite. O soro de leite é produzido em quantidades bastante grandes como um produto secundário da indústria de laticínios durante a produção de queijo, queijo cottage e caseína. Durante a produção de queijo, mais de 150 milhões de toneladas de soro de leite são produzidas anualmente no mundo (em média, 10 l de soro de leite por kg de queijo) e em todo o mundo a produção de queijo vem crescendo constantemente. O soro de leite ainda não é amplamente processado, mas representa um problema econômico e ecológico (Novalín et al., 2005). Além disso, sua manipulação acarreta em muitas restrições e não é possível liberá-lo livremente no meio ambiente. Metade do produto de refugo produzido é usada na produção de concentrados de proteínas de soro de leite (WPC), mas principalmente para alimentar animais de criação (Rudolfová & Čurda, 2005). O soro de leite também pode ser usado como matéria-prima para a produção de etanol. Considerando-se este fato, ele poderia ser um substrato atraente para processos de

fermentação no futuro (Coté et al., 2004). Por exemplo, durante a produção de etanol é possível usar a levedura *Kluyveromyces* que utiliza lactose. A hidrólise de lactose possibilita o uso de soro de leite engrossado com uma concentração mais alta da conte de C
5 como substrato e dessa forma aumenta consideravelmente o rendimento de fermentação (Rosenberg et al., 1995). Em alguns casos é possível realizar o processo de fermentação de maneira que o microorganismo produtor utiliza somente a glicose presente, ao passo que a galactose remanescente pode ser isolada, purificada
10 ou quimicamente modificada posteriormente (Rosenberg, 2000). Um outro uso significativo da β -galactosidase na indústria alimentícia é a criação de galactooligossacarídeos (GOS). Eles são simultaneamente formados durante a hidrólise de lactose devido à atividade de transglicosilato da β -galactosidade. A atividade de β -
15 galactosidade transglicosilato foi descrita pela primeira na década de 1950 (Aronson, 1952). Os primeiros trabalhos publicados se concentravam no monitoramento dos efeitos favoráveis dos GIS e na busca por métodos ótimos para sua produção (Mahoney, 1998). GOS pertence ao grupo dos chamados probióticos: componentes
20 alimentícios ingeríveis que estimulam seletivamente o crescimento ou, mais precisamente, a atividade de culturas probióticas no trato digestivo do homem. Devido a sua configuração β , os GOS são resistentes à hidrólise pela saliva e enzimas do líquido digestivo, que hidrolisam seletivamente as ligações β -glicosídico (Sako et al.,
25 1999). Os GOS penetram no intestino grosso, onde eles participam em processos muito importantes. A microflora bifidógena metaboliza os GOS dando ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, propiônico, láctico e butírico) e gases (Johnson et al., 1993). Ácidos incipientes estimulam o peristaltismo do intestino e
30 ajudam a absorção de cálcio e ferro diminuindo o pH. Os GOS também são conhecidos como fatores de crescimento de bifidobactérias, que são reconhecidas por seus efeitos benéficos à saúde. Além disso, bifidobactérias utilizam seletivamente galactooligossacarídeos, o que suprime o crescimento de
35 microorganismos indesejáveis no trato digestivo (Pennisin, 1997).

Os GOS também são benéficos à saúde da cavidade oral, quando não utilizados pela microflora oral (*Streptococcus mutants*), e portanto previnem a formação de cáries dentárias (Szilagyi, 1999). As β -galactosidases individuais diferem na quantidade total e na

5 estrutura dos GOS produzidos. Por exemplo, depois de isolamento de β -galactosidases de diferentes cepas do gênero *Bifidobacterium* e seu subsequente uso durante a síntese de GOS a partir de uma solução de lactose a 30%, houve uma diferença evidente na quantidade produzida. No caso de *Bifidobacterium angulatum*,

10 elas formaram 43,8% de todos os sacarídeos presentes em uma solução, ao passo que no caso de *Bifidobacterium pseudolongum* elas constituíram somente 26,8% (Rabiu et al., 2001). No que diz respeito à estrutura, o tipo da ligação glicosídeo recém-formada das duas unidades monossacarídeo (galactose-galactose,

15 galactose-glicose) é no caso de *Bifidobacterium bifidum* $\beta(1-3)$ (Dumortier et al., 1994), oposta à $\beta(1-4)$ no *Bacillus circulans* (Mozaffar et al., 1984) e $\beta(1-6)$ no *Streptococcus thermophilus* (Matsumoto, 1990).

A enzima β -galactosidase foi imobilizada das seguintes maneiras:

20 aprisionamento (Mammarella & Rubiolo, 2005, Rodriguez-Nogales & Delgadillo, 2005), reticulação (Sungur & Akbulut, 1994), adsorção (Carpio et al., 2000), ligação covalente (Hu et al., 1993, Findlay, 1991, Di Serio et al., 2003), encerramento em membranas (Novalin et al., 2005), ou uma combinação desses

25 métodos (descritos mais detalhadamente na parte 1.2.1).

O processo de imobilização de β -galactosidase é associado a certas desvantagens, tais como a perda de atividade enzimática depois da imobilização. A redução na atividade de β -galactosidase depois da imobilização varia de 5% a 90%, e depende do método

30 de imobilização usado. Esta desvantagem é compensada pela possibilidade de reutilização dos imobilizados. A capacidade de preservar uma atividade enzimática e a estabilidade dos imobilizados durante o uso repetido são os parâmetros decisivos para a aplicação de imobilizados em escala industrial (Tanaka &

35 Kawamoto, 1999).

Poliacrilamida e um álcool polivinílico gel são geralmente usados para o método de aprisionamento. Uma matriz de PVA também foi usada para encapsulação de β -galactosidase isolada de fungos filamentosos, com o que sua estabilidade térmica foi aumentada.

5 A enzima reteve 70% de sua atividade anterior depois de 24 horas a 50°C e 5% de sua atividade anterior a 60°C (Batsalova et al., 1987). Khare & Gupta (1988) imobilizaram β -galactosidase de *E. coli* usando uma combinação de dois métodos: reticulação e subsequente encapsulação em uma poliacrilamida gel. No mesmo

10 procedimento, porém usando dimetiladipimidato como agente de reticulação e substâncias preventivas enzimáticas: albumina sérica bovina, cisteína e lactose, a atividade mediu 190% da atividade de imobilizador anterior. A comparação de diferentes métodos de imobilização de β -galactosidase a partir da bactéria termofílica

15 *Thermus aquaticus* mostrou que reticulação e subsequente aprisionamento em grânulos de agarose é o processo preferido para a imobilização de altas concentrações de enzima com o benefício de alta atividade enzimática (Berger et al., 1995). O processo de imobilização permite maior estabilidade da enzima em

20 diferentes condições reacionais. O aprisionamento de β -galactosidase de *A. oryzae* em PVA criogel poroso aumentou a resistênica térmica da enzima, o valor do pH e a força iônica (Rossi et al., 1999).

Adsorção é um método tecnicamente não promissor de

25 imobilização. Fibra de algodão hidrófobo pode servir, por exemplo, como um carreador no qual uma enzima preserva 50% de sua atividade anterior (Sharma & Yamazaki, 1984). Bakken et al., usaram β -galactosidase de *A. oryzae* adsorvendo a mesma em polivinil cloreto de sílica gel na forma de uma membrana (1990)

30 durante a hidrólise de lactose em leite em um reator de fluxo axial. A β -galactosidase imobilizada por adsorção em pó de osso preservou 83% de sua atividade anterior, mas durante quatro hidrólise intermitentes os imobilizados gradativamente perderam sua atividade. Depois da quarta hidrólise, a atividade dos

imobilizados era de apenas 24% do original (Carpio et al., 2000). Esta experiência mostrou a desvantagem do método de imobilização, durante o qual ocorre uma ligeira dessorção. Este efeito pode ser eliminado pela adição de um agente de reticulação adequado (Szczodrak, 2000).

Pietta et al. (1989) imobilizaram β -galactosidase isolada de *A. oryzae* em dois carreadores diferentes usando uma ligação covalente. O primeiro foi zeólito, mas ele não foi conveniente porque ele só se liga a uma pequena quantidade de enzima. Ao contrário, nálion-6 em pó ligou-se covalentemente a uma quantidade maior de enzima e criou um complexo estável. Peters & Rehm (2006) imobilizaram β -galactosidase por ligação covalente a grânulos de polihidroxialcanoato. Os imobilizados formados foram estáveis a longo prazo durante seu armazenamento em diferentes condições, o que ofereceu prova de uma forte ligação entre o carreador e a enzima imobilizada.

Glutardialdeído com dois grupos funcionais reativos é o agente de reticulação usado com mais frequência na imobilização de β -galactosidase (Guisán et al., 1997, Szczodrak, 2000, Zhou & Chen 2, 2001). No entanto, o método de imobilização por reticulação é particularmente usado em combinação com outros métodos (acima mencionados, Panesar et al., no prelo), tal como adsorção ou aprisionamento. Por exemplo β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada usando o método de aprisionamento na forma de fibras compostas de alginato e gelatina, foi então reticulada por glutardialdeído, o que impediu remoção da enzima (Tanriseven & Dogan, 2002). Este tipo de reticulação também foi usado na imobilização de β -galactosidase em um alginato de cobalto gel. No entanto, a liberação de cobalto durante a hidrólise de lactose tornou impossível o uso dos imobilizados na indústria alimentícia (Ates & Mehmetoglu, 1997).

A atividade e a estabilidade da enzima imobilizada são afetadas pelo valor do pH, pela temperatura e pela força iônica (Roy & Gupta, 2003). Comparada com uma enzima livre, a enzima imobilizada tem faixas mais amplas de pH ótimo e temperatura

como mencionado na maioria das obras publicadas. A estabilidade mais alta da β -galactosidase imobilizada a um valor de pH mais baixo e uma temperatura mais alta é uma vantagem na hidrólise de lactose, e além disso, diminuir o valor do pH e aumentar a temperatura reduz o risco de contaminação. Por outro lado, o desvio do pH ótimo e o aumento de estabilidade constituem, nessas condições, uma vantagem durante a hidrólise de lactose em soro de leite doce, cujo pH está no intervalo de 5,5 a 6,0 (Szczodrak, 2000).

β -galactosidase de diferentes fontes microbianas também foi imobilizada com o propósito de produzir galactooligossacarídeos no modo de operação contínua bem como no modo de operação intermitente (Chockchaisawasdee et al. 2005). Comparada com uma enzima livre, a enzima livre produziu concentrações mais baixas de GOS. Esta redução foi causada pela limitação de acesso do substrato à enzima no sistema imobilizado (Mahoney, 1998). A concentração e a estrutura dos GOS em formação dependeram de forma considerável da concentração do substrato inicial e da origem da enzima. O aumento na concentração inicial de lactose de 14% para 23% duplicou a produção de GOS (Foda & Lopez-Leiva, 2000, Chockchaisawasdee et al., 2005).

Shin et al. (1998) imobilizaram uma enzima isolada de *Bullera singularis* ATTC 24193 em grânulos de quitosano. Eles usaram a enzima assim imobilizada na produção de GOS. A experiência durou 15 dias, durante cujo período eles registraram 55% em peso de GOS de todos os sacarídeos (a concentração inicial de substrato sendo de 100 g.l⁻¹) e a produtividade volumétrica de 4,4 g.l⁻¹.h⁻¹. Um outro exemplo de uso de β -galactosidase imobilizada na produção de oligossacarídeos também foi descrita na obra de Albayrak & Yang (2002). Eles atingiram a produção máxima de 26% em peso de todos os sacarídeos (com uma concentração de substrato de 400 g.l⁻¹) e a produtividade volumétrica de 106 g.l⁻¹.h⁻¹ usando uma enzima de *A. oryzae* imobilizada em fibra de algodão. Foda & Lopez-Leiva (2000) testaram um reator de fluxo de membrana com β -galactosidase imobilizada para a preparação

de GOS. Eles alcançaram a produção mais alta (31% em peso) usando soro de leite tratado por ultrafiltração com uma concentração inicial de lactose de 20% em peso. O soro de leite é uma fonte rica de lactose; seu uso na produção de GOS parece ser muito atraente.

Existe uma unidade de modelagem conhecida que é usada na produção de imobilizados, que são produtos- biocatalisadores à base de álcool polivinílico carreador - geralmente produzidos no formato de lentes ou correias pequenas. A mistura de álcool polivinílico gel e biomassa é aplicada a uma correia transportadora contínua usando um mecanismo de modelagem por gotejamento em dosagens precisas e previamente definidas, onde ela é transformada em uma massa adesiva por secagem e gelificação física durante o processo de produção. Atualmente, a unidade de modelagem para a produção de imobilizados à base de um álcool polivinílico carreador consiste em um mecanismo de modelagem disposto na frente do canal de secagem, no interior do qual passa uma correia transportadora contínua (feita de polietileno, por exemplo). O mecanismo de modelagem, conhecido como cabeçote de modelagem, é equipado com uma série de injetores de agulha de modelagem com um diâmetro variando de 0,1 mm a 2,00 mm, que pulsa com a ajuda de eletroímãs com frequências diferentes e comprimentos de pulso diferentes e transferem ou despejam a mistura de álcool polivinílico gel e biomassa na correia transportadora contínua. A unidade de modelagem contém ainda uma seção de reentumescimento colocada na parte superior do canal de secagem, que é formado por um sistema de jatos de aspersão de baixa pressão, que molha (reentumesce) o produto seco. Além disso, a unidade de modelagem é equipada com uma parte coletora, compreendendo um limpador de pressão feito de placa de aço inoxidável enxaguada por jatos de aspersão colocados cima do limpador de pressão de aço inoxidável e montados na armação transportadora da unidade de modelagem, acima do cilindro de acionamento da correia. Ar ambiente ou desumidificado é usado como a fonte do meio de secagem usando

desumidificação atmosférica contínua ou congelamento contínuo, que é aquecido por elementos de aquecimento antes de entrar no canal de secagem, e que assegura a gelificação secando os imobilizados produzidos à base de um álcool polivinílico

5 carreador. As unidades de modelagem dispostas desta maneira são incapazes de produção econômica a longo prazo, em particular devido à dificuldade de remover os imobilizados à base do álcool polivinílico carreador da correia transportadora. Um limpador de aço inoxidável mecânico é usado para limpeza, e subsequente

10 coleta. O limpador é firmemente pressionado contra a superfície da correia transportadora, i.e., com base na elasticidade, e subsequentemente, a massa é removida pelo limpador e cai dentro de um reservatório de coleta. Esta remoção mecânica do produto da correia está longe de ser perfeita, considerando-se

15 particularmente a formação de grandes grumos, aglomerados de álcool polivinílico carreador, e a consequente produção de um produto com baixa atividade ou atividade zero. Uma outra desvantagem é também o considerável desgaste mecânico da correia transportadora contínua da unidade de modelagem. Foi

20 ainda observado que o uso de soluções salinas na parte de reentumescimento da unidade de modelagem faz com que os sais fiquem aderidos à superfície da correia contínua e consequentemente causa alterações na tensão superficial da correia transportadora da unidade de modelagem, e por

25 conseguinte a alteração do formato do produto. Esta alteração significa que durante a remoção e desprendimento dos imobilizados da correia transportadora são inevitáveis danos e a formação de grandes grumos ou aglomerados na maioria dos casos.

30 Sumário da Invenção

As falhas acima mencionadas são eliminadas pelo método para a produção industrial de biocatalisadores, com material biologicamente ativo na forma de enzimas ou microorganismos imobilizados que são imobilizados em um álcool polivinílico gel,

35 e pelo seu uso baseado no fato de que para sua produção industrial

é usado um material biologicamente ativo, que consiste na mistura contendo nativo livre, ou catalisador enzimática pré-tratado (agregado), ou microorganismo produtor, ou suas partes e um álcool polivinílico gel, depois do que a mistura é modelada e gelificada em uma corrente de ar de secagem, a uma temperatura de 80°C a 15°C considerando a extensão de material biologicamente ativo e mantendo a proporção geométrica da superfície para o volume maior que 7 mm^{-1} , e em seguida os biocatalisadores assim produzidos podem ser cultivados e subseqüentemente usados em processos biotecnológicos, nas condições, que mantêm maior produtividade, maior estabilidade produtiva e enzimática, uso prolongado e repetitivo ou controle definível do processo com subsequente separação fácil do biocatalisador, para o processo biotecnológico dado.

As principais vantagens das tecnologias com células imobilizadas são: a considerável redução do custo operacional do processo dado, associada à possibilidade de usar o biocatalisador repetidamente e fazer do processo um processo contínuo, manutenção da alta concentração de biomassa fixa no sistema, e os custos mais baixos de separação da biomassa e isolamento do produto. Se o processo for contínuo, não ocorrerá remoção da biomassa de uma matriz de carreador, as fases de crescimento não-produtivas serão reduzidas, e serão obtidos aumento do rendimento e taxas reacionais mais altas. Também é vantajoso o fato de que o método de controle de processos biotecnológicos de acordo com esta invenção resulta na redução dos volumes de reação e dos intervalos de reação necessários, o que significa uma redução nos custos operacionais e nos investimentos.

É desejável para intensificação dos atuais processos de remoção de compostos de nitrogênio de água potável, água industrial e águas servidas na forma de nitrogênio gasoso, por meio de células imobilizadas, usar um formato de lente do carreador, ou mais precisamente o carreador no formato de cilindro, cuja altura é quatro vezes a vinte vezes menor que o raio inferior, ou no formato de uma correia pequena, ou mais precisamente um bloco,

uma das dimensões do qual é quatro vezes a vinte vezes menor que as outras duas dimensões, de modo que a proporção (geométrica) da superfície para o volume (S/V) do carreador é maior que 7 mm^{-1} .

- 5 É útil para a preparação do biocatalisador, destinado à remoção de poluição de nitrogênio de água potável, água industrial e águas servidas, encapsular bactérias nitrificantes e desnitrificantes em um álcool polivinílico gel, e em seguida gelificar e modelar a mistura de um álcool polivinílico carreador e células bacterianas
10 por secagem no formato de uma lente ou na forma de uma correia pequena à temperatura de 80°C a 15°C , de modo que a proporção da superfície para a superfície dos biocatalisadores é no mínimo $7,0 \text{ mm}^{-1}$, e em seguida endurecer os imobilizados em uma solução de sulfato de sódio adequada. Os imobilizados são então
15 cultivados em um meio nutriente aquoso contendo de 10 mg/l a 1000 mg/l de N-NH_4 e de 10 mg/l a 1500 mg/l N-NO_3 de substrato nitrogenoso a uma temperatura de 20°C a 35°C e um valor de pH de 6,0 a 9,5.

O biocatalisador contendo bactérias nitrificantes é preparado
20 separadamente do biocatalisador contendo bactérias desnitrificantes. Depois do cultivo a biomassa contendo os dois biocatalisadores pode ser usada diretamente nos dispositivos industriais criados para nitrificação e desnitrificação.

Uma cultura mista pura de bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas*
25 *europaeae* e *Nitrobacter winogradskiy*), é usada para a preparação de imobilizados com a ajuda de encapsulação em uma matriz de PVA. As bactérias litotróficas usadas (organismos de crescimento lento) tiram a energia para sua existência do nitrogênio da oxidação de amônia (N-NH_3), no caso das bactérias *Nitrosomonas*
30 *europaeae* e da oxidação de nitritos (N-NO_2) no caso de *Nitrobacter winogradskiy*.

Bactérias desnitrificantes (*Paraccocus denitrificans*), que usam nitrogênio de nitratos (N-NO_3) como um receptor de elétrons ao invés de oxigênio são usadas para a preparação de imobilizados
35 com a ajuda de encapsulação em uma matriz de PVA. As bactérias

desnitrificantes são bactérias organotróficas, que precisam de carbono orgânico para seu crescimento. As soluções de cultura usadas e águas servidas industriais reais não contêm quaisquer agentes orgânicos e portanto é necessário adicionar carbono orgânico - álcoois, sacarídeos e assim por diante, de preferência metanol, porque é barato mas produz relativamente pouca biomassa.

Também é útil o fato de que o formato de lente dos imobilizados mantém o uso ótimo do volume total do gel carreador (carga celular) para o crescimento do microorganismo, e por conseguinte o uso ótimo das propriedades enzimáticas produtivas de microorganismos e enzimas, que pode ser visto na produtividade específica aumentada do processo biotecnológico usando imobilizados em álcool polivinílico (PVA). Os biocatalisadores preparados desta maneira podem ser usados repetidamente no modo de operação de fermentação intermitente, semi-contínuo e contínuo.

É útil para a preparação do biocatalisador, destinado à produção de etanol a partir de substratos de sacarídeo, encapsular a bactéria anaeróbica *Zymomonas mobilis* em um álcool polivinílico gel, e em seguida gelificar e modelar a mistura de álcool polivinílico carreador e células da bactéria *Zymomonas* por secagem a uma temperatura de 80°C a 15°C, e em seguida cultivar os imobilizados em um meio de cultura aquoso contendo de 2 % a 25 % em peso do substrato de sacarídeo a uma temperatura de 20°C a 40°C, e pH de 3,5 a 7,0, na presença de etanol, na faixa de 1 % a 15 % em peso. Também é útil neste processo o fato de que as células imobilizadas são separadas da parte líquida e usadas repetidamente para a produção de etanol, depois de terminada a produção. Os biocatalisadores assim preparados podem ser usados repetidamente no modo de operação de fermentação intermitente, semi-contínuo e contínuo.

É útil para a preparação do biocatalisador, destinado à produção de ácido láctico a partir de substratos de sacarídeo, encapsular a bactéria termofílica *Bacillus coagulans* em um álcool polivinílico

gel, e em seguida gelificar e modelar a mistura de álcool polivinílico carreador e células da bactéria *Bacillus coagulans* por meio de secagem a uma temperatura de 80°C a 15°C, a uma proporção da superfície para o volume dos imobilizados maior que 7,0 mm⁻¹, e em seguida cultivar as células imobilizadas em um meio de cultura aquoso contendo de 2 % a 14 % em peso de substrato de sacarídeo, a uma temperatura de 30°C a 60°C, e um valor de pH de 5,0 a 7,5, na presença de ácido láctico ou seus sais na faixa de 1% a 12% em peso. Também é útil o fato de que as células imobilizadas são separadas da parte líquida e usadas repetidamente para a produção de ácido láctico, depois de terminada a produção. Os biocatalisadores assim preparados podem ser usados repetidamente em um modo de fermentação intermitente, semi-contínuo e contínuo.

É útil usar a cepa *Bacillus coagulans* CCM 4318 para aumentar a produtividade da produção de ácido láctico. Essa cepa bacteriana é caracterizada na alta produtividade de produção de ácido láctico, e considerando-se a extensão do biocatalisador embora conservando a proporção de seu volume para sua superfície de no mínimo 7,0 mm⁻¹, sua produtividade de produção de ácido láctico é ainda maior.

É útil para a preparação do biocatalisador, destinado à preparação de sacarídeo invertido a partir de soluções de sacarídeo, encapsular a enzima invertase em um álcool polivinílico gel, e em seguida gelificar e modelar a mistura de álcool polivinílico carreador e enzima por secagem a uma temperatura de 80°C a 15°C e a uma proporção da superfície para o volume dos imobilizados de no mínimo 7,0 mm⁻¹, e usar a enzima assim preparada para hidrólise das soluções de sacarídeo, que contêm de 2% a 50% em peso de substrato de sacarídeo, a uma temperatura de 20°C a 50°C e um valor de pH de 3,5 a 7,0.

É útil separar a invertase imobilizada da parte líquido, depois de terminada a hidrólise, e usar a mesma repetidamente na produção de sacarose invertida, a hidrólise de sacarose por meio de invertase imobilizada é realizada em um modo intermitente, semi-

contínuo e contínuo.

O presente método para a imobilização de invertase no álcool polivinílico gel (PVA) baseia-se na secagem de gel em uma corrente de ar secagem, a uma temperatura de 80°C a 15°C, embora possa ocorrer a interação entre o gel e os grupos funcionais da invertase. O formato de lente dos imobilizados, no caso a proporção da superfície para o volume do imobilizado é de no mínimo 7,0 mm⁻¹, assegura o uso ótimo do volume total de gel e a obtenção das altas atividades específicas da invertase. A enzima assim imobilizada não é removida da matriz e pode ser usada no modo de operação intermitente, semi-contínuo e contínuo.

É útil para a preparação do biocatalisador, destinado à preparação de D-glicose a partir de sacarídeos superiores, encapsular a enzima glicoamilase em um álcool polivinílico gel e e em seguida gelificar e modelar a mistura de álcool polivinílico carreador e enzima por secagem a uma temperatura de 80°C a 15°C, e a uma proporção da superfície para o volume dos imobilizados de no mínimo 7,0 mm⁻¹, a enzima assim produzida é usada para hidrólise de sacarídeos superiores, que são preparados por hidrólise parcial de um amido contendo 2% a 40% em peso do substrato de sacarídeo a uma temperatura de 20°C a 45°C e um valor de pH de 3,5 a 7.

Para impedir a remoção da glicoamilase, é útil efetuar a imobilização da enzima em um álcool polivinílico gel (PVA) durante o processo de secagem na corrente de ar, a uma temperatura de 80°C a 15°C, quando podem ocorrer as interações entre os grupos funcionais do gel e a glicoamilase. A enzima imobilizada por este método não é removida da matriz e pode ser usada no modo intermitente, semi-contínuo e contínuo. O substrato de sacarídeo assim preparado, que contém glicose, pode ser usado na indústria fermentativa e alimentícia.

Também é útil o fato de que a glicoamilase imobilizada é separada da parte líquida, depois de terminada a hidrólise, e é usada repetidamente na produção de glicose.

Também é útil o fato de que a hidrólise por meio de glicoamilase

imobilizada é realizada em um modo de operação intermitente, semi-intermitente (“fed-batch”) e contínuo.

Também é útil o fato de que glicoamilase imobilizada é usada para a sacarificação do substrato de amido no processo fermentativo de produção de etanol.

Também é útil o fato de que glicoamilase imobilizada é usada para a sacarificação do substrato de amido no processo fermentativo de produção de ácido láctico.

É útil para a preparação do biocatalisador, destinado à hidrólise de soluções de lactose, preparação de D-galactose, D-glicose e galactooligossacarídeos a partir das soluções de lactose, encerrar a enzima β -galactosidase em álcool polivinílico gel, e em seguida gelificar e modelar a mistura de álcool polivinílico carreador e enzima por secagem a uma temperatura de 80°C a 15°C, e a uma proporção da superfície para o volume dos imobilizados de no mínimo 7,0 mm⁻¹, de modo que a enzima produzida é usada para a hidrólise das soluções de lactose, que contêm de 2 % a 50 % em peso de substrato de sacarídeo, a uma temperatura de 20°C a 60°C e um valor de pH de 3,0 a 7,0.

É útil o fato de que a β -galactosidase imobilizada, depois de terminada a hidrólise, é separada da parte líquida e é usada repetidamente para a produção de D-galactose, D-glicose e galactooligossacarídeo, a hidrólise da lactose por meio de β -galactosidase imobilizada é realizada em um modo de operação intermitente, semi-intermitente e contínuo.

Um dispositivo para a preparação dos biocatalisadores imobilizados é o dispositivo de produção industrial, que proporciona uma otimização do volume e da superfície de um carreador biológico, dependendo da extensão de material biologicamente ativo, compreendendo um mecanismo de modelagem por gotejamento montado na frente de um canal de secagem, através do qual passa uma correia transportadora contínua, onde o dispositivo é equipado com pelo menos um cabeçote de modelagem com duas séries de injetores de agulha de modelagem conectados a um tanque de pressão temperado e um

compressor, a correia transportadora e um sistema de secagem - a fonte de ar de secagem, que é soprado por meio de um ventilador para dentro de um sistema de distribuição de ar com elementos de aquecimento incorporados, que passa por dentro do canal de secagem superior, e depois o canal de secagem final inferior e um tanque de reentumescimento, entre os quais está montado um dispositivo de limpeza e coleta, projetado com base em limpeza mecânica e enxague de alta pressão, que é conectado a uma tubulação com uma bomba de alta pressão integrada e uma bomba de baixa pressão que atingem um reservatório de coleta com resfriamento e depois uma caixa de enxague para a limpeza final da correia transportadora contínua por jatos conectados à bomba de baixa pressão, que é conectada a um tanque de enxague por tubulação.

O dispositivo de acordo com esta invenção forma uma montagem completamente nova de um dispositivo de modelagem industrial que consiste em um ou dois cabeçotes de modelagem, equipado com duas séries de injetores de agulha de modelagem, cujo diâmetro é de 0,1 a 2,00 mm, que pulsam por meio de eletroímãs com frequência e comprimento de pulso diferentes, uma correia transportadora com acionamento controlado, um canal de secagem com secagem contrafluxo, o tanque de reentumescimento, um sistema independente de enxágüe e coleta de baixa pressão, e um canal de secagem inferior com secagem contrafluxo na parte inferior do dispositivo de modelagem. Também é útil que o sistema independente de enxágüe de alta pressão por meio de uma solução salina aquosa no reservatório de coleta, compreendendo a bomba de alta pressão para a distribuição de água de pressão para os jatos de alta pressão, faça parte do dispositivo. Maior eficiência da limpeza mecânica da massa da correia transportadora é obtida desta maneira.

Também é importante o fato de que o dispositivo do presente ajuste, e a saber com este tipo de dispositivo de coleta e enxágüe, é capaz de assegurar a produção industrial econômica e ininterrupta à base do álcool polivinílico carreador.

É útil para o funcionamento correto do dispositivo de coleta e limpeza, que faz parte do dispositivo de modelagem, se ele for formado por uma armação lateral, na qual um limpador de polímero mecânico proporcionado o enxágüe a um ângulo de 45° a 80° é colocado sobre um mecanismo de pressão inoxidável, com um mecanismo de pressão de mola e o enxágüe por meio do sistema de jatos de alta pressão, fixado no sistema de distribuição de tubo inoxidável de suporte, que é fixado na armação, para a limpeza dos lados interno e externo da correia transportadora, há os limpadores inferiores e superiores com escovas de polímero fixadas atrás do limpador de polímero mecânico com o mecanismo de mola, e para limpeza final da correia transportadora do produto no local em que ela sai da armação, ele é ainda dotado de limpadores inferiores e superiores. Também é vantajoso o fato de que o mecanismo projetado do dispositivo de coleta e limpeza também limpa o outro lado da correia transportadora contínua, mesmo no caso de sua superfície interna ser irregular, corrugada ou áspera.

O dispositivo de acordo com esta invenção também pode ser usado para limpar outros materiais aderentes da correia transportadora em produções de outros materiais aderentes.

Breve Descrição dos Desenhos

A invenção será melhor ilustrada pelos desenhos, onde a fig. 1 ilustra o esquema da máquina de modelagem, a fig. 2 ilustra o esquema do tanque de reentumescimento, a fig. 3 ilustra a seção parcial do dispositivo de coleta e a fig. 4 ilustra o esquema da caixa de enxágüe.

Descrição da Tecnologia Relacionada

O método para a produção dos carreadores acima mencionados e seu uso no processo de remoção de nitrogênio de águas servidas por meio das células nitrificantes e desnitrificantes imobilizadas em um álcool polivinílico gel, serão descritos nos exemplos a seguir.

Exemplo 1

Imobilizados - biocatalisador para a nitrificação foi preparado pela

encapsulação da cultura mista pura de bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas europaeae* and *Nitrobacter winogradskyi*) em PVA hidrogel.

Imobilizados - biocatalisador para a desnitrificação foi preparado pela encapsulação de bactérias desnitrificantes (*Paraccocus denitrificans*).

A imobilização foi realizada da seguinte maneira: A solução de PVA, que continha 100 g de PVA (álcool polivinílico), 60 g de PEG (polietilenoglicol), 790 g de água destilada, foi preparada. 50 ml da suspensão homogênea de biomassa foram adicionados na solução assim preparada de modo que a concentração de células resultante fosse de 0,60 g de células por 1 dm³ de gel. A mistura de células assim preparada na solução de PVA foi despejada sobre uma placa rígida e em seguida reticulada e modelada em uma corrente de ar seco à temperatura de 80°C a 15°C. Os imobilizados, cuja proporção da superfície para o volume era no mínimo 7 mm⁻¹, foram então transferidos para a solução de sulfato de sódio (0,01 mol/l) e cloreto de amônio (0,1 mol/l) por 60 minutos. Os imobilizados foram cultivados ou armazenados em um meio de armazenamento à temperatura de 4°C, depois de filtração.

No caso de microorganismos nitrificantes, o cultivo intermitente foi realizado em um meio de cultura aquoso com um teor gradualmente crescente do substrato de nitrogênio de 50 mg/l a 500 mg/l de N-NH₄, durante o que o cultivo das bactérias ocorreu a um pH 7,0 e a concentração de oxigênio dissolvido foi maior que 1,5 mg/l.

No caso de microorganismos desnitrificantes, o cultivo intermitente foi realizado em um meio de cultura aquoso, com um teor de substrato de nitrogênio de 200 mg/l de N-NO₃ e outros nutrientes, à temperatura de 20°C a 35°C e pH 7,8 na presença de metanol como substrato de C. O teor de biomassa nos dois biocatalisadores era de cerca de 60 mg a 80 mg de matéria seca de biomassa por 1000 ml de PVA, depois dos cultivos.

Então os imobilizados preparados passaram por fermentações

intermitentes repetitivas. A nitrificação (remoção de nitrogênio da amônia) no reator com o volume efetivo de 17 l, com o conteúdo de 15 l de águas servidas sintéticas (WW), contendo cerca de 800 mg/l de N-NH_4 e 2000 g de preferência biocatalisador com bactérias nitrificantes encapsuladas terminou depois de 4 horas, o que dá uma taxa de nitrificação de cerca de 1500 mg de N-NH_4 /h x kg do biocatalisador, respectivos cerca de 4,8 kg de N-NH_4 /m³ de WW x dia e 36 kg de N-NH_4 /m³ do biocatalisador x dia.

A desnitrificação (remoção de nitrogênio de nitratos) no reator com o volume efetivo de 15,8 l, com o conteúdo de 15 l de águas servidas sintéticas com a concentração de 800 mg/l de N-NO_3 e 800 g do biocatalisador com bactérias nitrificantes encapsuladas, terminou depois de 3 horas na presença de metanol como substrato de C, o que dá uma taxa de desnitrificação de cerca de 2000 mg de N-NO_3 /hr x kg do biocatalisador, respectivos cerca de 6 kg de N-NO_3 /m³ de WW x dia e 45 kg de N-NO_3 /m³ do biocatalisador x dia.

Exemplo 2

Os imobilizados preparados e cultivados, da maneira descrita acima no Exemplo 1, foram usados para a remoção de poluição de nitrogênio de águas servidas reais com alta concentração de poluição de nitrogênio de 200 mg/l a 1000 mg/l de N-NH_4 e um índice de dicromato zero de fato, no ajuste contínuo de nitrificação e desnitrificação.

A unidade de modelo contínuo foi usada para testar a nitrificação e desnitrificação simultâneas, onde o volume efetivo do reator de nitrificação com agitação era de 17 l e o volume efetivo no reator de desnitrificação com agitação era de 3,8 l. A taxa de fluxo das águas servidas industriais reais foi de 35 l/dia com um teor de cerca de 1600 mg/l de N-NH_4 .

2000 g do biocatalisador com bactérias nitrificantes encapsuladas foram adicionados ao reator de nitrificação. 800 g do biocatalisador com bactérias desnitrificantes encapsuladas foram adicionados ao reator de desnitrificação.

A taxa de nitrificação média de cerca de 1000 mg de N-NH_4 /hr x

kg do biocatalisador a uma eficiência de nitrificação de 95% , e a taxa de desnitrificação média na presença de metanol como o substrato de C de cerca de 1600 mg de N-NO₃ /hr x kg do biocatalisador, foi atingida durante a experiência de várias
 5 semanas. A taxa de remoção de poluição de nitrogênio foi de cerca de 1,5 kg/m³ de WW x dia.

Exemplo 3

Os imobilizados, preparados e cultivados da maneira descrita acima no Exemplo 1, foram usados na remoção de poluição de
 10 nitrogênio de águas servidas reais com o alto teor de poluição de nitrogênio de 200 mg/l a 1000 mg/l de N-NH₄ e alto índice de dicromato (> 1000 mg/l) no ajuste contínuo de nitrificação e desnitrificação.

Os imobilizados assim preparados sofreram fermentações
 15 intermitentes. A nitrificação (remoção de nitrogênio da amônia) no reator com o volume efetivo de 17 l, com o teor de 15 l de águas servidas sintéticas (WW) com o teor de cerca de 800 mg/l de N-NH₄ e 2000 g do biocatalisador com bactérias nitrificantes encapsuladas, terminou depois de 12 horas, o que dá uma taxa de
 20 nitrificação de cerca de 500 mg de N-NH₄/hr x kg do biocatalisador, respectivos cerca de 1,6 kg de N-NH₄/m³ de WW x dia e 12 kg de N-NH₄/m³ do biocatalisador x dia.

A desnitrificação (remoção de nitrogênio nitroso) no reator com o volume efetivo de 15,8 l, com teor de 15 l de águas servidas
 25 sintéticas com a concentração de 800 mg/l de N-NO₃ e 800 g do biocatalisador com bactérias nitrificantes encapsuladas, terminou depois de 6 horas na presença de metanol como substrato de C, o que dá uma taxa de desnitrificação de cerca de 1000 mg de N-NO₃/hod x kg do biocatalisador, respectivos cerca de 3 kg de
 30 N-NO₃/m³ de WW x dia e 22,5 kg de N-NO₃/m³ do biocatalisador x dia.

O método para a produção e uso dos carreadores acima mencionados na produção de ácido láctico a partir de substratos de sacarídeo por meio de células imobilizadas de *Bacillus coagulans*
 35 em um álcool polivinílico gel será ilustrado nos exemplos a seguir.

Exemplo 4

A suspensão de esporos de *Bacillus coagulans* CCM 4318 foi preparada por inoculação com 0,2 cm³ da cultura de armazenamento sobre a superfície de MRS ágar com CaCO₃ estéril (3 h, 160°C) em pratos de P. (Ø 9 cm). A incubação ocorreu por 72 h à temperatura de 50°C no termostato de laboratório. Em seguida a cultura esporulada foi revestida com 5 cm³ de água destilada estéril e transferida para um balão de Erlenmayer. Em seguida a suspensão obtida foi incubada por 25 minutos à temperatura de 70°C e em seguida usada na imobilização no álcool polivinílico (PVA) gel.

Foi preparada a solução de PVA, que continha 100 g de PVA (álcool polivinílico), 60 g de PEG (polietileno glicol) e 790 g de água destilada. 50 ml da suspensão de biomassa homogênea foram adicionados à solução assim preparada de modo que a concentração final de células fosse de 0,67 g de células (matéria seca) por 1 dm³ de gel. A mistura de células assim preparada na solução de PVA foi despejada sobre uma placa rígida e em seguida foi reticulada e modelada em uma corrente de ar seco a um gradiente de temperatura: de 80°C a 15°C. Os imobilizados, cuja proporção da superfície para o volume era no mínimo 7 mm⁻¹, foram então transferidos para a solução de sulfato de sódio (0,1 mol/l) por 60 minutos. Os imobilizados foram usados nas fermentações intermitentes ou armazenados em água doce estéril à temperatura de 4°C, depois de filtração.

A propagação da biomassa foi realizada nas fermentações intermitentes repetitivas em um fermentador de laboratório de 5 l com 2,6 l de meio de produção. O meio de produção continha 60 g de sacarose, 10 g de extrato de levedo, 1 g de (NH₄)₂HPO₄, 0,2 g de MgSO₄ x 7H₂O, 0,05 g de MnSO₄ x 4H₂O, 0,01 g de FeSO₄ x 7H₂O em 1 l de água destilada. O meio de produção foi fervido por um curto período de tempo, resfriado para a temperatura de 60°C e em seguida 400 g dos imobilizados molhados foram adicionados. A temperatura foi gradativamente baixada para 45°C durante 1 hora, o pH baixou espontaneamente de 6,9 para 5,0 e em

seguida foi mantido em 5,8 durante a fermentação seguinte por adição da solução aquosa amoniacal a 26%. A fermentação foi realizada de modo intermitente e continuamente agitada (200 rpm). Os imobilizados foram separados do meio de fermentação depois do consumo do substrato de sacarídeo e foram usados em uma nova fermentação. A série de 9 fermentações intermitentes foi realizada de maneira similar nas seguintes condições: a segunda até a quinta conversão ocorreram à temperatura de 50°C e pH 6,0 e a sexta até a décima ocorreram à temperatura de 52°C e um valor de pH de 6,3. A duração total da fermentação foi reduzida durante as respectivas fermentação de 48 horas (a primeira conversão) para 12 horas (a décima conversão) com um rendimento de ácido láctico de 91 a 93%. A concentração de biomassa no PVA gel aumentou para 0,065g_{ccélulas}/g_{imobilizado} depois da décima conversão.

Exemplo 5

A composição de meio, a preparação de imobilizado e a fermentação intermitente foram análogos àquelas mencionadas acima no Exemplo 4, com a diferença de que glicose foi usada no lugar de sacarose no meio de produção (60 g/l). Havia 55,2 g /l de ácido láctico e 1,2 g /l de glicose na décima conversão depois de 14 horas de fermentação.

Exemplo 6

350 g dos imobilizados molhados preparados da maneira descrita acima no Exemplo 4 foram transferidos para um fermentador de 6 l e foram adicionados 2 dm³ do meio de produção, que continha: 60 g de sacarose, 5,0 g de extrato de levedo, 0,8 g de (NH₄)₂HPO₄, 0,2 g de MgSO₄ x 7H₂O, 0,05 g de MnSO₄ x 4H₂O, 0,01 g de FeSO₄ x 7H₂O em 1 l de água destilada. A fermentação foi realizada de forma intermitente, permanentemente agitada (200 rev. /min) à temperatura de 52°C, o pH foi mantido no valor de 6,3 por adição da solução amoniacal (26%). 2 l do meio de produção da mesma composição com um teor de 140 g /l de sacarose foram então adicionados depois que a concentração de sacarose diminuiu para 20g x dm⁻³ à taxa à qual a concentração no

fermentador podia ser mantida na faixa de 15 g/l a 30 g/l. O teor de ácido láctico no meio era de $93,5 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ depois 15 horas, a sacarose residual era de 2,6 g /l.

Exemplo 7

5 A composição de meio e a preparação dos imobilizados foram idênticas àquelas mencionadas acima no Exemplo 5. 350 g dos imobilizados foram transferidos para um fermentador de 6 l depois da 10ª conversão (“10. Conversion”) e foram adicionados $2,5 \text{ dm}^3$ do meio de produção, que continha 60 g de glicose, 5,0 g de extrato de levedo, 0,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,
 10 0,05 g de $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ em 1 l de água destilada. A fermentação foi permanentemente agitada (200 rpm) à temperatura de 52°C , o pH foi mantido no valor de 6,3. O meio de produção foi gradativamente adicionado depois de a concentração
 15 de glicose diminuir para $20 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$ e o meio fermentado da mesma composição foi retirado para manter a concentração de sacarose residual no reator na faixa de 15 g/l a 30 g/l, para manter a concentração de glicose residual na faixa de 10 g/dm^3 a 15 g/dm^3 e a concentração efetiva de ácido láctico na faixa de $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a
 20 $48 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. A fermentação foi realizada de forma contínua por 40 dias, a produtividade volumétrica média do dispositivo variou de $13,5$ a $17,0$ ($\text{g}_{\text{ácido láctico}} \times \text{dm}^{-3} \times \text{h}^{-1}$) no processo.

O método para a produção e uso dos carreadores acima mencionados no processo de produção de etanol a partir de
 25 substratos de sacarídeo por meio de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em álcool polivinílico gel será ilustrado pelos exemplos a seguir.

Exemplo 8

Foram preparados 100 ml do meio de cultura em um balão de
 30 cultura de 250 ml (esterilizado por 20 minutos à temperatura de 121°C). O meio de cultura continha 5 g de extrato de levedo, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de KH_2PO_4 , 100 g de glicose (pH de 5 a 5,5) em 1 l de água destilada. Em seguida o meio preparado foi inoculado com a cultura de *Zymomonas*
 35 *mobilis* CCM 2770, que cresceu no meio de cultura sólido e foi

cultivado estaticamente por 24 a 48 horas à temperatura de 30°C. A biomassa assim preparada foi usada como inóculo (10% v.) em 100 ml do meio de cultura com a composição descrita acima em balões de cultura de 250 ml. O microorganismo foi novamente transferido para o meio de cultura (5% v.) depois de 12 horas de cultivo estático à temperatura de 30°C. O cultivo foi realizado à temperatura de 30°C até o valor de matéria seca da biomassa atingir 1,2 g x dm⁻³, é agitar ligeiramente o meio. A biomassa foi separada por centrifugação (5500 rev./min., 25 min) depois de terminado o cultivo e usada na imobilização.

Foi preparada uma solução de PVA contendo 100 g de PVA (álcool polivinílico), 60 g de PEG (polietileno glicol) e 790 g de água destilada. 50 ml da suspensão de biomassa homogênea foram adicionados à solução assim preparada para que a concentração de células resultante fosse de 0,56 g de células por 1 dm³ de gel. A mistura de células assim preparada na solução de PVA foi despejada sobre uma placa rígida e em seguida foi reticulada e modelada em uma corrente de ar seco a um gradiente de temperatura de: 80°C a 15°C. Os imobilizados, cuja proporção da superfície para o volume era no mínimo 7 mm⁻¹, foram então transferidos para a solução de sulfato de sódio (0,1 mol/l) por 30 a 60 minutos.

A biomassa de bactérias nos imobilizados foi propagada em um fermentador de laboratório de 6 dm³, cada vez com 3 dm³ de um meio de cultura estéril no processo de fermentação, e então: 23% v. do imobilizado no meio de cultura foram cultivados de forma intermitente enquanto agitados constantemente (80 rev./min), de modo que o pH do meio de cultura foi ajustado em 6,5 e diminuiu espontaneamente até pH = 4,0 à temperatura de 25°C. A fase fluida foi removida e um meio fresco foi adicionados aos imobilizados e o processo foi repetido mais uma vez. A fase fluida foi então removida e um meio fresco foi adicionado aos imobilizados e o valor do pH foi ajustado em 6,5 (por uma solução 1 M de NaOH). O valor fórmula pH diminuiu então para pH = 5 por fermentação espontânea enquanto permanentemente agitado

(80 rpm), e em seguida a fermentação foi realizada até depleção da glicose. A fase fluida foi removida e um meio fresco foi adicionado às células imobilizadas e o processo foi repetido 6 vezes. A matéria seca celular nos imobilizados assim preparados
 5 aumentou para 65,8 g de células/dm³ de gel.
 2,2 dm³ de um meio de produção estéril com um teor de glicose de 150 g x dm⁻³ e pH = 5,5 foram adicionados às células imobilizadas assim preparadas (450 g do biocatalisador molhado). A fermentação ocorreu no biorreator de 5 l permanentemente agitado
 10 (80 rpm), o pH foi mantido em 5,0 por adição da solução de NaOH (2 mol/dm³) à temperatura de 30°C. Este meio continha 73,8 g.dm⁻³ de etanol depois de 11 horas de fermentação, ao passo que a concentração de glicose residual foi de 1,8 g.dm⁻³. A produtividade específica de etanol de *Zymomonas mobilis*
 15 imobilizado no PVA carreador atingiu 202 mg_{etanol}/ml_{gel}/h.

Exemplo 9

450 g dos imobilizados molhados, preparados da maneira descrita acima no Exemplo 8, foram adicionados a 2,2 dm³ do meio de produção com um teor de glicose de 200 g.dm⁻³ (pH = 5,0). A
 20 fermentação ocorreu de maneira intermitente, permanentemente agitada (80 rpm), o pH foi mantido em 5,0 por adição da solução de NaOH (2 mol.dm⁻³) à temperatura de 30°C. Seis fermentações foram realizadas dessa maneira. O teor de etanol no meio foi no mínimo de 94,0 g.dm⁻³ a 98,0 g.dm⁻³, depois de cada conversão,
 25 depois de 13 horas, e a glicose residual foi de 3 g.dm⁻³ a 8 g.dm⁻³ (i.e., 94 % a 98 % do rendimento teórico).

Exemplo 10

Os imobilizados preparados e propagados da maneira descrita acima no Exemplo 9 foram usados. 1050 ml de um meio de produção com uma concentração de glicose de 150 g.dm⁻³ (os
 30 imobilizados formavam 30% do volume do meio de fermentação) foram adicionados a 450 g de imobilizados. A fermentação ocorreu de maneira intermitente, permanentemente agitada (80 rpm), o pH foi mantido em 5,0 por adição da solução de
 35 NaOH (2 mol/dm³) à temperatura de 30°C. 1500 ml de um meio

de cultura com uma concentração de glicose de 320 g.dm^{-3} foram gradativamente adicionados, depois de a concentração de glicose diminuir para um valor de 20 g.dm^{-3} , a uma taxa tal que mantivesse a concentração de glicose residual no fermentador de
 5 15 g.dm^{-3} a 30 g.dm^{-3} . O teor de etanol no meio foi de $113,5 \text{ g.dm}^{-3}$, i.e., 91% do rendimento teórico, depois 20 horas, a glicose residual era de $4,6 \text{ g.dm}^{-3}$.

Exemplo 11

Os imobilizados de *Z. mobilis* CCM 2770 preparados e
 10 propagados da maneira descrita acima no Exemplo 8 foram usados. 450 g dos imobilizados molhados foram transferidos para $2,2 \text{ dm}^3$ de um meio de cultura com 150 g.dm^{-3} de glicose, pH ajustado em 5,0. A fermentação ocorreu a um pH = 5,0 e à temperatura de 30°C . Um meio de cultura com um teor de
 15 glicose de 50 g.dm^{-3} foi continuamente adicionado, depois de o teor de glicose diminuir no fermentador para um valor de 10 g.dm^{-3} a 20 g.dm^{-3} , e o meio fermentado foi removido a uma taxa de diluição tal que a concentração de glicose residual no fermentador ficou na faixa de 17 g.dm^{-3} a 30 g.dm^{-3} e a concentração efetiva de
 20 etanol ficou na faixa de 58 g.dm^{-3} a 65 g.dm^{-3} . A fermentação foi realizada de forma contínua por 50 dias, enquanto a produtividade volumétrica do dispositivo foi de $30 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{dm}^{-3}.\text{h}^{-1}$, que correspondente à produção específica de etanol de $140 \text{ mg}_{\text{etanol}}/\text{ml}_{\text{gel}}/\text{h}$.

25 Exemplo 12

O procedimento é o mesmo que aquele do exemplo 8, *Zymomonas mobilis* subsp. *pomacii* CCM 2771 foi usado como microorganismo de produção. O meio continha $68,3 \text{ g.dm}^{-3}$ de etanol depois de 15 horas de fermentação, enquanto a
 30 concentração de glicose residual foi de $6,8 \text{ g.dm}^{-3}$.

O método para a produção e uso dos carreadores acima mencionados na preparação de açúcar invertido a partir de soluções de sacarose por meio de invertase encapsulada em álcool polivinílico gel será ilustrado pelos exemplos a seguir.

35 Exemplo 13

Foi preparada uma solução de PVA, que continha 100 g de PVA (álcool polivinílico), 60 g de PEG (polietileno glicol), 790 g de água destilada. 50 ml da preparação de enzima Invertase (Sigma) (concentração de enzima 100 g/l) foram adicionados na solução
5 assim preparada. A mistura de enzima assim preparada na solução de PVA foi despejada sobre uma placa rígida e em seguida reticulada e modelada em uma corrente de ar seco a um gradiente de temperatura de : 80°C a 15°C. Os imobilizados, cuja proporção da superfície para o volume era no mínimo 7 mm⁻¹, foram
10 transferidos para a solução de sulfato de sódio (0,1mol /l) por 10 a 120 minutos. Os imobilizados preparados podem ser armazenados em 10 mM da solução de tampão acetato (pH = 4,5) à temperatura de 4°C.

A enzima imobilizada assim preparada pode ser usada na
15 hidrólise de sacarose dissolvida em 10mM de tampão acetato com pH = 4,5. 120 g de invertase imobilizada foram adicionados a 1000 ml de solução de sacarose (100 g/l). A hidrólise foi realizada com agitação permanente (80 rpm) de forma intermitente à temperatura
20 de 30°C. A sacarose está completamente hidrolisada depois de 50 minutos de hidrólise dando glicose e frutose.

Exemplo 14

120 g dos imobilizados molhados, preparados da maneira descrita acima no Exemplo 13, foram adicionados a 1000 ml de solução de
25 sacarose com a concentração de 450 g/l (pH = 4,5, tampão acetato 10mM) à temperatura de 30°C. A hidrólise ocorreu de forma intermitente, continuamente agitada. A concentração de sacarose residual é dessa maneira de 10,1 g/l depois de 360 minutos.

Exemplo 15

30 120 g de imobilizados molhados, preparados da maneira descrita acima no Exemplo 13, foram adicionados a 1000 ml de solução de sacarose com a concentração de 280 g/l (pH = 4,5, tampão acetato 10 mM) à temperatura de 30°C. A hidrólise foi realizada de forma intermitente, permanentemente agitada. A concentração de
35 sacarose residual é dessa maneira de 1,8 g of/l depois de

360 minutes. A fase fluida foi removida depois da hidrólise, e invertase imobilizada foi usada na hidrólise intermitente repetida pelo procedimento mencionado acima. A concentração de sacarose residual depois de 240 minutes de hidrólise foi de 3 g/l
5 depois de 6 conversões.

Exemplo 16

Os imobilizados preparados da maneira descrita acima no exemplo 13. 25 g de imobilizados molhados foram transferidos para 0,5 l de melaços com uma concentração de sacarose de 120 g/l, pII 4,5
10 (ajustado por H_2SO_4). A hidrólise foi realizada a $\text{pH} = 4,5$, 30°C e agitação a 200 rpm. Os melaços com a concentração de 120 g /l foram continuamente introduzidos no fermentador, e o meio hidrolisado foi removido a uma taxa tal para atingir uma concentração de sacarose de 30 g/l a 40 g/l (66% a 75% de
15 conversão), depois de a quantidade de sacarose no fermentador diminuir para um valor de 30 g/l a 40 g/l. A atividade específica do imobilizado é de $0,35 \text{ g /g.h}^{-1}$ (g da sacarose considerada por g do imobilizador por hora) em tal modo.

Exemplo 17

20 Os imobilizados preparados da maneira descrita acima no exemplo 13 foram usados. 25 g de imobilizados molhados foram transferidos para 0,5 l de melaços com uma concentração de sacarose de 120 g/l, pII 4,5. A hidrólise ocorreu a $\text{pH} = 4,5$, temperatura de 45°C e agitação a 200 rpm. Os melaços com a
25 concentração de 120 g /l foram continuamente introduzidos no fermentador, e o meio hidrolisado foi removido a uma taxa tal para atingir uma concentração de sacarose de 30 g/l a 40 g/l (66% a 75% de conversão), depois de a quantidade de sacarose no fermentador diminuir para um valor de 30 g/l a 40 g/l. A atividade
30 específica do imobilizado é de $0,55 \text{ g /g.h}^{-1}$ a $0,60 \text{ g /g.h}^{-1}$ (g da sacarose considerada por g do imobilizador por hora) em tal modo de hidrólise, que é realizada continuamente por 500 horas.

O método para produção e uso dos carreadores acima mencionados no processo de produção de glicose a partir de
35 hidrolisados de amido por meio glicoamilase encapsulada em

álcool polivinílico gel será ilustrado pelos exemplos a seguir.

Exemplo 18

Foi preparada a solução de PVA, que continha 100 g de PVA (álcool polivinílico), 60 g de PEG (polietilenoglicol), 790 g de água destilada. 50 ml da preparação de enzima SUN Ultra L (Novozymes) foram adicionados à solução assim preparada. A mistura de enzima assim preparada na solução de PVA foi despejada sobre uma placa rígida e em seguida foi reticulada e modelada em uma corrente de ar seco a um gradiente de temperatura de: 80°C a 15°C. Os imobilizados, cuja proporção da superfície para o volume é no mínimo de 7 mm⁻¹, foram então transferidos para a solução de sulfato de sódio (0,1mol/l) por 10 a 120 minutos. Os imobilizados preparados podem ser armazenados em 30 %em peso de glicose, dissolvidos em 10mM de solução de tampão acetato (pH = 4,5) à temperatura de 4°C.

A enzima imobilizada assim preparada foi usada na hidrólise de hidrolisado de amido, por exemplo, melaços de maltose (composição: sacarídeos superiores 33% em peso, maltotriose 20% em peso, maltose 53% em peso, glicose 4% em peso), dissolvido em 10mM de solução de tampão acetato com pH = 4,5. 120 g de glicoamilase imobilizada foram adicionados a 1000 ml da solução assim preparada com uma concentração de sacarídeos de 100 g/l. A hidrólise foi realizada permanentemente agitada (200 rpm) de forma intermitente à temperatura de 30°C. O meio continha 70 g/l a 80 g/l de glicose depois de 60 minutos de hidrólise.

Exemplo 19

5000 ml de meio de maltose com uma concentração de 250 g de sacarídeos/l (pH = 4,5) foram adicionados a 200 g de imobilizados molhados, preparados da maneira descrita acima no Exemplo 18 à temperatura de 40°C. A hidrólise ocorreu de forma intermitente, permanentemente agitada. 180 g/l de glicose foram criados desta maneira em 6 horas. A fase fluida foi removida depois da hidrólise e a glicoamilase imobilizada foi usada em hidrólises intermitentes repetidas no procedimento mencionado acima. A concentração da

glicose produzida é de 178 g/l depois de 6 horas de hidrólise depois da sexta conversão.

Exemplo 20

Os imobilizados preparados da maneira descrita acima no exemplo 18 foram usados. 25 g de imobilizados molhados foram transferidos para 0,5 l de melaços de maltose com uma concentração de sacarídeos de 100 g/l, pH 4,5. A hidrólise ocorreu a um pH = 4,5, uma temperatura de 30°C e agitação a 200 rpm. Os melaços de maltose com uma concentração de sacarídeos de 100 g/l foram continuamente introduzidos no fermentador e o meio hidrolisado foi removido a uma taxa tal para obter uma concentração de glicose de 50 g/l a 60 g/l (50% a 60% de conversão) depois de a concentração de glicose aumentar no fermentador para um valor de 55 g/l a 65 g/l. A atividade específica do imobilizador é de 0,3 g/g.h⁻¹ a 0,4 g/g.h⁻¹ (g da glicose produzida por g do imobilizado por hora), no modo de hidrólise realizada continuamente por 900 horas.

Exemplo 21

Os imobilizados preparados da maneira descrita acima no exemplo 18 foram usados. 25 g de imobilizados molhados foram transferidos para 0,5 l de melaços de maltose com uma concentração de sacarídeos de 100 g/l, pH 4,5. A hidrólise ocorreu a um pH = 4,5, uma temperatura de 45°C e agitação a 200 rpm. Os melaços maltose com uma concentração de sacarídeos de 100 g/l foram continuamente introduzidos no fermentador e o meio hidrolisado foi removido a uma taxa tal para obter uma concentração de glicose de 60 g/l a 70 g/l (60% a 70% de conversão) depois de a concentração de glicose aumentar no fermentador para um valor de 55 g/l a 65 g/l. A atividade específica do imobilizado foi de 0,55 g/g.h⁻¹ a 0,6 g/g.h⁻¹ (a glicose produzida por g do imobilizado por hora), no modo de hidrólise realizada continuamente por 1500 horas.

Exemplo 22

Os imobilizados preparados da maneira descrita acima no exemplo 18 foram usados. O meio com a composição de: melaços de

maltose com uma concentração de sacarídeos de 195 g/l, de extrato de levedo 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l, KH_2PO_4 , 1 g/l, todos dissolvidos em água destilada, pH = 4,5. 50 g do imobilizador com a glicoamilase imobilizada foram adicionados a 1 l do meio estéril assim preparado. A suspensão foi então inoculada com 10% vol. de inóculos de *Zymomonas mobilis* no período de crescimento exponencial do microorganismo. A utilização simultânea de glicose nascente e a produção de etanol por meio do microorganismo ocorreu no processo de hidrólise. 70 g/l de etanol foram produzidos desta maneira em 13,5 horas.

Exemplo 23

Os imobilizados preparados da maneira descrita acima no exemplo 18 foram usados. O meio com a composição de: melaços de maltose com um teor de sacarídeos de 80 g, 10 g de extrato de levedo, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ todos dissolvidos em 1 l de água destilada, pH = 6,0 foi usado nas conversões. 50 g do imobilizado com glicoamilase imobilizada foram adicionados a 1 l do meio estéril assim preparado. A suspensão foi inoculada com 5 % vol. de suspensão de esporos de *Bacillus coagulans*. A utilização simultânea de glicose nascente e a produção de ácido láctico por meio do microorganismo ocorre no processo de hidrólise. Há 55,2 g/l de ácido láctico e 1,2 g/l de glicose no meio depois de 24 horas de fermentação.

O método para produção e uso dos carreadores acima mencionados na hidrólise de soluções de lactose, em preparação de D-galactose, D-glicose e galactooligossacarídeos por meio de β -galactosidase encapsulada em álcool polivinílico gel, será ilustrado nos exemplos a seguir.

Exemplo 24

Foi preparada uma solução de PVA, que continha 100 g de PVA (álcool polivinílico), 60 g de PEG (polietileno glicol), 790 g de água destilada. 50 ml da preparação de enzima Lactozyme (Novozymes) foram adicionados à solução assim preparada. A mistura assim preparada da enzima na solução de PVA foi

despejada sobre uma placa rígida e em seguida reticulada e modelada em uma corrente de ar seco a um gradiente de temperatura de: 80°C a 15°C. Os imobilizados, cuja proporção da superfície para o volume é no mínimo de 7 mm⁻¹, foram então transferidos para a solução de tampão fosfato de potássio, (pH = 6,5) por 10 a 120 minutos. Os imobilizados preparados podem ser armazenados na solução de tampão fosfato (pH = 6,5) com a adição de etanol 5% a 10%, à temperatura de 4°C.

A enzima imobilizada preparada dessa maneira teve uma atividade inicial de 900 ± 100 U.cm⁻³.

Exemplo 25

Os imobilizados preparados da maneira descrita acima no exemplo 24 foram usados. A solução de lactose em tampão fosfato 0,1 M com pH = 6,5 e com adição de 2 mM de MgCl₂, foi usada na hidrólise. 130 g de β-galactosidase imobilizada foram adicionados a 1000 ml da solução assim preparada com uma concentração de lactose de 100 g/l. A hidrólise ocorreu com agitação permanente (200 rpm), de forma intermitente, à temperatura de 30°C. A fase fluida foi removida depois da hidrólise e a β-galactosidase imobilizada foi usada em hidrólises intermitentes repetidas no procedimento acima mencionado. O meio continha 13 g/l a 2 g/l de lactose depois de 210 minutos de hidrólise.

Exemplo 26

Os imobilizados preparados da maneira descrita acima no exemplo 24 foram usados. A solução de lactose em tampão fosfato 0,1 M com pH = 6,5 e com adição de 2 mM de MgCl₂ foi usada na hidrólise. 130 g de β-galactosidase imobilizada com uma atividade inicial de 786 U.cm⁻³ foram adicionados a 1000 ml da solução assim preparada com uma concentração de lactose de 100 g/l. A hidrólise ocorreu continuamente agitada (200 rev./min.) de forma intermitente à temperatura de 30°C. A duração de conversão foi constante. A atividade do imobilizador diminuída de 5% a 10% foi observada depois de 25 hidrólises intermitentes, que em geral duraram 160 horas.

A disposição do dispositivo de modelagem para a produção dos

imobilizados, à base do carreador álcool polivinílico, que foram mencionados nos exemplos acima, será explicada no texto a seguir. É óbvio que a descrição a seguir apenas ilustra os princípios de uma aplicação dos princípios da invenção.

- 5 A figura 1 mostra a presente versão de construção do dispositivo de modelagem para a produção dos immobilizados à base de um carreador do tipo álcool polivinílico, ajustada para produção industrial contínua. A versão de construção inclui o conjunto de modelagem por gotejamento, situado na frente do canal de
- 10 secagem superior 2, que é formado pelo cabeçote ou cabeçotes duplos de modelagem por gotejamento (“dropping casting double-row head or heads”) 17, que é (são) equipado(s) com duas séries de injetores de modelagem e conectados ao tanque de pressão temperado 15 e um compressor ou um reservatório de ar de
- 15 pressão 16. O canal de secagem superior 2, dentro do qual passa uma correia transportadora contínua 1 com acionamento controlado, é equipado com um sistema de secagem - a fonte 4 de ar de secagem, do qual o ar desumidificado é transportado através do primeiro ventilador auxiliar 19 para o sistema de distribuição
- 20 de ar 6 com elementos de aquecimento 5 integrados, que atinge o canal de secagem superior 2 em vários pontos. A correia transportadora contínua 1, depois de deixar o canal de secagem superior, passa através do tanque de reentumescimento 7 e do canal de secagem final 3, que fica situado no lado oposto - inferior
- 25 do dispositivo de modelagem, para um lado do qual dá a tubulação com o segundo ventilador auxiliar 20 para o transporte de ar de secagem do canal de secagem superior, usado para a secagem final da correia transportadora depois de deixar a caixa de enxague 13, e do outro lado do qual a saída 18 de ar gasto úmido dá para fora.
- 30 O dispositivo de coleta e limpeza 9, projetado com base em limpeza mecânica e enxague de alta pressão, que é conectado ao reservatório de coleta 8, contendo a solução de sais coletores de reentumescimento 24 e equipado com resfriamento, pela tubulação com uma bomba de alta pressão 10 e uma bomba de baixa pressão

11 integradas, e a caixa de enxague 13, para limpeza da correia transportadora contínua 1 por meio de jatos ligados à bomba de baixa pressão 14, que é conectada pela tubulação com o tanque de enxague 12 contendo água desmineralizada, são integrados entre o
 5 tanque de reentumescimento 7 com a solução de sais de reentumescimento 24 e o canal de secagem final 3.

A função do dispositivo para a produção de imobilizados à base do carreador álcool polivinílico carreador é a seguinte: A mistura de álcool polivinílico gel e matéria biológica é transferida ou
 10 despejada, do conjunto de moldagem por gotejamento, formado por dois cabeçotes de modelagem 17 equipados com duas séries de agulhas de modelagem, cujo diâmetro é de 0,1 a 2,00 mm, pulsando por meio de eletroímãs de frequência e comprimento de pulso diferentes, sobre a correia transportadora contínua 1 com
 15 acionamento controlado, que atravessa o canal de secagem superior 2. A mistura para moldagem por gotejamento é introduzida no tanque de pressão temperado 15, que é conectado ao compressor ou ao tanque de ar pressão 16. A mistura secando sobre a correia transportadora 1 é presa por um ar livre de
 20 umidade-água obtido do desumidificador atmosférico contínuo 4, que passa pelo primeiro ventilador auxiliar 19 e pelos elementos de aquecimento 5, colocados na tubulação de distribuição de ar condicionado 6, que controla o gradiente de temperatura no canal de secagem superior e leva para dentro de cada segmento do canal de secagem superior 2. A mistura seca, aderida, presa à correia
 25 transportadora contínua 1 atravessa então o tanque de reentumescimento 7 com a solução de sais de reentumescimento, depois do que os produtos, i.e., os imobilizados à base do carreador álcool polivinílico, são desprendidos no dispositivo de coleta e limpeza 9. Este dispositivo é equipado com o sistema para suprimento de água de alta pressão, formado pela bomba de alta
 30 pressão 10 e jatos, e esse sistema é conectado ao circuito independente. Os produtos que desprendem da correia transportadora ocorrem por meio da lâmina limpável de polímero e

os jatos por uma solução salina aquosa suprida pela bomba de alta pressão 10. A correia transportadora 1 é por fim tratada por meio dos jatos situados na caixa de enxágue 13, bomba de baixa pressão 14 e a água desmineralizada de enxágue é coletada no tanque de enxágue 12, dentro do qual ela escoar da caixa de enxágue 13. O sistema de distribuição de água de baixa pressão para enxágue da correia transportadora é conectado ao circuito independente. A correia transportadora molhada 1 é então finalmente secada no canal de secagem inferior 3, dentro do qual um ar de secagem é soprado do canal de secagem superior através da tubulação, na qual o segundo ventilador auxiliar 20 é instalado, enquanto o ar gasto molhado é conduzido para fora do canal de secagem inferior 3 através da descarga de ar gasto molhado 18.

A figura 2 mostra a construção do tanque de reentumescimento. O tanque de reentumescimento 7 nesta versão consiste no tanque 21 com um fundo oblíquo, no ponto mais baixo do qual está situada a válvula de descarga 22 para deixar sair o produto e a solução de sais de reentumescimento. A correia transportadora 1, conduzida pelo par de rolos carregadores dianteiros 23, que simultaneamente especifica a imersão da correia transportadora na solução salina aquosa de reentumescimento 24, com o que o tanque 21 é enchido, atravessa o tanque 21.

A figura 3 mostra a construção do dispositivo de coleta e limpeza 9. O dispositivo de coleta e limpeza 9 nesta versão consiste na armação lateral 25, o limpador de polímero mecânico é situado sobre o conjunto de pressão de aço inoxidável 27 com o conjunto de pressão de mola 28. Esse conjunto de pressão de mola 28 é formado pelo parafuso de regulagem de impulso 34 com arruela, sobre o qual a mola 35 é colocada. O dispositivo de coleta e limpeza 9 é ainda formado por jatos de alta pressão 26, unidos no sistema de distribuição de tubos de aço inoxidável de suporte fixados na armação 25, que permitem o enxágue a um ângulo de 45° a 80°. O sistema de distribuição de tubos de aço inoxidável 30, é equipado com a regulagem altitudinal, que é presa

pelos parafusos de regulagem 31. O limpador inferior e o limpador superior 29, com as escovas de polímero 32 que são fixadas na armação superior 33, ao passo que a correia transportadora 1 passa entre os limpadores, são firmemente situadas em seu lado interno e também externo atrás do limpador mecânico 27, para limpeza do lado interno da correia transportadora. A correia transportadora é equipada com o limpador de polímero inferior e também com o limpador de polímero superior 29 para o tratamento final do lado interno e também do lado externo da correia transportadora 1 no ponto de seu caminho para fora da armação 25.

A função do dispositivo de coleta e limpeza 9 é guiada para a linha de produção através do tanque de reentumescimento 7, do qual a correia transportadora 1 passa para fora já da seção inferior do dispositivo, portanto na direção oposta. É óbvio que o produto aplicado na seção do dispositivo superior sobre a correia transportadora 1 está agora virado para baixo na posição vertical. O método para sua remoção da correia transportadora baseia-se no fato de que o limpador mecânico 27 e também os jatos de alta pressão 26 afetam em cooperação o produto aderido ao lado externo da correia transportadora 1. O produto sobre a correia transportadora 1 é primeiro levado para o enxágue de alta pressão, que é garantido pelo sistema de distribuição de pressão da solução salina aquosa distribuída pelos jatos de pressão 26, que operam a um ângulo de 40° a 80° contra o limpador mecânico 27 com o mecanismo de pressão de mola 28, cuja inclinação em relação à correia transportadora 1 também é controlável na faixa de 5° a 15°. Os limpadores inferiores e superiores 29 firmemente fixados, com as escovas de polímero, que simultaneamente efetuam o tratamento final da correia transportadora 1 sobre seu lado interno e também seu lado externo, são montados atrás do limpador de polímero mecânico de molas 27 sobre o conjunto de pressão de aço inoxidável 28. A correia transportadora 1 deixa a armação 25 pelos limpadores de polímero inferior e superior 29, pelos quais

ela é finalmente tratada em ambos os lados.

A figura 4 mostra a construção da caixa de enxague 13. A caixa de enxague 13 nesta versão é formada pela parte superior 36 com a tampa 43 e a parte inferior 37 com a descarga 38 conectadas, entre as quais passa a correia transportadora 1 ao passo que estas partes são conectadas à armação da máquina de modelagem 39. Além disso, o jato de enxague superior 40 conectado ao tubo de abastecimento de água de enxague 41 é montado na parte superior 36 e da mesma forma o jato de enxague inferior 42 conectado ao tubo de abastecimento 41 é montado na seção inferior 37. Os limpadores de polímero ajustáveis 44 são fixados nos dois lados da seção superior 36 para remover a água da correia transportadora e da mesma maneira os limpadores 45 são fixados nos dois lados da parte inferior 37. A caixa de enxague 13 é fixada à armação da máquina de modelagem 39 pelos segmentos de montagem superiores e inferiores 46 e 47.

UTILIDADE INDUSTRIAL

A presente invenção pode usada na produção dos imobilizados, que destinam-se a aplicações na indústria alimentícia, farmácia e no tratamento de águas servidas, em particular na remoção biológica de compostos de nitrogênio da água potável, da água de abastecimento e de águas servidas (águas servidas de despejos, agrícolas, municipais, industriais), presentes onde vários compostos de nitrogênio são convertidos em nitrogênio gasoso pela atividade fisiológica de bactérias nitrificantes e desnitrificantes, e ainda no processo de produção de ácido láctico, etanol, glicose e melaços de glicose-frutose, na hidrólise de lactose em D-galactose e na produção de galactooligossacarídeos. Todos eles são produzidos por meio do dispositivo que oferece produção industrial contínua com capacidade de 1 kg a 10 kg dos imobilizados da marca LentiKats por hora.

O dispositivo para a produção dos imobilizados, destinado à indústria alimentícia, aplicações de farmácia e ao tratamento de águas servidas, pode ser usado em produção contínua.

LISTA DE SÍMBOLOS RELACIONADOS

- 1 -- correia transportadora com acionamento controlado
- 2 - canal de secagem superior
- 3 - canal de secagem inferior
- 4 - fonte de ar de secagem – desumidificador de adsorção contínua
- 5 5 – elementos de aquecimento na tubulação de ar
- 6 – sistema de distribuição de ar de secagem
- 7 – tanque de reentumescimento na seção inferior do dispositivo de modelagem de produção
- 8 – reservatório de coleta com resfriamento
- 10 9 - dispositivo de coleta de alta pressão
- 10 – bomba de alta pressão
- 11 - bomba de distribuição de baixa pressão
- 12 – tanque de enxágüe
- 13 - caixa de enxágüe
- 15 14 --bomba de enxágüe de baixa pressão
- 15 - tanque de pressão temperado de 10 l a 12 l
- 16 - compressor
- 17 – cabeçote de modelagem por gotejamento
- 18 - descarga de ar úmido residual
- 20 19 - o primeiro ventilador
- 20 – o segundo ventilador
- 21 - tanque
- 22 - válvula de escape
- 23 – rolo carregador
- 25 24 - solução salina de reentumescimento
- 25 - armação lateral
- 26 - jatos
- 27 - limpador mecânico
- 28 – mecanismo de pressão de mola
- 30 29 - limpador superior, inferior
- 30 - tubo de distribuição
- 31 - parafusos de ajuste
- 32 - escova
- 33 - armação protetora superior
- 35 34 - parafuso de regulagem de impulso

- 35 - mola
- 36 -- seção superior da caixa
- 37 --seção inferior da caixa
- 38 - descarga
- 5 39 -- armação da máquina de modelagem
- 40 -- jato de enxágüe superior
- 41 -- tubo de abastecimento
- 42- jato de enxágüe inferior
- 43 - tampa
- 10 44 - limpador ajustável
- 45 - limpador
- 46 -- segmento de montagem superior
- 47 -- segmento de montagem inferior

REIVINDICAÇÕES

1. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção” caracterizado por ser um método para a produção industrial de biocatalisadores com material biologicamente ativo na forma de enzimas ou microorganismos imobilizados que são imobilizados em álcool polivinílico gel e uso dos mesmos, onde o material biológico ativo, formado pela mistura de catalisador enzimático nativo livre ou pré-tratado (agregado), ou microorganismo de produção, ou parte dos mesmos, e do álcool polivinílico gel, é usado para sua produção industrial, a mistura é gelificada e modelada em uma corrente de ar de secagem na faixa de temperatura de 80°C a 15°C considerando a extensão do material biologicamente ativo, à proporção geométrica de biocatalisador da superfície para o volume mantida maior que 7 mm^{-1} , e consequente os biocatalisadores assim preparados podem ser cultivados ou armazenados e em seguida usados em processos biotecnológicos nas condições, que garantem ao processo biotecnológico dado maior produtividade, maior estabilidade de produção e enzimática, uso prolongado e repetido ou controle definível do processo com consequente separação fácil do biocatalisador.
2. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado onde o biocatalisador produzido industrialmente é repetidamente usado em repetidas fermentações intermitentes ou em repetidas fermentações contínuas ou semi-intermitentes.
3. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a

- reivindicação 1 ou 2, caracterizado onde microorganismos nitrificantes são encapsulados no álcool polivinílico gel para a preparação do biocatalisador, destinado à remoção de poluição de nitrogênio de águas servidas, e o biocatalisador é modelado na forma de lentes ou de correias pequenas, e consequentemente os imobilizados são cultivados em meio nutriente aquoso com o teor de substrato de nitrogênio de 50 mg/l a 500 mg/l de N-NH₄, a pH 7,0, à temperatura de 20°C a 35°C, e a concentração de oxigênio dissolvido maior que 1,5 mg/l.
4. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado onde microorganismos desnitrificantes são encapsulados em álcool polivinílico gel para a preparação do biocatalisador, destinado à remoção de poluição de nitrogênio de águas servidas, e o biocatalisador é então modelado na forma de lentilhas ou fitas, e consequentemente os imobilizados são cultivados em um meio nutriente aquoso com um teor de substrato de nitrogênio de 50 mg/l a 500 mg/l de N-NO₃, pH 7,8, à temperatura de 20°C a 35°C, e na presença de metanol como um substrato de C no caso de microorganismos desnitrificantes.
5. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado onde bactérias anaeróbicas *Zymomonas mobilis* são encapsuladas no álcool polivinílico gel para a preparação do biocatalisador, destinado à produção de etanol a partir de substratos de sacarídeos, e o biocatalisador é então modelado na forma de lentes ou de correias pequenas, e consequentemente os imobilizados são cultivados em um meio nutriente aquoso com o teor de substrato de sacarídeo de 2% a 25% em peso à temperatura de 20°C a 40°C e pH 3,5 a 7,0, na presença de etanol de 1% a 15% em peso.

6. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado onde bactérias termofílicas *Bacillus coagulans* são encapsuladas no álcool polivinílico gel para a preparação do biocatalisador, destinado à produção de ácido láctico a partir de substratos de sacarídeos, e o biocatalisador é então modelado na forma de lentes ou de correias pequenas, e consequentemente os imobilizados são cultivados em um meio nutriente aquoso com o teor de substrato de sacarídeo de 2% a 14% em peso à temperatura de 30 a 60°C e pH 5,0 a 7,5, na presença de ácido láctico ou seus sais de 1% a 12% em peso.
7. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado onde a cepa *Bacillus coagulans* CCM 4318 é de preferência usada para a produção.
8. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado onde a enzima *glicoamilase* é encapsulada em um álcool polivinílico gel para a preparação do biocatalisador, destinado à hidrólise de substratos de amido e celulose, e o biocatalisador é modelado na forma de lentilhas ou fitas.
9. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado onde a enzima *invertase* é encapsulada no álcool polivinílico gel para a preparação de biocatalisador, destinados à hidrólise de substratos de sacarose, e o

biocatalisador é modelado na forma de lentes ou de correias pequenas.

10. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou
5 Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado onde a enzima *β -galactosidase* é encapsulada no álcool polivinílico gel para a preparação do biocatalisador, destinado à hidrólise de lactose e à
10 produção de D-galactose, D-glicose e galactooligossacarídeos, e o biocatalisador é modelado na forma de lentes ou de correias pequenas.

11. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou
15 Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou 9, caracterizado onde a enzima assim imobilizada é usada na hidrólise de soluções de sacarose com um teor de 2% a 50% em peso de substrato de sacarídeo à temperatura
20 de 20°C a 50°C e pH = 3,5 a 7,0.

12. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção” caracterizado por ser um
25 método para uso de glicoamilase encapsulada em álcool polivinílico gel na preparação de D-glicose de acordo com as reivindicações 1 ou 2 ou 8, **onde** a enzima assim imobilizada é usada na hidrólise de sacarídeos superiores, preparados por hidrólise de amido parcial com 2% a 40% em peso de teor de
30 substrato de sacarídeo, à temperatura de 20°C a 45°C e pH 3,5 a 7.

13. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a
35 reivindicação 12, caracterizado onde a glicoamilase imobilizada é

usada na sacarificação de substrato contendo amido na produção fermentativa de etanol.

14. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou
5 Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado onde a glicoamilase imobilizada é usada na sacarificação de substrato contendo amido no processo de produção fermentativa de ácido láctico.
- 10 15. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção” caracterizado por ser um método de uso de β -galactosidase encapsulada em álcool
15 polivinílico gel na preparação de D-galactose, D-glicose e galactooligossacarídeos de acordo com as reivindicações 1 ou 2 ou 10, onde a enzima assim imobilizada é usada na hidrólise de soluções de lactose com 2% a 40% em peso de teor de substrato de sacarídeo à temperatura de 20°C a 60°C e pH 3,5 a 7.
- 20 16. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção” caracterizado por ser um dispositivo de produção industrial, que proporciona otimização do
25 volume de carreador biológico e da superfície dependendo da extensão de material biologicamente ativo, que consiste em um mecanismo de modelagem (17) montado na frente de um canal de secagem (2), através do qual passa uma correia transportadora contínua (1), de acordo com a reivindicação 1, **onde** o dispositivo
30 é equipado com pelo menos um cabeçote de modelagem (17) com duas séries de injetores de agulha de modelagem conectados a um tanque de pressão temperado (15) e um compressor (16), a correia transportadora (1) e um sistema de secagem - a fonte (4) de ar de secagem, que é soprado por meio de um ventilador para dentro de
35 um sistema de distribuição de ar (6) com elementos de

aquecimento incorporados (5), que atinge o canal de secagem superior (2), e depois o canal de secagem final inferior (3) e um tanque de reentumescimento (7), entre os quais está montado um dispositivo de limpeza e coleta (9), projetado com base em
5 limpeza mecânica e enxague de alta pressão, que é conectado a uma tubulação com uma bomba de alta pressão (10) e uma bomba de baixa pressão (11) integradas que atingem um reservatório de coleta (8) com resfriamento e depois uma caixa de enxague (13) para limpeza final da correia transportadora contínua (1) por jatos
10 conectados à bomba de baixa pressão (14), que é conectada a um tanque de enxague (12) por tubulação.

17. “Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu
15 uso, e Dispositivos para sua Produção”, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado onde seu dispositivo de coleta (9) é formado por uma armação (25), na qual o limpador mecânico (27), com o mecanismo de pressão de mola (28), e os jatos de alta pressão (26), fixados à armação (25) a um ângulo de 45° a 80°, são
20 montados, ao passo que o limpador superior (29) com uma escova para limpeza da parte interna da correia transportadora (1) é firmemente montado em seu lado interno e oposto ao limpador mecânico (27) e a correia transportadora (1) é equipada com o limpador inferior (29) para limpeza final no ponto de sua saída da
25 armação (25).

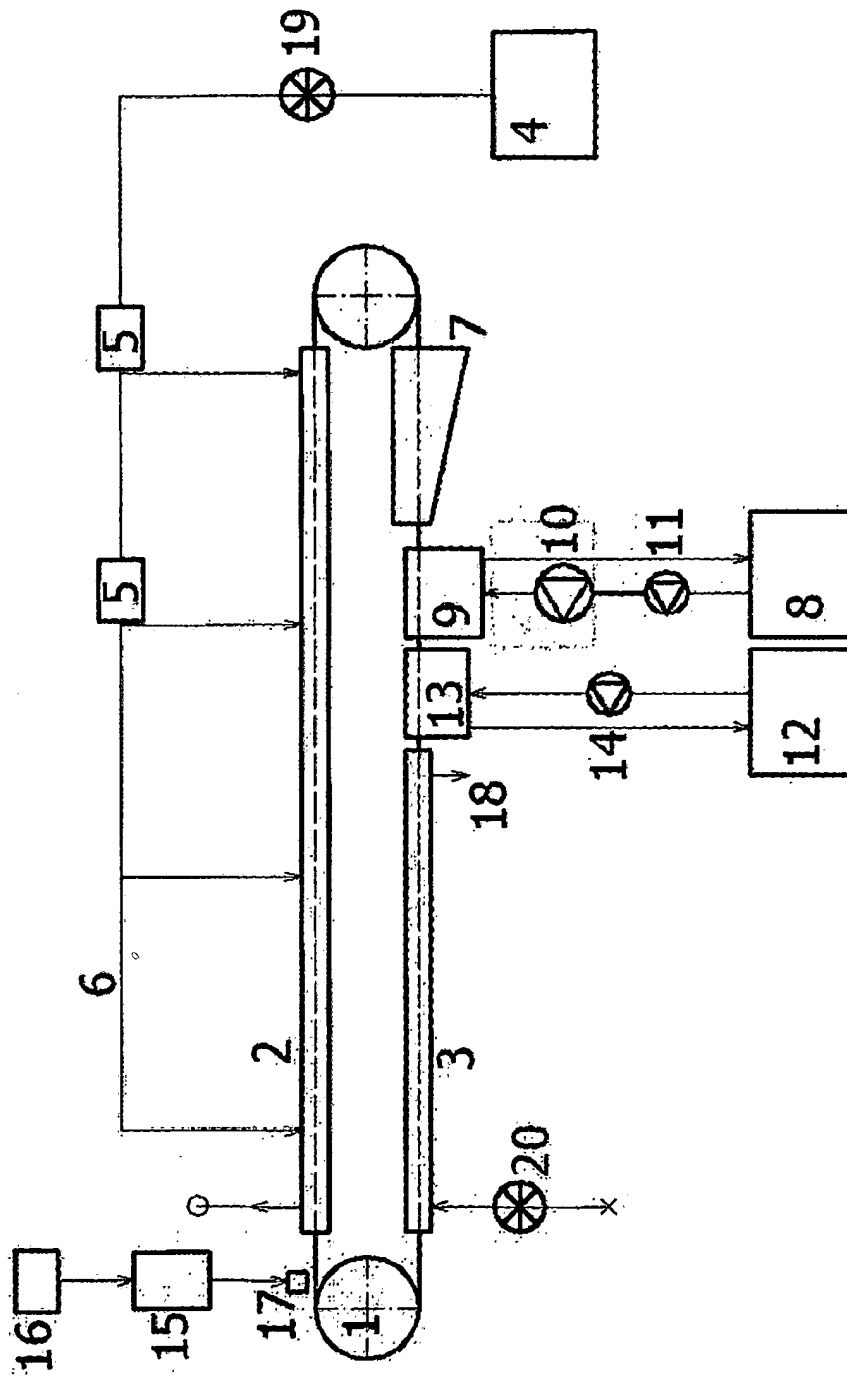


Fig. 1

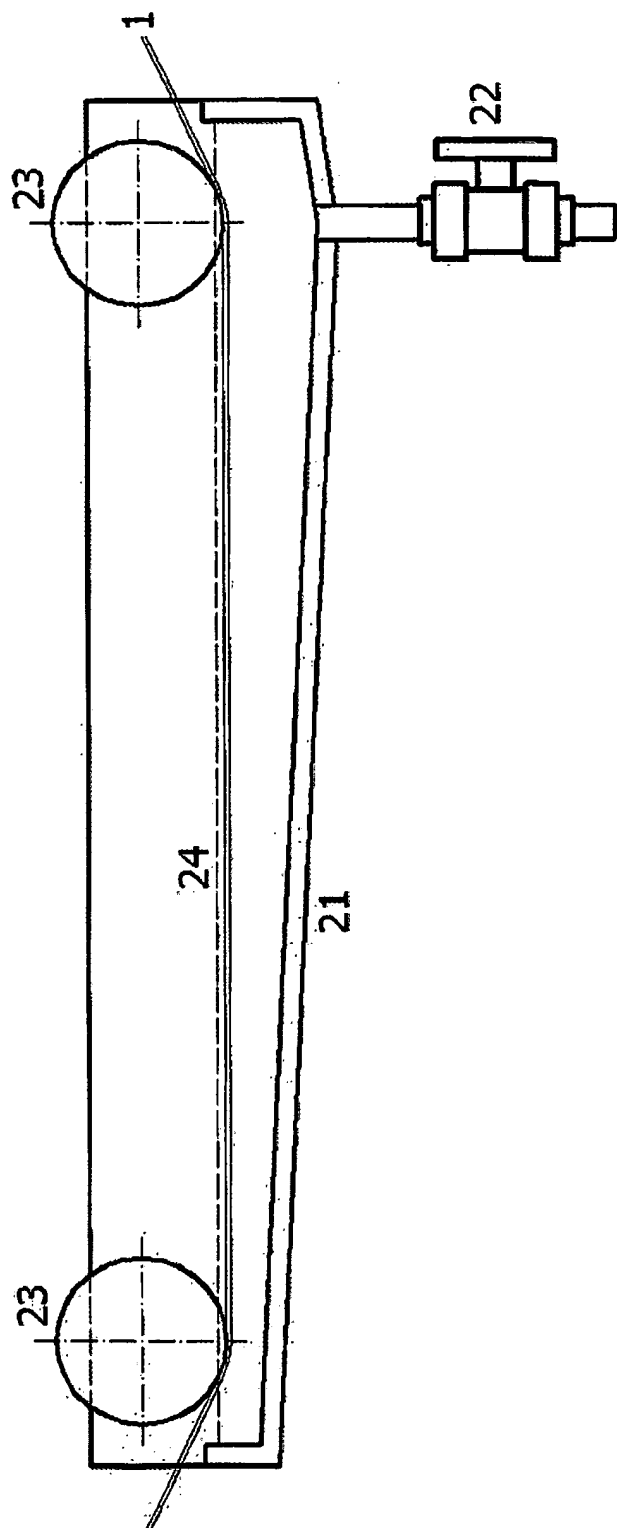
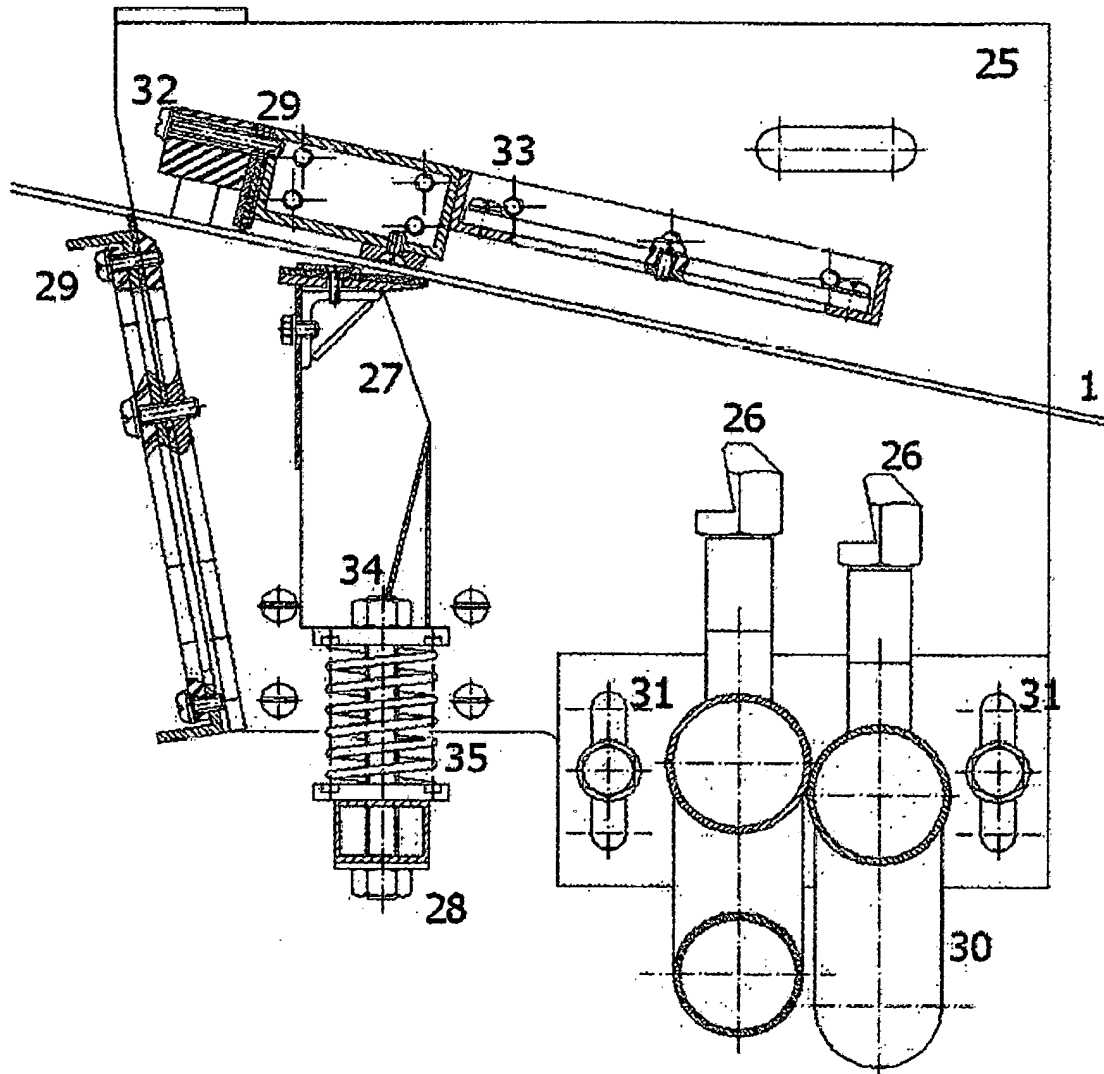
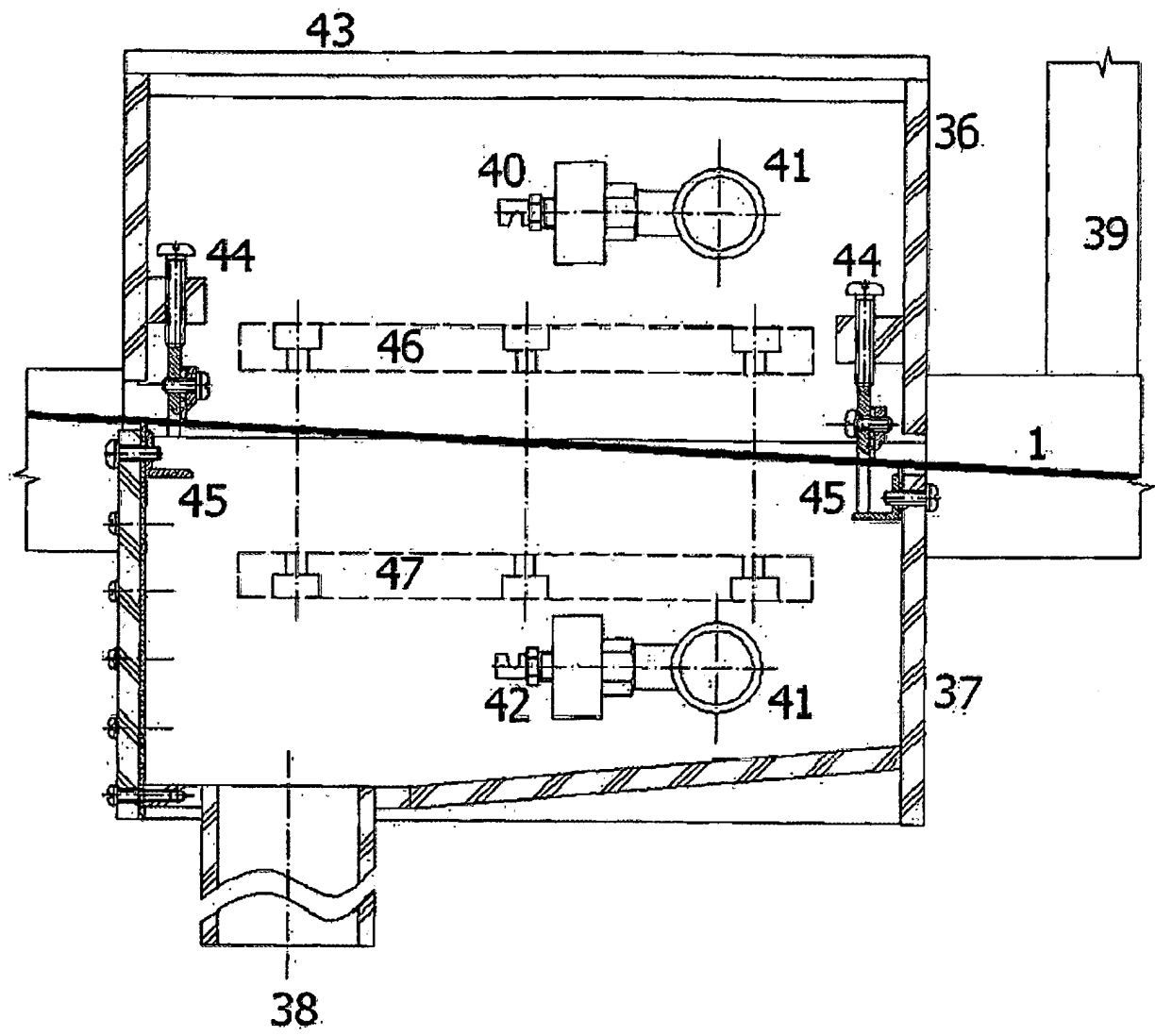


Fig. 2





RESUMO

“Método para Produção Industrial de Biocatalisadores com Material Bioativo na Forma de Enzimas, Imobilizadas, ou Microorganismos Imobilizados em Álcool Polivinílico Gel, e seu uso, e Dispositivos para sua Produção” sendo um método para a produção industrial de biocatalisadores com material biologicamente ativo na forma de enzimas ou microorganismos imobilizados que são imobilizados no álcool polivinílico gel, e uso dos mesmos com base no fato de que o material biológico ativo, formado pela mistura de catalisador enzimático nativo livre ou pré-tratado (agregado), ou microorganismo de produção, ou parte dos mesmos, e o álcool polivinílico gel, é usado para sua produção industrial, a mistura é gelificada e modelada em uma corrente de ar de secagem à temperatura de 80°C a 15°C, considerando a extensão do material biologicamente ativo, à proporção geométrica de biocatalisador da superfície para o volume mantida maior que 7 mm^{-1} , e consequentemente os biocatalisadores assim preparados podem ser cultivados ou armazenados e em seguida usados em processos biotecnológicos nas condições, que garantem ao processo biotecnológico dado maior produtividade, maior estabilidade de produção e enzimática, uso prolongado e repetido ou controle definível do processo com consequente separação fácil do biocatalisador.

Dispositivo de produção industrial, que proporciona otimização do volume de carreador biológico e da superfície dependendo da extensão de material biologicamente ativo, consistindo em um mecanismo de modelagem (17) montado na frente de um canal de secagem (2), através do qual passa uma correia transportadora contínua (1), é equipado com pelo menos um cabeçote de modelagem (17) com duas séries de injetores de agulha de modelagem conectados a um tanque de pressão temperado (15) e um compressor (16), a correia transportadora (1) e um sistema de secagem - a fonte (4) de ar de secagem, que é soprado por meio de um ventilador para dentro de um sistema de distribuição de ar (6) com elementos de aquecimento incorporados (5), que atinge o

canal de secagem superior (2), e depois o canal de secagem final inferior (3) e um tanque de reentumescimento (7), entre os quais está montado um dispositivo de limpeza e coleta (9), projetado com base em limpeza mecânica e enxague de alta pressão, que é

5 conectado a uma tubulação com uma bomba de alta pressão integrada (10) e uma bomba de baixa pressão (11) que atingem um reservatório de coleta (8) com resfriamento e depois uma caixa de enxague (13) para limpeza final da correia transportadora contínua (1) por jatos conectados à bomba de baixa pressão (14), que é

10 conectada a um tanque de enxague (12) por tubulação.