República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021018590-2 A2

(22) Data do Depósito: 17/09/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 28/03/2023

(54) Título: PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO SIMULTNEA DE CELULASES E XILANASES SOBRE OXIDO DE GRAFENO MAGNÉTICO E USO DO MESMO

(51) Int. Cl.: C12N 9/24; C12N 9/42.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): ARIELA VELOSO DE PAULA; FERNANDO MASARIN; FERNANDO ROBERTO PAZ CEDENO; RUBENS MONTI.

(57) Resumo: PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO SIMULTNEA DE CELULASES E XILANASES SOBRE OXIDO DE GRAFENO MAGNÉTICO E USO DO MESMO. A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de um derivado enzimático magnético e a sua utilização na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica. O processo de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica utilizando o derivado enzimático magnético, leva à obtenção de glicose e xilose sem a formação de qualquer tipo de inibidor de microrganismos. O derivado enzimático magnético pode ser reutilizado em vários ciclos de hidrólise. A glicose e xilose, na forma de hidrolisados, podem ser úteis para produzir diversos bioprodutos de interesse comercial.

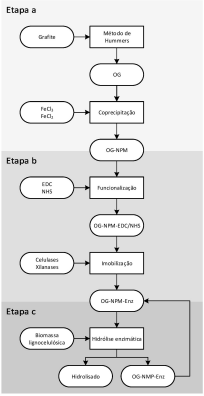

Figura 1

PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE CELULASES E XILANASES SOBRE ÓXIDO DE GRAFENO MAGNÉTICO E USO DO MESMO

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção se insere no campo da Engenharia, Química e Biotecnologia, mais especificamente na área de Bioprocessos, uma vez que se refere ao processo de imobilização covalente de enzimas na superfície de óxido de grafeno magnético, bem como a utilização do derivado na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] Os biocombustíveis representam um tema de grande repercussão internacional devido à dependência dos derivados do petróleo para a produção de energia e sua consequência nas mudanças climáticas do planeta. Nesse cenário, o Brasil dispõe de uma excelente oportunidade para atuar em novas matrizes energéticas associadas à produção de combustíveis e produtos químicos através de fontes renováveis. Atualmente, grandes quantidades de etanol são produzidas a partir da sacarose de cana-de-açúcar. O uso de materiais lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis e produtos químicos apresenta muitas vantagens em termos de disponibilidade de recursos, considerando a grande quantidade de materiais lignocelulósicos produzidos por atividades florestais e de agricultura.

[3] Os processos biocataliticos tem sido aplicado em vários setores da biotecnologia devido à sua alta especificidade, facilidade de produção e conservação do meio ambiente. O uso de enzimas em aplicações industriais pode ser limitado dependendo de seu custo. Além disso, manter a

estabilidade estrutural de algumas enzimas durante qualquer reação bioquímica é um grande desafio. A imobilização de enzimas em materiais sólidos oferece muitas vantagens, entre as quais o reuso da enzima, a possibilidade de separação do produto e o aumento da estabilidade.

[4] O óxido de grafeno (OG) é uma plataforma química altamente versátil devido à grande área superficial que oferece, além de vários grupos químicos localizados em sua superfície. Deste modo, o OG é um material com potencial para ser aplicado como suporte para imobilização de enzimas. Recentemente, a literatura tem reportado alguns trabalhos sobre magnetização de OG, prévio à sua utilização como suporte para imobilização de enzimas. A magnetização do OG consiste na síntese de nanopartículas magnéticas (NPM) depositadas na superfície do OG, sendo o método mais comum a coprecipitação de íons férrico e ferroso em solução alcalina. Assim, além das vantagens que oferece o OG como plataforma de imobilização de enzimas, tem-se ainda a característica magnética das (NPM) que permite a recuperação do derivado com a utilização de um imã comum. Esses trabalhos demostram que o OG magnetizado tem grande potencial de aplicação na imobilização de enzimas. Todavia, ainda não foram apresentados na literatura ensaios de hidrólise enzimática de subprodutos agroindustriais utilizando celulases e xilanases imobilizadas em óxido de grafeno magnetizado.

[5] Dentro do contexto apresentado, a presente invenção propôs imobilizar preparado enzimático comercial rico em atividades de celulases e xilanases em OG magnetizado e aplicar o derivado obtido na hidrólise enzimática de bagaço

de cana-de-açúcar visando a produção de açúcares monoméricos, além da recuperação do derivado.

ESTADO DA TÉCNICA

[6] O documento BR 102015008335-1 A2, intitulado "Processo de imobilização de enzimas em nanotubos de carbono, produto e uso" descreve um método para imobilização de enzimas, preferencialmente lipases, em nanotubos de carbono sem prévia funcionalização. O documento BR102013027182-9 A2, intitulado "Processo de imobilização de substrato enzimático em partículas magnéticas e sua utilização na purificação, isolamento, extração e/ou separação de enzimas" descreve um método para revestir partículas magnéticas com um polímero (polianilina), seguido de uma funcionalização com um agente bifuncional como glutaraldeído e finalmente a imobilização de enzimas, preferencialmente proteases. O documento CN101555473 (A), intitulado "*Covalently enhanced cellulase immobilization method*", descreve a imobilização covalente de celulases no suporte comercial Eudragit L-100 (polímero de resina acrílica) funcionalizado com N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e n-hidroxisuccinimida (NHS). O documento CN106434620 (A), intitulado "*Immobilization method of xylanase and immobilized xylanase*", descreve a imobilização de xilanases na superfície de nanopartículas formadas por Fe_3O_4, SiO_2 e 3-Aminopropiltrietoxissilano (APTES), utilizando um agente bifuncional, de preferência glutaraldeído ou anidrido maleico.

[7] A presente invenção prevê a síntese do nanocompósito formado por óxido de grafeno e magnetita, seguida de uma funcionalização da sua superfície para

possibilitar a ligação covalente das enzimas. O preparado enzimático é rico em atividades de celulases e xilanases imobilizadas covalentemente na superfície do nanocompósito obtido previamente, gerando um derivado enzimático.

[8] As tecnologias descritas no estado da técnica tratam-se de tecnologias diversas e que não prejudicam os requisitos de novidade e atividade inventiva da presente invenção.

Objetivos e vantagens da invenção

[9] A presente invenção tem por objetivo a obtenção de um derivado enzimático magnético formado por celulases e xilanases imobilizadas covalentemente na superfície do nanocompósito de óxido de grafeno e magnetita e a utilização do derivado na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica. Além disso, o derivado poderá ser reutilizado na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica.

[10] O hidrolisado produzido pode ser utilizado em bioprocessos para a produção de biocombustíveis (etanol, butanol, hidrogênio, entre outros), enzimas e química fina. Desta forma, além de não acumular um "resíduo" na fábrica, a empresa poderá ter um aumento na sua eficiência de produção de outros bioprodutos de interesse comercial.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[11] A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de um derivado enzimático magnético e a sua utilização na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica.

[12] O processo de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica utilizando o derivado enzimático magnético,

leva à obtenção de glicose e xilose sem a formação de qualquer tipo de inibidor de microrganismos. O derivado enzimático magnético pode ser reutilizado em vários ciclos de hidrólise.

[13] A glicose e xilose, na forma de hidrolisado, podem ser úteis para produzir diversos bioprodutos de interesse comercial.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[14] A Figura 1 mostra o fluxograma geral das etapas do processo da invenção. OG: Óxido de grafeno; NPM: Nanopartícula magnética; EDC: N-etil-N'-3-dimetilaminopropil carbodiimida; NHS: n-hidroxisuccinimida; Enz: Enzimas.

[15] A figura 2 apresenta as imagens do OG e OG-NPM obtidos.

[16] A Figura 3 apresenta um esquema de imobilização com ligação do tipo covalente de celulases e xilanases na superfície do nanocompósito formado por óxido de grafeno e magnetita.

[17] A Figura 4 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, onde (a) OG e (b) OG-NPM. Espectro EDX, onde (c) OG e (d) OG-NPM.

[18] A Figura 5 apresenta o espectro FTIR-ATR de OG, OG-NPM, OG-NPM-Enz e do preparado enzimático comercial.

[19] A Figura 6 apresenta a imagem de microscopia de força atómica do derivado enzimático magnético (a) e seu perfil de altura (b).

[20] A figura 7 apresenta a estabilidade operacional do derivado enzimático magnético para as atividades enzimáticas de endoglucanase (a) e de xilanase (b).

[21] A Figura 8 apresenta a conversão de celulose em glicose e xilana em xilose após cada ciclo de hidrólise enzimática reutilizando o derivado enzimático magnético.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[22] A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de um derivado enzimático magnético e a sua utilização na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica, compreendendo as etapas de:

a) Síntese do nanocompósito formado por óxido de grafeno e magnetita;

b) Imobilização covalente de preparado enzimático rico em atividades de celulases e xilanases na superfície do óxido de grafeno magnético;

c) Avaliação da estabilidade operacional do derivado enzimático magnético;

d) Hidrólise de biomassa lignocelulósica utilizando o derivado enzimático magnético e sua reutilização.

Etapa A – Síntese do nanocompósito Óxido de Grafeno-Magnetita

[23] Em um balão de fundo redondo foi adicionado 1 g de grafite (Graphite powder 99.99%, Sigma-Aldrich). O balão foi inserido em uma cuba, a qual foi preenchida com gelo. Posteriormente, foram adicionados no balão 60 mL de H_2SO_4 (96%, massa/massa) e mantido sob agitação durante 15 min. Em seguida foram adicionados lentamente 100 mL de solução de $KMnO_4$ 3,5% (massa/volume). Ao final da adição de $KMnO_4$ o sistema foi retirado do banho de gelo e deixado sob agitação magnética (aproximadamente 1000 rpm) por mais 120 min.

[24] Ao final dos 120 min o balão foi mantido novamente em banho de gelo, adicionando-se lentamente 100 mL de água destilada, lavando as paredes do balão. Em seguida, uma

porção de aproximadamente 10 mL de H_2O_2 (30% volume/volume) foi adicionada ao sistema. O sistema foi retirado do banho de gelo e mantido na capela de exaustão sem agitação por 12h. A dispersão foi então filtrada em sistema sob vácuo e em seguida o sólido obtido foi lavado com diversos solventes, na sequência, como se segue: 500 mL de água destilada, 250 mL de uma solução aquosa de HCl (10%, volume/volume), 250 mL de etanol (99,8%, volume/volume) e por fim mais 200 mL de água destilada.

[25] Após a lavagem o sólido foi seco em estufa sob vácuo a 50°C. O nanocompósito assim obtido foi denominado de óxido de grafeno (OG).

[26] Separadamente, foram adicionados 0.1-2.5 g de cloreto férrico ($FeCl_3$) e 0.05-1.0 g de cloreto ferroso ($FeCl_2$) a 100 mL de solução de água destilada contendo 3 mL de ácido acético em um béquer de 250 mL, colocado sob um agitador magnético com placa de aquecimento, sob agitação de 500-2000 rpm.

[27] Em seguida, foram adicionados à mistura, 10 mL de dispersão de OG (5 $mg.mL^{-1}$), previamente submetida a sonicação em ultrassom durante 30-120 min. A temperatura foi elevada até 60-90°C e foram adicionados 15-50 mL de hidróxido de amônio (25%, massa/volume) à mistura reacional sob agitação magnética vigorosa durante 15-60 min.

[28] Finalmente, a reação foi interrompida e o precipitado foi coletado com um ímã externo e lavado várias vezes com água destilada e metanol (99,8%, volume/volume). Em seguida, foi seco em estufa a temperatura de 40-60°C durante 12-24h. O material assim obtido foi denominado Óxido de Grafeno Magnético (OG-NPM).

Etapa B. Imobilização covalente de preparado enzimático rico em atividades de celulases e xilanases na superfície do óxido de grafeno magnético (OG-NPM)

[29] Foi preparada uma suspensão (5-50 mL) de OG-NPM (0.1-1.0 $mg.mL^{-1}$) em tampão acetato de sódio 0.05 M pH 4.8 e submetido a sonicação em ultrassom durante 2h. Posteriormente foram adicionados 10-50 mg de n-hidroxisuccinimida (NHS) e submetido a sonicação durante 10-60 min. Depois, foram adicionados 10-50 mg de cloridrato de N-etil-N'-3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDC) mantendo-se a agitação durante 1-6h.

[30] O material foi recuperado aplicando um campo magnético e lavado várias vezes com o mesmo tampão. Na sequência o material foi disperso em tampão acetato de sódio 0.05 M pH 4.8 atingindo uma concentração de 0.1-2.0 $mg.mL^{-1}$. Foi adicionado um volume de preparado enzimático (Cellic CTec2-Novozymes) e mantido em agitação por 12-48h. A relação mássica entre enzima e suporte foi de 10-1000 mg de enzima por grama de suporte. O material foi recuperado aplicando-se um campo magnético e lavando-se duas vezes com o tampão de imobilização, uma vez com solução de glicina 1 M e novamente com o tampão de imobilização.

[31] Finalmente o material foi suspenso no tampão de imobilização e denominado de derivado enzimático de óxido de grafeno com nanopartículas magnéticas funcionalizado (OG-NPM-EDC/NHS-Enz).

[32] Foram determinados os teores de proteínas no sobrenadante de imobilização e nos tampões de lavagem através da metodologia de Bradford. Esses dados foram utilizados para calcular o rendimento de imobilização de proteínas.

[33] Adicionalmente, foram determinadas as atividades enzimáticas de celulases totais, endoglucanase, β-glicosidase, xilanase e β-xilosidase no sobrenadante de imobilização, além do derivado enzimático.

[34] Após a imobilização, foram calculados o rendimento, a eficiência e a atividade recuperada de acordo com as Equações 1, 2 e 3, respectivamente.

$$Rendimento = \left(\frac{A_i - A_f}{A_i}\right) * 100\% \qquad \text{(Equação 1)}$$

$$Eficiência = \left(\frac{A_d}{A_i - A_f}\right) * 100\% \qquad \text{(Equação 2)}$$

$$Atividade\ recuperada = \left(\frac{A_d}{A_i}\right) * 100\% \qquad \text{(Equação 3)}$$

Onde A_i: Atividade total inicial no sobrenadante; A_f: Atividade total final no sobrenadante; A_d: Atividade total do derivado obtido.

Etapa C. Avaliação da estabilidade operacional do derivado enzimático magnético (OG-NPM-EDC/NHS-Enz)

[35] O derivado obtido na etapa "b" foi submetido a teste de estabilidade operacional. Para isto, em um tubo de ensaio foram adicionados 1-5 mL de solução de substrato (carboximetilcelulose sódica ou xilana) e 1-5 mg de derivado enzimático. Os tubos foram agitados em vortex e colocados em um banho térmico a 30-50°C, sem agitação, durante 5-120 min. Ao final do ciclo o derivado foi retido com um imã externo e o sobrenadante utilizado para determinação de açúcares redutores. Para iniciar um novo ciclo, foi adicionado novamente 1-5 mL de substrato, agitado em vortex e colocado nas mesmas condições do primeiro ciclo.

Etapa D. Hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica utilizando o derivado enzimático magnético (OG-NPM-EDC/NHS-Enz) *e reutilização do mesmo*

[36] Para a hidrólise enzimática foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar previamente submetido a um pré-tratamento com sulfito-alcalino. O pré-tratamento consistiu em pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar em reator a uma temperatura entre 120-150°C, durante 15-60 min, na proporção de 10 g de Na_2SO_3 e 5 g de NaOH (massa de Na_2SO_3 e NaOH por grama de bagaço, dados em base seca), com agitação de 4 rpm e consistência de 10% (massa/volume). O bagaço de cana-de-açúcar previamente pré-tratado com sulfito-alcalino foi submetido a hidrólise enzimática utilizando o derivado enzimático obtido por meio de ligação covalente. Para isto, foram adicionados 5-50 mg de bagaço em frasco Erlenmeyer e vertido 5-50 mL de suspensão de derivado enzimático (5-15 $mg.mL^{-1}$) em tampão acetato de sódio 0.05 M pH 4.8. O frasco foi mantido em um banho térmico a 30-60°C, com agitação de 80-150 rpm.

[37] A hidrólise foi interrompida após 24h aplicando um campo magnético externo para atrair o derivado enzimático. O sobrenadante foi recuperado e injetado em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação dos açúcares monoméricos.

[38] O derivado ainda no frasco, foi lavado com tampão acetato de sódio 0.05 M pH 4.8 e em seguida foram vertidos 5-50 mL do mesmo tampão em 5-50 mg de bagaço de cana-de-açúcar previamente pré-tratado. O frasco foi levado ao banho térmico configurado a 30-60°C e 80-150 rpm. Desta forma foi iniciado um novo ciclo de hidrólise enzimática.

EXEMPLO DE CONCRETIZAÇÃO DA INVENÇÃO

[39] Os exemplos aqui apresentados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar seu escopo.

Obtenção do suporte magnético

[40] A incorporação de nanopartículas magnéticas na superfície do óxido de grafeno (OG) proporciona a esses suportes uma nova funcionalidade. Na Figura 2 é apresentado o evidente comportamento magnético do OG-NPM, após a funcionalização com as nanopartículas magnéticas.

[41] O OG e OG-NPM obtidos foram caracterizados utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDX).

[42] A Figura 4 apresenta imagens do OG e do OG-NPM simultâneas a espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDX) utilizando um microscópio eletrônico de transmissão de emissão de campo. As imagens mostram que as nanopartículas magnéticas se encontram depositadas sobre as folhas de OG de uma forma relativamente homogênea, o que facilita a dispersão do suporte em meio aquoso. Os espectros EDX mostram que o OG (Figura 4c) é composto exclusivamente por carbono e oxigênio, enquanto o OGM (Figura 4d) tem carbono, ferro e oxigênio em sua composição. O aparecimento de níquel no espectro EDX é atribuído à interferência da grade que é utilizada como suporte para a amostra.

Obtenção do derivado enzimático magnético

[43] A Figura 5 apresenta o espectro FTIR-ATR do OG, OG-NPM, OG-NPM-Enz e do preparado enzimático comercial (Enz). Os espectros obtidos mostram as diferenças e similaridades entre os compostos. A banda em aproximadamente

570 cm^{-1}, tem sido atribuída na literatura por vários autores à vibração de alongamento da interação entre ferro e oxigênio (Fe-O) na rede cristalina da magnetita. Desta forma, a presença da banda em 570 cm^{-1} no OG-NPM indica que este foi magnetizado com sucesso corroborando com a ausência desta banda no OG. A banda em 1040 cm^{-1} presentes nos espectros do OG-NPM-Enz e do preparado enzimático comercial (Enz) tem sido atribuída à vibração da ligação do tipo C-N. A banda que se observa em aproximadamente 1540 cm^{-1} tem sido associada à vibração de alongamento da ligação do tipo C-N e à vibração de flexão da ligação do tipo N-H dos grupos -CONH-. A ausência destas bandas (1040 e 1540 cm^{-1}) no espectro do OG-NPM demonstra que as enzimas foram imobilizadas no suporte com sucesso. As bandas em 1640 e 3280 cm^{-1} correspondem à deformação da ligação do tipo O-H e à vibração de alongamento da ligação do tipo O-H da água fortemente intercalada.

[44] A Tabela 1 apresenta o rendimento, a eficiência e a atividade recuperada do processo de imobilização para as atividades de celulases totais, endoglucanase, xilanase, β-glicosidase e β-xilosidase.

Tabela 1 – Rendimento, eficiência e atividade recuperada no processo de imobilização de enzimas do preparado enzimático Cellic CTec2 em óxido de grafeno magnetizado (OGM)

Atividade	**Rendimento (%)**	**Eficiência (%)**	**Atividade recuperada (%)**
Celulases totais	71.1	69.0	49.1
Endoglucanase	63.4	37.6	23.8
Xilanase	27.0	55.2	14.9
β-glicosidase	97.2	113.0	109.8
β-xilosidase	91.6	86.6	79.3

**O rendimento de imobilização determinado pelo teor de proteínas foi de 96.5%.*

[45] A Figura 6 apresenta uma imagem de microscopia de força atômica do OG-NPM-Enz e seu perfil de altura. Analisando-se o perfil de altura da imagem é possível constatar que as enzimas se encontram imobilizadas sobre uma única camada de OG, pois a altura do suporte é de aproximadamente 1 nm.

[46] A massa de proteínas imobilizadas no suporte de óxido de grafeno magnético foi de 10-150 mg por grama de suporte.

Avaliação da estabilidade operacional do derivado enzimático magnético

[47] Para aplicações práticas, a capacidade de reutilizar o derivado enzimático é de extrema importância, pois a reutilização de enzimas em processos industriais pode tornar o processo menos dispendioso, ou seja, tem potencial de diminuição dos custos. Portanto, foi avaliada a estabilidade operacional do derivado enzimático magnético

frente à hidrólise de carboximetilcelulose sódica (CMC) e xilana.

[48] A Figura 7a apresenta a estabilidade operacional do derivado enzimático magnético frente à hidrólise de CMC em até 10 ciclos de reutilização. O derivado apresentou uma atividade relativa de endoglucanase de aproximadamente 70% após 10 ciclos de hidrólise.

[49] A figura 7b apresenta a estabilidade operacional do derivado enzimático magnético frente à hidrólise de xilana em até 10 ciclos de reutilização. O derivado apresentou uma atividade relativa de xilanases de aproximadamente 67% após 10 ciclos de hidrólise.

Avaliação da reutilização do derivado enzimático magnético na hidrólise de biomassa lignocelulósica

[50] A Figura 8 apresenta as conversões de celulose em glicose e xilana em xilose após cada ciclo de hidrólise. O primeiro ciclo de hidrólise enzimática do bagaço previamente pré-tratado com sulfito-alcalino apresentou conversões de celulose em glicose e de xilana em xilose de 68,5% e 82,0, respectivamente. Todavia, após o primeiro ciclo de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado averiguou-se uma diminuição acentuada na conversão de celulose em glicose, a qual foi estabilizada em aproximadamente 25% após o sexto ciclo. Entretanto, a conversão de xilana em xilose mostrou uma diminuição gradual, menos acentuada quando comparada com a conversão de celulose em glicose, atingindo valores de 66,7% para o quinto ciclo e 51,3% para o último ciclo.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção e utilização de um derivado enzimático magnético contendo atividades enzimáticas de celulases e xilanases, **caracterizado** por compreender as etapas de:

a) Síntese do nanocompósito utilizado como suporte de imobilização, formado por óxido de grafeno e magnetita;

b) Funcionalização do suporte obtido na etapa "a" e imobilização covalente de celulases e xilanases de preparado enzimático comercial;

c) Uso do derivado enzimático magnético obtido na etapa "b" em vários ciclos de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, na etapa "a", a síntese do suporte ser realizada utilizando óxido de grafeno (OG), cloreto férrico e cloreto ferroso.

3. Processo, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelo fato de a relação molar entre cloreto ferroso e férrico na etapa "a" ser 1:2.

4. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de a relação mássica entre óxido de grafeno e os sais de ferro na etapa "a" ser entre 1:3 e 1:60 e ser realizada durante um tempo de 0,1-12h a uma temperatura de 50-100°C.

5. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de a funcionalização da etapa "b" ser realizada mediante o tratamento do suporte com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e n-hidroxisuccinimida (NHS) em agitação mecânica em

presença de tampão pH 4-6 durante 1-24h.

6. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que na funcionalização da etapa "b" a relação mássica entre o suporte e o cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) ser entre 1:1 e 1:5.

7. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que na funcionalização da etapa "b" a relação mássica entre o suporte e o n-hidroxisuccinimida (NHS) ser entre 1:1 e 1:5.

8. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que na etapa "b" a relação mássica entre enzima e suporte ser de 10-1000 mg de enzima por grama de suporte.

9. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de a biomassa lignocelulósica da etapa "c" ser bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito-alcalino.

10. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de a relação mássica entre a biomassa e o derivado enzimático magnético na etapa "c" ser entre 1:2 e 1:20.

11. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de a temperatura ser de 30-50°C e o tempo de hidrólise de 12-48h.

12. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de o derivado enzimático magnético ser recuperado e reutilizado em vários ciclos de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar previamente pré-tratado.

13. Processo, de acordo como definido nas reivindicações 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de ser obtido um hidrolisado de açúcares monoméricos (glicose e xilose).

14. Uso do produto obtido, conforme definido nas reivindicações de 1 a 13, **caracterizado** por ser na produção de biocombustíveis, enzimas, química fina, dentre outros.

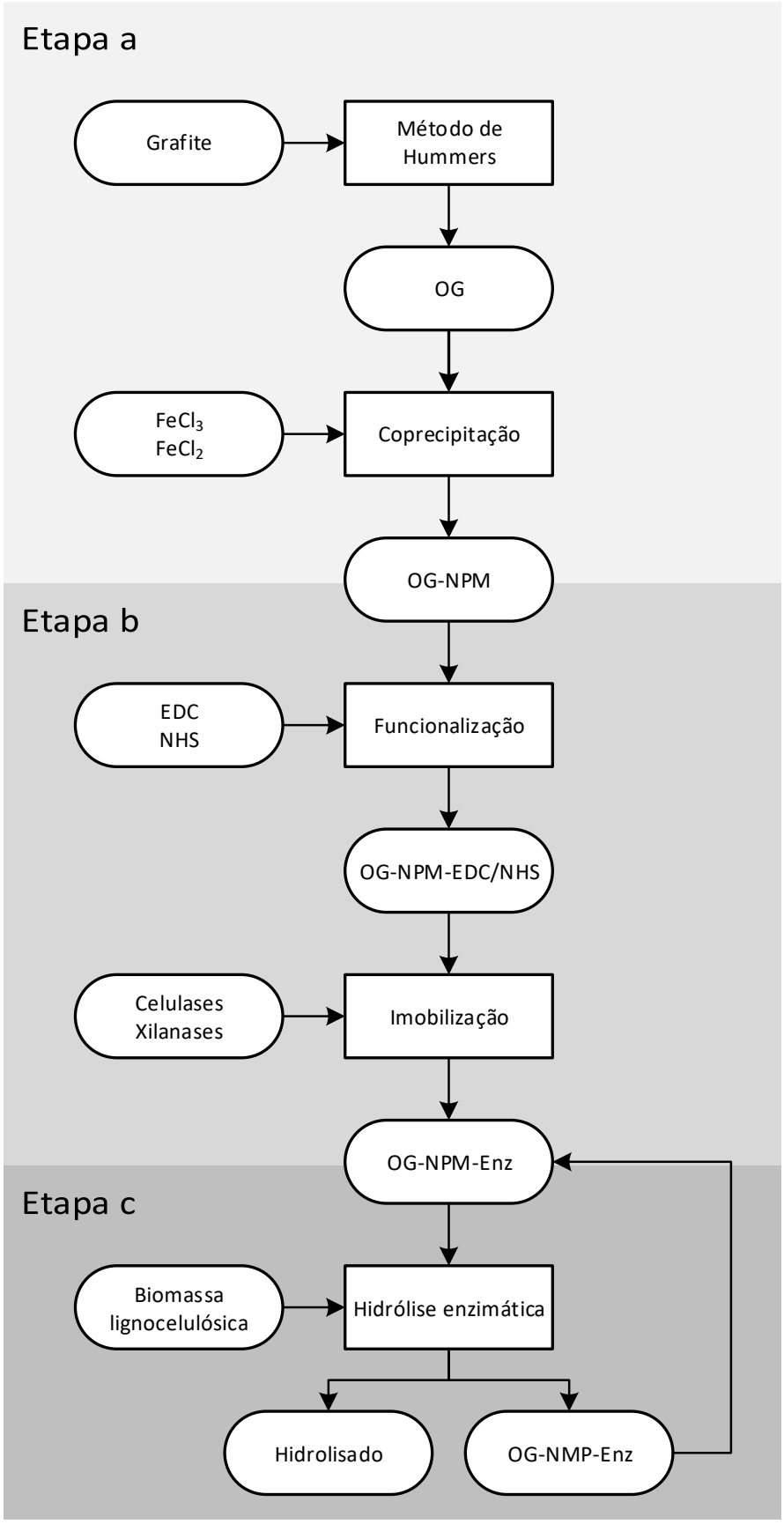
Etapa a
Grafite
Método de Hummers
OG
FeCl3
FeCl2
Coprecipitação
OG-NPM
Etapa b
EDC
NHS
Funcionalização
OG-NPM-EDC/NHS
Celulases
Xilanases
Imobilização
OG-NPM-Enz
Etapa c
Biomassa lignocelulósica
Hidrólise enzimática
Hidrolisado
OG-NMP-Enz

Figura 1

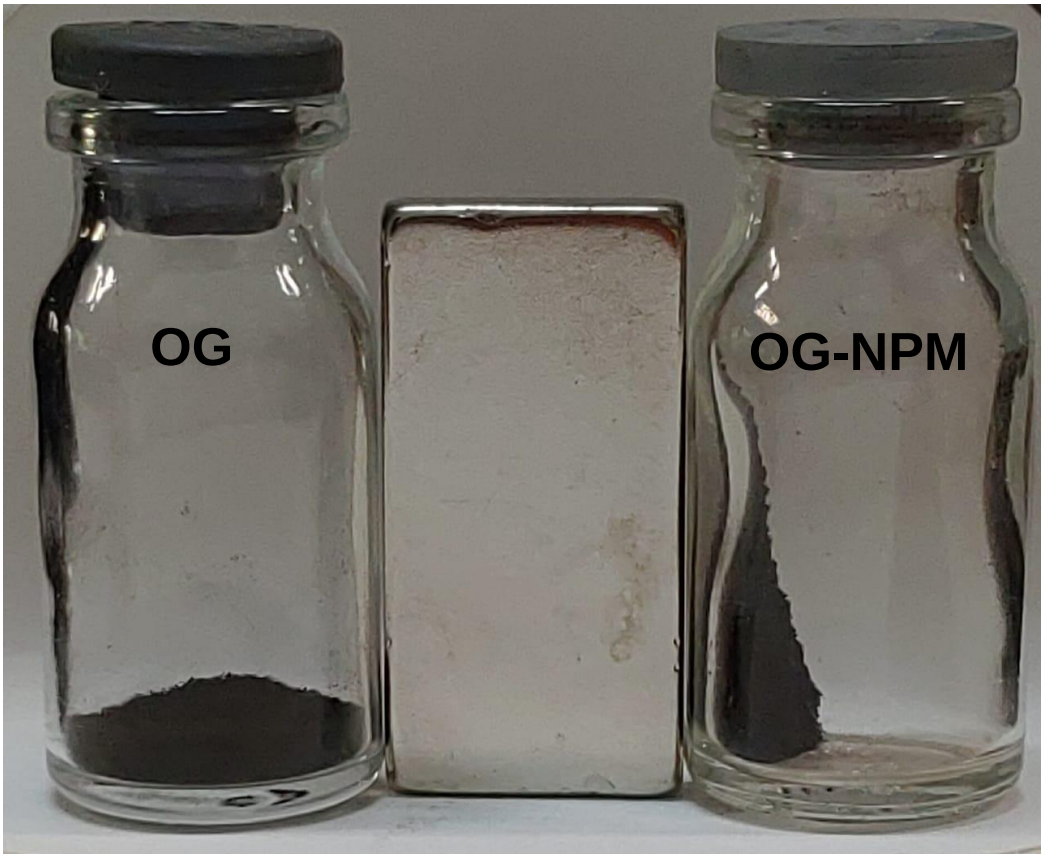

Figura 2

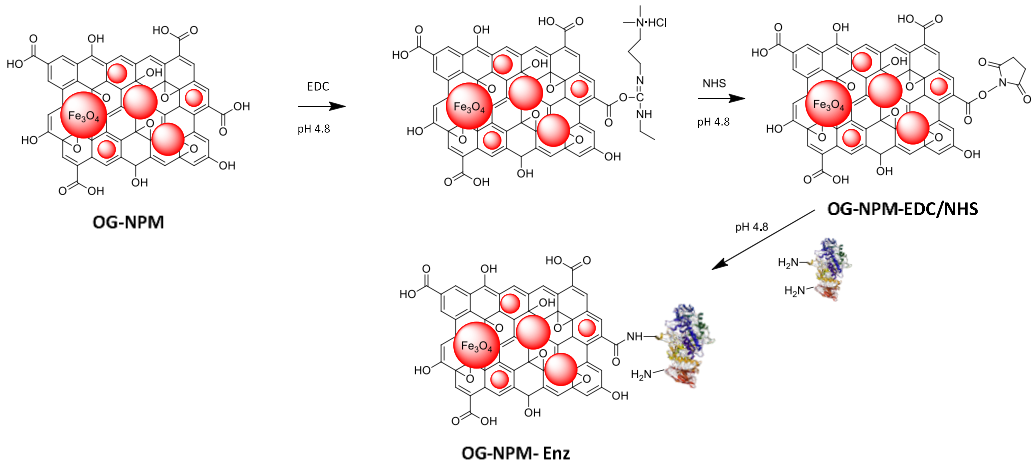

Figura 3

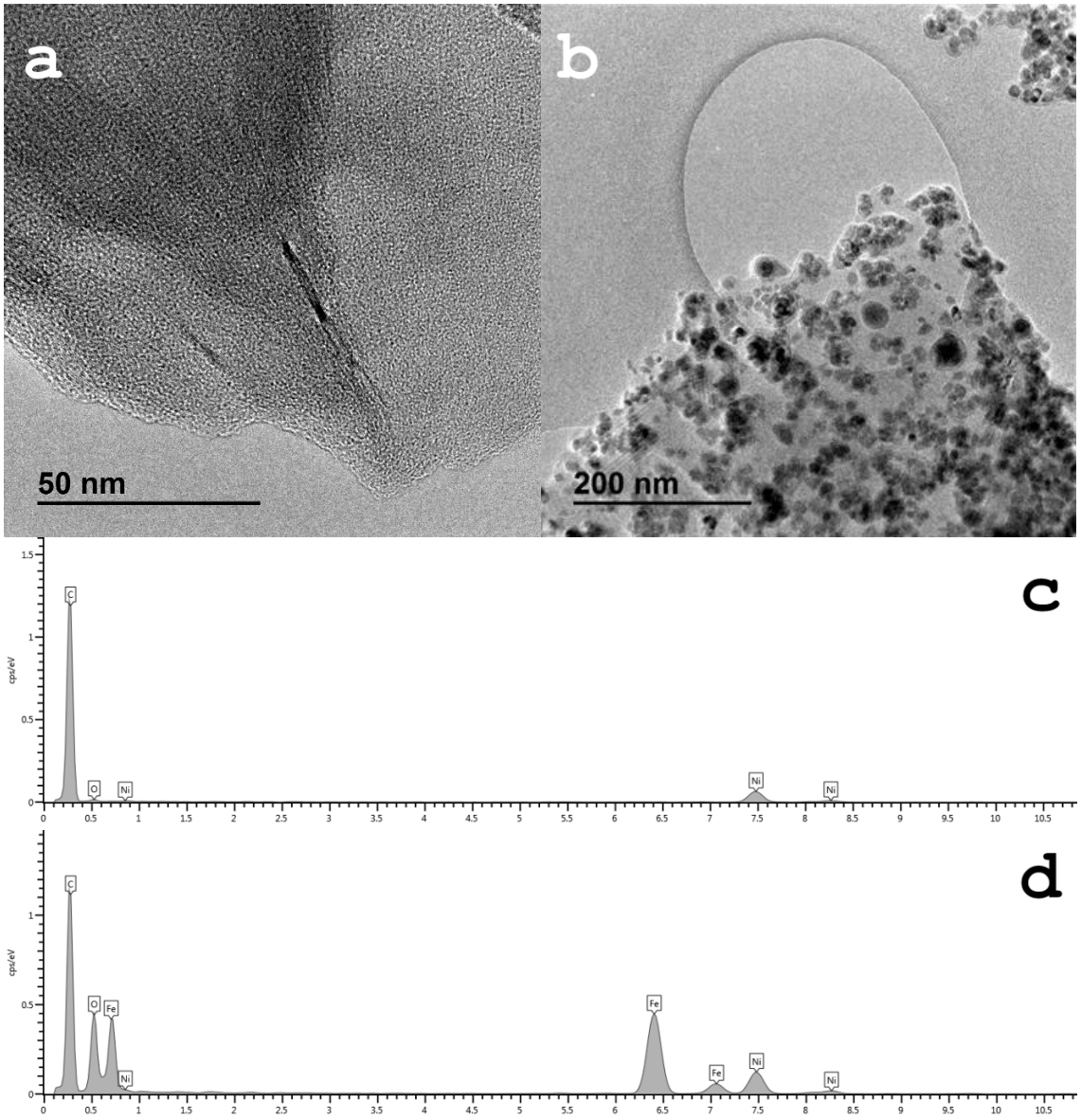

Figura 4

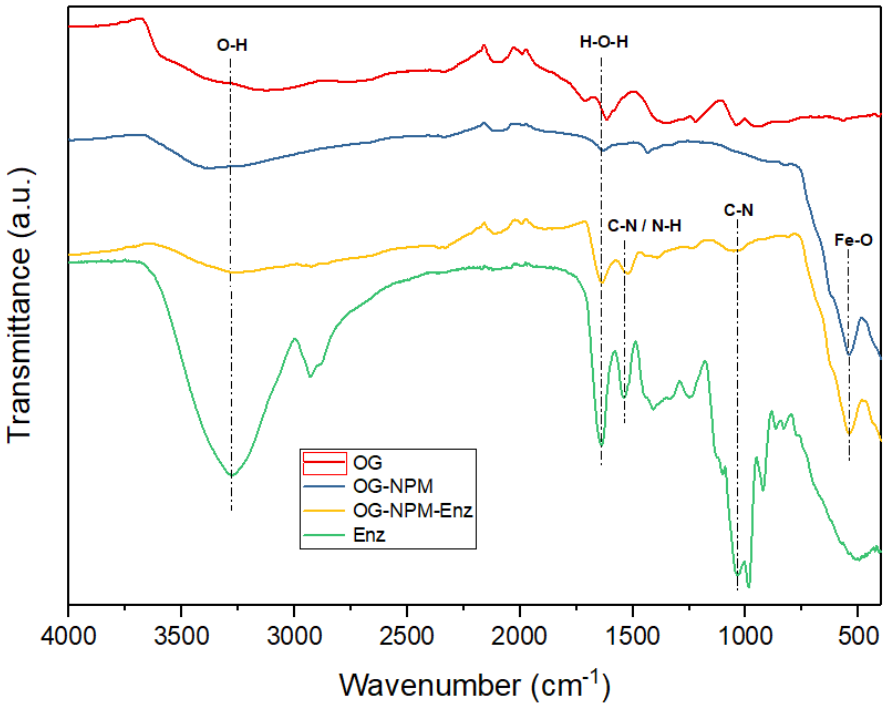

Figura 5

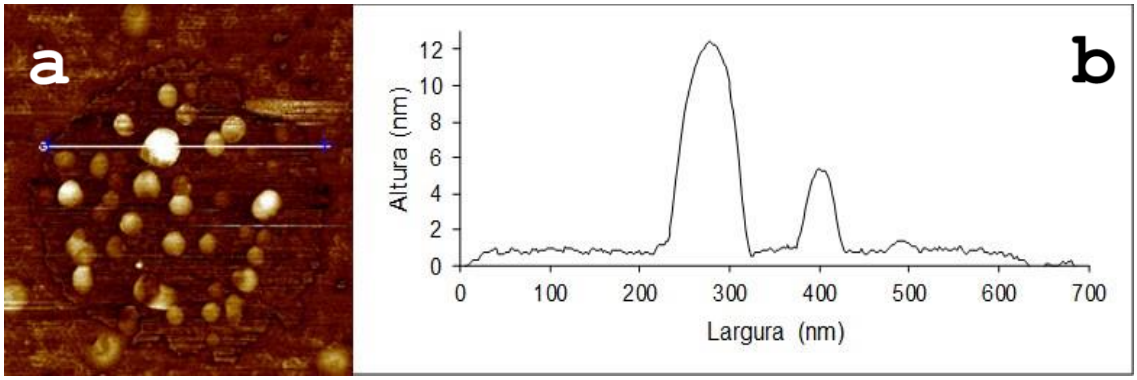

Figura 6

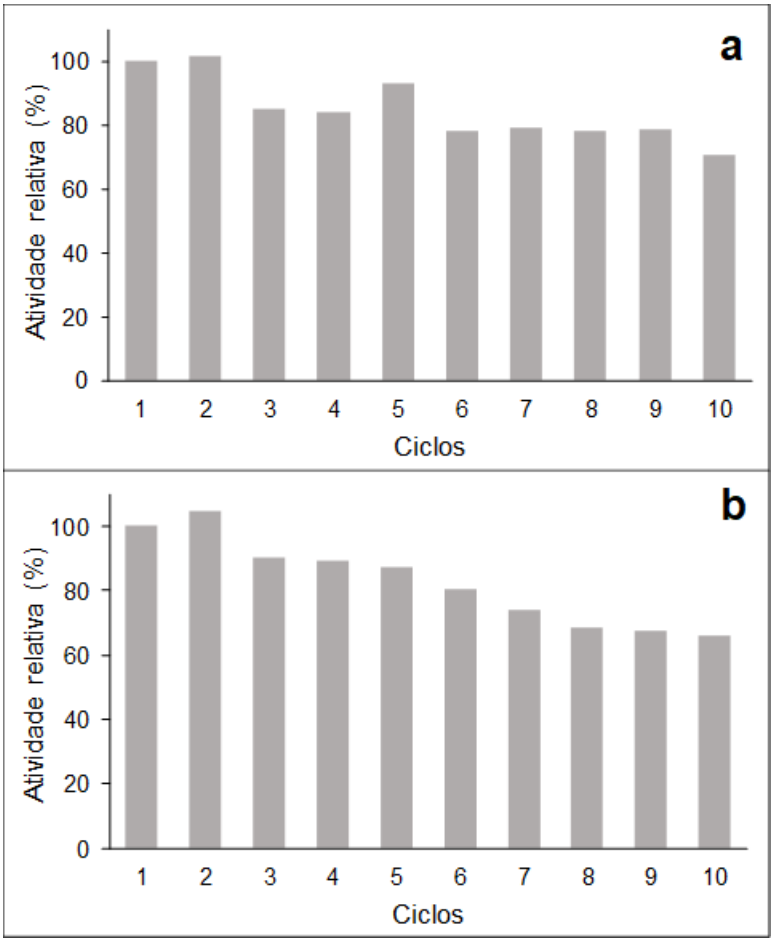

Figura 7

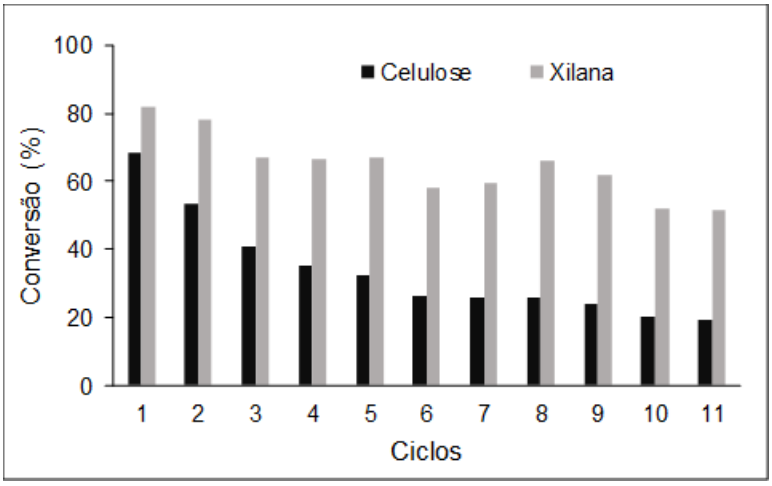

Figura 8

RESUMO

PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO SIMULTNEA DE CELULASES E XILANASES SOBRE OXIDO DE GRAFENO MAGNÉTICO E USO DO MESMO

A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de um derivado enzimático magnético e a sua utilização na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica. O processo de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica utilizando o derivado enzimático magnético, leva à obtenção de glicose e xilose sem a formação de qualquer tipo de inibidor de microrganismos. O derivado enzimático magnético pode ser reutilizado em vários ciclos de hidrólise. A glicose e xilose, na forma de hidrolisados, podem ser úteis para produzir diversos bioprodutos de interesse comercial.