

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

EQB738 – ENGENHARIA ENZIMÁTICA

Biocatálise em Sistemas Não-Aquosos

Prof Bernardo Dias

Introdução

- Uso exclusivo de Água → Restrição de Aplicações em Biocatálise
- Limita a produtividade de processos que envolvem substratos hidrofóbicos.
- Muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes ricos em lipídeos
- **Meios Não-Aquosos:**
 - ✓ Solventes orgânicos;
 - ✓ Fluidos supercríticos;
 - ✓ Líquidos iônicos;
 - ✓ Fases gasosas;
 - ✓ Fases sólidas;
 - ✓ Sistemas Micelares;



Introdução

- **Vantagens:**

- ✓ trocas no equilíbrio da reação, como consequência da alteração do coeficiente de partição de substratos e produtos entre as fases de interesse (controle da atividade da água).
- ✓ solubilização de substratos e /ou produtos hidrófobos;
- ✓ redução da inibição e ou toxicidade devida a substratos e produtos – solvente reduz a concentração interfacial (diluyente);
- ✓ facilidade de recuperação de produtos e biocatalisador (fases distintas);
- ✓ aumento da termoestabilidade do biocatalisador;
- ✓ menor risco de contaminação microbiana;
- ✓ aumento da estereoespecificidade na resolução de misturas racêmicas;
- ✓ variação na especificidade de algumas enzimas por seus substratos;
- ✓ aumento da solubilidade das espécies apolares;
- ✓ a imobilização freqüentemente não é necessária, mas se esta é desejável uma simples adsorção ou deposição sobre superfícies não porosas é satisfatória.

- ✓ **Desvantagens:**

- ☐ desnaturação e/ou inibição do biocatalisador pela presença do solvente orgânico;
- ☐ aumento da complexidade do sistema de reação- formação de emulsões;
- ☐ custos adicionais de solventes, co-solventes ou surfactantes.
- ☐ Limitações a transferência de massa no reator

Critérios para Seleção do Solvente

Físico Químicos (capacidade extração e solubilização substratos e produtos e propriedades- separação e transferência de massa)

- Capacidade para solubilização do substrato e do produto
- Coeficiente de partição
- Densidade
- Pontos de fusão e de ebulição
- Tensão superficial
- Viscosidade

Biológicos (mais restritivo)

- Toxicidade para o biocatalisador

Segurança

- Não apresentar toxicidade ambiental e saúde
- Inflamabilidade

Logísticos

- Facilidade de obtenção (disponibilidade) e reciclável

Econômicos

- Custo

Toxidez do Solvente

Toxicidade Molecular → difusão das moléculas de solvente através da membrana citoplasmática → Solventes Hidrofílicos

Toxicidade de Fase → Contato direto entre biocatalisador e solvente (baixa partição para o filme aquoso que rodeia o biocatalisador) → Solvente Hidrofóbico

- Pode ser reduzida, pelo uso de nutrientes mais concentrados, reduzindo a área interfacial, usando agitação suave/ e ou reduzindo a razão volumétrica das fases orgânica/aquosa- reduzindo efeitos de agregação e emulsão.
- Uso de imobilização do biocatalisador ou de membranas hidrófobas – evitam contato direto.

Table 1.4 Solvent descriptors of organic solvents commonly used for biocatalysis. Sw/o (solubility of water in solvent, wt%) So/w (solubility of solvent in water, wt%) and ϵ (dielectric constant) values from [78], log P (P = partition coefficient between octanol and water), ET (empirical polarity parameter by Reichardt-Dimroth) and HS (Hildebrand solubility parameter, $\text{J}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$) from [79].

<i>Solvent</i>	<i>log P</i>	ϵ	<i>ET</i>	<i>HS</i>	<i>Sw/o</i>	<i>So/w</i>
DMF	−1.01	36.71	0.404	20.3	100	
Methanol	−0.77	32.66	0.762	29.7	100	100
Ethanol	−0.31	24.55	0.654	26.1	100	100
1,4-Dioxane	−0.27	2.21	0.164	20.7	100	100
Acetone	−0.24	20.56	0.355	20.5	100	100
2-Butanone	0.29	18.51	0.327	19	10	24
Pyridine	0.65	12.91	0.302	21.7	100	100
Ethyl acetate	0.73	6.02	0.228	18.6	2.94	8.08
1-Butanol	0.88	17.51	0.506	23.7	20.5	7.45
Diethyl ether	0.89	4.2	0.117	15.1	1.47	6.04
Diisopropyl ether	1.52	3.88	0.102	14.4	0.57	1.2
Butyl acetate	1.7	5.01		17.4	1.2	0.68
Benzene	2.13	2.27	0.111	18.7	0.0635	0.179
1,1,1-Trichlorethane	2.49	7.25	0.17	17.4	0.034	0.132
Toluene	2.73	2.38	0.099	18.2	0.0334	0.0515
Hexane	3.98	1.88	0.009	14.9	0.0111	0.00123
Heptane	4.57	1.92	0.012	15.2	0.0091	0.000357

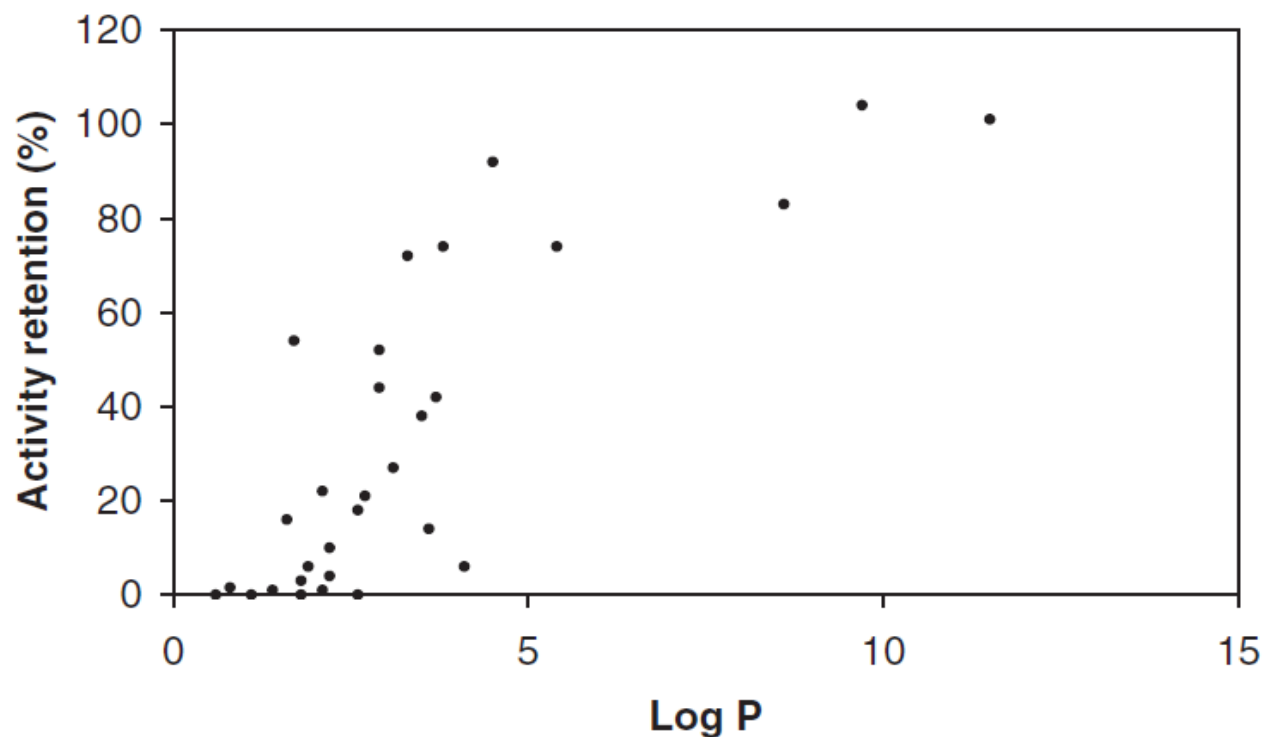


Figure 1.7 Activity retention of immobilized cells catalyzing an epoxidation reaction after exposure to organic solvents with different log P values. Data from Brink and Tramper [76] plotted according to Laane et al. [57]. Reprinted with permission of Wiley-Liss, a subsidiary of John Wiley and Sons, Inc.

Sistemas

Homogêneos: misturas de água com solventes orgânicos miscíveis

Heterogêneos:

Macro-heterogêneos –

dois líquidos imiscíveis (sistemas de duas fases orgânico-aquosas)
sólido - líquido - líquido

sólido – líquido (enzimas suspensas em meio orgânico com baixo conteúdo de água- forma de pó ou imobilizadas)

Micro-heterogêneos - micelas reversas (micelas invertidas e enzimas modificadas covalentemente)

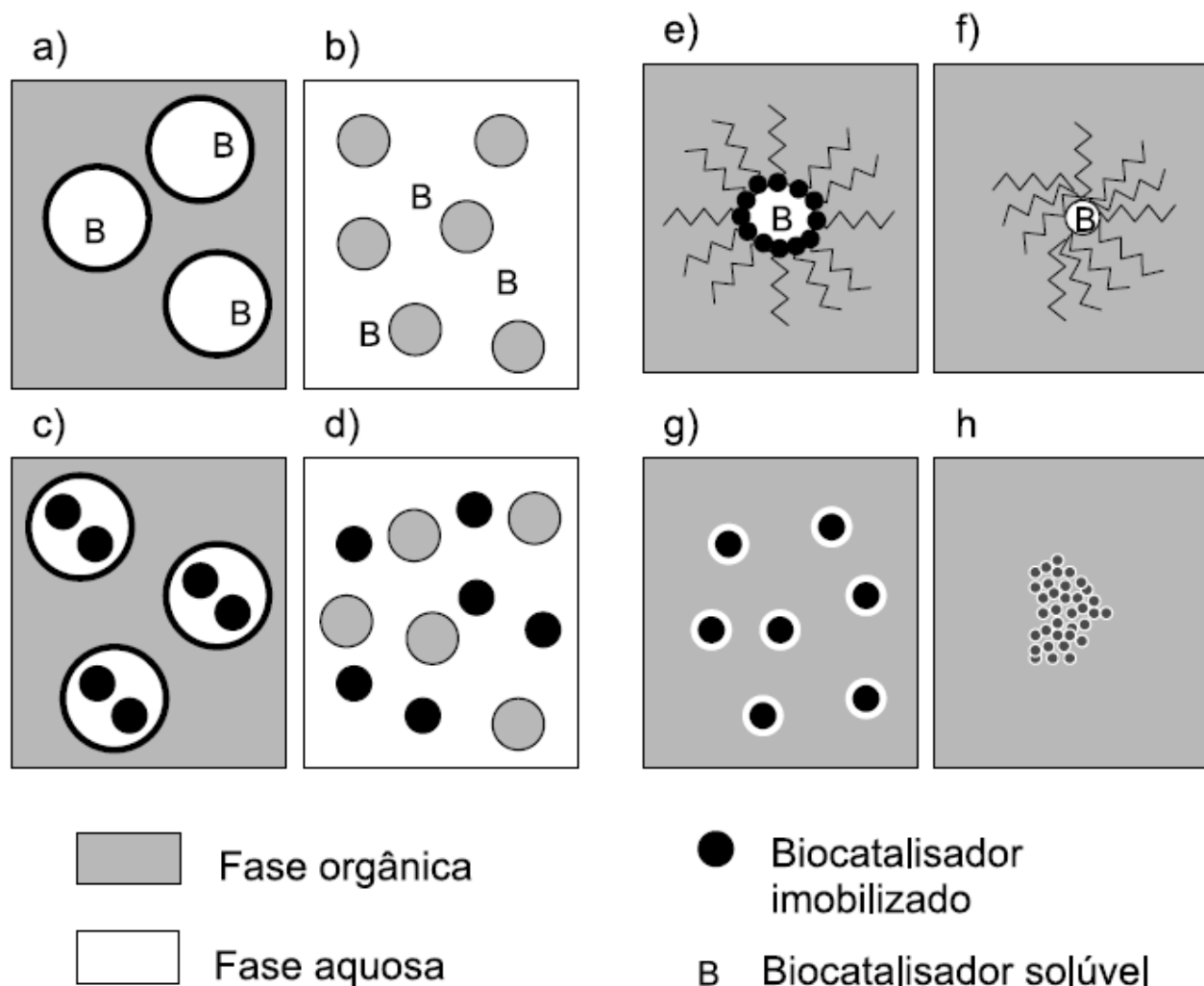


Figura 2 - Classificação de sistemas biocatalíticos englobando solventes orgânicos: (a) sistemas de duas fases líquidas orgânico-aquosas: emulsão de meio aquoso (disperso) em meio orgânico (contínuo); (b) sistemas de duas fases líquidas orgânico-aquosas: emulsão de meio orgânico (disperso) em meio aquoso (contínuo); (c) e (d) biocatalisador imobilizado num suporte poroso, em presença de um sistema bifásico; (e) biocatalisador microencapsulado numa micela invertida; (f) biocatalisador modificado com polietileno glicol e dissolvido em meio orgânico; (g) biocatalisador imobilizado ressuspenso em meio orgânico; (h) biocatalisador liofilizado e na forma de cristais, ressuspenso em meio orgânico.

Homogêneos:

- Solventes aquosos miscíveis em água – etanol, metanol, dimetilformamida.
- Resistências a transferência massa reduzida – homogeneidade.
- Mais tóxicos em concentrações elevadas.

Sistemas Macro-heterogêneos

líquido – líquido

Enzima e compostos hidrofílicos na fase aquosa e os substratos e produtos hidrófobos na fase orgânica

Vantagens:

- converter compostos pouco solúveis em água;
- conduzir com alto rendimento reações que ocorram com formação de água como produto (p.ex., síntese de peptídeos e de ésteres de aminoácidos);
- preparação simples;
- fácil separação de produtos de reação e regeneração da enzima.

Desvantagens:

- partição de solventes polares usados como fase orgânica em água - perda de atividade catalítica da enzima dissolvida na fase aquosa;
- área interfacial água-solvente orgânico é bastante pequena e conseqüentemente a magnitude da transferência de massa através da interface é baixa - emulsão;
- intensa agitação pode gerar uma tendência das enzimas a adsorver-se na interface.

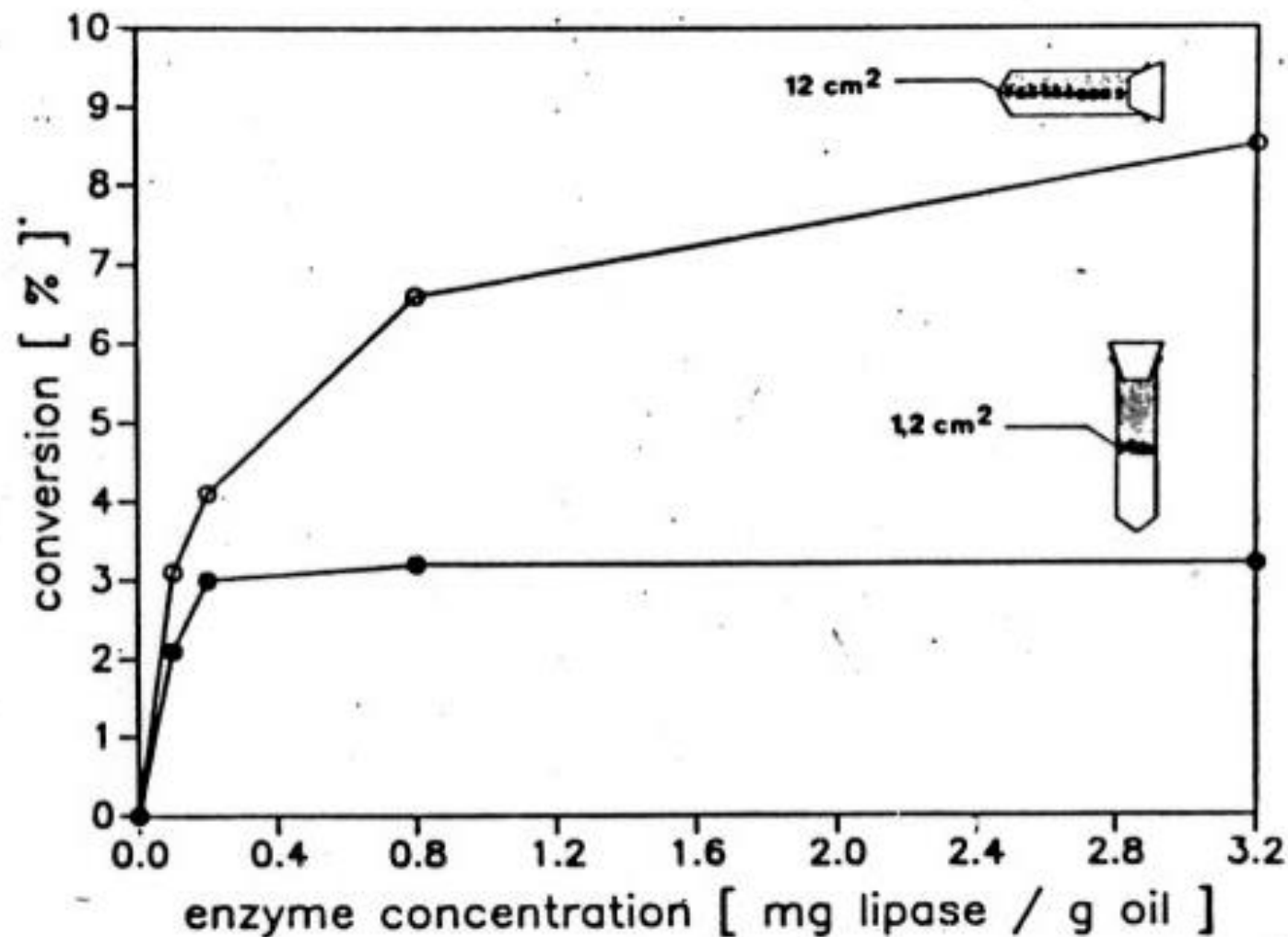


Fig. 15. Saturation of phase boundary surface with lipase: oil/H₂O = 25%/75%; pH 5.6; 30°C; reaction time 1 h.

Sistemas Micro-heterogêneos

- Casos particulares de microemulsões- fase aquosa não é macroscopicamente discernível da fase orgânica.
- Moléculas de agentes tensoativos na presença solventes apolares e de pequenas quantidades de água.
- Agentes tensoativos – grupo polar (hidrófilo- dentro do agregado) e cauda apolar (hidrófoba- contato solvente apolar).
- Micelas invertidas permitem – solubilização enzimas no núcleo interior aquoso e a partição de substratos e/ou produtos entre o núcleo e o solvente.

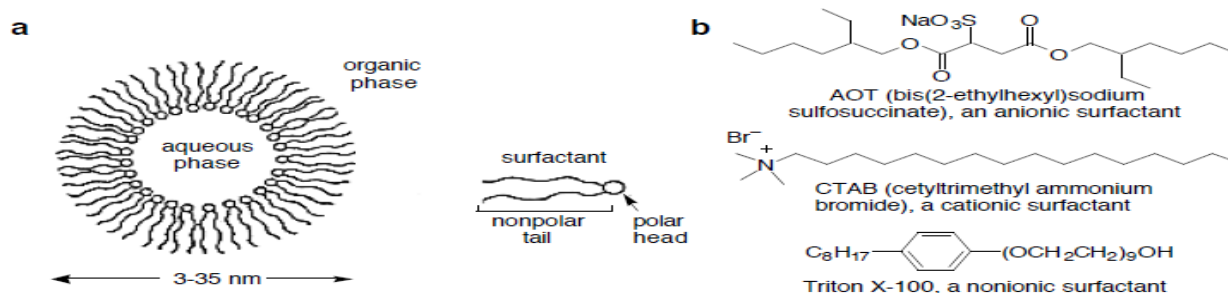


Fig. 28. Reverse micelles or water in oil microemulsions. **a** Reverse micelle contain an inner aqueous phase stabilized by surfactant in a bulk organic phase. **b** Surfactants used to stabilize reverse micelles include anionic (e.g., AOT), cationic (e.g., CTAB) and nonionic (e.g., Triton X-100) surfactants.

Novos Solventes

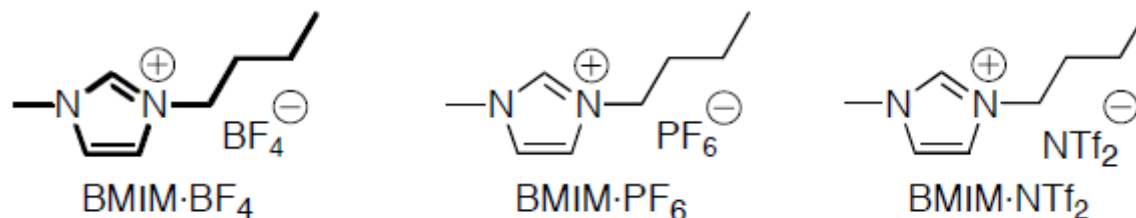


Fig. 27. Common ionic liquids in biocatalysis – 1-butyl-3-methylimidazolium salts.

PENNSTATE



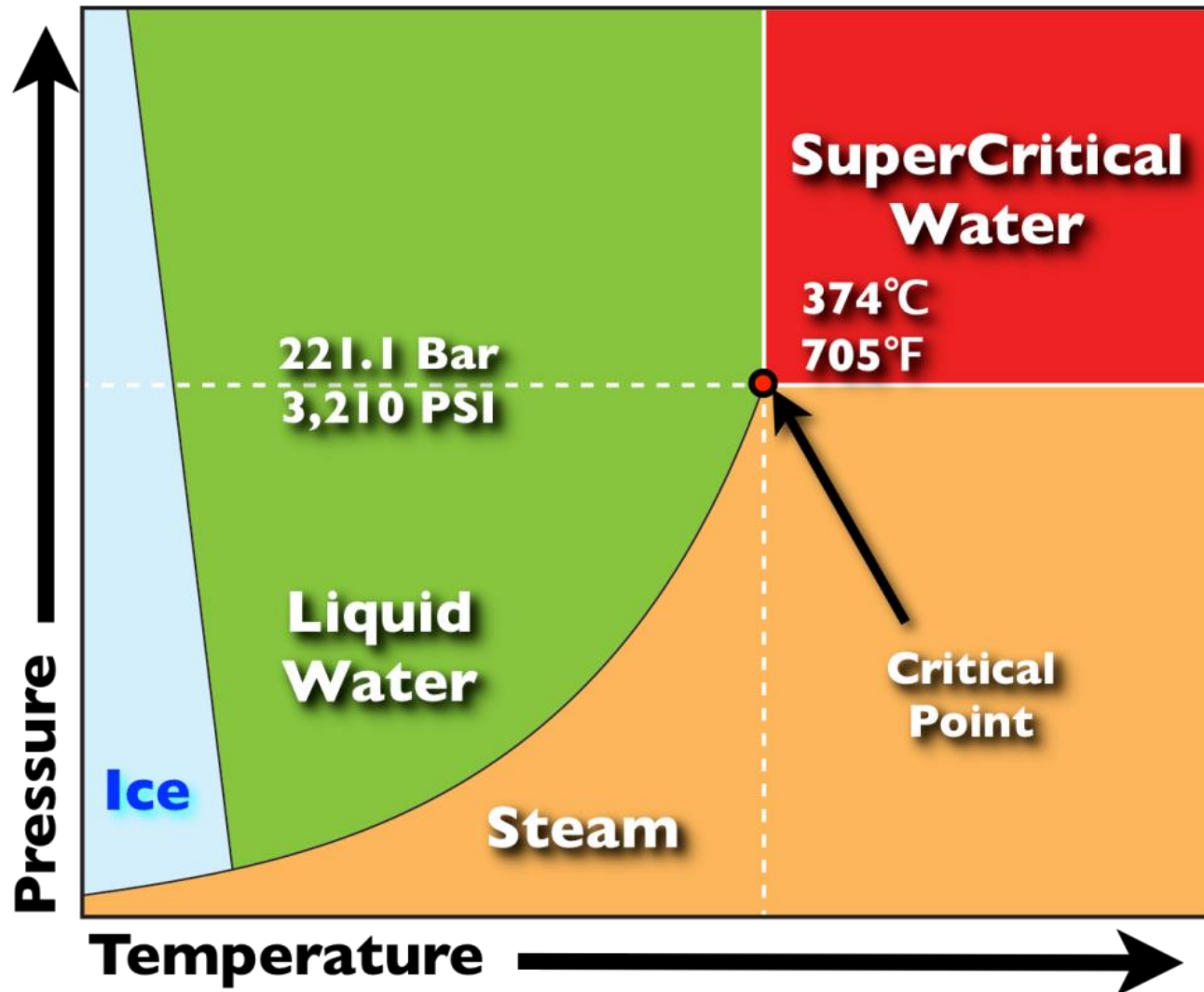
Novos Solventes

Tab. 5. Selected Hydrolases Active in Ionic Liquids.^a

Enzyme	Reaction	References
Lipases		
CAL-B ^b	transesterification	Park and Kazlauskas (2001); Lau et al. (2000); Lozano et al. (2000); Kim et al. (2001); Itoh et al. (2001); Schöfer et al. (2001)
	perhydrolysis	Lau et al. (2000)
	ammoniolysis	Lau et al. (2000)
PCL ^b	transesterification	Park and Kazlauskas (2001); Kim et al.(2001); Nara et al. (2002)
	polyester synthesis	Nara et al. (2003)
Proteases		
Thermolysin	peptide synthesis	Erbeldinger et al. (2000)
α -Chymotrypsin	transesterification	Lozano et al. (2001b; 2003); Laszlo and Compton (2001); Eckstein et al. (2002)
Esterase		
BSE ^b	transesterification	Persson and Bornscheuer (2003)
Glycosidase		
β -Galactosidase	<i>N</i> -acetylglucosamine synthesis ^c	Kaftzik et al. (2002)

^aFor a more complete list see Kragl et al. (2002). ^bCAL-B, *Candida antarctica* lipase B; PCL, *Pseudomonas cepacia* lipase; BSE, *Bacillus stearothermophilus* esterase. ^c25% ionic liquid in water

Novos Solventes



Novos Solventes

Substance	P_c (bar)	T_c (°C)	ρ_c (g mL ⁻¹)
CO ₂	72.9	31.3	0.47
N ₂ O	72.5	36.5	0.45
SF ₆	37.1	45.5	0.74
Xe	58.4	16.6	1.10
CH ₃ OH	78.9	240.5	0.27
CH ₃ CH(OH)CH ₃	47.0	235.3	0.27
H ₂ O	218	374	0.32

Novos Solventes

	Density (g cm ⁻³)	Diffusion (cm ² s ⁻¹)	Viscosity (g cm ⁻¹ s ⁻¹)
Gas	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
Supercritical fluid	10 ⁻¹ – 1 <i>Liquid-like</i>	10 ⁻⁴ – 10 ⁻³ <i>Liquid-like</i>	10 ⁻⁴ – 10 ⁻³ <i>Gas-like</i>
Liquid	1	< 10 ⁻⁵	10 ⁻²



Novos Solventes

Tab. 6. Examples of Lipase-Catalyzed Reactions in Supercritical Carbon Dioxide.

Lipase	Reaction	Process conditions ^a	References
ROL	triolein/stearic acid	B, 35β50°C, 150 bar	Chi et al. (1988); Nakamura et al. (1986)
RML	ethyl acetate/iso-amyl alcohol	C, 35β80°C, 80β140 bar, IPI	Doddema (1990); Janssens et al. (1992)
ROL	trilaurin/palmitic acid	B, 40°C, 90β290 bar	Erickson et al. (1990)
RML	oleic acid/ethanol	C, 33β50°C, 110β170 bar,	Marty et al. (1990; 1992)
RML	myristic acid/ethanol	B, 50°C, 150 bar	Dumont et al. (1992)
ROL	trilaurin/myristic acid	SβC, 35°C, 79β107 bar	Miller et al. (1990)
RML	trilaurin/oleic acid methylester	C, 40°C, 100 bar, IPI	Adshiri et al. (1992)
RML	myristic acid/ethanol	B, 50°C, 125 bar	Bernard and Barth (1995)
RML, ANL	oleic acid/oleyl alcohol	B, 40°C, 84β167 bar	Knez and Habulin (1992)
RML	myristic acid/ethanol	B, 50°C, 125 bar	Bernard et al. (1992)
PPL	butyric acid/glycidol	B, 35°C, 140 bar	Martins et al. (1992)
RML	ethyl acetate/nonanol	C, 60°C, 125β200 bar	Vermuë et al. (1992)
Several	methacrylate/2-ethyl hexanol	B, 40β50°C, 107 bar ^b	Kamat et al. (1992; 1993)
RML	propyl acetate/geraniol	B, 40°C, 140 bar	Chulalaksananukul et al. (1993)
RML	e.g., fructose-PBA/oleic acid	B, 40°C, 150 bar	Castillo et al. (1994)
PPL	adipate/1,4-butanediol	B, 50°C, 60β340 bar ^c	Chaudhary et al. (1995)
CRL	oleic acid/citronellol	B, 31-40°C, 76β193 bar	Ikushima et al. (1993)
PCL	3-hydroxyester/vinyl acetate	B, 36β70°C, 100β170 bar	Bornscheuer et al. (1996); Capewell et al.
PCL	2°-alcohols/acylation	B, 40°C, 200 bar	Cernia et al. (1994a; b)
CRL, PME	menthol or citronellol /IA, TA	B, 35β70°C, 150 bar	Michor et al. (1996)
RML	ibuprofen	B, 50°C, 100β150 bar	Rantakylae and Aaltonen (1994)
CAL-B	randomization of e.g., palm olein	B, 65°C, 200β345 bar	Jackson et al. (1997)
CAL-B	soybean oil/glycerol or MeOH	B, 40β70°C, 200β345 bar	Jackson and King (1997)

^a B: batch reactor; C: continuous reactor; S-C: semi-continuous reactor; IPI: integrated product isolation; PBA: phenyl boronic acid; IA: isopropenyl acetate; TA: triacetyl glycerol. ^b Ethane, ethylene, fluoroform, propane, sulfur hexafluoride also. ^c Fluoroform also.

Exemplos de Processos Industriais de Biocatálise em Fase orgânica

Reacção	Biocatalisador	Solvente	Companhia
Epoxidação 1-octeno	Nocardia corallina	n-hexadecano	Nippon Mining
Hidrólise de ésteres	Subtilisina (imobilizada) Lipase	Vários	Bayer Sumitomo, Chemie Linz AG; BASF; Sche- ring Plough
Desidrogenação de esteróides	Arthrobacter simplex	Tolueno	Upjohn
Dessulfurização	Rhodococcus sp.	Óleo (substrato)	Energy Biosystems

- Hidroxilação – hidroxilação de fenóis usando polifenoloxidase adsorvida em pérolas de vidro e suspensas em cloroformio- forma quinonas que são reduzidas depois a hidroxilados com ácido ascórbico.
- - Síntese de esteres – lipases alteram a forma de atuação em meio orgânico – reações de esterificação e interesterificação – obtenção de esteres de ácidos graxos de elevada pureza – isopropilmiristato, isopropilpalmitato 2-etilexilpalmitato (cremes etc)
- - Síntese peptídeos – á partir de protease em meio de no máximo 50% de água. Quimotripsina imobilizada em sefarose em butanol hidratado usada para este fim .
- - Resolução de misturas racêmicas- compostos opticamente ativos – usando lipases em meio orgânico.

Table 8.1 Some recent examples of biphasic systems in biocatalysis.

<i>Biocatalyst</i>	<i>System</i>
Alcohol dehydrogenase (Regeneration of co-factor is performed by the same enzyme, using 2-propanol as co-factor)	Reduction of acetophenone to (R)-phenylethanol in phosphate buffer/ methyl <i>tert</i> -butyl ether
Alcohol dehydrogenase (coupled to formate dehydrogenase for co-factor regeneration)	Reduction of ketones in phosphate buffer/ <i>n</i> -heptane
Chloroperoxidase	Oxidation of primary alcohols to aldehydes in acetate or citrate buffer/hexane or ethyl acetate
Epoxide hydrolase	Kinetic resolution of epoxides in Tris buffer/octane
β -Glycosidase and β -galactosidase	Synthesis of alkyl- β -glucosides in acetate buffer/1-hexanol or 1-octanol
Hydrolase	Resolution of (R,S)-ethyl mandelate and (R,S)-ethyl 2-chloromandelate in phosphate buffer/ <i>iso</i> -octane
Hydroxynitrile lyase	Synthesis of (R)-mandelonitrile in sodium phosphate buffer/methyl <i>tert</i> -butyl ether
Laccase	Oxidation of ferulic acid in sodium phosphate buffer/ethyl acetate to yield colorants
Lipase	Resolution of (R)-isomer and (S)-isomer of 2-hydroxy octanoic acid in phosphate buffer/ <i>iso</i> -octane
Penicillin acylase (immobilized)	Penicillin G hydrolysis in countercurrent system, in water (low pH, 4–5.6)/butyl acetate
Pyruvate decarboxylase	Production of (R)-phenylacetylcarbinol, a precursor of ephedrine in MES-KOH buffer/1-pentanol
Thermolysine	Syntheses of <i>N</i> -(benzyloxycarbonyl)-L-alanyl-L-phenylalanine methyl ester and <i>N</i> -(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-phenylalanine methyl ester in HEPES or MES-NaOH buffers/ethyl acetate
Thermolysine	Synthesis of ZAlaPheOMe in a membrane contactor using Tris-HCl/ethyl acetate

Princípios Físico-Químicos

- Papel da água – influencia atividade catalítica da enzima.

ex: *quimiotripsina* em octano (50 H₂O : E)

polifenoloxidase em clorofórmio (0,5% v/v H₂O)

glucoamilase em di e trietileno glicol (10% v/v H₂O)

- Interações que afetam a estabilidade - Ligações H+
- Propriedades dos solventes e seus efeitos
inibição ou inativação da enzima;
interage com substratos e produtos
remove a capa de água
- Propriedades de solutos e produtos de reação
formação do gradiente de difusão

Tab. 4. Methods to Control Water Activity in Organic Media.

Method	Reference
Equilibrate with saturated salt solutions	Adlercreutz (1991); Bloomer et al., (1991); Goderis et al. (1987); Rosell et al. (1996); Valivety et al. (1992a)
Equilibrate with salt hydrates	Halling (1992); Kim and Choi (1995); Kvittingen et al. (1992)
Equilibrate with saturated salt solutions via silicone tubing	Wehtje et al. (1993; 1997)
Equilibrate with wet silica gel	Halling (1994)
Measure a_w with sensor and control drying of headspace	Khan et al. (1990)

Table 1.1 Saturated salt solutions suitable for water activity control. Values are given for 25 °C [77].

<i>Salt</i>	<i>Water activity</i>
LiCl	0.113
MgCl ₂	0.225
K-acetate	0.328
K ₂ CO ₃	0.432
Mg(NO ₃) ₂	0.529
SrCl ₂	0.708
KCl	0.843
KNO ₃	0.936
K ₂ SO ₄	0.973

The thermodynamic equilibrium constant of reaction $A + B \rightleftharpoons C + D$ is defined as follows:

$$K = \frac{a_C \cdot a_D}{a_A \cdot a_B} \quad (3)$$

be interconverted using activity coefficients (γ_A , etc), where $a_A = \gamma_A \cdot X_A$.

The different equilibrium constants are thus related as follows:

$$K = K_\gamma \cdot K_x = \frac{\gamma_C \cdot \gamma_D}{\gamma_A \cdot \gamma_B} \cdot \frac{X_C \cdot X_D}{X_A \cdot X_B} \quad (4)$$

where K_x is the molar ratio-based equilibrium constant and K_γ is the combination of activity coefficients shown in the formula. The effects of the medium on

For reactions of the type acid + alcohol $\rightleftharpoons$ ester + water, catalyzed by hydrolases, an equilibrium constant involving both concentrations and the water activity has been suggested [61]:

$$K_0 = \frac{[\text{ester}] \cdot a_w}{[\text{acid}] \cdot [\text{alcohol}]} \quad a_w = \frac{p}{p^*} \quad \begin{array}{l} p \rightarrow \text{pressão de vapor da água na solução} \\ p^* \rightarrow \text{pressão de vapor da água pura} \end{array} \quad (5)$$

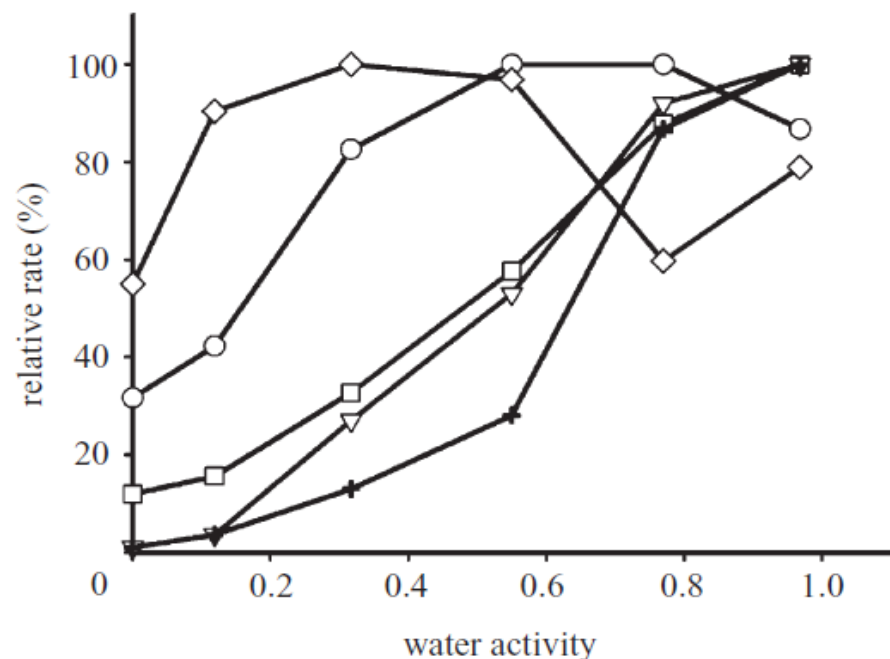


Figure 3. The effect of water activity on lipase catalytic activity. Lipases from *Rhizomucor miehei* (circles), *Rhizopus niveus* (diamonds), *Humicola lanuginosa* (squares), *Candida rugosa* (inverted triangles), and *Pseudomonas cepacia* (plus symbols). (Valivety *et al.* (1992a).)

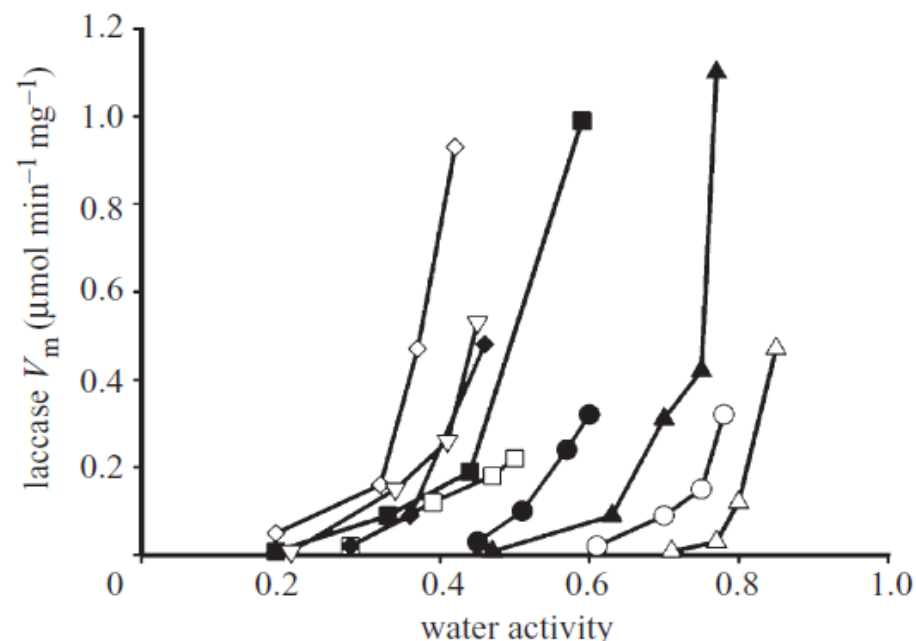


Figure 5. The relationship of laccase activity with water activity in miscible organic solvents. (Data from van Erp *et al.* (1991) for methanol (open diamonds), 2-propanol (inverted triangles), 2-butanol (closed diamonds), ethanol (open squares), 1-butanol (closed squares), dioxane (closed circles), acetonitrile (closed triangles), tetrahydrofuran (open circles) and acetone (upright triangles). Converted to water activity basis by Bell *et al.* (1997).)

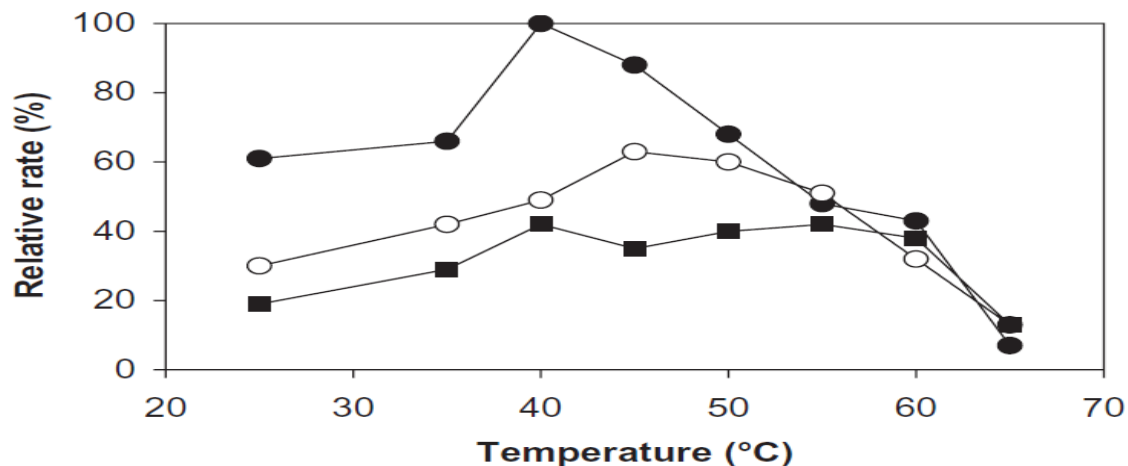


Figure 1.5 Relative activity of α -chymotrypsin in 5-methyl-2-hexanone at different temperatures and water contents: 100% water saturation (●), 75% water saturation (○), and 50% water saturation (■). Reprinted from Ref. [42] with kind permission of Springer Science and Business Media.

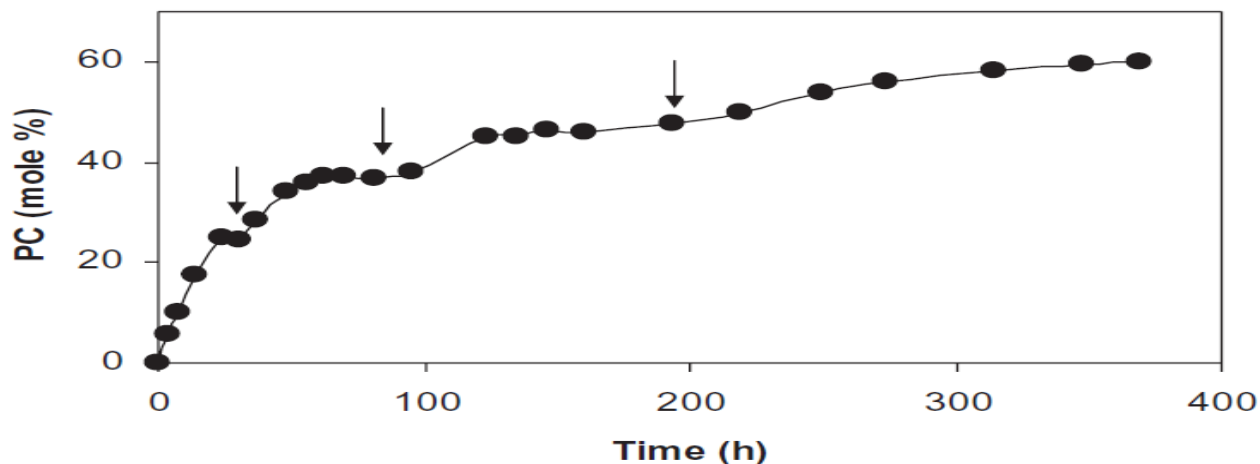


Figure 1.8 Time course of the synthesis of phosphatidylcholine from lysophosphatidylcholine and oleic acid catalyzed by phospholipase A_2 . The water activity was initially 0.43 and was decreased stepwise to 0.33, 0.22 and finally to 0.11 (at times indicated by arrows). Reprinted with permission from Elsevier [29].

Table 3.2 Values of $(k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{app}}$ ($\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$) $\times 100$ for freely suspended and glass-immobilized α -chymotrypsin in various solvents. In all solvent conditions, the enzyme is 1–2 orders of magnitude more active than the free, lyophilized enzyme [78].

<i>Solvent</i>	<i>Freely suspended chymotrypsin</i>	<i>Immobilized chymotrypsin</i>	<i>Ratio^[a]</i>
<i>n</i> -Octane	221	19 120	87
Carbon tetrachloride	15	2 150	141
Toluene	7.7	557	72
Diethyl ether	33	1 370	42
Tetrahydrofuran	7.2	91	13
Acetonitrile	0	56	—

a Ratio defined as: $(k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{app,immobilized}} / (k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{app,suspended}}$.

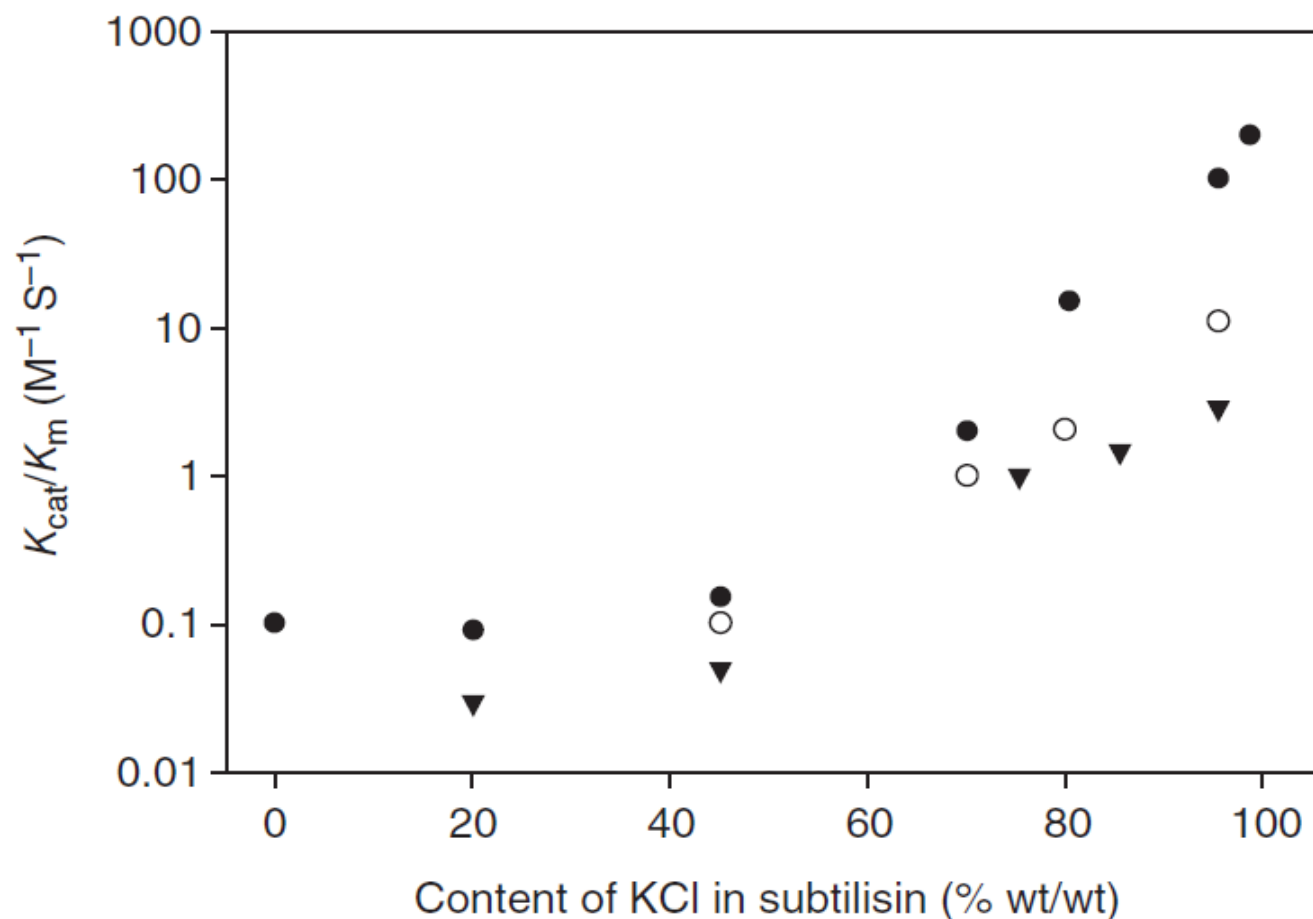


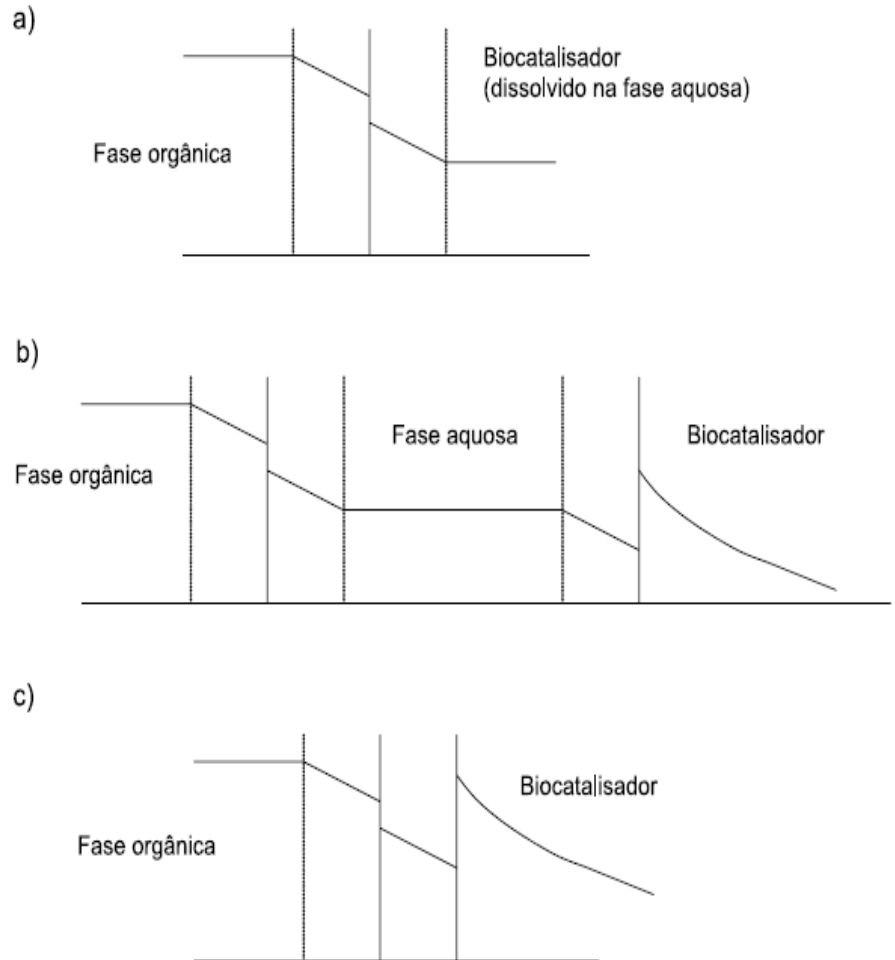
Figure 3.7 Catalytic activity of subtilisin in anhydrous organic solvents (● *n*-hexane, ○ diisopropyl ether, ▼ THF) as a function of the KCl content in the dry catalyst. The activity is expressed in terms of k_{cat}/K_m of the transesterification reaction between *N*-acetyl-L-phenylalanine ethyl ester and *n*-propanol, used in concentrations of 10 mM and 0.85 M, respectively [88].

Classificação dos sistemas: Perfis relativos de concentração do substrato e volume relativo de fases orgânico/aquosa

1- Duas fases líquidas orgânico-aquosas.

2- Duas fases líquidas orgânico-aquosas, com o biocatalisador insolúvel (imobilizado).

3- Sistema de biocatalisadores ressuspensos em solventes orgânicos.



Gradiente de Difusão

para o substrato:

para impulsionar o substrato dissolvido na fase orgânica até a interface, as polaridades do meio orgânico e o substrato devem ser diferentes;

para manter solúvel o substrato na interface, as diferenças de polaridade entre a interface e o substrato devem ser pequenas;

para situações em que uma dada concentração de substrato no microambiente da enzima provoque inibição (*inibição por substrato*), deve-se otimizar a polaridade da interface com respeito a polaridade do substrato.

para o produto:

para que os produtos não fiquem retidos na interface, as diferenças de polaridade entre os produtos e a interface devem ser grandes;

para que os produtos difundam até o solvente orgânico, a polaridade do mesmo deve ser semelhante a dos produtos; como consequência, se evitará a inibição por produtos, já que em torno da enzima a concentração dos mesmos será sempre baixa.

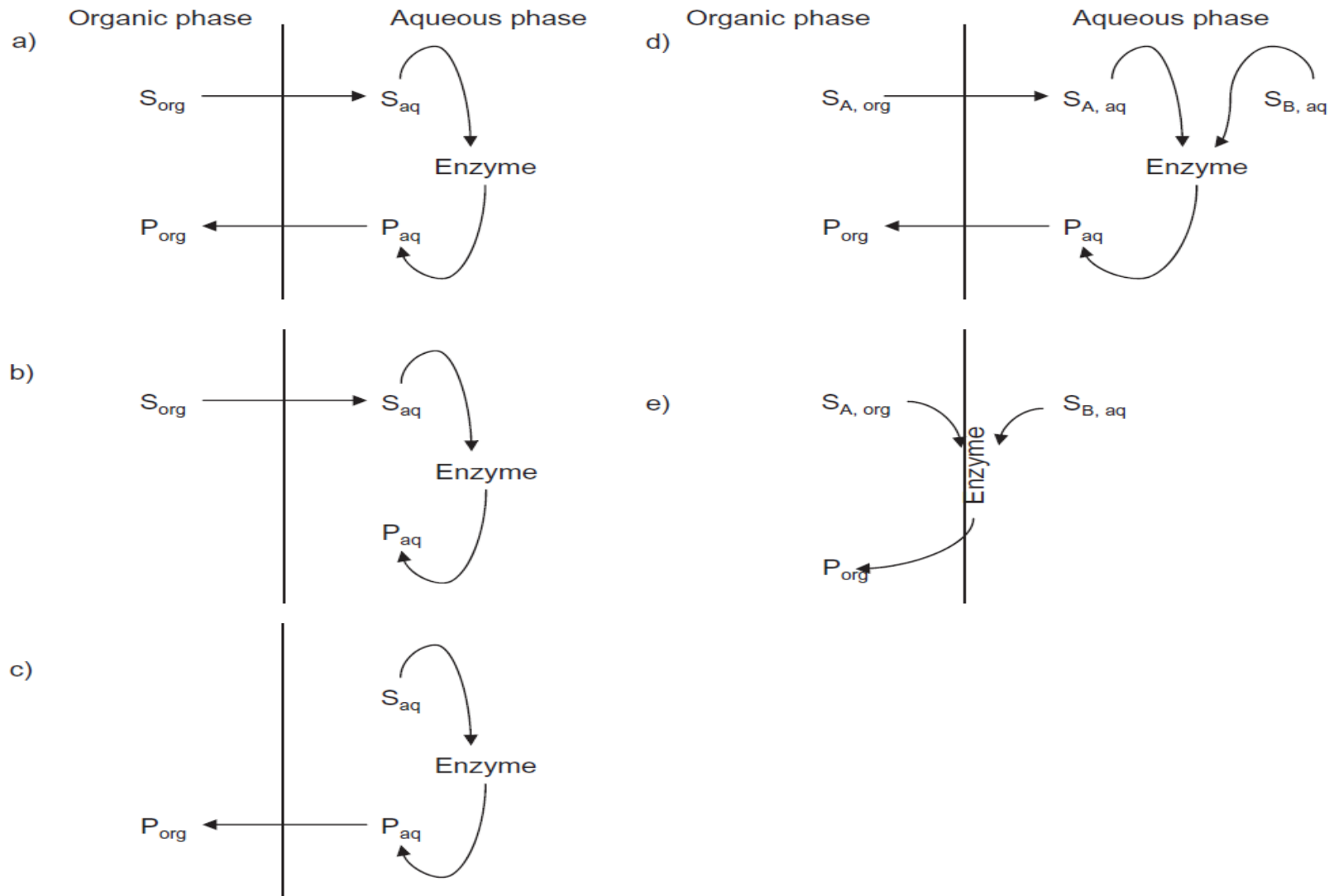


Figure 8.1 Schematic representation of some biocatalytic systems commonly found in organic-aqueous biphasic systems: (a) hydrophobic substrate and product, (b) hydrophobic substrate and hydrophilic product, (c) hydrophilic substrate and

hydrophobic product, (d) and (e) hydrophobic substrate A, hydrophilic substrate B, hydrophobic product. In systems (a) to (d) catalysis occurs in the bulk aqueous phase; in system (e) catalysis occurs in the interface.

P → coeficiente de partição

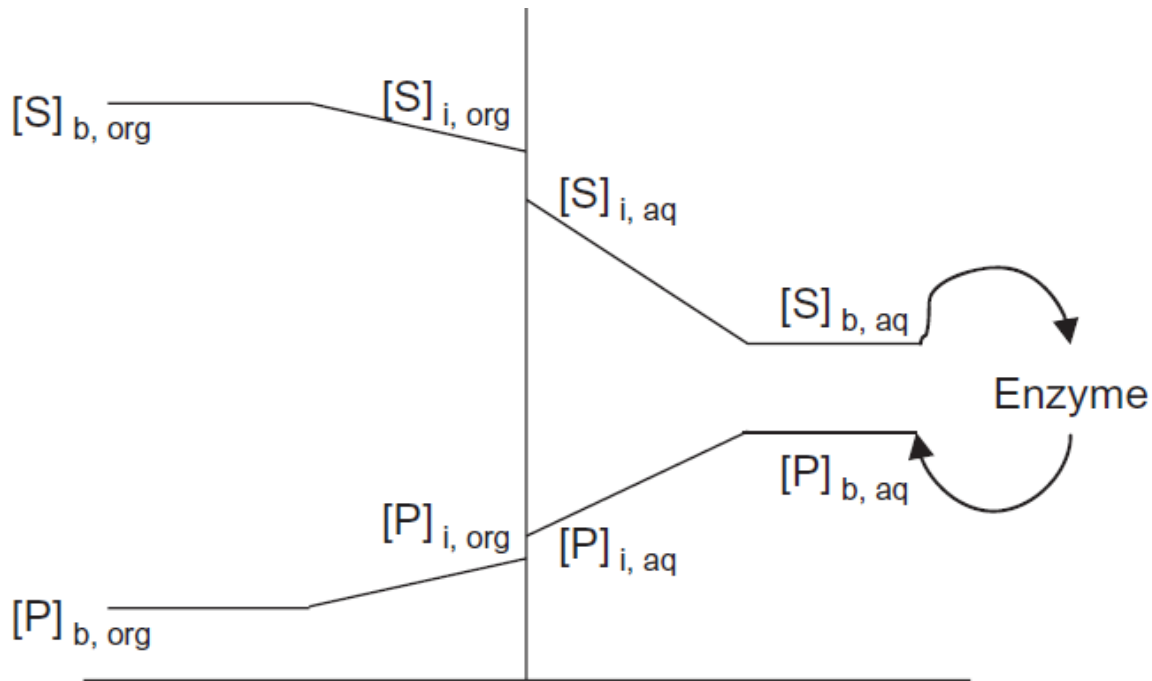


Figure 8.3 Two-liquid film model adapted to a biotransformation system where substrate and product are hydrophobic and reaction occurs in the bulk aqueous phase.

$$P_S = \frac{S_{org}^{eq}}{S_{aq}^{eq}}$$



$$P_P = \frac{P_{org}^{eq}}{P_{aq}^{eq}}$$

$$\frac{dS_{aq}}{dt} = k_S \frac{A}{V_{aq}} (S_{org} - P_S S_{aq}) - \frac{V_{max} S_{aq}}{K_M + S_{aq}}$$

$$\frac{dS_{org}}{dt} = -k_S \frac{A}{V_{org}} (S_{org} - P_S S_{aq})$$

$$\frac{dP_{aq}}{dt} = k_P \frac{A}{V_{aq}} (P_{org} - P_P P_{aq}) - \left(\frac{M_P}{M_S} \right) \frac{V_{max} S_{aq}}{K_M + S_{aq}}$$

$$\frac{dP_{org}}{dt} = -k_P \frac{A}{V_{org}} (P_{org} - P_P P_{aq})$$

$k_S \rightarrow$ coeficiente de transferência de massa (substrato)

$A \rightarrow$ área interfacial

$V_{aq} \rightarrow$ volume da fase aquosa

$M_S \rightarrow$ massa molar (substrato)

Tipos de Reatores Multifásicos

- Seleção reator adequado depende das características da biocatálise e de exigências reacionais e cinéticas do biocatalisador – modo de operação e características do fluxo.
- Características : **propriedades substratos e produtos** (PF e PE, solubilidade em água, estabilidade ao pH, T), **características reacionais** (pH, T, atividade de água) e **do biocatalisador** (livres, imobilizadas, localização atividade enzimática)
- Requisitos principais de reatores usados em sistemas multifásicos – área interfacial elevada, de modo a permitir uma transferência adequada de S e P através da interface e controle eficaz da área interfacial.

Types of Reactors

3

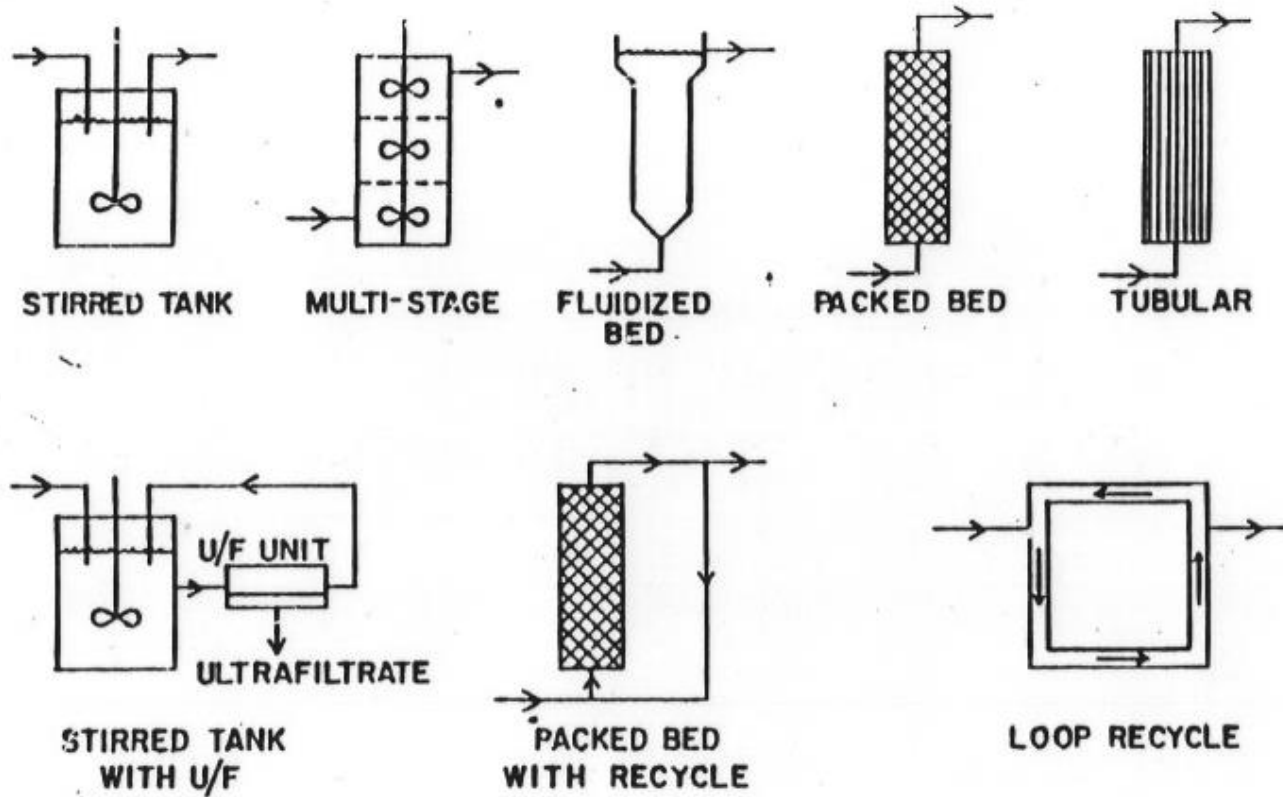


Figure 14.1 Examples of continuous-flow reactor systems.

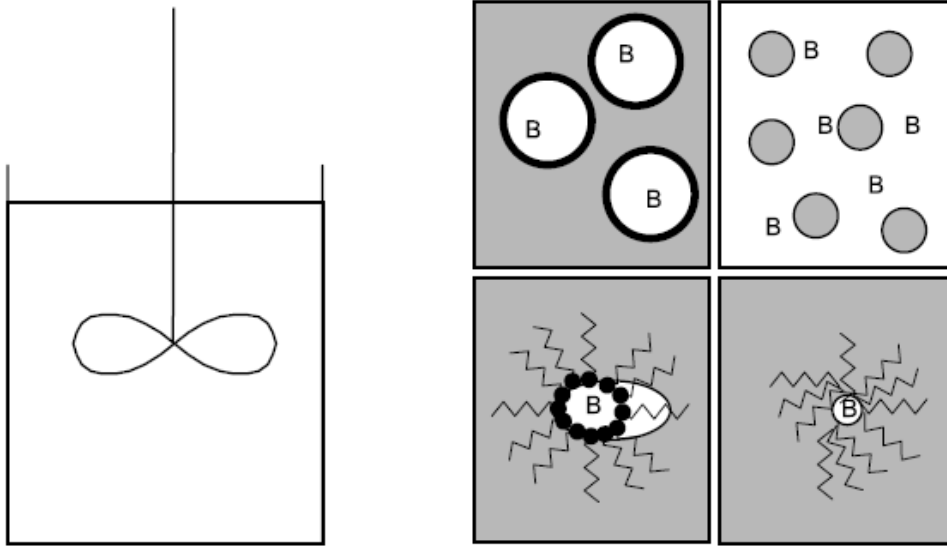


Figura 6 - Reactor descontínuo perfeitamente agitado (BSTTR).

Usados processos com biocatalisadores solúveis – áreas interfaciais elevadas podem ocasionar formação emulsões estáveis.

Usados processos com biocatalisadores imobilizados – redução da formação emulsões estáveis, melhoria separação produto, redução transferência de massa.

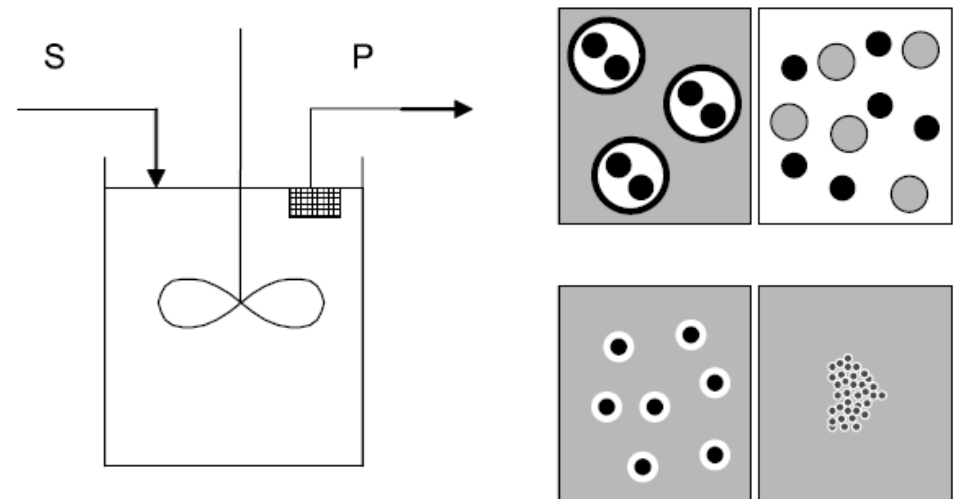


Figura 7 - Reactor contínuo perfeitamente agitado (CSTR)

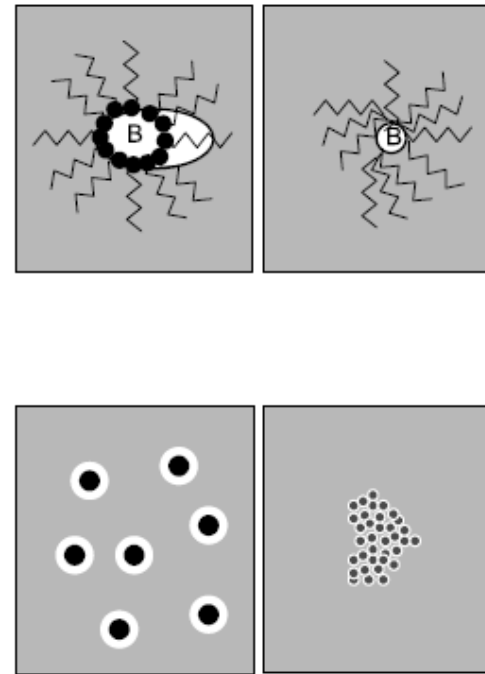
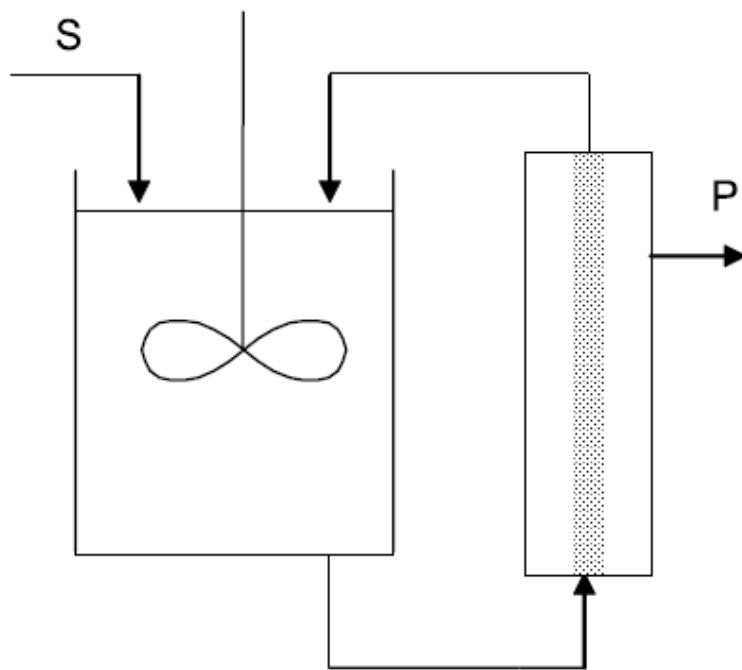


Figura 8 - Reactor de membrana (CSTR com recirculação)

Acoplado a membrana de ultrafiltração- permite uso de sistemas que microscopicamente temos duas fases líquidas – biocatalisador solúvel ou insolúvel

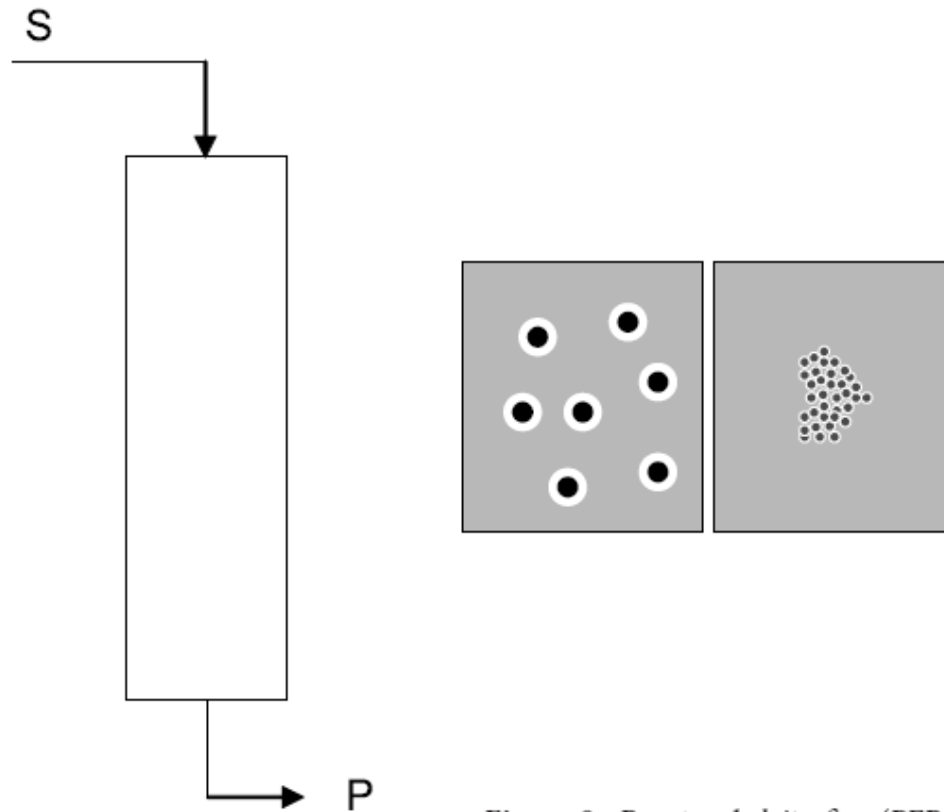


Figura 9 - Reactor de leito fixo (PFR)

Ideal para biocatalisadores ressuspensos em meio orgânico – são mais favoráveis cineticamente e as enzimas não sofrem tensões de corte em função da agitação mecânica. Aplicação limitada ao tipo de substrato e a forma do biocatalisador.

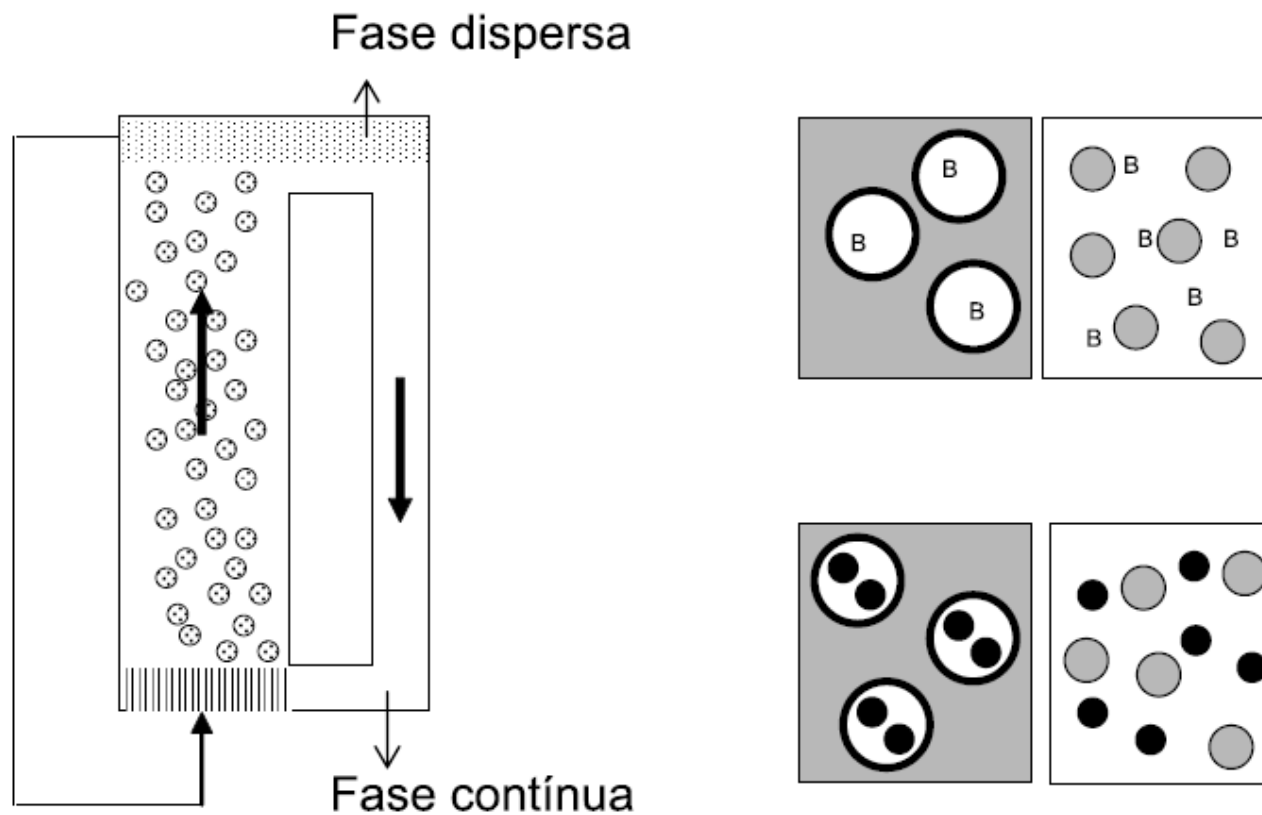


Figura 10 - Reactor agitado por uma fase líquida.

Reatores tipo *air-lift* – misturam-se as fases através do controle do fluxo e baixas tensões de corte- velocidades de reação elevadas e fácil recuperação dos produtos.

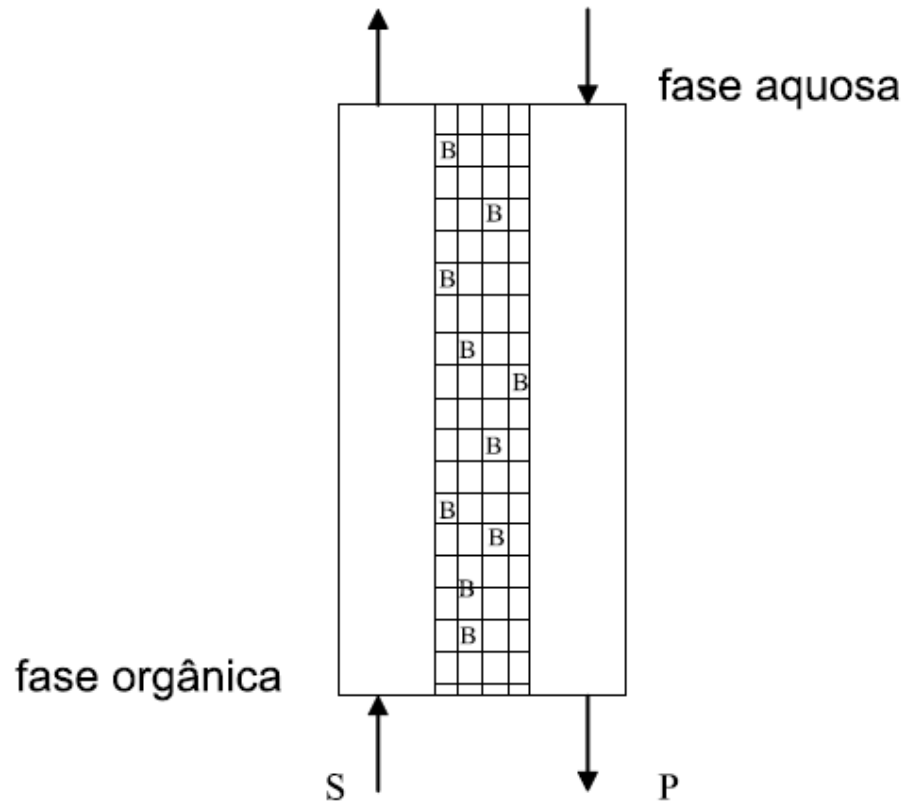


Figura 11 - Reactor de membrana.

Reatores de membrana – permite uma única operação em contínuo, integração da bioconversão com a separação/concentração do produto e recuperação do biocatalisador.

Membrana interface entre fases líquidas imiscíveis e biocatalisador.

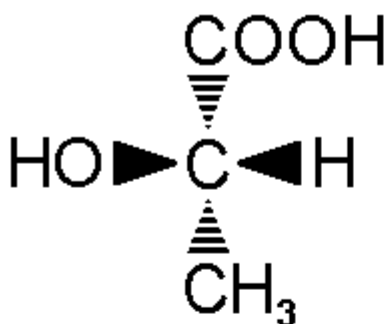
Evita formação emulsões e inativação enzima.

Problemas – *fouling* da membrana

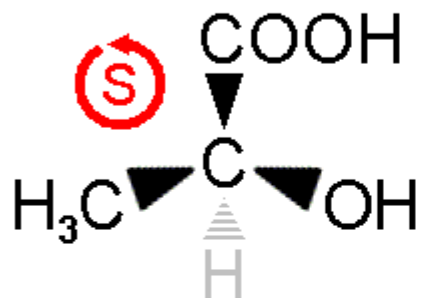
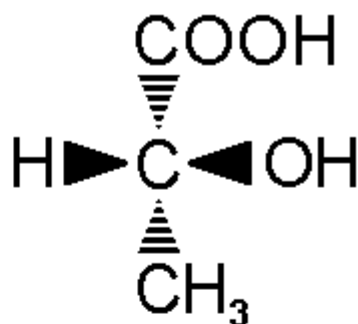
Tipo de Reator	Regime de Fluxo	Eficiência de Conversão	Razão Enzima / Volume do Reator	Controle de Parâmetros	Características Hidrodinâmicas	Custos de Operação
Tanque Agitado Contínuo	Mistura Perfeita	Menor que em coluna (exceto para casos de inibição)	Baixa	Fácil	Boas	Baixos
Coluna Empacotada	Pistão	Maior que o tanque agitado (exceto para casos de inibição)	Alta	Difícil	Regulares (problemas de compactação e canalização)	Intermediários
Reator Contínuo de Ultrafiltração (UF)	Mistura Perfeita	Idem tanque agitado contínuo	Intermediária	Fácil	Regulares (problemas de concentração na membrana)	Altos
Reator de Leito Fluidizado	Intermediário	Intermediária entre o tanque agitado e a coluna	Intermediária	Intermediário	Boas	Altos
Módulo Fibrilar	Pistão	Idem coluna	Alta	Difícil	Idem reator contínuo de UF	Altos

Tipos de Reatores Enzimáticos Contínuos e suas Características

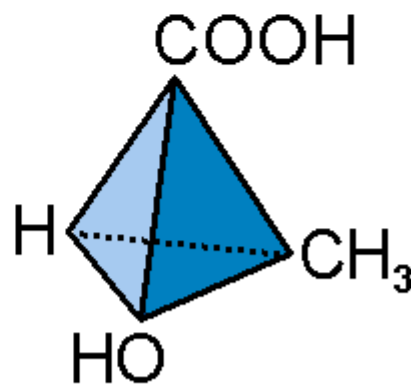
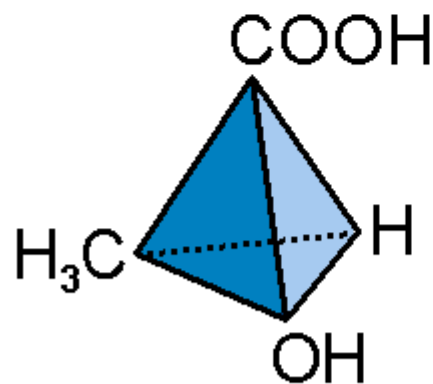
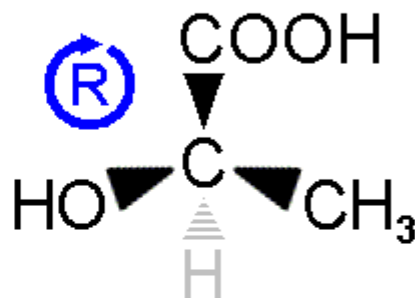
Enantiosseletividade



Fischer projection

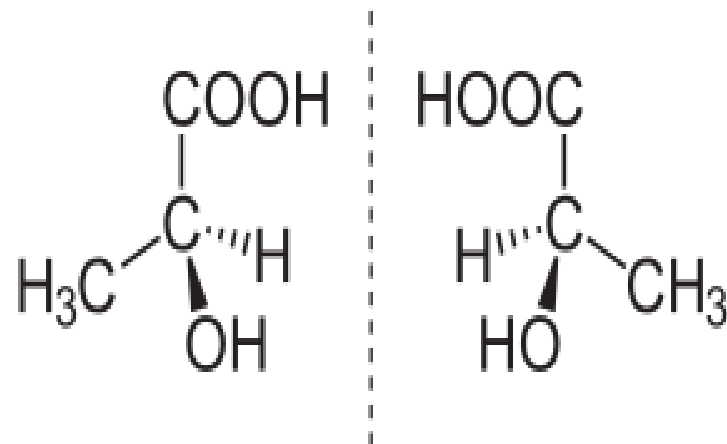


CIP projection



S
L-Lactic acid

D
R-Lactic acid



(S)-(+)-lactic acid (left) and (R)-(-)-lactic acid (right) are nonsuperposable mirror images of each other

Enantiosseletividade



$$E = \frac{V_{max}^R / K_M^R}{V_{max}^S / K_M^S}$$

→ Razão enantiomérica

$$ee_S = \frac{S_S - S_R}{S_S + S_R}$$

→ excesso enantiomérico do substrato restante

$$c = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P}$$

→ Conversão

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_p)]}{\ln[(1 - c)(1 - ee_p)]}$$

$$E = \frac{\ln \left[\frac{1 - ee_s}{1 - ee_s/ee_p} \right]}{\ln \left[\frac{1 - ee_s}{1 + ee_s/ee_p} \right]}$$

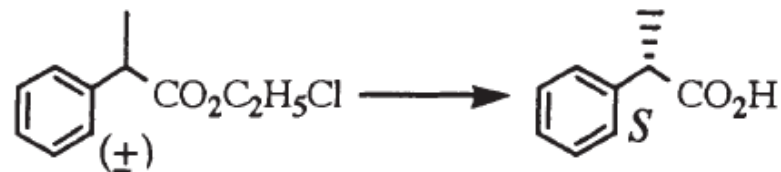
Enantioselectividad

Table 5.4 Enhancement of enantioselectivity in *C. rugosa* lipase catalysis

Selectivity-enhancing factors

Examples

1. Enantioselective inhibition (25)



+ inhibitor

E

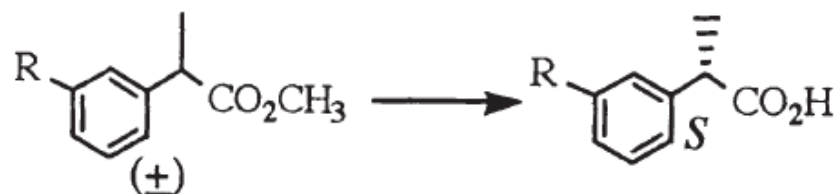
None

10

Dextromethophan

>100

2. Bile salt/organic solvent treatment (26)



E

R

crude lipase

treated lipase

H

10

>100

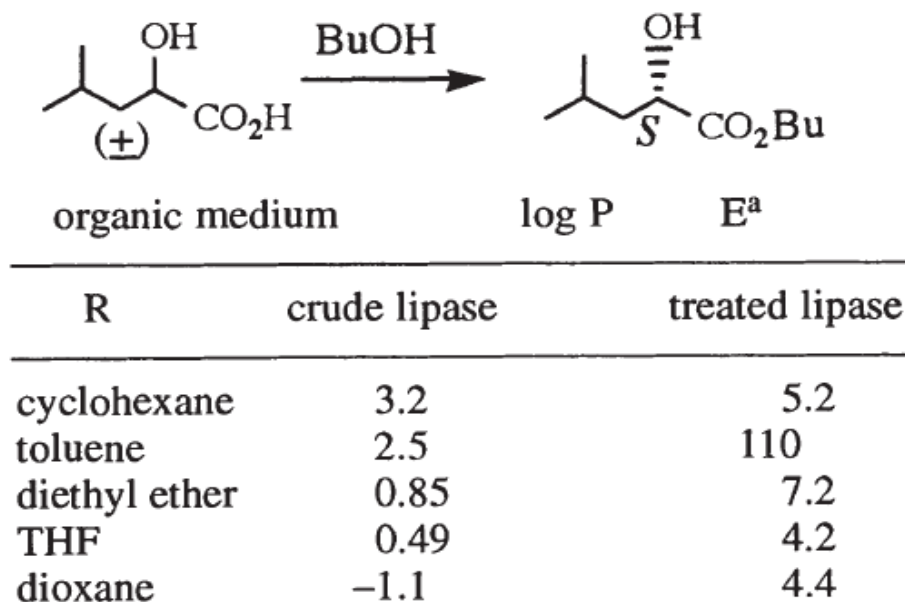
PhCO

4

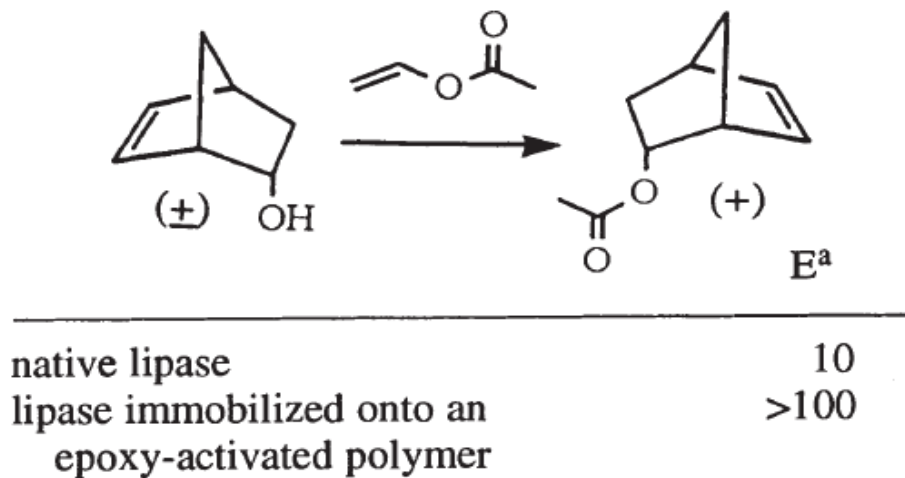
>100

Enantioselectividade

3. Solvent hydrophobicity (27)



4. Enzyme immobilization (28)



^a The E values were calculated from the reported ($V_{\max}/K_m$)s