

Efeito de glicose, ácido glicônico e sais sobre o desempenho de celulases

Carolina Medeiros Romera¹, Dasciana de Sousa Rodrigues², Rossano Gambetta³, Thais Demarchi Mendes⁴

Resumo

O ácido glicônico (AG) é um composto químico versátil com aplicação na indústria de alimentos, metalúrgica, farmacêutica, construção civil, entre outros. Sua produção a partir de biomassa lignocelulósica é uma oportunidade de aproveitamento de biomassas vegetais residuais. Neste trabalho, os principais gargalos para a síntese de AG a partir de biomassa vegetal são apresentados e discutidos. Considerando um processo totalmente enzimático em que a hidrólise de celulose para a liberação de glicose e a conversão dela em AG ocorrem simultaneamente, vários efeitos de inibição podem ocorrer, limitando a ação das enzimas hidrolíticas. Para avaliar esses efeitos, ensaios de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram realizados na presença de diferentes concentrações iniciais de glicose e AG. Além disso, sabendo que a produção de AG causa queda do valor de pH do meio reacional, o efeito inibitório causado por alguns agentes de neutralização do pH também foram investigados. Os resultados obtidos demonstraram que a glicose é um inibidor de celulases mais forte que o AG e que o tampão citrato é o melhor agente para manutenção do pH do meio reacional. Neste estudo, não foi realizado o processo de hidrólise de celulose e síntese simultânea de AG. Entretanto, os ensaios simulando esse processo permitiram concluir que ele pode ser vantajoso, comparado ao respectivo processo com etapas de hidrólise e síntese separados, pois, ao diminuir o efeito de inibição por glicose, a redução do tempo de reação e o aumento do rendimento na produção de AG são reduzidos.

Termos para indexação: inibição de celulases, ácido glicônico, glicose.

Introdução

Ácido glicônico (AG) é um composto químico versátil e aplicado como aditivo em alimentos, agente quelante e de limpeza de superfícies. Além disso, pode ser usado na fabricação de metal e couro, ou como retardador e plastificante na indústria de concreto (Ramachandran et al., 2006).

Dados indicam que a produção de AG pode atingir concentrações de até 422 g/L por rotas fermentativas (Ma et al., 2022) e 324 g/L por rota enzimática (Mu et al., 2019). Entretanto, é necessário utilizar soluções concentradas de glicose para se obter teores maiores de AG. Tais soluções são obtidas a partir de fontes amiláceas ou sacarinas. Visando a reduzir a competição por matérias-primas alimentares e fazer uso de resíduos agroindustriais, as biomassas vegetais ou lignocelulósicas vêm sendo avaliadas como fontes de glicose.

Dados da literatura utilizando celulose para obtenção de glicose e sequencial síntese de AG são escassos, e os baixos teores de glicose obtidos nos processos descritos exigem etapas de concentração antes da aplicação na síntese de AG (Dai et al., 2022).

¹ Química tecnológica, Universidade de Brasília, carolina.romera@colaborador.embrapa.br

² Química industrial, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

³ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

⁴ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

A obtenção de elevado teor de glicose a partir da hidrólise de biomassa vegetal é difícil. Além do acesso limitado das enzimas à celulose, o efeito de inibição da glicose (principal produto reacional) e de outras moléculas solúveis presentes no meio comprometem o rendimento (Kim et al., 2011; Mutrakulcharoen et al., 2020; Paulraj Gundupalli et al., 2021).

Neste estudo, a inibição de celulases causada pela glicose, AG e Na^+ foi avaliada com o objetivo de gerar dados que suportem uma futura reação de hidrólise de celulose e síntese de AG simultaneamente (Figura 1).

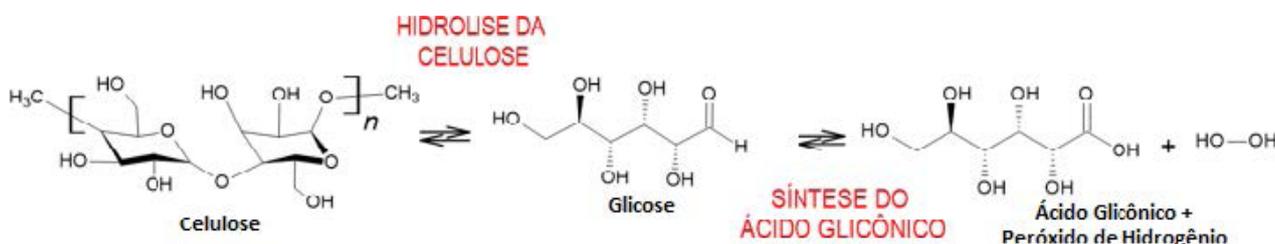


Figura 1. Hidrólise da celulose e síntese do ácido glicônico simultâneo.

Materiais e métodos

Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar. Bagaço de cana *Saccharum officinarum* L. (cedido pela usina Jalles Machado) foi pré-tratado por meio do processo organosolv modificado com razão sólido:líquido de 1:6 (m/v), sistema de solvente contendo etanol:água (1:1), (v/v), temperatura de 180 °C por 4 horas (Nogueira et al., 2023).

Hidrólise enzimática da biomassa. Biomassa pré-tratada foi submetida à hidrólise enzimática empregando enzima Cellic CTec3 como agente catalisador (15 FPU/g de biomassa).

Efeito de inibição por glicose e ácido glicônico. No início do processo de hidrólise enzimática, foram adicionadas nove diferentes concentrações de glicose ou ácido glicônico, na faixa de 0,05 mol/L a 0,75 mol/L. Os ensaios foram realizados em placas Deep-Well de 24 poços, volume final de 5 mL, 5% m/v de biomassa pré-tratada, pH 5 (tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 mol/L), a 50 °C e agitação de 250 rpm. Como o ácido foi adicionado na forma de ácido D-glicônico sal de sódio, como controle, também foram realizados ensaios na presença das mesmas concentrações de íon Na^+ , adicionado ao sistema na forma de NaCl.

Efeito do agente controlador de pH. O efeito do controle de pH por tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 mol/L ou pela adição de hidróxido de amônio ou hidróxido de sódio foi avaliado em biorreator. Volume final do reator de 750 mL, 10% m/v de biomassa pré-tratada (massa total fracionada em quatro alimentações), a 50 °C, agitação de 300 rpm e pH=5.

Análise dos produtos. Concentração de glicose e AG foram determinadas por cromatografia líquida (Agilent Infinity 1260): coluna HPX-87H BioRad a 45 °C; fase móvel H_2SO_4 5 mM com vazão 0,6 mL/min; detector RID a 40 °C e DAD 210 nm.

Resultados e discussão

A hidrólise enzimática da celulose presente em biomassa vegetal é negativamente afetada pela falta de acesso das enzimas à celulose e pela inibição pelo produto (glicose) e outras moléculas

solúveis no meio reacional. Para superar a falta de acesso das enzimas, o bagaço da cana utilizado neste estudo foi pré-tratado por processo organosolv, no qual mais de 90% da lignina é removida e uma celulose com aproximadamente 70% de pureza é obtida. A hidrólise enzimática dessa biomassa atinge rendimento próximo ao máximo teórico e permite a obtenção de hidrolisados com concentração de até glicose 100 g/L na presença de alta carga de sólidos.

O acúmulo de glicose no meio reacional (nesse estudo isto é simulado pela adição de diferentes quantidades de glicose já no início da reação) desacelera sensivelmente a velocidade de reação catalisada por celulases (barras azul-escuras da Figura 2). Para contornar esse problema, a glicose produzida pode ser simultaneamente removida do meio reacional (utilizando reatores de membrana, por exemplo) ou convertida em outra molécula, como o ácido glicônico, por exemplo. Dados publicados por Cannella et al. (2012) indicam que AG é um inibidor de betaglicosidases (enzimas que convertem oligossacarídeos em glicose) mais forte que a glicose. Entretanto, os autores afirmam que esse efeito pode não ser percebido em reatores em que a concentração de AG é baixa em relação à concentração de glicose. No processo de hidrólise de celulose e síntese simultânea de AG a ser realizado futuramente, haverá elevada concentração de AG no meio reacional durante a hidrólise enzimática. Então, para verificar o efeito de inibição do AG em elevadas concentrações sobre a ação de celulases, ensaios similares ao descrito acima foram realizados substituindo glicose por ácido glicônico, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 2 (barras verdes).

A comparação do efeito de inibição causado por glicose e AG pode ser visualizada no gráfico apresentado na Figura 3, em que, para uma mesma concentração inicial do inibidor, a quantidade de glicose liberada pela ação das celulases no sistema inibido por glicose (eixo y) é dividida pela quantidade de glicose liberada pela ação das celulases no sistema inibido por AG (eixo x). Se a quantidade de glicose liberada pela ação das enzimas é a mesma nos dois sistemas, o ponto desse gráfico é posicionado exatamente sobre a reta de referência, cujo coeficiente angular é igual a 1. Nos casos em que há menor quantidade de glicose liberada pelas enzimas no sistema inibido por AG, quando comparado ao sistema inibido por glicose, o ponto é posicionado acima da reta de referência, e nos casos em que a quantidade de glicose no sistema inibido por AG é maior, o ponto é posicionado abaixo da reta de referência. Em outras palavras, para uma mesma concentração inicial de inibidor, se a inibição das enzimas é mais afetada por glicose que por AG, o ponto no gráfico da Figura 3 fica abaixo da reta de referência. Entretanto, se o AG é o inibidor mais forte, o ponto fica acima da reta de referência. O efeito de inibição foi avaliado em três estágios da hidrólise enzimática: 1) com 4 horas de reação: ocorre a liquefação da celulose (liberação de oligossacarídeos pela ação de endoglucanases e exoglucanases); 2) após 7 horas de reação: há elevada concentração de oligossacarídeos e intensa liberação de glicose devida à ação de beta glicosidases; e 3) após 24 horas de reação: o sistema reacional tende ao equilíbrio, ou seja, um tempo suficiente para hidrólise quase completa em um sistema com baixa carga de sólido. Em todos os estágios da reação, o gráfico da Figura 3 confirma que a inibição causada por glicose sobre as celulases totais é mais forte que a inibição causada por AG.

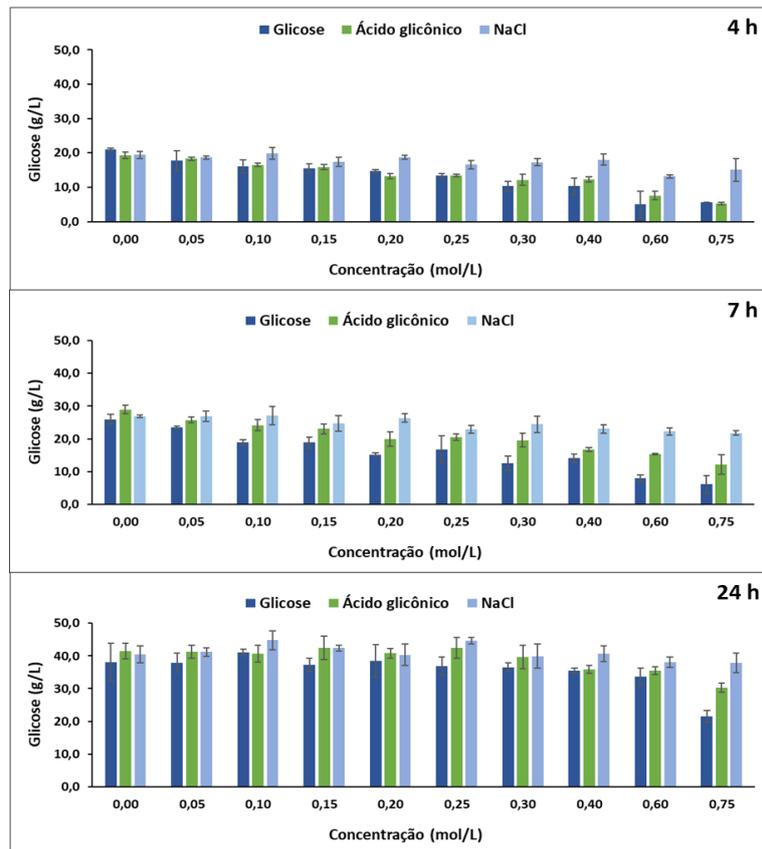


Figura 2. Quantidade de glicose liberada pela ação de celulases em sistemas inibidos por glicose, ácido glicônico e cloreto de sódio.

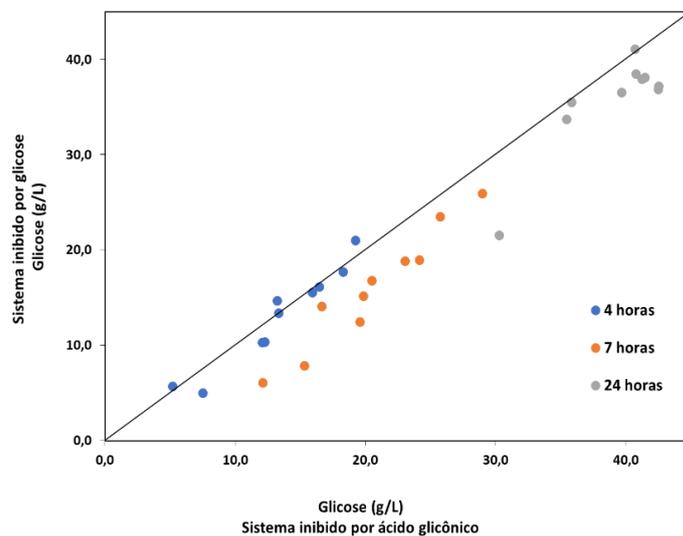


Figura 3. Comparação das quantidades de glicose em sistemas celulolíticos inibidos por diferentes concentrações iniciais de glicose e ácido glicônico.

Pode-se observar que a conversão da glicose em AG durante a hidrólise enzimática de celulose é benéfica, pois reduz a inibição pelo produto da reação, favorecendo a produção de AG. Por outro lado, é preciso considerar que tanto o avanço da hidrólise da celulose quanto a produção de AG causam a queda do valor de pH no meio reacional, e o tipo do agente de neutralização utilizado pode

afetar a ação das celulases. Três agentes de neutralização foram investigados, e os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de glicose após hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando diferentes agentes de neutralização de pH.

Amostra	Concentração de glicose (g/L)
Tampão citrato	74,7
Hidróxido de amônio (NH ₄ OH)	66,0
Hidróxido de sódio (NaOH)	58,7

O tampão citrato é o melhor agente de neutralização. Uma redução de quase 12% no teor de glicose ocorre quando NH₄OH substitui o tampão. Para o NaOH a redução na concentração de glicose em relação ao tampão é de 21%. Concentrações de biomassa maiores que 10% m/v intensificam este efeito.

Conclusão

Ácido glicônico apresenta efeito inibitório menor que a glicose sobre a ação de celulases, favorecendo o processo simultâneo de hidrólise de celulose e síntese de AG. Neste processo, alguns gargalos tanto da hidrólise enzimática quanto da síntese de AG são eliminados. Por exemplo, a inibição por glicose sobre as celulases é reduzida e a viscosidade do meio reacional para a síntese de AG se mantém baixa, favorecendo o transporte de massa.

Referências bibliográficas

- CANNELLA, D.; HSIEH, C.-W. C.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 1, 2012.
- DAI, L.; LIAN, Z.; ZHANG, R.; NAWAZ, A.; UL HAQ, I.; ZHOU, X.; XU, Y. Multi-strategy in production of high titer gluconic acid by the fermentation of concentrated cellulosic hydrolysate with *Gluconobacter oxydans*. *Industrial Crops and Products*, v. 189, 2022.
- KIM, Y.; XIMENES, E.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, n. 4-5, p. 408-415, 2011.
- MA, Y.; LI, B.; ZHANG, X.; WANG, C.; CHEN, W. Production of gluconic acid and its derivatives by microbial fermentation: process improvement based on integrated routes. *Frontiers Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, 2022. 864787. Doi: 10.3389/fbioe.2022.864787.
- MU, Q.; CUI, Y.; TIAN, Y.; HU, M.; TAO, Y.; WU, B. Thermostability improvement of the glucose oxidase from *Aspergillus niger* for efficient gluconic acid production via computational design. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 136, p. 1060-1068, 2019.
- MUTRAKULCHAROEN, P.; PORNWONGTHONG, P.; CHEENKACHORN, K.; TANTAYOTAI, P.; RODDECHA, S.; SRIARIVANUN, M. Inhibitory effect of inorganic salts residuals on cellulase kinetics in biofuel production from lignocellulose biomass. In: INTERNATIONAL CONFERENCE AND UTILITY EXHIBITION ON ENERGY, ENVIRONMENT AND CLIMATE CHANGE (ICUE). 2020, Pattaya, Thailand. [Proceedings...]. IEEE Xplore, 2020. p. 1-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1109/icue49301.2020.9307055>. Acesso em: 28/09/2023
- NOGUEIRA, B.; SECCHI, A. R.; MACHADO, F.; RODRIGUES, C. V. S.; GAMBETTA, R.; RODRIGUES, D. S. Improvement of enzymatic saccharification by simultaneous pulping of sugarcane bagasse and washing of its cellulose fibers in a batch reactor. *Biotechnology Journal*, v. 18, n. 8, ago. 2023.
- PAULRAJ GUNDUPALLI, M.; SAHITHI S. T. A.; CHENG, Y.-S.; TANTAYOTAI, P.; SRIARIYANUN, M. Differential effects of inorganic salts on cellulase kinetics in enzymatic saccharification of cellulose and lignocellulosic biomass. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, n. 11, p. 2331-2344, 2021.
- RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 185-195, 2006.