

Aprimoramento de um processo enzimático para a síntese de ácido glicônico

Eduardo Arantes da Silva¹, Matheus Firetti Cunha², Davi Fontenele de Oliveira³, Rossano Gambetta⁴, Thályta Fraga Pacheco⁵, Thaís Demarchi Mendes⁶, Dasciana de Sousa Rodrigues⁷

Resumo

Atualmente, o ácido glicônico é produzido industrialmente pela oxidação microbiana de glicose. Entretanto, esse processo encontra-se em vias de ser substituído pelo processo enzimático, o qual vem sendo fortemente investigado pela comunidade científica, visando melhorar os parâmetros de produção por meio, principalmente, de engenharia das enzimas e ajustes das condições operacionais do processo. O objetivo deste estudo foi aprimorar o processo de produção de ácido glicônico usando uma rota enzimática e glicose com elevado grau de pureza como substrato. A glicose oxidase de *Aspergillus niger* foi utilizada como enzima modelo. Foram avaliados os efeitos da concentração inicial de glicose, da presença de peroxidase e da aeração do meio reacional. A concentração inicial de glicose variou de 10 g/L a 100 g/L nos ensaios de síntese. As reações foram realizadas em microplaca utilizando um volume de trabalho de 110 µL. O melhor resultado alcançado foi obtido usando uma concentração inicial de glicose de 100 g/L em sistema aerado após 72 horas de reação, sendo atingido um rendimento de aproximadamente 92%, equivalente a uma concentração de ácido glicônico de 101,8 g/L. A adição da peroxidase provocou uma redução no rendimento de síntese, provavelmente pela ação dessa enzima complexada ao peróxido de hidrogênio sobre a glicose oxidase.

Palavras-chave: glicose oxidase, ácido xilônico, xilose.

Introdução

O ácido glicônico é um ácido poli-hidroxicarboxílico que pode ser produzido a partir de biomassa lignocelulósica. Este ácido orgânico possui inúmeras aplicações, principalmente nas indústrias de construção civil, química, farmacêutica e de alimentos. Atualmente, o ácido glicônico é produzido industrialmente pela oxidação microbiana de glicose. Entretanto, esse processo encontra-se em vias de ser substituído pelo processo enzimático, o qual vem sendo fortemente investigado pela comunidade científica a fim de aumentar o desempenho das enzimas por meio da engenharia destas, além de ajustes nas condições operacionais (Mano, 2019).

¹ Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, matheusfiretti@gmail.com

² Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, eduardoarants@gmail.com

³ Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, davi.ofontenele@gmail.com

⁴ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

⁵ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁶ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁷ Química industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

As três principais variáveis para a obtenção de soluções com elevada concentração de ácido glicônico são a concentração inicial de glicose, a aeração e a adição de uma peroxidase ao meio reacional. Dados da literatura indicam que concentrações de glicose de até 324 g/L podem ser utilizados e atingir conversões quase completas em ácido glicônico por meio da rota enzimática (Mu et al., 2019). Entretanto, valores convencionalmente utilizados são de aproximadamente 220 g/L de glicose inicial (Pal et al., 2016). Isto ocorre provavelmente em função do grau de pureza da glicose utilizada, quanto mais impureza, menor a quantidade de glicose oferecida ao reator, entretanto, glicose com elevado grau de pureza pode elevar o custo do produto final. A saturação do meio reacional com oxigênio pode aumentar a atividade de glicose oxidase em até 100% (Dados de propriedade e descrição da enzima retirado da página do fornecedor, Sigma-Aldrich). Por último, a adição de uma peroxidase se faz necessária para a remoção de peróxido de hidrogênio, o qual é um coproduto da reação e se acumula no meio causando a inativação de glicose oxidase (Malikkides, 1982; Pezzoti, 2006).

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da concentração inicial de glicose, assim como comparar meios reacionais aerados com meios não aerados, e contendo ou não uma peroxidase. Isto foi realizado para aumentar o rendimento de oxidação da glicose e, conseqüentemente, a concentração final de ácido glicônico por meio de um processo enzimático.

Material e Métodos

Síntese de ácido glicônico em microplaca

Soluções de glicose (PA) com concentrações de 10, 50 ou 100 g/L foram preparadas em tampão citrato 0,1 M e pH 5, e foram utilizadas como substrato. Uma solução de 100 g/L da glicose oxidase de *Aspergillus niger* da marca Sigma-Aldrich (100.000 unidades/g de sólido, sem adição de oxigênio), foi preparada em tampão citrato 0,1 M e pH 5. A reação foi realizada em microplaca PCR 96 poços e utilizou-se a proporção de 100 µL da solução de glicose para 10 µL da solução de glicose oxidase. Para o branco do substrato, foram utilizados 110 µL da solução de xilose. Para o branco da enzima, foram usados 10 µL da glicose oxidase e 100 µL do tampão. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A microplaca foi selada com um filme plástico e mantida em um termociclador para que a reação ocorresse sob a temperatura de 35 °C em diferentes intervalos de tempo.

Para avaliar o efeito de adição de uma peroxidase de "*horseradish*", da marca Sigma-Aldrich, ao meio reacional, um ensaio idêntico ao descrito acima (com concentração inicial de glicose de 100 g/L) foi realizado, entretanto, substituindo os 10 µL da solução de glicose oxidase por 10 µL de uma mistura de glicose oxidase e peroxidase, ambas em uma concentração de 50 g/L.

Síntese de ácido glicônico em reator encamisado

Para realizar o ensaio de síntese de ácido glicônico em um sistema aerado, foi necessário o uso de um reator encamisado com capacidade para 100 mL. Nesse reator, 20 mL de meio reacional foram adicionados, mantendo as mesmas proporções entre os componentes utilizados na microplaca. Ar comprimido foi borbulhado nesse sistema

a fim de manter a concentração de oxigênio suficientemente alta no meio reacional para a ação de glicose oxidase. A entrada de ar no reator foi ajustada para a máxima quantidade possível, sem que o líquido no reator fosse empurrado para fora deste. Este experimento visou apenas uma comparação entre sistema aerado e não aerado.

Monitoramento do avanço da reação

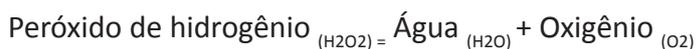
O ácido glicônico produzido foi quantificado indiretamente pela quantificação do consumo de glicose por meio do método do ácido dinitrosalisílico (DNS), ligeiramente modificado (Miller, 1959). Em cada um dos poços de uma microplaca, foram adicionados 20 μL de amostra do meio reacional e 40 μL de tampão citrato. Em seguida 120 μL da solução de DNS foi adicionado, a placa foi selada e mantida em termociclador por 10 minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$. Ao final da reação com DNS, uma alíquota de 36 μL de cada amostra foi transferida para uma microplaca, adequada para leitura espectrofotométrica, contendo 160 μL de água em cada poço. As misturas foram homogeneizadas e a leitura de absorbância foi realizada a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose por meio de uma curva de calibração, previamente construída.

Resultados e Discussão

A reação de síntese de ácido glicônico, catalisada por glicose oxidase, ocorre segundo o esquema apresentado abaixo:



Opcionalmente, uma peroxidase pode ser adicionada ao meio reacional para degradar o peróxido de hidrogênio formado, o qual causa a degradação a glicose oxidase quando a concentração deste no meio é elevada. O esquema reacional para a degradação de peróxido de hidrogênio pela peroxidase é:



A glicose consumida na reação de síntese de ácido glicônico foi quantificada pelo método DNS e os valores de concentração de glicose (g/L) foram calculados utilizando a seguinte equação da reta (Equação 1):

$$\text{Concentração de glicose (g/L)} = 13,914 \times \text{Abs}_{540\text{nm}} - 0,4064 \quad (1)$$

O rendimento de síntese de ácido glicônico foi calculado de acordo com a equação abaixo (Equação 2).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{([\text{Glicose inicial}] - [\text{Glicose final}])}{[\text{Glicose inicial}]} \times 100 \quad (2)$$

Os resultados de síntese obtidos para os diferentes ensaios são apresentados na Figura 1.

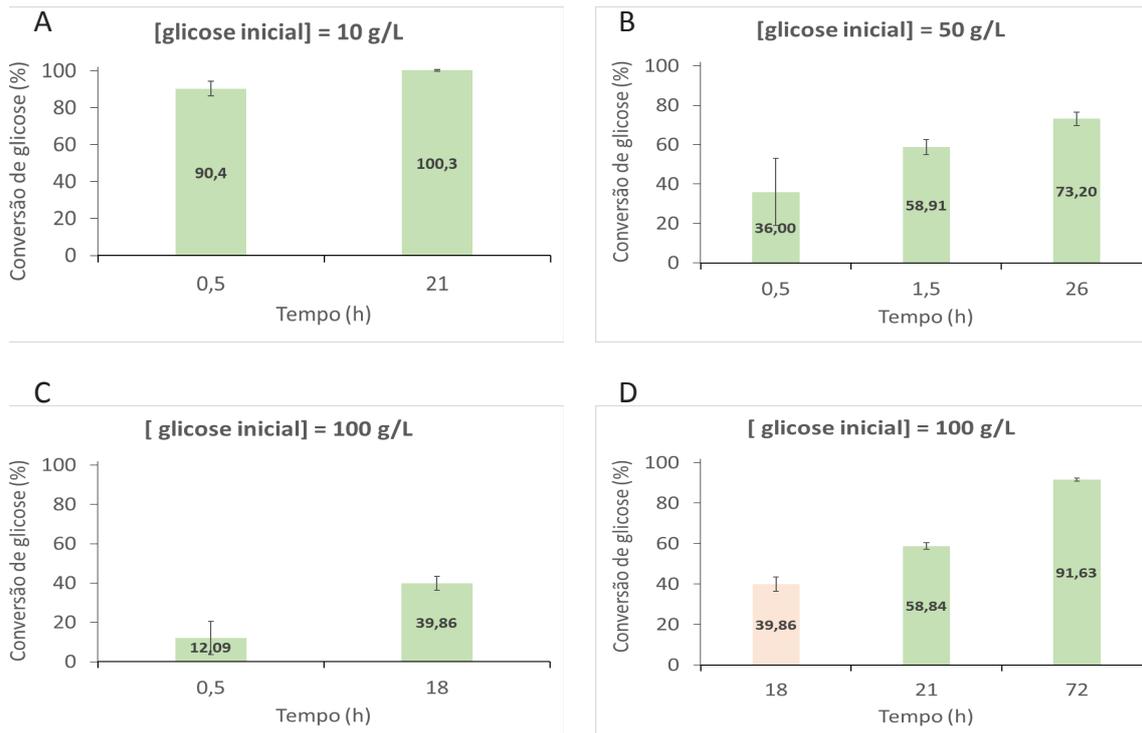


Figura 1. Dados da conversão de glicose em ácido glicônico por meio de processo enzimático, utilizando diferentes concentrações iniciais de glicose em microplaca (A-C) e utilizando concentração inicial de glicose de 100 g/L em reator encamisado (D) aerado (colunas verdes) e não aerado (coluna rosa, ensaio realizado em microplaca).

Os resultados para a síntese de ácido glicônico, na ausência de peroxidase e de aeração, indicam uma sensível desaceleração da velocidade de reação quando a concentração de ácido glicônico no meio reacional atinge aproximadamente 40 g/L. Isso é evidenciado pela conversão obtida após 26 horas no sistema com 50 g/L inicial de glicose que atingiu conversão de 73% (Figura 1B), equivalente a aproximadamente 40 g/L, enquanto no sistema contendo 100 g/L inicial de glicose (Figura 1C), a conversão foi de aproximadamente 40%, equivalente a uma concentração de ácido glicônico de 44 g/L. É possível que ao atingir aproximadamente 40 g/L de ácido glicônico, a concentração de peróxido de hidrogênio (~8 g/L) seja suficientemente elevada, a ponto de causar a inativação da enzima. Também é possível que a concentração de oxigênio no meio reacional tenha atingido níveis muito baixos e por isso a reação foi desacelerada.

Na Figura 1D é possível comparar o desempenho de dois sistemas reacionais com concentração inicial de glicose de 100 g/L, sendo um sistema aerado (barra verde) e outro sistema sem aeração (barra rosa). Observa-se que a conversão atingida no sistema aerado (58,8%) é significativamente superior à do sistema sem aeração (39,9%), após intervalos de reação similares (18 e 21 horas). Também é possível observar elevada taxa de conversão (91,6%) do sistema contendo 100 g/L inicial de glicose após 72 horas de reação. Essa elevada taxa de conversão, mesmo após um longo tempo de reação (72 horas) é justificada pela elevada concentração da enzima no meio reacional (~1 g da preparação enzimática para 10 g de substrato). Vale ressaltar que os dados representados na coluna rosa da Figura 1D foi realizado em microplaca, enquanto os

demais dados desta figura foram obtidos em reatores encamisados. Entretanto, como a enzima principal para este sistema reacional (glicose oxidase) está na forma solúvel, um efeito direto da agitação sobre a ação desta enzima não é significativo, mas é possível que a agitação mecânica utilizada nos reatores encamisados aumente a concentração de oxigênio no meio e indiretamente favoreça a reação. Novos ensaios deverão ser realizados para confirmar esta hipótese.

Visando atingir elevadas taxas de conversão em sistemas com elevada concentração inicial de glicose e usando baixa concentração de glicose oxidase, foi realizado um ensaio aerado contendo peroxidase de “*horsehadish*” no meio reacional. Entretanto, mesmo após 72 horas de reação, a conversão foi de apenas 35,9%. Isto pode ter ocorrido devido a inativação da glicose oxidase pela ação oxidativa do complexo peroxidase-peróxido de hidrogênio. Novos ensaios empregando catalase serão realizados, a fim de aumentar a taxa de conversão em intervalo de tempo o mais curto possível, visto que longos intervalos de tempo não são atrativos do ponto de vista industrial, principalmente para meios reacionais contendo elevada concentração de açúcar em baixas temperaturas, pois há o risco de contaminação biológica.

O melhor resultado alcançado nesse estudo permitiu a obtenção de uma solução de ácido glicônico com concentração de 102 g/L, partindo de uma concentração inicial de glicose de 100 g/L. Esse resultado ainda está distante daqueles obtidos em processos industriais que empregam concentração inicial de glicose de 220 g/L (Pal et al., 2016), e mais distante ainda daqueles que empregam enzimas engenheiradas, 324 g/L (Mu et al., 2019). Entretanto, acredita-se que com os ajustes nas concentrações de catalase e glicose oxidase, juntamente com os ajustes de aeração e concentração inicial de glicose, será possível atingir níveis competitivos de produção de ácido glicônico quando comparados aos processos industriais utilizados atualmente.

Considerações Finais

O processo industrial de produção de ácido glicônico que atualmente ocorre por rota microbiana pode, em um futuro próximo, ser realizado por rota enzimática. Apesar de promissor, o processo enzimático ainda necessita de vários aprimoramentos para que seja bem estabelecido industrialmente. Alguns dos desafios desse novo processo envolve não somente o aprimoramento de enzimas, mas também de condições operacionais e da utilização de glicose proveniente de fontes alternativas ao amido e sacarose.

Neste estudo, buscou-se inicialmente aprimorar as condições operacionais de síntese de ácido glicônico utilizando glicose PA (para análise), mas futuramente, pretende-se substituir a glicose pura por glicose obtida a partir de resíduos agroindustriais.

Referências

CANETE-RODRÍGUEZ, A.M.; SANTOS-DUENAS, I.M.; JIMÉN, J.E. Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1891–1903, 2016.

MALIKKIDES, C.O.; WEILAND, R.H. On the mechanism of immobilized glucose oxidase deactivation by hydrogen peroxide. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XXIV, p. 2419–2439, 1982.

MANO, N. Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications. **Bioelectrochemistry**, v. 128, p. 218–240, 2019.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.

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 Author links open overlay panel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 1060-1068, 2019.

PAL, P.; KUMAR, R.; BANERJEE, S. Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green production. **Chemical Engineering and Processing**, v. 104, p. 160–171, 2016.

PEZZOTTI, F.; THERISOD, M. Enzymatic synthesis of aldonic acids. **Carbohydrate Research**, v. 341 p. 2290–2292, 2006.