

Síntese enzimática de ácido xilônico utilizando glicose oxidase

Matheus Firetti Cunha¹, Eduardo Arantes da Silva², Davi Fontenele de Oliveira³, Rossano Gambetta⁴, Thályta Fraga Pacheco⁵, Thaís Demarchi Mendes⁶, Dasciana de Sousa Rodrigues⁷

Resumo

O ácido xilônico é uma das principais moléculas de alto valor agregado que podem ser obtidas a partir de biomassa lignocelulósica. Entretanto o processo de produção deste ácido ainda precisa ser aprimorado para atender as exigências industriais, tais como alta produtividade e rendimento, baixo custo de produção e redução na geração de resíduos. O objetivo deste estudo foi aprimorar em escala de bancada a produção de ácido xilônico por meio de rota enzimática usando como substrato xilose PA (para análise) e enzima comercial glicose oxidase, oriunda de *Aspergillus niger*. A fim de aumentar a concentração de ácido xilônico produzido, foram avaliadas diferentes concentrações iniciais de xilose (5 g/L a 100 g/L). Todas as reações foram realizadas em microplaca de 96 poços e um volume total de reação de 110 µL foi utilizado. A maior conversão (92,8 %) foi atingida quando uma concentração inicial de xilose de 10 g/L foi utilizada. Ao aumentar a concentração inicial de xilose para 100 g/L a conversão foi de apenas 11,1%. Os resultados sugerem que a enzima pode ter sido inibida pelo substrato ou pelo coproduto desta reação, o peróxido de hidrogênio. Além disso, a falta de aeração do meio reacional também desfavoreceu a ação de glicose oxidase. Etapas posteriores deste estudo irão investigar o uso de peroxidases e aeração do meio reacional a fim de aumentar o rendimento de ácido xilônico.

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

Introdução

O ácido xilônico é uma das principais moléculas de alto valor agregado que podem ser obtidas a partir de biomassa lignocelulósica (Werpy; Petersen, 2004). Esta molécula pode ser aplicada diretamente como dispersante em cimento, agente complexante ou quelante de íons como o Zn, Fe, Cu e Ca, agente clarificante de poliolefinas, antibiótico, aditivo para melhorar a absorção de vitamina C, redução de acrilamida em alimentos cozidos, branqueamento de têxteis, galvanoplastia, biopesticidas e como aditivos na exploração de poços de petróleo (Zhou et al., 2015; Chun et al., 2006; Pezzotti; Therisod, 2006; Miller et al., 1994; Zamora et al., 2000; Toivari et al., 2012b; Buchert; Viikari 1988). Além disso, o ácido xilônico pode ser utilizado como modificador ou precursor

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

para a síntese de 1,2,4-butanotriol, copoliamidas, poliéster, hidrogel e etileno glicol (Toivari et al., 2012a; Pezzotti; Therisod, 2006; Toivari et al., 2012b; Liu; Wang, 2012).

Atualmente, ácido xilônico é produzido em pequena escala por meio de rota microbiana (Toivari et al., 2012a), mas, assim como outros ácidos aldônicos, pode também ser produzido por meio de processo eletroquímico (Toivari et al., 2012b; Governo et al., 2004), oxidação química (Toivari et al., 2012b) ou enzimático (Pezzotti; Therisod, 2006; Toivari et al., 2012b). Para cada um desses processos, uma série de obstáculos vem sendo superada ao longo das últimas décadas. Algumas vantagens relacionadas ao processo enzimático envolvem o uso de condições operacionais suaves, baixo requerimento de energia, maior especificidade na obtenção de produto, possibilidade de uso de reator contínuo, e reduzida quantidade de poluentes gerados (Tomotani; Vitolo, 2007; Liu; Wang, 2007).

Apesar das vantagens supracitadas para processos enzimáticos, ainda existem muitos desafios que devem ser vencidos a fim de tornar esses processos mais atrativos industrialmente. Por exemplo, para oxidoredutases deve ser utilizada uma estratégia para regeneração de cofatores e, quando possível, recuperar e reutilizar a enzima. Também devem ser estabelecidas as condições operacionais de tal forma que a concentração de produto no meio reacional seja a máxima possível. Uma das condições operacionais mais importantes a serem estabelecidas é a concentração inicial do substrato, visto que desse valor depende a concentração final do produto. Nesse estudo, uma avaliação do efeito da concentração inicial de xilose foi realizada visando a obtenção de máximo rendimento em ácido xilônico.

Material e Métodos

Síntese de ácido xilônico

A síntese de ácido xilônico ocorre de acordo com a expressão abaixo:



Para o ensaio de síntese deste ácido em laboratório foram utilizadas soluções de xilose (PA) com concentrações de 5, 10, 50 ou 100 g/L, as quais foram preparadas em tampão citrato 0,1 mol/L, 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 mol/L, pH 5. A reação foi realizada em microplaca PCR 96 poços e utilizou-se a proporção de 100 µL da solução de xilose para 10 µL da solução de enzima. Para o branco do substrato foi utilizado 110 µL da solução de xilose. Para o branco da enzima, usou-se 10 µL da enzima 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.

Monitoramento do avanço da reação

A formação de ácido xilônico em função do tempo foi monitorada indiretamente pela quantificação do consumo de xilose 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 foram adicionados, 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 xilose por meio de uma curva de calibração, previamente construída.

Resultados e Discussão

O consumo de xilose nos diferentes ensaios de síntese foi monitorado pelo método do DNS. Os dados de absorbância obtidos foram convertidos em concentrações de xilose por meio da equação da reta apresentada a seguir (Equação 1):

$$\text{Concentração de xilose (g/L)} = 11,537 \times \text{Abs}_{540\text{nm}} - 0,0562 \quad (\text{Equação 1})$$

Os valores de concentração de xilose ao longo do tempo nos diferentes ensaios de síntese de ácido xilônico foram utilizados para calcular o rendimento de síntese de acordo com a Equação 2.

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

Os valores de rendimento obtidos para os diferentes ensaios são apresentados na Figura 1.

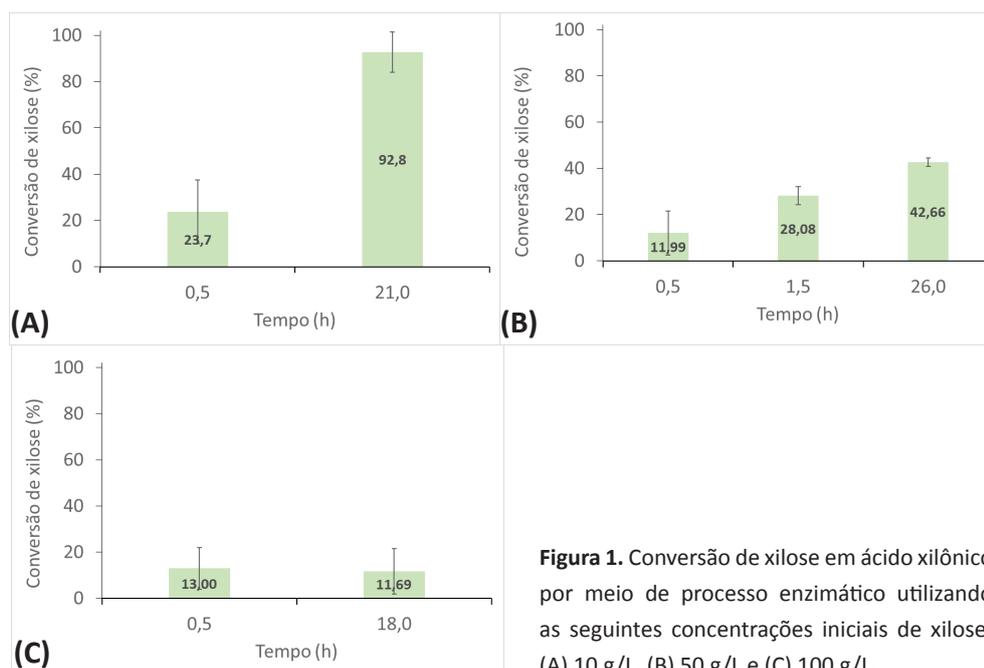


Figura 1. Conversão de xilose em ácido xilônico por meio de processo enzimático utilizando as seguintes concentrações iniciais de xilose: (A) 10 g/L, (B) 50 g/L e (C) 100 g/L.

Os dados para os ensaios realizados com concentração inicial de xilose de 5 g/L não foram apresentados porque apresentaram valores de concentração completamente fora de valores esperados, por exemplo, valores de absorvância negativa para meios contendo xilose. Isso pode ter sido causado por problemas na execução do experimento.

O maior valor de rendimento para a síntese de ácido xilônico obtido nesse estudo foi de 92,8 % quando uma concentração inicial de xilose de 10 g/L foi utilizada. Isto equivale a uma concentração final de ácido xilônico de 10,3 g/L. Pezzotti e Therisod (2006) obtiveram valores de rendimento de 90% quando utilizou glicose oxidase para síntese de ácido xilônico, em um meio reacional com concentração inicial de xilose de 75 g/L, após 100 horas de reação. O resultado superior obtido por Pezzotti e Therisod (2006), pode ser atribuído a um meio reacional aerado e contendo catalase.

Os valores de concentração de ácido xilônico alcançados neste estudo e no estudo realizado por Pezzotti e Therisod (2006), são muito inferiores aos valores encontrados para a síntese microbiana de ácido xilônico. Por exemplo, no estudo realizado por Zhou et al. (2015), valores de 586 g/L de ácido xilônico foram obtidos por meio de um processo microbiano. O processo enzimático possui algumas vantagens em relação ao processo microbiano como, por exemplo, não exigir nutrientes e meio reacional estéril, permitir a conversão quase completa de xilose em ácido xilônico, ou seja, sem reações secundárias, e produzir ácido xilônico com maior grau de pureza, livre de microrganismos e seus debrís ou metabólitos (Tomotani; Vitolo, 2007; Ahmed et al., 2011). Apesar dessas vantagens, vários obstáculos precisam ser superados para aumentar o teor de ácido xilônico nos meios de processo ao utilizar a rota enzimática.

Nas condições operacionais utilizadas nesse estudo, verificou-se que elevados rendimentos de síntese somente foram possíveis em baixas concentrações iniciais de xilose. Considerando os fundamentos teóricos divulgados na literatura científica para a síntese de ácidos aldônicos (ácidos glicônico e xilônico, principalmente) é possível concluir que os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a enzima pode ter sido inibida pelo substrato ou pelo coproduto desta reação, o peróxido de hidrogênio. Além disso, a falta de aeração do meio reacional também desfavoreceu a ação de glicose oxidase. Para atingir concentrações mais elevadas de ácido xilônico mantendo o rendimento de síntese será necessário aprimorar outras variáveis do processo, como por exemplo, a adição de uma peroxidase ao meio reacional para reduzir a concentração de peróxido de hidrogênio, o qual é inibidor da glicose oxidase e a aeração do meio reacional, pois a glicose oxidase precisa de oxigênio para a conversão de xilose a ácido xilônico.

Considerações Finais

O ácido xilônico está entre as principais moléculas que podem ser produzidas a partir de biomassa lignocelulósica. Nesse estudo foi identificada a concentração inicial mínima de xilose (10 g/L) em que se pode atingir elevado rendimento (>90%) para a síntese de ácido xilônico sem a necessidade de aeração e adição de uma peroxidase. Entretanto, partindo-se de uma concentração inicial de xilose muito baixa, conseqüentemente a concentração de ácido xilônico também será muito baixa, inviabilizando economicamente a purificação e comercialização do produto final. Para atingir níveis mais elevados na concentração de ácido xilônico é necessário a adição de catalase e aeração do meio

reacional para que elevados valores de rendimento sejam atingidos mesmo quando concentração inicial de xilose de aproximadamente 200 g/L seja utilizada no meio reacional.

Referências

- AHMED, Y.M.; IBRAHIM, I.H.; KHAN, J.A.; KUMOSANI, T.A. Oxidation and reduction of D-xylose by cell-free extract of *Hansenula polymorpha*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 12, p. 95-100, 2011.
- BECTON DICKINSON AND CO. MILLNER, O.E.; CLARKE, R.P.; TITUS, G.R. **Clarifiers for polyolefins and polyolefin compositions containing same**. C08K 5/15; C07D 407/02, U.S. n. 5283275A, 1994.
- BUCHERT, J.; VIKARI, L. The role of xylonolactone in xylonic acid production by *Pseudomonas fragi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 333–336, 1988.
- CHUN, B.-W.; DAIR, B.; MACUCH, P.J.; WIEBE, D.; PORTENEUVE, C.; JEKNAVORIAN, A. The development of cement and concrete additive based on xylonic acid derived via bioconversion of xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129–132, p. 645-658, 2006.
- GOVERNO, A.T.; PROENÇA, L.; PARPOT, P.; LOPES, M.I.S.; FONSECA, I.T.E. Electro-oxidation of d-xylose on platinum and gold electrodes in alkaline médium. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 1535–1545, 2004.
- LIU, H.; VALDEHUESA, K.N.G.; NISOLA, G.M.; RAMOS, K.R.M.; CHUNG, W.J. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 244–248, 2012.
- LIU, W.; WANG, P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 369–384, 2007.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PEZZOTTI, F.; THERISOD, M. Enzymatic synthesis of aldonic acids. **Carbohydrate Research**, v. 341 p. 2290–2292, 2006.
- TOIVARI, M.; NYGARD, Y.; KUMPULA, E.-P.; VEHKOMAKI, M.L.; BENCINA, M.; VALKONEN, M.; MAAHEIMO, H.; ANDBERG, M.; KOIVULA, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILA, M.; WIEBE, M.G. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate. **Metabolic Engineering**, v. 14, p. 427–436, 2012a.
- TOIVARI, M.H.; NYGÅRD, Y.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L.; WIEBE, M.G. Microbial D-xylonate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1–8, 2012b.
- TOMOTANI, E.J.; VITOLO, M. Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1020–1025, 2007.
- WERPY, T.; PETERSEN, G. Pacific Northwest National Laboratory, National Renewable Energy Laboratory. **Top Value Added Chemicals from Biomass: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. Department of Energy, Oak Ridge, TN (2004). Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2020.
- ZAMORA, F.; BUENO, M.; MOLINA, I.; IRIBARREN, J.I.; MUNOZ-GUERRA, S.; GALBIS, J.A. Stereoregular copolyamides derived from D-xylose and L-arabinose. **Macromolecules**, v. 33, p. 2030–2038, 2000.
- ZHOU, X.; LÜ, S.; XU, Y.; MO, Y.; YU, S. Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of xylonic acid using a compressed oxygen supply. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 196–199, 2015.