**APROVEITAMENTO DE GLICEROL BRUTO PARA PRODUÇÃO MICROBIANA DE 2,3-BUTANODIOL**

**Daniel Tinôco 1; Paulo Luiz Coutinho 2; Denise Maria Guimarães Freire 3**

1 Doutorando em Engenharia Química – Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, dneto@peq.coppe.ufrj.br.

2 Doutor - Instituto Senai de Inovação em Biossintéticos (SENAI CETIQT), Rio de Janeiro, RJ, pcoutinho@cetiqt.senai.br.

3 Doutora – Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, freire@iq.ufrj.br.

**Resumo**

Este estudo teve como objetivo investigar a produção de 2,3-butanodiol (2,3-BDO) a partir de glicerol bruto por *Paenibacillus polymyxa* PM 3605 em biorreator conduzido em batelada. Os ensaios fermentativos foram realizados a 37 °C, pH 6,3, 500 rpm e 3 vvm (aeração superficial), a partir de 50 g/L de glicerol bruto, presente em resíduo de biodiesel denominado glicerina loira. Uma produção de 7,95 g/L de 2,3-BDO foi alcançada ao final de 144 h de fermentação, para uma baixa disponibilidade de oxigênio, dada pelo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa) de 5 h-1. Os rendimentos de produto e de células foram bastante similares entre si, indicando que o carbono não foi direcionado preferencialmente para a síntese de 2,3-BDO, mas também para a geração de biomassa celular, além da manutenção endógena e formação de sub-produtos. Embora a produção aqui encontrada tenha sido baixa, esta foi a primeira vez que *P. polymyxa* foi usada para produção de 2,3-BDO a partir de glicerol bruto em biorreator batelada. Além disso, como o metabolismo de 2,3-BDO é dependente de uma condição microaeróbica e dada a natureza reduzida do glicerol, o controle de kLa pode melhorar a produção de 2,3-BDO, sendo, portanto, um bioprocesso promissor. A máxima seletividade de *levo*-2,3-BDO de 84% foi obtida após 96 h de fermentação. Novamente, o controle da disponibilidade de oxigênio poderá favorecer uma maior seletividade de *levo*-2,3-BDO em estudos futuros, tornando este bioprocesso econômica e produtivamente competitivo.

PALAVRAS-CHAVE: ​Glicerina loira, *Paenibacillus polymyxa*, *levo*-2,3-BDO, batelada, disponibilidade de oxigênio.

**Introdução**

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO) é um importante químico de plataforma, encontrado sob três formas isoméricas distintas (*levo*, *meso* e *dextro*), usado na produção de fármacos, cosméticos, combustíveis, solventes e polímeros (JI; HUANG; OUYANG, 2011). Sua síntese pode ser feita por via bioquímica, em alternativa a rota química, baseada em combustíveis fósseis, sendo caracterizada majoritariamente pela ação de bactérias classificadas no grupo de risco 1 (*Bacillus* e *Paenibacillus*) e no grupo de risco 2 (*Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*) (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009). A rota biológica é considerada *eco-friendly*, uma vez que diferentes resíduos agroindustriais podem ser empregados como substrato, dentre eles o glicerol bruto (PRIYA; LAL, 2019). Considerado um co-produto da produção de biodiesel, o glicerol corresponde a cerca de 10% da produção final e, portanto, é um importante resíduo, cuja disposição no ambiente é vista como um problema para a indústria (HE; MCNUTT; YANG, 2017). O aproveitamento de glicerol para produção de 2,3-BDO é, portanto, uma solução econômica e ambientalmente interessante para essa biomassa, cujo rendimento teórico de 2,3-BDO é similar ao de açúcares presentes em materiais lignocelulósicos, como glicose e xilose (JIANG et al., 2014). A rota biológica pode também favorecer a produção seletiva de um dos isômeros, sendo a *P. polymyxa* uma bactéria *GRAS* (geralmente reconhecida como segura) capaz de produzir com até 98% de pureza a forma *levo*-2,3-BDO (NAKASHIMADA et al., 2000). Esse isômero apresenta propriedades anticongelantes, de interesse da indústria de petróleo e médica, pela sua capacidade crioprotetora, usada com tecidos celulares (BOUTRON, 1992). A produção majoritária de um dos isômeros contribui para a redução dos custos da etapa *downstream*, de recuperação do produto, tornando o bioprocesso ainda mais econômico. Com um crescimento anual composto de 3% para o período de 2019-2027, é esperado um valor de mercado de US$ 220 milhões em 2027 para o 2,3-BDO (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2019), o que deverá favorecer ainda mais a rota biológica para produções em larga escala. Portanto, este estudo objetivou avaliar a produção de 2,3-BDO a partir de glicerol bruto, empregando-se *P. polymyxa* PM 3605, de maneira a garantir um bioprocesso baseado nos conceitos de economia circular, biorrefinaria e biossegurança.

**Metodologia**

*A. Local do trabalho*

 O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM), pertencente ao Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

*B. Procedimento*

Os ensaios fermentativos foram realizados em biorreator de 2 L (New Brunswick, modelo BIOFLO® & CELLIGEN® 310), conduzido em batelada com volume de trabalho de 1 L por 144 h. As condições empregadas de 37 °C, pH 6,3, 500 rpm e 3 vvm (aeração superficial) foram previamente definidas para a bactéria *P. polymyxa* PM 3605, mantida em estoque a -80 °C na coleção de culturas do LaBiM. O meio do pré-inóculo foi o YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L glicose). O pré-inóculo foi crescido em frasco agitado a 37 ºC, 200 rpm, por 16 h. O meio de fermentação foi proposto por ADLAKHA; YAZDANI (2015), com glicerol bruto, resultante da produção de biodiesel, como substrato. Esse resíduo era formado por 90% de óleo de soja e 10% de sebo animal, contendo 79,4% de glicerol bruto (MAINA et al., 2019), tendo sido gentilmente cedido pela PETROBRAS Biocombustível localizada em Montes Claros, MG. A concentração inicial de glicerol bruto usada foi de 50 g/L. Amostras foram coletadas a cada 24 h, para os ensaios realizados em duplicata biológica. Os parâmetros fermentativos foram determinados a partir das Equações 1, 2, 3 e 4.

$Y(X/S)=\frac{X-X0}{Gli0-Gli}$ (1)

$Y(P/S)=\frac{BDO-BDO0}{Gli0-Gli}$ (2)

$Qp=\frac{BDO}{t}$ (3)

$m=1-2\frac{µ}{Yx/s}$ (4)

Em que: YX/S= rendimento de células (X) a partir de glicerol (Gli)[g/g]; YP/S= rendimento de 2,3-BDO (BDO) a partir de glicerol (Gli) [g/g]; Qp= produtividade volumétrica de 2,3-BDO [g/L/h]; t= tempo de fermentação [h]; m= taxa de manutenção endógena celular [gs/gx/h]; µ= velocidade específica de crescimento celular [1/h]. Subíndice 0: valor inicial. Subíndice sem número: valor final.

*C. Análise Estatística*

As células foram quantificadas pelo método indireto de turbidimetria, usando espectrofotômetro de luz UV/VIS a 600nm (Biospectro SP-22). Os metabólitos de interesse (glicerol, *levo*- e *meso*-2,3-BDO, etanol e ácidos orgânicos) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC (Agilent Corp., USA), em um sistema equipado com coluna HPX-87H (BioRad - 300 mm x 7,8 mm), a 45 °C. Ácido sulfúrico (0,01 M) foi usado como eluente a 0,6 mL/min.

**Resultados e Discussão**

Uma produção de 7,95 g/L de 2,3-BDO a partir de 50 g/L de glicerol bruto por *P. polymyxa* PM 3605 foi alcançada após 144 h de fermentação (Fig. 1a). De acordo com a literatura científica, esta foi a primeira vez que 2,3-BDO foi produzido por *P. polymyxa* a partir de glicerol em biorreator conduzido em batelada. Essa produção foi acompanhada por um crescimento microbiano de DO600nm igual a 6,87, sob condição microaeróbica, conseguida por meio do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa) de 5 h-1. PRIYA e LAL (2019) obtiveram 22,74 g/L de 2,3-BDO + acetoína a partir de aproximadamente 53 g/L de glicerol bruto, após 168 h de fermentação empregando *Enterobacter cloacae* TERI BD 18 em batelada alimentada com aeração. Por sua vez, o presente estudo fez uso de uma bactéria *GRAS* em batelada, o que confere vantagens associadas à biossegurança de processo e à redução de custos com o controle celular, sendo ainda a produção de 2,3-BDO a partir de glicerol bruto passível de melhoria, por meio da adoção de estratégias de alimentação futuras.

**Figura 1.** Processo fermentativo usando *P. polymyxa* PM 3605 e glicerol bruto em biorreator batelada por 144 h para produção de (a) 2,3-BDO (b) isômeros *levo-* e *meso*-2,3-BDO.

Sabe-se que o metabolismo de 2,3-BDO é dependente do equilíbrio estabelecido entre os processos de fermentação e respiração celular, e, portanto, a formação de 2,3-BDO é favorecida pelo baixo suprimento de oxigênio às células (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009). A relação observada entre a fermentação e a respiração celular usando glicerol bruto como substrato foi determinada matematicamente por meio dos parâmetros fermentativos do processo microbiano de produção de 2,3-BDO (Tabela 1). Valores próximos para YX/S e YP/S indicaram um equilíbrio entre os processos fermentativo e respiratório, o que ajuda a explicar a baixa produtividade (Qp) de 2,3-BDO aqui encontrada. Embora o glicerol tenha sido quase completamente consumido por *P. polymyxa* PM 3605 (pouco mais de 98%), o fluxo de carbono não foi direcionado preferencialmente para a síntese de 2,3-BDO, havendo também a formação de sub-produtos como etanol (1,33 g/L), ácido acético (0,07 g/L) e ácido succínico (0,29 g/L), a geração de biomassa celular (µ), e a manutenção endógena microbiana (m), após 144 h de fermentação. Metabolicamente, a produção de etanol é favorecida pelo baixo suprimento de oxigênio, o que desvia os intermediários da rota de 2,3-BDO para a sua via. Por outro lado, o suprimento de oxigênio equivalente à demanda celular de oxigênio pode favorecer a produção de acetoína, precursor direto de 2,3-BDO, o que resulta na diminuição de seu rendimento (REBECCHI et al., 2018). Neste estudo, não foi verificada a produção de acetoína. Portanto, um ajuste fino das taxas de transferência de oxigênio, especialmente em termos de kLa, deve ser realizado para melhorar o rendimento de 2,3-BDO (CONVERTI; PEREGO; DEL BORGHI, 2003). REBECCHI et al. (2018) observaram uma produção de 15-20 g/L de 2,3-BDO por *B. licheniformis* ATCC9789 a partir de glicose quando um kLa de 6,5-46,6 h-1 foi empregado. A concentração de etanol no meio de cultivo foi minimizada. HÄSSLER et al. (2012) observaram produções de 26-52 g/L de 2,3-BDO por *P. polymyxa* DMS 365 a partir de glicose para kLa variando entre 20 e 40 h-1. O aumento de kLa contribuiu para a redução de etanol e lactato no meio de cultivo.

**Tabela 1. Parâmetros fermentativos da produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605 a partir de glicerol bruto em biorreator conduzido em batelada após 144 h de cultivo.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Parâmetro** | **Unidade** | **Valor** |
| 2,3-BDO  | (g/L) | 7,95±0,14 |
| Consumo de glicerol | (%) | 98,1±0,1 |
| YX/S  | (g/g) | 0,126±0,002 |
| YP/S  | (g/g) | 0,141±0,003 |
| Qp  | (g/L/h) | 0,055±0,001 |
| µ  | (1/h) | 0,034±0,005 |
| m  | (gs/gx/h) | 0,166±0,036 |

YX/S= rendimento de células a partir de glicerol; YP/S= rendimento de 2,3-BDO a partir de glicerol; Qp= produtividade volumétrica de 2,3-BDO; µ= velocidade específica de crescimento celular; m= taxa de manutenção endógena celular.

A natureza reduzida do glicerol bruto é outro fator limitante da produção de 2,3-BDO, estando também relacionada à disponibilidade de oxigênio. O equilíbrio intracelular redox representado pela razão NADH/NAD+ é responsável pelo direcionamento do carbono a diferentes vias metabólicas, incluindo a de formação de 2,3-BDO. Para um direcionamento preferencial à 2,3-BDO, a razão NADH/NAD+ deve ser suficientemente alta, o que é conseguido mediante baixa disponibilidade de oxigênio (HEYMAN et al., 2019). A natureza redutora do glicerol faz com que uma maior quantidade de NADH seja requerida. Consequentemente, um baixo suprimento de oxigênio é necessário para que a assimilação de glicerol ocorra de maneira eficiente e a produção de 2,3-BDO seja favorecida (JIANG et al., 2014). YANG et al. (2015) introduziram um sistema de regeneração de NADH/NAD+ extra em *B. amyloliquefaciens* B10-127 para co-superprodução de glicerol desidrogenase e acetoína redutase, responsáveis pela síntese de 2,3-BDO a partir de glicerol, e aplicaram uma estratégia de controle de oxigênio, baseada nos parâmetros fermentativos velocidade específica de crescimento celular (μ), taxa específica de consumo de substrato (glicerol) (qs) e taxa específica de formação de produto (2,3-BDO) (qp) para três diferentes estágios de agitação (300, 350 e 400 rpm). Uma produção de cerca de 42,6 g/L de 2,3-BDO a partir de 80 g/L de glicerol bruto foi alcançada em biorreator conduzido em batelada, após 40 h de fermentação.

A disponibilidade de oxigênio pode afetar também a seletividade de 2,3-BDO (Figura 1b). O oxigênio promove a acumulação de acetoína e a formação espontânea de diacetil, que por sua vez pode ser convertido nas formas *levo*- e *meso*-2,3-BDO por *P. polymyxa* (Nakashimada et al., 1998). Portanto, para uma elevada seletividade de um dos isômeros de 2,3-BDO, um baixo suprimento de oxigênio é requerido. HÄSSLER et al. (2012) observaram maiores seletividades de *levo*-2,3-BDO quando empregaram kLa entre 20 e 40 h-1, em torno de 98%. No entanto, para um kLa de aproximadamente 194 h-1, essa seletividade foi reduzida drasticamente para cerca de 40%. Neste estudo, a máxima seletividade de *levo*-2,3-BDO, em torno de 84%, foi alcançada em 96 h de fermentação. A seletividade é um fator importante para a economia do bioprocesso, uma vez que se relaciona com a etapa de recuperação do produto, considerada a etapa mais cara de um bioprocesso (BIRAJDAR et al., 2015). DAI et al. (2014) verificaram uma redução da seletividade de *levo*-2,3-BDO de 97,8 para 95,7% com o aumento da aeração do meio de cultivo de 0,1 vvm para 0,4 vvm, mantendo-se a agitação igual a 400 rpm.

**Conclusões**

 De acordo com a literatura científica, esta foi a primeira vez que 2,3-BDO foi produzido por *P. polymyxa* a partir de glicerol bruto em biorreator batelada. Embora a produção microbiana de 2,3-BDO tenha sido baixa neste estudo, o bioprocesso apresenta grande potencial produtivo, uma vez que a aplicação de um adequado kLa pode favorecer a síntese de 2,3-BDO a partir de glicerol em detrimento da geração de biomassa celular e da formação de sub-produtos. Além disso, o uso de glicerol bruto contribui para a economia do bioprocesso, pela redução dos custos com o substrato. Os conceitos de economia circular e biorrefinarias podem, ainda, ser aplicados no bioprocesso, a partir do uso de glicerol derivado de resíduo de biodiesel, o que representa uma importante vantagem ambiental, servindo, inclusive, de solução ao problema de sua disposição no ambiente. Por fim, o uso de glicerol residual, constituído por óleo de soja e sebo animal, para produção de 2,3-BDO representa uma alternativa econômica e ambientalmente viável, especialmente, para as indústrias de biodiesel brasileiras, cujo resíduo pode conter até 17% de sebo animal, sem causar quaisquer impedimentos metabólicos de assimilação do carbono por *P. polymyxa* PM 3605.

**Agradecimentos**

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e a PETROBRAS pelo apoio financeiro e estrutural a este estudo.

**Referências**

ADLAKHA, N.; YAZDANI, S. S. Efficient production of (R,R)-2,3-butanediol from cellulosic hydrolysate using Paenibacillus polymyxa ICGEB2008. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 21–28, 2015.

BIRAJDAR, S. D. et al. Continuous countercurrent liquid–liquid extraction method for the separation of 2,3-butanediol from fermentation broth using n-butanol and phosphate salt. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1449–1458, set. 2015.

BOUTRON, P. Cryoprotection of red blood cells by a 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers. **Cryobiology**, v. 29, n. 3, p. 347–358, jun. 1992.

CELIŃSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 715–725, nov. 2009.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of specific oxygen uptake rate on Enterobacter aerogenes energetics: Carbon and reduction degree balances in batch cultivations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 3, p. 370–377, 2003.

DAI, J.-J. et al. Regulation of extracellular oxidoreduction potential enhanced (R,R)-2,3-butanediol production by Paenibacillus polymyxa CJX518. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 433–440, set. 2014.

HÄSSLER, T. et al. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by Paenibacillus polymyxa DSM 365. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 237–244, nov. 2012.

HE, Q. (SOPHIA); MCNUTT, J.; YANG, J. Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. January 2016, p. 63–76, 2017.

HEYMAN, B. et al. Shake flask methodology for assessing the influence of the maximum oxygen transfer capacity on 2,3-butanediol production. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2019.

JI, X.-J.; HUANG, H.; OUYANG, P.-K. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 351–364, maio 2011.

JIANG, Y. et al. Microbial production of short chain diols. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2014.

MAINA, S. et al. Evaluation of 1,3-propanediol production by two Citrobacter freundii strains using crude glycerol and soybean cake hydrolysate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 35, p. 35523–35532, 2019.

NAKASHIMADA, Y. et al. Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in Paenibacillus polymyxa. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 661–664, jan. 2000.

PRIYA, A.; LAL, B. Efficient valorization of waste glycerol to 2,3-butanediol using Enterobacter cloacae TERI BD 18 as a biocatalyst. **Fuel**, v. 250, n. December 2018, p. 292–305, ago. 2019.

REBECCHI, S. et al. Effect of oxygen mass transfer rate on the production of 2,3-butanediol from glucose and agro-industrial byproducts by Bacillus licheniformis ATCC9789. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2018.

**Transparency Market Research 2019**. Disponível em: <https://www.transparencymarketresearch.com/2-3-butanediol-market.html/>. Acesso em: 30 maio. 2020.

YANG, T. et al. Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in Bacillus amyloliquefaciens. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2015.