



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



* B R 1 2 2 0 2 2 0 2 4 1 4 0 B 1 *

(11) BR 122022024140-9 B1

(22) Data do Depósito: 12/03/2014

(45) Data de Concessão: 16/05/2023

(54) Título: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM OU MAIS PRODUTOS POR FERMENTAÇÃO MICROBIANA DE UM SUBSTRATO GASOSO

(51) Int.Cl.: C12N 1/20; C12P 1/04.

(30) Prioridade Unionista: 15/03/2013 US 61/791,065.

(73) Titular(es): LANZATECH NZ, INC..

(72) Inventor(es): SEAN DENNIS SIMPSON; MICHAEL KOEPKE; KATHLEEN FRANCES SMART; LOAN PHUONG TRAN; PAUL SECHRIST.

(86) Pedido PCT: PCT US2014025128 de 12/03/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/151158 de 25/09/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/11/2022

(62) Pedido Original do Dividido: BR112015022736-8 - 12/03/2014

(57) Resumo: É proporcionado um método para o controle de um perfil metabólico de uma cultura de fermentação microbiana anaeróbica. Em particular, um perfil metabólico de um processo de fermentação é controlado através do controle da quantidade de CO₂ dissolvido fornecida a uma cultura. Além disso, é proporcionado um método para produzir um ou mais produtos por fermentação microbiana de um substrato gasoso através da alimentação de gás residual de CO₂ a partir de um reator para um segundo reator, ou por reciclagem de CO₂ do gás residual para o mesmo reator.

MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM OU MAIS PRODUTOS POR FERMENTAÇÃO MICROBIANA DE UM SUBSTRATO GASOSO

DIVIDIDO DO BR 11 2015 022736 8 de 12/03/2014

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Esta invenção refere-se genericamente aos métodos para controlar a produção de um ou mais produtos, por fermentação microbiana. Em particular, a invenção refere-se aos métodos para controlar a quantidade de dióxido de carbono fornecido a uma cultura microbiana. Em modalidades particulares, um perfil metabólico de um processo de fermentação é controlado através do controlo da quantidade de CO₂ dissolvido fornecida a uma cultura.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O etanol está rapidamente se tornando um importante combustível para o transporte líquido rico em hidrogênio em todo o mundo. O consumo mundial de etanol em 2002 foi estimado em 10,8 bilhões de litros. O mercado global para a indústria de etanol combustível também foi prevista para crescer acentuadamente no futuro, devido a um aumento do interesse em etanol na Europa, Japão, EUA e vários países em desenvolvimento.

[003] Por exemplo, nos EUA, o etanol é usado para produzir E10, uma mistura de 10% de etanol na gasolina. Em misturas E10 o componente etanol atua como um agente de oxigenação, melhorando a eficiência da combustão e reduzindo a produção de poluentes atmosféricos. No Brasil, o etanol satisfaz cerca de 30% da demanda de combustíveis para transportes, como um agente oxigenante misturado na gasolina, ou como combustível puro por si só. Além disso, na Europa, as preocupações ambientais em torno das consequências das emissões de gases do efeito estufa (GHG) têm sido o estímulo para a União Europeia (UE) para definir aos países membros uma meta do mandato para o consumo de combustíveis para transportes sustentáveis como etanol derivado de biomassa.

[004] A grande maioria do etanol combustível é produzida através de processos de fermentação tradicionais à base de leveduras que utilizam carboidratos derivados de culturas, como a sacarose extraída a partir da cana de açúcar, ou amido extraído de culturas de grãos, como a principal fonte de carbono. No entanto, o custo desses estoques de matérias-primas de carboidratos é influenciado por seu valor como alimento humano ou ração animal, enquanto o cultivo de amido ou de culturas produtoras de sacarose para produção de etanol não é economicamente sustentável em todas as geografias. Portanto, é do interesse desenvolver tecnologias para converter recursos de carbono de custos mais baixos e/ou mais abundantes em etanol combustível.

[005] CO é um importante subproduto livre rico em energia da combustão incompleta de materiais orgânicos, como carvão ou óleo e produtos derivados. Por exemplo, a indústria do aço na Austrália relata produzir e liberar para a atmosfera mais de 500.000 toneladas de CO por ano.

[006] Tem sido desde há muito reconhecido que os processos catalíticos podem ser utilizados para converter os gases que consistem principalmente em CO e/ou CO e hidrogênio (H₂) em uma variedade de combustíveis e produtos químicos. No entanto, os micro-organismos podem também ser usados para transformar estes gases em combustíveis e produtos químicos. Estes processos biológicos, embora geralmente mais lentos do que as reações químicas, tem várias vantagens sobre os processos catalíticos, incluindo uma maior especificidade, rendimentos mais elevados, menores custos de energia e maior resistência ao envenenamento.

[007] A capacidade de micro-organismos para crescer em CO como a sua única fonte de carbono foi descoberta pela primeira vez em 1903. Isto foi mais tarde determinado como sendo uma propriedade de organismos que utilizam a via bioquímica de acetil-coenzima A (acetil CoA) de crescimento autotrófico (também conhecida como a via Woods-Ljungdahl e a via de

monóxido de carbono desidrogenase/acetil CoA sintase (CODH/ACS)). Um grande número de organismos anaeróbicos incluindo organismos carboxidotróficos, fotossintéticos, metanogênicos e acetogênicos demonstraram metabolizar CO para diferentes produtos finais, ou seja, CO₂, H₂, metano, n-butanol, acetato e etanol. Enquanto utilizando CO como única fonte de carbono todos esses organismos produzem, pelo menos, dois destes produtos finais.

[008] As bactérias anaeróbicas, como aquelas do gênero *Clostridium*, demonstraram produzir etanol a partir de CO, CO₂ e H₂ através da via bioquímica acetil CoA. Por exemplo, várias cepas de *Clostridium ljungdahlii* que produzem etanol a partir de gases estão descritas em WO 00/68407, EP 117.309, patentes US 5.173.429, 5.593.886, e 6.368.819, WO 98/00558 e WO 02/08438. A bactéria *Clostridium autoethanogenum sp* também é conhecida por produzir etanol a partir de gases (Abrini et al, Archives of Microbiology 161, pp 345-351 (1994)).

[009] No entanto, a produção de etanol por micro-organismos por fermentação de gases está sempre associada a coprodução de acetato e/ou ácido acético. Como uma parte do carbono disponível é convertido no acetato/ácido acético em vez de etanol, a eficiência de produção de etanol a partir de tais processos de fermentação pode ser menos do que desejável. Além disso, a menos que o subproduto acetato/ácido acético possa ser utilizado para algum outro propósito, ele pode representar um problema de eliminação de resíduo. Acetato/ácido acético é convertido em metano por micro-organismos e, portanto, tem o potencial de contribuir para as emissões de gás do efeito estufa.

[0010] A importância do controle dos parâmetros do meio nutriente líquido utilizado para a cultura de bactérias ou micro-organismos dentro de um biorreator usado para a fermentação foi reconhecido na técnica. NZ 556.615, depositado em 18 de Julho de 2007 e aqui incorporado por

referência, descreve, em particular, a manipulação do pH e o potencial redox de um referido meio nutriente líquido. Por exemplo, na cultura de bactérias acetogênicas anaeróbicas, elevar o pH da cultura a acima de cerca de 5,7, embora mantendo o potencial redox da cultura a um nível baixo (-400 mV ou abaixo), as bactérias convertem acetato produzido como um subproduto de fermentação de etanol a uma taxa muito mais elevada do que em condições de pH mais baixos. NZ 556.615 reconhece ainda que diferentes níveis de pH e do potencial redox podem ser usados para otimizar as condições dependendo da função primária que as bactérias estão executando (isto é, crescimento, produção de etanol a partir de acetato e um substrato que contém CO gasoso, ou produzir etanol a partir de um substrato contendo gasoso).

[0011] US 7.078.201 e WO 02/08438 também descrevem melhoras de processos de fermentação para a produção de etanol por diferentes condições (por exemplo, pH e do potencial redox) do meio nutriente líquido em que a fermentação é realizada.

[0012] O pH do meio nutriente líquido pode ser ajustado por adição de um ou mais agentes de pH ou tampões de ajuste para o meio. Por exemplo, bases como NaOH e ácidos como o ácido sulfúrico podem ser usadas para aumentar ou diminuir o pH como necessário. O potencial redox pode ser ajustado pela adição de um ou mais agentes de redução (por exemplo, metil viologen) ou agentes oxidantes. Alternativamente, o pH do meio pode ser ajustado através de uma quantidade em excesso do substrato gasoso para a fermentação de tal forma que os micro-organismos recebem “excesso de oferta” com gás.

[0013] Processos semelhantes podem ser utilizados para produzir outros álcoois, como butanol, tal como seria evidente para um especialista na técnica.

[0014] É um objeto da presente invenção proporcionar um sistema e/ou um processo que irá, pelo menos, de alguma maneira no sentido de

superar as desvantagens acima mencionadas, ou pelo menos proporcionar ao público uma escolha útil.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0015] Em um primeiro aspecto da invenção, é proporcionado um método para controlar o perfil metabólico de uma cultura de fermentação que compreende pelo menos um micro-organismo acetogênico carboxidotrófico, o método compreendendo:

- a. fluir substrato gasoso compreendendo CO e CO₂ para um biorreator que compreende uma cultura do micro-organismo em um meio nutriente líquido; e
- b. ajustar a quantidade de CO₂ dissolvido na cultura de tal modo que o metabolismo da cultura é alterado.

[0016] Em uma modalidade a quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido é ajustada, controlando o fluxo de CO₂ para o biorreator. Em uma modalidade, o aumento da quantidade de CO₂ dissolvido no meio líquido nutriente altera o metabolismo do micro-organismo de tal modo que a produção de um ou mais produtos derivados de piruvato é aumentado. Em uma modalidade, a diminuição da quantidade de CO₂ dissolvido no meio líquido nutriente altera o metabolismo do micro-organismo de tal modo que a produção de um ou mais produtos derivados de piruvato é diminuída.

[0017] Em uma modalidade os um ou mais produtos derivados de piruvato são selecionados a partir do grupo que consiste em 2,3-butanodiol (2,3-BDO), lactato, succinato, metil etil cetona (MEK), 2-butanol, propanodiol, 2-propanol, isopropanol, acetoína, iso-butanol, citramalato, butadieno e ácido poli láctico (PLA).

[0018] Em uma modalidade, a fermentação é realizada a uma pressão de cerca de 250 a cerca de 450 kPag (ou superior a 500 kPag), de tal modo que a concentração de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido é aumentada. Em certas modalidades, a pressão é superior a 250 kPag ou superior a 300 kPag, ou superior a 350 kPag, ou superior a 400 kPag, ou superior a 450

kPag, ou superior a 500 kPag.

[0019] Em uma modalidade alternativa, a pressão no reator é reduzida ou minimizada para promover a produção de um ou mais produtos derivados de acetil coA em relação a um ou mais produtos derivados de piruvato. Em certas modalidades, a pressão no biorreator é de cerca de atmosférica a cerca de 200 kPag ou é mantida abaixo de 200 kPag, ou inferior a 150 kPag, ou inferior a 100 kPag, inferior a 50 kPag, ou à pressão atmosférica.

[0020] Em uma modalidade a pressão parcial de CO₂ é aumentada, para aumentar a quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido.

[0021] Em uma modalidade, a quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido é aumentada através do aumento da quantidade de CO₂ no substrato gasoso fornecido à fermentação. Em uma modalidade a concentração de CO₂ no substrato fornecida para o biorreator é pelo menos 10%, ou, pelo menos, 15%, ou, pelo menos, 18%, ou, pelo menos, 20%, ou, pelo menos, 25%, ou, pelo menos, 30%, ou, pelo menos, 35%, ou, pelo menos, 40%, ou, pelo menos, 45%. Em certas modalidades, a concentração de CO₂ no substrato fornecida para o biorreator é entre 15% e 65%, ou desde cerca de 20% a cerca de 50%, ou desde cerca de 25% a cerca de 45%. Em modalidades em que a pressão é aplicada para a fermentação, a quantidade de CO₂ exigido pela fermentação é reduzida. Na presença de pressão maior do que cerca de 50 kPag, a quantidade fornecida de CO₂ na fluxo de substrato é substancialmente menor do que quando fornecida à pressão atmosférica. Em modalidades particulares, a concentração de CO₂ no substrato fornecida para o biorreator é de cerca de 1% a cerca de 50%, quando fornecido a uma pressão superior a cerca de 50 kPag.

[0022] Em um segundo aspecto da invenção, é proporcionado um método para aumentar a produção de pelo menos um produto derivado do piruvato, o método compreendendo:

a. fluir um substrato compreendendo CO e CO₂ para um biorreator que

compreende uma cultura de pelo menos um micro-organismo acetogênico carboxidotrófico em um meio nutriente líquido; e

b. ajustar a quantidade de CO₂ fluída para o biorreator de tal modo que a quantidade de CO₂ dissolvido fornecida no meio nutriente líquido é aumentada.

[0023] Em um terceiro aspecto da invenção, é proporcionado um método para controlar uma proporção de produtos derivados de piruvato em produtos derivados de acetil co-A, o método compreendendo;

a. fluir um substrato compreendendo CO e CO₂ para um biorreator que compreende uma cultura de pelo menos um micro-organismo acetogênico carboxidotrófico em um meio nutriente líquido; e

b. ajustar o fluxo de dióxido de carbono para o biorreator de tal modo que a quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido, controla, assim, a proporção de produtos derivados do piruvato em derivados de acetil CoA.

[0024] Em uma modalidade da invenção, o aumento da quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido aumenta a proporção de produtos derivados do piruvato em derivados de acetil CoA, aumentando a produção de produtos derivados de piruvato. Em uma modalidade, a diminuição da quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido diminui a proporção de produtos derivados do piruvato em derivados de acetil CoA através da diminuição da produção de produtos derivados de piruvato.

[0025] Em um quarto aspecto é proporcionado um método para controlar o perfil metabólico de uma cultura de fermentação que compreende pelo menos um micro-organismo acetogênico carboxidotrófico, o método compreendendo

a. fluir substrato gasoso compreendendo CO e CO₂ para um biorreator que compreende uma cultura do micro-organismo em um meio nutriente líquido;

b. monitorar a concentração de CO₂ em uma corrente de saída que sai do biorreator; e

c. ajustar a quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido, tal que o metabolismo da cultura é controlado.

[0026] Em um quinto aspecto, é proporcionado um método para aumentar a produção de um ou mais produtos o método compreendendo;

- a. proporcionar um substrato compreendendo CO para um biorreator contendo uma cultura de um ou mais micro-organismos em um meio nutritivo líquido; e
- b. fermentar o substrato para produzir um ou mais produtos líquidos e CO₂.

[0027] Em uma modalidade uma ou mais das condições de fermentação são ajustadas para aumentar a quantidade de CO consumida pela cultura e a quantidade de CO₂ produzido pela cultura. Em uma modalidade a quantidade de CO consumida pela cultura é aumentada alterando a transferência de massa na fermentação. Em uma modalidade, a quantidade de CO consumida pela cultura é aumentada através do aumento da taxa de fluxo do substrato gasoso para o biorreator. Em uma modalidade a quantidade de CO consumida pela cultura é aumentada através do aumento da taxa de agitação do meio nutriente líquido no biorreator. Em uma modalidade a quantidade de CO consumida pela cultura é aumentada através do aumento da área de superfície de bolha.

[0028] Em uma modalidade, o aumento da quantidade de CO consumido pela cultura microbiana aumenta a quantidade de CO₂ em uma corrente de saída que sai do biorreator. Em uma modalidade, a quantidade de CO₂ na corrente de saída é pelo menos 30%, ou, pelo menos, 35%, ou, pelo menos, 40%, ou, pelo menos, 45%, ou pelo menos 50%.

[0029] Em um sexto aspecto, é proporcionado um método para aumentar a quantidade de CO₂ dissolvido em um meio nutriente líquido que compreende uma cultura de pelo menos um micro-organismo, o método compreendendo;

a. introduzir uma corrente de gás de alimentação compreendendo CO e um meio nutriente líquido a pelo menos um biorreator para formar um caldo de fermentação, compreendendo o biorreator ainda um tubo de descida para a circulação de uma porção do caldo de fermentação a partir de um ponto perto do topo do biorreator para um ponto próximo a parte inferior do biorreator;

b. fermentar o CO no biorreator para produtos líquidos e um fluxo de saída de gás que compreende CO₂;

c. passar, pelo menos, uma porção da fluxo de saída de gás, no tubo de descida do biorreator, que é a fonte da fluxo de saída de gás localizado perto da parte superior do biorreator ou um segundo biorreator; e

d. misturar o fluxo de saída de gás e o meio nutriente líquido ao longo do tubo de descida de modo a formar uma mistura de gás-líquido aumentando assim a pressão hidrostática sobre a mistura de gás-líquido, de tal modo que CO₂ do fluxo de gás de saída é dissolvido no meio nutriente líquido na parte inferior do canto de baixo.

[0030] Em uma modalidade específica o fluxo de gás de saída a partir do primeiro biorreator é passado para o tubo de descida de um segundo biorreator. Em outra modalidade o fluxo de gás de saída a partir do primeiro biorreator é reciclado para o tubo de descida do primeiro biorreator. Alternativamente, o fluxo de gás de saída a partir do primeiro biorreator é passado para a entrada de gás, do primeiro ou segundo biorreator. Além disso, o fluxo de alimentação para o segundo reator pode ser uma porção do fluxo de gás de saída ou residual do primeiro reator, opcionalmente misturados com fluxo de gás de alimentação fresco. Biorreatores adicionais podem ser adicionados em série e fluxos de gás de saída transmitidos para os mesmos ou diferentes biorreatores, como descrito acima.

[0031] Em um aspecto adicional é proporcionado um método para a produção de um ou mais produtos por fermentação microbiana de um

substrato gasoso, o método compreendendo:

a. Em um primeiro reator que compreende uma cultura de um ou mais micro-organismo carboxidotrófico em um meio nutriente líquido, de um substrato gasoso compreendendo CO;

b. fermentar o substrato gasoso compreendendo CO para produzir um ou mais produtos líquidos e uma saída de gás de CO₂ que compreende;

c. alimentar o gás de saída que compreende CO₂ a um segundo biorreator, o referido segundo biorreator compreende uma cultura de um ou mais micro-organismos carboxidotróficos em um meio nutriente líquido; e

d. fermentação do gás de saída compreendendo CO₂ para produzir um ou mais produtos.

[0032] Em uma modalidade, o gás de saída que compreende CO₂ é misturado com um ou mais substratos gasosos antes de ser alimentado ao segundo biorreator. Em uma modalidade, um substrato gasoso adicional é adicionado ao segundo biorreator para utilização como substratos na fermentação microbiana.

[0033] Em uma modalidade os um ou mais micro-organismos fornecidos no primeiro biorreator e o segundo biorreator sai os mesmos. Em uma modalidade a fermentação microbiana produz, pelo menos, dois produtos. Em uma modalidade a razão de produção dos dois produtos é diferente entre o primeiro biorreator e o segundo biorreator. Em uma modalidade, a fermentação produz pelo menos um álcool e pelo menos um subproduto. Em uma modalidade a razão entre o pelo menos um produto para pelo menos um subproduto é diferente nos primeiro e segundo biorreatores. Em uma modalidade, o produto é o etanol e o subproduto é 2,3-butanodiol (2,3-BDO). Em uma modalidade a razão de etanol (EtOH) a 2,3-BDO é menor no segundo biorreator.

[0034] Em uma modalidade os um ou mais micro-organismos são selecionados a partir do grupo que compreende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljundgahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, e *Clostridium coskatii*.

[0035] Em uma modalidade um gás residual que sai do segundo biorreator pode ser reciclado para o primeiro biorreator para ser utilizado como um substrato.

[0036] Em um aspecto adicional da invenção é proporcionado um método para controlar o perfil metabólico de uma cultura de fermentação que compreende pelo menos um micro-organismo acetogênico carboxidotrófico, o método compreendendo;

a. fluir substrato gasoso compreendendo CO para um biorreator que compreende uma cultura do micro-organismo em um meio nutriente líquido para proporcionar um caldo de fermentação; e

b. aumentar a taxa de oxidação de CO através de uma monóxido de carbono desidrogenase dependente de ferredoxina para aumentar a um nível reduzido de ferredoxina no caldo de fermentação;

em que o aumento do nível de ferredoxina reduzida aumenta a uma taxa de fermentação de piruvato a partir de acetil CoA.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0037] A Figura 1 mostra a via metabólica dos micro-organismos da presente invenção.

[0038] A Figura 2 é um gráfico que mostra o efeito da pressão sobre as concentrações do metabólito durante a fermentação.

[0039] A Figura 3 é um gráfico que mostra o efeito de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido sobre a produção de 2,3-butanodiol.

[0040] A Figura 4 é um gráfico que mostra a utilização de CO da cultura microbiana do exemplo 2.

[0041] A Figura 5 é um gráfico que mostra o efeito da concentração

de CO₂ no fluxo de entrada, sobre a concentração do metabólito do exemplo 3A.

[0042] A Figura 6 é um gráfico que mostra a absorção de CO, CO₂ e H₂ pela cultura microbiana do exemplo 3A.

[0043] A Figura 7 é um gráfico que mostra a concentração de metabólitos ao longo do tempo do exemplo 3B.

[0044] A Figura 8 é um gráfico que mostra a composição de gás do exemplo 3B.

[0045] A Figura 9 é um gráfico que mostra a absorção de vários componentes do fluxo de gás de entrada do Exemplo 3C pela cultura microbiana.

[0046] A Figura 10 é um gráfico que mostra o efeito de aumentar incrementalmente o CO₂ no fluxo de gás de entrada, a concentração de metabólito do exemplo 3C.

[0047] A Figura 11 é um gráfico que mostra as concentrações do metabólito em que a concentração de CO₂ no fluxo de entrada é ciclada de acordo com o exemplo 3D.

[0048] A Figura 12 é um gráfico que mostra a absorção de vários componentes no fluxo de entrada do exemplo 3D pela cultura microbiana.

[0049] A Figura 13 é um gráfico que mostra as concentrações do metabólito do exemplo 3E.

[0050] A Figura 14 é um gráfico que mostra a absorção de vários componentes no fluxo de entrada do Exemplo 3E pela cultura microbiana.

[0051] A Figura 15 é um gráfico que mostra as concentrações do metabólito do exemplo 4.

[0052] A Figura 16 é um gráfico de CO₂ dissolvido calculado em função da taxa de produção de 2,3 butanodiol.

[0053] A Figura 17 é uma representação de um sistema de acordo com uma modalidade da invenção.

[0054] A Figura 18 é um gráfico que mostra a absorção de vários componentes no fluxo de entrada do exemplo 4 por cultura microbiana.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0055] Os inventores descobriram métodos e sistemas para controle dos produtos metabólicos produzidos por uma cultura de um ou mais microorganismos acetogênicos carboxidotróficos. Em particular, os inventores descobriram um método para aumentar a produção de um ou mais produtos derivados de piruvato em um processo de fermentação.

[0056] O que se segue é uma descrição da presente invenção, incluindo modalidades preferidas da mesma, dadas em termos gerais. A invenção é ainda exemplificada na descrição dada no cabeçalho “Exemplos” aqui a seguir, que fornece os dados experimentais que apoiam a invenção, os exemplos específicos dos aspectos da invenção, e os meios de realização da invenção.

Definições

[0057] Conforme aqui utilizado, “butanodiol” refere-se a todos os isômeros estruturais do diol, incluindo 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol e 2,3-butanodiol e os seus estereoisômeros. O termo “2,3-butanodiol” deve ser interpretado para incluir todas as formas enantioméricas e diastereoisoméricas dos compostos, incluindo (R,R), (S,S) e, em formas meso racêmicas, formas parcialmente estereoisomericamente puras e/ou substancialmente estereoisomericamente puras.

[0058] O termo “biorreator” inclui um dispositivo de fermentação que consiste em um ou mais vasos e/ou torres ou arranjo de tubulação, que inclui o reator de taque agitado contínuo (CSTR), Reator celular Imobilizado (ICR), reator de leito em gotejamento (TBR), coluna de bolhas, fermentador com elevação a gás, misturador estático, ou outro vaso ou outro dispositivo adequado para o contato gás-líquido. Como é aqui descrito, depois de, em algumas modalidades o biorreator pode compreender um primeiro reator de

crescimento e um segundo reator de fermentação. Como tal, quando se refere à adição de um substrato, por exemplo, um substrato que contém o monóxido de carbono, para a reação de fermentação ou biorreator deve ser entendido para incluir a adição a um ou ambos destes reatores, onde apropriado.

[0059] O termo “substrato que contém o monóxido de carbono” e termos similares devem ser entendidos para incluir qualquer substrato no qual o monóxido de carbono está disponível para uma ou mais cepas de bactérias para crescimento e/ou fermentação, por exemplo.

[0060] “Substratos gasoso contendo o monóxido de carbono” incluem qualquer gás que contém um nível de monóxido de carbono. O substrato gasoso irá tipicamente conter uma proporção importante de CO, de preferência pelo menos cerca de 15% a cerca de 95% de CO, em volume.

[0061] “Substrato compreendendo CO₂” inclui qualquer fluxo de substrato que contém um nível de dióxido de carbono. No entanto, deve notar-se que o substrato gasoso pode ser proporcionado em formas alternativas. Por exemplo, o substrato que contém CO₂ gasoso pode ser fornecido dissolvido em um líquido. Essencialmente, um líquido é saturado com um gás contendo dióxido de carbono e, em seguida, aquele líquido é adicionado ao biorreator. Isto pode ser conseguido utilizando metodologia padrão. A título de exemplo, um gerador de dispersão de microbolhas (Hensirisak et al. Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 101, Número 3/Outubro de 2002) pode ser utilizado. A título de exemplo adicional, o substrato gasoso contendo CO₂ e H₂ pode ser adsorvido sobre um suporte sólido.

[0062] Os termos “aumentar a eficiência”, “aumento da eficiência” e semelhantes, quando utilizados em relação a um processo de fermentação, incluem, entre outros, aumentar uma ou mais a taxa de crescimento dos micro-organismos que catalisam a fermentação, a taxa de crescimento e/ou produção de produto em concentrações elevadas de butanodiol, o volume do

produto desejado produzido por volume de substrato consumido, a taxa de produção ou o nível de produção do produto desejado, e a proporção relativa do produto desejado produzida comparada com outros subprodutos da fermentação.

[0063] Os termos “produtividade” ou “taxa de produção” é a produtividade volumétrica de um produto. Em sistemas contínuos a produtividade volumétrica é calculada como a razão entre a concentração em estado estacionário do produto e o tempo de retenção de líquido. Em sistemas de lote a produtividade volumétrica é calculada como a concentração e o tempo necessário para produzir a referida concentração em sistema de lote. A produtividade volumétrica é relatada em g/L/dia.

[0064] A menos que o contexto exija de outra forma, as frases “fermentação”, “processo de fermentação” ou “reação de fermentação” e semelhantes, como aqui utilizadas, destinam-se a abranger tanto a fase de crescimento quanto a fase biossíntese do produto do processo.

[0065] O termo “produtos derivados de piruvato” ou termos semelhantes, como aqui utilizados pretendem abranger produtos de fermentação que têm um precursor piruvato. Estes produtos incluem, entre outros, 2,3-butanodiol, lactato, succinato, Metil Etil Cetona (MEK), 2-butanol, propanodiol, 2-propanol, isopropanol, acetoína, iso-butanol, citramalato, butadieno, e ácido poli lático.

[0066] O termo “produtos derivados de Acetil CoA”, “produtos derivados de acetil CoA” ou termos similares, como aqui utilizados pretendem abranger produtos de fermentação tendo um precursor acetil CoA. Estes produtos incluem, entre outros, etanol, ácido acético, acetona, butanol, 3-hidroxi butirato e isobutileno, 3-hidroxi propionato (3HP) e ácidos graxos.

[0067] Foi descoberto que a produção de 2,3-butanodiol em processos de fermentação aumenta durante períodos em que a cultura microbiana está apresentando sinais de estresse. Os inventores identificaram vários

indicadores de estresse que correspondem a um aumento na quantidade de 2,3-butanodiol, incluindo a produção de lactato pela cultura microbiana, aumento do pH da cultura microbiana, e uma diminuição na concentração de biomassa da cultura microbiana. Curiosamente, os inventores demonstraram que a produção de 2,3-butanodiol por cultura microbiana não é um indicador de estresse, e que é possível fornecer uma cultura microbiana saudável e estável tendo uma produtividade aumentada para 2,3-butanodiol.

[0068] Foi anteriormente demonstrado que o aumento da produtividade de 2,3-butanodiol foi influenciado por uma taxa de consumo de hidrogênio, por uma cultura microbiana (WO2012131627).

Efeito de CO₂ em Fermentação

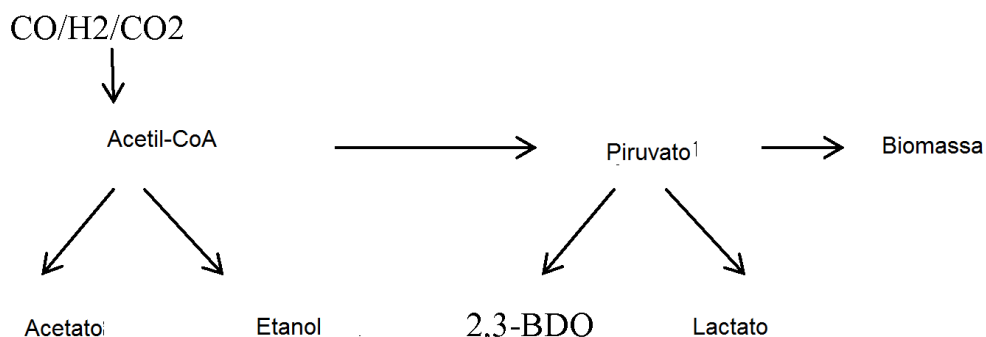
[0069] Os inventores descobriram que através da alteração da quantidade de CO₂ fornecida para a cultura microbiana, a via metabólica do micro-organismo é afetada. Ao alterar a quantidade de CO₂ fornecida para a cultura microbiana, o metabolismo da cultura pode ser manipulado.

[0070] Os inventores surpreendentemente demonstraram que a produção de produtos derivados de piruvato é aumentada quando a cultura microbiana é fornecida com um aumento da quantidade de dióxido de carbono. Correspondentemente, verificou-se que a produção de produtos derivados a partir de acetil CoA é aumentada, e a produção de produtos derivados de piruvato é reduzida quando a quantidade de CO₂ dissolvido na cultura microbiana é diminuída.

[0071] Foi demonstrado anteriormente que o fornecimento de uma cultura de carboxidotróficos com um substrato compreendendo CO e hidrogênio, opcionalmente, sob condições de fermentação, resulta na produção de álcoois e ácidos. Também foi anteriormente demonstrado a produção de etanol, com a produção de subprodutos adicionais, incluindo 2,3-butanodiol e ácido acético.

[0072] Os inventores descobriram agora que, adicionalmente, pelo

fornecimento da cultura microbiana com dióxido de carbono, o metabolismo do braço piruvato da via metabólica pode ser controlado. A via metabólica descrita acima é mostrada em mais detalhe na Figura 1 e abaixo.



[0073] Carboxidotróficos acetogênicos utilizam a via de Wood-Ljungdahl para fixar carbono em acetil CoA (Drake, Küsel, Matthies, Wood, & Ljungdahl, 2006; Wood, 1991), que serve como um precursor para os produtos como o acetato e etanol e para a biossíntese de ácidos graxos. Ao lado de acetil CoA, o outro intermediário chave na célula é o piruvato (ácido pirúvico), que serve como precursor para produtos como o 2,3-butanodiol, o ácido láctico, ou ácido succínico, bem como aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos ou requeridos para o crescimento e formação de biomassa. Acetil-CoA pode ser diretamente convertido em piruvato ou vice-versa, em uma única etapa enzimática, reversível catalisada por um piruvato:ferredoxina oxidoreductase (PFOR), por vezes também referido como piruvato sintase (EC 1.2.7.1). A reação PFOR parece como a seguir na reação 1:



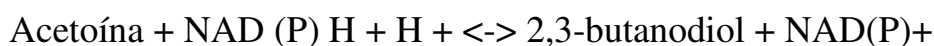
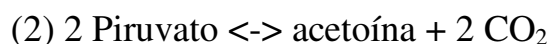
Piruvato + ferredoxina oxidada

$\Delta G^\circ = -4,6 \text{ kcal/mol} (19,2 \text{ kJ/mol})$ (Thauer, Jungermann, Decker, & Pi, 1977)

[0074] Em carboxidotróficos acetogênicos que crescem autotroficamente todo piruvato produzido tem que passar por acetil CoA em primeiro lugar. Como acetil CoA é um composto C2 e piruvato um composto C3, uma molécula de CO₂ precisa de ser incorporada (reação 1). A energia para esta reação é proporcionada por ferredoxina reduzida ($E_0' = -398 \text{ mV}$).

[0075] Uma estratégia para aumentar a taxa de formação de piruvato é aumentar o nível de edutos ou reagentes nesta reação (equilíbrio dinâmico). Por exemplo, aumentando o nível de CO₂ no gás de alimentação vai aumentar a taxa de formação de piruvato a partir de acetil-CoA, enquanto a reação inversa diminui até um ponto em que a reação está praticamente irreversível no sentido da formação de piruvato. Da mesma forma, o nível de ferredoxina reduzida pode ser aumentado por, por exemplo, aumentando a taxa de oxidação de CO através de monóxido de carbono desidrogenase dependente de ferredoxina.

[0076] O piruvato (ácido pirúvico) é um ácido com um pKa muito baixo de 2,5 e, assim, em concentrações mais elevadas é uma ameaça para as bactérias, destruindo o gradiente essencial de prótons através da membrana, necessária para a formação de ATP (Köpke & Dürre, 2011). Um depósito para as bactérias é a produção de 2,3-butanodiol, que permitirá neutralizar o ácido pirúvico e salvar a célula. O aumento do nível de CO₂ no gás de alimentação vai, portanto, aumentar a formação de 2,3-butanodiol indiretamente através do aumento das taxas de formação de piruvato. A reação para a produção de 2,3-butanodiol a partir do piruvato é como se segue na reação 2:



[0077] O ácido láctico e ácido succínico são os produtos derivados do piruvato que representam outro depósito e embora eles sejam ácidos mais fracos (pKa 4,2 e 5,6, respectivamente), causam também uma ameaça para as bactérias em níveis elevados. Por outro lado, o que limita a sua produção poderia aumentar o pool de piruvato e resultar em um aumento da produção de 2,3-butanodiol.

[0078] Os inventores demonstraram que aumentar a concentração de CO₂ no reator e/ou aumentar a concentração do CO no reator ou a taxa de

oxidação de CO pelo CODH levando a um aumento do nível de ferredoxina reduzida, a produção de piruvato em relação a acetil-CoA pode ser aumentada.

[0079] Em particular, os inventores demonstraram que a razão de produtos derivados de acetil-CoA, por exemplo, etanol, para produtos derivados de piruvato, por exemplo, 2,3-butanodiol, pode ser aumentada, aumentando a concentração de CO₂ dissolvido no meio líquido do reator. A quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido pode ser aumentada, aumentando a quantidade de CO₂ no substrato gasoso fornecido à fermentação. Em uma modalidade a concentração de CO₂ no substrato fornecido para o biorreator é pelo menos 10%, ou, pelo menos, 15%, ou, pelo menos, 18%, ou, pelo menos, 20%, ou, pelo menos, 25%, ou, pelo menos, 30%, ou, pelo menos, 35%, ou, pelo menos, 40%, ou, pelo menos, 45%. Em certas modalidades, a concentração de CO₂ no substrato fornecido para o biorreator é entre 15% e 65%, ou desde cerca de 20% a cerca de 50%, ou desde cerca de 25% a cerca de 45%.

[0080] Enquanto as concentrações baixas de CO₂ dissolvido (por exemplo, 0 a 10% de CO₂ no fluxo de gás de entrada) fornecidas para a cultura irão produzir etanol em 2,3-butanodiol a uma razão de cerca de 30:1 a cerca de 20:1, os inventores mostraram que as concentrações aumentadas de CO₂ (por exemplo, 10-65% de CO₂ no fluxo de gás de entrada) fornecidas para a cultura irão produzir etanol a razão de 2,3-butanodiol a partir de cerca de 20:1 a 1:1, preferencialmente 10:1 a 1:1.

[0081] Nos casos em que é desejada a baixa produção de produtos derivados de piruvato, uma concentração baixa de CO₂ dissolvido pode ser alvejada. Este método também pode ser utilizado a fim de aumentar a produção de produtos derivados de acetil-CoA. Por exemplo, um fluxo de entrada de gás com 0-10% de CO₂ no fluxo de gás de entrada irá resultar em uma alta razão de etanol para 2,3-butanodiol.

[0082] Além disso, verificou-se que o aumento da quantidade de CO consumida pela cultura aumenta a quantidade de CO₂ produzido, que por sua vez aumenta a produção de produtos derivados de piruvato. A quantidade de CO consumida pela cultura pode ser aumentada alterando a transferência de massa na fermentação, aumentando a taxa de fluxo do substrato gasoso para o biorreator e/ou aumentando uma velocidade de agitação do meio nutriente líquido no biorreator. A quantidade de CO consumida pela cultura pode também ser aumentada através do aumento da área de superfície da bolha. Tipicamente, elevada de transferência de massa pode ser alcançada através da introdução do substrato gasoso na forma de bolhas finas. Os especialistas na técnica apreciarão meios para introdução de substrato gasoso, como aspersores.

CO₂ dissolvido e Pressão

[0083] Os inventores identificaram uma série de métodos para controlar e ajustar a quantidade de CO₂ dissolvido fornecida a uma cultura microbiana para controlar o perfil metabólico da fermentação. Um tal método para ajustar a quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido inclui o ajuste da pressão para o sistema.

[0084] Os inventores demonstraram que o aumento da pressão no biorreator irá levar a um aumento da quantidade de CO₂ dissolvido no meio de fermentação. A fim de aumentar a produção de produtos derivados de piruvato, a fermentação deve ser realizada a uma pressão de cerca de 250 a cerca de 450 kPag (ou superior a 500 kPag), de tal modo que a concentração de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido é aumentada. Em certas modalidades, a pressão é superior a 250 kPag ou superior a 300 kPag ou superior a 350 kPag ou superior a 400 kPag, ou superior a 450 kPag ou superior a 500 kPag.

[0085] Em casos em que o CO₂ é fornecido para o reator a uma pressão de 50 kPag ou maior, uma menor concentração de CO₂ é necessária

no substrato, a fim de produzir níveis mais elevados de produtos derivados de piruvato. À medida que a cultura produz CO₂, através da utilização de CO, um fluxo de gás de entrada com uma concentração mínima de CO₂ pode ser fornecido ao reator, se a pressão é substancialmente elevada. Em certas modalidades, a quantidade de CO₂ fornecida ao reator a uma pressão de 50 kPag ou superior, é inferior a 10%, ou inferior a 5%, ou inferior a 1%. Em certas modalidades substancialmente nenhum CO₂ é fornecido ao reator a uma pressão de 50 kPag ou maior. De preferência, a concentração de CO₂ de um fluxo de gás de entrada fornecido a uma pressão de 50 kPag ou superior é de cerca de 0% a 50%.

[0086] Os inventores mostraram que a produção de 2,3-butanodiol é influenciada pela quantidade de pressão parcial de CO₂ no fermentador, que por sua vez altera a quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido. Pressões parciais de CO₂ superiores do fluxo de gás irão aumentar a quantidade de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido. Em modalidades preferidas, o CO₂ será fornecido ao reator a uma pressão parcial entre cerca de 50 kPag a cerca de 500 kPag.

[0087] Além disso, os inventores demonstraram também que é possível aumentar gradualmente a quantidade de CO₂ dissolvido, aumentando gradualmente a quantidade de CO₂ fornecida ao reator.

[0088] A quantidade de CO₂ em alguns fluxos gasosos podem não ser suficientes para permitir uma quantidade suficiente de CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido. De modo a ultrapassar este problema, os inventores proporcionaram um método e sistema para aumentar a quantidade de CO₂ por reciclagem de uma cauda ou gás de saída a partir da saída do biorreator para a entrada do biorreator. A fim de alterar a quantidade de pressão parcial de CO₂, e, por conseguinte, CO₂ dissolvido, independentemente, entre a pressão parcial de CO e a pressão total, o gás de saída/gás residual pode ser reciclado para o mesmo reator. O processo de fermentação no interior do reator irá

resultar em alta conversão de CO e H₂, e, por conseguinte, o gás residual consistirá principalmente de CO₂ e qualquer espécie de gases inertes. Assim, a reciclagem do gás de cauda permitiria que a pressão parcial de CO₂ a ser controlada independentemente da pressão parcial de CO e a pressão total.

[0089] O uso de um sistema de dois reatores permite que um gás de saída compreendendo CO₂ saindo de um primeiro biorreator seja passado para um segundo biorreator. Ao alimentar o gás de saída compreendendo CO₂ ao tubo de descida do segundo biorreator, em vez de para o vaso de reator, a pressão parcial de CO₂ no reator é aumentada. À medida que a mistura líquido-CO₂ viaja para baixo no tubo de descida, os a pressão hidrostática aumenta, aumentando assim a quantidade de CO₂ dissolvido na solução.

[0090] Para reciclar o gás residual a partir de um primeiro reator para um segundo ou reator receptor, a pressão de espaço aéreo do primeiro reator deverá ser ligeiramente mais elevada do que a pressão no tubo de descida do reator receptor, para superar perda de linhas e queda de pressão aspensor. Para reciclar o “gás residual” de seu próprio espaço aéreo, o gás residual podia ser reciclado para a entrada de gás ou tubo de descida, em que o tubo de descida precisaria de um edutor para capturar o gás residual (usando o fluxo de líquido no tubo de descida para arrastar o gás residual). A quantidade de CO₂ sendo reciclado para o tubo de descida seria controlada de modo a que o CO₂ dissolvido no meio nutriente líquido seria otimizado durante a aceleração. A Figura 17 proporciona uma representação de um reator de circuito fechado circulado com um substrato rico em CO₂ fornecido para o tubo de descida, em que (1) é o tubo de subida; (2) é o tubo de descida; (3) é o gás de alimentação; (4) é o gás residual/de saída; (5) é o ponto onde o gás rico em CO₂ do gás residual de ou um reator separado ou no mesmo reator entra no tubo de descida; e (6) representa a bomba de circuito que circula a mistura de gás/líquido através do tubo de subida e de descida.

O Biorreator

[0091] A fermentação pode ser realizada em qualquer biorreator apropriado, tal como um reator de tanque contínuo agitado (CSTR), um reator de célula imobilizada, um reator de ascensão de gás, um reator de coluna de bolhas (BCR), um reator de membrana, tal como um biorreator de membrana de fibra oca (HFM BR) ou um reator de leito gotejante (TBR). Além disso, em algumas modalidades da invenção, o biorreator pode compreender um primeiro reator de crescimento, na qual os micro-organismos são cultivados, e um segundo reator de fermentação, para o qual o caldo de fermentação a partir do reator de crescimento pode ser alimentado e em que mais de o produto de fermentação (por exemplo, etanol e acetato) pode ser produzido. O biorreator da presente invenção está adaptado para receber um substrato contendo CO e/ou H₂.

O substrato da fermentação

[0092] Um substrato que contém o monóxido de carbono e pelo menos um átomo de hidrogênio ou dióxido de carbono é utilizado na reação de fermentação para produzir um ou mais produtos nos métodos da invenção. De preferência o substrato é um substrato gasoso. O substrato gasoso pode ser um gás residual obtido como um subproduto de um processo industrial ou de outra fonte, como a partir de gases de escape de motor de combustão (por exemplo, do automóvel). Em certas modalidades, o processo industrial é selecionado a partir do grupo que consiste em produtos metálicos ferrosos de fabricação, como a fabricação de moinho de aço, produtos não ferrosos, processos de refinamento de petróleo, a gaseificação do carvão, a produção de energia elétrica, a produção de negro de carbono, a produção de amônia, produção de metanol, fabricação de coque e reforma de gás natural. Nestas modalidades, o substrato gasoso pode ser capturado a partir do processo industrial, antes de ser emitido para a atmosfera, utilizando qualquer método conveniente. Dependendo da composição do substrato gasoso, pode também ser desejável trata-lo para remover quaisquer impurezas indesejadas, como as

partículas de poeira antes de introduzi-lo para a fermentação. Por exemplo, o substrato gasoso pode ser filtrado ou esfregado utilizando métodos conhecidos.

[0093] Em outras modalidades da invenção, o substrato gasoso pode ser originado a partir da gaseificação de biomassa. O processo de gaseificação envolve a combustão parcial da biomassa em um fornecimento restrito de ar ou oxigênio. O gás resultante compreende, tipicamente, principalmente CO e H₂, com volumes mínimos de CO₂, metano, etano e etileno. Por exemplo, subprodutos de biomassa obtidos durante a extração e processamento de produtos alimentares, como açúcar a partir de cana de açúcar, ou amido de milho ou grãos, ou resíduos de biomassa não alimentar gerada pela indústria florestal podem ser gaseificados para produzir um gás contendo CO adequado para uso na presente invenção.

[0094] O substrato contendo CO conterá tipicamente uma proporção importante de CO, tal como pelo menos cerca de 15% a cerca de 100% de CO, em volume, de 40% a 95% de CO, em volume, de 40% a 60% de CO, em volume, e de 45% a 55% de CO, em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende cerca de 25%, ou cerca de 30%, ou cerca de 35%, ou cerca de 40%, ou cerca de 45%, ou cerca de 50% de CO, ou cerca de 55% de CO, ou cerca de 60% de CO, em volume. Substratos com concentrações mais baixas de CO, tal como de 6%, podem também ser adequadas, particularmente quando H₂ e CO₂ estão também presentes.

[0095] Tipicamente, o monóxido de carbono será adicionado à reação de fermentação no estado gasoso. No entanto, a invenção não deve ser considerada limitada à adição do substrato, neste estado. Por exemplo, o monóxido de carbono pode ser fornecido em um líquido. Por exemplo, um líquido pode ser saturado com um gás contendo monóxido de carbono e, em seguida, aquele líquido adicionado a um biorreator. Isto pode ser conseguido utilizando metodologia padrão. A título de exemplo, um gerador de dispersão

de microbolhas tal como descrito acima pode ser utilizado.

[0096] Em uma modalidade o dióxido de carbono é adicionado à fermentação no estado gasoso. Na modalidade alternativa, o dióxido de carbono é fornecido como um carbonato ou bicarbonato.

[0097] Em uma modalidade da invenção, uma combinação de dois ou mais substratos diferentes pode ser usada na reação de fermentação.

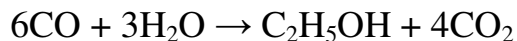
[0098] Em adição, é muitas vezes desejável aumentar a concentração de CO de uma corrente de substrato (ou pressão parcial de CO em um substrato gasoso) e, assim, aumentar a eficiência de reações de fermentação, onde CO é um substrato. O aumento da pressão parcial de CO em um substrato gasoso aumenta a transferência de massa de CO em um meio de fermentação. A composição dos fluxos de gases utilizados para alimentar uma reação de fermentação pode ter um impacto significativo sobre a eficiência e/ou custos daquela reação. Por exemplo, O₂ pode reduzir a eficiência de um processo de fermentação anaeróbico. Processamento de gases indesejados ou desnecessários em estágios de um processo de fermentação antes ou depois da fermentação pode aumentar a carga sobre esses estágios (por exemplo, onde o fluxo de gás é comprimido antes de entrar em um biorreator, energia desnecessária pode ser utilizada para comprimir gases que não são necessários na fermentação). Por conseguinte, pode ser desejável tratar correntes de substrato, particularmente correntes de substratos derivadas de fontes industriais, para remover componentes indesejáveis e aumentar a concentração de componentes desejáveis.

[0099] Em certas modalidades, pouco ou nenhum hidrogênio é fornecido no substrato compreendendo CO.

Mistura de Correntes

[00100] Pode ser desejável misturar uma corrente de substrato reformado compreendendo CO e H₂ com um ou mais outros fluxos, a fim de melhorar a eficiência, produção de álcool e/ou captura de carbono total da

reação de fermentação. Sem se pretender ficar limitado pela teoria, em algumas modalidades da presente invenção, as bactérias carboxidotróficas convertem CO em etanol de acordo com o seguinte:



[00101] No entanto, na presença de H₂, a conversão global pode ser como se segue:



[00102] Por conseguinte, fluxos com elevado teor de CO carbono podem ser misturados com correntes de substrato reformados compreendendo CO e H₂ para aumentar a relação CO:H₂ para otimizar a eficiência da fermentação. A título de exemplo, os fluxos de resíduos industriais, como gás de exaustão a partir de um moinho de aço têm um elevado teor de CO, mas incluem um mínimo ou nenhum H₂. Como tal, pode ser desejável misturar um ou mais fluxos compreendendo CO e H₂ com o fluxo de resíduos que compreende CO, antes de fornecer o fluxo de substrato misturado com o fermentador. A eficiência global, a produtividade de álcool e/ou captura de carbono total da fermentação serão dependentes da estequiometria da CO e H₂ no fluxo misturado. No entanto, em modalidades particulares o fluxo combinado pode compreender substancialmente CO e H₂ nas seguintes proporções molares: 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1 ou 1:2.

[00103] Além disso, pode ser desejável fornecer CO e H₂ em proporções particulares em diferentes fases da fermentação. Por exemplo, correntes de substrato com um teor relativamente elevado de H₂ (como 1:2 de CO:H₂) podem ser fornecidos à fase de fermentação durante o arranque e/ou fases de crescimento microbiano rápido. No entanto, quando a fase de crescimento diminui, de tal forma que a cultura é mantida a uma densidade microbiana substancialmente constante, o teor de CO pode ser aumentado (por exemplo, pelo menos 1:1 ou 2:1 ou superior, em que a concentração de H₂ pode ser maior ou igual a zero).

[00104] Mistura de fluxos também podem ter outras vantagens, particularmente nos casos em que um fluxo de resíduos que compreende CO é de natureza intermitente. Por exemplo, um fluxo de resíduos intermitente que compreende CO pode ser misturado com uma corrente de substrato reformado substancialmente contínuo compreendendo CO e H₂ e fornecido ao fermentador. Em modalidades particulares da invenção, a composição e a vazão do fluxo misturado substancialmente contínuo podem ser variados de acordo com o fluxo intermitente, a fim de manter o fornecimento de um fluxo de composição de substrato substancialmente contínuo e a vazão para o fermentador.

Meio

[00105] Será apreciado que para o crescimento de um ou mais micro-organismos e substrato para fermentação de etanol e/ou acetato ocorrer, além do substrato, um meio nutriente adequado terá de ser alimentado ao biorreator. Um meio nutriente conterá componentes, como vitaminas e minerais, suficientes para permitir o crescimento do micro-organismo utilizado. A título de exemplo apenas, meios anaeróbicos apropriados para o crescimento de *Clostridium autoethanogenum* são conhecidos na técnica, como descrito, por exemplo, por Abrini et al (*Clostridium autoethanogenum*, sp. Nov., Na Aerobic Bacterium That Produces Ethanol From Carbon Monoxide; Arch. Microbiol. 161: 345-351 (1994)). A seção de “Exemplos” aqui depois fornece mais exemplos de meios adequados.

Fermentação

[00106] Os processos para a produção de etanol e outros álcoois de substratos gasosos são conhecidos. Processos exemplificativos incluem os descritos, por exemplo, no documento WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925, WO2009/064200, US 6.340.581, US 6.136.577, US 5.593.886, US 5.807.722 e US 5.821.111, cada um dos quais está aqui incorporado por referência.

Condições de fermentação

[00107] A fermentação deve desejavelmente ser realizada sob condições apropriadas para o substrato para fermentação de etanol e/ou acetato ocorrer. As condições de reação que devem ser consideradas incluem a temperatura, a taxa de fluxo de meios, pH, potencial redox de meio, velocidade de agitação (se usando um reator tanque agitado contínuo), nível de inoculação, as concentrações máximas de substrato e as taxas de introdução do substrato ao biorreator para assegurar que nível do substrato não se torne limitante, e as concentrações máximas do produto para evitar a inibição do produto.

[00108] As condições ótimas de reação irão depender em parte do micro-organismo particular usado. No entanto, em geral, é preferencial que a fermentação seja realizada a uma pressão superior à pressão ambiente. Operando em pressões aumentadas permite um aumento significativo da taxa de transferência de CO a partir da fase gasosa para a fase líquida onde pode ser absorvida pelo micro-organismo como uma fonte de carbono para a produção de etanol. Isto por sua vez significa que o tempo de retenção (definido como o volume de líquido no biorreator dividido pela vazão de gás de entrada) pode ser reduzido quando biorreatores são mantidos a uma pressão elevada, em vez de a pressão atmosférica.

[00109] Além disso, uma vez que uma determinada taxa de conversão de CO para produto é, em parte, uma função do tempo de retenção do substrato, e alcançar um tempo de retenção desejado, por sua vez determina o volume necessário de um biorreator, o uso de sistemas pressurizados pode reduzir grandemente o volume do biorreator necessário, e, conseqüentemente, o custo capital do equipamento de fermentação. De acordo com os exemplos apresentados na patente US 5.593.886, volume do reator pode ser reduzido em proporção linear com o aumento da pressão de operação do reator, isto é, biorreatores operados a 10 atmosferas de pressão precisam ser apenas um

décimo do volume dos operados a 1 atmosfera de pressão.

[00110] As vantagens da realização de uma fermentação de gás para o produto a pressões elevadas também foram descritas em outro local. Por exemplo, o documento WO 02/08438 descreve fermentações gás para etanol realizadas sob pressões de 30 psig e 75 psig, gerando produtividades de etanol de 150 g/l/dia e 369 g/l/dia, respectivamente. No entanto, exemplos de fermentações realizadas utilizando meios semelhantes e as composições de gás de entrada em pressão atmosférica demonstraram produzir entre 10 e 20 vezes menos do etanol por litro por dia.

[00111] Exemplos de condições de fermentação adequadas para a fermentação anaeróbia de um substrato compreendendo CO são detalhados em WO2007/1 17.157, WO2008/115080, WO2009/022925 e WO2009/064200. Reconhece-se que as condições de fermentação reportadas nestes podem ser facilmente modificadas de acordo com os métodos da presente invenção.

Micro-organismos

[00112] Em várias modalidades, a fermentação é realizada utilizando uma cultura de uma ou mais cepas de bactérias carboxidotróficas. Em várias modalidades, a bactéria carboxidotrófica é selecionada a partir de *Moorella*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina*, e *Desulfotomaculum*. Um número de bactérias anaeróbias é conhecido por serem capazes de realizar a fermentação do CO para álcoois, incluindo *n*-butanol e etanol, e ácido acético, e são adequados para utilização no processo da presente invenção. Exemplos de tais bactérias que são adequadas para utilização na presente invenção incluem as do gênero *Clostridium*, como cepas de *Clostridium ljungdahlii*, incluindo as descritas em WO 00/68407, EP 117.309, Patentes US 6.368.819, 5.173.429, 5.593.886, e, WO 98/00558 e WO 02/08438, *Clostridium carboxidivorans* (Liou et al, International Journal of Systematic and

Evolutionary Microbiology 33: pp 2085-2091), *Clostridium ragsdalei* (WO/2008/028055) e *Clostridium autoethanogenum* (Abrini et al, Archives of Microbiology 161: pp 345-351). Outras bactérias adequadas incluem as do gênero *Moorella*, incluindo *Moorella sp* HUC22-1, (Sakai et al, Biotechnology Letters 29: pp 1607-1612), e os do gênero *Carboxidothermus* (Svetlichny, V.A., Sokolova, T.G. et al (1991), Systematic and Applied Microbiology 14: 254-260). Outros exemplos incluem *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermoautotrophica*, *Ruminococcus productus*, *Acetobacterium woodii*, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Oxobacter pfennigii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans*, *Desulfotomaculum kuznetsovii* (Simple et. al., Critical Reviews in Biotechnology, 2006 Vol. 26 Pp41-65). Além disso, deve ser entendido que outras bactérias anaeróbicas acetogênicas podem ser aplicáveis para a presente invenção tal como seria entendido por uma pessoa com conhecimentos na técnica. Será também apreciado que a invenção pode ser aplicada a uma cultura mista de duas ou mais bactérias.

[00113] Em uma modalidade, o micro-organismo é selecionado a partir do grupo de organismos carboxidotróficos acetogênicos compreendendo as espécies *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovata*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Thermoanaerobacter kiuvi*.

[00114] Estes carboxidotróficos acetogênicos são definidos pela sua capacidade de utilizar e crescer quimioautotroficamente em fontes de um carbono gasoso (C1) como monóxido de carbono (CO) e dióxido de carbono (CO₂) com monóxido de carbono (CO) e/ou hidrogênio (H₂) como fonte de

energia, sob condições anaeróbicas, formando acetil-CoA, acetato e outros produtos. Eles partilham o mesmo modo de fermentação, a via Wood-Ljungdahl ou reductiva de acetil-CoA, e são definidos pela presença de conjunto de enzima constituído por monóxido de carbono desidrogenase (CODH), Hidrogenase, formato desidrogenase formil-tetrahydrofolato, sintetase, metileno-tetrahydrofolato desidrogenase, Formil-tetrahydrofolato ciclohidrolase, metileno tetrahydrofolato redutase, e monóxido de carbono desidrogenase/acetil CoA sintetase (CODH/ACS), cuja combinação é característica e exclusiva para este tipo de bactérias (Drake, Küsel, Matthies, Wood, & Ljungdahl, 2006).

[00115] Em contraste com o crescimento de bactérias quimioheterotróficas fermentadoras de açúcar que convertem o substrato em biomassa, metabólitos secundários e de piruvato a partir da qual, em seguida, os produtos são formados (através da acetil-CoA ou diretamente), em acetogênicas o substrato é canalizado diretamente para acetil-CoA, a partir dos quais, em seguida, os produtos, a biomassa, e metabólitos secundários são formados.

[00116] Em uma outra modalidade, o micro-organismo é selecionado a partir de um cluster de Clostridia carboxidotrófica compreendendo a espécie *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahln*, e *C. ragsdalei* e isolados relacionados.

[00117] Estes incluem, entre outros, cepas de *C. autoethanogenum* JAI-1^T (DSM10061) (Abrini, Naveau, & Nyns, 1994), *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO/2009/064200), *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETC^T (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Miller, e Yang, 1993), *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (patente US 5.593.886), *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (patente US 6.368.819), *C. ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) (patente US 6.368.819), ou “*C. ragsdalei* P11^T” (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055), e produtos relacionados isolados como “*C. coskatii*” (patente US 2011/0229947), “*Clostridium* sp.

MT351” (Tyurin & Kiriukhin, 2012), “*Clostridium sp.* MT 653” (Berzin, Kiriukhin, & Tyurin, 2012a), “*Clostridium sp.* MT683 “(Berzin, 2012), “*Clostridium sp.* MT962”(Berzin, Kiriukhin, & Tyurin, 2013) “*Clostridium sp.* MTT 121” (Berzin, Kiriukhin, & Tyurin, 2012b), “*Clostridium sp.* MT1230” (Kiriukhin & Tyurin, 2013), ou “*Clostridium sp.* MT1962” (Berzin, Tyurin, & Kiriukhin, 2013), e cepas mutantes dos mesmos, como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesus Gas Using *Clostridium ljungdahlii*. Tese de doutorado, North Carolina State University, 2010) ou “*Clostridium sp.* MT896” (Berzin, Kiriukhin, & Tyurin, 2012c).

[00118] Estas cepas formam um subgrupo dentro do cluster de rRNA I de *Clostridium* (Collins et al., 1994), tendo pelo menos 99% de identidade no nível do gene 16S de rRNA, mesmo sendo espécies distintas, conforme determinado por reassociação DNA-DNA e experimentos de impressão digital de DNA (WO 2008/028055, patente US 2011/0229947).

[00119] As cepas deste cluster são definidas por características comuns, tendo ambos um genótipo e fenótipo semelhantes, e todos eles compartilham o mesmo modo de conservação de energia e metabolismo fermentativo. As cepas de este cluster são desprovidas de citocromos e conservam energia através de um complexo Rnf.

[00120] Todas as cepas deste aglomerado têm um genótipo semelhante com um tamanho de genoma de cerca de 4,2 MBP (Köpke et al, 2010) e uma composição de CG de cerca de 32% mol (Abrini et al, 1994; Köpke et al, 2010; Tanner et al, 1993) (WO 2008/028055; patente US 2011/0229947), e óperons de gene chave essenciais conservados que codificam para enzimas de via de Wood-Ljungdahl (monóxido de carbono desidrogenase, formil-tetrahidrofolato sintetase, metileno-tetrahidrofolato desidrogenase, formil-tetrahidrofolato ciclohidrolase, metileno-tetrahidrofolato redutase, e monóxido de carbono desidrogenase/acetil CoA-sintase), hidrogenase,

formato desidrogenase, complexo de Rnf (*rnfCDGEAB*), piruvato:ferredoxina oxidorreductase, aldeído:ferredoxina oxidorreductase (Köpke et al, 2010, 2011). A organização e o número de genes da via Wood-Ljungdahl, responsável pela absorção de gás, demonstrou ser a mesma em todas as espécies, apesar das diferenças nas sequências de ácido nucleico e de aminoácidos (Köpke et al, 2011).

[00121] As cepas têm uma morfologia e de tamanho semelhantes (células em crescimento logarítmico são entre 0,5-0,7 x 3-5 µm), são mesófilas (temperatura de crescimento ideal entre 30-37°C) e estritamente anaeróbica (Abrini et al., 1994; Tanner et al, 1993) (WO 2008/028055). Além disso, todos eles compartilham as mesmas características principais filogenéticas, como a mesma faixa de pH (pH 4-7,5, com um pH inicial ideal de 5,5-6), o forte crescimento autotrófico nos gases contendo CO com taxas de crescimento semelhantes, e um perfil metabólico semelhante com etanol e ácido acético como principal produto final da fermentação, e pequenas quantidades de 2,3-butanodiol e ácido láctico formadas sob certas condições (Abrini et al, 1994; Köpke et al, 2011; Tanner et al, 1993) (WO 2008/028055). Produção de indol foi observada com todas as espécies. No entanto, as espécies diferenciam em utilização do substrato de vários açúcares (por exemplo, ramnose, arabinose), ácidos (por exemplo, gluconato, citrato), aminoácidos (por exemplo, arginina, histidina), ou outros substratos (por exemplo, betaína, butanol). Além disso, algumas das espécies demonstraram ser auxotróficas para certas vitaminas (tiamina por exemplo, biotina), enquanto outras não. Também a redução de ácidos carboxílicos nos seus álcoois correspondentes, tem sido demonstrada em uma variedade destes organismos (Perez, Richter, Loftus, & Angenent, 2012). Esses traços são, portanto, não específicos para um organismo como *C. autoethanogenum* ou *C. ljungdahlii*, mas sim traços gerais para Clostridia carboxidotrófica que sintetiza etanol e pode-se prever que mecanismo de trabalho semelhante entre

essas cepas, embora possa haver diferenças de desempenho (Perez et al, 2012).

[00122] Um micro-organismo exemplar apropriado para utilização na presente invenção é *Clostridium autoethanogenum*. Em uma modalidade, o *Clostridium autoethanogenum* é um *Clostridium autoethanogenum* possuindo as características identificadoras da cepa depositada no Centro de Recursos alemão de Material Biológico (DSMZ) com o número de depósito de identificação 19630. Em outra modalidade, o *Clostridium autoethanogenum* é um *Clostridium autoethanogenum* tendo as características de identificação de número DSMZ de depósito DSMZ 10061. Estas cepas possuem uma tolerância especial a alterações na composição do substrato, em particular, de H₂ e CO e, como tal, são particularmente bem adequadas para utilização em combinação com um processo de reformação a vapor.

[00123] Um micro-organismo exemplar apropriado para utilização na produção de acetato a partir de um substrato que compreende CO₂ e H₂, em conformidade com um aspecto da presente invenção é *Acetobacterium woodii*.

[00124] A cultura das bactérias utilizada nos métodos da invenção pode ser conduzida utilizando qualquer número de processos conhecidos na técnica para a cultura e fermentação de substratos utilizando as bactérias anaeróbicas. A título de exemplo, os processos geralmente descritos nos seguintes artigos usando substratos gasosos para a fermentação podem ser utilizados: (i) K.T. Klasson, et al. (1991). Bioreactors for synthesis gas fermentation resources. Conservation and Recycling, 5; 145-165; (ii) K.T. Klasson, et al. (1991). Bioreactor design for synthesis gas fermentations. Fuel. 70. 605-614; (iii) K.T. Klasson, et al. (1992). Bioconversion of synthesis gas into liquido r gaseous fuels. Enzyme and Microbial Technology. 14; 602-608; (iv) J.L. Vega, et al. (1989). Study og Gaseous Substrate Fermentation: Carbon Monoxide Conversion to Acetate. 2. Continuous Culture. Biotech.

Bioeng. 34. 6. 785-793; (v) J.L. Vega, et al. (1989). Study of gaseous substrate fermentations: Carbon monoxide conversion to acetate. 1. Batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 34. 6. 774-784; (vi) J.L. Vega, et al. (1990). Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations. *Resources, Conservation and Recycling*. 3. 149-160; todos os quais são aqui incorporados por referência.

Produtos de fermentação

[00125] Os métodos da invenção podem ser utilizados para produzir qualquer um de uma variedade de produtos de hidrocarbonetos. Isto inclui álcoois, ácidos e/ou diois. Mais particularmente, a invenção pode ser aplicável a fermentação para produção de butirato, propionato, caproato, etanol, propanol, butanol, 2,3-butanodiol, propileno, butadieno, iso-butileno e de etileno. Em uma modalidade da invenção pode ser utilizado para produzir álcoois, incluindo, entre outros, propanol e butanol. Os álcoois podem então ser reagidos com acetato de produzir produtos, incluindo o acetato de propil ou acetato de butil. Um especialista compreenderá que a invenção não está limitada aos álcoois e produtos mencionados, qualquer álcool apropriado e ou ácido pode ser usado para produzir um produto.

[00126] Estes e outros produtos podem ser de valor para uma série de outros processos, como a produção de plásticos, produtos farmacêuticos e agroquímicos. Em uma modalidade, o produto de fermentação é utilizado para a produção de hidrocarbonetos na faixa da gasolina (cerca de 8 carbonos), hidrocarbonetos diesel (cerca de 12 carbonos) ou hidrocarbonetos combustíveis de jato (cerca de 12 carbonos).

[00127] Os métodos da invenção também podem ser aplicados para fermentações aeróbicas, para fermentações anaeróbicas ou aeróbicas de outros produtos, incluindo, entre outros, isopropanol. Os métodos da invenção também podem ser aplicada para fermentações aeróbicas, para fermentações anaeróbicas e aeróbicas de outros produtos, incluindo, entre outros,

isopropanol.

[00128] A invenção também prevê que pelo menos uma porção de um produto de hidrocarbonetos produzido por fermentação é reutilizada no processo de reformação a vapor. Isto pode ser realizado porque outros hidrocarbonetos de CH_4 são capazes de reagir com vapor sobre um catalisador para produzir H_2 e CO . Em uma modalidade particular, o etanol é reciclado para ser utilizado como uma matéria-prima para o processo de reformação a vapor. Em outra modalidade, a matéria-prima e/ou o produto de hidrocarboneto é passada através de um pré-reformador antes de ser utilizada no processo de reformação a vapor. Passando através de um pré-reformador parcialmente completa a etapa de reformação a vapor do processo de reformação a vapor, que pode aumentar a eficiência de produção de hidrogênio e reduzir a capacidade necessária da fornalha de reformação a vapor.

[00129] Os métodos da invenção também podem ser aplicados para fermentações aeróbicas e para fermentações anaeróbicas ou aeróbicas de outros produtos, incluindo, entre outros, isopropanol.

[00130] Mais particularmente, a invenção pode ser aplicável a fermentação para etanol e/ou acetato. Estes produtos podem então ser reagidos em conjunto para produzir os produtos químicos, incluindo ésteres. Em uma modalidade da invenção, o etanol e acetato produzidos por fermentação são reagidos em conjunto para produzir acetato de etila. O acetato de etila pode ser de valor para uma série de outros processos, como a produção de solventes incluindo revestimento de superfície, e diluentes, bem como na fabricação de produtos farmacêuticos e essências e aromas.

Recuperação do produto

[00131] Os produtos da reação de fermentação podem ser recuperados usando métodos conhecidos. Exemplos de métodos incluem aqueles descritos em WO07/117157, WO08/115080, US 6.340.581, US 6.136.577, US

5.593.886, US 5.807.722 e US 5.821.111. No entanto, brevemente e a título de exemplo o etanol pode ser recuperado a partir do caldo de fermentação por métodos como a destilação fracionada ou a evaporação, e a fermentação extrativa.

[00132] A destilação do etanol a partir de um caldo de fermentação produz uma mistura azeotrópica de água e etanol (isto é, 95% de etanol e 5% de água). O etanol anidro pode subsequentemente ser obtido através do uso de tecnologia de desidratação de etanol por crivo molecular, que também é bem conhecido na técnica.

[00133] Os procedimentos de fermentação extrativa envolvem o uso de um solvente miscível em água que apresenta um baixo risco de toxicidade para o organismo de fermentação, para recuperar o etanol a partir do caldo de fermentação diluído. Por exemplo, o álcool oleil é um solvente que pode ser usado neste tipo de processo de extração. Álcool oleil é continuamente introduzido em um fermentador, após o qual este solvente forma uma camada na parte superior do fermentador que é extraída continuamente e alimentada através de uma centrífuga. Água e, em seguida, as células são facilmente separadas a partir do álcool oleil e devolvido para o fermentador, enquanto o solvente carregado com etanol é introduzido em uma unidade de vaporização flash. A maior parte do etanol é vaporizada e condensada, enquanto o álcool oleil é não volátil e é recuperado para reutilização na fermentação.

[00134] Acetato, que pode ser produzido como um subproduto na reação de fermentação, também pode ser recuperado a partir do caldo de fermentação, utilizando métodos conhecidos na técnica.

[00135] Por exemplo, pode ser utilizado um sistema de adsorção que envolve um filtro de carvão ativado. Neste caso, prefere-se que as células microbianas sejam primeiro removidas do caldo de fermentação, utilizando uma unidade de separação adequada. Numerosos métodos de filtração à base de geração de um caldo de fermentação isento de células para a recuperação

do produto são conhecidos na técnica. O etanol livre de célula – e acetato - contendo permeado é então passado através de uma coluna que contém carvão ativado para adsorver o acetato. Acetato na forma de ácido (ácido acético), em vez de forma de sal (acetato) é mais facilmente adsorvido pelo carvão ativado. Por conseguinte, é preferível que o pH do caldo de fermentação seja reduzido para menos do que cerca de 3 antes de ser passado através da coluna de carvão ativado, para converter a maior parte do acetato na forma de ácido acético.

[00136] O ácido acético adsorvido para o carvão ativado pode ser recuperado por eluição utilizando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o etanol pode ser usado para eluir o acetato ligado. Em certas modalidades, o etanol produzido pelo processo de fermentação em si pode ser usado para eluir o acetato. Porque o ponto de ebulição de etanol é de 78,8°C e o do ácido acético é de 107°C, etanol e acetato podem ser facilmente separados uns dos outros utilizando um método à base de volatilidade tal como destilação.

[00137] Outros métodos para a recuperação de acetato a partir de um caldo de fermentação também são conhecidos na técnica e podem ser utilizados. Por exemplo, as patentes US 6.368.819 e 6.753.170 descrevem um sistema cossolvente e solvente que pode ser utilizado para a extração de ácido acético a partir de caldos de fermentação. Tal como acontece com o exemplo do sistema à base de álcool oleil descrito para a fermentação extrativa de etanol, os sistemas descritos nas patentes US 6.368.819 6.753.170 descrevem um solvente/cossolvente imiscível em água que podem ser misturados com o caldo de fermentação em presença ou ausência de micro-organismos fermentados, a fim de extrair o produto de ácido acético. O solvente/cossolvente que contém o produto de ácido acético é então separado a partir do caldo por destilação. Uma segunda etapa de destilação, em seguida, pode ser usada para purificar o ácido acético a partir do sistema de

solvente/cossolvente.

[00138] Os produtos da reação de fermentação (por exemplo, etanol e acetato) podem ser recuperados a partir do caldo de fermentação por remoção contínua de uma porção do caldo de cultura a partir do biorreator de fermentação, que separa as células microbianas a partir do caldo (convenientemente por meio de filtração), e recuperando um ou mais produtos a partir do caldo simultaneamente ou sequencialmente. No caso de etanol este pode ser convenientemente recuperado por destilação, e o acetato pode ser recuperado por adsorção sobre carvão ativado, utilizando os métodos descritos acima. As células microbianas são separadas de preferência devolvidas ao biorreator de fermentação. O permeado isento de células remanescentes após o etanol e acetato terem sido removidos é também, de preferência devolvido ao biorreator de fermentação. Nutrientes adicionais (como vitaminas B) podem ser adicionados ao permeado isento de células para repor o meio nutriente antes de ser devolvido ao biorreator. Além disso, se o pH do caldo foi ajustado tal como descrito acima, para aumentar a adsorção de ácido acético para o carvão ativado, o pH deve ser reajustado para um pH semelhante ao do caldo no biorreator de fermentação, antes de ser retornado para o biorreator.

[00139] A biomassa recuperada a partir do biorreator pode ser submetida a digestão anaeróbia em uma digestão para produzir um produto de biomassa, de preferência metano. Este produto de biomassa pode ser usado como matéria-prima para o processo de reformação a vapor ou utilizado para produzir calor suplementar para conduzir uma ou mais das reações aqui definidas.

EXEMPLOS

A invenção será agora ainda explicada por meio dos exemplos seguintes.

Exemplo 1: Experimentos de Microarranjo

Fermentação

[00140] As fermentações com *C. autoethanogenum* DSM23693 foram realizadas em biorreatores de 1,5 L a 37°C e contendo CO como única fonte de energia e carbono como descrito abaixo. Um meio líquido definido, contendo por litro: MgCl, CaCl₂ (2 mM), KCl (25 mM), H₃PO₄ (5 mM), Fe (100µM), Ni, Zn (5µM), Mn, B, W, Mo, Se (2 µM) foi utilizado para crescimento da cultura. O meio foi transferido para o biorreator e foi suplementado com uma solução de vitamina B e reduzido com uma solução 0,2 mM de Cr (II). Para atingir anaerobicidade do vaso o reator foi lavado com nitrogênio. Antes da inoculação, o gás foi trocado para uma mistura gasosa contendo 30% de CO e 70% de N₂, alimentado continuamente ao reator. O fluxo de gás foi inicialmente regulado para 100 ml/min e a agitação foi regulada para 300 rpm. Na₂S foi doseado para dentro do biorreator em 0,3 ml/h. A agitação foi aumentada para intervalos de 900 rpm a 50 rpm durante a fase de crescimento da fermentação. Após 0,8 dia no modo de lote, o biorreator foi trocado para um modo contínuo a uma velocidade de líquido de 1,8 ml/min (taxa de diluição de 1,7 d⁻¹). O fluxo de gás foi subsequentemente ajustado para alcançar 4 mol/L/d de absorção de CO. O fluxo de gás máximo foi de 435 ml/l por volume de fermentador. Depois de atingir a fase estável a experiência foi iniciada através da variação da concentração de CO₂ a partir de 0% a 25%. A fim de evitar qualquer alteração na absorção de CO, o fluxo de CO e o fluxo de gás total foi mantido constante durante o ajuste de fluxos de CO₂ e N₂ em relação um ao outro. A composição do gás foi apenas trocada uma vez que 95% dos metabólitos do regime de alimentação anterior foram lavados e os metabólitos foram estabilizados novamente em um novo nível para pelo menos dois dias de modo a que os dados pudessem ser extraídos para a análise. As amostras de meio foram retiradas para medir a biomassa e os metabólitos e uma análise do espaço aéreo de gás entrando e saindo foi realizada em uma base regular.

Procedimento de amostragem

[00141] As amostras foram coletadas a partir do biorreator utilizando tubos pré-refrigerados; a quantidade de amostra coletada foi equivalente a OD 2, medida a 600 nm. Três amostras foram coletadas a partir do biorreator para a análise de Microarranjo para comparar a composição do gás e efeito de tempo durante o perfil de expressão gênica em relação a diferentes proporções de EtOH:BDO. A primeira amostra foi coletada a partir de uma mistura gasosa de 30% de CO e N₂ a 70% e uma proporção EtOH: BDO de 23: 1 presente no reator. A segunda amostra foi coletada a partir de uma mistura gasosa de 30% de CO, 40% de N₂ e 30% de CO₂ com proporção EtOH:BDO de 13: 1, esta amostra foi coletada 7 horas após a composição do gás ser modificada. A terceira amostra foi coletada a partir da mesma mistura de gás como a segunda amostra, mas com uma proporção EtOH: BDO de 4: 1, esta amostra foi coletada 3 dias depois da adição de CO₂ para a composição do gás. Após a colheita, as amostras foram centrifugadas a 4000 RPM, durante 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi removido, subsequentemente, o pellet foi congelado rapidamente em N₂ líquido e armazenado a -80°C até sua utilização.

Extração de RNA

[00142] Após a recuperação de amostras de -80°C, as amostras foram extraídas utilizando Kit RiboPure™-Bacteria (Ambion, Número de Peça AM 1925).

Análise de Microarranjo

[00143] A análise de microarranjo foi realizada por Roche utilizando técnicas convencionais.

Exemplo 2: Os efeitos da pressão sobre a fermentação

[00144] A Figura 2, Figura 3 e Figura 4 mostram os resultados das corridas de fermentações a baixa e alta pressão, para demonstrar os efeitos de ambas a quantidade de CO₂ presente dissolvido no caldo de fermentação, e a concentração dos metabólitos produzidos pela fermentação. Em cada um

destes experimentos em um biorreator contendo um meio nutriente líquido foi inoculada com uma cultura de *Clostridium autoethanogenum*. Um substrato gasoso compreendendo CO e CO₂ foi fornecido para o biorreator.

[00145] A Figura 2 mostra os resultados de uma primeira experiência, em que a fermentação foi realizada a pressões diferentes, para determinar o efeito da pressão sobre a quantidade de CO₂ e dissolvido na concentração de 2,3-butanodiol (2,3-BDO) produzida no reator.

[00146] A Figura 2 mostra que a alta pressão a partir de 0-6 dias (320 kPag no espaço aéreo do reator, e cerca de 420 kPag na parte inferior do reator), ambos a quantidade de CO₂ dissolvido no caldo de fermentação, e a concentração de 2,3-BDO produzida aumentaram. Quando a fermentação foi operada a baixa pressão a partir de 6-22 dias (50 kPag no espaço aéreo, e cerca de 150 kPag na parte inferior), ambas a quantidade de CO₂ dissolvido no caldo de fermentação e a concentração de 2,3-BDO diminuíram.

[00147] A figura 3 demonstra claramente a correlação entre a quantidade de CO₂ dissolvido no caldo de fermentação e a concentração de 2,3-butanodiol.

[00148] A figura 4 demonstra o efeito da conversão de CO para CO₂ na fermentação. Quando a fermentação foi operada de tal modo que a quantidade de CO consumido pelas bactérias foi aumentada, CO₂ foi produzido como um subproduto da fermentação. A conversão de CO para CO₂ por CODH (dióxido de carbono desidrogenase) criou ferredoxina reduzida. Altos níveis de ferredoxina reduzida são necessários para converter acetil CoA em piruvato, o que resultou em um aumento da produção de 2,3-butanodiol, e um aumento na produção de outros produtos derivados do piruvato.

Exemplo 3: Concentrações crescentes de CO₂ dissolvido.

[00149] Um conjunto de experimentos foi realizado, que demonstrou que o nível de CO₂ dissolvido na fermentação resultou em um aumento da produção de 2,3-butanodiol.

3A: *Mudanças na concentração de CO₂ de entrada como uma forma de aumentar a produção de 2,3 BDO*

[00150] Durante esta experiência, a concentração do CO₂ do gás de entrada para o caldo de fermentação foi alterada de 0% a 25% em uma etapa, após 28 dias de operação. A absorção de CO foi mantida constante durante todo o experimento e a concentração de CO foi mantida a 30% no gás de entrada. Como mostrado na Figura 5 um grande aumento na produção de 2, 3 butanodiol foi observada quando o CO₂ foi alterado de 0% a 25%.

[00151] A Figura 6 representa as mudanças na concentração de CO₂ no caldo de fermentação entre os dias 25-31. No dia 25 a quantidade de CO₂ no fluxo de entrada fornecido para a fermentação foi de 0%. No dia 28, a concentração de CO₂ do fluxo de entrada foi aumentada para 25%. A Figura 6 mostra claramente que a absorção de CO permaneceu a mesma depois do aumento de CO₂, o que indica que o aumento da produção de BDO detalhado abaixo não pode ser explicado por mais carbono que entra no sistema. Além disso, a produção de CO₂ permaneceu a mesma após o aumento. A Figura 5 demonstra claramente as alterações correspondentes na produção de metabólitos da fermentação. Quando CO₂ foi adicionado ao caldo de fermentação a concentração de 2,3-BDO aumentou de uma concentração de cerca de 0,6 g/L no dia 28 para 2,0 g/L no dia 31. A concentração de etanol diminuiu, e a proporção etanol de 2,3-BDO diminuiu de cerca de 20:1 no dia 28 a cerca de 5:1 no dia 31.

3B: *concentração de entrada CO₂ alta na partida*

[00152] Esta experiência foi concebida para mostrar o impacto da alta concentração de CO₂ para a produção de 2,3-BDO quando o CO₂ estava presente no início da fermentação. Como mostrado na Figura 7, uma vez que as condições de funcionamento estáveis foram alcançadas houve uma produção significativa de 2,3-BDO com a proporção de etanol: 2,3-BDO a 2:1. A concentração média de CO₂ de entrada era de 42% e a concentração

média de CO₂ de saída foi de 67,4%. Durante todo o experimento 50% de CO foi usado o fluxo de gás e a absorção de CO foram ajustadas para maximizar a produção de etanol e 2,3-BDO. A concentração de CO, CO₂ e H₂ no fluxo de gás de saída ao longo de vários dias é mostrada na Figura 8.

3C: *Aumento gradual na concentração de entrada de CO₂*

[00153] Durante o período desta experiência a concentração de CO₂ no fluxo de gás de entrada para o caldo de fermentação foi gradualmente aumentado para determinar o efeito de CO₂ no perfil de produção de metabólitos da fermentação. A Figura 10 mostra o efeito do aumento de CO₂ no fluxo de entrada sobre as concentrações de metabólito. A concentração de CO₂ foi aumentada de 0% para 10% no dia 6; de 10% para 15% no dia 9, e de 15% para 20% no dia 13. A cada aumento da concentração de CO₂ no fluxo de entrada um aumento correspondente na concentração de 2,3-BDO foi observado. A Figura 9 mostra a absorção de CO, CO₂ e H₂ da cultura microbiana ao longo da duração da experiência.

3D: *Ciclagem de CO₂*

[00154] Esta experiência foi realizada para determinar o efeito dos ciclos de concentração de entrada de CO₂. A fermentação foi configurada de modo que a quantidade de CO₂ no fluxo de entrada foi repetido entre 0% e 20% a cada hora. A Figura 11 mostra a produção de metabólitos ao longo do curso do experimento. O ciclismo de concentrações de entrada CO₂ teve o efeito de manter a produção de 2,3-BDO em um ligeiro aumento de concentração. A Figura 12 mostra a absorção de vários componentes do gás de admissão pela cultura microbiana ao longo da duração da experiência.

3E: *Aumento da concentração de CO₂ para o segundo reator de um sistema de dois reatores.*

[00155] Esta experiência foi concebida para demonstrar o efeito de passagem do fluxo de gás de saída a partir de um primeiro biorreator para o fluxo de entrada de um segundo biorreator, aumentando assim a concentração

CO₂. A Figura 13 apresenta gráficos da concentração de metabólitos no segundo biorreator do sistema de dois reatores entre os dias 14 e 20 do processo de fermentação. No dia 14 a quantidade de CO₂ fornecida para o segundo biorreator a partir do primeiro biorreator foi aumentada de tal modo que a quantidade total de CO₂ no segundo biorreator foi de 17,8% para 43,8%. Entre os dias 14 e 21, a concentração de 2,3-BDO no reator aumentou de cerca de 8 g/L a cerca de 14g/L. A proporção de etanol para 2,3-BDO diminuiu de 4: 1 no dia 14 para 2:1 em torno do dia 20 e mantiveram-se relativamente constante para o período remanescente da experiência. A Figura 14 mostra a absorção de CO, CO₂ e H₂ para a cultura microbiana no decurso da fermentação.

Exemplo 4: O aumento da produção de 2,3-BDO controlando a utilização CO.

Demonstrando efeito do fluxo de gás e agitação na produção de metabólitos.

[00156] Esta experiência foi concebida para demonstrar o efeito das alterações na transferência de massa na produção de metabólitos de uma cultura microbiana. Ao longo do curso do experimento, as taxas de fluxo de gás de agitação foram variadas resultando em alterações no gás que sai do reator, e o perfil dos metabólitos da fermentação.

[00157] Referindo-nos à Figura 15, um aumento na concentração de 2,3-BDO pode ser visto a partir do dia 6 ao dia 8, o que corresponde a um aumento da velocidade de agitação dentro do biorreator e uma diminuição do fluxo de gás para o reator. Como mostrado na Figura 18, no dia 5,6 absorção de CO foi mantida constante, mas a utilização de CO melhorou, por conseguinte, CO₂ no gás de saída aumentou. Isto foi feito através do aumento da velocidade de agitação (rpm), e diminuindo o fluxo de gás, de modo que o CO no gás de saída diminuiu de 26% para 12,5%. A absorção de CO permaneceu a mesma uma vez que o fluxo de gás foi reduzido de 240 mL/min/L a 160 mL/min/L. CO₂ no fluxo de saída aumentou de 37% para

48%. A utilização de CO aumentou de 53% para 79%. Como resultado deste aumento da CO₂ dissolvido aumentou sem qualquer aumento na absorção de CO. O aumento da utilização de CO positivamente correlacionou com um aumento na produção de 2,3-BDO, quanto maior utilização CO corresponde com mais CO₂ dissolvido.

Efeito de CO₂ dissolvido no caldo de fermentação na taxa de produtividade de 2, 3-butanodiol.

[00158] Os dados combinados a partir de um número de corridas com diferentes concentrações de CO₂ de saída em diferente pressão no espaço aéreo foram representados graficamente para mostrar a relação de CO₂ dissolvido no caldo de fermentação para a produção de 2,3-butanodiol. A Figura 16 é um gráfico de CO₂ dissolvido contra taxa de produção de 2,3-BDO. O gráfico mostra que um aumento na quantidade de CO₂ dissolvido no caldo de fermentação corresponde a um aumento na taxa de produtividade de 2,3-butanodiol.

[00159] A tabela apresenta os resultados de uma série de experimentos que mais uma vez mostra a correlação entre o CO₂ dissolvido e concentração e produtividade de 2,3-BDO e.

A Tabela

Pass. #	CO ₂ dissolvido calc. mM*	Saída CO ₂ %	BDO g/L	Entrada CO ₂ %	Absorção CO mM/L/dia	Pontos de dados	BDO normalizado g/L (4 mol absorção CO)	Taxa de produção g/L/dia	Taxa produção normalizada (4 mol absorção CO)
1	2,39	10,62	0,5	0	-4280	Média ~ 3 dias	0,47	0,92	0,86
2	4,58	20,3	0,88	10	-4201	Média ~ 3 dias	0,84	1,6	1,52
3	5,76	25,5	0,96	15	-4234	Média ~ 3 dias	0,91	1,71	1,62
4	7	31,1	1,37	20	-4071	Média ~ 3 dias	1,35	2,58	2,54
5	8,5	37	0,86	18,5	-3597	Média ~ 3 dias	0,96	1,36	1,51
6	11,05	49	1,38	18,8	-3595	Média ~ 3 dias	1,54	2,18	2,43
7	14,89	66	2,22	50	-4055	Antes esmag.	2,19	3,89	3,84
8	26,1	50	5,3	19,2	-5000	Média day 9 -12	4,24	8	6,40
9	39,7	49,8	10,38	20,5	-5051	Dia médio4,3 - 6,0	8,22	13,3	10,53
10	40,9	48	6,48	18,5	-6500	Dia médio7-8	3,99	13,75	8,46
11	41,1	46	10,38	22,3	-5319	Dia médio6,3 - 9,3	7,81	13,4	10,08

[00160] A invenção foi aqui descrita com referência a certas modalidades preferidas, a fim de permitir que o leitor pratique a invenção sem experimentação indevida. Os especialistas na técnica apreciarão que a

invenção é susceptível a invenção inclui todas essas variações e modificações. Além disso, títulos, cabeçalhos ou análogos são fornecidos para melhorar a compreensão do leitor do presente documento, e não devem ser lidos como limitantes do escopo da presente invenção.

[00161] As descrições completas de todos os pedidos, patentes e publicações, acima e abaixo citados, se houver, são aqui incorporadas por referência.

[00162] A referência a qualquer técnica anterior nesta especificação não é, e não deve ser tomada como um aviso ou qualquer forma de sugestão de que a técnica anterior forma parte do conhecimento geral comum nos Estados Unidos da América ou de qualquer país do mundo.

[00163] Ao longo deste relatório descritivo e de todas as reivindicações que se seguem, a menos que o contexto exija de outra forma, as palavras “compreende”, “compreendendo” e semelhantes devem ser entendidas em um sentido inclusivo em oposição a um sentido exclusivo, ou seja, no sentido de “incluindo, entre outros.”

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um ou mais produtos por fermentação microbiana de um substrato gasoso, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

a. receber um substrato gasoso compreendendo CO em um primeiro biorreator que compreende uma cultura de pelo menos um micro-organismo acetogênico carboxidotrófico em um meio nutriente líquido;

b. fermentar o substrato gasoso compreendendo CO para produzir um ou mais produtos líquidos e um gás de saída compreendendo CO₂;

c. passar o gás de saída compreendendo CO₂, de volta para o primeiro biorreator ou para um segundo biorreator, em que o referido biorreator compreende uma segunda cultura de pelo menos um micro-organismo acetogênico carboxidotrófico em um meio nutriente líquido; e

d. fermentar o gás de saída compreendendo CO₂ no primeiro ou segundo biorreator para produzir pelo menos um produto.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o gás de saída que compreende CO₂ é misturado com pelo menos um substrato gasoso antes de ser alimentado ao segundo biorreator.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que pelo menos um substrato gasoso adicional é alimentado para o segundo biorreator para ser utilizado como um substrato na fermentação.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o primeiro biorreator produz produtos derivados de acetil CoA e produtos derivados de piruvato e a proporção de produtos derivados de acetil CoA para produtos derivados de piruvato é de 30:1 a 20:1.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o segundo biorreator produz uma proporção menor de produtos derivados de acetil CoA para produtos derivados de piruvato do que o

primeiro biorreator.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um produto derivado do piruvato é selecionado entre o grupo que consiste em 2,3-butanodiol, lactato, succinato, metil etil cetona (MEK), 2-butanol, propanodiol, 2-propanol, isopropanol, acetoína, isobutanol, citramalato, butadieno e ácido poli lático (PLA).

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda tomar um fluxo de gás de saída produzido a partir do segundo biorreator e passando este para o primeiro biorreator para ser utilizado como um substrato.

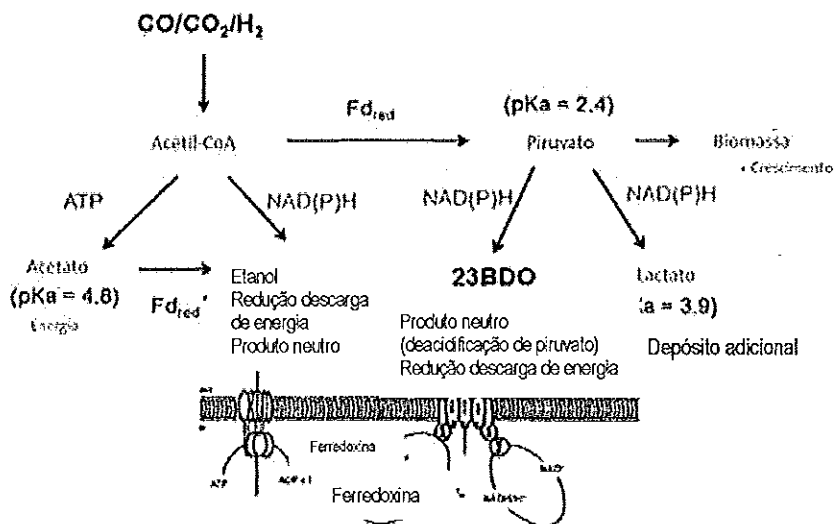


FIG. 1

Comparação de Pressão alta baixa

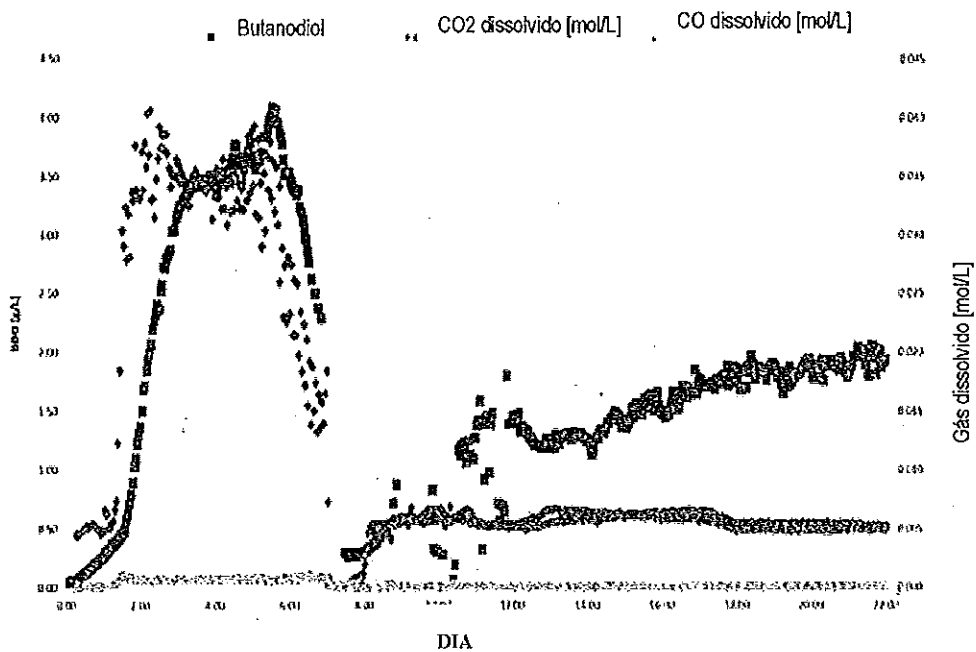


FIG. 2

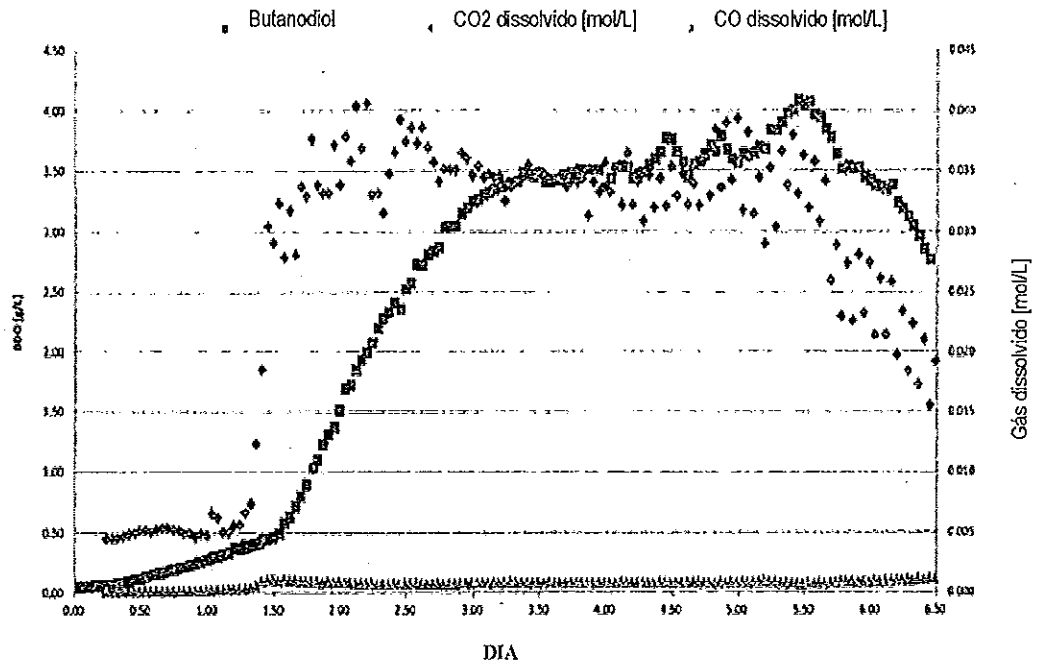
Concentração de BDO vs. CO₂ dissolvido

FIG. 3

Utilização de CO

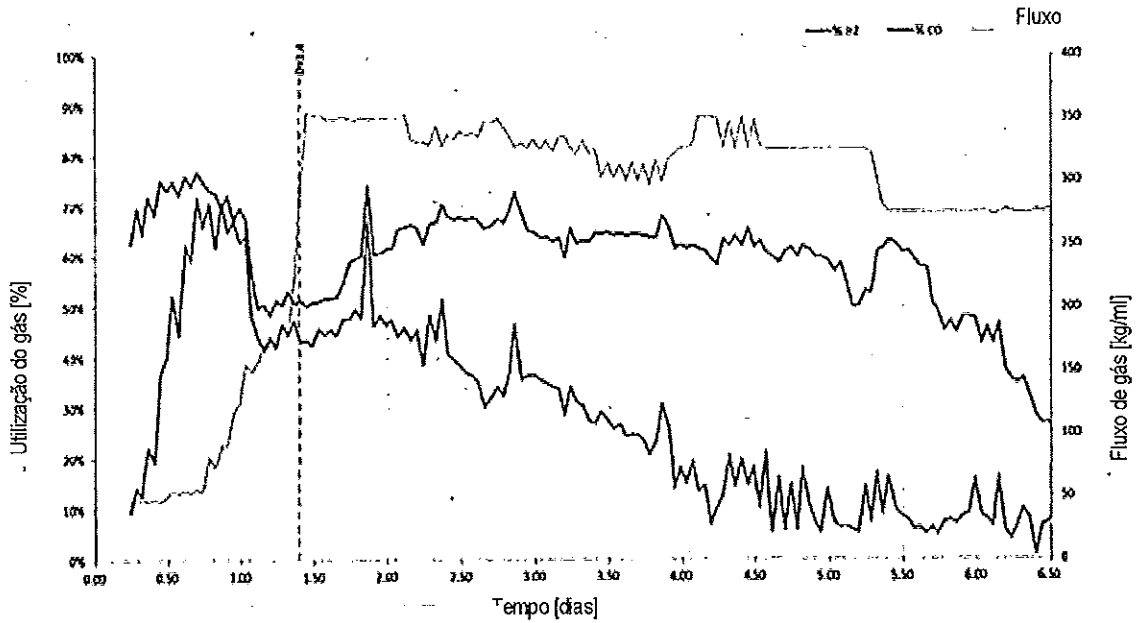


FIG.4

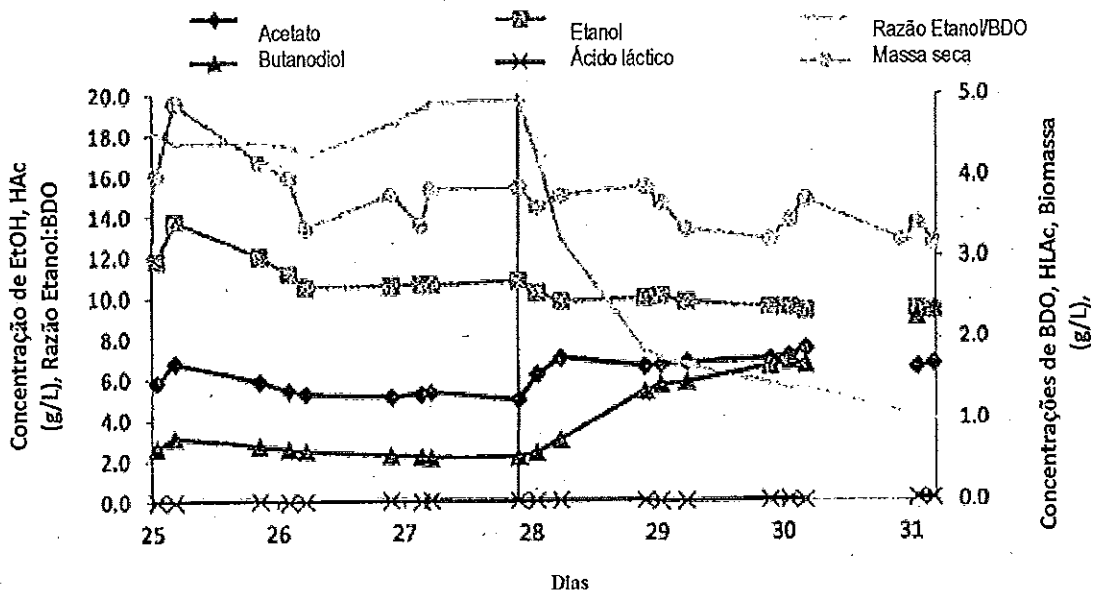


FIG. 5

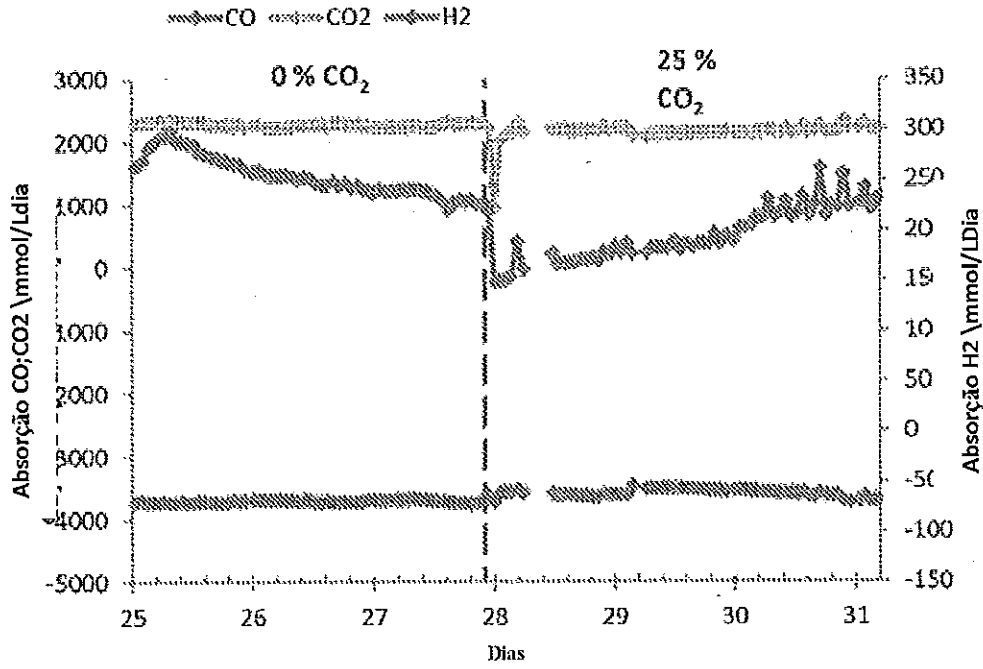


FIG 6

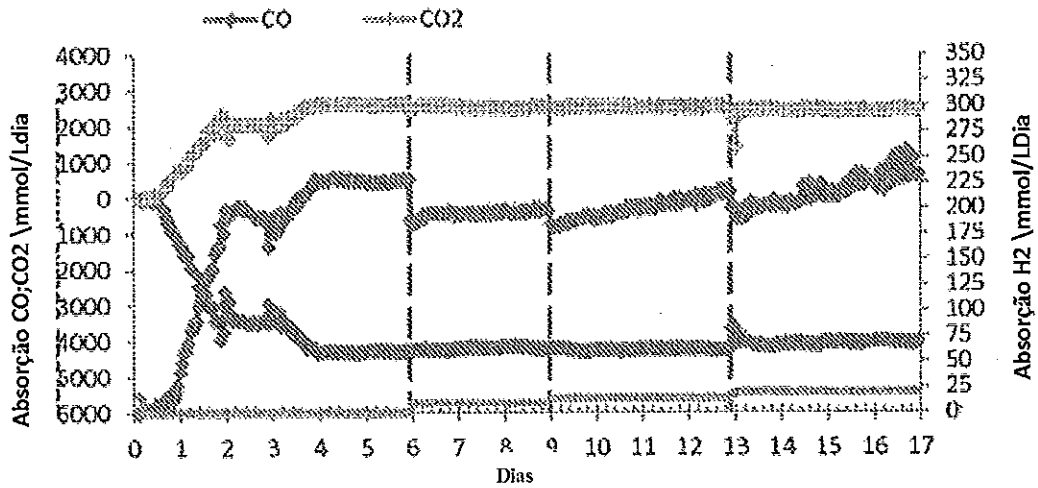


FIG 7

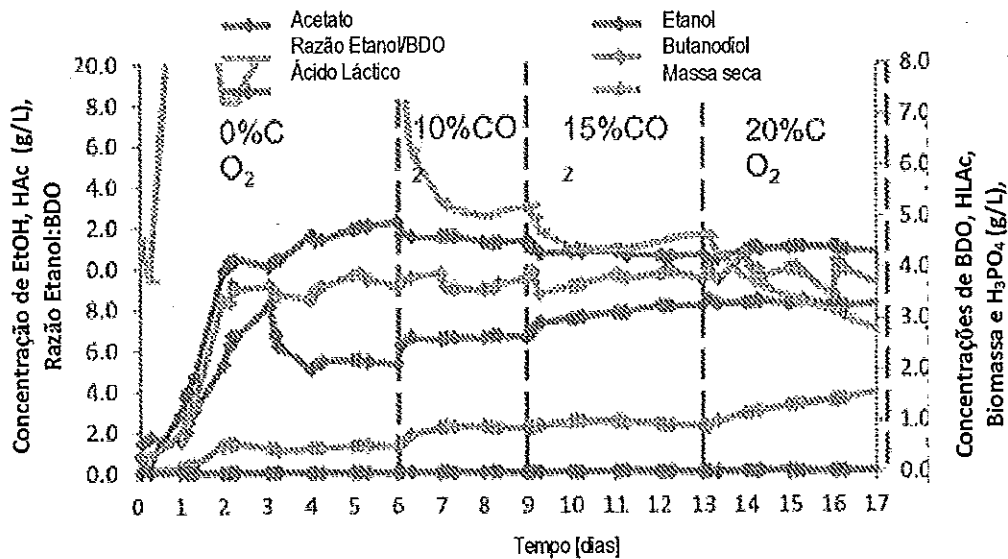


FIG 8

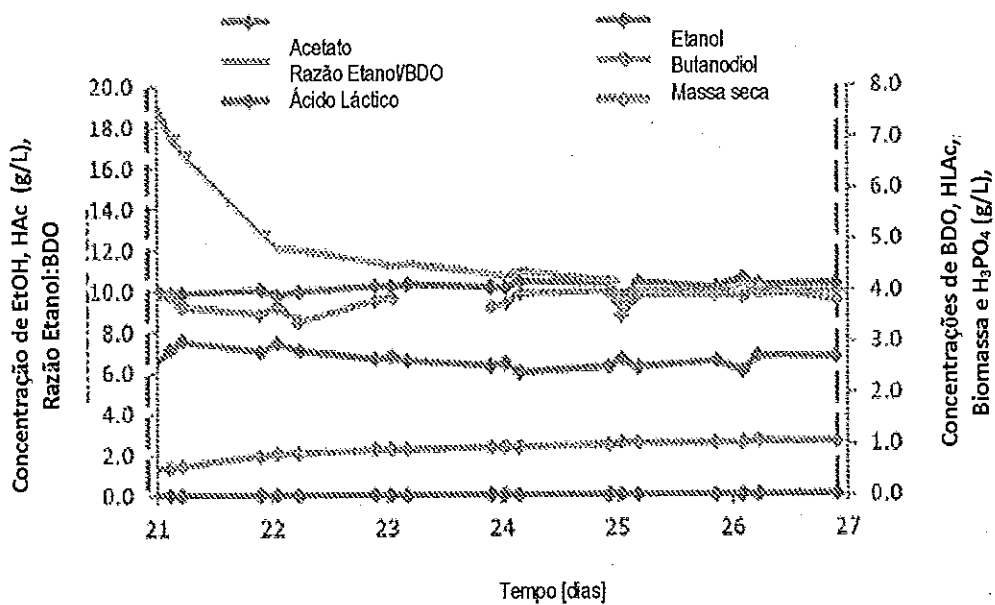


FIG 9

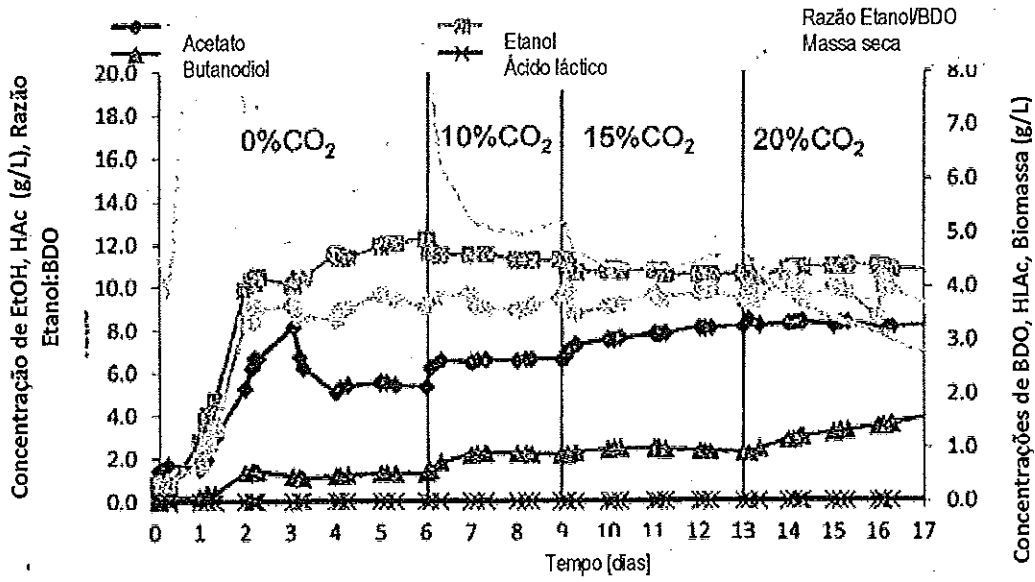


FIG. 10

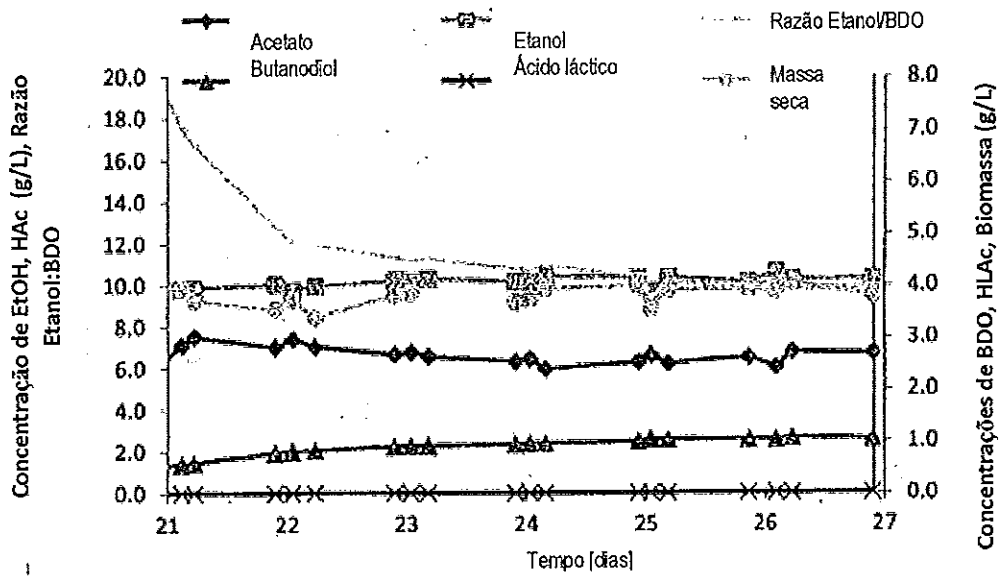


FIG. 11

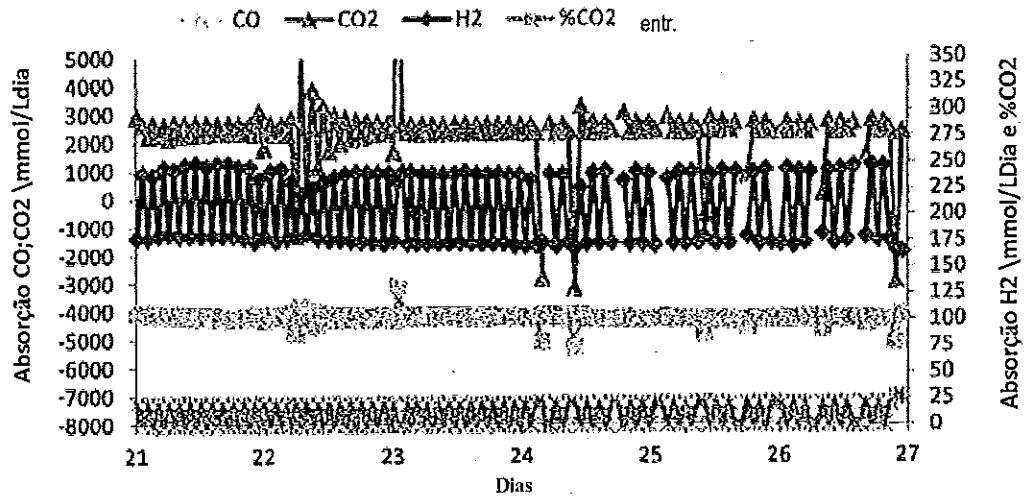


FIG. 12

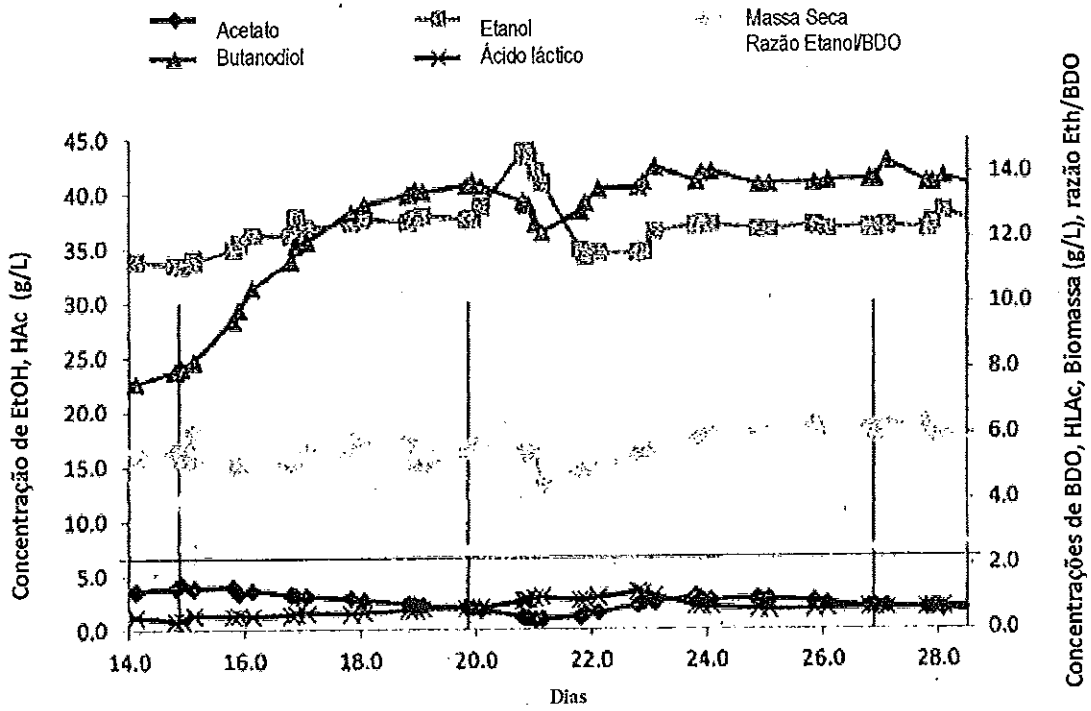


FIG. 13

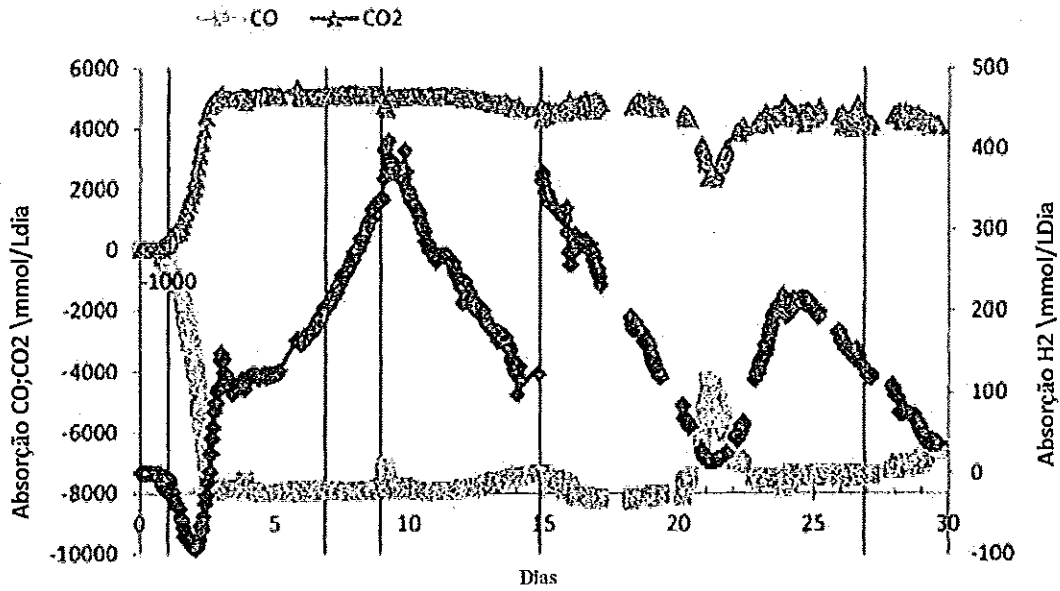


FIG. 14

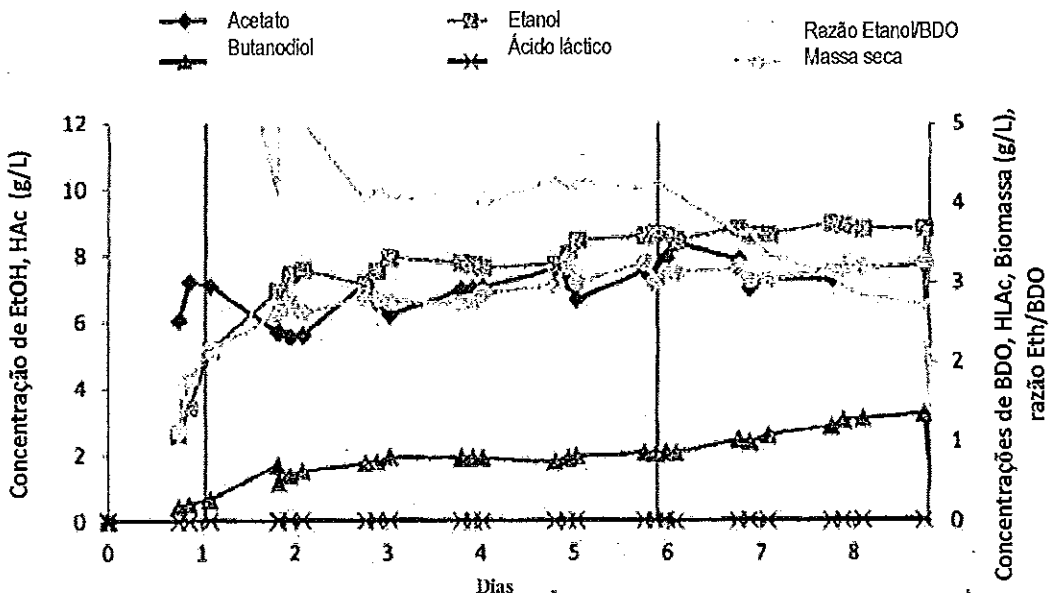


FIG. 15

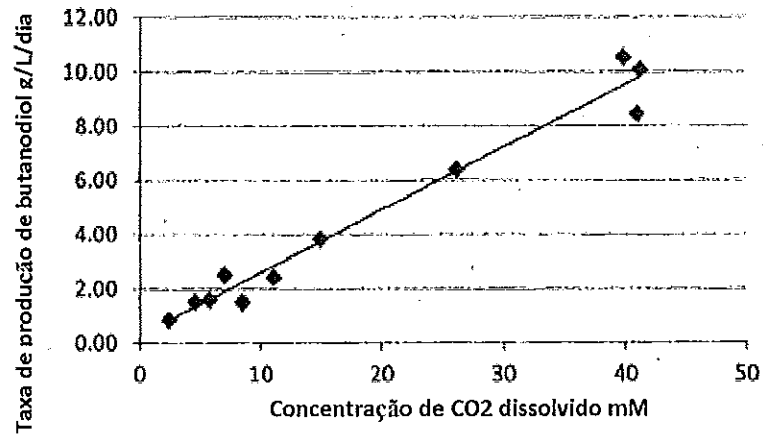


FIG. 16

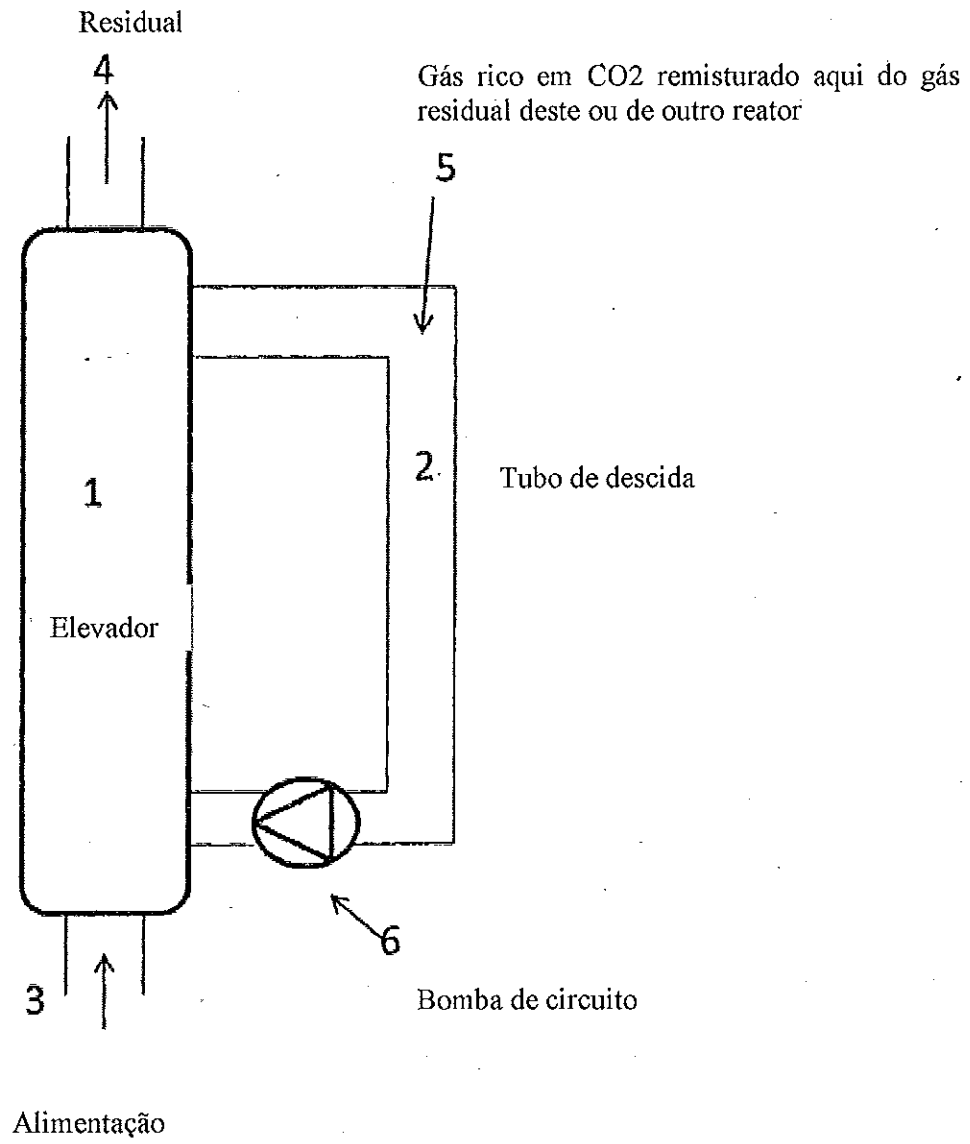


FIG. 17

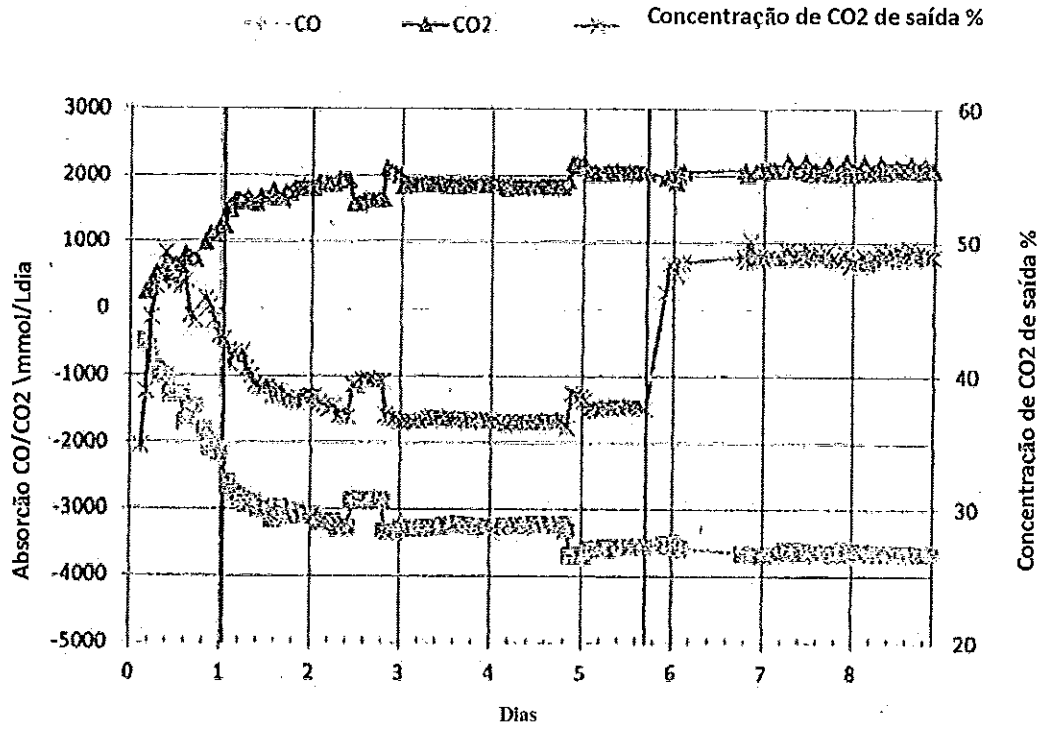


FIG. 18