



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112017000449-6 B1**



**(22) Data do Depósito: 06/05/2015**

**(45) Data de Concessão: 25/10/2022**

**(54) Título: PROCESSO DE FERMENTAÇÃO**

**(51) Int.Cl.: C12P 7/06; C12P 1/04; C12M 3/00; G06F 19/00.**

**(30) Prioridade Unionista: 11/07/2014 US 14/329,881.**

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

**(72) Inventor(es): CHRISTOPHE COLLET; GUY WILLIAM WATERS; JASON CARL BROMLEY; JUSTIN YI YANG; JAROD NATHAN WILSON.**

**(86) Pedido PCT: PCT US2015029563 de 06/05/2015**

**(87) Publicação PCT: WO 2016/007216 de 14/01/2016**

**(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/01/2017**

**(57) Resumo:** Trata-se de processos, assim como sistemas e produtos de programa de computador (software) associados, para a conversão biológica de CO em produtos finais desejados, tais como etanol. As metodologias de controle usadas para esses processos podem vantajosamente resultar em um tempo reduzido exigido para um período de operação em batelada ou outro período de operação inicial, antes de alcançar uma operação contínua, que pode ser demarcada tanto pela adição de meio de cultura fresco a uma taxa de fluxo definida quanto por outro alvo de iniciação de processo. As metodologias de controle podem alternativamente, ou em combinação, aprimorar um parâmetro de desempenho de processo, tal como uma produtividade do produto final desejado ou da taxa de crescimento bacteriano, durante esse período de operação em batelada ou outro período de operação inicial.

**PROCESSO DE FERMENTAÇÃO**  
**REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

[1] Este pedido reivindica o benefício do Pedido nº U.S. 14/329.881, depositado em 11 de julho de 2014, o conteúdo do qual é incorporado ao presente documento a título de referência.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[2] Aspectos da invenção referem-se à iniciação de processos para a fermentação microbiana de substratos que contêm CO em etanol, por exemplo, para alcançar operações contínuas e em estado estável. Aspectos específicos se referem à forma na qual parâmetros de operação são controlados, levando a resultados vantajosos.

**DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA**

[3] Preocupações ambientais sobre emissões de gás de efeito estufa (GHG) de combustível fóssil levaram a uma ênfase crescente em fontes de energia renováveis. Como resultado, etanol está se tornando rapidamente um combustível de transporte líquido rico em hidrogênio importante em todo o mundo. O crescimento contínuo no mercado global para a indústria de etanol combustível é esperado em um futuro próximo, com base em ênfase aumentada em produção de etanol na Europa, Japão e Estados Unidos, assim como em diversas nações em desenvolvimento. Por exemplo, nos Estados Unidos, o etanol é usado para produzir E10, uma mistura de 10% de etanol em gasolina. Em mesclas E10, o componente etanol atua como um agente oxigenante, que aprimora a eficiência de combustão e reduz a produção de poluentes de ar. No Brasil, o etanol satisfaz aproximadamente 30% da demanda de combustível de transporte, tanto como um agente oxigenante mesclado em gasolina quanto como um combustível puro por si só. Além disso, a União Europeia (UE) estabeleceu alvos, para cada um de seus países membros, para o consumo de combustíveis de transporte sustentáveis, tais como etanol derivado de biomassa.

[4] A vasta maioria de etanol combustível é produzida por meio de processos tradicionais de fermentação à base de levedura que usam carboidratos derivados de colheita, tais como sacarose extraída de cana-de-açúcar ou amido extraído de colheitas de grão, como a principal fonte de carbono. Entretanto, o custo dessas matérias-primas de carboidratos é influenciado por seu valor no mercado para usos concorrentes, a saber, como fontes de alimentos tanto para humanos quanto para animais. Além disso, o cultivo de colheitas de produção de amido ou sacarose para produção de etanol não é economicamente sustentável em todas as geografias, visto que essa é uma função tanto de valores de terra locais quanto do clima. Por essa razão, é de interesse particular desenvolver tecnologias para converter recursos de carbono de custos menores e/ou mais abundantes em etanol combustível. A esse respeito, o monóxido de carbono (CO) é um principal subproduto rico em energia da combustão incompleta de materiais orgânicos, tais como carvão, óleo e produtos derivados de óleo. Gases de refugo ricos em CO resultam de uma variedade de processos industriais. Por exemplo, a indústria de aço na Austrália é relatada para produzir e liberar na atmosfera mais de 500.000 toneladas métricas de CO anualmente.

[5] Mais recentemente, alternativas de processo com base em micro-organismos (bacterianos) para produzir etanol a partir de CO em uma escala industrial se tornaram um objeto de interesse e investimento comercial. A capacidade de culturas de micro-organismos de crescer, em que CO é a única fonte de carbono, foi primeiramente constatada em 1.903. Posteriormente, determinou-se que essa característica reside em um uso do organismo da via bioquímica de acetilcoenzima A (acetil CoA) de crescimento autotrófico (também conhecida como a via Wood-Ljungdahl e a via de monóxido de carbono desidrogenase/acetil CoA sintase (CODH/ACS)). Desde então, mostrou-se que uma grande quantidade de organismos anaeróbios que incluem organismos carboxidotróficos,

fotossintéticos, metanogênicos e acetogênicos metaboliza CO. Sabe-se que as bactérias anaeróbias, tais como aquelas do gênero *Clostridium*, produzem etanol a partir de CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> por meio da via bioquímica de acetil CoA. Por exemplo, várias cepas de *Clostridium ljungdahlii* que produzem etanol a partir de gases são descritas nos documentos nº WO 00/68407; nº EP 1117309 Al; nº US 5.173.429; nº US 5.593.886; nº US 6.368.819; nº WO 98/00558; e nº 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: 345-351 (1994)).

[6] Visto que cada enzima de um organismo promove sua conversão biológica designada com seletividade essencialmente perfeita, rotas de síntese microbiana podem alcançar rendimentos mais altos com custos de energia inferiores em comparação às rotas catalíticas convencionais. Por exemplo, as exigências de energia para separar subprodutos, que resultam de reações laterais não seletivas, dos produtos desejados podem ser reduzidas. Além disso, preocupações a respeito do envenenamento de catalisadores, devido às impurezas no meio de reação, são diminuídas.

[7] Entretanto, apesar dessas vantagens aparentes, a técnica deve abordar certos desafios associados à síntese microbiana de etanol a partir de CO, especialmente em termos de assegurar que a taxa de produção seja competitiva com outras tecnologias. Ao usar CO como sua fonte de carbono, as bactérias anaeróbias descritas acima produzem etanol através de fermentação, mas também produzem pelo menos um metabólito, por exemplo, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, metano, n-butanol e/ou ácido acético. A formação de qualquer um desses metabólitos tem o potencial para impactar significativamente a produtividade e a viabilidade econômica total de um dado processo, visto que o carbono disponível é perdido para o metabólito (ou metabólitos) e a eficiência de produção do produto final desejado é comprometida. Além disso, a menos que um metabólito (por exemplo, ácido

acético) em si tenha valor no momento e local do processo de fermentação microbiana, o mesmo pode representar um problema de descarte de refugo. Várias propostas para abordar a formação de produtos diferentes do produto final desejado na fermentação anaeróbia de gases que contêm CO para produzir etanol são discutidas nos documentos nº WO2007/117157, nº WO2008/115080 e nº WO2009/022925.

[8] A taxa de produção de etanol, que é um determinante-chave tanto para se um dado processo de fermentação é economicamente atrativo quanto para se é altamente dependente de gerenciamento das condições apropriadas para crescimento bacteriano. Por exemplo, sabe-se, a partir do documento nº WO2010/093262, que o substrato que contém CO deve ser fornecido para uma cultura microbiana a uma taxa de resulta em crescimento microbiano ideal e/ou produção de metabólito desejada. Caso substrato insuficiente seja fornecido, o crescimento microbiano retarda, e os rendimentos de produto de fermentação mudam em direção ao ácido acético à custa do etanol. Caso excesso de substrato seja fornecido, pode resultar em pobre crescimento microbiano e/ou morte de célula. Informações adicionais a respeito das relações entre parâmetros de operação nesses processos são encontradas no documento nº WO2011/002318.

[9] O controle de parâmetros de operação é particularmente importante durante o período inicial de operação, no qual os objetivos de processamento estão focados não somente no crescimento da cultura celular para um nível suficiente e no estabelecimento de outras condições para operação contínua, mas também no equilíbrio do produto e das produtividades de subproduto. A redução no tempo necessária para conduzir uma operação de cultura em batelada, antes da operação contínua de biorreator, tem maiores implicações para aprimorar a economia do processo. Isso é particularmente verdade visto que micróbios com capacidade para crescer em gases que contêm CO geralmente o fazem a uma taxa mais lenta do que micróbios

usados em tecnologias concorrentes com açúcares como uma fonte de alimento. A partir da perspectiva comercial de operação de um processo de fermentação, o tempo exigido para uma população microbiana se tornar estabelecida, isto é, atingir uma densidade celular suficientemente alta para a síntese de níveis economicamente favoráveis de produto, representa um custo-chave de operação que afeta a rentabilidade total. A capacidade de melhorar taxas de crescimento de cultura e/ou produtividades durante um período inicial de operação, por exemplo, sob condições de batelada, e assim, reduzir o tempo exigido para atingir densidades celulares desejadas e/ou níveis de produto, é um determinante importante para o sucesso total na comercialização de processos biológicos para produzir etanol a partir de gás de refugo que contém CO.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[10] Aspectos da invenção se referem a métodos para controlar a iniciação de processos biológicos de conversão de CO, com base em dados disponíveis. Normalmente, no começo de tais processos, o biorreator é carregado (inoculado) com um meio de cultura que contém bactérias carboxidotróficas (isto é, que têm a capacidade para derivar energia a partir de CO). De acordo com processos representativos, o etanol é o produto final desejado, enquanto acetato é gerado como um metabólito indesejado, na forma de ácido acético. Conforme discutido acima, o biorreator precisa ser abastecido criteriosamente com CO para atender objetivos concorrentes. Em particular, um subabastecimento de CO pode resultar em formação de acetato excessiva à custa de etanol, enquanto um sobreabastecimento de CO pode impactar negativamente o crescimento bacteriano. Em vista dessas considerações, um perfil especificado para a taxa de fluxo ao longo do tempo de CO ou gás que contém CO pode ser usado, com base no crescimento bacteriano esperado durante a operação em batelada, em conjunto com informações derivadas de outros processos.

[11] O objetivo principal de operação durante um período inicial de operação (por exemplo, um período de operação em batelada) é aumentar a concentração de bactérias (biomassa) no meio de cultura. Portanto, o perfil de fluxo de gás durante o período de operação em batelada é normalmente conservador e busca evitar o sobreabastecimento de CO. Isso pode resultar na formação de ácido acético em uma quantidade significativa que, em alguns casos, excede a do produto final de etanol desejado. Visto que qualquer ácido acético que é gerado ao longo de todos os processos de conversão bacteriana diminui o valor de pH do meio de cultura, um agente neutralizante básico, tal como hidróxido de amônio aquoso, pode ser introduzido. O agente neutralizante pode ser dosado para o biorreator para manter um valor de pH (por exemplo, um pH de 5,0) do meio de cultura adequado para o crescimento bacteriano.

[12] As modalidades da invenção são direcionadas aos processos de fermentação biológica para converter CO em um produto final desejado, tal como etanol, que compreendem alimentar um biorreator que compreende um meio de cultura que contém bactérias carboxidotróficas tanto com um substrato que contém CO quanto com um agente neutralizante básico (por exemplo, hidróxido de amônio aquoso). Os processos geram tanto o produto final desejado assim como um metabólito ácido (por exemplo, ácido acético), que é convertido pelo agente neutralizante (por exemplo, em um sal, tal como acetato de amônio), a fim de evitar níveis de pH inaceitáveis no meio de cultura. De acordo com uma modalidade representativa, a taxa de fluxo do agente neutralizante básico pode ser controlada com base em uma propriedade medida, tal como uma concentração medida ou produtividade medida das bactérias carboxidotróficas ou do metabólito ácido, no meio de cultura. Alternativamente, caso tal propriedade medida esteja indisponível, por exemplo, caso careça de equipamento analítico e de amostragem em linha adequado, a taxa de fluxo do agente neutralizante básico pode ser controlada

com base em uma taxa de fluxo medida do substrato que contém CO ou, de outra forma, com base em um ponto de ajuste para esse substrato.

[13] Outras modalidades da invenção são direcionadas aos sistemas que compreendem um biorreator e um controlador configurado para controlar a taxa de fluxo do agente neutralizante básico para o biorreator, com base em uma propriedade medida do meio de cultura, conforme descrito acima, ou, alternativamente, com base em uma taxa de fluxo medida do substrato que contém CO ou, de outra forma, com base em um ponto de ajuste para esse substrato. No caso de controle com base em uma propriedade medida do meio de cultura, o sistema pode compreender adicionalmente o aparelho de amostragem necessário, configurado para isolar uma amostra do meio de cultura do biorreator para análise, além de um analisador, configurado para analisar a amostra isolada. Em quaisquer alternativas de método de controle acima, sistemas representativos podem, opcionalmente, compreender um segundo controlador configurado para controlar uma taxa de fluxo de substrato que contém CO com base em um valor de pH medido, um aparelho de amostragem configurado para isolar, a partir do biorreator, uma amostra do meio de cultura, e/ou um analisador configurado para analisar a amostra e, então, inserir, no controlador, o valor de pH medido.

[14] Adicionalmente, as modalidades da invenção são direcionadas aos produtos de programa de computador que compreendem uma mídia legível por computador não transitória que tem programas de computador incorporados na mesma. Esses programas de computador incluem instruções para fazer com que um processador realize etapas necessárias para realizar os processos de controle descritos no presente documento. Esses processos incluem receber informações que são inseridas em um controlador configurado para controlar uma taxa de fluxo de neutralizante básico para um biorreator. As informações que podem ser recebidas e inseridas, dessa maneira, incluem informações recebidas a partir de um analisador

configurado para analisar uma amostra de meio de cultura do biorreator para uma propriedade medida, conforme descrito acima. Alternativamente, as informações podem ser a taxa de fluxo medida do substrato que contém CO, recebida a partir de um sensor ou dispositivo de medição de taxa de fluxo que é configurado para medir esse fluxo. As informações recebidas também podem incluir um ponto de ajuste de taxa de fluxo de substrato que contém CO. Independentemente do tipo de informações que são recebidas e inseridas em um controlador, os processos representativos podem compreender adicionalmente receber um valor de pH medido, por exemplo, de um medidor de pH ou outro analisador configurado para medir o pH do meio de cultura diretamente ou, de outra forma, de uma amostra do meio de cultura do biorreator. O valor de pH medido pode ser inserido em um segundo controlador configurado para controlar a taxa de fluxo de substrato que contém CO, em que o valor de pH medido é a base para controle.

[15] Essas e outras modalidades e aspectos relacionados à presente invenção são evidentes a partir da Descrição Detalhada a seguir.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[16] Uma compreensão mais completa das modalidades exemplificativas da presente invenção e das vantagens das mesmas pode ser adquirida em referência à descrição a seguir em consideração das Figuras anexas.

[17] A Figura 1 é um fluxograma de uma metodologia representativa para controlar parâmetros de operação de um processo biológico para converter um substrato que contém CO em etanol.

[18] A Figura 2 é um gráfico de concentrações medidas de etanol, bactérias carboxidotróficas e ácido acético, em um meio de cultura ao longo do tempo, para um processo biológico para converter um substrato que contém CO em etanol, com o uso de uma metodologia de controle convencional.

[19] A Figura 3 é um gráfico de concentrações medidas de etanol, bactérias carboxidotróficas e ácido acético em um meio de cultura ao longo do tempo, para um processo biológico para converter um substrato que contém CO em etanol, com o uso de uma metodologia de controle conforme descrito no presente documento.

[20] A Figura 4 é um gráfico comparativo da taxa de fluxo de substrato que contém CO ao longo do tempo, para processos biológicos para converter um substrato que contém CO em etanol, com o uso de uma metodologia de controle convencional e uma metodologia de controle conforme descrita no presente documento.

[21] A Figura 5 é um gráfico comparativo da concentração de bactérias carboxidotróficas em um meio de cultura ao longo do tempo, para processos biológicos para converter um substrato que contém CO em etanol, com o uso de uma metodologia de controle convencional e uma metodologia de controle conforme descrita no presente documento.

[22] A Figura 6 é um gráfico de concentrações medidas de etanol, bactérias carboxidotróficas e ácido acético em um meio de cultura ao longo do tempo, assim como da taxa de fluxo medida de meio de cultura fresco, para um processo biológico para converter um substrato que contém CO em etanol, com o uso de uma metodologia de controle representativa conforme descrita no presente documento.

[23] A Figura 7 é um gráfico de concentrações medidas de etanol, bactérias carboxidotróficas e ácido acético em um meio de cultura ao longo do tempo, assim como das taxas de fluxo medidas de solução de agente neutralizante de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e substrato que contém CO, para um processo biológico para converter um substrato que contém CO em etanol, com o uso de uma metodologia de controle alternativa conforme descrita no presente documento.

## DESCRIÇÃO DETALHADA

[24] A presente invenção se refere aos processos para produzir um produto final desejado, tal como etanol, alimentando-se o biorreator que compreende um meio de cultura que contém bactérias carboxidotróficas com CO em um substrato que contém CO. Além do produto final desejado, os processos representativos geram adicionalmente metabólitos indesejados ou menos desejados. Um exemplo de um metabólito ácido que pode ser gerado além de um produto desejado, tal como etanol, é o acetato (por exemplo, na forma de ácido acético). Bactérias carboxidotróficas representativas ou micróbios (isto é, micro-organismos que obtêm energia e carbono a partir de CO), são aquelas do gênero *Moorella*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina* e *Desulfotomaculum*. Exemplos particulares de bactérias que são *Clostridia* incluem *C. Ijundahlii*, *C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* e *C. beijerenckei*.

[25] Substratos que contêm CO representativos incluem amplamente qualquer gás que contém CO, ou possivelmente líquido, no qual monóxido de carbono pode ser disponibilizado para uma ou mais cepas de bactérias para crescimento e/ou fermentação. Tais substratos que contêm CO preferencialmente não incluem contaminantes, na medida em que tais contaminantes podem ter um efeito adverso no crescimento das bactérias carboxidotróficas (por exemplo, um ou mais contaminantes não estão presentes em concentrações ou quantidades de modo que a taxa de crescimento seja reduzida em mais do que 10% sob um dado conjunto de condições, em comparação à taxa de crescimento sob as mesmas condições, mas sem o contaminante (ou contaminantes)). Substratos que contêm CO gasoso representativos contêm tipicamente uma proporção significativa de CO, preferencialmente, de pelo menos 5% a 100% de CO em volume. Tais substratos são frequentemente produzidos como produtos de refugo de

processos industriais, tais como processos de fabricação de aço ou processo de fabricação de produto não ferroso. Outros processos nos quais substratos que contêm CO gasoso são gerados incluem a gaseificação de matéria orgânica, tal como metano, etano, propano, carvão, gás natural, óleo cru, resíduos de baixo valor de refinaria de óleo (que incluem coque de petróleo ou petcoke), refugo sólido urbano ou biomassa. A biomassa inclui subprodutos obtidos durante a extração e processamento de gêneros alimentícios, tais como açúcar de cana-de-açúcar, ou amido de milho ou grãos, ou refugo de biomassa não alimentar gerado pela indústria florestal. Qualquer um desses materiais carbonáceos pode ser gaseificado, isto é, parcialmente queimado com oxigênio, para produzir gás de síntese (gás de síntese que compreende quantidades significativas de H<sub>2</sub> e CO). Vantajosamente, correntes de gás desses processos podem ser usadas conforme descrito no presente documento para a produção benéfica de produtos finais úteis, tais como etanol. Em outras modalidades, o substrato que compreende CO pode ser derivado da reforma a vapor de hidrocarbonetos. Esses processos são descritos em mais detalhes nas Publicações de Pedido nº US2013/0045517A 1; nº US2013/0210096A 1; nº US2013/0203143 A 1 e nº US2013/0316411 A 1 e na Patente nº U.S. 8.383.376, cujo conteúdo de todas são incorporados ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[26] Embora não seja necessário que o substrato que contém CO contenha qualquer hidrogênio, a presença de H<sub>2</sub> normalmente não é prejudicial à formação do produto final desejado. Em modalidades particulares, o substrato que contém CO pode compreender baixas concentrações de H<sub>2</sub>, por exemplo, menos do que 10% em volume, menos do que 5% em volume ou menos do que 1% em volume. O substrato que contém CO também pode conter algum CO<sub>2</sub>, por exemplo, de 1% a 80% em volume, de 1% a 50% em volume ou de 1% a 30% em volume. Qualquer substrato que

contém CO, tal como um substrato que contém CO gasoso, pode ser tratado para remover quaisquer impurezas indesejadas, tais como partículas de poeira ou quaisquer outros contaminantes sólidos, líquidos ou gasosos que possam ser prejudiciais às bactérias carboxidotróficas ou ao processo de conversão biológica em geral, antes de seu uso no processo de conversão biológica. Por exemplo, o substrato que contém CO gasoso pode ser filtrado ou purificado com o uso de métodos conhecidos.

[27] No contexto de um metabólito ácido que é ácido acético, os termos “ácido acético” ou “acetato” se referem ao total de acetato presente no meio de cultura, tanto na sua forma aniónica (dissociada) (isto é, como íon acetato ou  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) quanto na forma de ácido acético molecular livre ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), com a razão entre essas formas sendo dependente do pH do sistema. O termo “biorreator” inclui qualquer vaso adequado para conter uma cultura de bactérias carboxidotróficas que pode ser usado para realizar os processos biológicos descritos no presente documento, que também pode ser denominado como processos de fermentação, na medida em que são geralmente conduzidos anaerobicamente. Um biorreator adequado pode ser um Reator com Tanque de Agitação Contínua (CSTR), um Reator de Célula Imobilizada (ICR), um Reator de Leito Gotejante (TBR), um Reator de Biofilme de Leito Móvel (MBBR), uma Coluna de Bolhas, um Fermentador de Elevação a Gás, um Reator de Membrana, tal como um Biorreator de Membrana de Fibra Oca (HFMBR), um Misturador Estático ou pode incluir outros vasos ou dispositivos (por exemplo, disposições de torres ou encanamento) adequados para colocar o substrato que contém CO em contato com o meio de cultura bacteriano (por exemplo, com dissolução e cinética de transporte de massa favoráveis para realizar a conversão biológica).

[28] Outras correntes de processo, parâmetros de operação e equipamento adequados para uso nos processos biológicos descritos no presente documento são descritos na Publicação de Pedido de Patente nº

US2011/0212433, que é incorporada ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[29] A presente invenção é mais particularmente associada à constatação de processos biológicos para converter CO em produtos finais valiosos, tais como etanol, nos quais (i) o tempo exigido para um período de operação em batelada ou outro período inicial de operação, antes de alcançar uma operação contínua, que pode ser demarcado tanto pela adição de meio de cultura fresco a uma taxa de fluxo definida quanto por outro alvo de iniciação de processo, é inesperadamente reduzido e/ou (ii) a produtividade do produto final desejado ou outro parâmetro de desempenho de processo (por exemplo, taxa de crescimento bacteriano) é inesperadamente aprimorada durante esse período de operação em batelada ou outro período inicial de operação. A conversão da operação em batelada para a operação contínua pode ser demarcada pelo início da adição do meio de cultura fresco ao biorreator usado no processo. Alternativamente, caso a taxa de adição de meio de cultura fresco seja aumenta gradualmente em vez de iniciada em um ponto de tempo discreto, a conversão de batelada para operação contínua pode ser demarcada alcançando-se uma taxa-alvo de adição de meio de cultura fresco ao biorreator e/ou alcançando-se uma taxa-alvo de extração de meio de cultura que contém bactérias do biorreator. As taxas-alvo de adição de meio de cultura fresco e/ou de extração de meio de cultura que contém bactérias podem ser as taxas associadas a uma operação de estado estável, isto é, uma operação sob a qual condições são mantidas substancialmente constantes ao longo de um período estendido (por exemplo, pelo menos 3 dias, ou pelo menos 10 dias) de produção de um produto final desejado. De outra forma, essas taxas-alvo podem ser pelo menos 60%, pelo menos 75% ou pelo menos 90% das taxas associadas à operação de estado estável.

[30] Além de uma taxa-alvo de meio de cultura fresco, outros alvos de iniciação de processo que podem ser usados para demarcar um período

inicial de operação de um período de operação de estado estável ou “em corrente” podem incluir uma concentração de meio de cultura de produto desejado (por exemplo, etanol), bactérias carboxidotróficas ou metabólito ácido. Os alvos de iniciação de processo também podem incluir uma produtividade de produto desejado, bactérias carboxidotróficas ou metabólito ácido. Os alvos de iniciação de processo podem ser predeterminados, isto é, estabelecidos desde o princípio do processo e possivelmente usados como inserções para controlar sistemas, incluindo produtos de programa de computador (software), usados para monitorar e/ou controlar os processos biológicos, que incluem monitoramento e/ou controle da adição de meio de cultura fresco.

[31] As modalidades particulares da invenção se baseiam na constatação de que certas metodologias de controle, que podem ser automatizadas, podem correlacionar de modo eficaz a taxa de fluxo do substrato que contém CO a uma propriedade medida do meio de cultura. Essas metodologias, quando usadas em um período inicial de operação (por exemplo, um período de operação em batelada), ou quando usadas em geral, fornecem vantajosamente um equilíbrio significativamente aprimorado em termos da redução em produção de ácido acético ou acetato, juntamente com a prevenção de excedentes de CO. Surpreendentemente, os objetivos do período de operação em batelada ou outro período inicial de operação podem ser alcançados muito antes e também de modo muito mais eficiente termos de produtividades tanto do produto final desejado quanto do metabólito (ou metabólitos) indesejado, em comparação à prática convencional para estabelecer um perfil de taxa de fluxo de gás que contém CO desde o princípio. De acordo com algumas modalidades, a economia total do processo pode ser imensamente aprimorada como um resultado do tempo de partida reduzido para alcançar uma concentração de bactérias no meio de cultura que permita a transição para a operação contínua. Por exemplo, o tempo de

inoculação do biorreator que é alcançado até uma dada concentração de bactérias de biomassa pode ser reduzido em pelo menos 20% (por exemplo, de 20% a 80%), tipicamente em pelo menos 35% (por exemplo, de 35% a 75%) e frequentemente em pelo menos 50% (por exemplo, de 50% a 70%), em comparação aos resultados alcançados com o uso de práticas convencionais para controlar parâmetros de processo.

[32] De acordo com uma metodologia de controle particular, uma propriedade do meio de cultura, medida durante um período inicial de operação (por exemplo, um período de operação em batelada) ou durante algum outro período de operação (por exemplo, um período de operação contínuo, de estado estável ou normal), é usada como a base para controle da taxa de fluxo de um agente neutralizante básico (por exemplo, hidróxido de amônio aquoso). Propriedades representativas incluem uma concentração de um metabólito ácido (por exemplo, ácido acético ou acetato), uma produtividade de um metabólito ácido, uma concentração das bactérias carboxidotróficas, uma produtividade das bactérias carboxidotróficas ou uma combinação de tais propriedades. Em geral, um aumento em qualquer uma dessas propriedades levará diretamente a um aumento na taxa de fluxo do agente neutralizante básico. Em uma modalidade específica, a taxa de fluxo de agente neutralizante básico é controlada com base em uma concentração-alvo de metabólito ácido no meio de cultura, que é, por sua vez, determinada a partir de uma concentração medida das bactérias carboxidotróficas. Dessa maneira, a metodologia de controle considera o consumo do agente neutralizante básico e, especificamente, o aumento de utilização de nitrogênio, pela cultura bacteriana em crescimento. Isso, vantajosamente, fornece condições durante a partida (por exemplo, um período de operação em batelada) que são especificamente adaptadas aos objetivos de crescimento rápido da cultura bacteriana com uma distribuição de rendimento de produto favorável.

[33] A propriedade do meio de cultura celular pode ser medida de modo contínuo ou intermitente, por exemplo, periodicamente, em que o período de tempo entre cada medição sucessiva é geralmente de cada 0,1 segundos a cada 120 segundos, tipicamente de cada 0,5 segundos a cada 60 segundos e frequentemente de cada segundo a cada 10 segundos. A propriedade medida pode ser obtida por análise em linha da concentração, no meio de cultura, tanto das bactérias carboxidotróficas quanto do metabólito ácido. Com base em medições sucessivas de concentração (por exemplo, em gramas por litro, g/l), juntamente com o intervalo de tempo entre medições sucessivas, as produtividades (por exemplo, em gramas por litro por dia, g/l dia<sup>-1</sup>) das bactérias carboxidotróficas ou do metabólito ácido podem ser calculadas. Por exemplo, caso a concentração de bactérias carboxidotróficas seja determinada em intervalos sucessivos, designados Tempo 1 e Tempo 2, então, a produtividade das bactérias carboxidotróficas no Tempo 2 pode ser expressada da seguinte forma: (concentração no Tempo 2 - concentração no Tempo 1) / (Tempo 2 - Tempo 1).

[34] Em geral, a concentração de metabólito ácido é medida em uma amostra de meio de cultura que é livre ou substancialmente livre de bactérias carboxidotróficas, como um resultado de filtragem ou separação de membrana. Por exemplo, um filtro que tem um tamanho de poro adequado (por exemplo, na faixa de 0,05 µm a 1 µm) para remover as bactérias pode ser incorporado em uma linha de amostra de um sistema de amostragem configurado para extrair o meio de cultura livre de células de um reator único ou, de outra forma, configurado para extrair tal líquido de múltiplos reatores (por exemplo, de 2 a 10 reatores, tal como 4 a 6 reatores, que podem operar em série ou em paralelo, ou, de outra forma, operarem independentemente) em momentos diferentes, a fim de monitorar automática e separadamente o desempenho dos reatores. De acordo com outras modalidades, uma amostra livre de células do meio de cultura pode estar disponível como uma corrente

de permeado de um sistema de separação de membrana, no qual a corrente de retentado rica em célula é reciclada para o biorreator. O permeado, caso não usado para análise, pode fluir normalmente para um segundo biorreator (por exemplo, que opera em série). O filtrado ou permeado livre de células obtido a partir do biorreator pode fornecer amostras representativas usadas para a medição em linha das propriedades de concentração de produto final (por exemplo, etanol) ou concentração de metabólito ácido (por exemplo, ácido acético ou acetato). Essas concentrações podem ser determinadas por métodos analíticos conhecidos, tais como cromatografia (por exemplo, cromatografia líquida de alta pressão ou HPLC).

[35] No caso de concentração de bactérias carboxidotróficas como a propriedade medida, o meio de cultura pode ser extraído diretamente do biorreator, por exemplo, como uma corrente de sangria que pode fluir normalmente para um segundo biorreator (por exemplo, que opera em série), caso não usado para análise. Uma linha de amostra de uma corrente de sangria ou outra corrente para extrair o meio de cultura celular pode ser conectada de modo fluido a um dispositivo analítico adequado para a medição em linha da propriedade de concentração de bactérias carboxidotróficas. Dispositivos representativos incluem aqueles que medem a absorbância ou transmissão de energia eletromagnética através da amostra (por exemplo, um espectrofotômetro), uma certa atividade biológica da amostra (por exemplo, um leitor de placa) ou outra propriedade da amostra (por exemplo, impedância/capacitância) em uma sonda descartável ou reutilizável (por exemplo, uma sonda de biomassa em linha). A linha de amostra de uma corrente de sangria ou outra corrente pode ser parte de um sistema de amostragem configurado para extrair o meio de cultura de um reator único ou, de outra forma, configurado para extrair tal líquido de múltiplos reatores (por exemplo, de 2 a 10 reatores, tal como de 4 a 6 reatores, que podem operar em série ou em paralelo ou, de outra forma, operarem independentemente) em

momentos diferentes, a fim de monitorar automática e separadamente o desempenho dos reatores.

[36] Sistemas de amostragem para a análise em linha de meios de cultura de um ou múltiplos biorreatores incluirão válvulas condutos (por exemplo, tubulação ou encanamento) adequadas, bombas e atuadores para permitir a amostragem automatizada de um reator desejado em um momento desejado, e dispositivos adequados para enxaguar (purgar) linhas de amostra para obter resultados precisos. No caso de análise do meio de cultura livre de células, por exemplo, para obter a concentração de etanol ou acetato, o líquido ou permeado de membrana filtrado, conforme descrito acima, pode ser alimentado (por exemplo, bombeado com o uso de uma bomba peristáltica) pelo menos intermitentemente, mas, de preferência, de modo contínuo, através de um recipiente de amostra adequado que é configurado para análise em linha. Por exemplo, linhas de entrada e saída em comunicação fluida com tal recipiente de amostra (por exemplo, um frasco de amostra) pode conduzir continuamente uma corrente filtrada de meio de cultura para e a partir do recipiente de amostra. A alimentação contínua de meio de cultura através de um recipiente de amostra, de acordo com algumas modalidades, envolverá fluir uma corrente de permeado ou filtrado livre de células, conforme descrito acima, da entrada de recipiente de amostra, através do recipiente de amostra e para a saída de recipiente de amostra ao longo de algum período de operação do biorreator, por exemplo ao longo de pelo menos 3 minutos, pelo menos 5 minutos ou pelo menos 10 minutos. De acordo com uma modalidade específica, por exemplo, o meio de cultura livre de células filtrado pode ser alimentado continuamente através do recipiente de amostra durante 9 minutos, seguido por um refluxo de 1 minuto do filtro na linha de amostra, a fim de impedir a obstrução do filtro. O excesso de meio de cultura que não é amostrado e que flui através da saída de recipiente de amostra, pode ser descartado como refugo.

[37] Dessa maneira, o líquido presente no recipiente de amostra é representativo do meio de cultura que contém célula no biorreator, em termos das concentrações do produto final desejado (por exemplo, etanol) e metabólito (ou metabólitos) (por exemplo, ácido acético ou acetato) nesse meio de cultura que contém célula no momento de análise do meio de cultura livre de células no recipiente de amostra. Os comprimentos das linhas de amostra podem ser minimizados para minimizar qualquer deslocamento entre a concentração (ou concentrações) real de produto final e/ou metabólito (ou metabólitos) no biorreator e a concentração (ou concentrações) medida do meio de cultura livre de células no recipiente de amostra no momento de análise. De acordo com algumas modalidades, o deslocamento entre a concentração real e a medida do produto final e/ou um metabólito será menor que 10%, menor que 5% ou menor que 2%. Uma amostra do meio de cultura livre de células pode, portanto, ser extraída do recipiente de amostra e analisada, a fim de determinar a concentração (ou concentrações) de produto final e metabólito (ou metabólitos) no biorreator essencialmente em tempo real. Por exemplo, a amostragem automatizada pode envolver o uso de uma agulha de amostragem para perfurar uma vedação de borracha no topo do recipiente de amostra e extraír uma amostra do meio de cultura livre de células em intervalos regulares, em que um período de tempo entre as medições sucessivas é conforme descrito acima. Um aparelho de amostragem automatizado pode incluir, por exemplo, de 2 a 10 recipientes de amostra, tal como de 4 a 6 recipientes de amostra, para amostrar o meio de cultura a partir da mesma quantidade de biorreatores, que podem operar em série ou em paralelo, ou, de outra forma, operarem independentemente.

[38] De modo mais genérico, aparelhos de amostragem automatizados podem ser configurados, com o uso de válvulas de condutos adequadas (por exemplo, tubulação ou encanamento), bombas e atuadores, para análise tanto do meio de cultura celular quanto do meio de cultura livre

de células, conforme descrito acima, de múltiplos reatores (por exemplo, de 2 a 10 reatores, tal como 4 a 6 reatores, que podem operar em série ou em paralelo, ou, de outra forma operarem independentemente) em momentos diferentes, a fim de monitorar automática e separadamente o desempenho dos reatores. As propriedades do meio de cultura, que incluem a concentração e a produtividade de metabólito (ou metabólitos) (por exemplo, ácido acético ou acetato) e/ou a concentração e a produtividade das bactérias carboxidotróficas, podem ser determinadas automaticamente em intervalos regulares, em que um período de tempo entre as medições sucessivas é conforme descrito acima. Vantajosamente, o uso de uma amostragem e análise automatizadas em linha permite que resultados analíticos sejam diretamente inseridos no controlador relevante (por exemplo, para controlar a taxa de fluxo do agente neutralizante básico), sem intervenção humana. Além disso, aparelhos de amostragem automatizados conforme descrito no presente documento permitem o monitoramento de propriedades de um biorreator meio de cultura, ou de múltiplos biorreatores meio de cultura, em uma base essencialmente em tempo real, sem a necessidade de operadores rastrearem e manusearem, por exemplo, realizando-se múltiplas amostras líquidas de diluições e/ou pipetagem de múltiplos biorreatores. Confiabilidade e reproduzibilidade de dados são, assim, significativamente aprimoradas, assim como a operação total do biorreator (ou biorreatores).

[39] Preferencialmente, as metodologias de controle conforme descritas no presente documento são automatizadas, o que envolve o uso de um programa de computador com instruções apropriadas para fazer com que um processador transmita os sinais necessários para que os controladores realizem essas metodologias de controle. De acordo com uma metodologia de controle particular, uma propriedade medida do meio de cultura é usada como a base para controlar a taxa de fluxo do agente neutralizante básico (por exemplo, um composto hidróxido, tal como hidróxido de amônio aquoso ou

outra base inorgânica ou orgânica). Tal metodologia de controle pode, em comparação às metodologias de controle convencionais, reduzir vantajosamente o tempo de um período inicial de operação (por exemplo, um período de operação em batelada), por exemplo, antes de um período de operação de estado estável ou contínua, que pode ser demarcado por uma taxa definida de extração de um produto final desejado (por exemplo, etanol) ou outro parâmetro de operação definido. Sem se ater à teoria, a redução em tempo pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao fato de que as bactérias carboxidotróficas utilizam ou consomem o agente neutralizante básico (por exemplo, utilizam nitrogênio no agente neutralizante básico). Portanto, em geral, as metodologias de controle conforme descritas no presente documento são particularmente vantajosas em processos de biorreator nos quais pelo menos duas correntes de alimentação (por exemplo, tanto um substrato que contém CO quanto um agente neutralizante básico) para o meio de cultura são consumidas, metabolizadas ou, de outra forma, utilizadas pelas bactérias contidas nas mesmas. Em outras modalidades, as metodologias de controle descritas no presente documento podem ser usadas tanto durante um período de operação em batelada quanto durante um período de operação contínua, ou durante um período de operação contínua somente.

[40] As propriedades representativas incluem uma concentração medida (isto é, em unidades de massa/volume, tais como gramas/litro ou gramas · litro<sup>-1</sup>) ou uma produtividade medida (isto é, em unidades de massa/(volume · tempo), tais como gramas/(litro<sup>-1</sup> dia) ou gramas litro<sup>-1</sup> · dia<sup>-1</sup>) do metabólito ácido (por exemplo, ácido acético ou acetato), ou das bactérias carboxidotróficas. De acordo com modalidades preferenciais, a propriedade medida é uma concentração medida ou produtividade medida do metabólito ácido. Qualquer uma das propriedades acima pode ser medida de modo contínuo ou intermitente (por exemplo, periodicamente) durante um período inicial de operação (por exemplo, um período de operação em batelada) ou

outro período, com uma frequência de medição e com o uso de técnicas de amostragem, conforme descrito acima. Por exemplo, uma amostra de uma corrente de permeado que é livre de células ou pelo menos substancialmente livre de células, pode ser analisada para sua concentração de metabólito ácido com o uso de HPLC.

[41] O controle da taxa de fluxo do agente neutralizante básico pode, mais especificamente, se basear em uma diferença entre qualquer uma das propriedades medidas do meio de cultura, conforme descrito acima, e seus pontos de ajuste correspondentes. Por exemplo, caso uma concentração medida de metabólito ácido seja a base para controle, então, a taxa de fluxo de agente neutralizante básico pode ser controlada com base na diferença entre a concentração medida de metabólito ácido e uma concentração de ponto de ajuste de metabólito ácido no meio de cultura. De modo semelhante, caso uma produtividade medida de metabólito ácido, uma concentração medida de bactérias carboxidotróficas ou uma produtividade medida de bactérias carboxidotróficas seja a base para controle, então, a taxa de fluxo de agente neutralizante básico pode ser controlada com base na diferença entre (i) a produtividade medida de metabólito ácido e uma produtividade de ponto de ajuste de metabólito ácido, (ii) a concentração medida de bactérias carboxidotróficas e uma concentração de ponto de ajuste de bactérias carboxidotróficas ou (iii) a produtividade medida de bactérias carboxidotróficas e uma produtividade de ponto de ajuste de bactérias carboxidotróficas.

[42] No caso de uma concentração de ponto de ajuste de metabólito ácido ser determinada, por exemplo, caso a concentração medida de metabólito ácido exceda sua concentração de ponto de ajuste (ou alvo), a metodologia de controle pode resultar em diminuição de modo direcional da taxa de fluxo do agente neutralizante básico. Isso irá, por fim, diminuir a concentração de metabólito ácido no meio de cultura, visto que a taxa de

fluxo diminuída de agente neutralizante básico fará com que o pH do meio de cultura diminua. De acordo com modalidades preferenciais, a taxa de fluxo de substrato que contém CO pode ser controlada com base em um valor de pH medido (por exemplo, obtido com o uso de um medidor de pH em linha) do meio de cultura. Portanto, uma diminuição no valor de pH medido (por exemplo, para abaixo de um ponto de ajuste de valor de pH ou valor-alvo de pH, tal como 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 ou 6,0) pode provocar um aumento na taxa de fluxo de substrato que contém CO. Quando o meio de cultura se tornar abastecido com um fluxo aumentado de substrato que contém CO, a produtividade de metabólito ácido diminui em favor de produtividade de etanol, o que faz com que a concentração de metabólito ácido diminua, por exemplo, direcionalmente para a concentração de ponto de ajuste de metabólito ácido, e o valor de pH aumente. Reciprocamente, caso a concentração medida de metabólito ácido caia abaixo da concentração de ponto de ajuste (ou alvo) determinada, a metodologia de controle pode resultar em aumento de modo direcional da taxa de fluxo do agente neutralizante básico. Isso irá, por fim, aumentar a concentração de metabólito ácido no meio de cultura, visto que a taxa de fluxo aumentada de agente neutralizante básico fará com que o pH do meio de cultura aumente. A taxa de fluxo de substrato que contém CO pode ser controlada com base em um valor de pH medido (por exemplo, obtido com o uso de um medidor de pH em linha) do meio de cultura, conforme descrito acima. Portanto, um aumento no valor de pH medido (por exemplo, para acima de um ponto de ajuste de valor de pH ou valor-alvo de pH, tal como 4,2, 4,7, 5,2, 5,7 ou 6,2) pode provocar uma diminuição na taxa de fluxo de substrato que contém CO. Quando o meio de cultura se tornar abastecido com um fluxo diminuído de substrato que contém CO, a produtividade de metabólito ácido aumenta à custa de produtividade de etanol, o que faz com que a concentração de metabólito ácido aumente, por exemplo, direcionalmente para a concentração de ponto de

ajuste de metabólito ácido, e o valor de pH diminua.

[43] Metodologias de controle análogas são possíveis, controlando-se o fluxo do agente neutralizante básico de acordo com outras propriedades medidas do meio de cultura, conforme descrito acima. Por exemplo, (i) caso a produtividade medida de metabólito ácido exceda uma produtividade de ponto de ajuste (ou alvo) correspondente, a metodologia de controle pode resultar em diminuição de modo direcional da taxa de fluxo do agente neutralizante básico, (ii) caso a concentração medida de bactérias carboxidotróficas exceda uma concentração de ponto de ajuste (ou alvo) correspondente, a metodologia de controle pode resultar em aumento de modo direcional da taxa de fluxo do agente neutralizante básico ou (iii) caso a produtividade medida de bactérias carboxidotróficas exceda uma concentração de ponto de ajuste (ou alvo) correspondente, a metodologia de controle pode resultar em aumento de modo direcional da taxa de fluxo do agente neutralizante básico. A Figura 1 retrata uma metodologia de controle representativa na qual a taxa de fluxo do agente neutralizante básico, hidróxido de amônio aquoso ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), se baseia na produtividade medida do metabólito ácido, ácido acético. A taxa de fluxo de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , por sua vez, afeta o pH do meio de cultura. Caso a resposta a qualquer alteração na taxa de fluxo de  $\text{NH}_4\text{OH}$  seja a manutenção do pH de meio de cultura (isto é, o pH é “nivelado”), então, a taxa de fluxo do substrato que contém CO permanece inalterada. Entretanto, caso tal resposta aumente o pH de meio de cultura acima de seu ponto de ajuste (isto é, pH é “alto”), então, o fluxo do substrato que contém CO é diminuído, o que aumenta a produtividade de ácido acético e leva o pH de volta ao seu ponto de ajuste. Caso tal resposta diminua o pH de meio de cultura abaixo de seu ponto de ajuste (isto é, pH é “baixo”), então, o fluxo do substrato que contém CO é aumentado, o que diminui a produtividade de ácido acético e leva o pH de volta para o seu ponto de ajuste.

[44] Qualquer um dos pontos de ajuste para propriedades do meio

de cultura (por exemplo, a concentração de ponto de ajuste de metabólito ácido, a produtividade de ponto de ajuste de metabólito ácido, a concentração de ponto de ajuste de bactérias carboxidotróficas ou a produtividade de ponto de ajuste de bactérias carboxidotróficas) pode ser determinado, por sua vez, com base em um ou mais outros parâmetros de operação medidos (por exemplo, taxas de fluxo, concentrações e/ou produtividades ou pH medidas) do processo de biorreator. Por exemplo, a concentração medida de bactérias carboxidotróficas ou a produtividade medida de bactérias carboxidotróficas pode ser usada para determinar um ponto de ajuste. De acordo com uma modalidade específica, e com base em certas constatações relacionadas à presente invenção, o ponto de ajuste pode ser proporcional à concentração medida de bactérias carboxidotróficas ou à produtividade medida de bactérias carboxidotróficas. A produtividade de ponto de ajuste de metabólito ácido, pode, por exemplo, ser independentemente determinada pelas fórmulas

$$A_1 \bullet \text{BIOCON}mv + B_1 \text{ ou } A_2 \bullet \text{BIOPROD}mv + B_2$$

em que  $A_1$  e  $A_2$  representam constantes de proporcionalidade entre o ponto de ajuste e a concentração medida de bactérias carboxidotróficas ( $\text{BIOCON}mv$ ) ou produtividade medida de bactérias carboxidotróficas ( $\text{BIOPROD}mv$ ), respectivamente, e  $B_1$  e  $B_2$  representam deslocamentos. As constantes  $A_1$  e  $B_1$ , ou  $A_2$  e  $B_2$ , podem ser determinadas empiricamente a partir de dados experimentais, por exemplo, dados anteriores obtidos com o uso do mesmo biorreator ou, de outra forma, obtidos com o uso de um biorreator que contém uma cultura microbiana para realizar o mesmo processo de conversão (por exemplo, a conversão de CO em etanol). Mais especificamente, essas constantes podem ser obtidas conduzindo-se uma análise de regressão linear de tais dados anteriores. No caso de determinação de  $\text{BIOCON}mv$  ou  $\text{BIOPROD}mv$ , a amostragem e análise para determinar a concentração de bactérias carboxidotróficas pode ser realizada conforme descrito acima.

[45] Portanto, em uma modalidade exemplificativa, uma concentração medida de bactérias carboxidotróficas (BIOCON<sub>mv</sub>) ou a produtividade medida de bactérias carboxidotróficas (BIOPROD<sub>mv</sub>) pode ser obtida com o uso de uma sonda de biomassa em linha ou outro dispositivo de amostragem e analisador de amostra. A partir do valor de BIOCON<sub>mv</sub> ou BIOPROD<sub>mv</sub>, uma concentração de ponto de ajuste de metabólito ácido (ou concentração-alvo) ou uma produtividade de ponto de ajuste de metabólito ácido (ou produtividade-alvo) pode ser determinada, por exemplo, de acordo com as fórmulas dadas acima.

[46] Um diluente, tal como o meio de cultura fresco, é geralmente adicionado ao biorreator, se não inicialmente, então, em algum ponto posterior no tempo durante o processo de conversão biológica. O diluente pode ser primeiro introduzido, isto é, o fluxo de diluente iniciado, ao mesmo tempo que uma ou mais outras alimentações são primeiro introduzidas ao biorreator (por exemplo, o substrato que contém CO e/ou o agente neutralizante básico). De outra forma, o diluente pode ser primeiro introduzido algum tempo depois (por exemplo, pelo menos 2 horas depois, pelo menos 6 horas depois ou pelo menos 12 horas depois) que uma ou mais alimentações são primeiro introduzidas ao biorreator (por exemplo, o substrato que contém CO e/ou o agente neutralizante básico). O fluxo de meio de cultura fresco pode ser iniciado após atingir um alvo de início de meio de cultura adequado, que pode ser o mesmo que qualquer um dentre os alvos de iniciação de processo, conforme descrito acima. Tal alvo pode incluir, por exemplo, uma concentração ou produtividade predeterminada tanto das bactérias carboxidotróficas quanto do metabólito ácido. Em geral, a adição de um diluente, tal como o meio de cultura fresco, em uma dada taxa de fluxo de massa ou taxa de fluxo volumétrica é acompanhada (por exemplo, simultaneamente) pela extração de meio de cultura, o que inclui o produto final desejado e quaisquer metabólitos, em uma taxa de fluxo de massa ou

taxa de fluxo volumétrica comparável. O meio de cultura extraído pode (i) ser livre ou substancialmente livre de bactérias carboxidotróficas (por exemplo, no caso de ser separado por filtração ou separação de membrana), ou (ii) conter bactérias carboxidotróficas na mesma ou substancialmente na mesma concentração que o meio de cultura contido no biorreatore (por exemplo, no caso de ser extraído sem separação). Em alguns casos, o meio de cultura extraído pode incluir porções (por exemplo, correntes separadas) tanto de (i) quanto de (ii). Em qualquer evento, um segundo biorreatore pode ser alimentado com nenhum ou tanto com (i) quanto com (ii) para realizar o mesmo processo de conversão biológico de CO em etanol (por exemplo, através de operação em série com o primeiro biorreatore).

[47] Preferencialmente, a taxa de fluxo do diluente é aumentada gradualmente durante todo ou parte de um período de operação em batelada, conforme definido no presente documento. Entretanto, não é exigido que qualquer fluxo de diluente seja adicionado durante esse período, de modo que o fluxo de diluente seja adicionado somente durante um período de operação posterior (por exemplo, contínuo), ou de modo que a introdução de diluente ao biorreatore seja usada para demarcar a transição de um período de operação em batelada para um período de operação contínuo.

[48] Conforme com a taxa de fluxo de agente neutralizante básico, a taxa de fluxo de diluente pode ser controlada com base em qualquer uma das propriedades medidas do meio de cultura, e com o uso de qualquer uma das metodologias de controle, conforme descrito acima. De acordo com modalidades particulares, a taxa de fluxo de diluente para o biorreatore é controlada com base na concentração medida de bactérias carboxidotróficas ou na produtividade medida de bactérias carboxidotróficas no meio de cultura. Com base em certas constatações relacionadas à presente invenção, um ponto de ajuste de taxa de fluxo de diluente pode ser determinado de acordo com uma função exponencial, em que a concentração medida ou a

produtividade medida é o expoente. Por exemplo, o ponto de ajuste de taxa de fluxo de diluente pode ser determinado de acordo com uma das fórmulas

$$C_1^{(BIOCONmv)} \text{ ou } C_2^{(BIOPRODmv)}$$

em que  $BIOCONmv$  e  $BIOPRODmv$  representam, respectivamente, a concentração medida de bactérias carboxidotróficas e a produtividade medida de bactérias carboxidotróficas, respectivamente, e  $C_1$  e  $C_2$  são constantes. As constantes  $C_1$  e  $C_2$  podem ser determinadas empiricamente a partir de dados experimentais, por exemplo, a partir de dados anteriores obtidos com o uso do mesmo biorreator ou, de outra forma, obtidos com o uso de um biorreator que contém uma cultura microbiana para realizar o mesmo processo de conversão (por exemplo, a conversão de CO em etanol). No caso de determinação de  $BIOCONmv$  ou  $BIOPRODmv$ , a amostragem e análise para determinar a concentração de bactérias carboxidotróficas pode ser realizada conforme descrito acima.

[49] De acordo com uma segunda metodologia de controle particular, a medição de uma propriedade do meio de cultura não é exigida. Em vez disso, dados anteriores podem ser usados para estabelecer relações entre as variáveis de concentração e produtividade de bactérias carboxidotróficas, e o fluxo correspondente de gás que contém CO (ou substrato) de uma dada composição que fornecerá uma produtividade-alvo do metabólito ácido, assim como o fluxo de agente neutralizante básico que manterá o pH do meio de cultura. Os dados anteriores podem ser obtidos, por exemplo, com o uso do mesmo biorreator ou, de outra forma, com o uso de um biorreator que contém uma cultura microbiana para realizar o mesmo processo de conversão (por exemplo, a conversão de CO em etanol). Com o uso de informações a partir de outros processos de conversão biológica de CO em etanol, que incluem concentração e produtividade de bactérias carboxidotróficas, além da taxa de fluxo correspondente de substrato que contém CO, a taxa de fluxo do agente neutralizante básico pode ser estimada

para uma produtividade de metabólito ácido desejada. Além disso, com o uso de tais informações, a taxa de fluxo de substrato que contém CO pode ser estimada para abastecer uma dada concentração de bactérias carboxidotróficas e alcançar a produtividade de metabólito ácido desejada.

[50] Relações específicas entre as variáveis de processo podem se basear, por exemplo, nas equações abaixo:

$$W \bullet \text{BIOPROD} + X \bullet \text{METPROD} = \text{NEUTFLO} = Y \bullet \text{COFLO} + Z$$

em que BIOPROD, METPROD, NEUTFLO e COFLO representam, respectivamente, a produtividade de bactérias carboxidotróficas, a produtividade de metabólito ácido, a taxa de fluxo de agente neutralizante básico para o biorreator e a taxa de fluxo de substrato que contém CO para o biorreator, e W, X, Y e Z são constantes que são determinadas com base em dados anteriores, conforme descrito acima. Mais especificamente, essas constantes podem ser obtidas conduzindo-se uma análise de regressão linear de tais dados anteriores. As produtividades podem ser medidas conforme descrito acima (por exemplo, com o uso de um espectrofotômetro, um leitor de placa ou uma sonda de biomassa no caso de concentração ou produtividade de bactérias carboxidotróficas, e/ou com o uso de HPLC no caso de concentração ou produtividade de metabólito ácido).

[51] Portanto, de acordo com modalidades particulares, durante um período de operação em batelada, ou outro período de operação, para alimentar o biorreator tanto com o substrato que contém CO quanto com o agente neutralizante básico, a taxa de fluxo de agente neutralizante básico é controlada com base na taxa de fluxo do substrato que contém CO. Por exemplo, a taxa de fluxo de agente neutralizante básico pode ser controlada com base em um valor medido (isto é, uma taxa de fluxo medida de substrato que contém CO) ou, de outra forma, um valor de ponto de ajuste (isto é, um ponto de ajuste de taxa de fluxo de substrato que contém CO). Isto é, um ponto de ajuste para a taxa de fluxo de agente neutralizante básico pode ser

determinado de acordo com tal valor medido ou valor de ponto de ajuste. De acordo com certas modalidades, conforme é evidente a partir das relações de variáveis de processo apresentadas acima, o ponto de ajuste de taxa de fluxo de agente neutralizante básico pode variar linearmente tanto com a taxa de fluxo medida de substrato que contém CO quanto com o ponto de ajuste de taxa de fluxo de substrato que contém CO. Ainda mais especificamente, o ponto de ajuste de taxa de fluxo de agente neutralizante básico pode ser determinado e acordo com as fórmulas:

$$Y \bullet \text{COFLO}_{\text{mv}} + Z \text{ ou } Y \bullet \text{COFLO}_{\text{3sp}} + Z$$

em que  $\text{COFLO}_{\text{mv}}$  e  $\text{COFLO}_{\text{sp}}$  representam, respectivamente, a taxa de fluxo medida de substrato que contém CO e o ponto de ajuste de taxa de fluxo de substrato que contém CO.  $Y$  e  $Z$  representam constantes, a saber, uma constante de proporcionalidade entre  $\text{COFLO}_{\text{mv}}$  ou  $\text{COFLO}_{\text{sp}}$  e o ponto de ajuste de taxa de fluxo de agente neutralizante básico, no caso de  $Y$ , e um deslocamento, no caso de  $Z$ .

[52] Em tipos particulares dessas metodologias de controle, a taxa de fluxo do substrato que contém CO pode ser, por sua vez, controlada com base no valor de pH do meio de cultura. Por exemplo, caso o valor medido de pH do meio de cultura caia abaixo de um ponto de ajuste de pH (por exemplo, um dentre os valores de pH específicos indicados acima), o meio de cultura se tornou muito ácido e, em resposta, a taxa de fluxo de substrato que contém CO é aumentada (por exemplo, aumentando automaticamente uma porcentagem de abertura de uma válvula de controle em uma linha de entrada de substrato que contém CO) para abastecer a cultura de bactérias com mais CO e reduzir a produtividade de metabólito ácido. Reciprocamente, caso o valor medido de pH do meio de cultura se eleve acima desse ponto de ajuste de pH, o meio de cultura se tornou muito básico e, em resposta, a taxa de fluxo de substrato que contém CO é diminuída (por exemplo, diminuindo-se automaticamente uma porcentagem de abertura de uma válvula de controle

em uma linha de entrada de substrato que contém CO) para abastecer a cultura de bactérias com menos CO e aumentar a produtividade de metabólito ácido.

[53] Alternativamente, um ponto de ajuste de taxa de fluxo que contém CO pode ser determinado a partir de um valor de pH medido do meio de cultura, sendo que esse ponto de ajuste representa um desvio a partir do valor medido de taxa de fluxo que contém CO. Em vista dessas considerações, pode ser possível para o valor de pH medido do meio de cultura gerar os pontos de ajuste tanto para a taxa de fluxo do substrato que contém CO quanto para a taxa de fluxo do agente neutralizante básico. Entretanto, geralmente, é preferencial que a taxa de fluxo medida de substrato que contém CO, essa taxa de fluxo medida (em oposição ao ponto de ajuste de taxa de fluxo), seja usada para determinar o ponto de ajuste para a taxa de fluxo de agente neutralizante básico. O valor de pH de meio de cultura pode ser medido tanto de modo contínuo quanto de modo intermitente (por exemplo, periodicamente em intervalos regulares) com o uso de, por exemplo, um analisador de pH em linha. De outra forma, esse valor de pH pode ser medido manualmente.

#### EXEMPLOS

[54] Os exemplos a seguir são apresentados como representativos da presente invenção. Esses exemplos não devem ser interpretados como limitativos do escopo da invenção, visto que essas e outras modalidades equivalentes serão evidentes em vista da presente revelação e das reivindicações anexas.

#### Exemplo 1

##### Comparação Entre Partida “Com Base Em Tempo” Convencional E Partida “Automatizada” Da Invenção

[55] Um processo biológico da conversão de CO em etanol foi iniciado inoculando-se um biorreator com meio de cultura que contém *C.*

*ljundahlii*. O pH de meio de cultura começou a cair à medida em que ácido acético foi produzido. As alimentações de substrato que contém CO e hidróxido de amônio para o biorreator foram iniciadas quando o pH do meio de cultura atingiu 5,0. A taxa de fluxo do substrato que contém CO durante a partida foi governada por um perfil com base em tempo predeterminado convencional, no qual a prevenção de sobreabastecimento de CO foi o objetivo principal. Para propósitos comparativos, o mesmo processo foi iniciado com o uso de uma metodologia de controle, conforme descrito no presente documento, no qual a taxa de fluxo do hidróxido de amônio foi controlada com base na concentração de acetato (na forma de ácido acético) no meio de cultura, medida automática e periodicamente por HPLC. O progresso dessas partidas comparativas é mostrado nas Figuras 2 e 3, que fornecem as concentrações de etanol, bactérias e ácido acético no meio de cultura ao longo de um período de dois dias. Essas informações são fornecidas no caso da partida com base em tempo convencional (Figura 2 - “Controle com Base em Tempo”) e no caso de partida automatizada (Figura 3 - “Controle Automatizado”), de acordo com uma modalidade representativa da invenção.

[56] Conforme é evidente a partir de uma comparação entre as Figuras 2 e 3, a concentração do produto desejado, etanol, é menor do que 2 gramas/litro (g/l) no Dia 1 da partida com base em tempo, enquanto essa concentração já é de cerca de 8 g/l nesse ponto na partida automatizada. Além disso, conforme ilustrado na Figura 4, é evidente que a partida automatizada leva a um aumento na taxa de fluxo de substrato que contém CO que é muito mais rápida, em comparação à partida com base em tempo. Isso se deve ao abastecimento contínuo da quantidade necessárias de CO para a cultura bacteriana para produção de etanol, sem sobreabastecimento que é prejudicial ao crescimento bacteriano. No caso do perfil com base em tempo, a taxa de fluxo do substrato que contém CO foi caracteristicamente conservadora, a fim

de garantir que o sobreabastecimento de CO seja evitado. Entretanto, como resultado, o subabastecimento de CO é inevitável, e o ácido acético é o produto principal, em vez do etanol. A Figura 5 compara as concentrações de bactérias ao longo do tempo, para esses processos de partida, com o uso dessas duas metodologias de controle. Conforme é evidente, mesmo com a taxa de fluxo de CO mais alta no caso da partida automatizada, o crescimento microbiano não é inibido e, de fato, é aumentado.

[57] Com base nesses resultados, as metodologias de controle, conforme descritas no presente documento, podem fornecer benefícios de processo significativos, particularmente em temos de redução do tempo necessário para alcançar um dado objetivo de processo, tal como uma concentração de ácido acético ou concentração de bactérias desejada. O objetivo pode estar associado à conclusão de um período de partida inicial, tal como um período de operação em batelada, caso no qual a transição para a operação contínua pode ser atingida de modo mais rápido e eficiente. Isso leva a importantes benefícios comerciais, que incluem um consumo reduzido de materiais e custos operacionais totais reduzidos. No caso de um processo que opera com dois reatores equipados com um sistema de reciclagem de célula, pode ser possível amostrar diretamente o permeado livre de células a partir dos reatores e alimentar um HPLC automatizado com essas amostras sem qualquer tratamento adicional, isto é, sem filtragem ou centrifugação de amostra. Em contrapartida, métodos de preparação de amostra convencionais, antes da injeção em um HPLC, exigem a adição de ácidos ou bases específicas, seguido por centrifugação ou filtragem. Isso envolve pipetagem manual, o que adiciona complexidade e resulta em maior erro nos resultados.

## **Exemplo 2**

### *Controle De Partida Automatizada De Fluxo De Nh<sub>4</sub>oh Com Base Em Concentrações Medidas*

[58] Um processo biológico para a conversão de CO em etanol foi

iniciado inoculando-se um biorreator com meio de cultura que contém *C. ljundahln*. O pH de meio de cultura começou a cair à medida em que ácido acético foi produzido. As alimentações de substrato que contém CO e hidróxido de amônio para o biorreator foram iniciadas quando o pH do meio de cultura atingiu 5,0. Com base na concentração de bactérias medida no biorreator, uma concentração-alvo de acetato (ácido acético) e uma taxa de fluxo de diluente foram determinados de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Concentração-alvo de acetato} = A_1 \bullet \text{BIOCON}^{mv} + B_1$$

$$\text{Taxa de fluxo de diluente} = C_1^{(\text{BIOCON}^{mv})}$$

[59] Em que  $A_1$ ,  $B_1$  e  $C_1$  foram determinados empiricamente a partir de informações obtidas em processos anteriores. Com base na concentração de ácido acético medida com o uso do HPLC em linha, a taxa de fluxo de hidróxido de amônio foi ajustada automaticamente, isto é, aumentada a fim de aumentar a produção de ácido acético pelas bactérias ou diminuída a fim de diminuir a produção de ácido acético. O fluxo do substrato que contém CO gasoso foi aumentado ou diminuído automaticamente a fim de manter o pH do meio de cultura em um pH-alvo = 5,0. As concentrações de etanol, bactérias e ácido acético ao longo do tempo, além da taxa de fluxo do diluente, são mostrados na Figura 6.

### Exemplo 3

#### Partida Automatizada Com Base Em Ph Medido E Fluxo De Substrato Que Contém Co Somente

[60] Com base em dados de partida anteriores para processos biológicos, conforme descrito no Exemplo 1, em que CO foi convertido em etanol alimentando-se um meio de cultura que contém *C. ljundahlii* com o mesmo, as relações foram estabelecidas entre uma dada concentração bacteriana no reator, uma taxa de fluxo do substrato que contém CO correspondente de uma dada composição exigida para render uma produtividade-alvo de ácido acético e uma taxa de fluxo de hidróxido de

amônio exigida necessária para manter o pH de meio de cultura em um dado alvo. Essas relações foram da seguinte forma:

$$W \bullet \text{BIOPROD} + X \bullet \text{METPROD} = \text{NEUTFLO} = Y \bullet \text{COFLO} + Z$$

em que BIOPROD, METPROD, NEUTFLO e COFLO representaram, respectivamente, a produtividade de bactérias (biomassa), a produtividade de ácido acético (acetato), a taxa de fluxo de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para o biorreator e a taxa de fluxo de substrato que contém CO para o biorreator. Os fatores W, X, Y e Z foram determinados empiricamente (com o uso de regressão linear) a partir de informações obtidas em processos anteriores, nos quais medições de produtividade de bactérias se basearam em concentrações medidas em intervalos de tempo sucessivos. Isto é, a produtividade bacteriana medida foi calculada como concentração de bactérias no Tempo 2 - concentração de bactérias no Tempo 1) / (Tempo 2 - Tempo 1). Nesses processos anteriores, a concentração de bactérias foi medida com o uso de um espectrofotômetro ou leitor de placa ou sonda de biomassa, e a produtividade de ácido acético medida foi calculada como concentração de ácido acético no Tempo 2 - concentração de ácido acético no Tempo 1) / (Tempo 2 - Tempo 1). As concentrações de ácido acético e etanol foram medidas por HPLC. De acordo com os dados gerados a partir desses processos anteriores, os fatores a seguir foram determinados: W=1,2, X=1,5, Y=1,46 e Z=3,21.

[61] Assim, a relação usada para a partida automatizada foi  $\text{NEUTFLO} = 1,46 \bullet \text{COFLO} + 3,21$ . O pH do meio de cultura foi mantido a 5,0 ajustando-se o fluxo do substrato que contém CO automaticamente com o uso de um controlador PID. As relações acima foram usadas para definir a taxa de fluxo de hidróxido de amônio, com base na taxa de fluxo medida do substrato que contém CO.

[62] As concentrações de etanol, bactérias e ácido acético ao longo do tempo, além das taxas de fluxo do hidróxido de amônio e do substrato que contém CO, são mostradas na Figura 7. Vantajosamente, o crescimento

bacteriano ao longo do primeiro dia foi alto, a 2,9 gramas/(litro · dia), e a produtividade de ácido acético foi baixa, a 2,8 gramas/(litro · dia). A produtividade e a concentração de etanol foram maximizadas. Essas observações foram consistentes com uma partida bem-sucedida do processo de conversão biológica de CO, que é crítico antes do estabelecimento de um processo contínuo. Essencialmente, as concentrações medidas de bactérias e ácido acético no biorreator não foram usadas diretamente nessa metodologia de controle. Em vez disso, essas concentrações foram monitoradas, somente na medida de confirmar o progresso da operação, mas sem retroalimentação na automação.

[63] De modo geral, os aspectos da invenção são direcionados às metodologias de controle para processos de fermentação biológica nos quais um substrato que contém CO é usado para produzir produtos de valor mais alto, tais como etanol. As metodologias de controle podem vantajosamente encurtar a iniciação ou a partida desses processos, de modo que a produção contínua seja atingida (por exemplo, mediante o alcance de um dado alvo de iniciação de processo) em um período de tempo mais curto após a inoculação do biorreator, em comparação aos períodos de tempo exigidos com o uso de metodologias de controle convencionais (por exemplo, um perfil com base em tempo para o fluxo de substrato que contém CO). Essas metodologias de controle podem, alternativa ou adicionalmente, aprimorar as produtividades do produto final desejado e/ou aprimorar a taxa de crescimento das bactérias, durante a iniciação ou partida. As pessoas versadas na técnica, com o conhecimento adquirido a partir da presente revelação, reconhecerão que várias alterações podem ser feitas nas metodologias de controle, sistemas e produtos de programa de computador, sem se desviar do escopo da presente invenção.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo de fermentação, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) alimentar com um substrato gasoso compreendendo CO e um agente neutralizante básico um biorreator que compreende uma cultura de bactérias carboxidotróficas em um meio líquido nutritivo;

(b) fermentar a cultura em que pelo menos uma porção de CO na corrente de substrato gasoso é convertida a um produto e um metabólito ácido;

(c) otimizar a produção do dito produto por:

(1) medir uma concentração de metabólito ácido, uma concentração de bactérias carboxidotróficas, e uma produtividade das bactérias carboxidotróficas;

(2) determinar a concentração de ponto de ajuste do metabólito ácido de acordo com uma dentre as fórmulas (1) e (2):

$$A_1 \bullet \text{BIOCON}mv + B_1 \quad (1)$$

$$A_2 \bullet \text{BIOPROD}mv + B_2 \quad (2)$$

em que  $\text{BIOCON}mv$  representa uma concentração medida de bactérias carboxidotróficas no meio de cultura,  $\text{BIOPROD}mv$  representa uma produtividade medida de bactérias carboxidotróficas e  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  e  $B_2$  são constantes;

(3) aumentar a taxa de fluxo de agente neutralizante básico se a concentração de metabólito ácido é menor que a concentração de ponto de ajuste do metabólito ácido; e

(4) diminuir a taxa de fluxo de agente neutralizante básico se a concentração de metabólito ácido é maior que a concentração de ponto de ajuste do metabólito ácido.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as constantes  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  e  $B_2$  são determinadas

empiricamente a partir de dados experimentais.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que comprehende adicionalmente fluir um diluente em um reator em uma taxa de fluxo de diluente que é determinada de acordo com uma dentre as fórmulas (3) e (4):

$$C_1^{(\text{BIOCON}mv)} \quad (3)$$

$$C_2^{(\text{BIOPROD}mv)} \quad (4)$$

em que  $\text{BIOCON}mv$  representa a concentração de bactérias carboxidotróficas no meio de cultura,  $\text{BIOPROD}mv$  representa a produtividade das bactérias carboxidotróficas e  $C_1$  e  $C_2$  são constantes determinadas empiricamente a partir de dados experimentais.

4. Processo de fermentação, caracterizado pelo fato de que comprehende:

(a) alimentar com um substrato compreendendo CO e um agente neutralizante básico um biorreator compreendendo meio cultura de bactérias carboxidotróficas em um meio líquido nutritivo;

(b) fermentar a cultura em que pelo menos uma porção de CO na corrente gasosa de substrato é convertida a um produto e um metabólito ácido;

(c) otimizar a produção do dito produto ajustando a taxa de fluxo de agente neutralizante básico no reator, o agente neutralizante básico determinado pela fórmula:

$$Y \bullet \text{COFLO}mv + Z \quad (1)$$

em que  $\text{COFLO}mv$  representa a taxa de fluxo medida de substrato e  $Y$  e  $Z$  são constantes determinadas empiricamente a partir de dados experimentais.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o substrato que contém CO é obtido a partir de um processo industrial selecionado a partir do grupo que consiste em um processo de

fabricação de aço, um processo de fabricação de produto não ferroso, um processo de refinamento de petróleo, um processo de produção de biocombustível, um processo de gaseificação de carvão, um processo de produção de energia elétrica, um processo de produção de negro de fumo, um processo de produção de amônia, um processo de produção de metanol, gaseificação de matéria orgânica, reforma a vapor de hidrocarbonetos e um processo de fabricação de coque.

6. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o metabólito ácido é ácido acético ou acetato.

7. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o agente neutralizante básico é uma solução de hidróxido de amônio.

8. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o produto final é etanol.

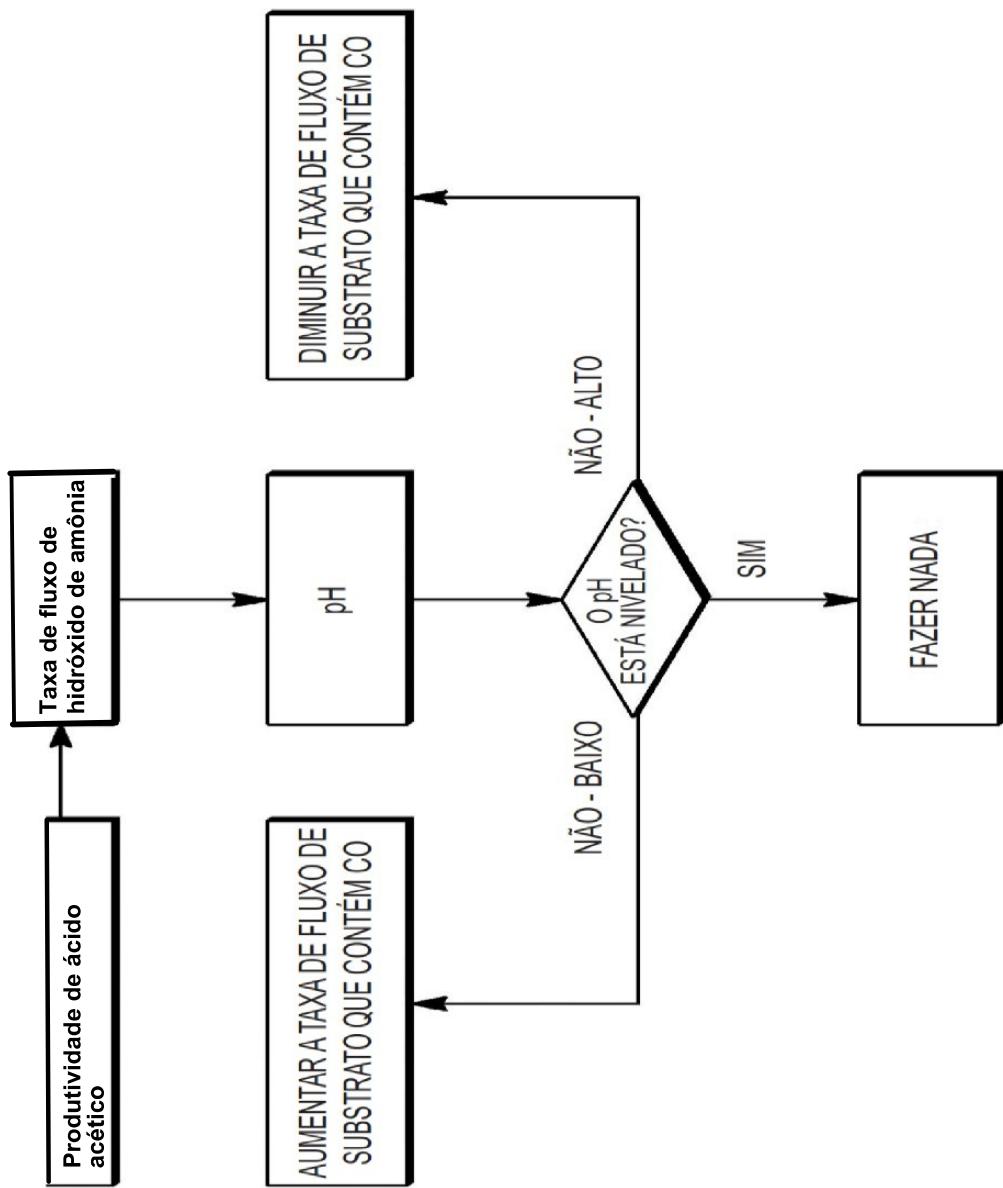
9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato que contém CO é obtido a partir de um processo industrial selecionado a partir do grupo que consiste em um processo de fabricação de aço, um processo de fabricação de produto não ferroso, um processo de refinamento de petróleo, um processo de produção de biocombustível, um processo de gaseificação de carvão, um processo de produção de energia elétrica, um processo de produção de negro de fumo, um processo de produção de amônia, um processo de produção de metanol, gaseificação de matéria orgânica, reforma a vapor de hidrocarbonetos e um processo de fabricação de coque.

10. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o metabólito ácido é ácido acético ou acetato.

11. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente neutralizante básico é uma solução de hidróxido de amônio.

12. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o produto final é etanol.

## Metodologia de Controle



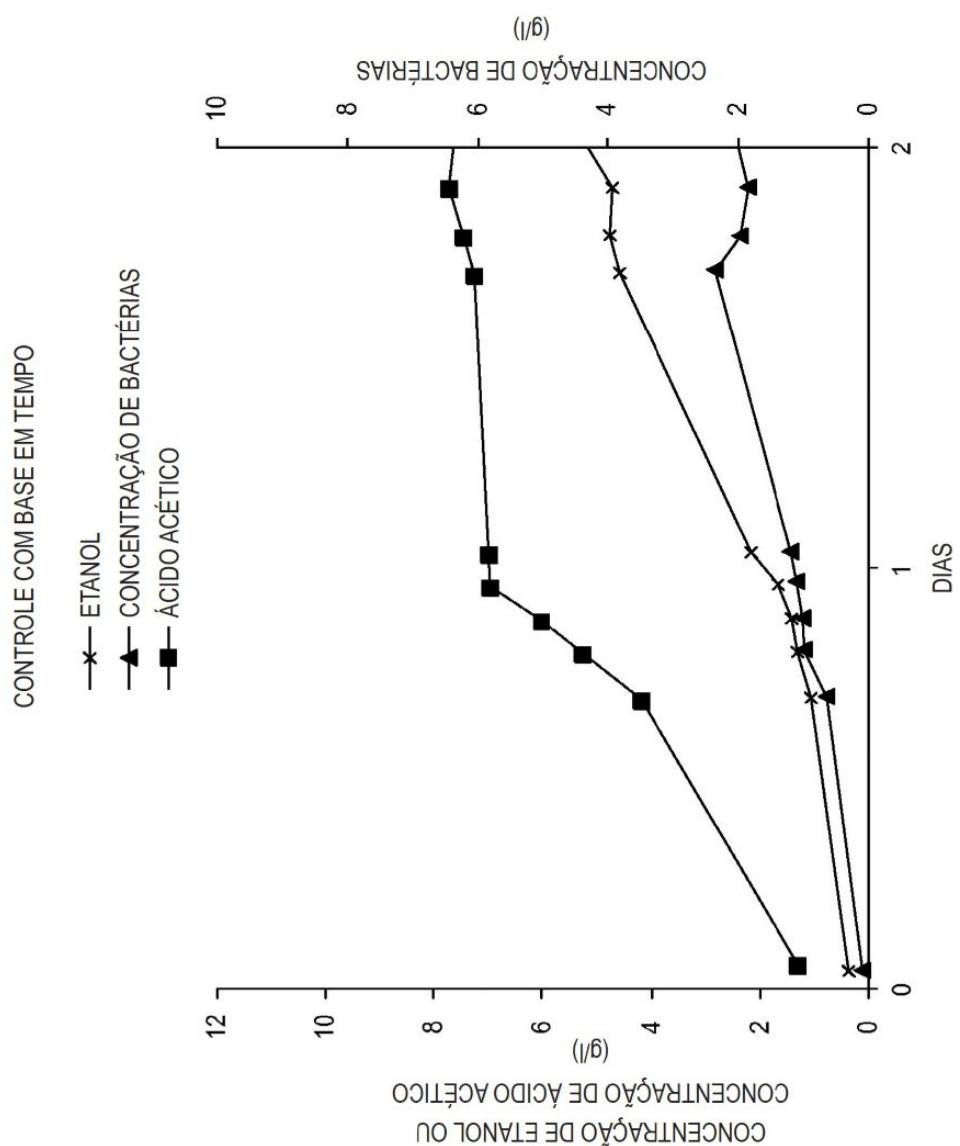
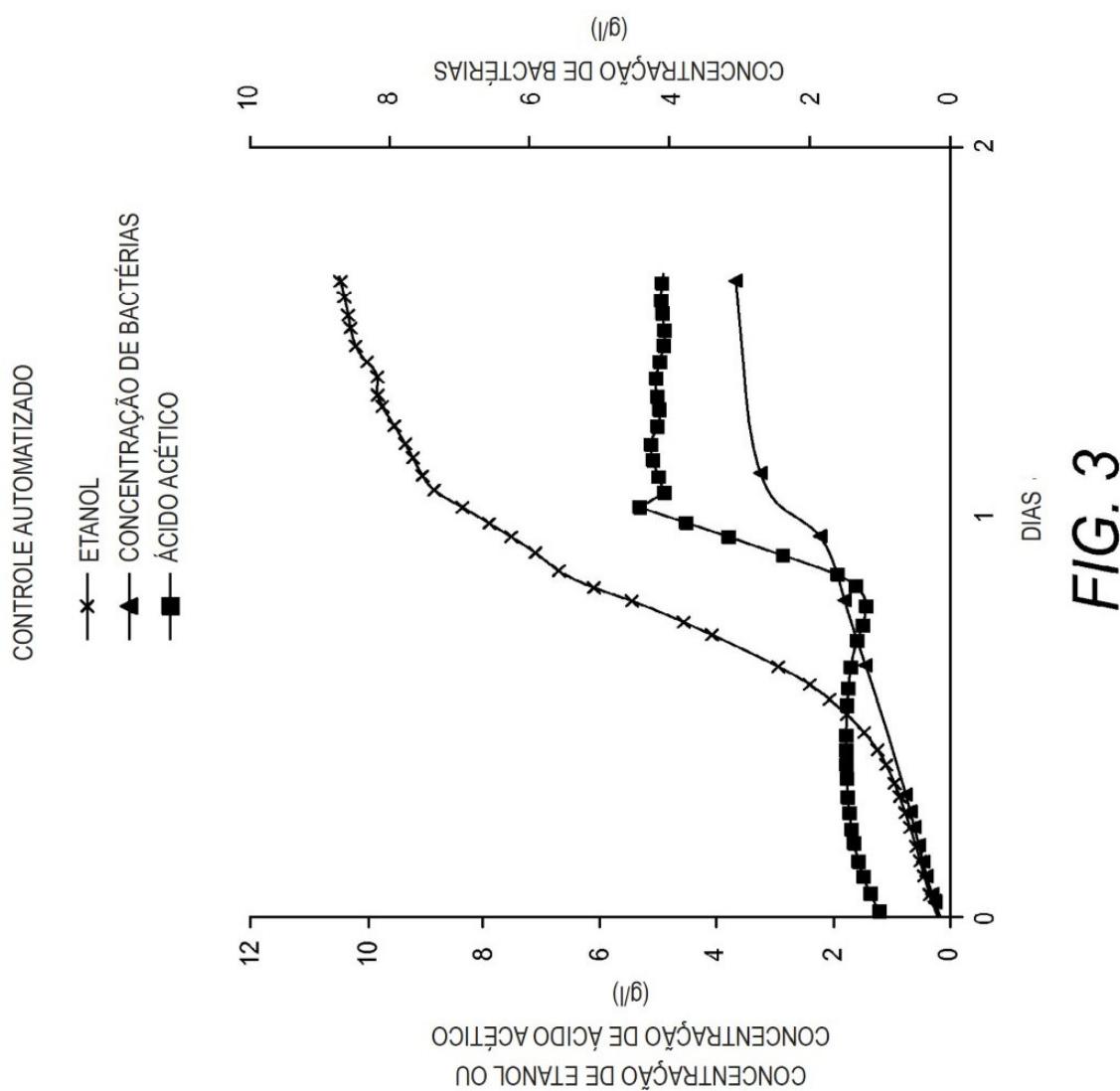
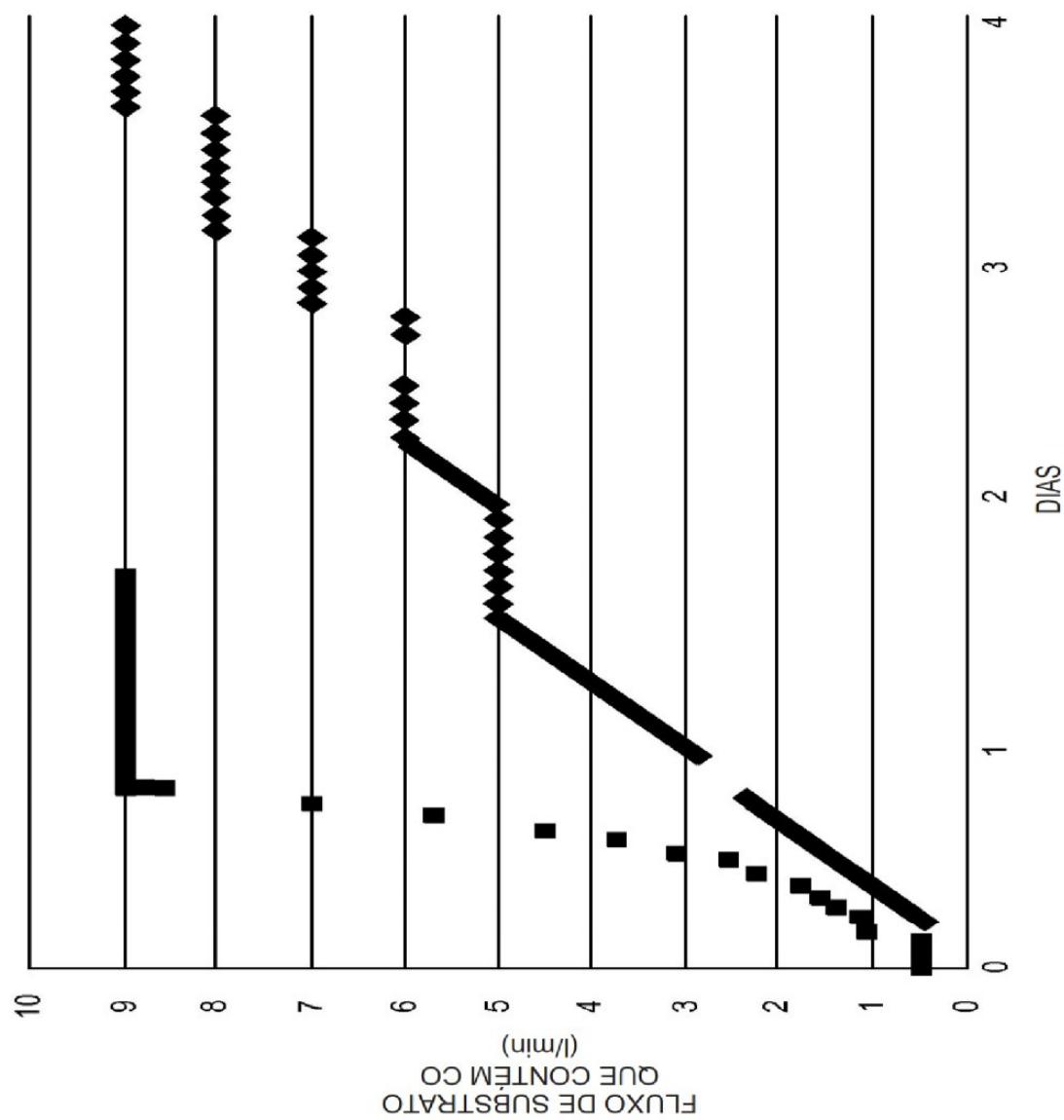
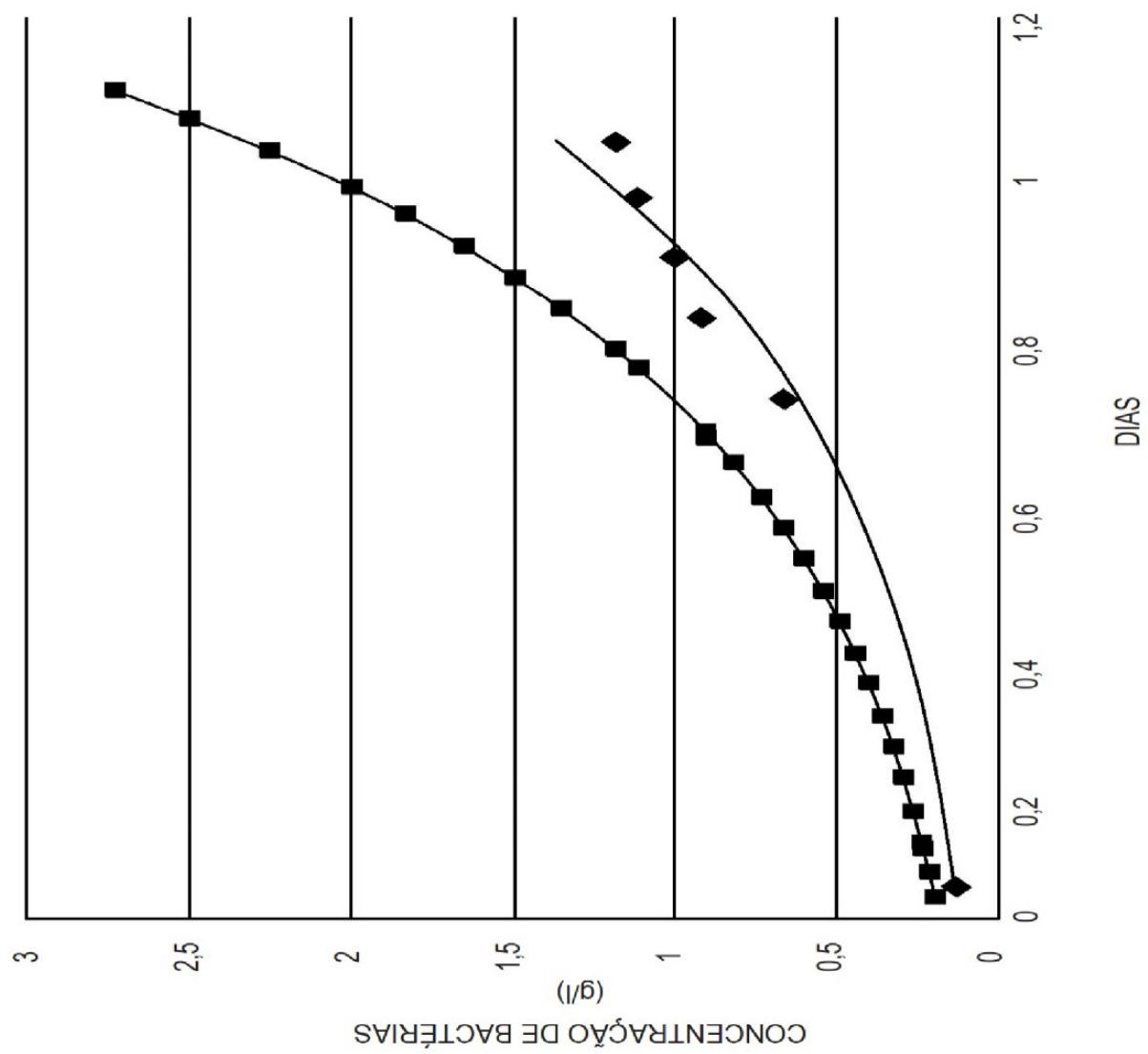


FIG. 2







CONTROLE AUTOMATIZADO - COM BASE EM CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIAS E CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO MEDIDAS

◆ ETANOL      \* TAXA DE FLUXO DE DILUENTE  
 ■ CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIAS      ■ ÁCIDO ACÉTICO

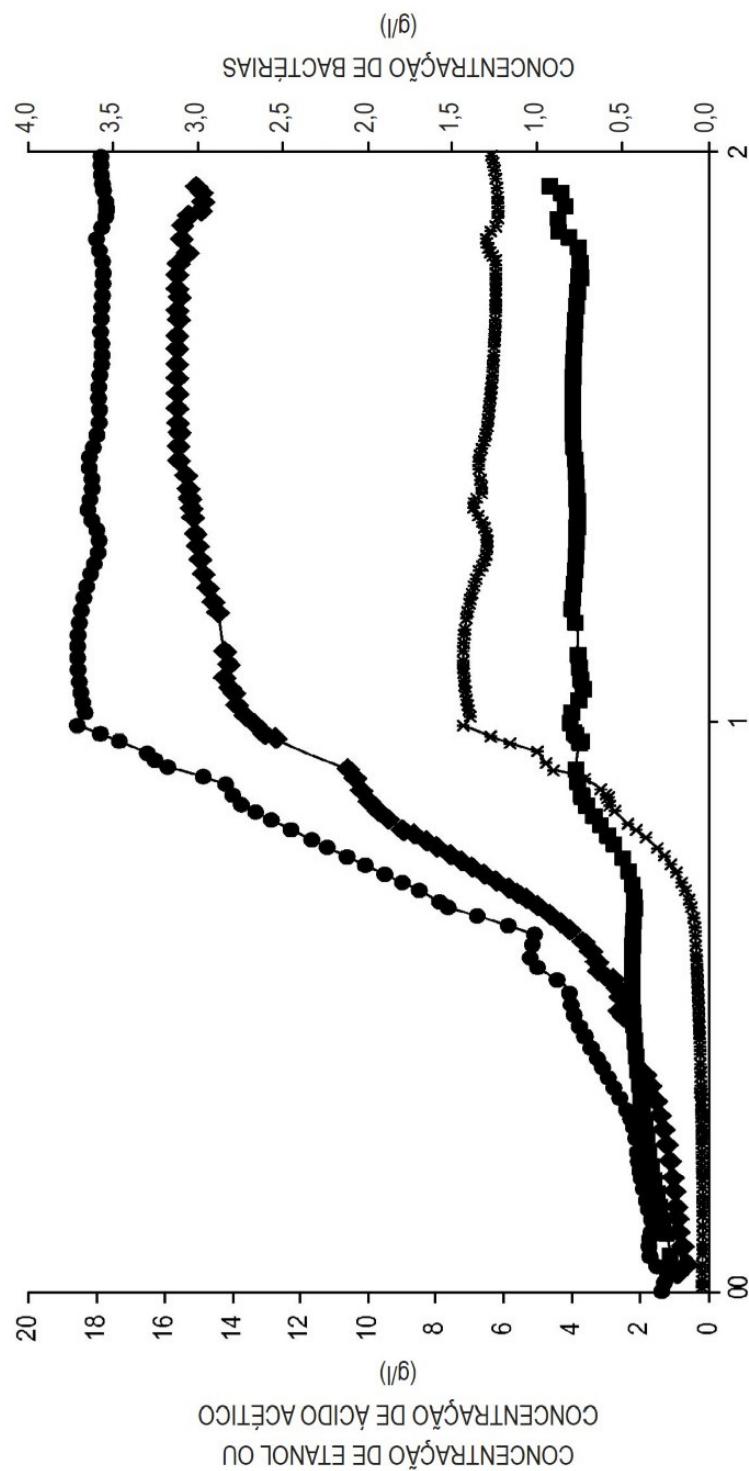


FIG. 6

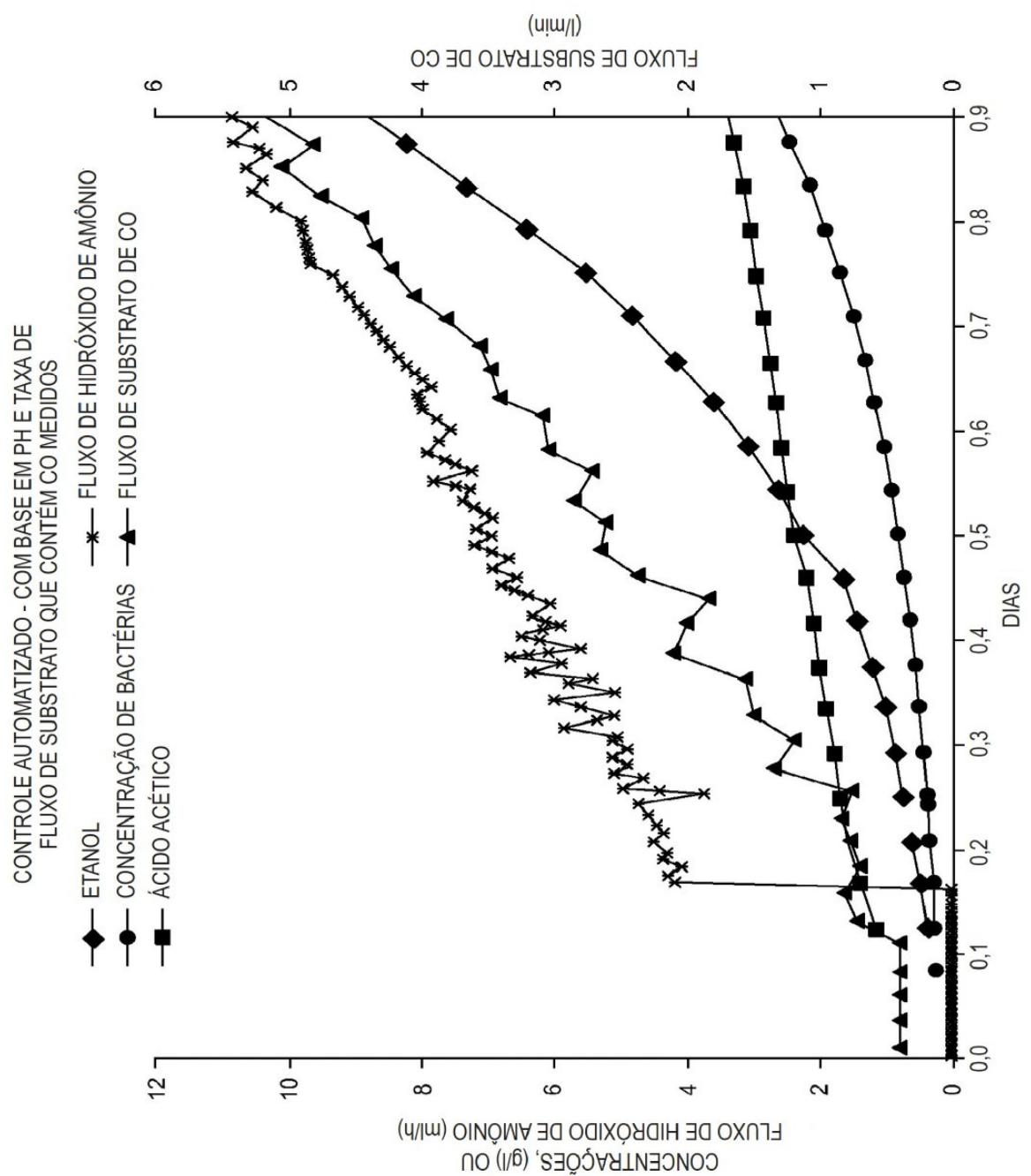


FIG. 7