



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0814681-0 B1**



\* B R F I D 8 1 4 6 8 1 B 1 \*

**(22) Data do Depósito: 04/07/2008**

**(45) Data de Concessão: 26/12/2018**

**(54) Título:** BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁLCOOL ISOPROPÍLICO RECOMBINANTE DO GÊNERO ESCHERICHIA E MÉTODO DE PRODUZIR ÁLCOOL ISOPROPÍLICO USANDO A MESMA

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/09; C12M 1/02; C12M 1/04; C12N 1/21; C12P 7/04.

**(30) Prioridade Unionista:** 11/07/2007 JP 2007-181571.

**(73) Titular(es):** MITSUI CHEMICALS, INC..

**(72) Inventor(es):** NOZOMI TAKEBAYASHI; MITSUFUMI WADA; DAISUKE MOCHIZUKI; FUMINOBU YOSHIMI; SEIICHI WATANABE; HITOSHI TAKAHASHI; TAKASHI MORISHIGE.

**(86) Pedido PCT:** PCT JP2008062205 de 04/07/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/008377 de 15/01/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 11/01/2010

**(57) Resumo:** BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁLCOOL ISOPROPÍLICO E MÉTODO DE PRODUZIR ÁLCOOL ISOPROPÍLICO USANDO A MESMA A invenção fornece: uma bactéria produtora de álcool isopropílico que tem uma atividade de acetoacetato 5 descarboxilase, uma atividade de álcool isopropílico desidrogenase, uma atividade de CoA transferase e uma atividade de tiolase tendo sido dada ao mesmo e é capaz de produzir o álcool isopropílico de um material derivado de planta; meio de um método de produção de álcool que o álcool isopropílico é isopropílico por produzido de um material derivado de planta usando esta bactéria produtora de álcool isopropílico; e um aparelho para o mesmo.

**BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁLCOOL ISOPROPÍLICO RECOMBINANTE DO  
GÊNERO ESCHERICHIA E MÉTODO DE PRODUZIR ÁLCOOL ISOPROPÍLICO  
USANDO A MESMA**

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção se relaciona a uma bactéria produtora de álcool isopropílico e um método de produção de álcool isopropílico usando a mesma.

TÉCNICA DE FUNDAMENTO

10 O álcool isopropílico produzido de um material derivado de planta pode ser convertido ao propileno através da desidratação, de modo que é promissor como um material bruto de carbono neutro para propileno. Já que todos os países desenvolvidos são atualmente exigidos pelo protocolo de Kyoto para reduzir suas quantidades de emissões de  
15 dióxido de carbono por 5% baseado naqueles em 1990, o propileno de carbono neutro é extremamente importante devido a sua versatilidade em virtude do ambiente global.

As bactérias que utilizam os materiais derivados de planta para produzir álcool isopropílico (por exemplo, veja  
20 Publicação do Pedido de Patente Chinês N°. CN 1043956 A e o Pedido de Patente Japonês aberto (JP-A) N°. 61-67493) já existem na natureza. Entretanto, são conhecidos por ter baixa produtividade de álcool isopropílico e para gerar álcoois, tais como butanol e etanol como subprodutos. Já  
25 que as temperaturas azeotrópicas de butanol e etanol são próximas da água, é difícil separar o álcool isopropílico do butanol e/ou etanol por métodos fáceis, tais como destilação simples. Portanto, pensa-se que a coleta de álcool isopropílico do caldo da fermentação no qual butanol  
30 e/ou etanol coexistem com álcool isopropílico requer

destilação usando instalações incidentais, tais como uma coluna retificante, de modo que o processo de purificação é esperado ser complicado.

A CN 1043956 A descreve um método para a produção de butanol, etanol, acetona e isopropanol em que *Clostridium butanoiaceticus* G.V é cultivado em um meio de cultura, que foi suplementado com milho e melaço, e submetendo a assim obtida cultura à destilação, redestilação e destilação fracionária. Entretanto, nos exemplos descritos na literatura, os rendimentos de butanol, etanol, acetona e isopropanol no meio de cultura não são descritos em todo, e a quantidade de cada um destes componentes deveria ter sido finalmente obtida pela destilação fracionária não é descrita. Assim, a produção real de isopropanol, butanol, etanol e acetona não podem ser vistas da literatura.

A JP-A 61-67493 descreve que o meio de cultura obtido cultivando uma bactéria do gênero *Clostridium* contém butanol, a quantidade da qual é maior do que a de álcool isopropílico, e pequenas quantidades de etanol e acetona. Esta literatura descreve que um método comum de separação e purificação para obter o álcool isopropílico do meio de cultura obtido é um método no qual o meio de cultura é filtrado, destilado diversas vezes, concentrado e submetido à separação ao salgando para obter um teor de óleo, que é submetido subsequentemente à destilação fracionária por um aparelho tendo uma coluna de fracionamento.

Por outro lado, é conhecido que a acetona pode ser produzida introduzindo, a *E. coli*, genes de acetoacetato descarboxilase, CoA transferase e tiolase que são derivados de uma bactéria do gênero *Clostridium* (*Clostridium*

*acetobutylicum*) e cultivo de *E. coli* recombinante obtido (por exemplo, Lourdes L Bermejo e col.: Applied and Environmental Microbiology, Vol.64, N°.3, p.1079-1085, (1998)).

5 DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

PROBLEMAS A SEREM RESOLVIDOS PELA INVENÇÃO

Como descrito acima, as bactérias produtoras de álcool isopropílico existentes têm baixa produtividade de álcool isopropílico e, além disso, produzem uma grande quantidade  
10 de álcoois, tais como butanol e etanol como subprodutos no meio de cultura, de modo que a coleta de álcool isopropílico do meio de cultura seja difícil, que tem sido problemático na produção industrial de álcool isopropílico.

A presente invenção foi feita sob as circunstâncias  
15 descritas acima, e aponta fornecer: uma bactéria que gera menos álcoois de subproduto e é capaz de produzir o álcool isopropílico que é mais altamente purificado, sem exigir uma etapa especial para separar os álcoois de subproduto; um método para produzir o álcool isopropílico usando esta  
20 bactéria; e um aparelho para produzir o álcool isopropílico.

MEIOS PARA RESOLVER OS PROBLEMAS

O primeiro aspecto da presente invenção é uma bactéria produtora de álcool isopropílico a qual uma atividade de acetoacetato descarboxilase, uma atividade de álcool  
25 isopropílico desidrogenase, uma atividade de CoA transferase e uma atividade de tiolase foram dadas, e a qual pode produzir o álcool isopropílico de um material derivado de planta.

Em modalidades preferíveis do primeiro aspecto da  
30 presente invenção, cada uma das atividade de acetoacetato

descarboxilase, atividade de álcool isopropílico desidrogenase, atividade de CoA transferase e atividade de tiolase são respectivamente obtidas pela introdução de um gene codificando uma enzima derivada de pelo menos uma  
5 selecionada do grupo consistindo de uma bactéria do gênero *Clostridium*, uma bactéria do gênero *Bacillus* e uma bactéria do gênero *Escherichia*.

O segundo aspecto da presente invenção é um método para produzir o álcool isopropílico, o método compreendendo  
10 produzir o álcool isopropílico de um material derivado de planta usando a bactéria produtora de álcool isopropílico.

As modalidades preferíveis do segundo aspecto da presente invenção compreendem: cultivar a bactéria produtora de álcool isopropílico ao fornecer um gás à  
15 mistura compreendendo a bactéria produtora de álcool isopropílico e o material derivado de planta; e coletar o álcool isopropílico produzido pela cultura.

O terceiro aspecto da presente invenção é um aparelho produtor de álcool isopropílico compreendendo: uma unidade  
20 de cultura compreendendo uma mistura compreendendo a bactéria produtora de álcool isopropílico e o material derivado de planta; uma unidade de fornecimento de gás que é conectada à unidade de cultura e abra em uma posição na mistura contida na unidade de cultura, para fornecer o gás  
25 à mistura; uma unidade de captura compreendendo o líquido de captura que captura o álcool isopropílico; e uma unidade de conexão que conecte a unidade de cultura com a unidade de captura e permite o álcool isopropílico evaporado na unidade de cultura para mover para a unidade de captura.

30 BREVE DESCRIÇÃO DO DESENHO

A Fig. 1 é um diagrama conceitual mostrando uma modalidade de exemplo do aparelho produtor de álcool isopropílico da invenção.

#### MELHOR MODO PARA REALIZAR A INVENÇÃO

5 A bactéria produtora de álcool isopropílico da invenção, a qual uma atividade de acetoacetato descarboxilase, uma atividade de álcool isopropílico desidrogenase, uma atividade de CoA transferase e uma atividade de tiolase foram dadas, é capaz de produzir o  
10 álcool isopropílico de um material derivado de planta.

O método da invenção para produzir o álcool isopropílico inclui a produção de álcool isopropílico de um material derivado de planta usando a bactéria produtora de álcool isopropílico.

15 O aparelho produtor de álcool isopropílico da invenção tem pelo menos: uma unidade de cultura contendo pelo menos uma mistura contendo pelo menos a bactéria produtora de álcool isopropílico e o material derivado de planta; uma unidade de fornecimento de gás que é conectada à unidade de  
20 cultura e abre em uma posição na mistura contida na unidade de cultura, para fornecer o gás à mistura; uma unidade de captura contendo pelo menos o líquido de captura que captura o álcool isopropílico; e uma unidade de conexão que conecta a unidade de cultura com a unidade de captura e  
25 permita o álcool isopropílico evaporado na unidade de cultura para mover para a unidade de captura.

Quando uma faixa de valores numéricos é mostrada no presente relatório descritivo, a menos que especificamente indicado, o primeiro e segundo valores da faixa representam  
30 valores mínimos e máximos, respectivamente.

Além disso, no presente relatório descritivo, uma "etapa" significa um estágio no qual o efeito esperado desta etapa é alcançado, e o conceito da etapa neste relatório descritivo também inclui os casos onde a etapa  
5 não pode ser claramente distinguida das outras, tal como os casos onde uma pluralidade de estágios prossegue simultaneamente.

No presente relatório descritivo, "vvm" indica a razão do volume de um gás a ser fornecido, por minuto, relativo a  
10 um volume de um líquido; por exemplo, se 2 vvm de um gás são fornecidos a 10 litros de um meio de cultura, 20 L/minuto do gás devem ser fornecidos.

A invenção será descrita agora.

*Bactéria produtora de álcool isopropílico*

15 A bactéria produtora de álcool isopropílico da invenção é uma bactéria produtora de álcool isopropílico a qual uma atividade de acetoacetato descarboxilase, uma atividade de álcool isopropílico desidrogenase, uma atividade de CoA transferase e uma atividade de tiolase  
20 foram dadas e é capaz de produzir álcool isopropílico de um material derivado de planta.

Todos os quatro tipos de enzimas produtoras de álcool isopropílico, isto é, acetoacetato descarboxilase, álcool isopropílico desidrogenase, CoA transferase e tiolase foram  
25 dados à bactéria produtora de álcool isopropílico da invenção. Os presentes inventores descobriram que a produção de álcool isopropílico usando esta bactéria produtora de álcool isopropílico não gera álcoois, tais como butanol e etanol como subprodutos. Desse modo, a  
30 coleta de álcool isopropílico pode ser feita notavelmente

simples comparado aos usos de um microrganismo produtor de álcool isopropílico convencional.

Na invenção, o material derivado de planta não é particularmente restrito contanto que seja uma fonte de carbono obtida de uma planta e capaz de ser metabolizado por uma bactéria e convertido ao álcool isopropílico. Na invenção, o material derivado de planta pode se referir a um órgão, tal como uma raiz, caule, pecíolo, ramo, folha, flor ou semente, um corpo de planta contendo estes, ou um produto de degradação de cada um destes órgãos de planta, e, além disso, entre as fontes de carbono obtidas dos corpos de planta ou órgãos de planta ou produtos de degradação dos mesmos, aqueles capazes de serem usados por microrganismos como fontes de carbono para cultivar são também incluídos nos materiais derivados de planta.

Os exemplos das fontes de carbono incluídas nos materiais derivados de planta incluem geralmente sacarídeos, tais como amido, glicose, frutose, sacarose, xilose e arabinose; produtos de degradação de planta contendo grandes quantidades destes componentes; e hidrolisados de celulose. A glicerina e ácidos gordos também correspondem às fontes de carbono de acordo com a invenção.

Os exemplos preferíveis do material derivado de planta usados na invenção incluem colheitas, tais como cereais, milho, arroz, trigo, soja, cana de açúcar, beterraba e algodão. Os exemplos das formas de seu uso como materiais brutos incluem, mas não são limitados a, produtos crus, sucos e produtos moídos. A forma dos materiais derivados de planta pode também ser unicamente a fonte de carbono descrita acima.

A bactéria produtora de álcool isopropílico da invenção pode ser qualquer contanto que tenha uma habilidade de produzir álcool isopropílico destes materiais derivados de planta, e os exemplos dos mesmos incluem as  
5 bactérias que utilizam materiais derivados de planta quando cultivadas e secretam álcool isopropílico no meio de cultura após determinados períodos de tempo.

Quatro tipos de atividades produtoras de álcool isopropílico, isto é, uma atividade de acetoacetato  
10 descarboxilase, uma atividade de álcool isopropílico desidrogenase, uma atividade de CoA transferase e uma atividade de tiolase são dadas à bactéria produtora de álcool isopropílico da invenção.

Na invenção, "dando" uma atividade, além de introduzir  
15 de um gene codificando uma enzima de fora de uma bactéria hospedeira no interior da mesma, também inclui melhora da atividade de um promotor um gene de enzima retido no genoma de uma bactéria hospedeira, e substituindo um promotor com outro promotor para causar a superexpressão de um gene de  
20 enzima.

A acetoacetato descarboxilase referida na invenção é o nome coletivo de enzimas que são classificadas como o código de enzima 4.1.1.4 de acordo com o relatório pela  
25 Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica (I.U.B.) e catalisam reações produzindo acetona do ácido acetilacético.

Os exemplos de tais enzimas incluem aqueles derivados das bactérias do gênero *Clostridium*, tal como *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*; e aqueles  
30 derivados das bactérias do gênero *Bacillus*, tal como

*Bacillus polymyxa*.

Como o gene de acetoacetato descarboxilase que é introduzido na bactéria hospedeira da invenção, um DNA tendo uma sequência de base do gene codificando  
5 acetoacetato descarboxilase obtido de cada um dos organismos acima mencionados, ou uma sequência de DNA sintética sintetizada baseada em uma sequência de base conhecida do gene pode ser usada.

Os exemplos preferíveis do gene incluem aqueles  
10 derivados das bactérias do gênero *Clostridium* ou bactérias do gênero *Bacillus*, e os exemplos dos mesmos incluem DNAs tendo uma sequência de base do gene derivado do *Clostridium acetobutylicum* ou *Bacillus polymyxa*. Um DNA tendo uma sequência de base do gene derivado de *Clostridium*  
15 *acetobutylicum* é especialmente preferível.

A álcool isopropílico desidrogenase referida na invenção é o nome coletivo de enzimas que são classificadas como o código de enzima 1.1.1.80 de acordo com o relatório pela Comissão de Enzima da União Internacional de  
20 Bioquímica (I.U.B.) e catalisam reações produzindo álcool isopropílico da acetona.

Os exemplos de tais enzimas incluem aqueles derivados das bactérias do gênero *Clostridium*, tal como *Clostridium beijerinckii*.

25 Como o gene de álcool isopropílico desidrogenase que é introduzido na bactéria hospedeira empregada na invenção, um DNA tendo uma sequência de base do gene codificando álcool isopropílico desidrogenase obtido de cada um dos organismos mencionados acima ou uma sequência de DNA  
30 sintética sintetizada baseada em uma sequência de base

conhecida do gene pode ser usado. Os exemplos preferíveis do gene incluem aqueles derivados das bactérias do gênero *Clostridium*, e exemplos dos mesmos incluem DNAs tendo uma sequência de base do gene derivado de *Clostridium*  
5 *beijerinckii*.

A CoA transferase referida na invenção é o nome coletivo de enzimas que são classificadas como o código de enzima 2.8.3.8 de acordo com o relatório pela Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica (I.U.B.) e catalisam reações produzindo o ácido acetilacético da  
10 acetoacetil-CoA.

Os exemplos de tais enzimas incluem aqueles derivados das bactérias do gênero *Clostridium*, tal como *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*, bactérias do  
15 gênero *Roseburia*, tal como *Roseburia intestinalis*, bactérias do gênero *Faecalibacterium*, tal como *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérias do gênero *Coprococcus*, tripanossomas, tais como *Trypanosoma brucei* e as bactérias do gênero *Escherichia*, tais como *Escherichia*  
20 *coli* (*E. coli*).

Como o gene de CoA transferase que é introduzido na bactéria hospedeira da invenção, um DNA tendo uma sequência de base do gene codificando CoA transferase obtido de cada um dos organismos acima mencionados ou uma sequência de DNA  
25 sintética sintetizado baseado em uma sequência de base conhecida do gene pode ser usado. Os exemplos preferíveis do gene incluem DNAs tendo uma sequência de base do gene derivado das bactérias do gênero *Clostridium*, tal como *Clostridium acetobutylicum*, bactérias do gênero *Roseburia*,  
30 tal como *Roseburia intestinalis*, bactérias do gênero

*Faecalibacterium*, tal como *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérias do gênero *Coprococcus*, tripanossomas, tais como *Trypanosoma brucei* e bactérias do gênero *Escherichia*, tais como *Escherichia coli*. Exemplos mais preferíveis dos mesmos  
5 incluem aqueles derivados das bactérias do gênero *Clostridium* e bactérias do gênero *Escherichia*. Um DNA tendo uma sequência de base do gene derivado de *Clostridium acetobutylicum* ou *Escherichia coli* é especialmente preferível.

10 A tiolase referida na invenção é o nome coletivo de enzimas que são classificadas com o código de enzima 2.3.1.9 de acordo com o relatório pela Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica (I.U.B.) e catalisam reações produzindo acetoacetil-CoA da acetil-CoA.

15 Os exemplos de tais enzimas incluem aqueles derivados das bactérias do gênero *Clostridium*, tal como *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*, bactérias do gênero *Escherichia*, tais como *Escherichia coli*, bactérias de *Halobacterium* sp., bactérias do gênero *Zoogloea*, tal  
20 como *Zoogloea ramigera*, bactérias da *Rhizobium* sp., bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, tal como *Bradyrhizobium japonicum*, bactérias do gênero *Caulobacter*, tal como *Caulobacter crescentus*, bactérias do gênero *Streptomyces*, tal como *Streptomyces collinus*, bactérias do gênero  
25 *Enterococcus*, tal como *Enterococcus faecalis*, leveduras do gênero *Candida*, tal como *Candida tropicalis*, o gênero *Helianthus* (Asteraceae), tal como *Helianthus annuus*, o gênero *Gallus* (Phasianidae), tal como *Gallus gallus*, o gênero *Rattus* (Muridae), tal como *Rattus norvegicus*, o  
30 gênero *Sus* (Suidae), tal como *Sus scrofa* e o gênero *Bos*

(bovídeos), tal como *Bos taurus*.

Como o gene de tiolase que é introduzido em uma bactéria hospedeira usada na invenção, um DNA tendo uma sequência de base do gene codificando tiolase obtido de  
5 cada um dos organismos acima mencionados ou uma sequência de DNA sintética sintetizada baseada em uma sequência de base conhecida do gene pode ser usado. Os exemplos preferíveis do gene incluem DNAs tendo uma sequência de base do gene derivado das bactérias do gênero *Clostridium*,  
10 tais como *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*, bactérias do gênero *Escherichia*, tais como *Escherichia coli*, bactérias de *Halobacterium* sp., bactérias do gênero *Zoogloea*, tal como *Zoogloea ramigera*, bactérias de *Rhizobium* sp., bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, tal como  
15 *Bradyrhizobium japonicum*, bactérias do gênero *Caulobacter*, tal como *Caulobacter crescentus*, bactérias do gênero *Streptomyces*, tal como *Streptomyces collinus*, bactérias do gênero *Enterococcus*, tal como *Enterococcus faecalis*, leveduras do gênero *Candida*, tal como *Candida tropicalis*, o  
20 gênero *Helianthus* (Asteraceae), tal como *Helianthus annuus*, o gênero *Gallus* (Phasianidae), tal como *Gallus gallus*, o gênero *Rattus* (Muridae), tal como *Rattus norvegicus*, o gênero *Sus* (Suidae), tal como *Sus scrofa* e o gênero *Bos* (bovídeos), tal como *Bos taurus*. Exemplos mais preferíveis dos mesmos incluem aqueles derivados das bactérias do  
25 gênero *Clostridium* e bactérias do gênero *Escherichia*; e um DNA tendo uma sequência de base do gene derivado de *Clostridium acetobutylicum* ou *Escherichia coli* é especialmente preferível.

30 Entre estes, cada um dos quatro tipos acima de enzimas

é preferivelmente derivado de pelo menos uma espécie selecionada do grupo consistindo de bactérias do gênero *Clostridium*, bactérias do gênero *Bacillus* e bactérias do gênero *Escherichia* em vista da atividade de enzima, e, em particular, mais preferível são os casos onde a acetoacetato descarboxilase e a álcool isopropílico desidrogenase são derivadas de uma bactéria/bactérias do gênero *Clostridium* e a atividade de CoA transferase e a atividade de tiolase são derivadas de uma bactéria/bactérias do gênero *Escherichia*, e os casos onde todos estes quatro tipos de enzimas são derivados de uma bactéria/bactérias do gênero *Clostridium*.

Em particular, cada um dos quatro tipos de enzimas de acordo com a invenção é derivado preferivelmente de qualquer de *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* e *Escherichia coli* em vista da atividade de enzima. Mais preferivelmente, a acetoacetato descarboxilase é a enzima derivada de *Clostridium acetobutylicum*; cada uma de CoA transferase e tiolase é a enzima derivada de *Clostridium acetobutylicum* ou *Escherichia coli*; e a álcool isopropílico desidrogenase é a enzima derivada de *Clostridium beijerinckii*. Especialmente preferivelmente, em vista das atividades de enzima dos quatro tipos descritos acima de enzimas, a atividade de acetoacetato descarboxilase é derivada de *Clostridium acetobutylicum*; a atividade de álcool isopropílico desidrogenase é derivada de *Clostridium beijerinckii*; e a atividade de CoA transferase e a atividade de tiolase são derivadas de *Escherichia coli*.

A atividade de cada uma destas enzimas na invenção

pode ser introduzida de fora da bactéria hospedeira no interior da bactéria hospedeira, ou alternativamente, a atividade de cada uma destas enzimas na invenção pode ser realizada pela superexpressão dos genes de enzima pela  
5 melhora da atividade de um promotor dos genes de enzima retidos no genoma da bactéria hospedeira ou substituição dos promotores com outros promotores para causar a superexpressão do gene de enzima.

A introdução das atividades de enzima pode ser  
10 realizada, por exemplo, pela introdução dos genes codificando aqueles quatro tipos de enzimas de fora da bactéria hospedeira no interior da bactéria hospedeira usando a tecnologia de recombinação de gene. Neste caso, os genes de enzima introduzidos podem ser aqueles da mesma  
15 espécie ou diferente da célula hospedeira. A preparação do DNA genômico, clivagem e ligação de um DNA, transformação, PCR (reação em cadeia da polimerase), projeto e síntese de oligonucleotídeos usados como primers, e similares podem ser realizados pelos métodos convencionais conhecidos por  
20 pessoas hábeis na técnica. Estes métodos são descritos em, por exemplo, Sambrook, J., e col., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Qualquer promotor pode ser usado como o promotor usado  
25 para melhora da atividade de promotor ou superexpressão do gene de enzima contanto que possa ser expressado em um hospedeiro, tal como *Escherichia coli*. Por exemplo, promotores derivados de *E. coli* ou fagos, tais como o promotor de *trp*, promotor de *laca*, promotor de  $P_L$  e  
30 promotor de  $P_R$  são usados. Os promotores artificialmente

projetados ou modificados, tais como o promotor de tac podem também ser usados. E, como descrito nos exemplos da invenção, o promotor de desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH), promotor de glutamato descarboxilase A (gadA) e promotor de serina hidróximetiltransferase (glyA) 5 podem também ser usados. Estes podem apropriadamente ser selecionados dependendo das origens e tipos das enzimas usadas.

Por exemplo, para melhora da atividade de tiolase ou 10 CoA transferase derivada de *Escherichia coli*, quaisquer promotores podem ser usados contanto que permitam a expressão da enzima em um hospedeiro, tal como *E. coli*, e um ou mais dos promotores podem ser apropriadamente selecionados do grupo de exemplo de promotores consistindo 15 de promotor de trp, promotpr de lac, promotor de P<sub>L</sub>, promotor de P<sub>R</sub>, promotor de tac, promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), promotor de glutamato descarboxilase A (gadA) e promotor de serina hidróximetiltransferase (glyA). Os promotores, tais como o 20 promotor de trp, promotor de laca, promotor de P<sub>L</sub>, o promotor de P<sub>R</sub>, promotor de tac, promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), promotor de glutamato descarboxilase A (gadA) e promotor de serina hidróximetiltransferase (glyA) podem ser usados para 25 substituir o promotor por tiolase ou CoA transferase derivado de *Escherichia coli*.

Estes promotores podem ser introduzidos na célula hospedeira de acordo com um método convencional tal que o gene de enzima alvo pode ser expresso por, por exemplo, 30 ligando o promotor com um vetor que é o mesmo com o qual o

gene de enzima alvo é ligado, seguido pela introdução do vetor na célula hospedeira junto com o gene de enzima.

Na invenção, a bactéria hospedeira é um procarionte que é usado para a introdução dos genes codificando os quatro tipos de enzimas de acetoacetato descarboxilase, álcool isopropílico desidrogenase, CoA transferase e tiolase, ou um procarionte que é o alvo de melhora da atividade de promotores destas enzimas ou substituição dos promotores. Os exemplos de tal bactéria incluem as bactérias do gênero *Escherichia*, bactérias do gênero *Bacillus* e bactérias do gênero *Corynebacterium*; e *Escherichia coli*, que é especialmente conveniente e rendeu abundância de resultados em usos industriais, é preferivelmente usada.

#### 15 *Método para a produção de álcool isopropílico*

O método para a produção de álcool isopropílico da invenção inclui produzir álcool isopropílico de um material derivado de planta usando a bactéria produtora de álcool isopropílico da invenção.

20 Desse modo, é possível produzir álcool isopropílico tendo alta pureza sem gerar outros álcoois como subprodutos. Assim, de acordo com a invenção, é possível produzir facilmente e eficientemente álcool isopropílico sem exigir um processo complicado para a separação de álcoois de subproduto.

25 Este método de produção inclui um método incluindo assimilar um material derivado de planta cultivando a bactéria produtora de álcool isopropílico em uma mistura contendo a bactéria produtora de álcool isopropílico e o material derivado de planta, e após um determinado período

30

de tempo, purificar o álcool isopropílico secretado no meio de cultura usando uma técnica conhecida, tal como destilação, separação por membrana e extração.

A mistura no método de produção de álcool isopropílico  
5 pode conter principalmente um meio basal geralmente usado para cultivar bactérias, e qualquer meio pode ser usado contanto que seja um meio normalmente usado dependendo do tipo de bactéria produtora de álcool isopropílico.

Tal meio basal não é particularmente limitado contanto  
10 que seja um meio contendo uma fonte de carbono, fonte de nitrogênio, íons inorgânicos e, como necessário, outros componentes menores. Como a fonte de carbono, sacarídeos, tais como glicose, frutose e/ou melaços; ácidos orgânicos, tais como ácido fumárico, ácido cítrico e/ou ácido  
15 succínico; álcoois, tais como metanol, etanol e/ou glicerol; e/ou similares podem ser apropriadamente usados.

Como a fonte de nitrogênio, fontes inorgânicas ou orgânicas de nitrogênio, tais como sais de amônio orgânicos, sais de amônio inorgânicos, nitrogênio de nitrato, gás de  
20 amônia, amônia aquosa e/ou hidrolisados de proteína; e/ou similares podem ser apropriadamente usados. Como os íons inorgânicos, íons magnésio, íons fosfato, íons potássio, íons ferro, íons manganês e/ou similares podem ser apropriadamente usados como necessário.

25 Como um componente menor orgânico, vitaminas, aminoácidos, e/ou extrato de levedura, peptona, polipeptona, licor molhado de milho, digestão de caseína e/ou similares contendo vitaminas, aminoácidos, e/ou similares podem ser apropriadamente usados.

30 A polipeptona é uma resultante obtida ao hidrolisar a

proteína por uma enzima ou ácido, e toda sua fonte de nitrogênio pode ser considerada como aquela derivada da proteína, embora haja casos onde uma pequena quantidade de nitrogênio de amônia medida de acordo com o valor analítico

5 de polipeptona Lot0586A de Nihon Pharmaceutical Co., Ltd é gerada. Os componentes de polipeptona incluem, por exemplo: 12,5% por massa a 14,5% por massa de teor de nitrogênio no total; 5,0% por massa a 6,5% por massa de amino nitrogênio; 4,0% por massa a 7,0% por massa de sobreaquecido residual;

10 e 3,5% por massa a 5,5% por massa de perda, perdida pela secagem, baseado na massa total da polipeptona. Normalmente, o teor da polipeptona em um meio está na faixa de 0,02 a 2% (peso/peso), e preferivelmente na faixa de 0,1 a 1% (peso/peso).

15 O licor molhado de milho é obtido concentrando um fluido de imersão que contém os componentes solúveis eluídos durante a imersão de milho e componentes produzidos por fermentação de ácido lático. De acordo com Microbiol. Mol. Biol. Rev., dezembro 1948; Vol.12: pp.297-311, seus

20 componentes são, por exemplo: 45% por massa a 55% por massa de água; 2,7% por massa a 4,5% por massa do teor total de nitrogênio; 1,0% por massa a 1,8% por massa de amino nitrogênio; 0,15% por massa a 0,40% por massa de nitrogênio volátil; 0,1% por massa a 11,0% por massa de açúcares

25 redutores; 5% por massa a 15% por massa de ácido lático; 9% por massa a 10% por massa de teor de cinza; 0,1% por massa a 0,3% por massa de ácidos voláteis; e 0,009% por massa a 0,015% por massa de dióxido de enxofre, baseado na massa total de licor molhado de milho. De acordo com os

30 componentes acima, há uma possibilidade que compostos

contendo nitrogênio de até 0,40% (peso/peso) que podem produzir íons de amônio em água são contidos como o nitrogênio volátil; entretanto, mesmo nos casos onde estes são inteiramente íons de amônio, o teor de íon de amônio é  
5 somente 0,008% em um meio contendo 2% de licor molhado de milho. O licor molhado de milho é normalmente usado em uma concentração dentro da faixa de 0,1 a 20% (peso/peso), e preferivelmente usado em uma concentração dentro da faixa de 0,5 a 7% (peso/peso).

10 O extrato de levedura foi divulgado como contendo aminoácidos, polímeros dos mesmos, ácidos nucleicos, vitaminas, ácidos orgânicos e sais inorgânicos, e de acordo com os dados de análise (catálogo # 211929, 211931, 211930) do extrato de levedura por BD (Becton, Dickinson and  
15 Company), os sais inorgânicos incluindo cálcio, magnésio, potássio, sódio, cloreto, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico são descritos, mas não há nenhuma descrição de compostos que podem produzir íons de amônio. Os componentes de extrato de levedura são, por exemplo: 11,4% por massa do  
20 teor total de nitrogênio; 6,9% por massa de amino nitrogênio; 13,1% por massa do teor de cinza; 1,0% por massa de perda, perdida pela secagem; 0,2% por massa de cloreto de sódio; e 10,5% por massa dos sais inorgânicos totais, baseada na massa total do extrato de levedura.

25 A quantidade do material derivado de planta na mistura varia dependendo de seu tipo e a atividade e o número de bactérias produtoras de álcool isopropílico contidas na mistura. Geralmente, a concentração de açúcar começando  
30 pode ser 20% por massa ou menos em termos de glicose, e pode ser preferivelmente 15% por massa ou menos, relativo à

massa total da mistura, em vista da tolerância de açúcar das bactérias. Cada um dos outros componentes pode ser adicionado em uma quantidade na qual é normalmente adicionado aos meios para microrganismos, e não há nenhuma  
5 limitação a isso.

Um composto contendo nitrogênio pode ser preferivelmente adicionalmente adicionado à mistura contendo as bactérias produtoras de álcool isopropílico e o material derivado de planta, em vista da melhoria de  
10 produtividade de álcool isopropílico. "Adicionalmente adicionado" significa que um composto contendo nitrogênio que pode gerar um íon de amônio em água está contido na mistura em um teor maior do que contido em um meio de cultura comum. Desse modo, as bactérias produtoras de  
15 álcool isopropílico podem ser cultivadas em um meio de cultura contendo um composto contendo nitrogênio diferente de aminoácidos em uma concentração mais elevada do que aquele/aqueles sob uma condição normal de cultura. O momento quando o composto contendo nitrogênio ao invés de  
20 aminoácidos é adicionado ao meio de cultura pode ser antes de começar a cultura ou durante a cultura.

Os exemplos de composto contendo nitrogênio que podem produzir um íon de amônio em água incluem: compostos inorgânicos e orgânicos tendo sais de amônio, tais como  
25 sulfato de amônio e nitrato de amônio; gás de amônia; e amônia aquosa. Os compostos contendo nitrogênio que podem produzir um íon de amônio em água estão contidos em 0,02% (peso/peso) em M9, que é um meio comum para bactérias, e em 0,02% (peso/peso) no MS, que é outro meio comum. Na  
30 invenção, o meio de cultura pode conter o composto contendo

nitrogênio em uma quantidade mais elevada do que estes a fim de aumentar o rendimento de álcool isopropílico. Na invenção, em vista de melhora da produtividade de álcool isopropílico, o composto contendo nitrogênio que pode  
5 produzir um íon amônio em água é preferivelmente adicionado antes da cultura, tal que a massa total dos átomos de nitrogênio no composto se torna 0,04% a 10,6% (peso/peso) relativa à massa total do meio de cultura no início do cultivo da mistura. A massa total dos átomos de nitrogênio  
10 é mais preferivelmente 0,04% a 5,30% (peso/peso), especialmente preferivelmente 0,04% a 4,24% (peso/peso). Neste caso, 1 mL de líquido é suposto pesar 1 g.

Além disso, o meio de cultura pode conter outros componentes aditivos que são adicionados geralmente aos  
15 meios para microrganismos, tais como antibióticos, em concentrações nas quais são geralmente usadas. Um agente antiespumante é adicionado preferivelmente ao meio de cultura em uma quantidade apropriada para suprimir a formação de espuma.

20 Os exemplos do meio usado na invenção incluem: meios líquidos baseados em um meio aquoso; e meios sólidos baseados em uma fase sólida, tal como agarose. O meio é preferivelmente um meio líquido, considerando que é submetido à produção industrial. Os exemplos do meio aquoso  
25 que forma o meio líquido incluem aqueles geralmente usados, tais como água destilada e tampões.

Não há nenhuma limitação particular à condição de cultura empregada para o cultivo na invenção. Nas modalidades, o cultivo pode ser realizado sob uma condição  
30 aeróbia com controle apropriadamente de pH e temperatura de

modo que o pH se torne na faixa de 4 a 9, que está preferivelmente na faixa de 6 a 8, e a temperatura se torne na faixa de 20°C a 50°C, que está preferivelmente na faixa de 25°C a 42°C.

5 O método para a coleta de álcool isopropílico acumulado no meio de cultura não é particularmente limitado, e exemplos do mesmo incluem um método no qual as células bacterianas são removidas do meio de cultura por centrifugação ou similar e o álcool isopropílico é então  
10 separado por um método de separação normal, tal como destilação ou separação por membrana.

O método da invenção para a produção de álcool isopropílico pode incluir pré-cultivar para alcançar um número de célula bacteriana apropriado e/ou um nível  
15 apropriado do estado ativo das bactérias produtoras de álcool isopropílico a serem usadas, antes de cultivar para produzir álcool isopropílico. O pré-cultivo pode empregar uma condição de cultura que é normalmente usada e depende do tipo das bactérias produtoras de álcool isopropílico.

20 O método para a produção de álcool isopropílico da invenção inclui preferivelmente: cultivar a bactéria produtora de álcool isopropílico com fornecimento de um gás a uma mistura contendo a bactéria produtora de álcool isopropílico e o material derivado de planta; e coletar o  
25 álcool isopropílico produzido pela cultura.

De acordo com este método, as bactérias de produção são cultivadas com o fornecimento de um gás a uma mistura (cultura de aeração). Devido à cultura de aeração, o álcool isopropílico produzido é liberado na mistura e evapora da  
30 mistura, e, como resultado, o álcool isopropílico produzido

pode facilmente ser separado da mistura (meio). Já que o álcool isopropílico produzido é continuamente separado da mistura, um aumento da concentração de álcool isopropílico na mistura pode ser suprimido. Conseqüentemente, não há  
5 necessidade de considerar a resistência das bactérias produtoras de álcool isopropílico ao álcool isopropílico.

O gás fornecido à mistura no cultivo pode ser um gás contendo oxigênio. Os exemplos do mesmo incluem oxigênio, o ar, e um gás misturado contendo um destes e um gás inerte.  
10 Estes gases são preferivelmente esterilizados.

Os exemplos de gás inerte que pode ser usado incluem o gás de N<sub>2</sub> e gases nobres (tais como Ar, He, Ne, Kr, ou Xe), e, entre estes, em vista de manipulação, gás de N<sub>2</sub> e gás de Ar são preferíveis, e o gás de N<sub>2</sub> é mais preferível.

Quando um gás misturado é usado, a razão de mistura pode ser arbitrária contanto que as bactérias a serem cultivadas não percam suas atividades fisiológicas. Em modalidades, a razão de mistura do gás inerte está preferivelmente na faixa de 10 a 90% baseada na massa total  
15 do gás misturado para permitir processamento durante um longo período apropriadamente suprimindo a atividade das bactérias produtoras de álcool isopropílico.  
20

Um corpo poroso, tal como um corpo de cerâmica pode ser colocado em uma mistura específica para assegurar a  
25 aeração na mistura.

A quantidade do gás para aerar a mistura não é limitada. Quando somente o ar é usado como o gás, a aeração é geralmente realizada em 0,02 vvm a 2,0 vvm (vvm; volume de aeração [mL]/volume de líquido [mL]/período de tempo  
30 [minuto]), preferivelmente em 0,1 vvm a 1,5 vvm em vista de

suprimir fisicamente a danificação das bactérias.

O cultivo é preferivelmente realizado com agitação da mistura inteira. Desse modo, as bactérias produtoras de álcool isopropílico e o material derivado de planta são bem  
5 misturados um com o outro, e o gás fornecido na mistura é permitido eficientemente difundir na mistura inteira.

O cultivo pode ser continuado do começo da cultura até o material derivado de planta ser consumido, ou até a atividade das bactérias produtoras de álcool isopropílico ser perdida. O período de tempo do cultivo varia dependendo  
10 do número e atividade das bactérias produtoras de álcool isopropílico, bem como da quantidade de material derivado de planta, e pode ser geralmente 1 hora ou mais, e ser preferivelmente 4 horas ou mais. Por outro lado, embora o  
15 período de cultivo possa ser ilimitadamente estendido ao adicionalmente fornecer o material derivado de planta e/ou as bactérias produtoras de álcool isopropílico, pode ser geralmente 5 dias ou menos, preferivelmente 55 horas ou menos, em vista da eficiência de processamento.

20 Na coleta, o álcool isopropílico produzido no cultivo e separado da mistura é coletado. O método para a coleta pode ser geralmente um pelo qual o álcool isopropílico que está na forma de gás destilado da mistura cultivando ou na forma de gotas pode ser coletado. Os exemplos de tal método  
25 incluem a coleta em uma unidade de coleta, tal como um recipiente fechado geralmente usado. Particularmente, em vista da habilidade de coletar álcool isopropílico unicamente em uma pureza elevada, o método preferivelmente inclui contatar, com o álcool isopropílico separado da  
30 mistura, um líquido de captura que capture o álcool

isopropílico.

Os exemplos do líquido de captura para capturar o álcool isopropílico incluem água e solventes orgânicos. O solvente orgânico como o líquido de captura não é limitado  
5 contanto que permita o álcool isopropílico dissolver facilmente no mesmo e tenha um ponto de ebulição com o qual pode ser separado do álcool isopropílico quando é destilado no estado aquoso ou absoluto (não contendo água). Os exemplos de um solvente tão orgânico incluem tolueno,  
10 dimetilformamida e sulfóxido de dimetila. O solvente orgânico como o líquido de captura pode ser usado com a mistura com água como apropriado.

O líquido de captura é preferivelmente água. Já que as impurezas voláteis esperadas serem produzidas juntas com o  
15 álcool isopropílico são menos solúveis em água do que o álcool isopropílico, a água pode permitir eficientemente separar o álcool isopropílico das impurezas e coletar o álcool isopropílico.

O contato de álcool isopropílico com o líquido de  
20 captura pode ser realizado para uma duração de tempo que é suficiente para o álcool isopropílico ser dissolvido no líquido de captura. A dissolução de álcool isopropílico no líquido de captura não é demorada contanto que o líquido de captura seja água ou o solvente orgânico acima mencionado,  
25 e geralmente suficientemente alcançado em aproximadamente 2 horas.

Para promover a dissolução de álcool isopropílico no líquido de captura, é preferível injetar diretamente, ao líquido de captura, o álcool isopropílico que foi separado  
30 da mistura e está na forma de gás ou gotas. Esta injeção

causa o borbulhamento, que acelera a dissolução de álcool isopropílico ao líquido de captura.

O método da invenção para produzir o álcool isopropílico preferivelmente inclui liquefazer o álcool isopropílico separado da mistura antes de contatar o álcool isopropílico com o líquido de captura, a fim de aumentar a eficiência de coleta.

O método para a liquefação de álcool isopropílico pode ser qualquer método contanto que permita liquefazer o álcool isopropílico que está na forma de gás ou gotas, e os exemplos do mesmo incluem o resfriamento de álcool isopropílico a uma extensão suficiente para uma mudança de fase de álcool isopropílico. Os exemplos do método de resfriamento incluem resfriamento por ar e métodos usando a água ou álcoois resfriados.

O álcool isopropílico separado da mistura pode ser coletado usando um adsorvente. Os exemplos de tal adsorvente incluem corpos porosos, tais como zeólita e gel de sílica, que são normalmente usados para a adsorção de líquido ou gás.

De acordo com este método para produzir álcool isopropílico, o álcool isopropílico pode ser coletado no estado dissolvido no líquido de captura ou na mistura. O álcool isopropílico coletado pode ser confirmado usando um método de detecção normal, tal como HPLC. O álcool isopropílico coletado pode ainda ser purificado como necessário. Os exemplos de tal método de purificação incluem a destilação.

Nos casos onde o álcool isopropílico coletado está no estado de uma solução aquosa, este método para produzir

álcool isopropílico pode ainda incluir a desidratação além da coleta. A desidratação de álcool isopropílico pode ser realizada por um método convencional.

A Fig. 1 é um diagrama conceitual mostrando um exemplo do aparelho de produção 10 aplicável ao método da invenção para a produção de álcool isopropílico. Este método para a produção de álcool isopropílico será descrito por referência à Fig. 1.

O aparelho de produção 10 tem um recipiente de cultura 12 e um recipiente de aprisionamento 40, e o recipiente de cultura 12 e o recipiente de aprisionamento 40 são conectados através de um duto de conexão 30. O recipiente de cultura 12 e o recipiente de aprisionamento 40 são capazes de serem selados de modo a não permitir o vazamento da atmosfera interna ao exterior dos recipientes.

No recipiente de cultura 12, uma mistura 14 contendo as bactérias B produtoras de álcool isopropílico e um material derivado de planta M é colocada. A quantidade da mistura 14 colocada pode ser aproximadamente uma metade da capacidade do recipiente de cultura 12, a qual a quantidade pode ser ajustada como apropriada dependendo da capacidade do recipiente de cultura 12 e/ou da escala do aparelho de produção 10. O recipiente de cultura 12 pode ser formado das substâncias normalmente usadas para a produção industrial de materiais usando microrganismos, e não é particular limitado. O aparelho de produção 10 pode ser capaz de executar o processamento em uma temperatura e pressão padrões, e pode ainda ser equipado com um dispositivo de aquecimento e/ou um dispositivo de pressurização como necessário para permitir aquecimento

e/ou pressurização.

Um duto de injeção 16 para injetar um gás de fora do aparelho é conectado ao recipiente de cultura 12. Um terminal do duto de injeção 16 é conectado a um aparelho de  
5 aeração, que é fornecido no exterior do aparelho de produção 10 e não mostrado na figura. Outro terminal do duto de injeção 16 se abre em uma posição que está em proximidade do fundo do recipiente de cultura 12 e está dentro do recipiente de cultura 12. O volume da mistura 14  
10 é ajustado antes, tal que o nível líquido da mistura 14 colocada no recipiente de cultura 12 está acima da abertura do duto de injeção 16.

O recipiente de cultura 12 tem uma unidade de motor 22 fornecida no exterior do recipiente de cultura 12 e um  
15 dispositivo de agitação 20 fornecido com uma unidade de agitação 24 conectada à unidade de motor 22. A unidade de agitação 24 está no formato de lâminas de hélice ou similares, e colocada em proximidade do fundo do recipiente de cultura 12.

20 Um dispositivo de controle de acionamento, que não é mostrado na figura, é conectado à unidade de motor 22 e controla o acionamento da unidade de motor 22 tal que a unidade de agitação 24 é girada em uma determinada velocidade de rotação. A velocidade de rotação da unidade  
25 de agitação 24 não é particularmente limitada, e a agitação é geralmente realizada em 100 rpm a 1.000 rpm, preferivelmente 200 rpm a 800 rpm.

Um líquido de aprisionamento 42 como o líquido de captura é colocado dentro do recipiente de aprisionamento  
30 40. No topo do recipiente de aprisionamento 40, um duto de

exaustão 44 para o gás de exaustão no recipiente de aprisionamento 40 ao exterior do recipiente de aprisionamento 40 é conectado.

Um terminal do duto de conexão 30 aberto na seção superior do recipiente de cultura, permitindo o gás colocado no recipiente de cultura 12 ser guiado ao exterior do recipiente de cultura 12. Outro terminal do duto de conexão 30 é prolongado e abre na vizinhança da seção inferior do recipiente de aprisionamento 40, e o nível líquido do líquido de captura colocado no recipiente de aprisionamento 40 é ajustado antes, tal que está acima da seção de abertura do duto de conexão 30.

O duto de conexão 30 pode ter um resfriador que positivamente resfria o interior do duto de conexão 30. Desse modo, quando o gás passa através do duto de conexão 30, o gás pode ser positivamente liquefeito.

O efeito deste aparelho de produção será descrito abaixo.

A mistura 14 contendo as bactérias B produtoras de álcool isopropílico e o material derivado de planta M é injetada no recipiente de cultura 12 do aparelho de produção 10, tal que o nível de líquido da mistura 14 alcance uma porção suficientemente acima do terminal do duto de injeção 16. A seção de motor 22 do dispositivo de agitação 20 é ligada para girar a unidade de agitação 24 em uma determinada velocidade de rotação. A adição da mistura 14 pode também ser realizada após colocar uma determinada quantidade do meio no recipiente de cultura 12 e ajustar sua temperatura apropriadamente antes, tal que uma determinada quantidade total seja alcançada.

Uma determinada quantidade da mistura 14 é colocada no recipiente de cultura 12, e o aparelho de aeração, que não é mostrado na figura, é ligado para injetar o gás no recipiente de cultura 12. Desse modo, no recipiente de cultura 12, o gás é injetado na mistura, e a aeração da cultura começa.

Quando a aeração da cultura começa, as bactérias B produtoras de álcool isopropílico começam a produção de álcool isopropílico assimilando o material derivado de planta. O álcool isopropílico produzido é liberado das células bacterianas na mistura, e uma parte do álcool isopropílico é dissolvida na mistura enquanto é na maior parte evaporada da mistura. Desse modo, o álcool isopropílico é separado da mistura. O álcool isopropílico separado da mistura se move da seção superior do recipiente de cultura 12 para entrar no duto de conexão 30 como exaustão, para ainda se mover no recipiente de aprisionamento 40.

Ao passar através do duto de conexão 30, uma parte do álcool isopropílico na exaustão é resfriada e liquefeita.

O álcool isopropílico que está sendo esgotado e movido para o recipiente de aprisionamento 40 entra no recipiente de aprisionamento 40 de outro terminal do duto de conexão 30 que se abre na seção inferior do recipiente de aprisionamento 40, e é injetado no líquido de aprisionamento 42. Neste momento, o borbulhamento ocorre no líquido de aprisionamento 42 pela injeção da exaustão. Neste momento, o álcool isopropílico é dissolvido no líquido de aprisionamento 42. Por outro lado, as impurezas voláteis, que estão na exaustão e são movidas com o álcool

isopropílico do recipiente de cultura 12 para o recipiente de aprisionamento 40, são menos solúveis ao líquido de aprisionamento 42, de modo que são liberadas do líquido de aprisionamento 42 e liberadas ao exterior do recipiente de  
5 aprisionamento 40 como a exaustão final, através do duto de exaustão 44 se abrindo na seção superior do recipiente de aprisionamento 40.

A quantidade de álcool isopropílico produzida no recipiente de cultura 12 é confirmada pela coleta usando  
10 uma maquinaria de coleta, que não é mostrada na figura, e o processo é terminado quando a produção de álcool isopropílico é confirmada para ser terminada ou diminuída, ou após um determinado período de tempo.

O líquido de aprisionamento 42 após o processamento  
15 tem uma concentração elevada de álcool isopropílico dissolvida no mesmo. Portanto, pode ser coletado como uma solução de álcool isopropílico em uma concentração elevada. Este líquido de aprisionamento 42 pode ser coletado para adicionalmente isolar e purificar como necessário o álcool  
20 isopropílico. Já que uma porção parcial de álcool isopropílico é dissolvida na mistura 14 no recipiente de cultura 12, a mistura 14 pode ser coletada para isolar e purificar o álcool isopropílico como necessário.

Assim, usando o aparelho de produção 10, o álcool  
25 isopropílico produzido usando as bactérias produtoras de álcool isopropílico pode ser separado e coletado em uma temperatura e pressão ordinárias, por exemplo, em 25°C e 101.325 Pa. Conseqüentemente, o aparelho de produção pode ter uma estrutura simples, e não é necessário fornecer uma  
30 etapa de separação e/ou etapa de purificação complicadas.

Os símbolos na Fig. 1 serão descritos. O número 10 indica o aparelho de produção (aparelho produtor de álcool isopropílico), o número 12 indica o recipiente de cultura (unidade de cultura), o número 14 indica a mistura, o número 16 indica o duto de injeção (unidade de fornecimento de gás), o número 20 indica o dispositivo de agitação (unidade de agitação ), o número 30 indica o duto de conexão (unidade de conexão), o número 40 indica o recipiente de armadilha (unidade de captura), o número 42 indica o líquido de armadilha (líquido de captura), e o número 44 indica o duto de exaustão.

O formato de partes e unidades respectivas, tais como o recipiente de cultura 12, recipiente de aprisionamento 40 e duto de conexão 30 fornecidos no aparelho de produção 10 pode ser mudado como apropriado contanto que seu efeito pretendido não seja danificado.

Uma unidade de injeção e/ou unidade de exaustão para continuamente injetar a mistura 14 ou as bactérias produtoras de álcool isopropílico no recipiente de cultura 12 podem ser fornecidas ao aparelho de produção 10 desta modalidade de exemplo. Isto permite a produção contínua de álcool isopropílico.

Na invenção, como mencionada acima, o álcool isopropílico que é mais altamente purificado pode ser produzido com menos álcoois de subproduto sem exigir uma etapa para separar os álcoois de subproduto.

Em uma modalidade preferível da invenção, o álcool isopropílico que é mais altamente purificado pode ser produzido continuamente e convenientemente.

Os exemplos da invenção serão descritos agora abaixo, embora a invenção não seja limitada desse modo. “%” na descrição indica a quantidade em termos de massa a menos que especificado de outra maneira.

5 Exemplo 1

Construção de vetor para a expressão de genes de enzima produtora de álcool isopropílico derivado da bactéria do gênero *Clostridium* e transformando com o vetor de expressão

10 As sequências de aminoácido e sequências de base dos genes dos quatro tipos de enzimas produtoras de álcool isopropílico nas bactérias do gênero *Clostridium* têm sido já relatadas. Isto é, a tiolase é descrita em 3005963-3007364 da fita complementar da sequência de genoma descrita no número de acesso de GenBank AE001437. A CoA transferase é descrita no número de acesso de GenBank X72831, a acetoacetato descarboxilase é descrita no número de acesso de GenBank M55392, e o álcool isopropílico desidrogenase é descrito no número de acesso de GenBank AF157307. A sequência do promotor de tiolase existindo na sequência de base acima de tiolase pode ser usada como a sequência de um promotor exigido para a expressão destes quatro tipos de genes.

Para obter o promotor de tiolase e o gene de tiolase, 25 a amplificação por PCR foi realizada com TTT GAA TTC CAT GAT TTT AAG GGG GTT AGC ATA TGC A (Id. de Seq. N°. : 1) e TTT GGT ACC CTA GCA CTT TTC TAG CAA TAT TGC TGT TCC (Id. de Seq. N°. : 2) usando o DNA genômico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 como molde. O fragmento de DNA assim 30 obtido foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e

KpnI para obter um fragmento de tiolase tendo um tamanho de aproximadamente 1,5 kpb incluindo uma sequência de DNA codificando o promotor de tiolase.

Para obter o gene de CoA transferase, a amplificação por PCR foi realizada com TTT GGT ACC CAA CCT TAA ACC TTC ATA TTT CAA CTA CTT (Id. de Seq. N°. : 3) e TTT GGA TCC CTA AAC AGC CAT GGG TCT AAG TTC (Id. de Seq. N°. : 4) usando o DNA genômico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 como o molde. O fragmento de DNA assim obtido foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e BamHI para obter um fragmento de CoA transferase tendo um tamanho de aproximadamente 1,4 kpb.

Para obter o gene de acetoacetato descarboxilase e uma sequência de terminal, a amplificação por PCR foi realizada com TTT GGA TCC AGC TAA ACA TTA TTA AAT TTA GGA AGG TG (Id. de Seq. N°. : 5) e TTT GTC GAC CCA ATG AAC TTA GAC CCA TGG CTG (Id. de Seq. N°. : 6) usando o DNA genômico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 como o molde. O fragmento de DNA assim obtido foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e SalI para obter um fragmento de acetoacetato descarboxilase tendo um tamanho de aproximadamente 880 pb incluindo uma sequência de DNA codificando o terminador.

O *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 pode ser obtido da Coleção de Cultura de Tipo Americana, que é um banco de células, microrganismos e genes.

Para obter o gene de álcool isopropílico desidrogenase, a amplificação por PCR foi realizada com TTT GGT ACC GCG AAA TAG CGA TGA ACA GGC AG (Id. de Seq. N°. : 7) e TTT GGT ACC GCA GAT TTT GCT ACT CTT GGA GC (Id. de Seq. N°. : 8)

usando o DNA genômico de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 como molde. O fragmento de DNA assim obtido foi digerido com a enzima de restrição KpnI para obter um fragmento de álcool isopropílico desidrogenase tendo um tamanho de aproximadamente 1,4 kpb.

O *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 pode ser obtido da Coleção de Cultura VTT, que é um banco de células e microrganismos.

Os quatro fragmentos de DNA e um fragmento obtido pela digestão do plasmídeo pUC19 com EcoRI e SalI foram misturados e ligados usando uma ligase, e a célula competente de cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricados por Toyobo Co. Ltd.) foram transformados com o produto de ligação resultante para obter os transformantes crescendo em um meio de cultura de LB Broth Miller (nome comercial: Difco244620) placa de ágar contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e tendo 40  $\mu$ l cada de 40 mg/mL X-gal e 20% IPTG aplicado em uma superfície da mesma. As colônias obtidas foram cultivadas em um meio líquido de LB contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pIPA foi coletado das células bacterianas assim obtidas.

Uma célula competente de cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) foi transformada com este plasmídeo pIPA e cultivada em um meio de cultura de placa de ágar de LB Broth Miller contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina em 37°C durante a noite para obter a cepa transformante de vetor de expressão de genes de enzima produtora de álcool isopropílico pIPA/B.

A cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) pode ser

obtida da Coleção de Cultura de Tipo Americana, que é um banco de células, microrganismos e genes.

#### Exemplo 2

Produção de álcool isopropílico pela cepa pIPA/B de  
5 *Escherichia coli* e Cepa de *Escherichia coli* Tipo Selvagem

Como pré-cultura, 5 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 0,1 g/l de ampicilina e 2 g/l de glicose foi colocado em um tubo plástico tendo uma capacidade de 14 mL (nome comercial: 2057, fabricado por FALCON), e a cepa  
10 pIPA/B de *Escherichia coli* obtida no exemplo 1 foi inoculada no mesmo, seguido pela cultura durante a noite em uma temperatura de cultivo de 37°C com agitação em 120 rpm. A cepa tipo selvagem B de *Escherichia coli* foi cultivada com agitação em um meio tendo a mesma formulação exceto que  
15 não continha ampicilina, sob a mesma condição de cultivo. A quantidade total de cada um dos meios de pré-cultura foi transferida a um frasco de Erlenmeyer tendo uma capacidade de 300 mL e contendo 60 mL de meio de cultura de LB Broth Miller com 0,1 g/l de ampicilina e 20 g/l de glicose, para  
20 realizar a cultura. O cultivo foi realizado em uma taxa de agitação de 120 rpm e uma temperatura de cultivo de 37°C. O meio de cultura bacteriano de célula foi amostrado 48 horas após o começo da cultura, e as células bacterianas foram removidas por centrifugação, seguidas pela medida de  
25 quantidades acumuladas de álcool isopropílico, butanol, etanol e acetona no sobrenadante de cultura assim obtido de acordo com um método convencional com HPLC. Os resultados são mostrados na tabela 1. A acumulação de 2,1 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 48 horas de cultivo  
30 da cepa pIPA/B de *Escherichia coli*. Neste momento, não

havia nenhuma acumulação de butanol e etanol.

Tabela 1 Resultados da medida por HPLC

	Cepa pIPA/B	Cepa tipo selvagem
Álcool isopropílico	2,1 g/L	0,0 g/L
Butanol	0,0 g/L	0,0 g/L
Etanol	0,0 g/L	0,0 g/L
Acetona	0,1 g/L	0,0 g/L

### Exemplo 3

Produção de álcool isopropílico pela cepa pIPA/B de  
5 *Escherichia coli* usando recipiente de Cultura de 1L (1)

O processamento neste exemplo foi realizado usando o  
aparelho de produção 10 mostrado na Fig. 1. O recipiente de  
cultura 12 tinha uma capacidade de 1 litro, e o recipiente  
de armadilha tinha uma capacidade de 500 mL. Todos  
10 recipiente de cultura 12, recipiente de aprisionamento 40,  
duto de injeção 16, duto de conexão 30 e duto de exaustão  
44 foram feitos de vidro. 400 mL de água (água de  
aprisionamento) como o líquido de aprisionamento 42 foi  
injetado no recipiente de aprisionamento 40.

15 Como pré-cultura, 4 mL de meio de cultura de LB Broth  
Miller contendo 0,1 g/l de ampicilina e 2 g/l de glicose  
foram colocados em um tubo teste, e a cepa pIPA/B de  
*Escherichia coli* obtida no exemplo 1 foi inoculada ao mesmo,  
seguida pelo cultivo por 18 horas em uma temperatura de  
20 cultivo de 37°C com agitação em 120 rpm. O meio de pré-  
cultura inteiro foi inoculado em um recipiente de cultura  
de 1L contendo 500 mL de meio de cultura de LB Broth Miller  
contendo 0,1 g/l de ampicilina, 20 g/l de glicose e uma  
gota de adecanol, e o cultivo foi realizado. Esta cultura

foi realizada em uma taxa de agitação de 500 rpm e a temperatura de cultivo de 37°C, e pH do meio de cultura foi controlado a 7,0 usando a solução de amônia 12,5%. 20 mL de glicose em uma concentração de 0,5 g/mL foram adicionados 5 25 horas após o começo da cultura. As amostras foram colhidas da cultura de célula bacteriana 48 horas após o começo do cultivo, e as células bacterianas foram removidas por centrifugação, seguidas pela medida das quantidades acumuladas de álcool isopropílico, butanol, etanol e 10 acetona no sobrenadante de cultura assim obtido de acordo com um método convencional por HPLC. Os resultados são mostrados na tabela 2. A acumulação de 3,0 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 48 horas de cultivo da cepa pIPA/B de *Escherichia coli*. Neste momento, não havia 15 nenhuma acumulação de butanol e etanol. Cada valor medido na tabela 2 é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e na água de aprisionamento (400 mL) após o cultivo.

Tabela 2

20 Resultados de medida por HPLC

	Cepa pIPA/B
Álcool isopropílico	3,0 g/L
Butanol	0,0 g/L
Etanol	0,0 g/L
Acetona	0,9 g/L

## Exemplo 4

Construção de vetor expressando o gene de tiolase derivado de *Escherichia coli*, gene de CoA transferase derivado de *Escherichia coli*, gene de acetoacetato

descarboxilase derivado de bactéria do gênero *Clostridium* e gene de desidrogenase de álcool isopropílico derivado de bactéria do gênero *Clostridium*, e transformante com o vetor de expressão

5 As sequências de aminoácido e as sequências de base dos genes de tiolase de *Escherichia coli* e CoA transferase de *Escherichia coli* já têm sido relatadas. Isto é, o gene codificando tiolase é descrito em 2324131-2325315 da sequência genômica da cepa MG1655 de *Escherichia coli*  
10 descrita no número de acesso de GenBank U00096. O gene codificando CoA transferase é descrito em 2321469-2322781 da sequência genômica descrita acima da cepa MG1655 de *Escherichia coli*. A produção de álcool isopropílico é possível expressando, junto com estes, o gene de  
15 acetoacetato descarboxilase e o gene de álcool isopropílico desidrogenase derivados de uma bactéria/bactérias do gênero *Clostridium*. A sequência promotora de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (que pode em seguida ser referida como GAPDH) descrita em 397-440 da informação de sequência  
20 de base de número de acesso de GenBank X02662 pode ser usada como a sequência de um promotor exigido para a expressão dos genes descritos acima.

Para obter o promotor de GAPDH, a amplificação por PCR foi realizada com CGAGCTACATATGCAATGATTGACACGATTCCG (Id. de  
25 Seq. N°. : 9) e CGCGCGCATGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (Id. de Seq. N°. : 10) usando o DNA genômico da cepa MG1655 de *Escherichia coli* como o molde. O fragmento de DNA assim obtido foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e SphI para obter um fragmento de DNA correspondendo ao promotor  
30 de GAPDH tendo um tamanho de aproximadamente 110 pb. O

fragmento de DNA assim obtido e um fragmento obtido pela digestão do plasmídeo pBR322 (número de acesso de GenBank J01749) com as enzimas de restrição NdeI e SphI foram misturados e ligados usando uma ligase, e a célula  
5 competente de cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricada por Toyobo Co. Ltd.) foi transformada com o produto de ligação resultante para obter os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina. As colônias assim obtidas foram  
10 cultivadas em um meio líquido de LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pBRgapP foi coletado das células bacterianas assim obtidas.

Para obter o gene de álcool isopropílico desidrogenase, a amplificação por PCR foi realizada com  
15 AATATGCATGCTGGTGGAAACATATGAAAGGTTTTGCAATGCTAGG (Id. de Seq. N°. : 11) e GCGGATCCGGTACCTTATAATATAACTACTGCTTTAATTAAGTC (Id. de Seq. N°. : 12) usando o DNA genômico de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 como um molde. O fragmento de DNA assim obtido foi digerido com as enzimas de restrição SphI  
20 e BamHI para obter um fragmento de álcool isopropílico desidrogenase tendo um tamanho de aproximadamente 1,1 kpb. O fragmento de DNA assim obtido e um fragmento obtido pela digestão do plasmídeo pBRgapP com as enzimas de restrição SphI e BamHI foram ligados usando uma ligase, e a célula  
25 competente de cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricada por Toyobo Co. Ltd.) foi transformada com o produto de ligação resultante para obter os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina. As colônias obtidas foram  
30 cultivadas em um meio líquido de LB contendo 50  $\mu$ g/mL de

ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pGAP-IPAdh foi coletado das células bacterianas assim obtidas.

Para obter o gene de tiolase derivado de *Escherichia coli*, amplificação por PCR foi realizada com  
5 ATGGATCCGCTGGTGGAAACATATGAAAAATTGTGTCATCGTCAG (Id. de Seq. N°. : 13) e GCAGAAGCTTGTCTAGATTAATTCAACCGTTCAATCACCATC (Id. de Seq. N°. : 14) usando o DNA genômico da cepa MG1655 de *Escherichia coli* como o molde. O fragmento de DNA assim obtido foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e  
10 HindIII para obter um fragmento de tiolase tendo um tamanho de aproximadamente 1,2 kpb. O fragmento de DNA assim obtido e um fragmento, que foi obtido pela digestão do plasmídeo pGAP-IPAdh com as enzimas de restrição BamHI e HindIII, foram misturados e ligados usando uma ligase, e a célula  
15 competente de cepa DH5α de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricada por Toyobo Co. Ltd.) foi transformada com o produto de ligação resultante, para obter os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 50 µg/mL de ampicilina. As colônias obtidas foram  
20 cultivadas em um meio líquido de LB contendo 50 µg/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pGAP-IPAdh-atoB foi coletado das células bacterianas assim obtidas.

Para obter o gene de CoA transferase derivado de  
25 *Escherichia coli*, a amplificação por PCR foi realizada com GCTCTAGAGCTGGTGGAAACATATGAAAACAAAATTGATGACATTACAAGAC (Id. de Seq. N°. : 15) e TAGCAAGCTTCTACTCGAGTTATTTGCTCTCCTGTGAAACG (Id. de Seq. N°. : 16) usando o DNA genômico da cepa MG1655 de *Escherichia coli* como o molde. O fragmento de DNA assim  
30 obtido foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e

HindIII, para obter um fragmento de subunidade  $\alpha$  de CoA transferase tendo um tamanho de aproximadamente 600 pb. O fragmento de DNA assim obtido e um fragmento obtido pela digestão do plasmídeo pGAP-IPAdh-atoB com as enzimas de restrição XbaI e HindIII, a ligação foi realizada usando uma ligase, e a célula competente de cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricada por Toyobo Co. Ltd.) foi transformada com o produto de ligação resultante, para obter os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina. As colônias obtidas foram cultivadas em um meio líquido de LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pGAP-IPAdh-atoB-atoD foi coletado das células bacterianas assim obtidas.

Além disso, a amplificação por PCR foi realizada com AAGTCTCGAGCTGGTGGAAACATATGGATGCGAAACAACGTATTG (Id. de Seq. N°. : 17) e GGCCAAGCTTCATAAATCACCCCGTTGC (Id. de Seq. N°. : 18) usando o DNA genômico da cepa MG1655 de *Escherichia coli* como o molde, e o fragmento de DNA obtido foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e HindIII, para obter um fragmento de subunidade  $\beta$  de CoA transferase tendo um tamanho de aproximadamente 600 pb. Após ter misturado o fragmento obtido e os fragmentos de DNA obtidos pela digestão de plasmídeo pGAP-IPAdh-atoB-atoD com as enzimas de restrição XhoI e HindIII, a ligação foi realizada usando uma ligase, e a célula competente de cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricada por Toyobo Co. Ltd.) foi transformada com o produto de ligação resultante para obter os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina. As

colônias assim obtidas foram cultivadas em um meio líquido de LB contendo 50 µg/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA foi coletado das células bacterianas obtidas.

5 Para obter o gene de acetoacetato descarboxilase, a amplificação por PCR foi realizada com CAGGTACCGCTGGTGGAAACATATGTTAAAGGATGAAGTAATTAAACAAATTAGC (Id. de Seq. N°. : 19) e GCGGATCCTTACTTAAGATAATCATATATAACTTCAGC (Id. de Seq. N°. : 20) usando o DNA genômico de *Clostridium*  
10 *acetobutylicum* ATCC824 como o molde. O fragmento de DNA assim obtido foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e BamHI para obter um fragmento de acetoacetato descarboxilase tendo um tamanho de aproximadamente 700 pb. O fragmento de DNA assim obtido e um fragmento, que foi  
15 obtido pela digestão do plasmídeo pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA com as enzimas de restrição KpnI e BamHI, foram misturados e ligados usando uma ligase, e a célula competente de cepa DH5α de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricada por Toyobo Co. Ltd.) foi transformada com o  
20 produto de ligação resultante para obter os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 50 µg/mL de ampicilina. As colônias obtidas foram cultivadas em um meio líquido de LB contendo 50 µg/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pGAP-Iaaa foi coletado das  
25 células bacterianas obtidas.

A célula competente de cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) foi transformada com este plasmídeo pGAP-Iaaa e cultivada em uma placa de ágar de LB Broth Miller contendo 50 µg/mL de ampicilina em 37°C durante a noite para obter a  
30 cepa pGAP-Iaaa/B de *Escherichia coli*.

A cepa MG1655 de *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 e cepa B de *Escherichia coli* podem ser obtidas da Coleção de Cultura de Tipo Americana, que é um banco de células, microrganismos e genes.

5 Exemplo 5

Produção de álcool isopropílico pela cepa pGAP-Iaaa/B de *Escherichia coli* usando o recipiente de cultura de 1L (1)

A produção de álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi estudada na mesma maneira que no  
10 exemplo 3, exceto que no pré-cultivo, 25 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 0,1 g/l de ampicilina colocado em um frasco de Erlenmeyer foram usados, e a cepa pGAP-Iaaa/B de *Escherichia coli* obtida no exemplo 4 foi inoculada ao mesmo, seguido pelo cultivo por 16 horas em  
15 uma temperatura de cultivo de 35°C com agitação em 120 rpm. O meio de pré-cultura inteiro foi inoculado em um recipiente de cultura de 1L contendo 475 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 50 g/l de glicose e uma gota de adecanol, e cultivo foi realizado. O cultivo foi  
20 realizado em uma taxa de agitação de 500 rpm e em uma temperatura de cultivo de 35°C, e o pH do meio de cultura foi controlado a 7,0 usando soluções de hidróxido de sódio de 24% peso/peso. As amostras foram colhidas da cultura de célula bacteriana 24 horas após o começo do cultivo, e as  
25 células bacterianas foram removidas por centrifugação, seguida pela medida das quantidades acumuladas de álcool isopropílico, butanol, e de etanol no sobrenadante de cultura obtido de acordo com um método convencional por HPLC. A acumulação de 5,5 g/l de álcool isopropílico foi  
30 confirmada após 24 horas de cultivo. Neste momento, não

havia nenhuma acumulação de butanol e etanol. A quantidade acumulada de álcool isopropílico após 48 horas foi 5,0 g/l. Cada valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento (mudada para 500 mL) após o cultivo.

#### Exemplo 6

Produção de álcool isopropílico pela cepa pGAP-Iaaa/B de *Escherichia coli* usando recipiente de cultura de 1L (2)

A produção de álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi estudada na mesma maneira que no exemplo 5, exceto que na cultura em um recipiente de cultura de 1L, 475 mL do meio de cultura com a composição indicada na tabela 3 foram usados. A quantidade dos átomos de nitrogênio derivados de sulfato de amônio neste momento é 0,04% por massa baseada na massa total do meio de cultura no início de cultura. Além disso, a solução de glicose aquosa de 50% peso/peso foi adicionada em uma taxa de fluxo de 10 g/l/hora. Como resultado, a acumulação de 7,4 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 24 horas de cultivo. Neste momento, não havia nenhuma acumulação de butanol e etanol. A quantidade acumulada de álcool isopropílico após 48 horas foi 6,2 g/l. Cada valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento (500 mL) após o cultivo.

25 Tabela 3

Formulação de meio	
Polipeptona	2 g/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,09 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/L

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O            2 g/L

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>            2 g/L

---

(o restante: água)

#### Exemplo 7

Produção de álcool isopropílico pela cepa pGAP-Iaaa/B de *Escherichia coli* usando recipiente de cultura de 1L (3)

5            A produção de álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi estudada na mesma maneira que no exemplo 6, exceto que durante a cultura em um recipiente de cultura de 1L, 0,2% por massa (2 g/l) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi adicionado após 30 horas. A soma da quantidade dos átomos  
10 de nitrogênio derivados de sulfato de amônio neste exemplo é 0,08% por massa baseada na massa total do meio de cultura no início de cultura. Como resultado, a acumulação de 7,2 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 24 horas de cultivo. Neste momento, não havia nenhuma acumulação de  
15 butanol e etanol. A quantidade acumulada de álcool isopropílico após 48 horas foi 13,4 g/l. Cada valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento (500 mL) após o cultivo. Foi mostrado que a adição de uma quantidade apropriada de uma  
20 fonte de nitrogênio, tal como sulfato de amônio aumenta a produtividade.

#### Exemplo 8

Produção de álcool isopropílico pela cepa pGAP-Iaaa/B de *Escherichia coli* usando recipiente de cultura de 1L (4)

25            A produção de álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi estudada na mesma maneira que no exemplo 6, exceto que na formulação do meio para a cultura em um recipiente de cultura de 1L, a quantidade de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

foi mudada para 0,4% por massa (4 g/l). A quantidade dos átomos de nitrogênio derivados de sulfato de amônio neste exemplo é 0,08% por massa baseada na massa total de meio de cultura no início de cultura. Como resultado, a acumulação de 11,6 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 24 horas de cultivo. O valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento (500 mL) após o cultivo. Mostrou-se que a adição de uma quantidade apropriada de uma fonte de nitrogênio, tal como sulfato de amônio aumenta a produtividade.

#### Exemplo 9

Produção de álcool isopropílico pela cepa pGAP-Iaaa/B de *Escherichia coli* usando recipiente de cultura de 1L (5)

A produção de álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi estudada na mesma maneira que no exemplo 6, exceto que na formulação de meio para a cultura em um recipiente de cultura de 1L, a quantidade de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi mudada para 0,5% por massa (5 g/l). A quantidade dos átomos de nitrogênio derivados de sulfato de amônio neste exemplo é 0,11% por massa baseada na massa total do meio de cultura no início da cultura. Como resultado, a acumulação de 11,2 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 24 horas de cultivo. Além disso, a acumulação de 21,3 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 55 horas de cultivo. O valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento (500 mL) após o cultivo.

#### Exemplo 10

Produção de álcool isopropílico pela cepa pGAP-Iaaa/B

de *Escherichia coli* usando recipiente de cultura de 1L (6)

A produção de álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi estudada na mesma maneira que no exemplo 6, exceto que 12,5% por massa de solução aquosa de amônia foram usados como um ajustador de pH. Como resultado, a acumulação de 13,3 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 24 horas de cultivo. Além disso, a acumulação de 28,4 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 55 horas de cultivo. A massa dos 12,5% por massa de solução de amônia aquosa adicionada em 55 horas foi 69,0 g, e a soma da quantidade dos átomos de nitrogênio derivados da solução aquosa de amônia é 0,73% por massa baseada na massa total do meio de cultura no início da cultura. O valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento (500 mL) após o cultivo.

#### Exemplo 11

Produção de álcool isopropílico pela cepa pGAP-Iaaa/B de *Escherichia coli* usando recipiente de cultura de 1L (7)

A produção de álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi estudada na mesma maneira que no exemplo 6, exceto que na formulação de meio para a cultura em um recipiente de cultura de 1L, 2 g/l de polipeptona foram substituídos com 20 g/l de licor molhado de milho (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.), e a quantidade de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi mudada para 5 g/l como resultado, uma acumulação de 10,9 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 24 horas de cultivo. Além disso, a acumulação de 17,8 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 55 horas de cultivo. A soma da quantidade

dos átomos de nitrogênio derivados do sulfato de amônio neste exemplo é 0,11% por massa baseada na massa total do meio de cultura no início da cultura. O valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o  
5 em água de aprisionamento (500 mL) após o cultivo. Mostrou-se que uma grande variedade de componentes pode ser usada como fontes nutrientes para o meio.

#### Exemplo 12

Produção de álcool isopropílico pela cepa pIPA/B de  
10 *Escherichia coli* usando recipiente de cultura de 1L (2)

O cultivo para álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi estudado na mesma maneira que no exemplo 3, exceto que no início da cultura, 0,5% (5 g/l) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi adicionado. A quantidade dos átomos de  
15 nitrogênio derivados de sulfato de amônio neste exemplo é 0,11% por massa baseada na massa total do meio de cultura no início de cultura. Como resultado, a acumulação de 4,5 g/l de álcool isopropílico foi confirmada após 48 horas de cultivo.

#### 20 Exemplo 13

Coleta de álcool isopropílico do meio de cultura por método de destilação

A cepa pIPA/B foi cultivada de acordo com o método no exemplo 3 para obter 180 g de um meio de cultura a ser  
25 submetido à destilação. Isto é referido como um meio de cultura A. 178,6 g do meio de cultura A foram colocadas em um frasco de coleta tendo uma capacidade de 200 mL e aquecidas ao serem agitadas em um banho de óleo para realizar a destilação simples de acordo com um método  
30 convencional. A temperatura aérea e a quantidade de líquido

do meio de cultura A em cada etapa são mostradas na tabela 4. Os teores de álcool isopropílico, butanol e etanol contidos no meio de cultura antes da destilação, bem como em alíquotas do líquido coletado pela destilação e no líquido residual foram medidas de acordo com um método convencional por HPLC. Os resultados são mostrados na tabela 5. Do meio de cultura obtido cultivando a cepa pIPA/B deste exemplo, quase todo o álcool isopropílico contido poderia ser coletado com uma temperatura aérea de 99,1°C a 99,5°C. Neste momento, butanol e etanol não foram detectados nas alíquotas coletadas.

#### Exemplo comparativo 1

Similarmente à composição do meio de cultura para a cepa 172CY-02 de *Clostridium* sp. descrita em JP-A 61-67493, 180 g de um meio de cultura tendo 9,9 g/l de n-butanol, 0,6 g/l de etanol e 7,2 g/l de álcool isopropílico adicionados ao meio de cultura de LB Broth Miller foi preparada, a qual o meio de cultura foi referido como um meio de cultura comparativo B. 177,9 g de meio de cultura comparativo B foram colocadas em um frasco de recuperação tendo uma capacidade de 200 mL e aquecido ao ser agitado em um banho de óleo, para realizar a destilação simples de acordo com um método convencional. A temperatura aérea e a quantidade de líquido do meio de cultura comparativo B em cada etapa são mostradas na tabela 4. Os teores de álcool isopropílico, butanol e etanol contidos no líquido antes da destilação, bem como em alíquotas do líquido coletado pela destilação e no líquido residual foram medidas de acordo com um método convencional por HPLC. Os resultados são mostrados na tabela 5. Observa-se que entre os três tipos dos

componentes de álcool misturados no meio de cultura comparativo B, o álcool isopropílico e butanol mostraram o mesmo comportamento de destilação, de modo que o álcool isopropílico não poderia ser separado e coletado unicamente.

5 Baseado nos resultados no exemplo 13 e no exemplo comparativo 1, compreende-se que o álcool isopropílico pode ser facilmente coletado do meio de cultura da invenção já que não contém álcoois diferentes do que álcool isopropílico como subprodutos. Assim, o álcool isopropílico  
10 pode ser coletado do meio de cultura de acordo com a invenção por um simples processo de purificação tal como a destilação simples.

Por outro lado, é compreendido que a coleta de álcool isopropílico dos meios de cultura processados com bactérias  
15 existentes não é simples, pois a separação de álcool isopropílico dos álcoois de subproduto é difícil. A coleta de álcool isopropílico de um meio de cultura processado com uma bactéria existente é esperada exigir a destilação usando instalações incidentais, tais como uma coluna de  
20 retificação, de modo que o processo de purificação seja esperado ser complicado.

Em consideração destes, as bactérias produtoras de álcool isopropílico da invenção podem ser superiores as na técnica prévia com relação às aplicações práticas de  
25 produção de álcool isopropílico derivado de planta.

#### Tabela 4

Temperaturas aéreas e quantidades de líquido de meio de cultura A e meio de cultura comparativo B

Etapa de destilação	Meio de cultura A	Meio de cultura comparativo B
---------------------	-------------------	-------------------------------

	Temperatura aérea (°C)	Quantidade de líquido (g)	Temperatura aérea (°C)	Quantidade de líquido (g)
Fração 1	99,1-99,5	10,1	96,0-98,0	9,4
Fração 2	99,5	10,0	99,4	9,6
Fração 3	99,8	11,0	99,5	10,4
Fração 4	99,8	20,6	99,5	20,3
Fração 5	99,8	21,9	99,9	18,8
Líquido residual após destilação		100,9		107,5

Tabela 5

## Resultados de medidas por HPLC

		Álcool isopropílico (g)	Butanol (g)	Etanol (g)
Meio de cultura A	Antes da destilação	0,48	0,00	0,00
	Fração 1	0,43	0,00	0,00
	Fração 2	0,02	0,00	0,00
	Fração 3	0,00	0,00	0,00
	Fração 4	0,00	0,00	0,00
	Fração 5	0,00	0,00	0,00
	Residual líquido	0,00	0,00	0,00
Meio de cultura comparativo B	Antes da destilação	1,20	1,69	0,10
	Fração 1	0,93	1,35	0,06

	Fração 2	0,22	0,30	0,03
	Fração 3	0,01	0,02	0,01
	Fração 4	0,00	0,00	0,00
	Fração 5	0,00	0,00	0,00
	Líquido			
	Residual	0,00	0,00	0,00

## Exemplo 14

## Exemplo Teste

O processamento neste exemplo foi realizado usando o aparelho de produção 10 mostrado na Fig. 1. O recipiente de cultura 12 tinha uma capacidade de 1 litro, e o recipiente de aprisionamento 40 tinha uma capacidade de 500 mL. Todos recipiente de cultura 12, recipiente de aprisionamento 40, duto de injeção 16, duto de conexão 30 e duto de exaustão 44 foram feitos de vidro. 400 mL de água (água de aprisionamento) como o líquido de aprisionamento 42 foram injetados no recipiente de aprisionamento 40.

10 g/l de solução aquosa de álcool isopropílico foi injetada no recipiente de cultura 12 de 500 mL como o líquido de processamento. O processamento foi realizado em uma taxa de agitação de 500 rpm e uma temperatura de processamento de 37°C.

O ar foi subsequentemente introduzido do duto de ion 16 na solução aquosa de álcool isopropílico em uma taxa de 0,5 L/min. (1 vvm) e o processamento foi começado. A exaustão do recipiente de cultura 12 foi borbulhada no líquido de aprisionamento 42 no recipiente de aprisionamento 40. A exaustão do recipiente de aprisionamento 40 foi liberada à atmosfera do sistema de aparelho. Cada um do líquido de processamento no recipiente

de cultura 12 e líquido de aprisionamento 42 no recipiente de aprisionamento 40 foi amostrado 0, 2, 4, 8 e 24 horas após o começo do processamento, e a quantidade acumulada de álcool isopropílico em cada amostra foi medida por HPLC. A medida por HPLC foi realizada com ULTRON PS-80H (nome comercial, fabricado por Shinwa Chemical Industries Ltd.; ID: 8,0 mm, L: 300 mm) usando 0,1% HClO<sub>4</sub> como um eluente, em uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min, e uma temperatura de coluna de 50°C, e usando um detector de índice de refração diferencial (RI) como um detector. Os resultados são mostrados na tabela 6.

Tabela 6

Tempo de processamento (H.)	Quantidade acumulada de Álcool isopropílico (g/L)		
	Líquido de processamento	Água de aprisionamento	Quantidade total
0	10,1	0,0	10,1
2	9,8	1,2	11,0
4	8,5	2,4	10,9
8	7,1	3,8	10,9
24	3,1	7,0	10,1

Como mostrado na tabela 6, a concentração de álcool isopropílico no recipiente de cultura 12 diminuiu sobre o tempo, e a concentração de álcool isopropílico no líquido de aprisionamento 42 aumentou gradualmente. Revelou-se que 70% de álcool isopropílico no recipiente de cultura tinha se movido para o frasco de água quando 24 horas passaram. Neste momento, a quantidade total de álcool isopropílico era 10,1 g, e o material de equilíbrio foi quase consistente com o mesmo.

Portanto, revelou-se que, borbulhando a exaustão da aeração da cultura no recipiente de cultura 12 no líquido de aprisionamento 42 no recipiente de aprisionamento 40, o álcool isopropílico no líquido de processamento pode ser separado do líquido de processamento e foi dissolvido no líquido de aprisionamento 42.

#### Exemplo 15

##### Produção de álcool isopropílico

Neste exemplo, o álcool isopropílico foi produzido usando o aparelho de produção 10, que é o mesmo que o usado no exemplo 3. O recipiente de aprisionamento 40 continha água (água de aprisionamento) como o líquido de aprisionamento 42 injetado em uma quantidade de 400 mL.

Como pré-cultivo, 4 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 0,1 g/l de ampicilina e 2 g/l de glicose foram colocados em um tubo teste tendo um diâmetro de 19 mm e comprimento de 175 mm, e a cepa pIPA/B obtida no exemplo 1 foi inoculada ao mesmo, seguido pelo cultivo em uma temperatura de cultivo de 37°C com a agitação em 120 rpm por 18 horas.

O meio de pré-cultura foi inoculado ao recipiente de cultura 12 contendo 500 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 0,1 g/l de ampicilina, 20 g/l de glicose e uma gota de adecanol, e o cultivo foi começado. O cultivo foi realizado em uma taxa de agitação de 500 rpm e uma temperatura de cultivo de 37°C, e pH do meio de cultura foi ajustado 7,0 usando a solução aquosa de amônia 12,5%.

Subsequentemente, a aeração da cultura foi começada injetando o ar do duto de injeção 16 no meio de cultura em uma taxa de 0,5 L/min (1 vvm). A exaustão do recipiente de

cultura 12 foi borbulhada no líquido de aprisionamento 42 no recipiente de aprisionamento 40.

No momento em que 23 horas passaram do começo da cultura, 20 mL de 0,5 g/l de solução de glicose foram  
5 adicionados ao recipiente de cultura. [0131]

#### Detecção de álcool isopropílico nas amostras

O meio de cultura de célula bacteriana no recipiente de cultura 12 após o processamento e o líquido de aprisionamento 42 no recipiente de aprisionamento 40 após o  
10 processamento foram amostrados 0, 7, 23, 30, 47 e 52 horas após o começo da cultura. Cada meio de cultura amostrado foi submetido à centrifugação para remover os sólidos, tais como células bacterianas no meio de cultura.

A quantidade acumulada de álcool isopropílico em cada  
15 um do meio de cultura amostrado e água foi medida por HPLC. Os resultados são mostrados na tabela 7.

Além disso, com relação ao meio de cultura e à água de aprisionamento obtida 47 horas após o começo da cultura, o número de picos, tempos de Rt (tempos de retenção) e os  
20 nomes de compostos detectados submetendo o meio de cultura à medida por HPLC são mostrados na tabela 8, e aqueles detectados submetendo a água de aprisionamento à medida por HPLC são mostrados na tabela 9.

Nas tabelas 8 e 9, "IPA" indica álcool isopropílico.  
25 Na tabela 8, os nomes de compostos indicados como o "não conseqüido" são supostos por serem impurezas geradas pela aeração da cultura de álcool isopropílico.

Tabela 7

Tempo de cultivo (h)	Em meio de cultura (g/L)	Em água (g/L)
0	0,0	0,0

7	0,0	0,0
23	0,8	0,3
30	1,3	0,7
47	1,4	1,7
52	1,0	2,0

Tabela 8

Pico N°.	Rt (min)	Nome do composto
1	5,15	Não conhecido
2	6,24	Não conhecido
3	6,7	Não conhecido
4	7,33	Glicose
5	7,98	Não conhecido
6	8,89	Não conhecido
7	9,52	Não conhecido
8	10,19	Não conhecido
9	11,91	Ácido acético
10	14,07	Não conhecido
11	17,42	Não conhecido
12	18,77	IPA

Tabela 9

Pico N°.	Rt (min)	Nome do composto
1	18,76	IPA

Como mostrado na tabela 7 à tabela 9, confirma-se que o álcool isopropílico produzido usando as bactérias produtoras de álcool isopropílico é acumulado no meio de cultura e água de aprisionamento pela aeração de cultura.

11 picos supostos por serem derivados das impurezas além da glicose e ácido acético foram encontrados de meio de cultura obtido 47 horas após o começo da cultura, mas não havia nenhum pico com exceção do correspondendo ao

álcool isopropílico que foi encontrado da água de  
aprisionamento neste momento. Assim, revela-se que, de  
acordo com este método de produção, as impurezas e o álcool  
isopropílico podem facilmente ser separados de cada um  
5 borbulhando a exaustão do recipiente de cultura 12 no  
líquido de aprisionamento 42.

Desse modo, o álcool isopropílico pode ser  
eficientemente coletado realizando operações simples nas  
etapas do começo da cultura à coleta de álcool isopropílico.  
10 Além disso, revela-se que uma solução aquosa de álcool  
isopropílico não tendo nenhuma impureza pode ser obtida  
usando a água para a coleta de álcool isopropílico. A  
invenção pode portanto ser dita ser um método inovador na  
implementação prática de produção de álcool isopropílico  
15 através do cultivo de microrganismos, o método permitindo a  
construção de um processo de produção com uma carga  
reduzida na purificação.

#### Exemplo comparativo 2

Construção de plasmídeo pIPA faltando o gene de  
20 Tiolase e construção de transformante com o plasmídeo

Um plasmídeo pIPA $\Delta$ thio, tendo uma estrutura de  
plasmídeo pIPA descrito no exemplo 1 com remoção de gene de  
tiolase do mesmo, foi preparado.

Para isolar o promotor de tiolase de pIPA, a  
25 amplificação por PCR foi realizada com TTT GAA TTC CAT GAT  
TTT AAG GGG GTT AGC ATA TGC A (Id. de Seq. N°. : 21) e TTT  
TCT AGA TCT AAC TAA CCT CCT AAA TTT TGA TAC GGG (Id. de Seq.  
N°. : 22) usando pIPA como o molde, e o fragmento de DNA  
assim obtido foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI  
30 e KpnI para obter um fragmento de promotor de tiolase tendo

um tamanho de aproximadamente 240 pb.

Para isolar o gene de álcool isopropílico desidrogenase de pIPA, a amplificação por PCR foi realizada com TTT CTC GAG GCA GAT TTT GCT ACT CTT GGA GC (Id. de Seq. N°.: 23) e TTT GGT ACC GCA GAT TTT GCT ACT CTT GGA GC (Id. de Seq. N°.: 24) usando pIPA como o molde, e o fragmento de DNA obtido foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e XbaI para obter um fragmento de gene de álcool isopropílico desidrogenase tendo um tamanho de aproximadamente 1,4 kpb.

Os dois fragmentos de DNA descritos acima e 4,9k pb de um fragmento obtido digerindo o plasmídeo pIPA com as enzimas de restrição EcoRI e KpnI foi misturado e ligado usando uma ligase, e a célula competente de cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricada por Toyobo Co. Ltd.) foi transformada com o produto de ligação resultante para obter os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. As colônias assim obtidas foram cultivadas em um meio líquido de LB contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pIPA $\Delta$ thio foi coletado das células bacterianas obtidas. A sequência de base de pIPA $\Delta$ thio foi determinada por um método convencional, e as sequências de DNA de gene de desidrogenase de promotor de tiolase e o isopropílico de álcool foram confirmadas como não incluindo nenhum erro.

A célula competente de cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) foi transformada com este plasmídeo pIPA $\Delta$ thio, e cultivada em uma placa de ágar de LB Broth Miller contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina em 37°C durante a noite para obter a cepa transformante pIPA $\Delta$ thio/B.

Produção de álcool isopropílico pela cepa pIPAAthio/B de *Escherichia coli* usando recipiente de cultura de 1L

Um teste de produção de álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi realizado na mesma maneira que no exemplo 3. Como pré-cultivo, 4 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 0,1 g/l de ampicilina e 2 g/l de glicose foram colocados em um tubo de teste, e a cepa pIPAAthio/B de *Escherichia coli* foi inoculada ao mesmo, seguido pelo cultivo por 18 horas em uma temperatura de cultivo de 37°C com a agitação em 120 rpm. O meio de pré-cultura inteiro foi inoculado em um recipiente de cultura de 1L contendo 500 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 20 g/l de glicose e uma gota de adecanol, e o cultivo foi realizado. O cultivo foi realizado em uma taxa de agitação de 500 rpm e uma temperatura de cultivo de 37°C, e o pH do meio de cultura foi controlado à 7,0 usando solução de amônia 12,5%. 20 mL de glicose em uma concentração de 0,5 g/mL foram adicionados à cultura em 72 horas após o começo de cultivo. As amostras foram colhidas da cultura de célula bacteriana com intervalo de tempo do começo da cultura, e as células bacterianas foram removidas por centrifugação, seguida pela medida da quantidade acumulada de álcool isopropílico no sobrenadante da cultura obtida de acordo com um método convencional por HPLC. Os resultados são mostrados na tabela 10. Cada valor medido na tabela 10 é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento após o cultivo.

Cada um dos genes de acetoacetato descarboxilase, álcool isopropílico desidrogenase e CoA transferase é introduzido, mas o gene de tiolase não é introduzido na

cepa pIPA $\Delta$ thio/B de *Escherichia coli*. Portanto, a atividade da tiolase desta cepa é a inerente da mesma. Entretanto, não houve nenhuma acumulação de álcool isopropílico mesmo depois de 72 horas de cultivo da cepa pIPA $\Delta$ thio/B de

5 *Escherichia coli*.

Tabela 10

Resultados de medida por HPLC

Tempo de cultivo	Álcool isopropílico
0	0,0 g/L
9	0,0 g/L
24	0,0 g/L
30	0,0 g/L
48	0,0 g/L
54	0,0 g/L
72	0,0 g/L

## Exemplo comparativo 3

Construção de pIPA plasmídeo faltando o gene de

10 Tiolase e CoA transferase, e construção de transformante com o plasmídeo

Um plasmídeo pIPA $\Delta$ thio $\Delta$ ctfAB, tendo uma estrutura de plasmídeo pIPA descrita no exemplo 1 com remoção do gene de tiolase e CoA transferase do mesmo, foi preparado.

15 O pIPA $\Delta$ thio foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e BamHI, e os terminais do DNA cegos e ligados, seguido pela transformação de célula competente de cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricada por Toyobo Co. Ltd.) com o plasmídeo para obter

20 os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. As colônias assim obtidas foram cultivadas em um meio líquido de LB contendo 100

µg/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pIPAΔthioΔctfAB foi coletado das células bacterianas obtidas.

A cepa de transformante pIPAΔthioΔctfAB/B foi obtida transformando a célula competente de cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) com o plasmídeo pIPAΔthioΔctfAB, seguido pelo cultivo do mesmo em uma placa de ágar de meio de cultura de LB Broth Miller (Difco244620) contendo 100 µg/mL de ampicilina em 37°C durante a noite.

10 Produção de álcool isopropílico pela cepa pIPAΔthioΔctfAB/B de *Escherichia coli* usando recipiente de cultura de 1L

A produção de álcool isopropílico usando um recipiente de cultura de 1L foi estudada na mesma maneira que no exemplo 3, exceto que no pré-cultivo, 4 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 0,1 g/l de ampicilina e 2 g/l de glicose foram colocados em um tubo de teste, e a cepa pIPAΔthioΔctfAB/B de *Escherichia coli* foi inoculada ao mesmo, seguido pelo cultivo por 18 horas em uma temperatura de cultivo de 37°C com agitação em 120 rpm. O meio de pré-cultura inteiro foi inoculado em um recipiente de cultura de 1L contendo 500 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 20 g/l de glicose e uma gota de adecanol, e o cultivo foi realizado. O cultivo foi realizado em uma taxa de agitação de 500 rpm e em uma temperatura de cultivo de 37°C, e o pH de meio de cultura foi controlado à 7,0 usando a solução amônia 12,5%. Além disso, 20 mL de glicose em uma concentração de 0.5 g/mL foram adicionados à cultura em 72 horas após o começo de cultura.

30 O meio de cultura de célula bacteriana foi amostrado

com intervalo de tempo do começo da cultura, e as células bacterianas foram removidas por centrifugação, seguida pela medida da quantidade acumulada de álcool isopropílico no sobrenadante de cultura assim obtido de acordo com um método convencional por HPLC. Os resultados são mostrados na tabela 11. A quantidade de álcool isopropílico na tabela 11 é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento após o cultivo.

Os genes para acetoacetato descarboxilase e álcool isopropílico desidrogenase são introduzidos, mas gene o gene de tiolase e CoA transferase não são introduzidos na cepa pIPA $\Delta$ thio $\Delta$ ctfAB/B de *Escherichia coli*. Portanto, as atividades do gene de tiolase e gene de CoA transferase desta cepa são inerentes do mesmo. Entretanto, não havia nenhuma acumulação de álcool isopropílico mesmo depois 72 horas de cultivo da cepa pIPA $\Delta$ thio $\Delta$ ctfAB/B de *Escherichia coli*.

Tabela 11

Resultados de medida por HPLC

Tempo de cultivo	Álcool isopropílico
0	0,0 g/L
9	0,0 g/L
24	0,0 g/L
30	0,0 g/L
48	0,0 g/L
54	0,0 g/L
72	0,0 g/L

Dos resultados nos exemplos 1, 2 e 3 e os exemplos comparativos 2 e 3, pode-se ver que *E. coli* obtida de acordo com a invenção não produz nenhum álcool isopropílico

quando não fornece ao mesmo as atividades de tiolase e de CoA transferase codificadas por genes para estas enzimas, que inerentemente existem no genoma de *E. coli*, além das atividades de acetoacetato descarboxilase e álcool isopropílico desidrogenase.

#### Exemplo 16

Construção de vetor para a expressão de gene de tiolase derivado de *Escherichia coli*, gene de CoA transferase derivado de *Escherichia coli*, gene de acetoacetato descarboxilase derivado de bactéria do gênero *Clostridium* e gene de desidrogenase de álcool isopropílico derivado de bactéria do gênero *Clostridium* usando o promotor glyA e transformante com o vetor de expressão

O promotor para o gene de serina hidróximetiltransferase (glyA) derivado de *Escherichia coli* foi usado aqui em vez do promotor de GAPDH no exemplo 4.

A sequência de aminoácido da serina hidróximetiltransferase de *Escherichia coli* e a sequência de base do gene já foram relatadas. Isto é, o gene codificando serina hidróximetiltransferase é descrito no número de acesso de GenBank V00283. Os genes exigidos para a produção de álcool isopropílico podem ser expressos usando seu promotor.

Para obter o promotor de glyA, a amplificação por PCR foi realizada com TCGACCGGCTCCAGTTCG (Id. de Seq. N°.: 25) e CTGTCGCATGCTGACTCAGCTAACAATAAAATTTTGG (Id. de Seq. N°.: 26) usando o DNA genômico de cepa MG1655 de *Escherichia coli* como o molde, e o fragmento de DNA obtido foi digerido com a enzima de restrição SphI para obter um fragmento de DNA tendo um tamanho de aproximadamente 850 pb

correspondendo ao promotor de glyA. O fragmento assim obtido e os fragmentos de DNA obtidos pelo tratamento do plasmídeo pBR322 (número de acesso de GenBank J01749) com a enzima de restrição NdeI e cegamento subsequente com o tratamento de polimerase de DNA T4 seguido pela digestão com SphI foram misturados e ligados usando uma ligase, e a célula competente de cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricados por Toyobo Co. Ltd.) foi transformada com o produto de ligação resultante, para obter os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina. As colônias assim obtidas foram cultivadas em um meio líquido de LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, e o plasmídeo pBRglyP foi coletado das células bacterianas assim obtidas.

Depois disso, na mesma maneira que no exemplo 4, os genes codificando cada tiolase, álcool isopropílico desidrogenase, CoA transferase e acetoacetato descarboxilase foram introduzidos sequencialmente, e o plasmídeo pGly-Iaaa foi coletado.

A cepa pGly-Iaaa/B de *Escherichia coli* foi obtida transformando as células competentes de cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) com este plasmídeo pGly-Iaaa, seguido pelo cultivo do mesmo em uma placa de ágar de LB Broth Miller contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina em 37°C durante a noite.

#### Exemplo 17

Construção de vetor para a expressão de gene de tiolase derivado de *Escherichia coli*, gene de CoA transferase derivado de *Escherichia coli*, gene de acetoacetato descarboxilase derivado de bactéria do gênero

*Clostridium*, gene de álcool isopropílico desidrogenase derivado de bactéria do gênero *Clostridium* usando o promotor *gadA* e transformante com o vetor de expressão

O promotor para o gene de glutamato descarboxilase A (5 *gadA*) derivado de *Escherichia coli* foi usado aqui em vez do promotor de GAPDH no exemplo 4.

A sequência de aminoácido de glutamato descarboxilase A de *Escherichia coli* e a sequência de base do gene do mesmo já foi relatado. Isto é, o gene codificando glutamato 10 descarboxilase A é descrito no número de acesso de GenBank M84024. Os genes exigidos para a produção de álcool isopropílico podem ser expressos usando seu promotor.

Para obter o promotor de *gadA*, a amplificação por PCR foi realizada com CGACTCGCATATGTCGTTTTCTGCTTAGG (Id. de 15 Seq. N°. : 27) e CAGTCGCATGCTTCGAACTCCTTAAATTTATTTGAAGGC (Id. de Seq. N°. : 28) usando o DNA genômico de cepa MG1655 de *Escherichia coli* como o molde, e o fragmento de DNA obtido foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e SphI para obter um fragmento de DNA tendo um tamanho de 20 aproximadamente 130 pb correspondendo ao promotor de *gadA*. O fragmento assim obtido e um fragmento obtido digerindo o plasmídeo pBR322 (número de acesso de GenBank J01749) com as enzimas de restrição NdeI e SphI foram misturados e ligados usando uma ligase, e a célula competente de cepa 25 DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (nome comercial: DNA-903, fabricados por Toyobo Co. Ltd.) foi transformada com o produto de ligação resultante para obter os transformantes crescendo em uma placa de ágar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina. As colônias assim obtidas foram cultivadas em 30 um meio líquido de LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina em

37°C durante a noite, e o plasmídeo pBRgadP foi coletado das células bacterianas assim obtidas.

Depois disso, na mesma maneira que no exemplo 4, os genes codificando cada de tiolase, álcool isopropílico desidrogenase, CoA transferase e acetoacetato descarboxilase foram sequencialmente introduzidos, e o plasmídeo pGad-Iaaa foi coletado.

Pela transformação das células competentes de cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) com este plasmídeo pGad-Iaaa, seguido pelo cultivo do mesmo em uma placa de ágar de LB Broth Miller contendo 50 µg/mL de ampicilina em 37°C durante a noite, a cepa pGad-Iaaa/B de *Escherichia coli* foi obtida.

#### Exemplo 18

Produção de álcool isopropílico pela cepa pGly-Iaaa/B de *Escherichia coli* e pela cepa pGad-Iaaa/B usando recipiente de cultura de 1L

A produção de álcool isopropílico pela cepa pGly-Iaaa/B de *Escherichia coli* e pela cepa pGad-Iaaa/B usando um recipiente de cultura de 1L foi estudada na mesma maneira que no exemplo 5. Como resultado, após 24 horas de cultivo, a acumulação de álcool isopropílico em uma concentração de 3,1 g/l pela cepa pGly-Iaaa/B e em uma concentração de 2,6 g/l pela cepa pGad-Iaaa/B foram confirmadas. Cada valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento (500 mL) após o cultivo.

#### Exemplo 19

Produtividade de álcool isopropílico no cultivo de cepa pGAP-Iaaa/B em um volume de aeração de 1 vvm ou 2 vvm

Neste exemplo, o álcool isopropílico foi produzido usando dois aparelhos, cada qual é o mesmo que o aparelho 10 usado no exemplo 5 exceto a capacidade do recipiente de aprisionamento. Cada um dos recipientes de aprisionamento 5 40 aqui tinha uma capacidade de 2000 mL e água contida (água de aprisionamento) como o líquido de aprisionamento 42 em um volume de 2000 mL.

Como pré-cultivo, 25 mL de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 0,1 g/l de ampicilina colocados em um 10 frasco de Erlenmeyer foram usados, e a cepa pGAP-Iaaa/B de *Escherichia coli* foi inoculada ao mesmo, seguido pelo cultivo por 16 horas em uma temperatura de cultivo de 35°C com agitação em 120 rpm. O meio de pré-cultura inteiro foi inoculado em um recipiente de cultura de 1L contendo 475 mL 15 de meio de cultura de LB Broth Miller contendo 50 g/l de glicose e uma gota de adecanol, e o cultivo foi realizado. O cultivo foi realizado em uma taxa de agitação de 500 rpm e uma temperatura de cultivo de 35°C, e o pH do meio de cultura foi ajustado a 7,0 usando NaOH.

20 Subsequentemente, em um dos aparelhos de produção, a aeração da cultura foi começada injetando o ar do duto de injeção 16 no meio de cultura, tal que 1 vvm é alcançado. No outro aparelho de produção, dois dutos de injeção 16 foram usados, e a aeração da cultura foi começada injetando 25 o ar e gás de nitrogênio tal que 1 vvm para cada gás é alcançado para ter para o volume de aeração total seja 2 vvm. A exaustão do recipiente de cultura 12 foi borbulhada no líquido de aprisionamento no recipiente de aprisionamento 40.

30 Como resultado, após 24 horas de cultivo, a acumulação

de álcool isopropílico em uma concentração de 5,5 g/l pela amostra com o volume de aeração de 1 vvm e a em uma concentração de 3,3 g/l pela amostra com 2 vvm foram confirmadas. Cada valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento após o cultivo. A quantidade de álcool isopropílico na água de aprisionamento foi calculada ao multiplicar a concentração de álcool isopropílico em água por 4 para converter o valor na quantidade correspondente no meio de cultura.

#### Exemplo 20

Produtividade de álcool isopropílico em cultivar a cepa pIPA/B no volume de aeração de 1 vvm ou 0,75 vvm

O cultivo da cepa pIPA/B foi estudado na mesma maneira que no exemplo 3, exceto que a concentração de glicose foi mudada a 40 g/l, e uma solução aquosa de amônia foi usada como o ajustador de pH. Cada recipiente de aprisionamento 40 tinha uma capacidade de 500 mL, e a água contida (água de aprisionamento) como o líquido de aprisionamento 42 em uma quantidade de 500 mL. O ar foi usado como um gás de aeração, e o volume de aeração do mesmo foi ajustado a 1 vvm ou 0,75 vvm. Como resultado, após 54 horas de cultivo, a acumulação de álcool isopropílico em uma concentração de 2,8 g/l pela amostra com o volume de aeração de 1 vvm e a em uma concentração de 2,8 g/l pela amostra com o volume de aeração de 0,75 vvm foram confirmadas. Cada valor medido é a soma do teor de álcool isopropílico no meio de cultura e o em água de aprisionamento após o cultivo.

Dos resultados nos exemplos 19 e 20, os presentes inventores descobriram que um volume de aeração pode ser

otimizado para a produção de álcool isopropílico. Descobrimos que o volume total de aeração injetado ao recipiente de cultura pode ser preferivelmente 0,75 a 1 vvm comparando a 2 vvm para a produção de álcool isopropílico.

5 Assim, de acordo com modalidades da invenção, menos álcoois de subproduto são gerados, e o álcool isopropílico que é mais altamente purificado pode ser convenientemente e eficientemente produzido somente por purificação simples sem exigir uma etapa para separar álcoois de subproduto.

10 O álcool isopropílico obtido pela invenção pode ser aplicado para vários usos. Por exemplo, pode preferivelmente ser usado como um material bruto para a produção de propileno.

A divulgação do Pedido de Patente Japonês N°. 2007-  
15 181571 é incorporada aqui por referência em sua totalidade.

Todas literaturas, pedidos de patente e padrões técnicos descritos no presente relatório descritivo são incorporados no presente relatório descritivo por referência, a mesma extensão que nos casos onde as  
20 literaturas individuais, pedidos de patente e padrões técnicos são concretamente e individualmente descritos para serem incorporados por referência.

### REIVINDICAÇÕES

1. Bactéria produtora de álcool isopropílico recombinante do gênero *Escherichia* **caracterizada** pelo fato de que uma atividade de acetoacetato descarboxilase, uma  
5 atividade de álcool isopropílico desidrogenase, uma atividade de CoA transferase e uma atividade de tiolase foram proporcionadas pela introdução de genes codificando uma acetoacetato descarboxilase, uma álcool isopropílico desidrogenase, uma CoA transferase e uma tiolase utilizando  
10 a tecnologia recombinantes de genes; e

a referida bactéria produtora de álcool isopropílico recombinante pode produzir álcool isopropílico a partir de de um material derivado de planta, em que o material derivado de planta é selecionado do grupo consistindo em um  
15 órgão, tal como uma raiz, caule, pecíolo, ramo, folha, flor ou semente, um corpo de planta contendo estes, um produto de degradação de cada um destes órgãos de planta, ou as fontes de carbono obtidas dos corpos de planta ou órgãos de planta ou produtos de degradação dos mesmos;

em que a atividade álcool isopropílico desidrogenase é obtida pela introdução de genes que codificam enzimas derivadas de uma bactéria do gênero *Clostridium*.

2. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que cada uma da atividade de  
25 acetoacetato descarboxilase, atividade de álcool isopropílico desidrogenase, atividade de CoA transferase e atividade de tiolase são obtidas pela introdução de um gene codificando uma enzima derivada de pelo menos uma selecionada do grupo consistindo de uma bactéria do gênero  
30 *Clostridium* e uma bactéria do gênero *Escherichia*.

3. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a atividade de acetoacetato descarboxilase e a atividade de álcool isopropílico desidrogenase são respectivamente obtidas pela introdução

5 de genes codificando as enzimas derivadas de uma bactéria ou bactérias do gênero *Clostridium*, e a atividade de CoA transferase e atividade de tiolase são respectivamente obtidas pela introdução de genes codificando uma enzima derivada de uma bactéria ou bactérias do gênero *Escherichia*.

10 4. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a atividade de acetoacetato descarboxilase é obtida pela introdução de um gene codificando uma enzima derivada de *Clostridium acetobutylicum*, a atividade de álcool isopropílico desidrogenase é obtida pela introdução de um gene codificando uma enzima derivada de *Clostridium beijerinckii*,

15 e a atividade de CoA transferase e a atividade de tiolase são respectivamente obtidas pela introdução de genes codificando enzimas derivadas da *Escherichia coli*.

20 5. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que cada uma da atividade de acetoacetato descarboxilase, atividade de álcool isopropílico desidrogenase, atividade de CoA transferase e atividade de tiolase é respectivamente obtida pela

25 introdução de um gene codificando uma enzima derivada de uma bactéria do gênero *Clostridium*.

6. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a bactéria é *Escherichia coli*.

30 7. Método para produzir álcool isopropílico

**caracterizado** pelo fato de que compreende produzir o álcool isopropílico de um material derivado de planta usando a bactéria produtora de álcool isopropílico como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6;

5 em que o material derivado de planta é selecionado do grupo consistindo em um órgão, tal como uma raiz, caule, pecíolo, ramo, folha, flor ou semente, um corpo de planta contendo estes, um produto de degradação de cada um destes órgãos de planta, ou as fontes de carbono obtidas dos  
10 corpos de planta ou órgãos de planta ou produtos de degradação dos mesmos.

8. Método para produzir álcool isopropílico, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionar, a uma mistura compreendendo a  
15 bactéria produtora de álcool isopropílico, um composto contendo nitrogênio, em que o composto contendo nitrogênio são sais de amônio, tais como sulfato de amônio e nitrato de amônio, gás de amônia e amônia aquosa.

9. Método para produzir álcool isopropílico, de acordo  
20 com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionar, a uma mistura compreendendo a bactéria produtora de álcool isopropílico, um composto contendo nitrogênio que pode produzir um íon de amônio em água, tal que um teor do composto contendo nitrogênio está  
25 em uma faixa de 0,04% a 10,6% (peso/peso) em termos de % por massa dos átomos de nitrogênio totais, com relação à massa total do meio de cultura na mistura no início de cultivo,

em que o composto contendo nitrogênio é selecionado do  
30 grupo compreendendo sais de amônio, tais como sulfato de

amônio e nitrato de amônio, gás de amônia e amônia aquosa.

10. Método para produzir álcool isopropílico, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

5 cultivar a bactéria produtora de álcool isopropílico ao fornecer um gás à mistura compreendendo a bactéria produtora de álcool isopropílico; e

coletar o álcool isopropílico produzido pela cultura, em que o gás é selecionado do grupo compreendendo 10 oxigênio, o ar, e um gás misturado contendo um destes e um gás inerte, em que o gás inerte que pode ser usado inclui o gás N<sub>2</sub> e gases nobres selecionados de Ar, He, Ne, Kr, ou Xe.

11. Método para produzir álcool isopropílico, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de 15 que a quantidade de gás fornecida é 0,02 vvm a 2,0 vvm.

12. Método para produzir álcool isopropílico, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade de gás fornecida é 0,1 vvm a 1,5 vvm.

13. Método para produzir álcool isopropílico, de 20 acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a coleta compreende contatar, com um líquido de captura que captura o álcool isopropílico, o álcool isopropílico evaporado da cultura obtida no cultivo,

em que o líquido de captura é selecionado do grupo 25 compreendendo água e solventes orgânicos selecionados de tolueno, dimetilformamida e sulfóxido de dimetila.

14. Método para produzir álcool isopropílico, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que a coleta compreende liquefazer álcool isopropílico 30 evaporado seguido pelo contato do álcool isopropílico

liquefeito com um líquido de captura,

em que o líquido de captura é selecionado do grupo compreendendo água e solventes orgânicos selecionados de tolueno, dimetilformamida e sulfóxido de dimetila.

5

FIG. 1

