



INPI  
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Assinado  
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

## CARTA PATENTE N° PI 0909841-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** PI 0909841-0

**(22) Data do Depósito:** 10/03/2009

**(43) Data da Publicação do Pedido:** 17/09/2009

**(51) Classificação Internacional:** C12P 7/06; C12N 1/00; C12R 1/145.

**(30) Prioridade Unionista:** US 12/381,193 de 09/03/2009; US 61/064,506 de 10/03/2008.

**(54) Título:** MÉTODOS DE SUSTENTAÇÃO E DE PREVENÇÃO DE PERDA RÁPIDA DE CULTURA DE MICROORGANISMOS EM REATOR DE FERMENTAÇÃO DE SINGÁS EM CONCENTRAÇÃO DIMINUÍDA OU AUSÊNCIA DE VÁRIOS SUBSTRATOS

**(73) Titular:** INEOS BIO SA. Endereço: Avenue Des Uttins 3, CH-1180 Rolle, SUIÇA(CH)

**(72) Inventor:** STEPHENS S. ADAMS; SYRONA R. SCOTT; CHING-WHAN KO.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 10/03/2009, observadas as condições legais

**Expedida em:** 05/02/2019

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**“Métodos de Sustentação e de Prevenção de Perda Rápida de  
Cultura de Microorganismos em Reator de Fermentação de Singás  
em Concentração Diminuída ou Ausência de Vários Substratos”**

**Relatório Descritivo**

5

**Campo da Invenção**

A presente invenção é dirigida a aperfeiçoamentos nos métodos de fermentação microbiana para a produção de álcool a partir de um substrato gasoso contendo pelo menos um gás redutor que contenha pelo menos um microorganismo acetogênico.

10

**Histórico da Invenção**

Há numerosos métodos convencionais para a manutenção de culturas de microorganismos. Todavia, esses métodos sofrem de inúmeras deficiências. Persiste a necessidade de métodos adicionais mais eficazes para a manutenção de culturas de microorganismos na ausência de vários substratos em um processo de fermentação com gás de síntese.

Três cepas de acetogênicos (Drake, 1994) foram descritas para uso na produção de combustíveis líquidos a partir de gás de síntese: *Butyribacterium methylotrophicum* (Grethlein e colaboradores, 1990; Jain e colaboradores, 1994b); *Clostridium autoethanogenum* (Abrini e colaboradores, 1994); *Clostridium ljungdahlii* (Arora e colaboradores, 1995; Bariik e colaboradores, 1988; Barik e colaboradores 1990; e Tanner e colaboradores, 1993). Destas, a *Clostridium ljungdahlii* e a *Clostridium autoethanogenum* são conhecidas por converterem CO em etanol. A Patente 5,173,429 para Gaddy e colaboradores descreve a *Clostridium ljungdahlii* ATCC No. 49587, um microorganismo anaeróbi-

co que produz etanol e acetato a partir de CO e H. sub.20 e/ou CO. sub.2 e H.sub.2 em gás de síntese.

5 A Patente U.S. 5.192.673 para Jain e colaboradores revela uma cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum* e um processo de fabricação de butanol com essa cepa.

A Patente U.S. 5.593.886 para Gaddy e colaboradores revela a *Clostridium ljungdahlii* ATCC No. 55380. Este microorganismo consegue produzir anaerobicamente acetato e etanol, usando resíduo de gás (como gás de carbono) como substrato.

10 A Patente U.S. 5.807.722 para Gaddy e colaboradores revela o método e o equipamento para conversão de gases residuais em produtos úteis tais como ácidos orgânicos e álcool, usando bactérias anaeróbicas, tais como *Clostridium ljungdahlii* ATCC No. 55380.

15 A Patente U.S. 6.136.577 para Gaddy e colaboradores revela o método e equipamento para conversão de gases residuais em produtos úteis tais como ácidos orgânicos e álcool (particularmente etanol) usando bactérias anaeróbicas, tais como *Clostridium ljungdahlii* ATCC Nos. 55988 e 55989.

20 A Patente U.S. 6.136.577 para Gaddy e colaboradores revela o método e equipamento para conversão de gases residuais em produtos úteis tais como ácidos orgânicos e álcool (particularmente ácido acético), usando cepas anaeróbicas de *Clostridium ljungdahlii*.

25 A Patente U.S. 6.753.170 para Gaddy e colaboradores revela um processo de fermentação microbiana para a produção de ácido acético.

A Patente U.S. 7.285.402 para Gaddy e colaboradores revela um processo de fermentação microbiana anaeróbico para a

produção de álcool.

Outras cepas de acetogênicos também foram descritas para uso na produção de combustíveis líquidos a partir de gás de síntese, tais como: *Butyribacterium methylotrophicum* (Grethlein e colaboradores, 5 1990, *Appl. Biochem. Biotech.* **24**/24:875-884); e *Clostridium autoethanogenum* (Abrini e colaboradores, 1994, *Arch. Microbiol.* **161**:345-351).

Persiste uma necessidade na técnica da preservação de cultura em processos de fermentação com gás de síntese com concentração reduzida ou ausência de vários substratos. Existe uma necessidade de manter culturas no caso de várias interrupções do processo 10 industrial da produção de álcool. Particularmente, existe a necessidade de manter a cultura de microorganismos no caso de CO, H<sub>2</sub> ou CO e H<sub>2</sub> reduzidos em várias concentrações.

### **Sumário da Invenção**

15 A presente invenção relaciona-se com os métodos para manutenção de culturas de microorganismos em um reator de fermentação com gás de síntese em concentração reduzida ou ausência de vários substratos, incluindo: acréscimo de dióxido de carbono e opcionalmente, álcool; mantendo concentrações livres de ácido acético; e 20 realizando os passos mencionados acima dentro do tempo especificado.

A presente invenção também contempla um método para prevenção da perda rápida de cultura de microorganismos em um reator de fermentação por gás de síntese em concentração reduzida ou na ausência de vários substratos, incluindo: acréscimo de dióxido de carbono e opcionalmente, álcool; temperatura reduzida a partir da temperatura operacional; mantendo as concentrações livres de ácido acético; e realizando os passos mencionados acima dentro do tempo especificado.

A presente invenção também proporciona um método para manutenção de cultura de microorganismos em um reator de fermentação de gás de síntese, devido à concentração reduzida ou ausência de vários substratos em suprimento de gás, incluindo: acréscimo de 5 dióxido de carbono e opcionalmente, álcool; temperatura reduzida a partir da temperatura operacional; mantendo as concentrações livres de ácido acético; e realizando os passos mencionados acima dentro do tempo especificado.

Como uma modalidade da presente invenção, o álcool pode 10 ser utilizado como substrato. Embora vários substratos alternativos de crescimento tenham sido experimentados, nenhum foi tão bom quanto o álcool e nenhum foi tão prontamente disponibilizado como o álcool. Quando o suprimento de gás de síntese é restaurado, a cultura de microorganismos retorna prontamente ao uso de gás de síntese. Além 15 disso, como uma modalidade, usar somente acetato/álcool não oferece a oportunidade de outras bactérias se desenvolverem e poderem estar presentes no líquido da cultura ou na tubulação do processo. Assim, um substrato de crescimento como glicose estaria prontamente disponí- vel a quaisquer organismos presentes para seu crescimento.

20 A técnica anterior incluiria ajustes no caldo de cultura para manter uma baixa concentração de ácido acético. Esses ajustes incluem aumentar o pH e o fluxo de líquido para retirar o acetil. Como uma modalidade, a redução de temperatura para diminuir a atividade da cultura e usar o produto etanol e dióxido de carbono para devolver 25 energia à cultura, mantendo a viabilidade. Além disso, o conceito de substrato alternativo inédito.

Este é um aperfeiçoamento do processo, pois haverá 30 ocasiões em que o suprimento de gás será interrompido devido a algumas intervenções no suprimento do gaseificador, nos equipamentos de transporte, secagem, limpeza do gás ou qualquer outra unidade

envolvida na linha de suprimento de gás. Outra aplicação da presente invenção compreende o transporte do inóculo de um local para outro. Durante o transporte, a cultura pode não ter um suprimento de gás de síntese. Portanto, será necessário um substrato alternativo. Ter a 5 capacidade de manter a viabilidade durante 12 horas ou mais seria um aperfeiçoamento das capacidades do processo. Portanto, ter uma alternativa que seja econômica e tecnicamente viável resultaria na redução de interrupções e/ou inatividade da produção de álcool, além de inicializações e reinicializações na fábrica.

10

### Breve Descrição da Figura

A **Figura 1** é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade do fluxo do processo geral contemplado durante as operações normais da presente invenção. Embora o etanol esteja indicado no diagrama, outros tipos de álcool também são contemplados pela 15 presente invenção.

A **Figura 2** é um diagrama esquemático que ilustra as modalidades da presente invenção, mostrando as tendências com adição de dióxido de carbono, consumo de álcool e restauração de cultura.

20

A **Figura 3** é um diagrama esquemático que ilustra as comparações da presente invenção, demonstrando falta de consumo de álcool e falta de restauração de cultura.

### Descrição Detalhada da Invenção

#### Definições

25

A menos que de outra forma definido, os seguintes termos são usados ao longo deste Relatório Descritivo, conforme definidos como se segue.

O termo “cerca de” modificando qualquer quantidade refere-se à variação dessa quantidade encontrada em condições normais de manutenção de cultura de microorganismos, por exemplo, em laboratório, usina piloto ou local de produção. Por exemplo, uma quantidade de 5 um ingrediente empregado em uma mistura quando modificado por “cerca de” inclui a variação e o grau de cuidado normalmente empregados na avaliação de uma condição experimental em um local de produção ou laboratório. Por exemplo, a quantidade de um componente de um produto quando modificado “cerca de” inclui a variação entre os 10 lotes em vários experimentos na fábrica ou laboratório e a variação inerente no método analítico. Modificadas ou não por “cerca de”, as quantidades incluem os equivalentes a essas quantidades. Qualquer quantidade declarada aqui e modificada por “cerca de” também pode ser empregada na presente invenção como a quantidade que não foi 15 modificada por “cerca de”.

Exceto quando declarado de outra forma, o termo “acetato” é usado para descrever a mistura de ácido acético livre ou molecular e sal de acetato presente no caldo de fermentação. A proporção de ácido acético molecular para acetato depende do pH do sistema. Por exemplo, 20 com uma concentração constante de “acetato”, quanto menor for o pH, maior será a concentração de ácido acético molecular relacionada com sal de acetato.

O termo “acetogênio” ou “acetogênico” refere-se a uma bactéria que gera acetato como produto da respiração anaeróbica. Este 25 processo é diferente da fermentação de acetato, embora ambos ocorram na ausência de oxigênio e produzam acetato. Esses organismos também são referidos como bactérias acetogênicas, pois todos os acetogênios conhecidos são bactérias. Os acetogênios são encontrados em uma variedade de habitats, geralmente os anaeróbicos (falta de oxigênio). Os 30 acetogênios também podem utilizar vários compostos como fontes de

energia e carbono; a forma de metabolismo acetogênico mais pesquisada envolve o uso de dióxido de carbono como fonte de carbono e hidrogênio como fonte de energia.

Os termos “biorreator”, “reator” ou “biorreator de fermentação” incluem um dispositivo de fermentação que consiste em um ou mais vasos e/ou torres ou disposição de tubulação, que inclui o Reator de Tanque Agitado Contínuo (CSTR), o Reator de Células Imobilizadas (ICR), o Reator de Leito de Gotejamento (TBR), Coluna de Bolha, Fermentador de Elevador de Gás, Misturador Estático ou outro dispositivo adequado para contato entre gás e líquido. De preferência, para o método desta invenção, o biorreator de fermentação compreende um reator de crescimento que alimenta o caldo de fermentação para outro biorreator de fermentação, onde a maior parte do produto etanol é produzida.

“Concentração de células” neste Relatório Descritivo é baseado no peso de uma bactéria por litro de amostra. A concentração celular é avaliada diretamente ou por calibragem para uma correlação com densidade óptica.

O termo “método contínuo”, conforme aqui usado, refere-se a um método de fermentação que inclui alimentação contínua de nutrientes, suprimento de substrato, produção celular no biorreator, remoção celular (ou purificação) a partir do biorreator e remoção de produto. Este suprimento contínuo, remoção ou produção celular, podem ocorrer na mesma linha ou em linhas diferentes. Um processo contínuo resulta na obtenção de um estado estacionário dentro do biorreator. Por “estado estacionário” significa-se que todas as variáveis disponíveis (suprimentos, concentração de substrato e nutrientes mantidos no biorreator, concentração celular no biorreator e remoção celular do biorreator, remoção de produto do biorreator, assim como as variáveis condicionais tais como temperatura e pressão) são constantes

ao longo do tempo.

A “produtividade de etanol” é a produtividade volumétrica de etanol, calculada como a proporção de concentração de etanol em estado estacionário e o tempo de retenção de líquido (LRT) em sistemas 5 contínuos ou a proporção de concentração de etanol e o tempo exigido para produzir essa concentração em sistemas de bateladas. A frase “alta produtividade de etanol” descreve uma produtividade volumétrica de etanol maior do que 10 g/L por dia.

“Excesso de H<sub>sub</sub>.2” é disponibilizado para a produção de 10 etanol quando a proporção dos moldes de H<sub>sub</sub>.2 no gás de alimentação para a soma de duas vezes os moles de CO convertidos e três vezes os moles de CO<sub>sub</sub>.2 convertidos for maior do que 1.0. Se essa proporção for menor do que 1.0, o excesso de H<sub>sub</sub>.2 não está disponível e o etanol somente poderá ser produzido por meio de um mecanismo 15 de controle diferente.

O termo “fermentação” significa a fermentação de CO para a produção de álcool e acetato. Várias bactérias anaeróbicas são conhecidas serem capazes de realizar a fermentação de CO para álcoois, incluindo butanol e etanol e ácido acético, e são adequadas para uso no 20 processo da presente invenção. Exemplos dessas bactérias que são adequados para uso na invenção incluem aquelas do gênero *Clostridium*, tais como as cepas de *Clostridium lungdahlii*, incluindo as descritas em WO 00/68407, EP 117309, nas Patentes 5.173.429, 5.593.886, e 6.368.819, WO 98/00558 e WO 02/08438, e *Clostridium autoethanogenum* (Aribini e colaboradores, *Archives of Microbiology* **161**: pp 345-25 351). Outras bactérias adequadas incluem aquelas do gênero *Moorella*, incluindo *Moorella* sp HUC22-1, (Sakai e colaboradores, *Biotechnology Letters* **29**: pp 1607-1612), e aquelas do gênero *Carboxydotothermus* (Svetlichny, V. A., Sokolova, T. G. e colaboradores (1991), *Systematic 30 and Applied Microbiology* **14**: 254-260). As revelações de cada uma

dessas publicações são totalmente incorporadas por referência. Além disso, outras bactérias anaeróbicas acetogênicas poderão ser selecionadas para uso no processo da invenção por uma pessoa capacitada. 5 Também será observado que uma cultura mista de duas ou mais bactérias pode ser utilizada no processo da presente invenção. Um microorganismo adequado para uso na presente invenção é *Clostridium autoethanogenum*, que está disponível comercialmente a partir de DSMZ e tendo as características de identificação de DSMZ, com o número de depósito DSMZ 10061. A fermentação poderá ser realizada em qualquer 10 biorreator adequado, tal como um reator de tanque de agitação contínua (CTSR), um reator de coluna de bolha (BCR) ou um reator de leito de gotejamento (TBR). Além disso, em algumas modalidades preferidas da invenção, o biorreator pode incluir um primeiro reator de crescimento em que os microorganismos são cultivados e um segundo reator, de 15 fermentação, para o qual o caldo de fermentação do reator de crescimento é suprido e no qual grande parte do produto de fermentação (etanol e acetato) é produzida.

O termo “substratos gasosos”, conforme aqui usado, representa CO sozinho, CO e H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, ou CO, 20 CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, opcionalmente misturados com outros elementos ou compostos, incluindo nitrogênio e metano no estado gasoso. Esses substratos gasosos incluem gases ou fluxos que são normalmente liberados ou exauridos para a atmosfera quer diretamente quer por meio de combustão. Em algumas modalidades deste método, o substrato 25 gasoso inclui CO. Em outras modalidades deste método, o substrato gasoso inclui CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Ainda em outras modalidades, o substrato gasoso inclui CO e H<sub>2</sub>. Em uma modalidade particularmente preferida, o substrato gasoso inclui CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Ainda outros substratos da invenção podem incluir os componentes 30 mencionados acima e pelo menos um gás de nitrogênio, CO<sub>2</sub>, etano e metano. Assim, esses substratos incluem o que é convencio-

nalmente referido como “syngas” ou gás de síntese a partir da gaseificação de produtos de carbono (incluindo metano), além de gases residuais a partir de uma variedade de métodos industriais.

A frase “alta concentração de etanol” representa um valor 5 maior do que 10 g/L, preferencialmente maior do que 15 g/L etanol no caldo de fermentação ou uma proporção de produto de etanol para acetato de 5:1 ou mais.

Os termos “substrato limitador” ou “nutriente limitador” definem uma substância no meio nutriente ou substrato gasoso que, 10 durante o crescimento da cultura de bactérias no biorreator, é consumida pela cultura a um nível que não mais suporta o estado estacionário ou o crescimento estável de bactérias no biorreator. Todas as outras substâncias do meio do nutriente ou substrato de gás estão presentes em excesso e são “não limitadoras”. A evidência desta limitação está no 15 aumento da taxa de adição do substrato limitador na cultura, isto é, na taxa de abastecimento de nutrientes ou taxa de suprimento de gás para a cultura ocasionando um aumento correspondente dos valores de absorção de gás (mmol/mín. de gás) devido a um aumento na densidade celular.

20 O termo “microorganismo” inclui bactérias, fungos, arqueias e protistas; plantas microscópicas (chamadas de algas verdes); e animais tais como plânctons, planárias e amebas. Alguns incluem também os vírus, porém outros não consideram estes como seres não vivos. Os microorganismos vivem em todas as partes da biosfera onde 25 houver água, incluindo solo, nascentes, leito do oceano, atmosfera, nas profundezas das rochas dentro da Terra. Os microorganismos são essenciais para a reciclagem de nutrientes nos ecossistemas, pois eles agem como decompósitos. Os micróbios também são explorados pelas pessoas na biotecnologia, tanto no campo dos alimentos tradicionais 30 como na preparação de bebidas, e nas tecnologias modernas baseadas

na engenharia genética. É encarado que microorganismos mistos que possam ou não conter cepas de vários microorganismos, serão utilizados na presente invenção. É ainda encarado que a tecnologia de recombinação de DNA consiga criar microorganismos usando cepas de microorganismos existentes. Em algumas modalidades da presente invenção, várias cepas exemplificativas de *C. ljungdahlii* incluem a cepa PETC (Patente U.S. 5.173.429); cepa ERI2 (Patente US 5.593.886) e cepas C-01 e O-52 (Patente U.S. 6.136.577). Essas cepas foram incluídas na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, 5 Manassas, Va. 20110-2209, sob o Acesso 55383 (antigo ATCC No. 49587), 55380, 55988, e 55989 respectivamente. Cada uma das cepas de *C. ljungdahlii* é uma bactéria anaeróbica, gram-positiva, com um conteúdo de nucleotídeo de guanina e citosina (G+C) de cerca de 22%. Essas bactérias usam uma variedade de substratos para crescimento, 10 mas não metanol nem lactato. Essas cepas diferem na sua tolerância a CO, valores específicos de absorção de gás e produtividades específicas. Nas cepas “selvagens” encontradas na natureza, é observada uma 15 produção de etanol muito baixa. Cepas de *C. ljungdahlii* operam de forma ideal a 37 graus C e geralmente têm uma proporção de produção de etanol para acetila (referindo-se ao ácido acético livre ou molecular e sais de acetato) de aproximadamente 1:20 (1 parte de etanol para 20 partes de acetil) em estado “selvagem”. As concentrações de etanol são 20 de somente 1-2 g/L. Embora essa capacidade de produção de etanol seja importante em razão da baixa produção de etanol, a bactéria “selvagem” não pode ser utilizada para a produção comercial de etanol. 25 Com menos manipulação de nutrientes, as cepas de *C. ljungdahlii* foram utilizadas para produzir etanol e acetila com uma proporção de 1:1 (partes iguais de etanol e acetil), mas a concentração de etanol é menor do que 10 g/L, um nível que resulta em baixa produtividade, abaixo de 30 10 g/L por dia. Além disso, a estabilidade da cultura é um problema, primeiramente devido à concentração relativamente alta (8-10 g/L) de acetila (2,5-3 g/L, ácido acético molecular), em combinação com a

presença de etanol. Além disso, conforme a quantidade de gás é aumentada no esforço de produzir mais etanol, a cultura é inibida, primeiro, pelo ácido acético molecular e, depois, pelo CO. Como resultado, a cultura torna-se instável e falha em capturar o gás e produzir 5 um produto adicional. Além disso, pesquisas prévias feitas pelos inventores mostraram dificuldades na produção de mais do que 2:1 de proporção de etanol em uma operação de estado estacionário. Ver Klasson e colaboradores, 1990 *Applied Biochemistry and Biotechnology, Proceedings of the 11.sup.th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 24/25: 857; Phillips e colaboradores, 1993 *Applied Biochemistry and Biotechnology, Proceedings of the 14.sup.th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 39/40: 559, entre outros. Um grande número de documentos descreve o uso da bactéria anaeróbica, 10 diferente da *C. ljungdahlii*, na fermentação de açúcares que não consumam CO, CO<sub>sub</sub>.2 e H<sub>sub</sub>.2 para produzir solventes. Numa tentativa 15 de proporcionar altos rendimentos de etanol, foi alterada uma variedade de parâmetros, que inclui: tipos de nutrientes, microorganismo, adição específica de agentes redutores, variações de pH e a adição de gases exógenos. Ver Rothstein e colaboradores, 1986 *J. Bacterid.*, **165**(1):319- 20 320; Lovitt e colaboradores, 1988 *J. Bacterid.*, **170**(6):2809; Taherzadeh e colaboradores, 1996 *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**:176.

O termo “cepas mistas” significa uma cultura mista de dois ou mais microorganismos. Essas “cepas mistas” dos microorganismos enumerados aqui são utilizadas nos métodos desta invenção.

25 O termo “estado natural” descreve qualquer composto, elemento ou caminho que não possua elétrons ou prótons adicionais que estejam normalmente presentes. Inversamente, o termo “estado de redução” descreve qualquer composto, elemento ou caminho que possua excesso de um ou mais elétrons. O “estado de redução” é obtido 30 por meio de adição de um ou mais elétrons ao “estado natural”, isto é,

baixando o potencial redox do caldo de fermentação.

“Meio nutriente” geralmente é usado para descrever o meio convencional para cultura de bactérias que contenha vitaminas e minerais suficientes para permitir o crescimento de uma bactéria selecionada. Os açúcares não estão incluídos neste meio. Os componentes de uma variedade de meios nutrientes adequados para uso desta invenção são conhecidos e descritos em publicações anteriores, incluindo de seus inventores. Ver a fórmula do meio nutriente descrita na International Patent Application No. WO08/00558; Patente US 5.807.722; Patente US 5.593.886 e Patente US 5.821.111, além das publicações identificadas acima. De acordo com a presente invenção, um típico meio nutriente laboratorial para a produção de acetato a partir de CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> contém 0,9 mg/L de pantotenato de cálcio. Porém, um meio nutriente típico para a produção de etanol a partir de CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> contém 0,02 mg/L de pantotenato de cálcio.

O termo “gás redutor” significa um ou ambos CO ou H<sub>2</sub>. A frase “uma quantidade de gás redutor maior do que o necessário para crescimento de bactérias” representa a quantidade de gás redutor que excede a quantidade que a bactéria pode utilizar para seu crescimento ou metabolismo, conforme os ingredientes do meio nutriente. Essa quantidade pode ser obtida por meio do aumento da quantidade líquida de gás redutor ou por redução de ingredientes de nutrientes essenciais de redução, de forma que a quantidade em excesso de gás seja obtida sem aumentar o gás, ou por meio do aumento da quantidade de gás liberado para a bactéria. Quando a bactéria fica exposta a uma maior quantidade de gás redutor necessário para o seu crescimento, ela responderá através do aumento da produção de etanol. “Bactérias sujeitas” são bactérias anaeróbicas acetogênicas (ou facultativas) capazes de converter CO e água ou H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> em etanol ou

produtos de ácido acético. As bactérias úteis, de acordo com esta invenção, incluem, sem limitação: *Acetogenium kivui*, *Acetobacterium woodii*, *Acetoanaerobium noterae*, *Clostridium aceticum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *C. acetobutylicum*, *C. thermoaceticum*, *Eubacterium limosum*, *C. ljungdahlii PETC*, *C. ljungdahlii ERI2*, *C. ljungdahlii C-Ol*, *C. ljungdahlii 0-52*, e *Peptostreptococcus productus*. Outras bactérias anaeróbicas acetogênicas são selecionadas para uso neste métodos por uma pessoa competente na técnica.

O termo “syngas” significa o gás de síntese que é o nome dado a uma mistura de gás que contenha quantidades variáveis de monóxido de carbono e hidrogênio. Exemplos de métodos de produção incluem a reformação a vapor do gás natural ou hidrocarbonetos líquidos para a produção de hidrogênio, gaseificação de carvão e, em alguns tipos de instalações de gaseificação de rejeitos em energia. O nome vem de seu uso como intermediário na criação de gás natural sintético (SNG) e para produção de amônia e metanol. O syngas também é utilizado como intermediário na produção de petróleo sintético para uso como combustível ou lubrificante por meio da síntese de Fischer-Tropsch e, previamente, no processo de metanol para gasolina da Mobil. O Syngas consiste principalmente em hidrogênio, monóxido de carbono e quase sempre em dióxido de carbono e possui menos da metade da densidade energética do gás natural. O syngas é um combustível geralmente utilizado como fonte de combustível ou como intermediário para a produção de outros compostos químicos.

### **da Presente Invenção**

A presente invenção relaciona-se com métodos para manutenção de cultura de microorganismos num reator de fermentação por gás de síntese com concentração reduzida ou ausência de vários

substratos, compreendendo: acréscimo de dióxido de carbono e opcionalmente, álcool; manutenção da concentração de ácido acético livre menor do que 5 g/L; e realização dos passos acima mencionados dentro de 0-30 minutos, dentro de 0-15 minutos e dentro de 15-30 minutos.

5 A presente invenção também contempla um método para evitar a perda rápida de cultura de microorganismos em um reator de fermentação por gás de síntese com concentração reduzida ou ausência de vários substratos, compreendendo: acréscimo de dióxido de carbono e opcionalmente álcool; redução de temperatura a partir da temperatura 10 opcional para entre 0-25 graus C, enquanto se mantém a temperatura entre 0-25 C; manutenção da concentração de ácido acético livre menor do que 5 g/L; e realização dos passos mencionados acima entre 0-30 minutos, entre 0-15 minutos e entre 15-30 minutos.

15 A presente invenção proporciona também um método para manutenção de cultura de microorganismos em um reator de fermentação com gás de síntese devido a uma concentração reduzida ou ausência de vários substratos no suprimento de gás, incluindo: acréscimo de dióxido de carbono e opcionalmente, álcool; redução de temperatura da temperatura opcional entre 0-25 graus C, enquanto mantém a temperatura 20 entre 0-25 C; manutenção da concentração de ácido acético livre menor do que 5 g/L; e realização dos passos mencionados acima entre 0-30 minutos, entre 0-15 minutos e entre 15-30 minutos.

25 Como uma modalidade, essa manutenção da cultura de microorganismos abrange a duração de aproximadamente 0-30 horas. Como uma modalidade, o pH pode ser mantido no limite de 3.5-5.6. É ainda contemplado que uma solução de bicarbonato seja acrescentada para controle de pH. A solução de bicarbonato pode incluir: bicarbonato de amônia, bicarbonato de sódio e/ou bicarbonato de potássio. Uma modalidade da presente invenção proporciona um método de remoção 30 opcional do referido dióxido de carbono para o citado reator. Além disso,

como uma modalidade, é proporcionada a opção de acréscimo de nutrientes nesse reator. A presente invenção proporciona a opção de acréscimo de nutrientes nesse reator.

Outras modalidades da presente invenção proporcionam o álcool, incluindo um ou mais dos seguintes: etanol, butanol, etanol e butanol.

Opcionalmente, a temperatura pode ser reduzida a partir da temperatura opcional entre 0-25 graus C, mantendo a temperatura entre 0-25 C; opcionalmente água pode ser adicionada a esse reator.

Esta água pode incluir água fresca, água aditivada, água reciclada, água destilada, água deionizada ou suas combinações.

A presente invenção contempla um método em que essas culturas de microorganismos contenham pelo menos uma bactéria acetogênica. A cultura de microorganismos pode incluir uma ou mais cepas selecionadas a partir de *Clostridium*, *Moorella* e *Carboxydothermus* ou suas modificações genéticas.

Como uma modalidade, o microorganismo pode incluir *Clostridium ljungdahlii* selecionada a partir das cepas que incluem PETC, ERI-2, 0-52 e C-Ol ou suas combinações.

A presente invenção também proporciona um método em que a cultura de microorganismos é retornada às condições de pré-suspensão, incluindo o acréscimo de gás de síntese.

Opcionalmente, como modalidades, a presente invenção pode oferecer: remoção de permeatos; limpeza desse reator com gás inerte ou manutenção da baixa agitação para manter os sólidos em suspensão.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção são

melhor descritos na descrição detalhada seguinte.

As bactérias acetogênicas e autotrópicas que utilizam monóxido de carbono e/ou hidrogênio e dióxido de carbono (gás de síntese) para produção de álcool exigem um suprimento constante de 5 gás para a produção de álcool. Um produto essencial para a produção do etanol é o ácido acético, que pode ser intercelular e extracelular. Sem um boa fonte de gás de síntese, é produzida uma quantidade limitada de álcool a favor do ácido acético.

Durante as condições em que houver gás reduzido ou 10 nenhum gás para a produção do produto, o ácido acético, a cultura pode converter o álcool de volta a ácido acético na presença do dióxido de carbono. O etanol já está presente na cultura e está pronto para uso quando houver gás de síntese limitado ou nenhum. Álcool adicional pode também ser fornecido conforme necessário. O dióxido de carbono 15 pode ser adicionado pela oxigenação de gás CO<sub>2</sub> na cultura ou pode ser formado no caldo de cultura por meio do acréscimo de bicarbonato. O bicarbonato de sódio pode ser utilizado na fermentação para manter o pH desejado e está, portanto, prontamente disponível. No caldo de cultura ácido, o tampão de bicarbonato reage para formar o dióxido de 20 carbono. O dióxido de carbono formado é, então, disponibilizado às bactérias para retornar o álcool para o estado de ácido acético.

O desvio de álcool para ácido acético na presença do dióxido de carbono é um processo relativamente rápido. Os microorganismos 25 tais como *Clostridium ljungdahlii* são limitados na concentração de ácido acético livre que possa estar presente no caldo de cultura. São necessárias algumas medidas para controlar a concentração de ácido acético livre durante a redução ou perda de gás de síntese. Um desses métodos de controle pode ser a manipulação da temperatura. A temperatura aumentada, dentro do limite mesofílico, aumenta a atividade da 30 cultura. Ao passo que a temperatura reduzida no caldo de fermentação

reduz essa atividade. Portanto, a redução de temperatura é útil para retardar a atividade da cultura durante condições de gás reduzido ou nenhum gás, resultando numa produção de ácido mais lenta. Outro método de controle do ácido acético é modificar o pH da cultura. O 5 equilíbrio da acetila para ácido acético é controlado em parte pelo pH. Aumentar o pH durante a interrupção do suprimento de gás de síntese permite que a concentração total de acetila, além do ácido acético, seja maior, enquanto mantém uma concentração de ácido mais baixa.

Um terceiro método com potencial para controlar a concentração de ácido acético é um fluxo de líquido aumentado através do sistema. Conforme a concentração de ácido livre aumenta, o aumento do fluxo de um líquido para dentro do sistema com um aumento na purga de permeato lavará mais ácido livre para fora da cultura, ao mesmo tempo em que impede que desapareçam células indesejadas. O 10 líquido adicional para dentro do sistema pode ser um fluxo de água adicional ou um aumento no fluxo da corrente de nutrientes. O 15

### **Descrição Detalhada do Processo**

#### **Sob Condições Normais de Operação**

A presente invenção envolve os métodos para a fermentação 20 anaeróbica de substratos gasosos que contêm um ou mais redutores, particularmente os componentes gasosos de resíduos industriais e gases sintéticos (por exemplo, CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>) para etanol. Estes métodos resultam em produtividades de etanol muito maiores do que 10 g/L por dia, por meio da manipulação das rotas biológicas das 25 bactérias sujeitas. Um método da invenção provoca uma abundância de NAD(P)H sobre NAD(P). A oxidação de NAD(P)H para NAD(P) provoca a produção de ácido acético pela cultura a ser reduzida a etanol. Alternativamente, outros métodos para a produção de altas concentrações de etanol em uma fermentação desta invenção envolvem a redução do

potencial redox no caldo de fermentação, reduzindo dessa maneira o ácido acético para etanol. Os métodos desta invenção produzem concentrações mais altas de etanol (isto é, maiores do que 10 g/L e preferencialmente maiores do que 15g/L) e baixas concentrações de 5 acetato (isto é, menores do que 5 g/L de ácido acético livre no biorreator). Estes métodos também mantêm e controlam as condições do método para a produção contínua de etanol e ácido acético para ajudar o sistema a se recuperar rapidamente de problemas com o método. Além disso, os métodos desta invenção ajudam a evitar a aclimatação 10 da cultura a baixa concentração de nutrientes, o que pode ser prejudicial para o desempenho da cultura. A presente invenção proporciona um método comercial viável para a produção de etanol.

### **As Rotas Biológicas Utilizadas no Método Desta Invenção**

#### **Sob Condições Operacionais Normais**

15 Sem querer ficar limitado pela teoria, os inventores teorizam que os métodos para o aumento da produção anaeróbica de etanol a partir dos métodos aqui descritos estão baseados nas rotas biológicas que envolvem a conversão de NAP(P)H para NAD(P) nos ciclos básicos do caminho acetogênico para o crescimento autotrópico. A invenção 20 envolve a manipulação dessas rotas para permitir a produção contínua e a manutenção de altas concentrações de etanol com baixas concentrações de acetato, sob condições operacionais estáveis, proporcionando, dessa maneira, métodos comerciais úteis para a produção de etanol a partir de gases industriais. O envolvimento essencial de NAD(P)H para 25 NAD(P) nas rotas biológicas é descrito como se segue: a produção de etanol a partir de componentes gasosos tais como CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> ocorre num método biológico de três etapas. Na primeira etapa, os substratos CO e H<sub>2</sub> são oxidados e, quando isso ocorre, liberam NAD(P)H: NAD(P).fwdarw.NAD(P)H



Os produtos da primeira etapa são convertidos em ácido acético, uma etapa que requer NAD(P)H:  $\text{NAD(P)H} \xrightarrow{\text{fwdarw}} \text{NAD(P)}$   $\text{CO} + \text{CO}_{\cdot} \text{sub.2} + 6\text{H}_{\cdot} \text{sup.} + \xrightarrow{\text{fwdarw}} \text{CH}_{\cdot} \text{sub.3COOH} + \text{H}_{\cdot} \text{sub.2O}$ . Finalmente, caso o excedente de NAD(P)H estiver disponível porque a reação da primeira etapa ocorreu mais rapidamente do que a reação da segunda etapa, o ácido acético é reduzido a etanol.  $\text{NAD(P)H} \xrightarrow{\text{fwdarw}} \text{NAD(P)}$   $\text{CH}_{\cdot} \text{sub.3COOH} + 4\text{H}_{\cdot} \text{sup.} + \xrightarrow{\text{fwdarw}} \text{C}_{\cdot} \text{sub.2H}_{\cdot} \text{sub.5OH} + \text{H}_{\cdot} \text{sub.2O}$ . Assim, a disponibilidade do excedente de NAD(P)H a partir da oxidação dos substratos leva à produção de etanol a partir de ácido acético.

Há dois ciclos conhecidos no processo acetogênico: (1) o ciclo de acetil-CoA e (2) o ciclo de THF, em que  $\text{CO}_{\cdot} \text{sub.2}$  é reduzido a um grupo de metil. A sequência para a geração de etanol e ácido acético está ilustrada em J. R. Phillips e colaboradores, 1994 *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **45/46**:145. O ciclo Acetil-CoA possui um ciclo interno, aqui referido como ciclo CO. Como o ciclo de CO normalmente reage no sentido horário, a ferredoxina é reduzida. A ferredoxina também pode ser reduzida por  $\text{H}_{\cdot} \text{sub.2}$ , uma vez que ela é oxidada sobre a enzima hidrogenase. Como resultado, o ciclo Acetil-CoA também reage no sentido horário e a ferredoxina é oxidada. Caso o ciclo interno de CO e o ciclo de acetil-CoA reajam com as mesmas velocidades, a ferredoxina entra num estado de equilíbrio. Se, todavia, os dois ciclos não ocorrerem com a mesma velocidade, isto é, o ciclo de CO reage mais rapidamente do que o ciclo Acetil-CoA, acumula-se a ferredoxina reduzida. Também com o excesso de  $\text{H}_{\cdot} \text{sub.2}$ , a ferredoxina reduzida pode também ser produzida em excesso. Este excesso de ferredoxina reduzida faz que o NAD(P) seja regenerado (reduzido) para NAD(P)H, o que acumula um excesso que deve ser aliviado ao equilíbrio e, ao fazê-lo, reduz o ácido acético a etanol.

necessário para uma cultura contínua; portanto, não pode ser parado completamente. Reduzir a velocidade do ciclo de THF também serve para ocasionar uma proporção maior de NAD(P)H para NAD(P). O NAD(P)H é oxidado em dois locais. Ao limitar essa oxidação, que poderia 5 manter a proporção total celular NAD(P)H para NAD(P) em equilíbrio, o NAD(P)H é utilizado para reduzir o ácido acético a etanol.

Um segundo método básico de fazer a redução do ácido acético a etanol é reduzir diretamente o potencial redox do caldo de fermentação. Um estado reduzido suficientemente mais baixo do que o 10 estado natural da cultura NAD(P)H faz que ela esteja em abundância e promova a redução do ácido acético a etanol.

### **Métodos da Operação Normal**

As etapas básicas do método incluem o seguinte: um método de fermentação contínua com recuperação do produto é descrito 15 por referência à Figura 1. Um fluxo contínuo de substrato de gás 1, compreendendo pelo menos um gás redutor, por exemplo, CO ou H<sub>2</sub>. É suprido com uma taxa de suprimento de gás selecionado e um fluxo contínuo de meio nutriente 2 em fase líquida a uma taxa de suprimento de nutriente selecionada são fornecidos a um biorreator de 20 fermentação 3, contendo uma bactéria sujeita. No biorreator 3, o meio e o substrato gasoso são fermentados pela bactéria para a produção de etanol e ácido acetato. Uma vez uma concentração celular estável seja obtida sob condições de estado estacionário, os componentes do sistema contínuo são manipulados para diminuir o potencial de 25 redução ou aumentar a proporção de NAD(P)H para NAD(P), no caldo de fermentação, enquanto mantém a concentração de ácido acético no biorreator menor do que 5 g/L. Os métodos desta invenção foram criados para permitir e manter a produção de etanol e acetato no caldo de fermentação de tal modo que a produtividade de etanol seja maior do 30 que 10 g/L por dia, com uma proporção entre etanol e acetato de 1:1 e

20:1. Em uma modalidade, essa proporção deverá ser maior do que 3:1. Em outra modalidade, essa proporção deverá ser maior do que 5:1. Ainda em outra modalidade, essa proporção deverá ser maior do que 10:1. Ainda em outra modalidade, essa proporção deverá ser maior do que 5 que 15:1. O método desta invenção é alternativamente eficaz na intensificação das condições estáveis (estado estacionário) para a produção de altas concentrações de etanol (15-35 g/L etanol) e baixas concentrações de acetato (0-5 g/L acetato), isto é, a proporção entre etanol e acetato de 3:1 ou mais, de CO, CO<sub>2</sub>, e H<sub>2</sub> com boa 10 estabilidade do método.

Periodicamente, durante o curso dos métodos desta invenção, amostras do líquido são retiradas para determinar a proporção por um método de ensaio convencional. Por exemplo, as células são separadas a partir da amostra, por centrifugação e a amostra isenta de 15 células é, então, sujeita a um método de ensaio, tal como o método preferido de cromatografia gasosa. Todavia, outros métodos de ensaio convencionais são selecionados por alguém capacitado na técnica. As etapas opcionais adicionais do método são adicionadas para conseguir e/ou manter a proporção.

20 As etapas utilizadas para manipular os componentes do sistema e manter e/ou obter a produtividade desejada de etanol ou a proporção etanol para acetato inclui pelo menos uma ou mais combinações das seguintes etapas: alterar o conteúdo do meio nutriente, a velocidade de suprimento do gás, a velocidade de alimentação de água, 25 a pressão operacional, o pH de operação, o teor de substrato gasoso, a velocidade de alimentação gasosa, a velocidade de agitação do caldo de fermentação, a etapa de inibição do produto, a diminuição da densidade celular no biorreator ou o impedimento da inibição do substrato. Algumas manipulações preferidas incluem suprir o biorreator com 30 nutriente em fase líquida (pantotenato ou cobalto), um leve excesso de

CO e H<sub>sub</sub>.2 no gás de suprimento, minimizando a concentração de acetato, evitando a aclimatação da cultura a baixas concentrações de nutrientes na fase líquida, levando a cultura a uma concentração celular adequada a uma velocidade relativamente alta, elevando o pH da cultura para além de 4,5, purgando as células bacterianas do biorreator para uma concentração celular menor do que a concentração estável do estado estacionário que utilize todo o gás de redução ou substratos de nutrientes no biorreator e aumentando a velocidade de alimentação de água, quando a parte livre de ácido acético do acetato presente no biorreator de fermentação exceder 2 g/L, inibindo, assim, qualquer aumento indesejado na concentração de ácido acético livre. Todas essas etapas estão descritas em detalhes abaixo.

Os gases de exaustão contendo gases diferentes de CO, CO<sub>sub</sub>.2 e H<sub>sub</sub>.2 e os gases CO, CO<sub>sub</sub>.2 e H<sub>sub</sub>.2 não convertidos do reator são ventilados a partir do reator e usados pelo seu valor de combustível. Caso seja empregado H<sub>sub</sub>.2 em excesso como mecanismo de controle, a pressão parcial de H<sub>sub</sub>.2 na saída do gás e a proporção da pressão parcial de H<sub>sub</sub>.2 para a pressão parcial de CO<sub>sub</sub>.2 na saída do gás são utilizadas para identificar o controle da proporção de etanol para acetato por essa etapa. A reciclagem celular é utilizada (mas não é exigida) para aumentar a concentração de células dentro do biorreator e, assim, oferecer mais biocatalisador para a conversão de CO, CO<sub>sub</sub>.2 e H<sub>sub</sub>.2. Com a reciclagem celular, o líquido efluente do reator 5 é enviado para um separador celular 6, onde as células 7 e os permeatos (líquido sem células) 8 são separados. As células 7 são enviadas de volta ao biorreator e o permeato 8 é enviado para a recuperação do produto.

A separação celular é realizada pelo uso de uma centrifuga contínua, fibra oca ou sistema de filtragem enrolado em espiral, sistema de filtro cerâmico ou outro separador sólido/líquido. O etanol pode ser

recuperado a partir do permeato (ou alternativamente o efluente a partir do reator 5, se a separação celular não for empregada) por uma variedade de técnicas, incluindo a destilação e a absorção. O permeato 8 é separado numa coluna de destilação para produzir uma fração superior 5 de etanol a 95% 10 e água 11 para reciclagem de volta para o reator 3. A água reciclada 11 contém nutrientes em excesso não usados na fermentação, mas quaisquer vitaminas em excesso a partir da fermentação ou da lise celular serão destruídos pela destilação térmica. A fração superior de etanol a 95% é enviada para uma peneira molecular 10 12 onde o etanol anidro 13, o produto final desejado, é separado do etanol diluído 14 que foi enviado de volta à coluna de destilação 9.

A combinação contínua de crescimento, morte e remoção celular mantém uma concentração celular constante, de tal forma que o método contínuo utilizado na produção de etanol (e pequenas quantidades de ácido acético) podem operar durante muitos meses com suprimento de CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> juntamente com nutrientes, sem suplementação adicional da cultura. Os métodos desta invenção mantêm e controlam as condições de produção contínua de etanol e ácido acético e impedem ou corrigem rapidamente as falhas do método. 15 Os métodos desta invenção também ajudam a evitar a aclimatação da cultura à baixa concentração do nutriente, o que pode ser prejudicial para o desempenho da cultura. Nas descrições abaixo e nos exemplos, a menos que indicado de outra forma, a pressão utilizada é de 1 atmosfera e a temperatura utilizada está entre 36-41 graus C. As temperaturas 20 e pressões desejáveis poderão ser determinadas por alguém capacitado na técnica, dependendo dos microorganismos selecionados para uso no biorreator.

Uma variedade de manipulações descritas especificamente abaixo, adicionadas às etapas básicas desta invenção, permitem uma 30 produção intensificada de etanol. De preferência, a limitação do

nutriente em fase líquida (pantotenato ou cobalto) ou o uso de H<sub>sub</sub>2 ou CO em excesso são as etapas do método da invenção descritas em detalhes abaixo, usadas para obter e manter a produtividade de etanol desejada e permitir a produção de concentrações e proporções estáveis de etanol para acetato no caldo de fermentação. Estas condições permitem a produção de concentrações estáveis de etanol e acetato no caldo de fermentação. Em uma modalidade preferível, a proporção de produto de etanol para acetato produzido no caldo de fermentação é maior do que 10:1 e a concentração de etanol é maior do que 15 g/L.

10

#### **A - Limitação do Pantotenato de Cálcio**

Em uma modalidade específica desta invenção, o método de manipulação das rotas biológicas para favorecer a produção de etanol e limitar a produção de ácido acético envolve a limitação da quantidade de pantotenato de cálcio no meio nutriente a uma quantidade que seja menor do que a necessária para manter a bactéria numa concentração estável de estado estacionário que utilizaria totalmente o pantotenato de cálcio provido. O pantotenato é um componente da Acetil-CoA e, portanto, limitando o pantotenato no meio nutriente, a velocidade do ciclo da Acetil-CoA é reduzida em relação ao ciclo de CO. Isto causa um acúmulo de ferredoxina reduzida e a redução de NAD(P) para NAD(P)H, e aumenta, assim, a produção de etanol como produto final.

A limitação de pantotenato é observada quando os micro-gramas (.mu.g) do pantotenato de cálcio levado ao reator por grama (g) de células (peso seco) produzidas no reator estiverem dentro do limite de 0,5 a 100. Uma limitação de pantotenato mais desejável está dentro do limite de 2 a 75 .mu.g de pantotenato de cálcio por grama (g) de células produzidas no reator. Ainda uma limitação de pantotenato desejada é de 0,5 a 50 .mu.g de pantotenato de cálcio por grama (g) de células produzidas no reator. Outra modalidade desta limitação é de cerca de 1-25 .mu.g de pantotenato de cálcio por grama (g) de células

produzidas no reator. Outra modalidade desta limitação é de aproximadamente 10-30 .mu.g de pantotenato de cálcio por grama (g) de células produzidas no reator. Esta quantidade de nutriente mantém a produção de etanol, de preferência à produção de acetato.

5                   Em outro aspecto deste método, a aclimatação das bactérias no biorreator de fermentação para baixar a concentração de pantotenato de cálcio é evitada pela regulação ou ajuste dos parâmetros de fermentação de modo que uma concentração de pantotenato de cálcio é mantida, enquanto pelo menos um e algumas vezes mais de um  
 10 parâmetro de velocidade de suprimento de gás, velocidade de suprimento de líquido, velocidade de agitação ou pressão parcial de H<sub>sub</sub>.2 é  
 ajustado. São evitadas grandes mudanças nos nutrientes, mas é  
 15 mantida uma concentração de alimentação de nutrientes relativamente constante. Se a cultura for deixada aclimatar-se a baixos nutrientes de limitação da fase líquida, ocorrem de modo irreversível proporções  
 20 deficientes de produto de 1,0 g etanol/g de acetato ou menos. Assim, são necessários o desligamento do reator e a reinoculação. Preferencialmente, a rota biológica é controlada para favorecer a produção de etanol e limitar a produção de ácido acético primeiro pelo suprimento de H<sub>sub</sub>.2 em excesso no gás de suprimento para o biorreator e, então, limitando o pantotenato de cálcio no meio nutriente, como descrito acima.

25                   De fato, durante a iniciação, o pantotenato de cálcio do nutriente da fase líquida normalmente limitativo é mantido em excesso para evitar a aclimatação a baixas concentrações de nutrientes, uma condição que pode resultar num desempenho muito deficiente e na perda da capacidade da cultura produzir altas produtividades de etanol de mais de 10 g/L por dia, se não for empregado excesso de H<sub>sub</sub>.2.

#### **B - Limitação de Cobalto**

Em outra modalidade desta invenção, o método para manipulação das rotas biológicas para favorecer a produção de etanol e limitar a produção de ácido acético envolve limitar a quantidade de cobalto no meio nutriente a uma quantidade que seja menor do que a exigida para manter as bactérias numa concentração estável do estado estacionário que utilizasse totalmente o cobalto provido. A limitação de cobalto é observada quando os microgramas (.mu.g) de cobalto supridos ao reator por grama (g) de células (peso seco) produzidas no biorreator estão dentro do limite de 5 a 100. Preferencialmente, uma limitação de cobalto envolve o suprimento de aproximadamente 20 a 50 .mu.g de cobalto para o reator por grama de células produzidas no reator. Esta quantidade de cobalto mantém a produção de álcool na preferência para acetato no processo.

A limitação de cobalto no caldo de fermentação pode também reduzir a velocidade do ciclo de Acetil-CoA. O cobalto é utilizado para transferir um grupo metila a partir do ciclo THF para o ciclo Acetil-CoA, a limitação da quantidade de cobalto no caldo de fermentação também reduz a velocidade do ciclo THF, o que também causa uma proporção maior de NAD(P) e NAD(P), produzindo, assim, etanol.

O método é ainda manipulado evitando a aclimatação a baixa concentração de cobalto limitadora. De modo muito semelhante à maneira como a aclimatação a baixas concentrações de pantotenato é evitada, uma concentração constante de cobalto é mantida ao mesmo tempo em que o ajuste de um ou mais parâmetros de fermentação (velocidade do gás, velocidade do líquido, velocidade de agitação, teor de Co.<sub>2</sub> e pressão parcial de gás H<sub>2</sub>). São evitadas grandes mudanças nos nutrientes, mas, em vez disso, é mantida uma concentração relativamente constante de nutriente.

Preferencialmente, a rota biológica é controlada para favorecer a produção de etanol e limitar a produção de ácido acético

primeiramente suprindo o H<sub>sub</sub>.2 em excesso para o reator e, então, limitando o cobalto no meio nutriente, como descrito acima. Na iniciação, o cobalto do nutriente da fase líquida limitadora é mantido em excesso para evitar a aclimatação a baixa concentração de nutrientes, uma condição que pode resultar em desempenho de cultura muito deficiente e na perda da capacidade da cultura de produzir proporções do produto maiores do que 1:1.

### **C - Superabastecimento de Hidrogênio**

Ainda em outra modalidade, o método de manipulação das rotas biológicas para favorecer a produção de etanol e limitar a produção de ácido acético envolve suprir H<sub>sub</sub>.2 em excesso no gás de suprimento ou limitar o carbono gasoso que resulta em H<sub>sub</sub>.2 em excesso, que é então usado pela rota biológica. Preferencialmente, o gás redutor H<sub>sub</sub>.2 está em excesso em relação ao CO e o H<sub>sub</sub>.2 em excesso faz que as bactérias produzam uma alta proporção de etanol para acetato no caldo de fermentação. Caso a proporção de H<sub>sub</sub>.2 (moles de gás abastecido) para a soma de duas vezes o CO (em moles de gás) convertido e três vezes o CO<sub>sub</sub>.2 (em moles de gás) convertido for maior do que 1, o fermentador é limitado ao carbono. O H<sub>sub</sub>.2 parcial presente no gás de saída é preferencialmente maior do que 0,4 atm. Finalmente, a proporção da pressão parcial de H<sub>sub</sub>.2 para a pressão parcial de CO<sub>sub</sub>.2 deverá ser maior do que 3,0 para assegurar que H<sub>sub</sub>.2 suficiente seja disponibilizado para usar todo o CO<sub>sub</sub>.2. Caso a pressão parcial de CO<sub>sub</sub>.2 seja maior do que 0,1 atm, é provável que o crescimento tenha sido limitado de outra forma.

Durante a partida, o uso de excesso de H<sub>sub</sub>.2 é favorecido em relação à limitação de nutriente, sobretudo por que é mais fácil de controlar. Os benefícios de empregar H<sub>sub</sub>.2 em excesso são que ele evita a produção de ácido acético em excesso, o que pode levar a proporções deficientes do produto e potencial inibição do ácido acético,

assim como aclimatação a baixas concentrações de nutrientes.

#### **D - Sobrealimentação de Monóxido de Carbono**

Outro modo de manipular os componentes do método envolve a sobrealimentação de gás redutor, CO, no substrato gasoso para uso na rota, o que serve para reduzir diretamente o potencial redox no caldo de fermentação. Assim, de acordo com essa modalidade, o biorreator é suprido com substrato gasoso, compreendendo CO, onde a quantidade de CO presente no biorreator é maior do que a quantidade exigida para manter as bactérias a uma concentração estável do estado estacionário que utilizaria completamente o CO provido. A sobrealimentação de CO como método para favorecer a produção de etanol sobre a produção de ácido acético quando a taxa específica de absorção de CO (milimoles de CO por grama de células) (peso seco) no reator por minuto ou mmol/g célula) é maior do que 0,3. Com maior preferência, esta etapa envolve uma velocidade específica de absorção de CO de mais do que 0,5. Isto significa que cada célula, em média, está utilizando CO em seu metabolismo a uma velocidade de pelo menos 0,3 mmol/gminuto., ou mais idealmente, a uma velocidade de pelo menos 0,5 mmol/gminuto. Preferencialmente, o CO é provido a uma taxa na qual a absorção de CO é de 0,3 a 2 mmol CO/célula (peso seco) de bactérias/minuto. Em outra modalidade, o CO é provido a uma taxa de 0,5 a 1,5 mmol de CO/g célula (peso seco) de bactérias/minuto. Em outra modalidade, o CO é provido a uma taxa de aproximadamente 1 mmol de CO/g célula (peso seco) de bactérias/minuto.

Esta quantidade de absorção de CO mantém a produção de etanol preferencial em relação ao acetato. Se o CO for fornecido de tal forma que o CO dissolvido na fermentação seja significativo em relação à pressão de gás ou uma transferência de massa extremamente boa, o caldo de fermentação fica mais reduzido. A sobrealimentação de CO possui dois benefícios adicionais. O excesso de CO pode fazer que o

ciclo de CO opere a uma velocidade maior e, caso o ciclo de Acetyl-CoA seja limitado de outra forma e não consiga acompanhar o ciclo de CO, a ferredoxina reduzida acumular-se-á. O CO também pode desacelerar a etapa 2 (produção do ácido acético intermediário) no método geral de 5 três etapas, através da inibição de substrato. Esta taxa reduzida da etapa 2 em relação à etapa 1 ocasiona um excesso de NAD(P)H, que leva à produção de etanol em favor do ácido acético.

Embora o excesso de CO possa resultar numa produção aumentada de etanol pela redução direta do potencial redox do caldo de 10 fermentação, a presença de CO em excesso também inibe o crescimento pela inibição da dehidrogenase do CO e, portanto, a absorção de H<sub>sub</sub>.2. A presença de CO em excesso infelizmente também resulta numa conversão deficiente de H<sub>sub</sub>.2, que pode não ser economicamente favorável. A consequência de uma operação estendida sob a 15 inibição do substrato é uma absorção deficiente do H<sub>sub</sub>.2. Isto por fim causa a lise celular e a reiniciação necessária do reator. Onde este método tem um resultado inesperado de inibição do substrato de CO (a presença de CO em excesso para as células disponíveis) durante o crescimento inicial da cultura ou posteriormente, a velocidade de 20 alimentação do gás e/ou a velocidade de agitação é reduzida até que a inibição de substrato seja aliviada.

#### **E - Etapas Adicionais de Manipulação**

Além das etapas principais de intensificação do método descrito acima, várias etapas de método foram incluídas no método de 25 produção de etanol.

##### **1 - Aumento da Transferência de Massa**

Uma modalidade adicional envolve a garantia de que a transferência de massa de CO ou de H<sub>sub</sub>.2 a partir do suprimento de

gás para o caldo líquido de fermentação seja mais rápida do que a capacidade da bactéria de utilizar os gases dissolvidos. Por exemplo, se um biorreator contendo *C. ljungdahlii* for alimentado de CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> e for operado sem limitação quanto aos nutrientes (tais como pantotenato e cobalto) ou a presença de H<sub>2</sub> em excesso, o crescimento das células é limitado pela quantidade de gás transferido para a fase líquida e o sistema produz ácido acético como produto. Se a cultura for alimentada com uma pequena quantidade de CO ou H<sub>2</sub> em excesso daquela exigida para o crescimento da cultura, ela produz etanol. Todavia, se demasiado gás for transferido para a fase líquida para uso da cultura, ocorre a inibição do substrato, o que pode levar ao fim da cultura e morte das células. Assim, há uma faixa bastante estreita de operação com transferência de massa em excesso.

Com referência ao ciclo Acetil-CoA, para que a ferredoxina reduzida em excesso seja produzida, o ciclo de CO ou a redução de ferredoxina através da hidrogenase deve ocorrer mais rapidamente do que o ciclo Acetil-CoA. Os métodos descritos aqui limitam a velocidade a que os organismos conseguem utilizar os gases dissolvidos restringindo a velocidade a que os nutrientes essenciais, tais como o pantotenato de cálcio ou cobalto ou outros substratos, tais como CO<sub>2</sub>, estão disponíveis para as bactérias ou proporcionando excesso de substrato, H<sub>2</sub> ou CO à cultura.

Uma velocidade teórica de transferência de massa, que seja mais alta do que a velocidade a que a bactéria consegue usar o substrato, mesmo sem outras limitações, pode ser calculada. Essa velocidade, quando atingida, é limitada pelo crescimento natural do organismo. Portanto, a modalidade mais produtiva é quando a transferência de massa (velocidade de fluxo de gás ou velocidade de agitação) ocorrer mais rapidamente do que a velocidade a que a maior concentração possível de células consegue utilizar o substrato sem nenhuma limita-

ção. Haveria uma faixa de operação muito estreita, uma vez que a inibição do substrato poderia causar rapidamente a morte celular e uma concentração de subproduto resultante que é tóxica para a cultura.

5

## 2 - Suprindo CO e H<sub>sub</sub>.2 em excesso

Em outra modalidade de um método desta invenção, a estabilidade na concentração elevada de etanol/produção limitada de ácido acético é obtida nos métodos que limitam cobalto ou pantotenato de cálcio ou que provêm uma abundância de H<sub>sub</sub>.2 ou CO. De acordo com esta etapa, uma vez que a cultura usa os substratos gasosos CO, H<sub>sub</sub>.2 e CO<sub>sub</sub>.2 como fontes de carbono e energia, CO e H<sub>sub</sub>.2 são supridos com um ligeiro excesso. Um ligeiro excesso de CO e H<sub>sub</sub>.2 é conseguido atingindo a operação estacionária e, então, aumentando gradualmente a velocidade de alimentação do gás e/ou a velocidade da agitação (incrementos de 10% ou menos) até que as conversões de CO e H<sub>sub</sub>.2 comecem a diminuir. Este é um meio de evitar a limitação da transferência de massa, que favorece a produção de ácido acético, e de suprir ferredoxina reduzida em excesso para reduzir NAD(P) a NAD(P)H e produzir etanol. Se CO e H<sub>sub</sub>.2 não forem fornecidos com um pequeno excesso, ocorre a limitação de transferência de massa e a rota é equilibrada. Isso resulta em proporções deficientes de etanol para acetato (alta concentração de acetato). As altas concentrações de acetato podem resultar na inibição do ácido acético, que limita a capacidade da bactéria de absorver H<sub>sub</sub>.2 e pode levar finalmente ao fracasso da cultura.

Medidas no sentido de evitar a limitação da transferência de massa incluem um aumento da velocidade de agitação ou velocidade do gás para transferir mais CO e H<sub>sub</sub>.2 para a fase líquida e, assim, retornar à presença de um ligeiro excesso de CO e H<sub>sub</sub>.2. Se a inibição de produto ocorrer como resultado da limitação de transferên-

cia de massa, é necessário aumentar a velocidade de alimentação de líquido para eliminar a inibição do ácido acético, por diluição a uma concentração mais baixa de acetato. Uma vez que aumentando o suprimento do meio aumentaria o .mu.g do pantotenato ou cobalto/g produzido pela célula, isso deve ser feito somente brevemente ou o pantotenato ou cobalto em excesso devem ser eliminados pelo ajuste da concentração do meio ou aumento na velocidade de suprimento de água.

### **3 - Condicionando a Inibição**

#### **10 do Produto de Ácido Acético**

Nos métodos descritos acima, a inibição do produto de ácido acético pode ocorrer quando muito ácido acético molecular, isto é, >2 g/L, se acumula no biorreator para permitir o crescimento celular e maior produção de etanol. Outra etapa de manipulação é usada para 15 evitar o fracasso da cultura. Uma modificação envolve aumentar levemente a velocidade de suprimento de líquido ou aquoso para reduzir a concentração da fase líquida de inibição do ácido acético a menos do que 2 g/L.

### **4 - Etapa de Reciclagem da Água**

20 Ainda outra etapa adicional do método para manter uma cultura estável que produza etanol como produto único sem produção líquida de ácido acético nos métodos desta invenção envolve adicionar água reciclada a partir do reator de destilação de volta para o reator de fermentação. Como observado antes, o reciclo de água (contendo até 5 g/L de acetato) tem o benefício de reciclar o acetato produzido de volta para o reator de forma que nenhum ácido acético líquido seja produzido. Um equilíbrio é, assim, estabelecido entre o etanol e o acetato no reator. Como resultado, todo o CO, CO.<sub>2</sub> e H.<sub>2</sub> alimentados

para o reator e convertidos em produto resulta na produção de etanol, exceto aquele utilizado para a manutenção da cultura.

### **5 - Reduzindo a Densidade Celular**

Outra medida de manipulação útil neste método é iniciar a 5 purga periódica ou contínua de células bacterianas do biorreator, a fim de reduzir a concentração celular no biorreator. Essa manipulação serve para reduzir a concentração celular para menos da concentração celular estável do estado estacionário que utilize todo o gás redutor ou os substratos de nutrientes presentes no biorreator. Alterando, assim, a 10 densidade celular, a produção de etanol é favorecida em relação à produção de acetato no biorreator.

### **6 - CSTR de Dois Estágios**

Um dos problemas associados à produção de etanol com limitação de meio é a capacidade ou tendência da cultura de, finalmente, adaptar-se às condições limitativas e não continuar a produzir etanol após vários meses de operação. Em vez disso, o acetato se transforma por fim no produto dominante. Esta aclimatação a baixas concentrações limitativas de nutrientes resulta numa cultura que produz mais ácido acético do que etanol (proporção etanol/acetato de 1,0 ou menos) e produz baixas concentrações de etanol (algumas vezes, tão baixas quanto 1 g/L). A adaptação ocorre mais provavelmente quando a cultura não é provida de nutrientes suficientes durante a partida, onde a velocidade de crescimento é mais importante do que a velocidade de produção de etanol. Adicionalmente, há o perigo de que a 15 cultura possa ser aclimatada a baixas concentrações limitativas de nutrientes durante a operação do estado estacionário, particularmente conforme as concentrações limitativas de nutrientes são ajustadas para baixo do limite do sistema de reação do acetato.

Para evitar essa adaptação quando se usa as etapas acima de limitação do pantotenato ou cobalto, em vez de permitir que a cultura cresça com os nutrientes disponíveis, e o perigo mencionado acima, pode ser empregada outra modificação do método. Um sistema 5 CSTR de dois estágios onde ocorre primariamente um bom crescimento da cultura no primeiro estágio, com um ligeiro excesso de nutrientes limitativos (talvez com a produção acompanhante de ácido acético), seguido por um estágio de produção em que a cultura a partir do primeiro estágio é agora limitada pelo nutriente limitador e é usada 10 para produzir altas concentrações de etanol, é outra modificação do método. Essa modificação permite a manutenção de uma cultura estável, que não se aclimate a concentrações reduzidas de pantotenato ou cobalto. Esta modificação envolve a operação de um CSTR de dois estágios, em que um reator de crescimento (Estágio 1) supre um reator 15 de produção (Estágio 2), onde ocorre o volume de produção de etanol.

O reator de crescimento não é operado com as etapas de limitação de nutrientes descritas acima, assim, a cultura não é tão suscetível à aclimatação a uma condição limitada.

De acordo com uma modalidade de CSTR de dois estágios, o 20 Estágio de Crescimento é operado num tempo de retenção de líquido (LRT) de aproximadamente 24 horas. O Estágio de Crescimento CSTR 1 é suprido com pantotenato ou cobalto no meio 2 para produzir uma cultura saudável (e pode produzir também ácido acético). Assim, o excesso de ácido acético é produzido no reator, mas com uma estabilidade aumentada. Essa concentração de pantotenato ou cobalto é em 25 excesso do que seria normalmente suprido a um único CSTR usado para produzir etanol. O suprimento de gás para este reator é o gás não convertido 3 do Estágio de Produção 4 e o suprimento de líquido é o meio fresco 2. O Estágio de Crescimento CSTR é operado sem reciclagem celular. O propósito deste reator de Estágio de Crescimento é 30

proporcionar uma cultura saudável para a produção posterior de etanol que não se aclimate a baixas concentrações de pantotenato.

O reator do estágio de Produção 4 é operado a um LRT nominal de menos de 20 horas. Esse CSTR com reciclagem celular é 5 alimentado com um gás 5 e pode ter baixas conversões. Ele é suprido com um suprimento de meio fresco 6, assim como um suprimento de cultura 7 a partir do Estágio de Crescimento. Pantotenato ou cobalto mínimo é suprido a este reator, uma vez que o excesso do Estágio de Crescimento se encontre disponível. A reciclagem celular 8 é usada 10 neste reator para obter a maior quantidade de produção das células enviadas de volta ao reator 9. A concentração do etanol de saída no produto líquido 10 deve ser maior do que 20 g/L. As características do sistema CSTR de dois estágios incluem uma pequena mudança para aclimatação a baixas concentrações de pantotenato ou cobalto; um LRT 15 global de menos do que ou igual a 30 horas; uma maior produtividade de etanol e maior concentração de etanol esperadas a partir de um único CSTR do mesmo tamanho.

## 7 - Modificações na Partida

Outras etapas do método, que são preferencialmente 20 utilizadas na prática desta invenção, envolvem a produção celular na partida inicial da cultura de fermentação. A partida de um biorreator com CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> para produzir etanol e ácido acético é realizada por meio da inoculação de lote a partir da cultura em estoque ou empregando uma inoculação contínua a partir de um reator existente 25 como suprimento da cultura. Conforme observado anteriormente na discussão sobre evitar a aclimatação da cultura a baixas concentrações de pantotenato ou cobalto, a cultura é trazida de modo desejável para uma concentração celular maior antes dos nutrientes limitadores, mas suprindo o excesso de H<sub>2</sub> para a cultura. Esta partida rápida evita 30 a aclimatação da cultura e produz boas proporções de produto (altas

concentrações de etanol e baixas concentrações de acetato). Caso não seja empregada a partida rápida, poderão ocorrer proporções deficientes de produto e a cultura pode aclimatar-se a baixas concentrações de nutrientes na fase líquida e necessitar de uma reinoculação no reator.

5 O reator é iniciado com um lote em fase líquida (meio líquido não inicialmente suprido continuamente para o reator), com baixa agitação (talvez 400-600 rpm em um reator laboratorial New Brunswick Scientific Bioflo. RTM.) e no pH desejado. A fase líquida do reator consiste, assim, num lote de meio nutriente contendo vitaminas e  
10 sais, com uma concentração nominal de nutriente limitador, seja ele pantotenato de cálcio ou cobalto (20.  $\mu\text{g/L}$  pantotenato ou 75 ppb cobalto). Caso seja empregada a inoculação contínua a partir de um reator existente, provavelmente a operação em fase líquida do lote não é necessária. Neste caso, o gás é suprido continuamente para o reator  
15 durante a partida inicial e controlado. Idealmente, a fase gasosa na partida seria  $\text{CO}_{\text{sub}}.2$ - livre,  $\text{H}_{\text{sub}}.2$ -abundante e as velocidades do gás e da agitação seriam mantidas em níveis baixos para evitar a inibição do substrato de CO.

20 Um protocolo geral de partida exemplificativo para a produção e sustentação de concentrações de etanol comercialmente  
viáveis a partir de CO,  $\text{CO}_{\text{sub}}.2$  e  $\text{H}_{\text{sub}}.2$  consiste em três fases distintas: (a) partida inicial, quando a produção de células é crítica; (b) partida, em que a velocidade de produção se torna crítica; e (c) operação  
25 em estado estacionário. Essencialmente, a partida inicial é caracterizada pela inoculação de um lote líquido, com um nutriente limitador nominal selecionado a partir do cobalto (75 ppb) ou pantotenato de cálcio (20. $\mu\text{g/L}$ ) com o pH desejado (geralmente 4.5-5.5). Para facilitar a partida, a velocidade de suprimento de gás e a velocidade de agitação são mantidas preferencialmente baixas, enquanto o  $\text{H}_{\text{sub}}.2$  é  
30 suprido em excesso. A causa da produção de etanol durante a partida é

H<sub>2</sub> em excesso; a limitação de nutriente ocorre depois. Assim, os nutrientes líquidos em excesso estão presentes durante a partida para evitar aclimatação indesejada da cultura a baixos nutrientes. À medida que a fermentação prossegue durante um período de várias horas após a inoculação, o CO<sub>2</sub> é produzido e o H<sub>2</sub> é consumido. As mudanças nestas velocidades indicavam que a velocidade de agitação deveria ser nominalmente e lentamente aumentada (talvez 200-300 rpm num reator de laboratório, durante um período de 2-3 dias) para evitar a limitação da transferência de massa.

10 Esta iniciação da produção de CO<sub>2</sub> ocorre muito mais rapidamente nos sistemas que empregam a inoculação contínua, ao contrário da inoculação em lote a partir da cultura em estoque. Todavia, se a velocidade de agitação for aumentada muito rapidamente, ocorre a inibição do substrato de CO. Esse procedimento de observar a conversão de H<sub>2</sub> (ou a produção de CO<sub>2</sub>) enquanto aumenta nominalmente a velocidade de agitação aumenta ocorre a uma velocidade relativamente alta até que a velocidade de agitação pretendida seja alcançada. Durante esse tempo de aumento da velocidade de agitação na cultura líquida de batelada, a produção de células, em vez da 15 formação de produto, é da maior importância.

20 Uma vez que seja atingida a velocidade de agitação (800-1000 rpm no reator de laboratório New Brunswick Scientific Bioflo. RTM), a cultura é deixada estacionária para confirmar a absorção de H<sub>2</sub>. A partida é trocada para um modo em que a velocidade de produção se torna importante. É desejável ter as conversões de CO excedendo 80% e uma alta pressão parcial de H<sub>2</sub> na saída de gás (pelo menos 0,55 atm) para garantir a produção de etanol enquanto limita o acetato e a concentração livre de ácido acético molecular. A velocidade de alimentação do meio líquido é então ligada (para sistemas 25 com inoculação de lote a partir de cultura em estoque) para iniciar a 30

alimentação contínua de líquido e a velocidade de gás é aumentada em incrementos de 10% em relação para a velocidade de fluxo pretendida. H<sub>sub</sub>.2 permanece em excesso para evitar a produção de ácido acético em excesso. Conforme a velocidade do gás é aumentada, os nutrientes em fase líquida são limitados (pantotenato de cálcio ou cobalto) e o efeito dessa limitação é uma ligeira queda da conversão H<sub>sub</sub>.2, na produção alvo.

Na operação no estado estacionário, é alcançada a produção de 15-35 g/L de etanol e 0-5 g/L de acetato. Nesse estágio, pequenos ajustes nos nutrientes limitadores, velocidades de abastecimento de líquidos e velocidades de alimentação de gás são necessários e escolhidos por alguém capacitado na técnica com recurso e conhecimento de causa, assim como os ensinamentos desta invenção. Caso a reciclagem de células deva ser adicionada ao método de produção de etanol, ela é adicionada neste momento juntamente com um ajuste na velocidade do gás (aumento) e na concentração de nutrientes (diminuição).

Os métodos descritos acima de produção e manutenção contínuas de altas concentrações de etanol com baixas concentrações de acetato como subproduto sob condições operacionais estáveis intensificam o uso das bactérias sujeitas em escala comercial para a produção comercial de etanol a partir de CO, CO<sub>sub</sub>.2 e H<sub>sub</sub>.2. de preferência, As etapas delineadas nos métodos acima superam as limitações de utilizar as bactérias sujeitas para a produção comercial de etanol a partir de CO, CO<sub>sub</sub>.2 e H<sub>sub</sub>.2. De preferência, o método emprega um biorreator contínuo, embora a fermentação em lote seja também utilizada, ela não é provavelmente economicamente viável para a produção de etanol em larga escala.

Os exemplos seguintes servirão para ilustrar certas modalidades específicas das invenções descritas aqui. Esses exemplos não devem, todavia, ser interpretados como limitadores do escopo da

invenção inovatória, pois existem muitas variações que podem ser feitas sem sair do espírito da invenção descrita, conforme os especialistas na técnica reconhecerão.

### **Exemplos**

5           Um experimento inicial foi conduzido para investigar o uso de etanol e dióxido de carbono, como fonte de energia para a manutenção da viabilidade de *C. Ljungdahlii*. Neste experimento, o dióxido de carbono foi fornecido como bolhas de gás ao longo da cultura. A concentração de ácido livre foi controlada pela redução da temperatura  
10          a 25 graus C e pelo aumento do ponto de ajuste do pH. O gás de síntese foi desligado e substituído por dióxido de carbono em bolhas de aproximadamente 30 ml/minuto. A agitação foi reduzida para um nível baixo que proporcionava uma mistura suficiente para distribuir calor e adições de líquido dentro do reator. O pH foi elevado de 4,5 a 4,7. O  
15          reator tinha uma alça de reciclo celular usando uma fibra oca que permitia a saída do permeato a ser usado a fim de evitar a perda celular durante o experimento. O fluxo do permeato foi igual ao fluxo do meio para dentro do sistema. O tempo de retenção de líquido não mudou, permanecendo em 30 horas.

20           Após 12 horas sem suprimento de gás de síntese, o etanol medido e as concentrações totais de acetila modificaram conforme era esperado. O nível de etanol diminuiu de 24,0 para 12,8 g/L enquanto o nível total de acetila aumentou de 4,2 para 10Ag/L. A temperatura ajustada retornou para 38°C. Conforme a cultura estava aquecendo, a  
25          agitação foi aumentada para o mesmo nível usado anteriormente; o dióxido de carbono foi substituído por um fluxo de gás de síntese de 50% da velocidade do fluxo usado antes do experimento.

          A purga de permeato foi interrompida. A cultura foi mantida nesta condição durante 14 horas. Durante este tempo, a absorção do

monóxido de carbono permaneceu estável e a absorção de hidrogênio foi melhorada. Quando a absorção de hidrogênio tinha melhorado de maneira significativa, o fluxo de gás foi aumentado para atingir o fluxo pré-experimental. Dentro de 47,5 horas, o fluxo do gás de síntese tinha 5 retornado aos valores pré-experimentais. Conforme o fluxo de gás de alimentação aumentava, a concentração total de acetila diminuía e a concentração de etanol aumentava. A concentração total de acetila voltou aos níveis experimentais dentro de 32 horas. A concentração de etanol chegou perto dos níveis experimentais depois de 70,5 horas.

10 Neste experimento, o dióxido de carbono foi provido por um fluxo contínuo de uma solução de bicarbonato de sódio a 7,7% para dentro da cultura. A temperatura foi reduzida para 25°C. A concentração de ácido acético livre foi controlada pelo abaixamento da temperatura a 25°C, aumentando o pH e aumentando o fluxo de líquido através 15 da cultura. O gás de síntese foi desligado e trocado por um fluxo contínuo de bicarbonato de sódio a 7,7%. Na presença de um ambiente ácido, o bicarbonato de sódio degrada-se num íon de sódio, água e dióxido de carbono, provendo, assim, o dióxido de carbono necessário para a conversão do etanol em ácido livre. A agitação foi reduzida a um 20 nível baixo que proporcionou exatamente a mistura suficiente para distribuição de calor e adições de líquidos dentro do reator. O nível de pH não foi controlado, mas, conforme o bicarbonato era adicionado à cultura, o pH aumentava lentamente através do experimento, o que ajudou a controlar a concentração de ácido livre. O reator tinha uma 25 alça de reciclagem celular usando uma membrana de fibra oca que permitia que uma purga do permeato fosse usada, a fim de evitar a perda celular durante o experimento. O fluxo de permeato foi igual ao fluxo do meio, mais o fluxo adicional de bicarbonato de sódio para dentro do sistema. O fluxo extra de bicarbonato reduziu o tempo de 30 retenção do líquido de 29 para 21 horas.

Durante o experimento, a concentração de etanol diminuiu conforme a concentração total de acetila aumentava de modo constante. Dentro de 5,5 horas, a concentração do etanol diminuiu de 21,0 para 14,1 g/L, enquanto o nível total de acetila tinha aumentado de 4,4 para 5 9,1 g/L. O pH medido tinha também aumentado de 4,48 para 4,84. Em um esforço para controlar a concentração de ácido, o fluxo de nutrientes aumentou de 1,33 ml/minuto para 2,81 ml/minuto, 5,6 horas após o início do experimento. A purga do permeato foi também aumentada de 1,86 para 3,48 ml/minuto. para evitar a lavagem indesejada de células.

10 Estas mudanças diminuíram o tempo de retenção de líquido de 21 para 12 horas. Isso teve o efeito desejado de manter a concentração de ácido mais baixa. Duas horas após as mudanças nos fluxos de líquido, a concentração total de acetila tinha aumentado para somente 9,4 g/L. Todavia, a concentração de etanol caiu a uma velocidade mais alta de 15 14,1 para 10,7 g/L. Após 8 horas sem suprimento de gás de síntese, o etanol medido e as concentrações totais de acetila mudaram conforme era esperado. O nível de etanol diminuiu de 21,0 para 10,7 g/L, enquanto o nível total de acetila aumentou de 4,4 para 9,4 g/L. A temperatura voltou para os 38°C. Conforme a cultura aquecia, a 20 agitação diminuía para o mesmo nível utilizado anteriormente; a adição de bicarbonato de sódio foi interrompida, o fluxo de gás de síntese foi iniciado a 50% do fluxo utilizado anteriormente ao experimento; e a purga de permeato cessou. A cultura foi mantida nessas condições durante apenas 50 minutos. O fluxo de gás foi aumentado para o fluxo 25 anterior. Após 29,2 horas, o fluxo de gás de síntese retornou às velocidades pré-experimentais. Conforme o fluxo de gás aumentava, a concentração total de acetila diminuía e a concentração de etanol aumentava para as concentrações pré-experimentais depois de 43,2 horas. Assim, o etanol que já estava no fermentador pôde ser utilizado 30 juntamente com o dióxido de carbono para manter a viabilidade da cultura durante a interrupção do gás de síntese.

## Exemplo 1

### Estudos de Perda de Gás de Microorganismos

#### Usando Etanol e Conversão de CO<sub>2</sub> para Energia

O propósito da experimentação com microorganismos foi 5 determinar um método de manutenção de cultura no caso de uma perda de gás durante um período prolongado (>30 minutos). Neste exemplo, o foco esteve sobre a adição de CO<sub>2</sub> para a conversão de etanol a ácido livre como forma de a cultura obter energia durante a perda de gás de síntese.

10 Sabe-se há algum tempo que certos microorganismos acetogênicos conseguem converter etanol de volta para ácido acético usando CO<sub>2</sub>, mas nenhum teste foi feito para determinar se esse processo poderia ser utilizado para manter a cultura por longos períodos de tempo, quando não havia gás de síntese disponível. Uma 15 modalidade da presente invenção proporciona uma solução para a sobrevivência à perda de suprimento de gás desde que etanol e CO<sub>2</sub> (na forma de bicarbonato de sódio) estejam prontamente disponíveis para uso devido às operações normais do biorreator. Além da adição de CO<sub>2</sub> para a conversão de etanol a ácido, a temperatura da cultura diminuiu 20 durante alguns dos experimentos, como forma de diminuir a atividade da cultura. Uma atividade celular mais lenta deveria reduzir a quantidade de energia necessária, a quantidade de CO<sub>2</sub> e etanol necessárias e a quantidade de ácido produzido.

Para esses experimentos, o biorreator foi acionado através 25 de CSTR tanto com reciclagem celular como alça de enrolamento de resfriamento de cultura. Uma purga de permeato foi usada durante os experimentos para impedir a perda indesejada de células, mas o fluxo de purga foi desviado para resíduo e não foi reciclado para o biorreator.

Durante as operações normais do biorreator, a temperatura de cultura foi mantida em 38°C; a agitação foi de 400 rpm; o volume de cultura aproximado foi de cerca de 2,4 L; e o pH foi estabelecido em 4,5. Uma solução de 7,7% de NaHCO<sub>3</sub> foi utilizada para controle do pH. O gás escolhido foi o gás de síntese contendo 15% de H<sub>2</sub>, 45% de N<sub>2</sub>, 30% de CO e 10% de CO<sub>2</sub>. A velocidade do gás de síntese foi de quase 475 ml/minuto. O meio foi suprido para o reator com valores de 1,30-1,35 ml/minuto ou quase 1870-1940 mL/dia. Os tempos de retenção de líquido e de células foi de 25-30 horas em média. O meio utilizado foi Ix EtOH, regularmente utilizado para cultura de C-01. Os componentes e suas concentrações estão listados na Tabela 1 abaixo.

Durante as operações normais, as bactérias CL usam os componentes de gás de síntese CO, H<sub>2</sub> e CO, carbono e fonte de energia ou elétrons. Em razão disso, deve-se tomar cuidado para impedir a fim de sustentar a cultura. Todavia, se o suprimento de gás for interrompido, o etanol e o CO<sub>2</sub> utilizados serão para produzir ácido acético, conforme a Equação (1) abaixo.



Através dessa reação, as células podem adquirir elétrons para sobreviver à oxidação do álcool na forma de ácido carboxílico. Caso o suprimento de gás seja interrompido, a cultura adquire elétrons, enquanto não ganha carbono, diminuindo, assim, o crescimento celular. Acredita-se, portanto, que este processo proporcione um meio de sobrevivência da cultura, embora a produção não seja otimizada. A saída de células ou a remoção de quaisquer células a partir do sistema deveria ser evitada, a fim de manter a densidade celular durante a perda de suprimento de gás.

Este processo leva a um acúmulo de ácido. Devem ser tomadas providências para garantir que os níveis de ácido acético livre

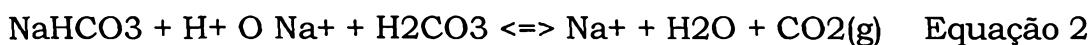
sejam mantidos nos níveis de concentração abaixo das concentrações inibidoras (<5g/L). Isso pode ser obtido por meio da elevação do pH para uma faixa de 5,1-5,3, aumentando o fluxo de líquido através do sistema, reduzindo, assim, o LRT para 15-20 horas e limitando a 5 produção de ácido pela limitação do CO<sub>2</sub> e/ou etanol disponíveis ou pela redução do metabolismo da cultura através da redução de temperatura.

A produção de ácido esgota a concentração de etanol no reator. Uma vez que a cultura esteja exibindo uma produção reduzida 10 de etanol enquanto sob estas condições, a concentração de etanol deve ser monitorada para garantir que ela não seja excessivamente esgotada. O etanol pode ser adicionado ao sistema ou suplementado à medida que aumenta o período de tempo sem gás de suprimento. Durante estes experimentos, a concentração de etanol no biorreator foi esgotada para 15 uma concentração tão baixa quanto 4g/L, sem efeitos prejudiciais para a cultura.

Opcionalmente, a temperatura da cultura desempenha um papel vital neste processo como forma de controlar a taxa metabólica das células. À medida que a temperatura é reduzida, a taxa metabólica 20 da célula também é reduzida. Isso, por sua vez, reduz a produção de ácido e o uso de etanol e CO<sub>2</sub>. Reduzir a temperatura quando o reator estiver sem suprimento de gás estende o período de tempo em que a cultura consegue sobreviver. Mas, se a temperatura for mantida em 38°C, a taxa de produção de ácido estará em seu nível maior e exige-se 25 monitoramento cuidadoso do nível de ácido e etanol para manter a cultura saudável. Os experimentos reduziram a temperatura da cultura para aproximadamente 25°C, mantendo com sucesso a viabilidade celular durante cerca de 30 horas sem suprimento de gás.

Uma modalidade da presente invenção proporciona um 30 método de fornecimento de uma quantidade controlada de CO<sub>2</sub>,

compreendendo a adição de NaHCO<sub>3</sub>. Quando o bicarbonato de sódio for introduzido num ambiente ácido tal como o caldo de fermentação, o CO<sub>2</sub> é produzido como mostrado abaixo na Equação 2. Acredita-se que este método de adição de CO<sub>2</sub> ao sistema seja vantajoso em relação à aspersão de CO<sub>2</sub> na cultura, pois o bicarbonato de sódio não somente acrescenta CO<sub>2</sub>, mas também aumenta o pH da cultura para aproximadamente 5,1, ajudando a compensar a produção do sistema de ácido por meio do equilíbrio dos níveis de ácido livre.



A conversão de etanol para ácido começa a acontecer quase imediatamente ou em segundos, após a perda do suprimento de gás. É possível evitar um acúmulo rápido e considerável de ácido no início da perda de suprimento de gás por meio da vaporização do CO<sub>2</sub> dissolvido presente na cultura, usando um alto fluxo de N<sub>2</sub> de aproximadamente 400-450 ml/minuto. O nitrogênio deve ser aspergido através da cultura durante aproximadamente de 0 a 15 minutos, tão logo possível após o fluxo de gás ter sido perdido, quanto mais rápido isso for feito, mais vantajoso será para a presente invenção. O fluxo de nitrogênio nos primeiros 5 minutos é uma modalidade da presente invenção. Uma vez que o inventário de CO<sub>2</sub> dissolvido tenha sido removido, a adição de NaHCO<sub>3</sub> poderá ser iniciada, usando uma taxa de suprimento controlada.

Usar a adição de NaHCO<sub>3</sub> para fornecer CO<sub>2</sub> pode aumentar o pH da cultura. Se as células permanecerem ativas, utilizando todo o bicarbonato de sódio disponível, o pH deve aumentar para aproximadamente 5,1 e permanecer aí. Esse é um efeito secundário desejado e não deve ser impedido. O aumento lento e firme de pH ajudará a contrariar o aumento da produção de ácido mantendo o nível de ácido livre sob verificação. Se, todavia, a atividade celular for comprometida, o pH aumentará para além de 5,3, dando uma indicação de que a cultura

pode ter sido desnaturada ou de outra forma funcionalmente diminuída.

Quando o suprimento de gás estiver disponível, a adição de bicarbonato de sódio deve ser cessada e a transferência de massa do suprimento de gás deve aumentar assim que possível, mas tomando o cuidado de não sobrecarregar as células. Durante um período de 10-15 minutos, a agitação deve ser aumentada de volta para o mesmo ajuste estabelecido anteriormente à perda de gás de alimentação e a velocidade do fluxo de gás de alimentação deve aumentar de volta para aproximadamente 50% do valor original. Em razão da disponibilidade do substrato e do alto nível de acetila total, a cultura converterá o ácido de volta para etanol. Isso será refletido num aumento de pH e é esperado. As mudanças na velocidade do fluxo de gás de alimentação do fermentador durante este período devem ser feitas com base em conversões de gás como em quaisquer operações normais do reator.

Uma vez que o fluxo de gás tenha sido reiniciado, se tudo deu certo na preservação da viabilidade celular, a velocidade do fluxo do gás de alimentação deve se capaz de alcançar um ajuste operacional normal dentro de 20-26 horas. As concentrações de etanol e ácido podem levar mais tempo para chegar aos níveis operacionais normais, aproximadamente de 26 a 72 horas.

Uma agitação mínima é exigida para manter a distribuição de temperatura através do biorreator e para manter o pH da cultura. A agitação mínima seria definida como a mistura exatamente suficiente para manter o líquido distribuído. O valor pode ser de 50 rpm ou 40-60 rpm, comparado com altas taxas, tais como 400 rpm, usadas durante as operações normais. Esta agitação também mantém com efeito as células suspensas. Acredita-se que as células devam ser suspensas, a fim de oferecer contato constante com CO<sub>2</sub> e etanol para realizar as reações necessárias.

Os microorganismos acetogênicos exigem CO ou H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> a fim de ganhar os elétrons e carbono necessários para o crescimento celular. Durante os períodos de tempo sem suprimento de gás, nem CO e nem H<sub>2</sub> estarão disponíveis para o processo de crescimento celular.

5 Acredita-se que o crescimento celular seja suspenso durante esses períodos de perda gasosa. Pode ser considerado que um suprimento de gás menor poderia ser utilizado para a sobrevivência da cultura durante os tempos em que o suprimento de gás possa ser limitado. A quantidade reduzida de suprimento de gás fornecido proporciona a reversão da

10 cultura para o modo de produção de ácido. Quando a quantidade de substrato é diminuída, a cultura parará automaticamente a conversão de ácido para etanol, ocasionando uma queda aumentada na proporção de etanol para ácido. Uma vez que esse processo de perda de gás esteja totalmente compreendido, pode ser aconselhável que o melhor curso de

15 ação seja parar o suprimento de gás totalmente durante os períodos de dificuldades na produção de gás de alimentação, em vez de fornecer uma velocidade mais baixa de substrato. Se for determinado que é preferível reduzir a velocidade de suprimento de substrato, uma ação deve ser tomada para corresponder ao aumento do ácido. Essas ações

20 envolveriam o aumento do fluxo de líquido através do sistema para remoção de ácido, o aumento do pH da cultura para manter um nível tolerável de ácido livre e/ou a remoção de uma grande parte das células a partir do sistema para manter uma absorção de gás saudável à proporção celular para a produção mínima de ácido.

**Tabela 1**

**Componentes do Meio e Suas Concentrações**  
**no Meio 1x EtOH**

<b>Componente/Ión</b>	<b>Adicionado Como</b>	<b>1x EtOH</b>
		<b>Conc no Meio (ppm)</b>
NH4+	NH4Cl/(NH4)2HPO4	838
Fe	FeCl2 4H2O	16,8
Ni	NiCl2 6H2O	0,198
Co	CoCl2 6H2O	0,991
Se	Na2SeO3	0,0913
Zn	ZnSO4 7H2O	0,455
Mo	Na2MoM4 2H2O	0,238
Mn	MnCl2 4H2O	0,167
B	H3BO3	1,05
Cu	CuCl2 2H2O	0,149
W	Na2WO4 2H2O	1,12
K	KCl	78,6
Mg	MgCl2 6H2O	59,8
Na	NaCl	78,7*
Ca	CaCl2 2H2O	54,5
Cisteína HCl	Cisteína HCl	250
PO4-2	H3PO4/(NH4)2HPO4	816
Ácido Pantotênico	Ácido Pantotênico	0,025
Biotina	Biotina	0,020
Tiamina	Tiamina	0,050

\* A concentração de Na+ é de NaCl somente. Ela não inclui Na+ de outros componentes tais como Na2WO4 · 2H2O.

\*\* A concentração de Ca+2 não inclui o cálcio a partir do ácido pantotê-

nico, sal de cálcio.

A Tabela 2 detalha os parâmetros de cultura antes e depois do experimento, tais como pH, redução, etanol e ácido acético. Geralmente, quando a cultura usa menos etanol e CO<sub>2</sub> para sobreviver, o nível de etanol diminui conforme a concentração de ácido e o pH da cultura aumentam. A Tabela 2 também lista o alto nível medido de ácido livre durante aqueles experimentos, assim como o número de horas após o fim do experimento para recuperar a taxa original de alimentação de gás. Deve ser lembrado que um componente essencial na sobrevivência da cultura durante a perda de alimentação de gás é a manutenção de uma concentração de ácido livre <5.0 g/L. À medida que o ácido está sendo produzido, um pH maior de cultura e uma velocidade maior de remoção de ácido é necessária para evitar a inibição do ácido.

A Tabela 3 detalha a adição de CO<sub>2</sub> à cultura em mmol/minuto por grama de células na cultura. Os cálculos foram baseados na velocidade de suprimento de bicarbonato de sódio e no total de células no biorreator. A 25°C, uma velocidade de suprimento de CO<sub>2</sub> de 0,014 mmol/minuto g foi suficiente para manter a cultura durante 12 horas sem gás de suprimento. Quando a duração de tempo do experimento foi aumentada para 24 horas, uma taxa média de alimentação de CO<sub>2</sub> de 0,034 mmol/min-g foi necessária para a sobrevivência saudável da cultura. De modo interessante, quando a temperatura da cultura foi aumentada para 38°C, a cultura exigiu um suprimento mínimo de CO<sub>2</sub> de 0,114 mmol/min-g para manter uma cultura saudável. A 38°C, o metabolismo da célula é maior exigindo mais energia para sobreviver, assim maior conversão de etanol em ácido.

## **Exemplo 2**

**Sobrevivência da Cultura Durante 17 e 24 horas****Sem Suprimento de gás**

Condições experimentais:

16,9 horas sem suprimento de gás

5 A temperatura diminuiu para 25°C

A adição de meio não foi modificada para o experimento

0,030mmol/minuto de taxa de suprimento de CO2 por  
grama de células.

A purga do permeato foi usada para manter as células no  
10 interior.

O CO2 não foi retirado da cultura no início do experimento

Antes do início do experimento, a densidade celular da cul-  
tura era de 3,7 g/L; o pH era de 4,44; o redox era de -440mV; a  
absorção de CO e H2 era de 5,0 e 1,2 mmol/minuto, respectivamente;  
15 as conversões de CO e H2 eram de 86 e 40% respectivamente; o etanol  
era de 23,5 g/L; e o ácido era de 3,9 g/L.

Em t = 9511,6 horas, a taxa de fluxo do suprimento de gás  
diminuiu de 474 ml/minuto para 53 ml/minuto. A agitação foi baixada  
de aproximadamente 400 para 50 rpm e o ponto de ajuste da tempera-  
20 tura no reator foi diminuído de 38° para 25°C dentro de cerca de 12  
minutos. Uma vez que o resfriamento tivesse sido feito, 38,5 g/L de  
bicarbonato de sódio como iniciados em 0,57 ml/minuto proporcionan-  
do uma taxa de alimentação de CO2 de 0,030 mmol/minuto por grama  
de células; o fluxo de gás de alimentação foi parado; uma purga de  
25 permeato foi iniciada a 1,95 ml/minuto e o fluxo do meio foi mantido a

1,37 ml/minuto. O nitrogênio foi lentamente adicionado ao espaço superior do reator para impedir que se formasse vácuo no reator. A cultura foi deixada nessa condição durante 16,9 horas.

5 Durante o experimento, foram extraídas amostras líquidas aproximadamente a cada 2 horas para monitorar o pH da cultura, a densidade celular, os produtos e a morfologia celular. O pH da cultura aumentou firmemente ao longo do experimento para chegar a 5,07 até o final do experimento. A concentração de etanol diminuiu firmemente de 23,5 para 7,0 g/L pelo final do experimento. A concentração total de 10 acetila aumentou firmemente de 3,9 para 8,2 g/L. Aproximadamente 12 horas após o início do experimento, a morfologia da cultura mostrou que somente 5-10% das células estavam granuladas ou ocas. O comprimento da célula era médio com pouca a nenhuma deformação ou encurvamento.

15 Em  $t = 9528,5$  horas, o ponto de ajuste da temperatura no reator foi aumentado de volta para 38°C; o suprimento de gás foi reiniciado a cerca de 53 ml/min; o Meio B e a purga de permeato foram cessados; e o fluxo de N<sub>2</sub> para o reator foi parado. Quando a temperatura atingiu aproximadamente 28,0°C, a velocidade de fluxo do gás de 20 suprimento foi aumentada para 143mL/minuto. A cerca de 30,0 °C, o fluxo do gás de alimentação foi aumentado de novo para 236ml/minuto ou 50% da velocidade original do fluxo de gás. A cerca de 32,0°C, a agitação foi aumentada para 200 rpm. A aproximadamente 34°C, a agitação foi aumentada para cerca de 400 rpm.

25 As conversões iniciais a cerca de 40 minutos após o aumento de gás, a agitação e a temperatura estavam boas a 47% de H<sub>2</sub> e 88% de CO. Aproximadamente 15 minutos depois, as conversões ainda estavam muito boas com 47% de H<sub>2</sub> e 87% de CO. Aumentos da taxa de fluxo do gás foram iniciados imediatamente. Foram necessárias 30 18,3 horas para obter o fluxo máximo de gás usado antes do início do

experimento. À medida que o fluxo de gás era aumentado, o pH continuava a cair, chegando a 4,60 em 18,3 horas. O etanol aumentou de volta para 20,0 g/L 40,6 horas depois do fim do experimento e o ácido caiu de volta para 3,4 g/L após 24,9 horas.

5

### Exemplo 3

Condições experimentais:

Aproximadamente 24 horas sem suprimento de gás

A temperatura caiu para cerca de 25°C

A adição de meio não foi modificada para o experimento

10

0,035mmol/minuto de CO<sub>2</sub> por grama de células

A purga de permeato foi usada para manter as células

O CO<sub>2</sub> não foi retirado do meio de cultura no início do experimento

15

Antes do início do experimento, a densidade celular da cultura era de cerca de 3,2 g/L; o pH era de aproximadamente 4,50; o redox era de cerca de -425mV; a absorção de CO e H<sub>2</sub> era de 4,7 e 1,5 mmol/minuto, respectivamente; o etanol era de cerca de 17,7 g/L; e o ácido era de cerca de 2,93 g/L.

20

Em t = 1888 horas, o suprimento de fluxo de gás foi diminuído de 474 ml/minuto para 53 ml/minuto. A agitação foi baixada de aproximadamente 400 para 50 rpm e o ponto de ajuste da temperatura no reator foi diminuído de 38° para 25°C em cerca de 14 minutos. Uma vez que o resfriamento tivesse sido feito, a adição de bicarbonato de sódio foi iniciada, usando aproximadamente 38,5 g/L de fluxo de NaHCO<sub>3</sub> de 0,58 ml/minuto, proporcionando uma taxa de alimentação

de CO<sub>2</sub> de 0,035mmol/minuto por grama de células; o fluxo do gás de alimentação foi parado; uma purga de permeato foi iniciada a 1,81 ml/minuto e o fluxo do meio foi mantido a 1,30 ml/minuto. O nitrogênio foi lentamente adicionado ao reator para evitar uma formação de 5 vácuo no reator. A cultura foi deixada naquela condição durante 24 horas.

Aproximadamente 15,5 horas após o início do experimento, a condição do reator mostrou: a densidade celular de cerca de 2,4 g/L, pH de aproximadamente 4,96; EtOH de mais ou menos 6,06 g/L; e o 10 ácido era de cerca de 7,87 g/L. A morfologia celular mostrou que somente 5-10% das células estavam granuladas ou quase granuladas. Devido à baixa concentração de etanol no reator, em t = 1904 horas, 115mL de álcool de grão Gem Clear foi acrescentado a 9L de meio A para uma concentração de etanol de aproximadamente 10g/L. A 15 velocidade de suprimento do meio permaneceu a mesma, proporcionando uma velocidade de alimentação de etanol de 0,037 mmol/minuto por grama de células.

No final das 24 horas, a condição da cultura proporcionou: a densidade celular de 2,9g/L; o pH de aproximadamente 5,04; o EtOH 20 de 4,10g/L; e o ácido foi de aproximadamente 8,68g/L. A morfologia celular mostrou que aproximadamente 10-15% das células tinham se tornado granuladas ou quase granuladas.

Em t = 1912 horas, o ponto de ajuste da temperatura no reator foi aumentado de volta para 38°C; o suprimento de gás foi 25 reiniciado em aproximadamente 53 ml/min; o Meio B e a purga de permeato foram cessados; e o fluxo de N<sub>2</sub> para dentro do espaço superior do reator foi parado. O meio foi mudado para um meio normal 1xEtOH sem nenhum etanol adicionado. O gás de alimentação e a agitação foram aumentados a intervalos regulares à medida que a 30 temperatura aumentava. Quando a temperatura atingiu aproximada-

mente 28.0°C, o fluxo de gás foi aumentado para cerca de 179 ml/minuto. A aproximadamente 30°C, o fluxo de gás foi aumentado novamente para 248 ml/minuto ou aproximadamente 50% do fluxo de gás original. A aproximadamente 32°C, a agitação foi aumentada para 5 mais ou menos 200 rpm. A aproximadamente 34°C, a agitação foi aumentada para cerca de 400 rpm.

Como uma modalidade, as conversões iniciais 35 minutos após o aumento de gás, a agitação e a temperatura eram de 60% de H<sub>2</sub> e 84% de CO. Como uma modalidade, aproximadamente 15 minutos depois, as conversões proporcionaram: 62% de H<sub>2</sub> e 91% de CO. Aumentos no fluxo de gás foram introduzidos imediatamente. Neste caso, levou cerca de 19,5 horas para atingir o fluxo máximo de gás antes do início do experimento.

### Exemplo 4

## 15 Condições Experimentais:

23,5 horas sem gás

A temperatura caiu para 25°C

A adição de meio foi reduzida para metade do fluxo normal; a concentração de cisteína foi dobrada no meio

20 0,039mmol/minuto de taxa de alimentação de CO<sub>2</sub> por  
grama de células

A purga de permeato foi usada para segurar as células no interior

O CO<sub>2</sub> não foi extraído da cultura no início do experimento.

25 Numa modalidade, o experimento de perda de gás de 24

horas mostrou que a cultura consegue sobreviver muito bem durante 24 horas sem suprimento de gás ao mesmo tempo em que provê 0,035 mmol/minuto de CO<sub>2</sub> por grama de células. Os fluxos de meio e de bicarbonato de sódio para dentro do reator durante o experimento 5 exigiram que 2,6 L de permeato fossem removidos para evitar a perda celular. Isso é um pouco mais do que 2,4 L do volume da cultura. Em escala laboratorial, essa proporção de fluxo de líquido exigido para o volume da cultura é bem tolerada. Todavia, em escala industrial, o volume de água deverá ser monitorado e, se necessário, reduzido. Neste 10 experimento, todos os parâmetros permaneceram os mesmos dos experimentos anteriores, exceto que o fluxo do meio foi reduzido pela metade para diminuir a quantidade de purga de permeato exigida. Houve algumas indicações no experimento anterior que sugerem que uma redução no suprimento de cisteína pode interferir no experimento. 15 Então, durante este experimento, a concentração de cisteína no meio foi dobrada para reter a velocidade de suprimento de cisteína.

Antes do início do experimento, a densidade celular da cultura era de cerca de 2,5 g/L; o pH era de aproximadamente 4,50; o redox era de -440mV; a absorção de CO e H<sub>2</sub> era de cerca de 4,8 e 1,2 20 mmol/minuto, respectivamente; o etanol era de mais ou menos 21,3 g/L; e o ácido era de cerca de 2,96 g/L.

Em t = 2008,5 horas, o suprimento de fluxo de gás foi diminuído de 474 ml/minuto para 53 ml/minuto. A agitação caiu de aproximadamente 400 para cerca de 50 rpm e o ponto de ajuste de 25 temperatura no reator foi diminuído de 38° para 25°C em 13 minutos. Uma vez que o resfriamento tivesse sido feito, a adição de bicarbonato de sódio foi iniciada, usando aproximadamente 38,5 g/L de fluxo de NaHCO<sub>3</sub> de 0,57 ml/min; o fluxo de gás foi cessado; uma purga de permeato foi iniciada a 1,20 ml/min e o fluxo do meio foi reduzido para 30 0,68 ml/minuto. O nitrogênio foi lentamente adicionado à parte

superior do reator para evitar a formação de vácuo no reator. A concentração de cisteína foi aumentada para 5g/L no meio A. O CO<sub>2</sub> foi suprido a 0,039 mmol/minuto por grama de células. A cultura foi mantida nessa condição por 24 horas.

5 Durante o experimento, amostras líquidas foram extraídas  
aproximadamente a cada 2 horas para monitorar o pH da cultura, a  
densidade celular, os produtos e a morfologia celular. Conforme  
esperado, o pH da cultura aumentou através do experimento para  
chegar a 5,14 até o final do experimento. A concentração de etanol  
10 diminuiu firmemente de 21,3 para 6,03 g/L até o fim do experimento. A  
concentração total de acetila aumentou firmemente de 2,96 para 10,38  
g/L. Após cerca de 24 horas, a morfologia da cultura mostrou que cerca  
de 10-20% das células estavam granuladas ou quase granuladas.

Em  $t = 2032$  horas, o ponto de ajuste da temperatura estabelecida no reator aumentou de volta para  $38^{\circ}\text{C}$ ; o suprimento de gás foi reiniciado a cerca de  $53 \text{ ml/min}$ ; a adição de bicarbonato de sódio e a purga de permeato foram cessadas; e o fluxo de  $\text{N}_2$  para o espaço superior do reator foi parado. O fluxo do meio foi aumentado de volta para  $1,37 \text{ ml/minuto}$ . Conforme a cultura foi aquecendo, o fluxo de gás foi aumentado de volta para  $248 \text{ ml/minuto}$  e a agitação foi elevada para  $400 \text{ rpm}$  em degraus.

As conversões iniciais 30 minutos após o aumento de gás, agitação e temperatura eram de 50% de H<sub>2</sub> e 87% de CO. Os aumentos do fluxo de gás foram iniciados imediatamente. Levou cerca de 24 horas para atingir o fluxo máximo de gás usado antes do início do experimento.

### Exemplo 5

Minimização da taxa de alimentação de CO<sub>2</sub> a 25°C, sobre-

vivência da cultura de 12 horas

Condições Experimentais:

12 horas sem suprimento de gás

A temperatura caiu para 25°C

5 A adição de meio não foi modificada durante o experimento

0,014mmol/minuto CO2 por grama de células

A purga de permeato foi utilizada para manter as células

CO2 NÃO FOI vaporizado do caldo da cultura no início do experimento

10 Este experimento avalia a velocidade mínima de adição de CO2 necessária para manter a cultura durante 12 horas a 25°C. Como uma modalidade, a solução de NaHCO3 utilizada como meio B teve sua concentração reduzida enquanto mantinha todos os outros parâmetros experimentais. Neste experimento, a concentração de NaHCO3 foi 15 baixada para aproximadamente 19,3 g/L, gerando uma velocidade de suprimento de CO2 de aproximadamente 0,014 mmol/minuto de CO2 por grama de células no reator. Esta é uma baixa velocidade de suprimento com sobrevivência da cultura.

20 Antes do início do experimento, a densidade celular da cultura era de cerca de 4.0 g/L; o pH era de aproximadamente 4,43; o redox era de mais ou menos -430mV; a absorção de CO e H2 era de cerca de 4,9 e 1,3 mmol/minuto, respectivamente; as conversões de CO e H2 eram de aproximadamente 86 e cerca de 44% respectivamente; o etanol era de mais ou menos 18,9 g/L; e o ácido era de cerca de 3,8g/L.

25 Em 2015, t = 9580,7 horas, a velocidade de fluxo do gás foi

reduzida de mais ou menos 474 ml/ para aproximadamente 53 ml/minuto. A agitação foi baixada de cerca de 400 para aproximadamente 50 rpm e o ponto de ajuste da temperatura no reator foi reduzido de cerca de 38 para cerca de 25° em 12 minutos. Uma vez que o  
5 resfriamento tenha sido feito, a adição de bicarbonato de sódio foi iniciada a 0,56 ml/7 min; o fluxo de gás foi cessado; uma purga de permeato foi iniciada a 1,96 ml/minuto e o fluxo do meio foi mantido a 1,36 ml/minuto. O nitrogênio foi lentamente adicionado ao reator para evitar a formação de vácuo no reator. A cultura foi mantida nessa  
10 condição por aproximadamente 12 horas.

Durante o experimento, amostras líquidas foram tomadas aproximadamente a cada 2 horas para monitorar o pH da cultura, a densidade celular, os produtos e a morfologia celular. Através do experimento o pH da cultura aumentou para atingir cerca de 4,72 até o  
15 final do experimento. A concentração de etanol diminuiu firmemente de cerca de 18,9 até aproximadamente 10,7 g/L pelo fim do experimento. A concentração total de acetila aumentou firmemente desde cerca de 3,8 até 6.0 g/L. A densidade celular caiu desde cerca de 4.0 até aproximadamente 2.8 g/L. Após mais ou menos 12 horas, a morfologia da  
20 cultura mostrou que cerca de 95% das células tinham uma média ligeiramente longa no comprimento com deformação e encurvamento mínimos e apenas uma célula granulada ocasional ou corpo oco.

Em  $t = 9592$  horas, o ponto de ajuste da temperatura no reator foi aumentada de volta para cerca de 38°C; o suprimento de gás  
25 foi reiniciado a aproximadamente 53 ml/min; o meio B e a purga de permeato foram cessados; e o fluxo de N<sub>2</sub> para o espaço superior do reator foi parado. Enquanto a cultura era aquecida durante os próximos 15 minutos, a velocidade do fluxo de gás e a agitação foram aumentados em intervalos regulares. Quando a temperatura atingiu aproximadamente 28.0°C, a velocidade do fluxo de gás foi aumentada para  
30

aproximadamente 178 ml/minuto. O pH da cultura caiu lentamente, indicando atividade da cultura. Aproximadamente 30,0°C, a velocidade do fluxo de gás foi aumentada novamente para 236 ml/minuto ou 50% da velocidade do fluxo de gás original. Aproximadamente 32,0°C, 5 a agitação foi aumentada para aproximadamente 200 rpm. Aproximadamente 34°C, a agitação foi aumentada para aproximadamente 400 rpm.

As conversões iniciais 50 minutos após o aumento de gás, a agitação e a temperatura proporcionaram cerca de 53% de H<sub>2</sub> e cerca 10 de 89% de CO. Os aumentos da velocidade do fluxo de gás foram iniciados imediatamente. Levou 14,6 horas para atingir o fluxo máximo de gás usado antes do início do experimento. Conforme o fluxo de gás foi aumentado, a concentração de etanol aumentou de volta para cerca de 23,7 g/L em 49,4 horas e o ácido caiu de volta para 3,5 g/L após 9,3 15 horas.

### **Exemplo 6**

Minimização da velocidade de suprimento de CO<sub>2</sub> a 38°C, sobrevivência de 6 horas

Condições do Experimento:

20 6 horas sem suprimento de gás

Temperatura mantida a 38°C

A adição de meio não foi modificada durante o experimento

0,114mmol/minuto CO<sub>2</sub> por grama de células

A purga de permeato foi utilizada para manter as células

25 N<sub>2</sub> utilizado para vaporizar CO<sub>2</sub> da cultura no início do

## experimento

5 Antes do início do experimento, a densidade celular da cultura era de cerca de 2,76 g/L; o pH era de cerca de 4,60; o redox era de cerca de -440mV; a absorção de CO e H<sub>2</sub> era de cerca de 4,5 e 1,2 mmol/minuto, respectivamente; o etanol era de cerca de 19 g/L; e o ácido era de cerca de 2,43g/L.

10 Em 2015, t = 3080,5 horas, a velocidade do fluxo de gás foi reduzida de cerca de 475 ml/ para aproximadamente 53 ml/minuto e, depois, desligada. Um alto fluxo de N<sub>2</sub> iniciou-se através do dispersor de suprimento de gás enquanto a agitação estava ainda em cerca de 400 rpm durante cerca de 3 minutos para vaporizar o CO<sub>2</sub> a partir da cultura. Ao extrair o CO<sub>2</sub>, o controle de pH foi desligado para evitar qualquer adição de bicarbonato. Após 3 minutos, o fluxo de N<sub>2</sub> caiu e a 15 entrada de N<sub>2</sub> foi modificada para o espaço superior em vez de para o dispersor. A agitação foi baixada desde cerca de 400 para cerca de 50 rpm. A adição de CO<sub>2</sub> foi iniciada a cerca de 0,82 ml/minuto, usando aproximadamente 77g/L de NaHCO<sub>3</sub> para prover aproximadamente 0,114 mmol/minuto de CO<sub>2</sub> por grama de células no reator. A velocidade do fluxo do meio foi deixado a cerca de 1,34 ml/minuto e foi iniciada 20 uma purga do fluxo de permeato de 2,25 ml/minuto.

25 O experimento foi parado após 6 horas em t = 3086,5 horas, devido à alta concentração de ácido. A adição de bicarbonato de sódio, a purga de permeato e a adição de N<sub>2</sub> foram paradas. O fluxo do gás de alimentação foi reiniciado a 53 ml/minuto. O gás de suprimento e a agitação foram aumentados aproximadamente nos mesmos intervalos usados para aumentar o gás e a agitação quando a cultura está aquecendo a cerca de 38°C nos experimentos anteriores. Dois minutos após o experimento foi parado, o fluxo de gás de alimentação foi aumentado para aproximadamente 170 ml/minuto. Mais ou menos 30 quatro minutos depois, o experimento foi parado, o fluxo do gás de

alimentação foi aumentado para cerca de 248 ml/minuto (50% da velocidade do fluxo original de gás). Aproximadamente seis minutos após o experimento ser cessado, a agitação foi aumentada para 200 rpm. Aproximadamente oito minutos após o experimento ser parado, a agitação foi aumentada para cerca de 400 rpm.

Aproximadamente 6 horas depois da adição de CO<sub>2</sub> e baixa agitação, o pH era de aproximadamente 5,08. Uma análise do líquido mostrou que os produtos eram de aproximadamente 10,4 g/L de etanol e aproximadamente 8,21 g/L de ácido. A morfologia da cultura mostrou 10 que cerca de 3% das células estavam granuladas e aproximadamente 22% estavam quase granuladas.

As conversões iniciais cerca de 30 minutos após o experimento ser parado eram de 47% de cerca de H<sub>2</sub> e cerca de 87% de CO. Os aumentos do fluxo de gás foram iniciados imediatamente. A velocidade original do fluxo de gás de alimentação foi atingida em t = 3108 15 horas ou aproximadamente 21,5 horas após o fim do experimento.

**Tabela 2**

**Parâmetros de Cultura em Experimentos com Perda de Gás a Aproximadamente 25C e cerca de 38C em que a Cultura tinha sido reiniciada, usando Agitação e Pelo Menos 50% do GFR Original**

Cor- rida	Temperatura da Cultura (C)	Conc. Bicarbona- to	#	Δ em EtoH			Δ em Hac			Δ em pH			Δ em redox			Tem- po de recup.
				Exp/H sem gás de alim.	Antes do Exp.	Fim do exp.	An- tes do Exp.	Fim do exp.	An- tes do Exp.	Fim do exp.	An- tes do Exp.	Fim do exp.	(m/V)	(m/V)	Ací- do livre	máx atín- gido
1	25	77	8	21,01	10,74	4,41	9,36	4,48	4,93	-425	325	4,1	29,2			
2	25	38,5	16,9	23,51	7,03	3,91	8,24	4,44	5,07	-440	245	3,5	18,3			
3	25	19,25	12	18,95	9,91	3,83	5,78	4,43	4,72	-430	265	3,2	14,6			
4	25	9,625	12,25	20,28	11,92	3,54	2,61	4,53	5,12	-440	240	2,3	35,2			
5	25	14,63	12,25	17,89	11,10	5,52	4,40	4,53	5,04	-440	370	1,5	35,6			
6	25	38,5	24	17,70	4,10	2,93	8,68	4,50	5,04	-425	305	3,1	19,5			
7	25	38,5	23,5	21,30	6,03	2,96	10,38	4,50	5,14	-440	320	3,5	24			
8	38	77	4	21,30	9,88	3,28	14,60	4,56	5,26	-445	340	3,4	13,5			

9	38	77	6,75	23,20	7,25	3,15	14,50	4,47	5,53	-430	280	3,2	19
10	38	77	6,5	20,44	7,04	2,86	12,79	4,53	5,30	-440	235	3,1	20,75
11	38	77	7	22,20	8,77	3,40	14,10	4,48	5,15	-435	275	4,0	28
12	38	77	6	19,00	10,4	2,43	8,21	4,60	5,08	-440	270	2,6	21,5
13	38	77	8,5	20,15	7,5	1,75	12,12	4,53	5,2	-430	200	3,4	30,5

Tabela 3

**Velocidade de Suprimento de CO<sub>2</sub> Calculada por Grama de Células no Reator (mmol/minuto g) para a Adição de Bicarbonato, Experimentos com Perda de Gás de Alimentação com Velocidades Conhecidas de Adição de CO<sub>2</sub>**

Corrida	Temp. Cultura (°C)	Conc. NaHCO <sub>3</sub> (g/L)	Veloc. Fluxo de NaHCO <sub>3</sub> (ml/min)	Veloc. de Aliment. de CO <sub>2</sub> (mmol/min)	Densidade Celular (g/L)	Vol. Cultura (L)	Veloc. de Alim. De CO <sub>2</sub> por grama de células (mmol/min g)	Extensão do Tempo de Exposição	Tempo de Recuperação
1	25	77	0.57	0.5224	3.64	2.35	0.0610	8	29.2
2	25	38.5	0.57	0.2612	3.71	2.325	0.0303	17	18.3
3	25	19.25	0.56	0.1282	4.02	2.325	0.0137	12	14.6
4	25	9.625	0.57	0.0653	3.25	2.3	0.0087	12	35.2
5	25	14.63	0.58	0.1010	3.97	2.375	0.0107	12	35.6
6	25	38.5	0.58	0.2658	3.20	2.4	0.0347	24	19.5
7	25	38.5	0.57	0.2612	2.69	2.5	0.0388	24	24
8	38	77	3.18	2.9147	3.12	2.45	0.3815	4	13.5
9	38	77	1.65	1.5123	2.48	2.45	0.2492	6.75	19
10	38	77	1.4	1.2832	2.98	2.35	0.1834	6.5	20.75
11	38	77	1	0.9166	2.84	2.4	0.1347	7	28
12	38	77	0.82	0.7516	2.76	2.4	0.1135	6	21.5
13	38	77	0.92	0.8432	2.71	2.4	0.1298	8.5	30.5

Tabela 4

Suprimento de CO<sub>2</sub>, Taxa de Absorção de EtOH e Produção de Ácido

## Durante Experimentos de Perda de Gás de Suprimento

Corrida	Temperatura do Experimento (°C)	Veloc. de Suprimento de CO <sub>2</sub> (mmol/min g)	Produção de Ácido (mmol/min g)	Consumo de EtOH (mmol/min g)	Extensão de Tempo do Experimento (H)
1	25	0.0610	0.0816	0.0442	8
2	25	0.0306	0.0419	0.0310	17
3	25	0.0140	0.0263	0.0211	12
4	25	0.0346	0.0451	-	24.0
5	25	0.0387	0.0546	0.0504	24.0
6	38	0.382	0.285	0.096	4.0
7	38	0.223	0.295	0.222	6.75
8	38	0.187	0.192	0.131	6.5
9	38	0.142	0.196	0.123	7.0
10	38	0.113	0.136	0.086	6.0
11	38	0.130	0.166	0.100	8.5

### **Exemplo 7**

#### **Exemplo Comparativo:**

#### **Método Exemplificativo da Presente Invenção**

Um gás de síntese ou residual contendo CO e/ou dióxido de carbono /hidrogênio gasoso é continuamente introduzido num tanque biorreator contendo uma cepa de *C. ljungdahlii*, juntamente com um meio líquido convencional contendo vitaminas, traços de metais e sais.

Durante a partida do método, usando uma cultura com 10% ou menos, o reator é operado com um lote em fase líquida, em que o meio líquido não é abastecido continuamente para o reator. A fase líquida no reator consiste num lote de meio nutriente com uma concentração nominal de nutriente limitador, seja pantotenato de cálcio ou cobalto. Alternativamente, pode também ser empregado um meio rico contendo fermento, tripticase ou outros nutrientes complexos.

Idealmente, a fase gasosa na partida está livre de CO<sub>2</sub> e contém H<sub>2</sub> em excesso. A velocidade do fluxo de gás e a velocidade de agitação são mantidas a níveis baixos (menos do que 500 rpm num biorreator de fermentação New Brunswick Scientific Bioflo. RTM) para produzir CO e H<sub>2</sub> com leve excesso, mas, ao mesmo tempo, evitando a inibição de substrato de CO. Em um biorreator de fermentação de laboratório de 1 litro New Brunswick Scientific Bioflo. RTM, por exemplo, em que a composição do suprimento de gás é de 63% de H<sub>2</sub>, 32% de CO e 5% de CH<sub>4</sub>, a velocidade de agitação para iniciar a partida é de 400 rpm e a velocidade de gás é de 20 ml/ minuto. A causa da produção de etanol durante a partida é H<sub>2</sub> em excesso; a limitação de nutrientes ocorre depois. Assim, os nutrientes líquidos em excesso (pantotenato, cobalto) estão presentes durante a partida para evitar a aclimatação indesejada das culturas a nutrientes baixos.

Conforme a fermentação prossegue durante um período de várias horas após a inoculação, o CO<sub>2</sub> é produzido a partir da conversão de CO e H<sub>sub</sub>.2 é consumido juntamente com CO<sub>sub</sub>.2, que é um sinal para aumentar nominalmente a taxa de agitação para evitar a limitação de transferência de massa gasosa. No New Brunswick Scientific Bioflo.RTM. CSTR, o gás de saída é de 25% de CO, 67% de H<sub>sub</sub>.2, 2% de CO<sub>sub</sub>.2, e 6% de CH<sub>sub</sub>.4. Caso a agitação seja aumentada rápido demais, ocorre a inibição do substrato de CO, conforme evidenciada por uma diminuição da concentração de metano após um aumento da agitação. Assim, a velocidade de agitação pode ser tipicamente aumentada por 200 rpm em 24 horas. Esse procedimento de monitoramento da produção de CO<sub>sub</sub>.2 (ou conversão de H<sub>sub</sub>.2) enquanto ocorre nominalmente o aumento da taxa de agitação a uma taxa relativamente rápida até que seja atingida a agitação desejada.

Uma agitação típica no biorreator New Brunswick Scientific Bioflo.RTM. é de 900 rpm. Durante este tempo de aumento da agitação em cultura líquida, a produção celular é mais importante, em vez da formação de produto. Assim, são obtidas concentrações de células de aproximadamente 1,5 g/L, enquanto as concentrações típicas de produto são de 10 g/L de etanol e 2 g/L de acetato a partir da cultura do lote.

Uma vez a agitação desejada seja alcançada, o sistema permite o crescimento até o máximo de absorção de H<sub>sub</sub>.2. É desejável ter concentrações de saída muito altas de H<sub>sub</sub>.2 (geralmente >60%) para garantir a produção de etanol enquanto limita a produção de ácido acético. A alimentação do meio líquido é, então, ligada (para sistemas que têm inoculação de lote a partir da cultura em estoque) para iniciar o suprimento líquido contínuo e a velocidade do fluxo de gás é aumentada para atingir a velocidade de fluxo desejada. No biorreator de fermentação de laboratório New Brunswick Scientific Bioflo.RTM. a velocidade de suprimento de líquido é tipicamente de 0,5 mL/minuto, enquanto que a velocidade do fluxo de gás é aumentada de

10 a 15% a cada 24 horas para obter um valor de 125 mL/minuto.

É importante prover H<sub>sub</sub>.2 em excesso no gás de suprimento para evitar a produção em excesso de ácido acético. Conforme a velocidade do fluxo de gás é aumentada, a produção de células aumenta 5 até que o reator seja finalmente limitado quanto aos nutrientes em fase líquida (pantotenato de cálcio ou cobalto) conforme evidenciado por uma pequena queda na conversão de H<sub>sub</sub>.2, na produtividade alvo. No New Brunswick Scientific Bioflo.RTM. CSTR, isso é reconhecido por uma queda de 10% durante a conversão de H<sub>sub</sub>.2 a uma produtivida-10 de desejada de 20 g/L por dia.

O método de produção e o sistema de reator são então mantidos num estado estacionário que produz de 15 a 35 g/L de etanol e de 0 a 5 g/L de acetato como produtos, como alguns pequenos ajustes ocasionais em nutrientes limitadores, velocidade dos líquidos e velocidade do gás. As condições típicas do estado estacionário no biorreator 15 de fermentação de laboratório New Brunswick Scientific Bioflo.RTM. sem reciclagem celular são um tempo de retenção de gás (velocidade de gás/volume líquido do reator) de 20 minutos, um tempo de retenção de líquido (velocidade de fluxo de líquido/volume líquido do reator) de 30 20 horas e um valor de agitação de 900 rpm, resultando em conversões de CO de 92% e conversões de H<sub>sub</sub>.2 de 60% com limitação de pantotenoato.

Numa modalidade deste método onde a reciclagem celular é 25 acrescentada ao sistema do reator, ela é acrescentada nesta altura juntamente com um ajuste na velocidade de gás (aumento) e concentração de nutrientes (diminuição). Com a reciclagem celular no New Brunswick Scientific Bioflo.RTM. CSTR, o tempo de retenção do gás é de 8 minutos, o tempo de retenção do líquido é de 12 horas, o tempo de retenção celular é de 40 horas e a velocidade de agitação é de 900 rpm. 30 Essas condições resultam geralmente numa conversão de CO de 92% e

uma conversão de H<sub>2</sub> de 50% com limitação de pantotenato.

### **Exemplo 8**

#### **Exemplo Comparativo:**

#### **Recuperação de Falha Grave no Método**

5                   Um CSTR com reciclagem celular contendo *C. Ijungdahlii*, com C-01 sendo continuamente suprido com gás e nutrientes líquidos alimentados, produzindo 15-35 g/L de etanol e 0-5 g/L de acetato em um estado estacionário que falhou devido a mudanças imprevistas nas condições do método, por exemplo, problemas mecânicos no reator. A  
 10                  10 falha no sistema do reator pode ser leve, tal como um breve aumento na velocidade do gás que possa causar a inibição do substrato a curto prazo, ou grave, tal como um aumento de longo prazo na velocidade do fluxo de gás que possa, por fim, levar a uma produção aumentada de ácido acético e uma inibição mais severa do produto de ácido acético  
 15                  15 molecular.

As falhas de curto prazo são facilmente corrigidas pelo mero reajuste do parâmetro de falha (por exemplo, diminuindo a velocidade do gás para o seu nível original) e o monitoramento do progresso do reator para garantir que a falha não leve a um problema de longo prazo.

20                  Todavia, a inibição de ácido acético é um problema mais grave. Caso o ácido acético molecular em excesso seja produzido pela cultura como resultado de inibição de substrato a longo prazo, adição em excesso de nutriente, acúmulo de CO<sub>2</sub> ou problemas mecânicos de muitos tipos, o problema que levou ao excesso de ácido acético  
 25                  25 deve ser primeiramente corrigido. O excesso de ácido acético, que leva rapidamente à inibição do produto, é retirado do sistema por meio do aumento da velocidade do líquido para retirar o ácido acético (e infelizmente o etanol) do sistema. Uma vez que o nível de acetato esteja

abaixo de 3-5 g/L, o fluxo de líquido é reajustado e o reator é colocado de volta abaixo quer do excesso de alimentação de H<sub>sub</sub>.2, quer limitação de vitamina ou cobalto (com ou sem reciclagem celular). Trazer o reator de volta envolve a redução da velocidade do gás para 5 evitar a inibição do substrato e/ou a velocidade de agitação antes da lavagem das células ou que ocorra a lise celular. A velocidade de agitação ou a velocidade do gás são então aumentadas.

Como exemplo específico, um CSTR com reciclagem celular contendo *C. ljungdahlii*, cepa C-O1, que produzia etanol e ácido acético 10 a partir de CO, CO<sub>sub</sub>.2 e H<sub>sub</sub>.2 começou a produzir ácido acético em resposta a um problema mecânico. O reator de 2.100 ml foi abastecido com gás contendo 62% H<sub>sub</sub>.2, 31% CO e 7% C<sub>sub</sub>.2H<sub>sub</sub>.6 com um tempo de retenção de gás de 15 minutos e estava operando a 15 uma velocidade de 600 rpm e pH de 4.86. O tempo de retenção de líquido foi de 23 horas e o tempo de retenção celular foi de 68 horas. A solução de vitamina B (mistura aquosa de 50,5 mg/1 pantotenato de cálcio, 20,6 mg/L d- biotina e 50,6 mg/L tiamina HCl) estava presente 20 no meio de nutriente líquido contendo sais e vitaminas a uma concentração de 0,4 ml de solução vitamínica por litro de meio (ver Tabela 2). A concentração de etanol caiu para 7 g/L, enquanto a concentração de acetato aumentou para 7 g/L, condições não são nem estáveis para a operação do reator e nem econômicas para a produção de etanol. A concentração celular era de 2,4 g/L, a conversão de CO era de 85% e a conversão de H<sub>sub</sub>.2 era de 25%.

25 A estratégia utilizada para recuperar o reator consistiu em reduzir drasticamente o gás abastecido ao reator, seguido de uma recuperação gradual do reator na presença de H<sub>sub</sub>.2 em excesso. A velocidade de líquido para o reator não foi reduzida para eliminar a inibição de produto neste exemplo porque a concentração de acetato 30 não estava excessivamente alta. Em vez disso, a concentração de

acetato foi deixada cair mais gradualmente a níveis não inibidores com a redução na velocidade do fluxo de gás e a subsequente operação na presença de H<sub>sub</sub>2 em excesso. O procedimento específico para recuperação do reator é discutido abaixo.

5 A reciclagem celular foi desligada e a velocidade do gás foi drasticamente reduzida em 70% durante um tempo de retenção de 62 minutos, enquanto foi feito um leve ajuste no tempo de retenção de líquido de 23 para 30 horas (t=0). A concentração de vitamina no meio não foi mudada. Com esta mudança na velocidade do gás, a conversão de CO aumentou para 98% e a conversão de H<sub>sub</sub>2 aumentou em 80%. De modo mais importante, o sistema teve um excesso de H<sub>sub</sub>2 presente, conforme ficou evidenciado pela redução de CO<sub>sub</sub>2 na saída de gás de 19 para 5%. Com o início do excesso de H<sub>sub</sub>2, a concentração de acetato caiu enquanto a concentração de etanol aumentou. Em t=66 h (66 h após desligar a reciclagem celular), por exemplo, a concentração de acetato tinha caído para 4 g/L e a concentração de etanol tinha subido levemente para 7,5 g/L.

10

15

A presença de H<sub>sub</sub>2 em excesso (e a concentração abaixada de acetato) permitiu aumentos subsequentes na velocidade, 20 primeiro mais lentamente e, depois, a uma velocidade mais alta. Em t=215 hr, a retenção de gás era de 29 minutos, a concentração de etanol era de 12 g/L e a concentração de acetato era de 3 g/L. A produtividade de etanol era de 8 g/L por dia. O CO<sub>sub</sub>2 estava presente no gás de saída a 6%, a conversão de CO foi de 98% e a conversão de H<sub>sub</sub>2 foi de 80%. Em t=315 hr, a concentração de etanol era de 16 g/L e a concentração de acetato era de 4 g/L, novamente com boas conversões de gás e um tempo de retenção de 20 25 minutos. A produtividade de etanol era de 11 g/L por dia. Em t=465 hr, a concentração de etanol chegou a 20 g/L, com 3.5-4 g/L de acetato 30 também presente. A produtividade de etanol era de 16 g/L por dia. O

tempo de retenção de gás tinha caído para 16 minutos, com conversões de CO e H<sub>2</sub> de 95 e 73%, respectivamente. Essas condições foram mantidas por quase 200 horas de operação contínua, demonstrando que o sistema de reator tinha recuperado a sua capacidade de produzir 5 etanol e tinha retido essencialmente as condições operacionais anteriores.

Todos os documentos publicados são aqui incorporados por referência. Inúmeras modificações e variações da presente invenção estão incluídas no Relatório Descritivo acima referenciado e espera-se 10 que as mesmas sejam óbvias para alguém versado na técnica. Acredita-se que essas modificações e alterações nas composições e métodos da presente invenção sejam compreendidas pelo escopo das Reivindicações aqui anexadas.

## REIVINDICAÇÕES

### 1. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos

**Produtores de Álcool**, contendo pelo menos uma bactéria acetogênica, **caracterizado** por que a referida cultura de microrganismos compreende uma ou mais cepas selecionadas a partir de *Clostridium*, *Moorella*, *Carboxydothermus* e suas modificações genéticas em um reactor de fermentação de gás de síntese a uma temperatura operacional em concentração reduzida ou ausência de gás de síntese compreendendo: adicionar dióxido de carbono e, opcionalmente, adicionar álcool; manter a concentração de ácido acético livre em menos de 5 g/L de ácido acético livre; consumir álcool na solução existente do referido reator de fermentação; realizar os passos acima mencionados dentro de 30 minutos da referida concentração diminuída ou ausência de gás de síntese; compreendendo uma proporção de menos de 0,77 de álcool consumido para o álcool inicial; e subsequentemente recuperar a cultura de microorganismos para produzir álcool; em que o referido álcool compreende um ou mais de etanol e butanol.

### 2. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos

**Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a referida sustentação de cultura de microorganismos compreende uma duração de 0-30 horas.

### 3. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos

**Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o pH da cultura de microorganismos é mantido na faixa de 3,5-5,6.

### 4. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos

**Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que é adicionada uma solução de bicarbonato para controlar o pH da cultura de microorganismos.

**5. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o referido dióxido de carbono é opcionalmente removido do referido reator.

**6. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que são opcionalmente adicionados nutrientes ao referido reator.

**7. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o álcool compreende um ou mais de etanol e butanol.

**8. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a temperatura é opcionalmente mudada a partir da temperatura operacional para entre 0-25 graus C, se a temperatura não estiver entre 0-25 graus C.

**9. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que água é opcionalmente adicionada ao referido reator.

**10. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que opcionalmente adicionar água ao referido reator compreende: água fresca, água de composição, água reciclada, água destilada, água desionizada ou suas combinações.

**11. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a referida cultura de microorganismos é retornada a condições de pré-suspensão compreendendo a adição de gás de síntese.

**12. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o permeato é opcionalmente removido.

**13. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o referido reator é opcionalmente purgado com gás inerte.

**14. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que é opcionalmente mantida agitação baixa para manter sólidos em suspensão.

**15. Método Para Prevenção de Perda Rápida de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, contendo pelo menos uma bactéria acetogênica, **caracterizado** por que a referida cultura de microrganismos que compreende uma ou mais cepas selecionadas a partir de *Clostridium*, *Moorella*, *Carboxydothtermus* e suas modificações genéticas num reactor de fermentação de gás de síntese em concentração reduzida ou ausência de gás de síntese compreendendo: diminuir a temperatura desde a temperatura operacional até entre 0-25 graus C. se a referida temperatura operacional não estiver entre 0-25 graus C.; manter a concentração de ácido acético livre em menos de 5 g/L de ácido acético livre; consumir álcool na solução existente do referido reator de fermentação; realizar os passos acima mencionados dentro de 30 minutos da referida concentração diminuída ou ausência de gás de síntese; compreendendo uma proporção de menos de 0,77 de álcool consumido para o álcool inicial; e subsequentemente recuperar a cultura de microorganismos para produzir álcool; em que o referido álcool compreende um ou mais de etanol e butanol.

**16. Método de Sustentação de Cultura de Microrganismos Produtores de Álcool**, contendo pelo menos uma bactéria acetogênica,

**caracterizado** por que a referida cultura de microrganismos compreende uma ou mais cepas selecionadas a partir de *Clostridium*, *Moorella*, *Carboxydothermus* e suas modificações genéticas num reactor de fermentação de gás de síntese devido à diminuição da concentração ou ausência de gás de síntese no fornecimento de gás de alimentação, compreendendo: a diminuição da temperatura desde a temperatura operacional até entre 0-25 graus C. se a referida temperatura operacional não estiver entre 0-25 graus C.; manter a concentração de ácido acético livre a menos de 5 g/L de ácido acético livre; consumir álcool na solução existente do referido reator de fermentação; realizar os passos acima mencionados dentro de 30 minutos da referida concentração diminuída ou ausência de gás de síntese; compreendendo uma proporção de menos de 0,77 de álcool consumido para o álcool inicial; e subsequentemente recuperar a cultura de microorganismos para produzir álcool; em que o referido álcool compreende um ou mais de etanol e butanol.

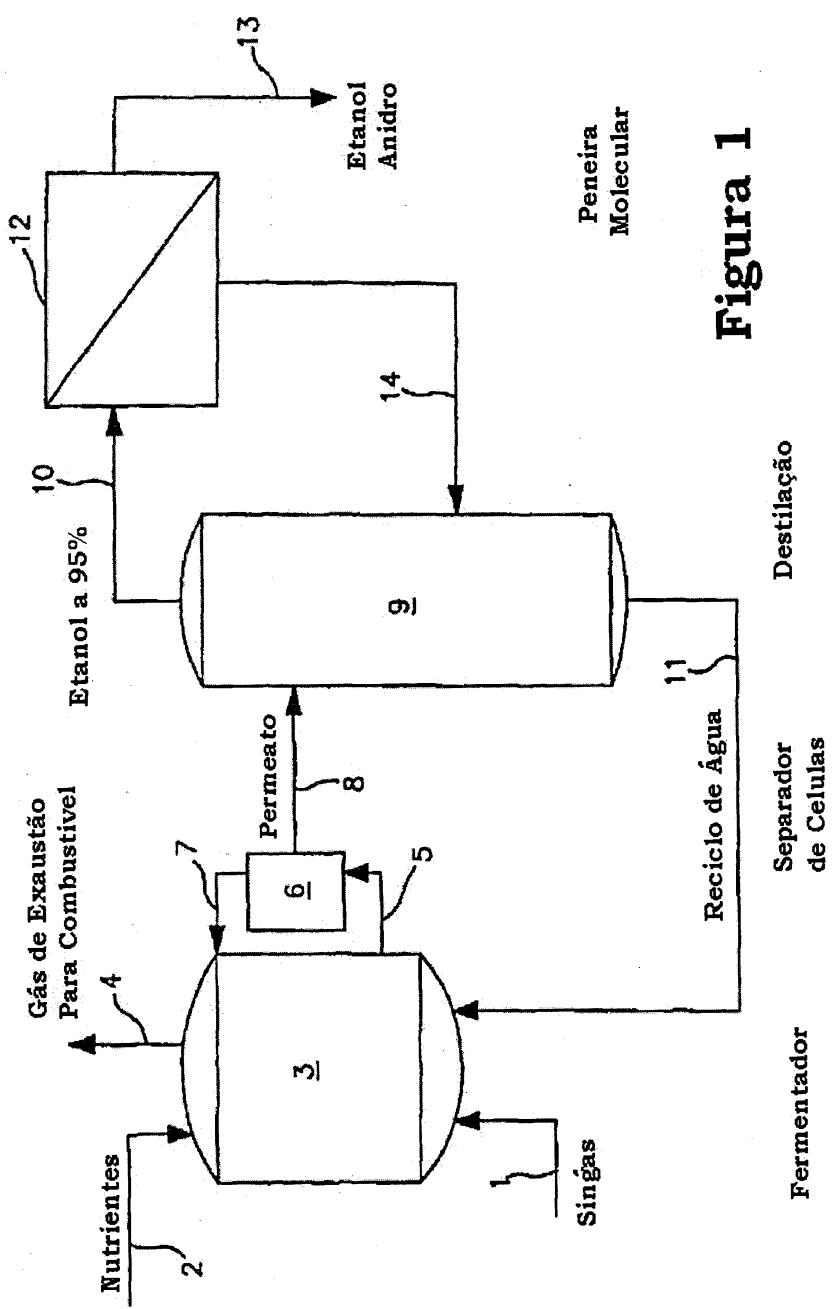
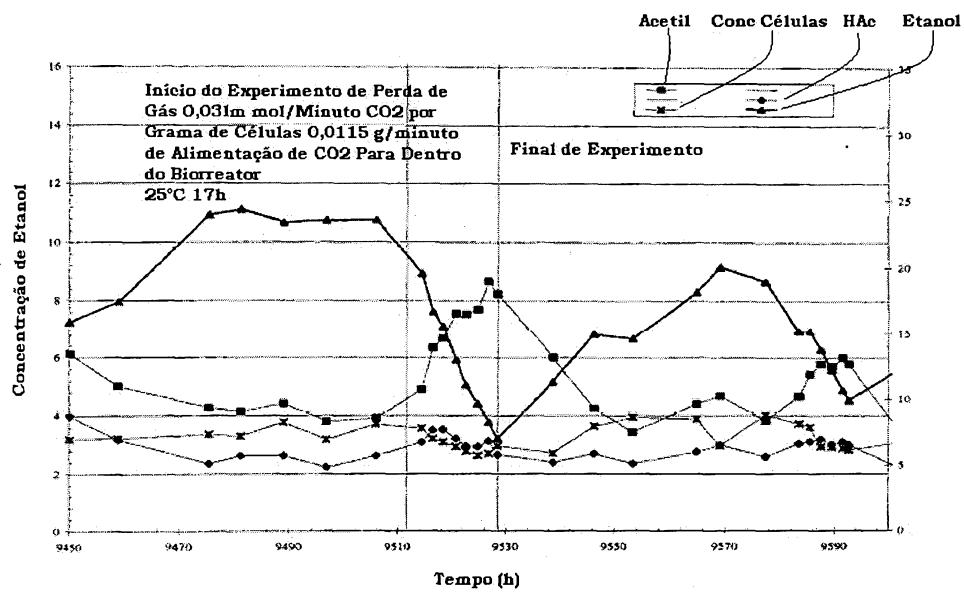
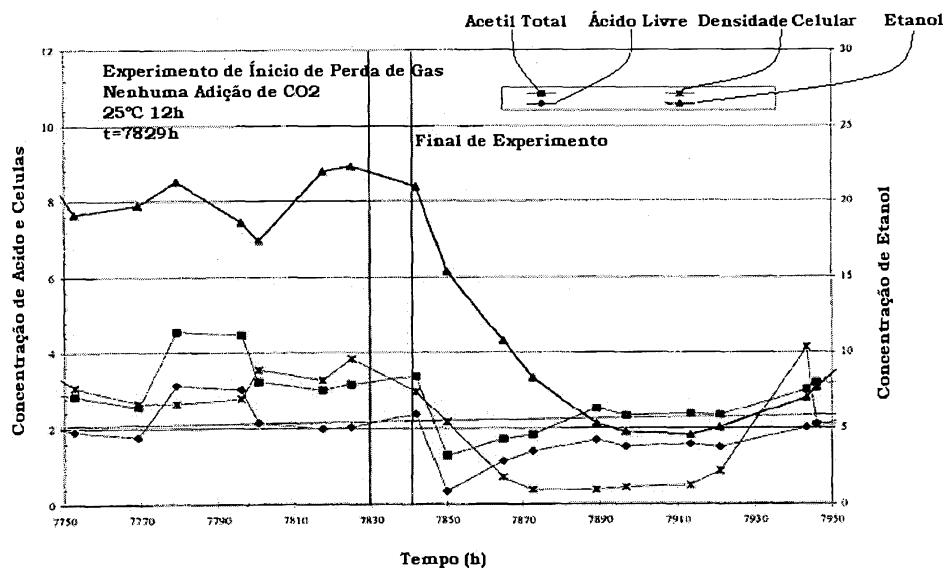


Figura 1



Concentração dos Produtos (g/L) e Concentração das Células (g/L) no Reator, um CSTR Direto Usado em Experimentos de Perda de Gás de Alimentação - Utilizando CO<sub>2</sub>e Etanol Para Energia

**Figura 2**



Concentração de Produto (g/L) e Densidade Celular (g/L) em Reator, um CSTR Direto Usado em Experimentos de Perda de Gás com Baixa Temperatura na Ausência de CO<sub>2</sub>

**Figura 3**