



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

(21) **PI0613714-8 A2**

(22) Data de Depósito: 13/06/2006
(43) Data da Publicação: 01/02/2011
(RPI 2091)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 7/18

(54) Título: **MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE MATERIAL DE AMIDO NATURAL**

(30) Prioridade Unionista: 17/06/2005 CN 200510011959.6

(73) Titular(es): TSINGHUA UNIVERSITY

(72) Inventor(es): DEHUA LIU, HONGJUAN LIU, JIAN HAO, KEKE CHENG, RIHUI LIN

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT CN2006001291 de 13/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/133637 de 21/12/2006

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE MATERIAL DE AMIDO NATURAL. A presente invenção refere-se a um método para produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol a partir de materiais de amido natural, incluindo as etapas que seguem: 1) *Candida krusei* ou *Hansenula Arabitolgens Fang* são inoculadas em um meio de fermentação com o líquido de sacarificação dos amidos naturais como uma fonte de carbono; as células de levedura são cultivadas em uma condição aeróbica até que a taxa de consumo de glicose seja significativamente reduzida, e então fermentadas anaerobicamente para uma concentração de glicose de 5 a 10 g/L; o caldo de fermentação é coletado e filtrado para remover as células de levedura no caldo, e o filtrado resultante é caldo de fermentação de glicerina; 2) *Klebsiella*, *Clostridium butyricum* ou *Clostridium pasteurianum* são inoculadas em um meio de fermentação no qual o caldo de fermentação de glicerina obtido a partir da etapa 1) serve como uma fonte de carbono; as bactérias são fermentadas anaerobicamente por 30-32 horas, e então fermentadas aerobiamente quando a taxa de produção de 1,3-propanodiol diminuiu obviamente, e a fermentação foi parada quando a concentração de glicerina é reduzida para um nível abaixo de 10 g/L, e finalmente 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol são obtidos. O método da presente invenção pode reduzir eficazmente o custo de produção e aumentar a produtividade.



PI0613714-8

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE MATERIAL DE AMIDO NATURAL**".

CAMPO DA TÉCNICA

5 A presente invenção refere-se a um método para produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol, particularmente um método para produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol a partir de materiais de amido natural.

ANTECEDENTES DAS TÉCNICAS

1,3-Propanodiol (PDO), como uma matéria-prima importante para a indústria química, pode ser usado como um solvente orgânico em tintas, corantes e impressão, revestimentos, lubrificantes ou indústria anticongelante e similares. 1,3-Propanodiol pode agir como um monômero na síntese de poliésteres e poliuretano, especialmente para polimerizar com ácido tereftálico para formar polítrimetileno tereftalato (PTT), que exibe melhores desempenhos comparado com aqueles polímeros sintetizados a partir de 1,2-propanodiol, butanodiol e monômero de glicol. Agora, dezenas de milhões de toneladas de polietileno tereftalatos (PET) são consumidas a cada ano em todo o mundo. PTT é comparável a PET em estabilidade química, biodegradabilidade e similar, no entanto mais excelente em resistência à poluição, dureza, resiliência elástica, resistência à UV e similar. Ainda, PTT também tem outras vantagens, tal como resistência à abrasão ou capacidade de desgaste, baixa absorção de água, eletricidade estática baixa, etc, capaz de competir com náilon no mercado de tapete. Ele pode ser também usado em tecidos não-tecidos, plásticos de engenharia, roupas, enfeites domésticos, materiais de revestimento, tecidos e similar. PTT foi avaliado como um dos seis melhores petroquímicos novos nos USA em 1998, e considerado como o produto atual ao invés de PET.

O excelente desempenho e potencial de mercado de PTT foram reconhecidos 50 anos atrás. É muito difícil produzir PTT em uma escala industrial grande devido à dificuldade técnica grande e custo na produção de sua matéria-prima, 1,3-propanodiol. Até agora, apenas duas corporações internacionais, Dupont e Shell, produzem 1,3-propanodiol para uso próprio

para sua síntese de PTT a partir de óxido de etileno ou propileno como matérias-primas através de uma via de síntese química convencional. Existe várias deficiências nos processos de síntese química, incluindo subprodutos excessivos: seletividade pobre; requer condições de operação especiais, tal
5 como temperatura e pressão altas; enormes custos com equipamento; suas matérias-primas sendo fontes não-reproduzíveis; e óxido de etileno e o produto intermediário acroleína produzidos em uma outra via sendo matérias perigosas combustíveis, explosivas ou virulentas, respectivamente. O processo de fermentação para produção de 1,3-propanodiol foi focado nos últimos
10 anos devido à alta seletividade e condições de operação suaves.

Como um subproduto na fermentação de 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol também é uma matéria-prima importante na indústria química. Ele é um líquido incolor e insípido, e pode ser usado como combustíveis, e usado para preparar polímeros, tintas, perfumes, anticongelantes, fumigantes,
15 umidificantes, agente de amaciamento, plastificante, explosivos, veículos quírais para agentes farmacêuticos e similar. Também, 2,3-butanodiol pode servir como uma matéria-prima muito valiosa na indústria química para sintetizar outros agentes químicos, por exemplo, desidratar 2,3-butanodiol para formar metil etil cetona com aplicações bastante extensivas, e desidratar
20 mais para formar 1,3-butadieno. 2,3-Butanodiol pode ser polimerizado para produzir estireno através de reação Diels-Alder. 2,3-Butanodiol e metil etil cetona podem condensar e então se submeter a uma reação de hidrogenação para formar octano, que pode ser usado para produzir materiais de alta qualidade para aviação. 2,3-Butanodiol reage com ácido acético para formar
25 diacetato de 2,3-butanodiol, que pode ser adicionado a manteigas para melhorar o sabor. Em geral, 2,3-butanodiol, não entanto, não deve ser separado e purificado como um produto devido a seus baixos rendimentos na fermentação de 1,3-propanodiol.

Atualmente, existe dois métodos principais para produção de
30 1,3-propanodiol, métodos químico e biológico. Comparado com métodos de síntese química, métodos de fermentação de micróbio para produção de 1,3-propanodiol possuem muitas vantagens significantes, incluindo condições de

produção suaves, boa seletividade, menos subprodutos, facilidade de separar e purificar, sem poluição ambiental, etc, e mais e mais atenção deve ser dada a tais métodos.

Atualmente, existe vários cursos para produção de 1,3-propanodiol através de métodos biológicos:

1. Bactérias intestinais são utilizadas para converter glicerol em 1,3-propanodiol sob condições anaeróbicas (vide US5254467, EP0373230 A1).

2. Fermentação anaeróbica com bactérias tal como *Klebsiella* sob condições anaeróbicas para produzir 1,3-propanodiol (Ruch e outros, *Regulation of glycerol catabolism in Klebsiella aerogenes*, *J. Bacteriol.* 1974, 119(1):50-56; Streekstra e outros, *Overflow metabolism during anaerobic growth of Klebsiella pneumoniae NCT418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture*. *Arch. Microbiol.*, 1987, 147:268-275; Zeng e outros, *Pathways analysis of glycerol fermentation by Klebsiella pneumoniae: Regulation of reducing equivalent balance and product formation*. *Enzyme Microbiol Technol.* 1993, 15:770-779).

3. *Klebsiella* são utilizadas sob condições microaeróbicas para produzir 1,3-propanodiol através de fermentação (vide Wang Jianfang, etc, *Study on microaerobic conversion of glycerin to 1,3-propanodiol by Klebsiella pneumoniae*, *Modern Chemical Industry*, 2001, 21(5):28-31; e Publicação de Patente Chinesa No. CN1348007, *A method for microaerobic fermentive production of 1,3-propanodiol*, expedida para Xiu Zhilong, etc).

4. *Klebsiella* são utilizadas sob condições anaeróbicas para produzir 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol através de fermentação (Biebl e outros, *Fermentation of glycerol to 1,3-propanodiol and 2,3-butanodiol*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 50:24-29).

5. 1,3-Propanodiol e 2,3-butanodiol são produzidos a partir de glicerol através de um método de fermentação microbiano de dois estágios (Liu Dehua, etc., Pedido de Patente No. 200410037692.3).

6. Um método para produção de 1,3-propanodiol através de uma fermentação microbiana de duas etapas (Xiu Zhilong, etc., Patente Chinesa

No. ZL01138769.6).

Os métodos 1-3 acima utilizam todos glicerol como substratos para produzir um produto único 1,3-propanodiol, e a concentração de 1,3-propanodiol no caldo é muito baixa, então seus custos de produção são muito altos. O método 4 propõe uma fermentação para produzir simultaneamente 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol, no entanto, seu nível de fermentação é muito baixo devido às limitações de condições técnicas. O método 5 adota um novo processo usando condições anaeróbicas em estágio inicial e um condição aeróbica em estágio final, o que aumenta significativamente a concentração dos produtos de fermentação 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol, e, até certo ponto, diminui os custos de produção; mas os custos de produção são ainda relativamente altos porque este método também utiliza glicerol como substratos. O método 6 provê um método de fermentação de duas etapas para produzir 1,3-propanodiol a partir de matérias-primas tal como amidos, que, teoricamente, pode diminuir acentuadamente os custo de produção; mas, devido às limitações de condições técnicas, a concentração de glicerol é apenas 49,9 g/L com um rendimento de apenas 39,1% em mol, e a concentração de 1,3-propanodiol é também muito baixa e apenas 13,18 g/L com um rendimento de 22,8% em mol e suas modalidades mais preferidas.

20 DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Um objetivo da presente invenção é prover um método para produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol a partir de materiais de amido natural.

Um método para produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol a partir de materiais de amido natural provido pela invenção inclui as etapas que seguem:

1) *Candida krusei* ou *Hansenula arabitolgens fang* são inoculadas em um meio de fermentação com o líquido de sacarificação de amidos naturais como uma fonte de carbono, usando uma condição aeróbica em estágio inicial e uma condição anaeróbica em estágio posterior, isto é, as células de levedura são cultivadas na condição aeróbica até a taxa de consumo de glicose ser significativamente reduzida, e então fermentadas anae-

robicamente para uma concentração de glicose de a partir de 5 a 10 g/L. O caldo de fermentação é coletado e filtrado para remover as células de levedura no caldo de fermentação, e o filtrado resultante é caldo de fermentação de glicerina.

- 5 2) *Klebsiella*, *Clostridium butyricum* ou *Clostridium pasteurianum* são inoculadas em um meio de fermentação onde o caldo de fermentação de glicerina obtido da etapa 1) serve como uma fonte de carbono. As bactérias são fermentadas anaerobiamente por 30-32 horas, e então fermentadas aerobicamente quando a taxa de produção de 1,3-propanodiol diminuiu ob-
- 10 viamente, e a fermentação foi parada quando a concentração de glicerina é reduzida para um nível abaixo de 10 g/L, e finalmente 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol são obtidos.

Onde as células de levedura removidas através de filtração na etapa 1) podem ser recuperadas diretamente para a próxima batelada de

15 fermentação; a recuperação de célula pode diminuir o período de cultura da semente da próxima batelada.

As *Candida krusei* ou *Hansenula arabitolgens fans* são de uma semente primária ou secundária; a semente primária é preparada de acordo com os procedimentos que seguem: as *Candida krusei* ou *Hansenula arabi-*

20 *tolgens fans* são inoculadas em um meio de semente contendo o líquido de sacarificação de amidos naturais, e cultivadas em um frasco de agitação com uma carga de líquido de 1/5 do volume do frasco a 30-35° C por 18-20 horas, usando um raio de giro de 25 mm e uma velocidade de rotação de a partir de 200 a 250 rpm. A semente secundária é preparada como segue: a

25 semente primária é inoculada em um meio de semente com o líquido de sacarificação de amidos naturais como uma fonte de carbono em um fermentador, e cultura a 30-35° C por 5-7 horas, usando uma velocidade de mistura de a partir de 300 a 500 rpm e uma quantidade de aeração de 0,2-0,5 vvm.

O meio de fermentação com o líquido de sacarificação de ami-

30 dos naturais como uma fonte de carbono tem um pH de 4-5, e contém ainda pasta fluida de amido e uréia; o teor do líquido de sacarificação de amidos naturais é calculado com base em que todos os açúcares de redução no lí-

quido de sacarificação de amidos naturais são considerados como glicose, e é até 260-350 g/L de glicose no meio; o teor de pasta fluida de amido é 2-3 g/L; e o teor de uréia é 2,5-4 g/L.

O meio de semente contendo o líquido de sacarificação de amidos naturais tem um pH de 4-5, e contém ainda pasta fluida de amido e uréia; o teor do líquido de sacarificação de amidos naturais é calculado com base em que todos os açúcares de redução no líquido de sacarificação de amidos naturais são considerados como glicose, e é até 80-100 g/L de glicose no meio; o teor da pasta fluida de amido é 2-3 g/L; e o teor de uréia é 2-3 g/L.

Os amidos naturais na etapa 1) podem ser materiais de amidos tal como amido de batata doce, amido de milho ou tapioca; e o valor de DE do líquido de sacarificação de amidos naturais é 90-110.

O líquido de sacarificação de amidos naturais pode ser preparado de acordo com os procedimentos que seguem: formulação de uma emulsão de amido a partir de amidos naturais e água em uma razão de massa de 1:1800-2000; adição de uma enzima de liquefação duas vezes a 80-85° C e 90-95° C, respectivamente, e para cada vez usar 3-5 U/grama de amido natural; liquefazer por 40-50 minutos; então aumentar a temperatura para 110-120° C para inativar a enzima; resfriar; adicionar uma enzima de sacarificação de 150-200 U/grama de amido; sacarificar a 50-60° C por 8-12 horas; e obter um líquido de sacarificação de amidos naturais tendo um valor DE de 90-110.

Klebsiella, *Clostridium butyricum* ou *Clostridium pasteurianum* são de uma semente primária ou secundária; a semente primária é preparada de acordo com os procedimentos que seguem: *Klebsiella*, *Clostridium butyricum* ou *Clostridium pasteurianum* são inoculadas em um meio de semente formulado a partir do caldo de fermentação de glicerina obtido na etapa 1) e cultivadas sob condições aeróbicas em um frasco de agitação com uma carga de líquido de 1/5 do volume de frasco a 30-33° C por 18-20 horas, usando um raio de rotação de 25 mm e uma velocidade de rotação de 130 a 150 rpm. A semente secundária é preparada como segue: uma se-

mente primária é inoculada em um meio de semente formulado a partir do caldo de fermentação de glicerina na etapa 1) em um fermentador e cultivada a 30-33° C por 5-10 horas, usando uma velocidade de mistura de 60 a 150 rpm e uma quantidade de aeração de 0,2-0,5 vvm.

5 O meio de fermentação com o caldo de fermentação de glicerina obtido na etapa 1) como uma fonte de carbono tem um pH de 6,8-8,0, o teor do caldo de fermentação de glicerina é até 20-80 g/L de glicerina no meio conforme calculado em uma base de glicerina; o meio de fermentação com o caldo de fermentação de glicerina como uma fonte de carbono contém ainda
 10 2,225-3,5 g/L de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 2,0-4,0 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,65-1,2 g/L de KH_2PO_4 , 0,1-0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1-1,5 g/L de pó de levedura, uma solução de elementos traço de 2-3 mL/L e 0,1 mL/L de agente antiespumante. A solução de elementos traço consiste em 70 mg/L de $ZnCl_2$, 100 mg/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 60 mg/L de H_3BO_3 , 200 mg/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 25 mg/L de
 15 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 27,64 mg/L de $NiCl_2 \cdot H_2O$, 35 mg/L de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 20 mg/L de $CuCl_2 \cdot H_2O$, 29,28 mg/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e 0,9 mL/L de HCl concentrado.

O meio de fermentação com o caldo de fermentação de glicerina obtido na etapa 1) como uma fonte de carbono tem um pH de 6,8-8,0, o teor
 20 do caldo de fermentação de glicerina é até 20 g/L de glicerina no meio conforme calculado em uma base de glicerina; o meio de fermentação com o caldo de fermentação de glicerina como uma fonte de carbono contém ainda 4,45-5,6 g/L de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 2,0-4,0 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1,3-2,6 g/L de KH_2PO_4 , 0,1-0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0-2,0 g/L de pó de levedura, 1,0-2,0
 25 g/L de $CaCO_3$ e uma solução de elementos traço de 2-3 mL/L. A solução de elementos traço consiste em 70 mg/L de $ZnCl_2$, 100 mg/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 60 mg/L de H_3BO_3 , 200 mg/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 25 mg/L de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 27,64 mg/L de $NiCl_2 \cdot H_2O$, 35 mg/L de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 20 mg/L de $CuCl_2 \cdot H_2O$, 29,28 mg/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e 0,9 mL/L de HCl concentrado.

30 A temperatura de fermentação no processo de fermentação da etapa 1) é 30-35° C.

A condição aeróbica na etapa 1) é aerar o ar durante o processo

de fermentação, com uma quantidade de aeração de 0,5-2 vvm (L/L/min, uma razão do volume de aeração de ar em um fermentador por minuto para o volume do caldo de fermentação no fermentador); a condição anaeróbica na etapa 1) é aerar gás nitrogênio durante o processo de fermentação, com
 5 uma quantidade de aeração de 0,2-2 vvm (L/L/min, uma razão do volume de gás nitrogênio aerando para um fermentador por minuto para o volume do caldo de fermentação no fermentador).

O caldo de fermentação de glicerina obtido na etapa 1) é adicionado semicontínuo (*fed-batch*) durante o processo de fermentação da etapa
 10 2), permitindo que o teor de glicerina no meio seja mantido em 20-80 g/L.

Fonte de nitrogênio é suplementada duas vezes durante o processo de fermentação da etapa 2), cada uma adicionando pó de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma quantidade de 0,8 g de pó de levedura/L de meio e 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L de meio, respectivamente.

15 O pH é 6,8-8,0 e a temperatura de fermentação é 30-37° C durante o processo de fermentação da etapa 2).

O método inclui ainda uma etapa de purificação de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol, isto é, coleta do caldo de fermentação, filtração para remover a massa bacteriana e acúmulo do filtrado para permitir
 20 que ele dessalinize, destile e retifique sob vácuo.

AS MODALIDADES PREFERIDAS PARA IMPLEMENTAR A INVENÇÃO

Os métodos experimentais que seguem são todos métodos convencionais a menos que de outro modo especificado.

Exemplo 1. Produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol a partir de amidos de milho naturais
 25

1. A liquefação e sacarificação dos materiais de amido natural.
 1475 g de amidos de milho naturais e 2722 L de água foram formulados como emulsão de amido. A emulsão foi aquecida, adicionada enzima de liquefação (5 U/grama de amido) duas vezes a 80° C e 95° C e liquefeita por 50
 30 minutos. E então a temperatura foi aumentada para 110° C para inativar a enzima. A mistura foi esfriada e adicionada enzima de sacarificação (200 U/grama de amido), então sacarificada a 60° C por 9 horas. Os resultados

medidos mostram que o valor de glicose (valor de DE (equivalente de dextrose), com referência à porcentagem de glicose em massas secas, conforme calculado com base em que todos os açúcares de redução em líquido de sacarificação são considerados como glicoses) do líquido de sacarificação é 103,46 e a concentração de dextrose no líquido de sacarificação é 31,55%.

2. Produção de glicerina através da fermentação do líquido de sacarificação

(1) Cepas: *Candida krusei* 2.1048 (comercialmente disponível do *Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences*)

10 (2) Meios:

Meio "Slant" (g/L): glicose (preparada com o líquido de sacarificação da etapa 1), 200; pasta fluida de amido, 3, uréia, 3; e ágar, 20.

Meio de semente: glicose (preparada com o líquido de sacarificação da etapa 1), 100; pasta fluida de amido, 3, e uréia, 3.

15 Meio de fermentação: glicose (preparada com o líquido de sacarificação da etapa 1), 315; pasta fluida de amido, 3, e uréia, 2,5.

Os meios acima são todos ajustados para um pH de 4-4,5 e esterilizados a 110° C por 15 minutos.

(3) Cultura de semente

20 *Candida krusei* 2.1048 são inoculadas em meio "slant" e cultivadas a 35° C por 24 horas para ativar a cepa.

As *Candida krusei* 2.1048 ativadas são inoculadas em meio de semente contendo líquido de sacarificação de amido natural, e sementes primárias são obtidas através de cultura em um frasco de agitação (um frasco cônico de 500 mL, com uma carga de líquido de 100 mL) a 35° C, 200 rpm (um raio de rotação de 25 mm) por 20 horas.

25 Segundas sementes são obtidas através de inoculação das sementes primárias em meio de semente contendo líquido de sacarificação de amido natural e cultura em uma velocidade de mistura de 300-500 rpm a 35° C por 5-7 horas, com uma quantidade de aeração de 0,2-0,5 vvm.

(4) Fermentação

Fermentação foi realizada através de qualquer um dos três pro-

cedimentos que seguem:

A. Fermentação foi realizada com um fermentador de 5 L e sementes primárias. As sementes primárias foram inoculadas em um meio de fermentação em uma razão de volume de 10% e a fermentação foi realizada no fermentador de 5 L, aerando ar em uma quantidade de 2,0 vvm durante as primeiras 60 horas e gás nitrogênio em uma quantidade de 0,5 vvm após 60 horas em uma velocidade de mistura de 500 rpm e cultura por 70 horas. A temperatura de fermentação permaneceu em 30° C durante o processo de fermentação. O rendimento da glicerina foi medido e os resultados mostraram que a glicerina estava em uma concentração de 165 g/L, os açúcares restantes estavam em uma concentração de 5 g/L e o rendimento de glicerina versus glicose era 52,4% em massa.

B. Fermentação foi realizada com um fermentador de 500 L e sementes secundárias. As sementes secundárias foram inoculadas em um meio de fermentação em um razão de volume de 10% e a fermentação foi realizada no fermentador de 500 L, aerando ar em uma quantidade de 0,8 vvm durante as primeiras 60 horas e gás nitrogênio em uma quantidade de 0,2 vvm após 60 horas em uma velocidade de mistura de 300 rpm e cultura por 72 horas. A temperatura de fermentação permaneceu em 33° C durante todo o processo de fermentação. O rendimento da glicerina foi medido e os resultados mostraram que a glicerina estava em uma concentração de 179 g/L, os açúcares restantes estavam em uma concentração de 5 g/L e o rendimento de glicerina versus glicose era 55,38% em massa;

C. Fermentação foi realizada com um fermentador de 75000L e sementes secundárias. As sementes secundárias foram inoculadas em um meio de fermentação em uma razão em volume de 10% e a fermentação foi realizada no fermentador de 75000L, aeração de ar em uma quantidade de 0,5 vvm durante as primeiras 60 horas e gás nitrogênio em uma quantidade de 0,2 vvm após 60 horas em uma velocidade de mistura de 300 rpm e cultura por 72 horas. A temperatura de fermentação permaneceu a 35° C durante todo o processo de fermentação. O rendimento da glicerina foi medido e os resultados mostraram que a glicerina estava em uma concentração de

258 g/L, os açúcares restantes estavam em uma concentração de 5 g/L e o rendimento da glicerina versus glicose era 53,3% em massa.

3. Produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol através de fermentação do caldo de fermentação de glicerina

5 (1) O caldo de fermentação de glicerina da etapa anterior foi filtrado para remover *Candida krusei* 2.1048. As células filtradas foram usadas diretamente na batelada seguinte de fermentação de glicerina sob as mesmas condições de fermentação com a primeira batelada. O filtrado resultante é usado para fermentar 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol.

10 (2) Cepas: *Klebsiella pneumoniae* 1.1734 (comercialmente disponível do *Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences*)

(3) Os ingredientes de meio de semente e de fermentação para 1,3-propanodiol são listados na Tabela 1 abaixo, onde as composições da solução de elementos traço são listadas na Tabela 2 abaixo.

15 Tabela 1. Os ingredientes de meio de semente e de fermentação

Ingredientes do Meio	Meio de Semente (/L)	Meio de Fermentação (/L)
Glicerina (formulada através do caldo de fermentação de glicerina da etapa 2)	20 g	20-80 g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	4,45 g	2,225 g
$(NH_4)_2SO_4$	2,0 g	2,0 g
KH_2PO_4	1,3 g	0,65 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g	0,2 g
Pó de Levedura	1,0 g	1,5 g
Solução de elementos traço	2 mL	2 mL
$CaCO_3$	2,0 g	
Agentes antiespumantes		0,1 mL

Tabela 2. Ingredientes de Solução de Elemento Traço

Solução de Elementos Traço (mg/L)	
ZnCl ₂	70 (mg/L)
MnCl · 4H ₂ O	100 (mg/L)
H ₃ BO ₃	60 (mg/L)
CoCl ₂ · 6H ₂ O	200 (mg/L)
NiCl ₂ · 6H ₂ O	25 (mg/L)
NiCl ₂ · H ₂ O	27,64 (mg/L)
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	35 (mg/L)
CuCl ₂ · H ₂ O	20 (mg/L)
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	29,28 (mg/L)
HCl concentrado (37%)	0,9 (mg/L)

O pH do meio acima é 6,8-8,0.

- (4) Cultura de semente: *Klebsiella pneumoniae* 1.1734 foi inoculada no meio de semente formulado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2 (um frasco cônico de 500 mL com uma carga de líquido de 100 mL) e cultura a 30° C em uma velocidade de agitador de 150 rpm (com um raio de rotação de 25 mm). Sementes primárias foram obtidas através de uma cultura aeróbica por 18 horas; e então o caldo de fermentação neste frasco de agitação foi inoculado em uma razão de volume de 2% para o fermentador carregado como meio de semente e cultivado em uma velocidade de mistura de 60-150 rpm a 30° C com uma quantidade de aeração de 0,2-0,5 vvm por 5-10 horas para se obter sementes secundárias.

(5) Cultura de Fermentação:

- Fermentação foi realizada através de qualquer um dos métodos C, D e E que seguem, e métodos A e B foram tomados como controle:

- A. Um fermentador de 5L foi usado, a temperatura de cultura era 37° C e o valor do pH foi ajustado para 6,8 com KOH. O líquido semente foi inoculado no meio de fermentação (com uma concentração de glicerina de 56 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2, nenhum caldo de fermentação de glicerina foi alimentado durante o processo de fermentação. O fermentador foi girado em uma velocidade de 150 rpm. Gás nitrogênio foi aerado a 0,5 vvm. A fermentação foi realizada por 30 ho-

ras e as concentrações de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol foram 21 g/L e 2 g/L, respectivamente.

5 B. Um fermentador de 5 L, temperatura de cultura era de 37° C e o valor do pH foi ajustado para 6,8 com KOH. O líquido semente foi inoculado no meio de fermentação (com uma concentração de glicerina de 80 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2, nenhum caldo de fermentação de glicerina foi alimentado durante o processo de fermentação. O fermentador foi girado em uma velocidade de 150 rpm. O ar foi aerado a 0,5 vvm. A fermentação foi realizada por 30 horas e as concentrações
10 de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol foram 35 g/L e 6,6 g/L, respectivamente.

C. Um fermentador de 5L foi usado, a temperatura da cultura era de 37° C e o valor do pH foi ajustado para 6,8 com KOH. O líquido semente foi inoculado no meio de fermentação (com uma concentração de glicerina de 30 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2,
15 com adição do caldo de fermentação de glicerina em um modo em semicontínuo durante o processo de fermentação e controle da taxa de fluxo para permanecer a concentração de glicerina em 30 g/L. O fermentador foi girado em uma velocidade de 150 rpm. Gás nitrogênio foi primeiro aerado e ar aerado após 32 horas, ambos a 0,5 vvm. Nutrição foi suplementada duas vezes a 16 horas e 30 horas durante o processo de fermentação (cada uma
20 adicionando pó de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma quantidade de 0,8 g de pó de levedura/L de meio e 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L de meio, respectivamente). A fermentação estava completa após 64 horas. O caldo de fermentação foi coletado, filtrado para remover as cepas e o licor filtrado resultante foi coletado para dessalinizar, destilar e retificar sob vácuo para obter produtos, 1,3-
25 propanodiol e 2,3-butanodiol. Os resultados medidos mostraram que no término da fermentação, as concentrações de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol no caldo de fermentação eram 70 g/L e 16 g/L, respectivamente, e o rendimento de 1,3-propanodiol era 51% em mol (a razão de mols de 1,3-propanodiol para os mols da glicerina consumida), o rendimento dos dióis
30 totais era 71,85% em mol (a razão dos mols de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol para os mols da glicerina consumida).

D. Um fermentador de 500 L foi usado. 50 L de líquido semente secundária foram inoculados no meio de fermentação (com uma concentração de glicerina de 30 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2, com a rotação do fermentador em uma velocidade de 60 rpm e usando uma quantidade de aeração de 0,3 vvm. O caldo de fermentação de glicerina foi adicionado em um modo semicontínuo durante o processo de fermentação e controle de sua taxa de fluxo para permanecer a concentração de glicerina em 30 g/L. As outras condições eram as mesmas que aquelas para uma fermentação semicontínua de alimentação de 5 L. No término da fermentação, as concentrações de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol no caldo de fermentação eram 72 g/L e 25,4 g/L, respectivamente, o rendimento de 1,3-propanodiol foi 55,38% em mol, e o rendimento dos dióis totais era 71,85% em mol.

E. Um fermentador de 5000 L foi usado. 500 L de líquido semente secundária foram inoculados no meio de fermentação inicial (com uma concentração de glicerina de 30 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina descrito acima. O caldo de fermentação de glicerina foi adicionado em modo semicontínuo durante o processo de fermentação e controle de sua taxa de fluxo para permanecer a concentração de glicerina em 30 g/L. As condições de fermentação eram as mesmas que aquelas para um fermentador de 500 L. No término da fermentação, as concentrações de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol no caldo de fermentação eram 66,6 g/L e 30,4 g/L, respectivamente, e o rendimento do 1,3-propanodiol era 59,1% em mol, o rendimento dos dióis total era 83,2% em mol.

4. Reciclagem de célula: as células resultantes foram filtradas do caldo de fermentação de glicerina para uso direto na próxima batelada de fermentação de glicerina. E as condições de fermentação eram todas as mesmas que a primeira batelada. A viabilidade celular substancialmente permaneceu sem modificação por pelo menos 10 reciclagens, e a concentração de glicerina permaneceu estável.

Exemplo 2. Produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol a partir de amidos de batata doce naturais

1. A liquefação e sacarificação dos materiais de amido natural

1475 g de amidos de batata doce naturais e 2722 L de água foram formulados como emulsão de amido. A emulsão foi aquecida, adicionada enzima de liquefação (5 U/grama de amido) duas vezes a 80° C e 95° C e
 5 liquefeita por 50 minutos. E então a temperatura foi aumentada para 110° C para inativar a enzima. A mistura foi esfriada e adicionada enzima de sacarificação (200 U/grama de amido), então sacarificada a 60° C por 9 horas. Os resultados medidos mostram que o valor de glicose (valor de DE (equivalente de dextrose), com referência à porcentagem de glicose em massas secas,
 10 conforme calculado com base em todos os açúcares de redução no líquido de sacarificação são considerados glicose) do líquido de sacarificação é 95,5 e a concentração de dextrose no líquido de sacarificação é 26,8%.

2. Produção de glicerina através da fermentação do líquido de sacarificação

15 (1) Cepas: *Hansenula Arabitolgens* Fang 2.887 comercialmente disponível do *Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences*

(2) Meios:

Meio de "declive" (g/L): glicose (preparada com o líquido de sacarificação da etapa 1), 200; pasta fluida de amido, 2; e ágar, 20.

20 Meio de semente (g/L): glicose (preparada com o líquido de sacarificação da etapa 1), 100; pasta fluida de amido, 2; e uréia, 2.

Meio de fermentação (g/L): glicose (preparada com o líquido de sacarificação da etapa 1), 268; pasta fluida de amido, 2, e uréia, 4.

25 Os meios acima são todos ajustados para um pH de 4-4,5 e esterilizados a 110° C por 15 minutos.

(3) Cultura de semente

Hansenula Arabitolgens Fang 2.887 são inoculadas em meio de "declive" e cultivadas a 35° C por 24 horas para ativar a cepa.

30 As *Hansenula Arabitolgens* Fang 2.887 ativadas são inoculadas em meio de semente contendo líquido de sacarificação de amido natural, e sementes primárias são obtidas através de cultura em um frasco de agitação (um frasco cônico de 500 mL, com uma carga de líquido de 100 mL) a 30° C,

200 rpm (um raio de rotação de 25 mm) por 20 horas.

Segundas sementes são obtidas através de inoculação das sementes primárias em meio de semente contendo líquido de sacarificação de amido natural e cultura em uma velocidade de mistura de 300-500 rpm a 35° C por 5-7 horas, com uma quantidade de aeração de 0,2-0,5 vvm.

(4) Fermentação

Fermentação foi realizada através de qualquer um dos três procedimentos que seguem A, B, C:

A. Fermentação foi realizada com um fermentador de 5 L e sementes primárias. As sementes primárias foram inoculadas em um meio de fermentação em uma razão em volume de 10% e fermentadas no fermentador de 5 L, aerando ar em uma quantidade de 2,0 vvm durante as primeiras 60 horas e gás nitrogênio em uma quantidade de 0,5 vvm após 60 horas em uma velocidade de mistura de 500 rpm e cultura por 70 horas. A temperatura de fermentação permaneceu em 30° C durante o processo de fermentação. O rendimento da glicerina foi medido e os resultados mostraram que a glicerina estava em uma concentração de 140 g/L, os açúcares restantes estavam em uma concentração de 4,8 g/L e o rendimento de glicerina versus glicose era 53% em massa.

B. Fermentação foi realizada com um fermentador de 500 L e sementes secundárias. As sementes secundárias foram inoculadas em um meio de fermentação em um razão em volume de 10% e fermentadas no fermentador de 500 L, aerando ar em uma quantidade de 0,8 vvm durante as primeiras 60 horas e gás nitrogênio em uma quantidade de 0,2 vvm após 60 horas em uma velocidade de mistura de 300 rpm e cultura por 72 horas. A temperatura de fermentação permaneceu em 33° C durante todo o processo de fermentação. O rendimento da glicerina foi medido e os resultados mostraram que a glicerina estava em uma concentração de 146 g/L, os açúcares restantes estavam em uma concentração de 4,7 g/L e o rendimento de glicerina versus glicose era 55,7% em massa.

C. Fermentação foi realizada com um fermentador de 75000L e sementes secundárias. As sementes secundárias foram inoculadas em um

meio de fermentação em uma razão em volume de 10% e fermentadas no fermentador de 75000L, aerando ar em uma quantidade de 0,5 vvm durante as primeiras 60 horas e gás nitrogênio em uma quantidade de 0,2 vvm após 60 horas em uma velocidade de mistura de 300 rpm e cultura por 72 horas.

- 5 A temperatura de fermentação permaneceu a 35° C durante todo o processo de fermentação. O rendimento da glicerina foi medido e os resultados mostraram que a glicerina estava em uma concentração de 142 g/L, os açúcares restantes estavam em uma concentração de 4 g/L e o rendimento da glicerina versus glicose era 54,1% em massa.

- 10 3. Produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol através de fermentação do caldo de fermentação de glicerina

- (1) O caldo de fermentação de glicerina da etapa anterior foi filtrado para remover células de *Hansenula Arabitolgens Fang 2.887*. As células filtradas foram usadas diretamente na batelada seguinte de fermentação de glicerina sob as mesmas condições de fermentação com a primeira batelada. O filtrado resultante é usado para fermentar 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol.

(2) Cepas: *Clostridium pasteurianum* 1.208, comercialmente disponível do *Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences*.

- 20 (3) Os ingredientes de meio de semente e de fermentação para 1,3-propanodiol são listados na Tabela 1 abaixo, onde as composições da solução de elementos traço são listadas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 1. Os ingredientes de meio de semente e de fermentação

Ingredientes do Meio	Meio de Semente (/L)	Meio de Fermentação (/L)
Glicerina (formulada através do caldo de fermentação de glicerina da etapa 2)	20 g	20-80 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	4,45 g	2,225 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g	2,0 g
KH ₂ PO ₄	1,3 g	0,65 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g	0,2 g
Pó de Levedura	1,0 g	1,5 g

Ingredientes do Meio	Meio de Semente (/L)	Meio de Fermentação (/L)
Solução de elementos traço	2 mL	2 mL
CaCO ₃	2,0 g	
Agentes antiespumantes		0,1 mL

Tabela 2. Ingredientes de Solução de Elemento Traço

Solução de Elementos Traço (mg/L)	
ZnCl ₂	70 (mg/L)
MnCl · 4H ₂ O	100 (mg/L)
H ₃ BO ₃	60 (mg/L)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200 (mg/L)
NiCl ₂ · 6H ₂ O	25 (mg/L)
NiCl ₂ · H ₂ O	27,64 (mg/L)
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	35 (mg/L)
CuCl ₂ · H ₂ O	20 (mg/L)
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	29,28 (mg/L)
HCl concentrado (37%)	0,9 (mg/L)

O pH do meio acima é 6,8-8,0.

- (4) Cultura de semente: *Clostridium pasteurianum* 1.208 foi inoculada no meio de semente formulado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2 (um frasco cônico de 500 mL com uma carga de líquido de 100 mL) e cultura a 30° C em uma velocidade de agitador de 150 rpm (com um raio de rotação de 25 mm). Sementes primárias foram obtidas através de uma cultura aeróbica por 18 horas; e então o caldo de fermentação neste frasco de agitação foi inoculado em uma razão em volume de 2% para o fermentador carregado como meio de semente e cultivado em uma velocidade de mistura de 60-150 rpm a 30° C com uma quantidade de aeração de 0,2-0,5 vvm por 5-10 horas para se obter sementes secundárias.

(5) Cultura de Fermentação:

- 15 Fermentação foi realizada através de qualquer um dos métodos

C, D e E que seguem, e métodos A e B foram tomados como controle:

A. Um fermentador de 5L foi usado, a temperatura de cultura era 37° C e o valor do pH foi ajustado para 6,8 com KOH. O líquido semente foi inoculado no meio de fermentação (com uma concentração de glicerina de 50 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2, nenhum caldo de fermentação de glicerina foi alimentado durante o processo de fermentação. O fermentador foi girado em uma velocidade de 150 rpm. Gás nitrogênio foi aerado a 0,5 vvm. A fermentação foi realizada por 30 horas, e as concentrações de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol foram 24 g/L e 1,7 g/L, respectivamente;

B. Um fermentador de 5 L, temperatura de cultura era de 37° C e o valor do pH foi ajustado para 6,8 com KOH. O líquido semente foi inoculado no meio de fermentação (com uma concentração de glicerina de 80 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2, nenhum caldo de fermentação de glicerina foi alimentado durante o processo de fermentação. O fermentador foi girado em uma velocidade de 150 rpm. O ar foi aerado a 0,5 vvm. A fermentação foi realizada por 30 horas, e as concentrações de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol foram 38 g/L e 5,6 g/L, respectivamente;

C. Um fermentador de 5L foi usado, a temperatura da cultura era de 37° C e o valor do pH foi ajustado para 6,8 com KOH. O líquido semente foi inoculado no meio de fermentação (com uma concentração de glicerina de 30 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2, com adição do caldo de fermentação de glicerina em um modo semicontínuo durante o processo de fermentação e controle da sua taxa de fluxo para permanecer a concentração de glicerina em 30 g/L. O fermentador foi girado em uma velocidade de 150 rpm. Gás nitrogênio foi primeiro aerado e ar aerado após 32 horas, ambos a 0,5 vvm. Nutrição foi suplementada duas vezes a 16 horas e 30 horas durante o processo de fermentação (cada uma adicionando pó de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma quantidade de 0,8 g de pó de levedura/L de meio e 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L de meio, respectivamente). A fermentação estava completa após 64 horas. O caldo de fermentação foi

coletado, filtrado para remover as cepas e o licor filtrado resultante foi coletado para dessalinizar, destilar e retificar sob vácuo para obter produtos, 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol. Os resultados medidos mostraram que no término da fermentação, as concentrações de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol no caldo de fermentação eram 50 g/L e 18 g/L, respectivamente, e o rendimento de 1,3-propanodiol era 54% em mol (a razão de mols de 1,3-propanodiol para os mols da glicerina consumida), o rendimento dos dióis totais era 70% em mol (a razão dos mols de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol para os mols da glicerina consumida).

10 D. Um fermentador de 500 L foi usado. 50 L de líquido de semente secundária foram inoculados no meio de fermentação (com uma concentração de glicerina de 30 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina da etapa 2, com o fermentador girando em uma velocidade de 60 rpm e usando uma quantidade de aeração de 0,3 vvm. O caldo de fermentação de glicerina foi adicionado em um modo semicontínuo durante o processo de fermentação e controle de sua taxa de fluxo para permanecer a concentração de glicerina em 30 g/L. As outras condições eram as mesmas que aquelas para uma fermentação semicontínua de 5 L. No término da fermentação, as concentrações de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol no caldo de fermentação eram 54 g/L e 22 g/L, respectivamente, o rendimento de 1,3-propanodiol foi 55% em mol, e o rendimento dos dióis totais era 73% em mol.

25 E. Um fermentador de 5000 L foi usado. 500 L de líquido semente secundária foram inoculados no meio de fermentação inicial (com uma concentração de glicerina de 30 g/L) preparado com o caldo de fermentação de glicerina descrito acima. O caldo de fermentação de glicerina foi adicionado em modo semicontínuo durante o processo de fermentação e controle de sua taxa de fluxo para permanecer a concentração de glicerina em 30 g/L. As condições de fermentação eram as mesmas que aquelas para um fermentador de 500 L. No término da fermentação, as concentrações de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol no caldo de fermentação eram 57,6 g/L e 27,3 g/L, respectivamente, e o rendimento do 1,3-propanodiol era 56% em mol, o

rendimento dos dióis total era 76,2% em mol.

4. Reciclagem de célula: as células resultantes foram filtradas do caldo de fermentação de glicerina para uso direto na próxima batelada de fermentação de glicerina. E as condições de fermentação eram todas as mesmas que a primeira batelada. A viabilidade celular substancialmente permaneceu sem modificação por pelo menos 10 reciclagens, e a concentração de glicerina permaneceu estável.

APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

- Os experimentos mostram que os métodos da presente invenção podem significativamente aumentar a concentração e rendimento de glicerina e 1,3-propanodiol durante a produção de 1,3-propanodiol através de um método de fermentação de duas etapas, enquanto obtendo-se 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol com alto valor adicionado, deste modo aumentando eficazmente a razão de disponibilidade de matérias-primas e reduzindo os custos de produção. O presente método obtém bons efeitos quando aplicado a fermentador de 5L, 500 L e 5000 L, onde a concentração de glicerina obtida através de fermentação é até 158-179 g/L, a concentração de 1,3-propanodiol obtido através de fermentação é até 66-72 g/L, e a concentração de 2,3-butanodiol é até 16-30,4 g/L.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol a partir de materiais de amido natural, incluindo as etapas que seguem:

5 1) *Candida krusei* ou *Hansenula Arabitolgens Fang* são inoculadas em um meio de fermentação com o líquido de sacarificação dos amidos naturais como uma fonte de carbono; cultivadas em uma condição aeróbica até que a taxa de consumo de glicose seja significativamente reduzida, e então fermentada anaerobicamente para uma concentração de glicose de 4 a 0 g/L; o caldo de fermentação é coletado e filtrado para remover as células
10 de levedura no caldo de fermentação, e o filtrado resultante é caldo de fermentação de glicerina;

2) *Klebsiella*, *Clostridium butyricum* ou *Clostridium pasteurianum* são inoculadas em um meio de fermentação no qual o caldo de fermentação de glicerina obtido a partir da etapa 1) serve como uma fonte de carbono; as
15 bactérias são fermentadas anaerobicamente por 30-32 horas, e então fermentadas aerobicamente quando a taxa de produção de 1,3-propanodiol diminuiu obviamente, e a fermentação foi parada quando a concentração de glicerina é reduzida para um nível abaixo de 10 g/L, e finalmente 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol são obtidos.

20 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as células de levedura removidas através de filtração na etapa 1) são recuperadas diretamente para a batelada de fermentação seguinte.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a *Candida krusei* ou *Hansenula Arabitolgens Fang* é de uma semente primária ou secundária; a semente primária é preparada de acordo com os procedimentos
25 que seguem: a *Candida krusei* ou *Hansenula Arabitolgens Fang* é inoculada em um meio de semente contendo o líquido de sacarificação de amidos naturais, e cultivada em um frasco de agitação com uma carga de líquido de 1/5 do volume do frasco a 30-35° C por 20 horas, usando um raio de rotação de 25 mm e uma velocidade de rotação de a partir de 200 a 250 rpm; e a
30 semente secundária é preparada como segue: uma semente primária é inoculada em um meio de semente com o líquido de sacarificação de amidos

naturais como uma fonte de carbono no fermentador, e cultivada a 30-35° C por 5-7 horas, usando uma velocidade de mistura de a partir de 300 a 500 rpm e uma quantidade de aeração de 0,2-0,5 vvm.

5 4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o meio de fermentação com o líquido de sacarificação de amidos naturais como uma fonte de carbono tem um pH de 4-5, e contém ainda pasta fluida de amido e uréia; o teor do líquido de sacarificação de amidos naturais é calculado com base em que todos os açúcares de redução no líquido de sacarificação de amidos naturais são considerados como glicose, e é até 260-350 g/L de glicose no meio; o teor de pasta fluida de amido é 2-3 g/L; e o teor de uréia é 2,5-4 g/L.

15 5. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o meio de semente contendo o líquido de sacarificação de amidos naturais tem um pH de 4-5, e contém ainda pasta fluida de amido e uréia; o teor do líquido de sacarificação de amidos naturais é calculado com base em que todos os açúcares de redução no líquido de sacarificação de amidos naturais são considerados como glicose, e é até 80-100 g/L de glicose no meio; o teor da pasta fluida de amido é 2-3 g/L; e o teor de uréia é 2-3 g/L.

20 6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que *Klebsiella*, *Clostridium butyricum* ou *Clostridium pasteurianum* são de uma semente primária ou secundária; a semente primária é preparada de acordo com os procedimentos que seguem: *Klebsiella*, *Clostridium butyricum* ou *Clostridium pasteurianum* são inoculadas em um meio de semente formulado a partir do caldo de fermentação de glicerina obtido na etapa 1) e cultivadas são condições aeróbicas em um frasco de agitação com uma carga de líquido de 1/5 do volume de frasco a 30-33° C por 18-20 horas, usando um raio de rotação de 25 mm e uma velocidade de rotação de 130 a 150 rpm, para se obter a semente primária; e a semente secundária é preparada como segue: uma semente primária é inoculada em um meio de semente formulado a partir do caldo de fermentação de glicerina obtido na etapa 1) em um fermentador, e cultivada a 30-33° C por 5-10 horas, usando uma velocidade de mistura de 60 a 150 rpm e uma quantidade de aeração de 0,2-0,5 vvm, para se obter a

semente secundária.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o meio de fermentação com o caldo de fermentação de glicerina obtido na etapa 1) como uma fonte de carbono tem um pH de 6,8-8,0, o teor do caldo de fermentação de glicerina é até 20-80 g/L de glicerina no meio conforme calculado em uma base de glicerina; o meio de fermentação com o caldo de fermentação de glicerina como uma fonte de carbono contém ainda 2,225-3,5 g/L de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 2,0-4,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,65-1,2 g/L de KH_2PO_4 , 0,1-0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1-1,5 g/L de pó de levedura, uma solução de elementos traço de 2-3 mL/L e 0,1 mL/L de agente antiespumante. A solução de elementos traço consiste em 70 mg/L de $ZnCl_2$, 100 mg/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 60 mg/L de H_3BO_3 , 200 mg/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 25 mg/L de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 27,64 mg/L de $NiCl_2 \cdot H_2O$, 35 mg/L de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 20 mg/L de $CuCl_2 \cdot H_2O$, 29,28 mg/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e 0,9 mL/L de HCl concentrado.

8. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o meio de fermentação com o caldo de fermentação de glicerina obtido na etapa 1) como uma fonte de carbono tem um pH de 6,8-8,0, o teor do caldo de fermentação de glicerina é até 20-25 g/L de glicerina no meio conforme calculado em uma base em glicerina; o meio de fermentação com o caldo de fermentação de glicerina como uma fonte de carbono contém ainda 4,45,5,6 g/L de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 2,0-4,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1,3-2,6 g/L de KH_2PO_4 , 0,1-0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0-2,0 g/L de pó de levedura, 1,0-2,0 g/L de $CaCO_3$ e uma solução de elementos traço de 2-3 mL/L: a solução de elementos traço consiste em 70 mg/L de $ZnCl_2$, 100 mg/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 60 mg/L de H_3BO_3 , 200 mg/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 25 mg/L de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 27,64 mg/L de $NiCl_2 \cdot H_2O$, 35 mg/L de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 20 mg/L de $CuCl_2 \cdot H_2O$, 29,28 mg/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e 0,9 mL/L de HCl concentrado.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que os amidos naturais na etapa 1) são amido de batata doce, amido de milho ou tapioca; e o valor de DE do líquido de sacarificação de amidos naturais é 90-110.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o líquido

de sacarificação de amidos naturais é preparado de acordo com os procedimentos que seguem: formulação dos amidos naturais e água em uma razão de massa de 1:1800-2000 para se obter uma emulsão de amido; adição de uma enzima de liquefação duas vezes a 80-85° C e 90-95° C, respectivamente, cada uma de 3-5 U/grama de amido natural; liquefazer por 40-50 minutos; então aumentar a temperatura para 110-120° C para inativar a enzima; resfriar; adicionar uma enzima de sacarificação de 150-200 U/grama de amido; sacarificar a 50-60° C por 8-12 horas; e obter um líquido de sacarificação de amidos naturais tendo um valor DE de 100-110.

10 11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que a temperatura de fermentação no processo de fermentação da etapa 1) é 30-35° C; a condição aeróbica na etapa 1) é aerar ar durante o processo de fermentação, com uma quantidade de aeração de 0,5-2 vvm; e a condição anaeróbica na etapa 1) é aerar gás nitrogênio durante o processo de fermentação, com uma quantidade de aeração de 0,2-2 vvm.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que o caldo de fermentação de glicerina obtido na etapa 1) é adicionado em de modo semicontínuo durante o processo de fermentação da etapa 2), permitindo que o teor de glicerina no meio seja mantido em 20-80 g/L.

20 13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que nutrição é suplementada duas vezes com o processo de fermentação da etapa 2), cada uma adicionando pó de levedura de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma quantidade de 0,8 g de pó de levedura/L de meio e 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L de meio, respectivamente.

25 14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que o pH é 6,8-8,0 e a temperatura de fermentação é 30-37° C durante o processo de fermentação da etapa 2); a condição anaeróbica na etapa 2) é aerar gás nitrogênio durante o processo de fermentação, com uma quantidade de aeração de 0,1-0,5 vvm; e a condição aeróbica na etapa 2) é aerar ar durante o processo de fermentação, com uma quantidade de aeração de 0,1-0,5 vvm.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8,

incluindo ainda uma etapa de purificação de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol, isto é, coleta do caldo de fermentação, filtragem para remover as bactérias e acúmulo do filtrado para dessalinizar, destilar e retificar sob vácuo.

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE MATERIAL DE AMIDO NATURAL".

5 A presente invenção refere-se a um método para produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol a partir de materiais de amido natural, incluindo as etapas que seguem: 1) *Candida krusei* ou *Hansenula Arabitolgens Fang* são inoculadas em um meio de fermentação com o líquido de sacarificação dos amidos naturais como uma fonte de carbono; as células de levedura são cultivadas em uma condição aeróbica até que a taxa de consumo de glicose seja significativamente reduzida, e então fermentadas anaerobicamente para uma concentração de glicose de 5 a 10 g/L; o caldo de fermentação é coletado e filtrado para remover as células de levedura no caldo, e o filtrado resultante é caldo de fermentação de glicerina; 2) *Klebsiella*, 10 *Clostridium butyricum* ou *Clostridium pasteurianum* são inoculadas em um meio de fermentação no qual o caldo de fermentação de glicerina obtido a partir da etapa 1) serve como uma fonte de carbono; as bactérias são fermentadas anaerobicamente por 30-32 horas, e então fermentadas aerobicamente quando a taxa de produção de 1,3-propanodiol diminuiu obviamente, 15 e a fermentação foi parada quando a concentração de glicerina é reduzida para um nível abaixo de 10 g/L, e finalmente 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol são obtidos. O método da presente invenção pode reduzir eficazmente o custo de produção e aumentar a produtividade.