



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

**(11) PI 0915017-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 05/06/2009**

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

**(54) Título:** MÉTODO PARA PRODUZIR 2,3-BUTANODIOL PELA FERMENTAÇÃO MICROBIANA DE UM SUBSTRATO GASOSO COMPREENDENDO CO

**(51) Int.Cl.:** C12P 7/18; C10L 1/182; C12R 1/145.

**(30) Prioridade Unionista:** 09/06/2008 US 61/060,113.

**(73) Titular(es):** LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED.

**(72) Inventor(es):** SEAN DENNIS SIMPSON; PHUONG LOAN TRAN; CHRISTOPHE DANIEL MIHALCEA; JENNIFER MON YEE FUNG; FUNGMIN LIEW.

**(86) Pedido PCT:** PCT NZ2009000101 de 05/06/2009

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/151342 de 17/12/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 09/12/2010

**(57) Resumo:** PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ÁLCOOL. A presente invenção refere-se a métodos para produzir o 2,3-butanodiol pela fermentação anaeróbica. De acordo com determinados mé- 5 todos da invenção, o 2,3-butanodiol é produzido pela fermentação anaeróbica de substratos que incluem monóxido de carbono e carboidrato.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA PRODUZIR 2,3-BUTANODIOL PELA FERMENTAÇÃO MICROBIANA DE UM SUBSTRATO GASOSO COMPREENDENDO CO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se à produção do butanodiol pela fermentação microbiana, particularmente à produção do 2,3-butanodiol pela fermentação microbiana de substratos compreendendo o CO.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os biocombustíveis para transporte são substituições atrativas  
10 para a gasolina e estão penetrando rapidamente nos mercados de combustível como misturas de baixa concentração. Os biocombustíveis, derivados de fontes vegetais, são mais ambientalmente sustentáveis do que aqueles derivados de recursos de fósseis (tal como gasolina), o seu uso permite uma redução dos níveis do assim chamado gás carbônico de fóssil  
15 (CO<sub>2</sub>) que é lançado na atmosfera em consequência da queima de combustível. Além disso, os biocombustíveis podem ser produzidos localmente em diferentes geografias, e podem atuar para reduzir a dependência de recursos importados de energia de fóssil. Os alcoóis convenientes para o uso como biocombustíveis incluem o etanol, o butanol e  
20 o 2,3-butanodiol.

O etanol está se tornando rapidamente um combustível principal de transporte líquido rico em hidrogênio em todo o mundo. O consumo mundial de etanol em 2002 foi aproximadamente 40,88 bilhões de litros. O mercado global da indústria de etanol combustível também está  
25 previsto para crescer agudamente no futuro, devido a um interesse aumentado no etanol na Europa, o Japão, os EUA e vários países em desenvolvimento.

Butanodióis que incluem 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol e 2,3-butanodiol podem ser considerados como tendo várias  
30 vantagens sobre etanol. Semelhante ao etanol, os butanodióis podem ser usados diretamente como um aditivo de combustível automóvel. Eles também podem ser relativamente facilmente transformados em diversos outros produtos de valor potencialmente mais alto e/ou produtos de energia mais alta. Por exemplo, o 2,3-butanodiol pode ser prontamente convertido em um  
35 processo de 2 etapas em um dímero de oito carbono que pode ser usado como

combustível de aviação.

O 2,3-butanodiol deriva a sua versatilidade da sua cadeia principal difuncional, isto é, 2 grupos hidroxila são localizados em átomos de C vicinais que permitem que a molécula seja transformada bastante facilmente em substâncias, tais como butadieno, butadiona, acetoína, metiletil cetona, etc. Estes compostos químicos são usados como moléculas de base para produzir uma ampla faixa de produtos químicos industrialmente produzidos.

Além disso, o 2,3-butanodiol pode ser usado diretamente como combustível em um motor de queima interna. É de vários modos mais semelhantes à gasolina do que é ao etanol. Como o interesse na produção e a aplicação de combustíveis ambientalmente sustentáveis se fortaleceu, o interesse em processos biológicos para produzir o 2,3-butanodiol (muitas vezes referido como biobutanol) aumentou.

O 2,3-butanodiol pode ser produzido pela fermentação microbiana de matéria-prima carboidrato (Syu MJ, *Appl Microbiol Biotechnol* 55:10-18 (2001), Qin *et al.*, *Chinese J Chem Eng* 14 (1):132-136 (2006)). O 2,3-butanodiol também pode ser produzido pela fermentação microbiana da biomassa de colheitas, tais como beterraba sacarina, grão, trigo e cana-de-açúcar. Contudo, o preço dessas matérias-primas de carboidrato está sob o efeito do seu valor como alimentação humana ou animal e o cultivo de amido ou colheitas que produzem a sacarose para a produção de 2,3-butanodiol não é economicamente sustentável em todas as geografias. Por isso, há o interesse em desenvolver tecnologias de conversão preço mais baixo e/ou recursos de carbono mais abundantes em 2,3-butanodiol.

O monóxido de carbono (CO) é um subproduto principal da queima incompleta de materiais orgânicos, tais como carvão ou produtos de derivados do petróleo e óleo. Embora a queima completa de carbono contendo precursores produza CO<sub>2</sub> e água como os únicos produtos finais, alguma necessidade de processos industrial temperaturas levantadas favorecendo acumular do monóxido de carbono sobre CO<sub>2</sub>. Um exemplo é a indústria de aço, onde as altas temperaturas são necessárias para gerar qualidades de aço desejadas. Por exemplo, informa-se que a indústria de aço na

Austrália produza e lance na atmosfera mais de 500.000 toneladas do CO anualmente.

Além disso, o CO é também um componente principal do gás de síntese, onde várias quantidades do CO e H<sub>2</sub> são geradas pela gaseificação de um combustível contendo o carbono. Por exemplo, o gás de síntese pode ser produzido pelo craqueamento da biomassa orgânica de madeiras inúteis e madeira para gerar precursores da produção de combustíveis e produtos químicos mais complexos.

A liberação do CO na atmosfera pode ter impacto ambiental significativo. Além disso, pode ser solicitado o pagamento de impostos por emissão, aumentando preços das plantas industriais. Já que o CO é uma molécula rica em energia de reação, ela pode ser usada como um composto precursor da produção de vários produtos químicos. Contudo, esta matéria-prima valiosa não foi utilizada para produzir o 2,3-butanodiol.

É um objetivo da presente invenção fornecer um processo que segue pelo menos um dos caminhos em direção à superação das desvantagens acima ou pelo menos fornecer o público com uma escolha útil.

#### RELATÓRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a invenção fornece um método para produzir o butanodiol pela fermentação microbiana de um substrato compreendendo o monóxido de carbono. Em modalidades particulares, a invenção fornece um método de produção do butanodiol pela fermentação microbiana, o método incluindo:

- a. Fornecimento de um substrato compreendendo o CO;
- b. Um biorreator contendo uma cultura de um ou mais micro-organismos, fermentando anaerobicamente o substrato para produzir butanodiol.

Em certas modalidades, o butanodiol é 2,3-butanodiol.

Em outro aspecto, a invenção fornece um método para aumentar a eficiência da produção de 2,3-butanodiol pela fermentação, o método incluindo:

- a. Fornecer um substrato compreendendo o CO;

b. Um biorreator contendo uma cultura de um ou mais micro-organismos, fermentando anaerobicamente o substrato para produzir 2,3-butanodiol.

Em outro aspecto da invenção, é fornecido um método para produzir o 2,3-butanodiol pela fermentação microbiana, método incluindo:

a. Fornecimento de um substrato

b. Um biorreator contendo uma cultura de um ou mais micro-organismos, fermentando anaerobicamente o substrato, em que um ou mais micro-organismos incluem um ou mais genes 2,3-butanodiol desidrogenases;

c. Suprarregular o gene 2,3-butanodiol desidrogenase, de tal modo que o 2,3-butanodiol seja produzido pelo(s) micro-organismo(s).

Em modalidades particulares, o substrato compreende o CO.

Em modalidades particulares de vários aspectos, o substrato compreendendo monóxido de carbono é um substrato gasoso compreendendo monóxido de carbono. O substrato gasoso compreendendo monóxido de carbono pode ser obtido como um subproduto de um processo industrial. Em certas modalidades, o processo industrial é selecionado do grupo consistindo em fabricação de produtos metálicos ferrosos, fabricação de produtos não ferrosos, processos de refino de petróleo, gaseificação da biomassa, gaseificação de carvão, produção de força elétrica, produção de negro de fumo, produção de amônia, produção de metanol e fabricação de coque. Em uma modalidade o substrato gasoso compreende um gás obtido da moagem de aço. Em outra modalidade o substrato gasoso compreende fumaças da exaustão de automóveis.

Em modalidades particulares, o substrato contendo CO tipicamente contém uma proporção principal do CO, tal como pelo menos de aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO em volume, de 40% a 95% de CO em volume, de 40% a 60% de CO em volume, e de 45% a 55% de CO em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende aproximadamente 25%, ou aproximadamente 30%, ou aproximadamente 35%, ou aproximadamente 40%, ou aproximadamente 45%, ou apro-

ximadamente 50%, ou CO de aproximadamente 55% de CO, ou aproximadamente 60% de CO em volume. Os substratos possuindo concentrações mais baixas de CO, tais como 6%, também podem ser apropriados, particularmente quando H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> também estão presentes.

5                Em modalidades particulares de vários aspectos, o substrato compreendendo o CO é fornecido a um nível suficiente, de tal modo que o 2,3-butanodiol seja produzido. Em modalidades particulares, CO é fornecido de tal modo que uma taxa de absorção específica de pelo menos 0,4 mmol/g/min; ou pelo menos 0,5 mmol/g/min; ou pelo menos 0,6 mmol/g/min; 10                ou pelo menos 0,7 mmol/g/min; ou pelo menos 0,8 mmol/g/min; ou pelo menos 0,9 mmol/g/min; ou pelo menos 1,0 mmol/g/min; ou pelo menos 1,2 mmol/g/min; ou pelo menos 1,5 mmol/g/min é mantida.

Em certas modalidades de vários aspectos, o método compreende a fermentação microbiana usando *Clostridium autoethanogenum*.

15                Em outro aspecto, a invenção fornece um método para produzir o 2,3-butanodiol pela fermentação microbiana, o método incluindo:

- a.            Fornecimento de um substrato
- b.            Um biorreator incluindo uma cultura de *Clostridium autoethanogenum*, fermentando anaerobicamente o substrato para produzir 2,3-

20                butanodiol.

Em modalidades particulares, o substrato é um ou mais carboidratos, tais como frutose. Alternativamente o substrato é um substrato compreendendo monóxido de carbono, tipicamente um substrato gasoso compreendendo monóxido de carbono, tal como aqui antes descrito.

25                Em um aspecto adicional, a invenção fornece um método para produzir o butanodiol pela fermentação microbiana de um primeiro substrato e de um segundo substrato compreendendo o CO. Preferivelmente, o butanodiol é o 2,3-butanodiol.

30                Em modalidades particulares, o primeiro substrato é um carboidrato. Em certas modalidades, o primeiro substrato é frutose. Em certas modalidades, o segundo substrato é um substrato gasoso compreendendo monóxido de carbono, como aqui antes descrito.

Em modalidades particulares, o método inclui as etapas de:

a. fermentação microbiana do primeiro substrato a produzir o 2,3-butanodiol

5 b. fermentação microbiana do segundo substrato compreendendo o CO para produzir o 2,3-butanodiol.

Em certas modalidades, etapas (a) e (b) podem ser conduzidas ao mesmo tempo. Alternativamente, a etapa (a) pode preceder substancialmente ou seguir a etapa (b). Em modalidades particulares, o método pode alternar entre as etapas (a) e etapa (b).

10 Em um aspecto adicional da invenção, é fornecido um método de acordo com qualquer um dos aspectos anteriores, em que a fermentação é executada em um biorreator.

Em um aspecto adicional da invenção, é fornecido um método de acordo com quaisquer dos aspectos anteriores, em que o método também inclui a etapa de captura ou recuperação do butanodiol.

15 Em um aspecto adicional, o butanodiol fornecido, preferivelmente 2,3-butanodiol, é produzido pelos métodos de qualquer dos aspectos anteriores.

Também se pode dizer que a invenção consiste amplamente nas partes, elementos e características mencionadas ou indicadas no relatório descritivo da aplicação, individualmente ou coletivamente, em algumas ou todas as combinações de duas ou mais de partes ditas, elementos ou características, e onde os números inteiros específicos são mencionados aqui são conhecidos equivalentes na técnica à qual a invenção se relaciona, considera-se que tais equivalentes conhecidos sejam incorporados aqui como se individualmente fossem apresentados.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O que se segue é uma descrição da presente invenção, incluindo modalidades preferidas da mesma, dados em termos gerais. A presente invenção é também exemplificada com a descrição dada sob o título "Exemplos" mais adiante, que fornece dados experimentais que suportam a invenção, os exemplos específicos dos aspectos da invenção, e os meios de exe-

cutar a invenção.

Tal como usado aqui o termo "butanodiol" refere-se a todos os isômeros estruturais do diol incluindo 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol e 2,3-butanodiol e estereoisômeros do mesmo. O termo "2,3-  
5 butanodiol" deve ser interpretado como incluindo todas as formas enancio-  
méricas e diastereoisoméricas do composto, incluindo (R,R), (S,S) e formas  
meso, em racêmicos, formas parcialmente estereoisomericamente puras  
e/ou substancialmente estereoisomericamente puras.

O termo "biorreator" inclui um dispositivo de fermentação com-  
10 posto de um ou mais vasos e/ou torres ou arrumação de tubulação, incluindo  
o reator de tanque de agitação contínua (CSTR), reator de célula imobilizada  
(ICR), reator de leito de gotejamento (TBR), coluna de bolhas, fermentador  
de elevação de gás, misturador estático, ou outro vaso ou outro dispositivo  
conveniente para o contato de gás e líquido. Como é descrito em seguida,  
15 em algumas modalidades o biorreator pode compreender um primeiro reator  
de crescimento e um segundo reator de fermentação. Como tal, referindo-se  
à adição de um substrato, por exemplo, um substrato compreendendo mo-  
nóxido de carbono, ao biorreator ou a reação de fermentação deve-se en-  
tender que ele inclui a adição em cada um ou em ambos desses reatores  
20 onde melhor apropriado.

Deve-se entender que o termo "substrato compreendendo mo-  
nóxido de carbono" e termos semelhantes inclui qualquer substrato no qual o  
monóxido de carbono está disponível para uma ou mais cepas de bactérias  
para crescimento e/ou fermentação, por exemplo.

25 O termo "substratos gasosos compreendendo monóxido de car-  
bono" inclui qualquer gás que contém um nível do monóxido de carbono. O  
substrato gasoso conterá tipicamente uma proporção principal do CO, prefe-  
rivelmente pelo menos aproximadamente 15% a aproximadamente 95% de  
CO em volume.

30 A menos que o contexto solicite de outra maneira, as frases  
"fermentação", o "processo de fermentação" ou "reação de fermentação" e  
assim por diante, como usado aqui, são destinadas a abranger tanto a fase



de crescimento como a fase de biossíntese do produto no processo.

Os inventores mostraram surpreendentemente que o 2,3-butanodiol pode ser produzido pela fermentação microbiana usando *Clostridium autoethanogenum*. Eles encontraram que os produtos de fermentação incluem vários alcoóis, onde o etanol e o 2,3-butanodiol são substituintes significantes. O 2,3-butanodiol não foi anteriormente identificado como um produto de fermentação usando *Clostridium autoethanogenum*. Especialmente, os inventores determinaram que o *Clostridium autoethanogenum* pode ser usado para produzir o 2,3-butanodiol e outros produtos de um substrato compreendendo carboidrato. Especialmente, a frutose pode ser convertida em produtos que incluem acetato, etanol e 2,3-butanodiol. Também se demonstrou surpreendentemente que o 2,3-butanodiol pode ser produzido por *Clostridium autoethanogenum* de substratos compreendendo CO, substratos particularmente gasosos compreendendo CO. O uso de uma fonte de carbono gasosa, particularmente uma fonte incluindo o CO, em processos de fermentação não resultou anteriormente na produção do 2,3-butanodiol.

Em modalidades particulares da invenção, a eficiência da produção de 2,3-butanodiol pode ser aumentada fornecendo o substrato a um nível suficiente de tal modo que o 2,3-butanodiol seja produzido. Foi reconhecido que aumentando a quantidade do substrato fornecido a uma cultura microbiana, aumenta a quantidade do 2,3-butanodiol produzido pela cultura.

Em modalidades particulares da invenção, o substrato compreendendo o CO é fornecido a um nível suficiente de tal modo que o 2,3-butanodiol seja produzido. Mostrou-se que uma cultura microbiana compreendendo *C. autoethanogenum* pode absorver o CO em uma taxa até aproximadamente 1,5 a 2 mmol/grama de peso seco de células microbianas/minuto (absorção específica de CO). Em modalidades particulares da invenção, um substrato compreendendo o CO é fornecido à cultura microbiana compreendendo *C. autoethanogenum* de tal modo que uma absorção específica é mantida substancialmente em ou pelo menos 0,4 mmol/g/min; ou pelo menos 0,5 mmol/g/min; ou pelo menos 0,6 mmol/g/min; ou pelo menos 0,7 mmol/g/min; ou pelo menos 0,8 mmol/g/min; ou pelo menos 0,9

mmol/g/min; ou pelo menos 1,0 mmol/g/min; ou pelo menos 1,2 mmol/g/min; ou pelo menos 1,5 mmol/g/min. Em tais modalidades, o 2,3-butanodiol é um produto de fermentação significativa de pelo menos 0,5 g/L; ou pelo menos 1 g/L; ou pelo menos 2 g/L; ou pelo menos 5 g/L. Em modalidades particulares, o 2,3-butanodiol é produzido em uma taxa de pelo menos 0,5 g/L/dia; ou pelo menos 1 g/L/dia.

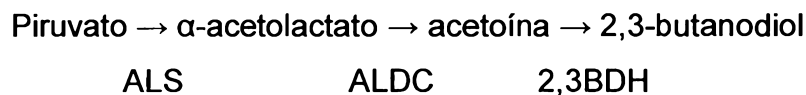
Em modalidades particulares da invenção, o aparelho usado para conduzir métodos da presente invenção permite a quantificação e/ou o controle de parâmetros, tais como fornecimento de CO, absorção de CO, nível de biomassa, produção de 2,3-butanodiol. Por exemplo, as amostras podem ser tomadas de um biorreator para determinar um ou mais dos parâmetros acima e as condições do biorreator estão opcionalmente ajustadas para melhorar a produção de 2,3-butanodiol. Por exemplo, em um biorreator, em que a cultura microbiana não está produzindo nenhuma quantidade ou quantidade insignificante do 2,3-butanodiol, o fornecimento de CO pode ser aumentado de tal modo que o 2,3-butanodiol seja produzido.

Reconhece-se que os produtos, tais como acetato e etanol são produzidos do CO através de uma combinação do ciclo de acetil-CoA e o ciclo THF como descrito em Phillips, J.R, *et al*, 1994, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45/46: 145. Contudo, conforme os métodos da invenção, mostrou-se surpreendentemente que o 2,3-butanodiol pode ser produzido, particularmente onde o CO é fornecido taxas de absorção específica de COs de tal modo que de pelo menos 0,4 mmol/g/min; ou pelo menos 0,5 mmol/g/min; ou pelo menos 0,6 mmol/g/min; ou pelo menos 0,7 mmol/g/min; ou pelo menos 0,8 mmol/g/min; ou pelo menos 0,9 mmol/g/min; ou pelo menos 1,0 mmol/g/min; ou pelo menos 1,2 mmol/g/min; ou pelo menos os 1,5 mmol/g/min são mantidos. Sem desejar estar preso pela teoria, considera-se que fornecendo os níveis suficientes ou elevados do CO, os produtos de energia mais alta, tais como 2,3-butanodiol podem ser produzidos durante a fermentação. Considera-se que os precursores de produtos, tais como 2,3-butanodiol atuem como receptores de elétrons para aliviar a célula microbiana do potencial de redução excessivo, na forma de NAD(P)H, assim restau-

rando um equilíbrio NAD(P):NAD(P)H favorável. Considera-se também que os carboidratos fermentados pela cultura também possam ser convertidos no 2,3-butanodiol em uma maneira semelhante.

Os seguintes genes foram putativamente identificados no *C. autoethanogenum*:  $\alpha$ -acetolactato sintetase (ALS),  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (ALDC) e 2,3-butanodiol desidrogenase (2,3BDH). O 2,3-butanodiol putativação gene desidrogenase (ORF 1283) de *C. autoethanogenum* (cepa depositada em DSMZ sob o número de acesso 19630) mostra a homologia forte o 2,3BDH de *Clostridium novyi* (NT01CX\_0344) com a identidade de aminoácido de 73% (262/357) e positivos de 84% (300/357). ORF 1283 também mostra a homologia significativa ao gene YdjL (bdhA) de *Bacillus subtilis* (identidade de aminoácido de 47%, positivos de 63% e valor E de 3e-89. Evidência adicional que ORF 1283 de LZ1560 é 2,3BDH vem da homologia a 2,3BDH (YAL060W) de *Saccharomyces cerevisiae* (E=2e-53).

Sem desejar estar preso pela teoria, considera-se que o 2,3-butanodiol seja produzido do piruvato (um intermediário no anabolismo produzido do acetil CoA) como se segue:



Os estudos de PCR em tempo real da 2,3-butanodiol desidrogenase em *C. autoethanogenum*, indicam que é substancialmente suprarregulado em culturas onde as quantidades significativas do 2,3-butanodiol são produzidas. Assim, a 2,3-butanodiol desidrogenase pode ser suprarregulado conforme os métodos da invenção. Por exemplo, onde o CO é fornecimento a níveis suficientes, a 2,3-butanodiol desidrogenase é suprarregulado. Especialmente, onde o CO é fornecimento de tal modo que a absorção específica de CO pela cultura microbiana é pelo menos 0,4 mmol/g/min; ou pelo menos 0,5 mmol/g/min; ou pelo menos 0,6 mmol/g/min; ou pelo menos 0,7 mmol/g/min; ou pelo menos 0,8 mmol/g/min; ou pelo menos 0,9 mmol/g/min; ou pelo menos 1,0 mmol/g/min; ou pelo menos 1,2 mmol/g/min; ou pelo menos 1,5 mmol/g/min; a 2,3-butanodiol desidrogenase é suprarregulada. Como tal, a presente invenção fornece um método para produzir o 2,3-

butanodiol pela fermentação microbiana de um substrato pela suprarregulação da 2,3-butanodiol desidrogenase.

Os inventores demonstraram também que substratos diferentes, tais como um substrato de carboidrato e um substrato compreendendo o CO gasoso, podem ser trocados durante a produção microbiana do 2,3-butanodiol, sem efeito deletério. Além disso, eles contemplam que os substratos podem ser alternados, por exemplo, quando um substrato está indisponível, e continuaria produzindo o 2,3-butanodiol.

Conforme os resultados obtidos, em uma modalidade da invenção, o 2,3-butanodiol é produzido pela fermentação microbiana de um substrato compreendendo carboidrato. Em outra modalidade da invenção, um substrato compreendendo monóxido de carbono, preferivelmente um substrato compreendendo o CO gasoso, é convertido em vários produtos que incluem 2,3-butanodiol, por *Clostridium autoethanogenum*.

Em uma modalidade adicional da invenção, um primeiro substrato compreendendo carboidrato (preferivelmente frutose) pode ser usado em etapas iniciais da reação de fermentação e depois do consumo completo do substrato, o substrato pode ser trocado por um segundo substrato compreendendo o CO. Novamente, os inventores decidiram surpreendentemente que o 2,3-butanodiol é produzido nas etapas iniciais onde o primeiro substrato compreendendo carboidrato é a única fonte de carbono e também é produzido nas últimas etapas onde o substrato compreendendo o CO é a única fonte de carbono.

Os inventores mostraram que o 2,3-butanodiol é produzido sob várias condições, incluindo meio contendo soluções tampão alternativas, tal como tampão acetato e tampão citrato. Os inventores também sugerem que em modalidades onde o pH é incontrollável e pode ser variável, o 2,3-butanodiol ainda é produzido. Os exemplos do meio conveniente para executar a fermentação desejada são descritos na seção de exemplos daqui por diante.

Os inventores contemplam que o 2,3-butanodiol produzido em tais processos pode ser prontamente recuperado usando técnicas de sepa-

ração conhecidas na técnica. Além disso, o 2,3-butanodiol pode ser prontamente convertido em substâncias, tais como butadieno, butadiona, acetoína, metiletil cetona e assim por diante. Tais compostos químicos são moléculas de base valiosas usadas para produzir uma percentagem significativa de todos os produtos de indústria químicos. Por isso, os inventores contemplam que o 2,3-butanodiol produziu nos processos descritos aqui pode ser usado na produção de uma ampla faixa de produtos industriais bem conhecidos.

A presente invenção é geralmente descrita aqui em relação a modalidades preferidas da invenção que utilizam *Clostridium autoethanogenum* e/ou produzem o 2,3-butanodiol. Contudo, deve-se apreciar que os micro-organismos alternativos podem ser substituídos por *C. autoethanogenum*. Similarmente, os métodos podem ser usados para produzir e recuperar butanodíóis diferentes de 2,3-butanodiol. Consequentemente, a menos que o contexto necessite de outra maneira, a referência ao "2,3-butanodiol" pode ser substituída pelo termo geral "butanodiol".

#### Método

Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para produção do butanodiol pela fermentação microbiana. Em uma modalidade preferida o método compreende pelo menos a etapa de fermentar anaerobicamente um substrato compreendendo o CO, preferivelmente um substrato compreendendo o CO gasoso, para obter o 2,3-butanodiol.

Em uma determinada modalidade da invenção, o método inclui as etapas de:

(a) Fornecer um substrato compreendendo o CO, preferivelmente um substrato compreendendo o CO gasoso;

(b) Em um biorreator contendo uma cultura de um ou mais micro-organismos fermentando anaerobicamente o substrato para produzir 2,3-butanodiol.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar a eficiência da produção de 2,3-butanodiol pela fermentação, método incluindo:

(a) Fornecer um substrato compreendendo o CO;

(b) Em um biorreator contendo uma cultura de um ou mais micro-organismos, fermentando anaerobicamente o substrato para produzir 2,3-butanodiol.

Em modalidades particulares, o substrato compreendendo o CO  
 5 é fornecido a um nível suficiente para produzir quantidades significativas de 2,3-butanodiol, tal como pelo menos 0,5 g/L, ou pelo menos 1 g/L, ou pelo menos 2 g/L, ou pelo menos 5 g/L do meio de fermentação. Em certas modalidades, CO é fornecido a um nível suficiente para produzir o 2,3-butanodiol em uma taxa de pelo menos 0,5 g/L/dia; ou pelo menos 1 g/L/dia.  
 10 Em modalidades particulares, CO é fornecido de tal modo que uma taxa de absorção específica de pelo menos 0,4 mmol/g/min; ou pelo menos 0,5 mmol/g/min; ou pelo menos 0,6 mmol/g/min; ou pelo menos 0,7 mmol/g/min; ou pelo menos 0,8 mmol/g/min; ou pelo menos 0,9 mmol/g/min; ou pelo menos 1,0 mmol/g/min; ou pelo menos 1,2 mmol/g/min; ou pelo menos 1,5  
 15 mmol/g/min é mantido. Aqueles versados na técnica apreciarão métodos do fornecimento de CO, particularmente CO gasoso, de tal modo que a taxa de absorção necessária seja atingida. Contudo, como forma de exemplo, os fatores, tais como aumento da retenção de gás em um meio de fermentação aumentarão a quantidade do CO disponível para a conversão a produtos  
 20 pela cultura microbiana. A retenção de gás pode ser tipicamente aumentada por meios mecânicos, tais como agitação crescente em um CSTR. Além disso, o fornecimento CO em uma taxa mais rápida ou uma pressão parcial mais alta também aumentará a disponibilidade de CO em um caldo de fermentação.

25 Em outra modalidade, o método implica na fermentação por *Clostridium autoethanogenum* de um substrato compreendendo carboidrato para produzir o butanodiol, preferivelmente, o 2,3-butanodiol.

Em outra modalidade, o método inclui as etapas de:

(a) Fermentação microbiana do primeiro substrato para pro-  
 30 duzir o 2,3-butanodiol

(b) Fermentação microbiana do segundo substrato compreendendo o CO para produzir o 2,3-butanodiol.

Em certas modalidades, o primeiro substrato é carboidrato e em algumas modalidades, o substrato é frutose. Preferivelmente, o segundo substrato é um substrato compreendendo o CO gasoso. Em modalidades particulares, as etapas (a) e (b) podem ser conduzidas ao mesmo tempo.

- 5 Alternativamente, a etapa (a) pode preceder substancialmente ou seguir a etapa (b). Preferivelmente, o método pode alternar entre a etapa (a) e a etapa (b).

Em certas modalidades da invenção, o método também inclui a etapa de coleta ou recuperação do 2,3-butanodiol produzido.

#### 10 Micro-organismos

- Nas modalidades da presente invenção um ou mais micro-organismos usados na fermentação é o *Clostridium autoethanogenum*. Em uma modalidade preferida o *Clostridium autoethanogenum* é um *Clostridium autoethanogenum* possuindo as características que identificam da cepa de-
- 15 positada no Centro de Recurso Alemão do Material Biológico (DSMZ) sob o número de depósito de identificação 19630. Em outra modalidade o *Clostridium autoethanogenum* é um *Clostridium autoethanogenum* possuindo as características de identificação do DSMZ número de depósito de identificação DSMZ 10061.

- 20 O cultivo das bactérias usadas em um método da presente invenção pode ser conduzido pela utilização de qualquer número de processos conhecidos na técnica para cultivo e fermentação de substratos usando bactérias anaeróbicas. As técnicas de exemplo são fornecidas na seção "Exemplos" deste documento. Como forma de mais exemplos, aqueles pro-
- 25 cessos geralmente descritos nos seguintes artigos usando substratos gasosos para fermentação pode ser utilizada: K. T. Klasson, M. D. Ackerson, E. C. Clausen e J. L. Gaddy (1991). *Bioreactors for synthesis gas fermentations resources. Conservation and Recycling*, 5; 145-165; K. T. Klasson, M. D. Ackerson, E. C. Clausen e J. L. Gaddy (1991). *Bioreactor design for synthe-*
- 30 *sis gas fermentations. Fuel*. 70. 605-614; K. T. Klasson, M. D. Ackerson, E. C. Clausen e J. L. Gaddy (1992). *Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. Enzyme and Microbial Technology*. 14; 602-608; J. L. a

Vega, G. M. Antorrena, E. C. Clausen e J. L. Gaddy (1989). *Study of Gaseous Substrate Fermentation: Carbon Monoxide Conversion to Acetate*. 2. *Continuous Culture*. *Biotech. Bioeng.* 34. 6. 785-793; J. L. a Vega, E. C. Clausen e J. L. Gaddy (1989). *Study of gaseous substrate fermentations: Carbon monoxide conversion to acetate*. 1. *Batch culture*. *Biotechnology and Bioengineering*. 34. 6. 774-784; e, J. L. a Vega, E. C. Clausen e J. L. Gaddy (1990). *Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations*. *Resources, Conservation and Recycling*. 3. 149-160. Os métodos de bactérias de cultivo em substratos compreendendo carboidratos são também bem conhecidos na técnica.

#### Substratos

Em uma modalidade da invenção, o 2,3-butanodiol é produzido pela fermentação microbiana de um substrato compreendendo carboidratos usando o *Clostridium autoethanogenum*. Será apreciado que há muitos exemplos de carboidratos convenientes para a fermentação conhecidos na técnica e muitos exemplos dos tipos de processos costumaram fermentar o substrato de carboidrato. Como forma de exemplo, os substratos convenientes podem incluir, mas não estar limitados a, monossacarídeos, tais como glicose e frutose, oligossacarídeos, tais como sacarose ou lactose, polissacarídeo, tal como celulose ou amido. Embora seja contemplado que alguns destes substratos de carboidrato (e misturas dos mesmos) sejam convenientes na presente invenção, os substratos de carboidrato preferidos são a frutose e a sacarose (e misturas das mesmas).

Aqueles versados na técnica apreciarão que o açúcar fermentável pode ser obtido da biomassa celulósica e lignocelulósica através dos processos de pré-tratamento e sacarificação, como descrito, por exemplo, na US20070031918. Biomassa se refere a qualquer material de celulose ou lignocelulósico e inclui materiais compreendendo celulose, e compreendendo hemicelulose adicional de opcionalmente, lignina, amido, oligossacarídeos e/ou monossacarídeos. A biomassa inclui, mas não está limitada a colheitas de bioenergia, resíduos agrícolas, resíduos sólidos inúteis, industriais sólidos municipais, lama de fabricação de papel, resíduos de quintal, madei-



ra e resíduos florestais. Contudo, em modalidades exemplos da presente invenção a frutose comercialmente disponível é usada como fonte de carbono e energia para a fermentação.

Em uma determinada modalidade, um substrato compreendendo monóxido de carbono, preferivelmente um substrato gasoso compreendendo monóxido de carbono é usado nos métodos da invenção. O substrato gasoso pode ser um gás inútil obtido como um subproduto de um processo industrial, ou de alguma outra fonte tal como do motor de queima (por exemplo automóvel) fumaça de exaustão. Em certas modalidades, o processo industrial é selecionado do grupo consistindo em fabricação de produtos metálicos ferrosos, tal como a moagem de aço, fabricação de produtos não ferrosos, processos de refino de petróleo, gaseificação de carvão, produção de força elétrica, produção de negro de fumo, produção de amônia, produção de metanol e fabricação de coque. Nestas modalidades, o gás contendo CO pode ser capturado do processo industrial antes que seja emitido para a atmosfera, usando qualquer método conveniente. Dependendo da composição do substrato gasoso compreendendo monóxido de carbono, também pode ser desejável tratá-lo para retirar qualquer impureza indesejada, tal como partículas de pó antes de introduzi-lo na fermentação. Por exemplo, o substrato gasoso métodos conhecidos usados podem ser filtrados ou purgados.

Em outras modalidades da invenção, o substrato gasoso compreendendo monóxido de carbono pode ser originário da gaseificação de biomassa. O processo da gaseificação implica a queima parcial da biomassa com um fornecimento restrito de ar ou oxigênio. O gás resultante tipicamente compreende principalmente o CO e H<sub>2</sub>, com volumes mínimos de CO<sub>2</sub>, metano, etileno e etano. Por exemplo, os subprodutos de biomassa obtidos durante a extração e o beneficiamento de gêneros alimentícios, tais como açúcar da cana-de-açúcar, ou amido de milho ou grãos, ou resíduos de biomassa não alimentícios gerados pela indústria florestal pode ser gaseificados para produzir um gás contendo CO conveniente para o uso na presente invenção.

O substrato contendo CO conterá tipicamente uma proporção

principal do CO, tal como pelo menos de aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO em volume, de 40% a 95% de CO em volume, de 40% a 60% de CO em volume, e de 45% a 55% de CO em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende aproximadamente 25%, ou aproximadamente 30%, ou aproximadamente 35%, ou aproximadamente 40%, ou aproximadamente 45%, ou aproximadamente 50% de CO, ou aproximadamente 55% de CO, ou aproximadamente 60% de CO em volume. Os substratos possuindo concentrações mais baixas de CO, tais como 6%, também podem ser apropriados, particularmente quando H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> estão presentes também.

Em modalidades particulares, CO é fornecimento a um nível suficiente para que a produção de 2,3-butanodiol possa ocorrer. Em modalidades particulares, CO é fornecido de tal modo que uma taxa de absorção específica de pelo menos 0,4 mmol/g/min; ou pelo menos 0,5 mmol/g/min; ou pelo menos 0,6 mmol/g/min; ou pelo menos 0,7 mmol/g/min; ou pelo menos 0,8 mmol/g/min; ou pelo menos 0,9 mmol/g/min; ou pelo menos 1,0 mmol/g/min; ou pelo menos 1,2 mmol/g/min; ou pelo menos 1,5 mmol/g/min é mantida. Aqueles versados na técnica apreciarão métodos de fornecimento de CO, particularmente CO gasoso, de tal modo que a taxa de absorção necessária seja atingida. Contudo, como forma de exemplo, os fatores, tais como aumento de retenção de gás em um meio de fermentação aumentarão a quantidade do CO disponível para a conversão a produtos pela cultura microbiana. Aqueles versados na técnica apreciarão métodos de aumentar a retenção de gás. Contudo, através de exemplo não limitantes, a retenção de gás é tipicamente aumentada por meios mecânicos, tais como agitação crescente em um CSTR. Além disso, o fornecimento CO em uma taxa mais rápida ou uma pressão parcial mais alta também aumentará a disponibilidade de CO em um caldo de fermentação.

Não é necessário para o substrato gasoso contenha qualquer hidrogênio, contudo isto não é considerado prejudicial para a produção de 2,3-butanodiol. O substrato gasoso também pode conter, por exemplo, algum CO<sub>2</sub> tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% em

volume, ou de 1% a aproximadamente 30% em volume. Em uma modalidade ele contém de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% em volume. Em outra modalidade o substrato gasoso contém CO<sub>2</sub> a aproximadamente 20% em volume.

5                    Tipicamente, o monóxido de carbono será acrescentado à reação de fermentação em um estado gasoso. Contudo, não se deve considerar que a presente invenção esteja limitada à adição do substrato neste estado. Por exemplo, o monóxido de carbono pode ser fornecido em um líquido. Por exemplo, um líquido pode ser saturado com um gás contendo monóxido de

10                    carbono e depois o líquido é acrescentado a um biorreator. Isto pode ser conseguido utilizando metodologia padrão. Como forma de exemplo um gerador de dispersão de microbolha (Hensirisak *et al.* Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 101, Nº 3 / Outubro, 2002) pode ser usado.

15                    Em uma modalidade da invenção, os inventores decidiram que o 2,3-butanodiol pode ser produzido pela fermentação de um primeiro substrato e um segundo substrato. Em uma determinada modalidade da invenção, o 2,3-butanodiol será produzido quando um primeiro substrato, por exemplo um carboidrato, tal com a frutose e um segundo substrato, preferivelmente

20                    um substrato compreendendo o CO, é fornecido.

                    Em uma modalidade adicional, os inventores decidiram que o 2,3-butanodiol será produzido por um primeiro substrato e com consumo completo, o primeiro substrato pode ser substituído com um segundo substrato e o 2,3-butanodiol continuar sendo produzido. Em uma determinada

25                    modalidade, o primeiro substrato é frutose e com o consumo completo da frutose, um substrato compreendendo o CO pode ser fornecido. Os inventores encontraram surpreendentemente que o 2,3-butanodiol continua sendo produzido. Os inventores também contemplam que o primeiro substrato e segundo substrato podem ser alternados se necessário. Por exemplo, se um

30                    primeiro substrato não está indisponível, um substrato alternativo pode ser usado até que a disponibilidade do primeiro substrato se restabeleça.

#### Meios

Será apreciado que para o crescimento das bactérias e um substrato à para que a fermentação de butanodiol possa ocorrer, além do substrato, um meio nutriente conveniente precisará ser alimentado ao biorreator. Um meio nutriente conterá componentes, tais como vitaminas e minerais suficientes para permitir o crescimento do micro-organismo usado. O meio anaeróbico conveniente para o crescimento de *Clostridium autoethanogenum* é conhecido na técnica, como o descrito, por exemplo, por Abrini et al (*Clostridium autoethanogenum*, sp. Nov., *An Anaerobic Bacterium That Produces Ethanol From Carbon Monoxide*; *Arch. Microbiol.*, 161: 345-351 (1994)). A seção "Exemplos" em seguida fornece exemplos adicionais do meio conveniente.

#### Condições de Fermentação

A fermentação deve ser desejavelmente executada sob condições apropriadas de substrato para que a fermentação do butanodiol possa ocorrer. As condições de reação que devem ser considerar incluem a temperatura, a taxa de fluxo do meio, o pH, o potencial de oxirredução do meio, a taxa de agitação (usando um reator de tanque agitado contínuo), o nível de inóculo, as concentrações máximas de substrato e taxas da introdução do substrato ao biorreator para assegurar que o nível de substrato não se torna limitação, e concentrações de produto máximas para evitar a inibição de produto. Os exemplos de condições de fermentação convenientes para a fermentação anaeróbica de um substrato compreendendo o CO são detalhados em WO2007/117157, WO2008/115080, WO2009/022925 e WO2009/064200, a descrição do qual são incorporados aqui pela referência. É reconhecido que as condições de fermentação informadas nos mesmos podem ser prontamente modificadas conforme os métodos da presente invenção imediata.

Os inventores decidiram que, em uma modalidade onde o pH não é controlado, não parece haver um efeito deletério sobre a produção de 2,3-butanodiol.

#### Biorreator

As reações de fermentação podem ser executadas em qualquer

5 biorreator conveniente como descrito anteriormente aqui. Em algumas modalidades da invenção, o biorreator pode compreender um primeiro, reator de crescimento no qual os micro-organismos são cultivados, e um segundo, reator de fermentação, ao qual o caldo do reator de crescimento é alimentado e no qual a maior parte do produto de fermentação (2,3-butanodiol, por exemplo) é produzido.

#### Recuperação de Produto

10 A fermentação resultará em um caldo de fermentação compreendendo um produto desejável (tal como butanodiol) e/ou um ou mais subprodutos (tais como etanol, acetato e butirato) bem como células bacterianas, em um meio nutriente. Em uma modalidade preferida, os produtos de fermentação incluem o 2,3-butanodiol.

15 O 2,3-butanodiol, ou corrente de álcool variada contendo 2,3-butanodiol e um ou mais outros alcoóis, pode ser recuperado do caldo de fermentação por métodos conhecidos na técnica, tais como destilação fracionada ou evaporação, pré-evaporação, e fermentação de extrato. Os subprodutos, tais como ácidos que incluem acetato e butirato também podem ser recuperados dos métodos de utilização de caldo de fermentação conhecidos na técnica. Por exemplo, um sistema adsorvente que implica um filtro  
20 de carvão ativado ou eletrodíálise pode ser usado.

Em certas modalidades da invenção, o 2,3-butanodiol e os subprodutos são recuperados do caldo de fermentação retirando continuamente uma porção do caldo do biorreator, separando células microbianas do caldo (convenientemente pela filtração, por exemplo), e recuperando 2,3-  
25 butanodiol e opcionalmente outros alcoóis e ácidos do caldo. O álcool pode ser convenientemente recuperado, por exemplo, por destilação, e os ácidos podem ser recuperados, por exemplo pela adsorção no carvão vegetal ativado. As células microbianas separadas são preferivelmente devolvidas ao biorreator de fermentação. As células livres que permeiam o restante após o  
30 álcool e o ácido terem sido retirados também são preferivelmente devolvidas ao biorreator de fermentação. Os nutrientes adicionais (tais como vitaminas B) podem ser acrescentados à célula livre permeantes para encher nova-

mente o meio nutriente antes que seja devolvido ao biorreator.

Também, se o pH do caldo foi ajustado durante a recuperação de 2,3-butanodiol e/ou subprodutos, o pH deve ser reajustado a um pH semelhante àquele do caldo no biorreator de fermentação, antes de ser devolvido ao biorreator.

5

A presente invenção será descrita agora mais detalhadamente com referência aos seguintes exemplos não restritivos.

### EXEMPLOS

#### Materiais e Métodos

Solução A			
NH <sub>4</sub> Ac	3,083g	KCl	0,15g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,61g	NaCl (opcional)	0,12g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,294g	Água destilada	Até 1L
Solução B			
Biotina	20,0 mg	Cálcio D-(*)- pantotenato	50,0 mg
Ácido fólico	20,0 mg	Vitamina B12	50,0 mg
Piridoxina, HCl	10,0 mg	Ácido p- aminobenzoico	50,0 mg
Tiamina, HCl	50,0 mg	Ácido tioctico	50,0 mg
Riboflavina	50,0 mg	Água destilada	Para 1 litro
Ácido nicotínico	50,0 mg		

10

Solução C			
Componente/0,1M solução (aq)	Quantidade/ml em 1L de meio	Componente/0,1M solução (aq)	Quantidade/ml em 1L de meio
FeCl <sub>3</sub>	1ml	MnCl <sub>2</sub>	0,1ml
CoCl <sub>2</sub>	0,5ml	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	0,1ml
NiCl <sub>2</sub>	0,5ml	ZnCl <sub>2</sub>	0,1ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1ml	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,1ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,1ml		

	Solução D	Solução E
<i>Componente do Meio</i>	<i>Concentração por 1,0L de meio</i>	<i>Concentração por 1,0L de meio</i>
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,5g	0,5g
NaCl	0,2g	0,2g
CaCl <sub>2</sub>	0,2g	0,2g
100 mM tampão de fosfato de sódio (pH 6,0)	-	160mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,04g	-
NH <sub>4</sub> Cl	2,5g	0,6g
85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,5mL
KCl	0,15g	0,15g
Solução C	10mL	10mL
Solução E	10mL	10mL
Resazurina (1000 mg/L armaz.)	2mL	1mL
FeCl <sub>3</sub>	0,01g	0,0025g
Mono-hidrato de cisteína HCl	0,5g	0,25g
Agarose (opcional)	15g	-
Água destilada	Para 1 litro	Para 1 litro

Solução F	
<i>Solução composta de metais traço</i>	<i>Por litro de armazenamento</i>
Ácido nitriloacético	1,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,0g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,5g
NaCl	1,0g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,8g
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,2g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g

CuCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,02g
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . 12H <sub>2</sub> O	0,02g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,30g
NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,03g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,02g
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,02g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,02g
Água destilada	Para 1 litro

#### Preparação de Na<sub>2</sub>S<sub>x</sub>

Um frasco de 500 ml foi carregado com Na<sub>2</sub>S (93,7 g, 0,39 mol) e 200 ml H<sub>2</sub>O. A solução foi agitada até o sal ter se dissolvido e o enxofre (25 g, 0,1 mol) foi acrescentado sob fluxo constante de N<sub>2</sub>. Após agitação de 2 horas na temperatura ambiente, a solução "Na<sub>2</sub>S<sub>x</sub>" (aproximadamente 4M em relação ao [Na] e aproximadamente 5M em relação ao enxofre), agora um líquido marrom avermelhado claro, foi transferido em garrafas de soro purgadas de N<sub>2</sub>, enroladas em folha metálica de alumínio.

#### Preparação da solução de Cr (II)

Um frasco de 1 L com 3 pescoços foi ajustado com uma entrada apertada de gás e saída para permitir a trabalho sob o gás inerte e a transferência subsequente do produto desejado para um frasco de armazenamento conveniente. O frasco foi carregado com CrCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O (40g, 0,15 mol), grânulos de zinco [20 mesh] (18,3g, 0,28 mol), mercúrio (13,55g, 1mL, 0,0676 mol) e 500 mL de água destilada. Em seguida a purga com N<sub>2</sub> durante uma hora, a mistura foi aquecida por aproximadamente 80°C para iniciar a reação. Duas horas seguintes de agitação sob um fluxo de N<sub>2</sub> constante, a mistura foi esfriada à temperatura ambiente e continuamente agitada durante outras 48 horas após esse tempo a mistura de reação tinha virado a uma solução azul profunda. A solução foi transferida em N<sub>2</sub> purgou garrafas de soro e guardou na geladeira do futuro uso.

#### Bactérias

O *Clostridium autoethanogenum* usado é aquele depositado no Centro de Recurso Alemão de Material Biológico (DSMZ) e alocado sob nú-



mero de acesso 19630.

### Amostragem e Procedimentos Analíticos

Amostras de meio foram tomadas do reator de fermentação (por exemplo, CSTR ou garrafa de soro) em intervalos de tempo durante o curso da fermentação. Cada vez que o meio era amostrado o cuidado era tomado para assegurar que nenhum gás entrasse ou escapasse do reator.

### HPLC

Sistema de HPLC Agilent 1100 Séries. Fase Móvel: 0,0025N Ácido Sulfúrico. Fluxo e pressão: 0,800 mL / minuto. Coluna: Alltech IOA; Catálogo # 9648, 150x6,5 mm, tamanho de partícula 5 µm. Temperatura de coluna: 60°C. Detector: Índice Refração. Temperatura de detector: 45°C.

### Método de Preparação de Amostra

400 µL de amostra e 50 µL de 0,15M ZnSO<sub>4</sub> e 50 µL de 0,15M Ba(OH)<sub>2</sub> são carregados em um tubo Eppendorf. Os tubos são centrifugados por 10 minutos em 12.000 rpm, 4°C. 200 µL de sobrenadante são transferidos para um frasco HPLC, e 5 µL são injetados no instrumento HPLC.

### Análise do Headspace

As medições foram executadas em um Varian CP-4900 GC micro com dois canais instalados. O canal 1 foi uma coluna de peneira molecular de 10 m que corre a 70°C, 200 kPa argônio e um tempo de retrolavagem de 4,2s, enquanto o canal 2 foi uma coluna PPQ de 10 m que corre a 90°C, 150 kPa hélio e nenhuma retrolavagem. A temperatura de injetor de ambos os canais foi 70°C. Os tempos de execução foram estabelecidos a 120s, mas todos os picos de interesse eluíram normalmente antes 100s. A absorção específica de CO foi determinada calculando consumo de CO por grama de células (peso seco - vide abaixo).

### Densidade Celular

A densidade celular foi determinada contando células bacterianas em uma alíquota definida do caldo de fermentação. Alternativamente, a absorvância das amostras foi medida em 600 nm (espectrofotômetro) e o peso seco determinado através do cálculo de acordo com procedimentos publicados.

### Solução 1 de Sulfeto Metálico

Aproximadamente 950 mL da solução A foram transferidos para um fermentador de 1L e injetado com o nitrogênio.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (solução de 85%, 1,5mL) foi acrescentado e o pH ajustado a 5,3 utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}(\text{aq})$  concentrado. A resazurina (1mL de uma solução 2 g/L) foi acrescentada e a solução injetada com  $\text{N}_2$ . Cromo (II) o cloreto foi acrescentado até que o ORP da solução diminuísse a aproximadamente -150mV. 10 X Solução C foi acrescentada antes do polisulfito de sódio (1,44mL de um 4,3M ou 1mL de uma solução 6M) foram acrescentados e a solução injetada com  $\text{N}_2$ .

### 10 Exemplo 1A: Produção de 2,3-butanodiol por fermentação

A conversão fermentativa de um substrato, usando *Clostridium autoethanogenum* foi conduzida em um reator CSTR por um período de duas semanas, com monitorização periódica. O meio usado para os experimentos de CSTR foi preparado conforme os componentes listados na tabela

15 E. A mistura de sal de fosfato compôs-se de 0,65mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 15,3 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Todos os outros componentes, tais como o ácido fosfórico, os sais de amônio e o hidrocloreto da cisteína foram misturados em 800 ml de água antes que os sais tampões fossem acrescentados à solução. Prosseguir nesta maneira assegurou que o pH aumentasse acima de aproxima-

20 damente 6,5 evitando a precipitação de componentes do meio. A solução foi diluída a 1L e feita anaeróbica aquecendo-se a fervura e deixando esfriar à temperatura ambiente sob um fluxo constante de gás  $\text{N}_2$ . Uma vez fria, a solução foi ajustada ao pH final de 5,3 e as vitaminas B acrescentadas. A anaerobicidade foi mantida em todas as partes do experimento. O carboidra-

25 to (frutose 5 g/L) foi acrescentado à formulação de meio básica. As soluções de meio foram introduzidas nos fermentadores e opcionalmente injetadas com os respectivos gases contendo CO na partida do experimento, ou após um intervalo predeterminado. Durante estes experimentos, o pH foi controlado para permanecer em 5,5 acrescentando uma solução aquosa de NaOH.

30 Uma cultura de *Clostridium autoethanogenum* crescimento ativo foi inoculada no reator a um nível de 5% (v/v). A temperatura do reator foi mantida em 37°C e a taxa de agitação foi 400 rpm.

Resultados:

Inicialmente, a fermentação continha a frutose como um substrato, o que resultou na produção de ácido acético, etanol e 2,3-butanodiol. Durante algum tempo, a frutose foi consumida e uma corrente de gás incluindo CO (CO a 95%, CO<sub>2</sub> a 5%) foi injetado através do meio. O meio foi mantido no pH 5,5 (Tabela 1). Deve-se observar que mesmo quando o carboidrato tinha sido consumido, os produtos acima mencionados aumentaram em concentração, claramente demonstrando que o CO foi usado para produzir os produtos que incluem 2,3-butanodiol.

10 Tabela 1: Monitoramento da produção de 2,3-butanodiol, etanol e acetato (concentrações em g/L) durante algum tempo em um reator CSTR.

Tempo/horas	Frutose	Ácido acético	Etanol	2,3-butanodiol
0	5	0	0	0
23	5	0,123	0,018	0
45	3,8	0,579	0,167	0,05
110	0	4,753	2,8	1,2
185	0	7,2	3,8	1,9
324	0	6,736	4,9	1,91

Exemplo 1B: Produção de 2,3-butanodiol por fermentação

Em um experimento adicional, a conversão de um substrato por *Clostridium autoethanogenum* foi conduzida em um reator CSTR por um período de 10 dias, com monitorização periódica. Neste exemplo o fermentador e o meio foram preparados conforme o exemplo 1A, contudo o substrato foi exclusivamente simulado gás de aço moído (CO a 70%, H<sub>2</sub> a 1%, N<sub>2</sub> a 14%, CO<sub>2</sub> a 15%) injetado continuamente e o pH do meio foi mantido constante em 5,5 (Tabela 2). A conversão do substrato novamente resultou em ácido acético, etanol e 2,3-butanodiol, demonstrando que até na ausência de um substrato de carboidrato no começo da fermentação, o ácido acético, o etanol e o butanodiol são produzidos.

20 Tabela 2: Monitoramento da produção de 2,3-butanodiol, etanol e acetato (concentrações em g/L) durante algum tempo em um reator de batelada CSTR.

Tempo/dias	Ácido acético	Etanol	2,3-butanodiol
0	0	0	0
6	4,5	0,5	0
10	5	4	0,5

#### Exemplo 2: Produção de 2,3-butanodiol por fermentação

Em um experimento adicional, a conversão de um substrato por *Clostridium autoethanogenum* foi conduzida em um reator CSTR por um período de 3 dias, com a monitorização periódica. Neste exemplo, o fermentador e o meio foram preparados conforme isto descrito no exemplo 1A, contudo o substrato foi simulado gás de aço moído (CO de 70%, H<sub>2</sub> de 1%, 14%N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> de 15%), injetado continuamente e frutose (10g/L) e o pH do meio foi mantido constante em 5,5 (Tabela 3). A conversão do substrato novamente resultou em ácido acético, etanol e 2,3-butanodiol.

10 Tabela 3: Monitoramento de produção de 2,3-butanodiol, etanol e acetato (concentrações em g/L) durante algum tempo em um reator de batelada CSTR.

Tempo/horas	Frutose	Ácido acético	Etanol	2,3-butanodiol
0	10	0	0	0
15	9,8	0,8	0,2	0,05
23	8,87	1,7	0,7	0,2
39	5,3	3,7	2,3	0,9
69	1,8	7,3	4	3,1

15 As concentrações finais de acetato, etanol e 2,3-butanodiol também foram comparadas entre os experimentos de fermentador delineados em exemplos 1A, 1B e 2, no fim de cada experimento (nota, estes resultados relacionam-se às concentrações finais medidas em tabelas 1-3 e são sumariados para a comparação na Tabela 4).

20 Tabela 4: Exemplos de produção de 2,3-butanodiol usando substratos alternativos em um reator CSTR, medido em conclusão de cada experimento. Os resultados são dados em g/L.

Substrato	Acetato final	Etanol final	2,3-butanodiol final	Tempo de fermentação (dias)
Fructose e depois gas de moagem (Ex 1A)	6,7	4,9	1,9	13,5
Somente gás de moagem (Ex 1B)	5	4	0,5	10
Frutose e gás de moagem (Ex 2)	7,3	4	3,1	2,9

### Exemplo 3: Produção de 2,3-butanodiol por fermentação

Para apurar como as condições de meio podem afetar a produção do 2,3-butanodiol, as garrafas de soro que contêm meio compreendendo uma seleção de tampões estiveram preparadas e os produtos de fermentação analisados no fim do experimento (Tabela 5). A incubação foi executada em garrafas de soro seladas de 234 ml cada contendo 50 ml do meio acima descrito (Tabela E), opcionalmente tamponada com um tampão de acetato (0,02M) ou com um tampão citrato (0,02M) e ajustada ao pH 5,3. O headspace de 184 ml de cada garrafa de soro era inicialmente N<sub>2</sub> e depois foi cheio com uma sobre pressão de 206,8 kPa com CO a 95%, CO<sub>2</sub> a 5%, ou com CO a 70%, CO<sub>2</sub> a 15%, N<sub>2</sub> a 14%, H<sub>2</sub> a 1%. Cada garrafa foi inoculada com 2 ml de uma cultura de *Clostridium autoethanogenum*. Uma incubadora com agitação foi usada e a temperatura da reação foi mantida a 37°C.

Mais uma vez, é claro que o 2,3-butanodiol foi produzido independente do tampão usado no experimento. Além disso, também se deve observar que como as garrafas de soro não tiveram pH controlado, o produto também pareceu ser produzido com controle limitado (ou nenhum) do pH.

### Tabela 5: Exemplos de produção de 2,3-butanodiol em vários meios.

O meio das garrafas de soro foi analisado após o crescimento ativo, isto é, o aumento na massa de célula se estabilizou após vários dias (4 a 7 dias). Os resultados são dados em g/L.

Meio usado e sistema	Acetato final	Etanol final	2,3-butanodiol final
Garrafa de soro tampão acetato 0,02M	5,597	1,1	0,43
Garrafa de soro tampão citrato 0,02M	6,547	0,364	0,16

#### Exemplo 4: Fermentação de Batelada em CSTR

Aproximadamente 1,3 L da solução A foram transferidos em um 2L fermentador e injetados com o nitrogênio. A resazurina (1,35 mL de uma solução 2 g/L) foi acrescentada. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (solução de 85%, 2,025 mL) foi acrescentado e o pH ajustado a 5,3 utilizando NH<sub>4</sub>OH (aq) conc. O cloreto cromo (II) foi acrescentado até que o ORP da solução diminuísse a aproximadamente -150mV. O polissulfito de sódio (6,07ml de uma solução 4,3M) foi acrescentado e o pH ajustado a 5,5 utilizando HCl concentrado. A solução foi injetada com N<sub>2</sub> durante 1 hora antes da adição da solução 1 (150ml) de sulfito metálico e Solução B (15ml). A solução foi injetada com N<sub>2</sub> então gás contendo CO (H<sub>2</sub> a 3%; N<sub>2</sub> a 30%; CO a 47%; CO<sub>2</sub> a 20%), antes de inoculação com uma cultura de *Clostridium autoethanogenum* crescimento ativo a um nível de aproximadamente 5% (v/v). A taxa de fluxo de gás foi ajustada para assegurar que a cultura microbiana não fosse limitada pelo CO para manter uma alta absorção específica de CO. Os resultados da fermentação são mostrados na tabela 6.

Tabela 6: Produtividade de 2,3-butanodiol em uma cultura de batelada em variadas absorções específicas de CO.

Dia	Absorção média específica de CO (mmol/g/min)	Taxa média de produção de 2,3-butanodiol
1 a 3	0,8	1,5 g/L/dia
5 a 6	0,1	0,25 g/L/dia

O acúmulo de 2,3-butanodiol total em mais de 7,5 dias foi de aproximadamente 7,5 g/L. É reconhecido que o 2,3-butanodiol é produzido em níveis baixos em taxas de absorção específica de COs mais baixas. Contudo, quando o gás é fornecimento de tal modo que a taxa de absorção de CO pode ser mantida acima de 0,4 mmol/g/min, há um aumento de produtividade de 2,3-butanodiol significativo. Neste exemplo, a absorção específica de CO é mantida em uma média de 0,8 mmol/g/min durante vários dias e o 1,3-butanodiol é produzido em uma taxa mais de 1 g/L.

#### Exemplo 5: Fermentação em batelada em CSTR

Aproximadamente 1,3 L da solução A foram transferidos em um

2L fermentador e injetados com o nitrogênio.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (solução de 85%, 2,025 mL, 30 mm) foi acrescentado e o pH ajustado com utilização  $\text{NH}_4\text{OH}$  (aq) concentrado a 5,3. A Solução B (13,5ml) foi acrescentada e a solução injetada com  $\text{N}_2$ . O cloreto de Cromo (II) foi acrescentado até que o ORP da solução diminuísse a aproximadamente -150mV. A resazurina (1,35mL de uma solução 2 g/L) foi acrescentada. O polisulfito de sódio (2,85ml de uma solução 6M) foi acrescentado e a solução injetada com  $\text{N}_2$  durante 12 horas antes da troca para gás contendo  $\text{CO}$  ( $\text{H}_2$  a 1%;  $\text{N}_2$  a 14%;  $\text{CO}$  a 70%;  $\text{CO}_2$  a 15%). O pH foi ajustado a 5,5 com  $\text{HCl}$  concentrado antes da adição da solução 1 (150ml) de sulfito metálico. A solução foi injetada com o gás contendo  $\text{CO}$  durante uns 30 minutos adicionais antes da inoculação com uma cultura de *Clostridium autoethanogenum* crescimento ativo a um nível de aproximadamente 5% (v/v). Novamente, a taxa de fluxo de gás foi ajustada para assegurar que a cultura microbiana não fosse limitada pelo  $\text{CO}$  para manter uma alta absorção específica de  $\text{CO}$ . Os resultados da fermentação são mostrados na tabela 7.

Tabela 7: Produtividade de 2,3-butanodiol em uma cultura de batelada em variação de absorções específicas de  $\text{CO}$ .

Dia	Absorção média de $\text{CO}$ (mmol/g/min)	Taxa média de produção de 2,3-butanodiol
1 a 4	0,85	0,8g/L/dia
5 a 6	0,3	0,25g/L/dia

O 2,3-butanodiol total após aproximadamente 6 dias foi de 5 g/L. Mais uma vez, a absorção específica de  $\text{CO}$  elevada resultou na produtividade de 2,3-butanodiol significativamente mais alta de pelo menos 0,5 g/L/dia.

#### Exemplo 6: Fermentação de batelada em CSTR

Aproximadamente 1,3 L da solução A foram transferidos em um fermentador de 1,5L e injetados com o nitrogênio.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (solução de 85%, 2,25mL) foi acrescentado e o pH ajustado a 5,3 utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$ (aq) concentrado. A Solução B (15ml) foi acrescentada e a solução injetada com  $\text{N}_2$ . O cloreto de cromo (II) foi acrescentado até que o ORP da solução diminuísse a aproximadamente -150mV. A resazurina (1,5mL de uma solução 2 g/L)

foi acrescentada. O polissulfito de sódio (1,5ml de uma solução 3M) foi acrescentado e a solução injetada com N<sub>2</sub> durante 1 hora. As soluções de 0,1M de FeCl<sub>2</sub> (3,75mL), CoCl<sub>2</sub> (1,875mL), NiCl<sub>2</sub> (1,875mL), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,375ml), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (0,375ml), MnCl<sub>2</sub> (0,375ml), Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> (0,375ml) e ZnCl<sub>2</sub> (0,1875ml) foram acrescentadas e a solução injetada com o gás contendo CO (H<sub>2</sub> a 50%; CO a 32%; CO<sub>2</sub> a 4%; CH<sub>4</sub> a 32%). O pH foi ajustado a 5,5 com HCl concentrado antes da adição da Solução C (150ml). A solução foi injetada com o gás contendo CO durante uns 30 minutos adicionais antes da inoculação com uma cultura de *Clostridium autoethanogenum* crescimento ativo a um nível de aproximadamente 5% (v/v). A taxa de fluxo de gás foi ajustada para assegurar que a cultura microbiana não fosse limitada pelo CO para manter uma alta absorção específica de CO. Os resultados da fermentação são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Produtividade de 2,3-butanodiol de uma cultura em batelada em variação de absorções específicas de CO.

Dia	Absorção média de CO (mmol/g/min)	Taxa média de produção de 2,3-butanodiol
0 a 4	0,07	0
5 a 14	0,15	0,2g/L/dia

A concentração de 2,3-butanodiol total após 4 dias foi aproximadamente 3 g/L. Enquanto as taxas atingidas são menos do que fermentações prévias (exemplos 4 e 5), a corrente de substrato compreende uma porção substancial de hidrogênio. Os resultados mostram que o 2,3-butanodiol é produzido usando um substrato variado CO/H<sub>2</sub>.

Exemplo 7: Fermentação contínua em reator de tanque de agitação contínua.

O meio foi preparado em pH 5,5 como se segue. Todos os ingredientes na Solução D, com a exceção de cisteína-HCl foram misturados em 400 ml água destilada. Esta solução foi tornada anaeróbica aquecendo-se até a fervura e deixou-se resfriar à temperatura ambiente sob um fluxo constante do gás CO a 95%, CO<sub>2</sub> a 5%. Uma vez fria, a cisteína-HCl foi acrescentada e o pH da solução ajustado a 5,5 antes de fazer o volume até



1000 ml; a anaerobicidade foi mantida em todas as partes dos experimentos.

Um biorreator de cinco litros foi carregado com 4,9 L do meio LM33 preparado como descrito acima. O gás foi trocado ao gás contendo CO (H<sub>2</sub> de 1%; N<sub>2</sub> de 14%; CO de 70%; CO<sub>2</sub> de 15%) em pressão atmosférica antes de inoculação com 100 ml de uma cultura de *Clostridium autoethanogenum*. O biorreator foi mantido em 37°C agitado em 200 revoluções por minuto na partida da cultura. Durante a fase de crescimento, a agitação foi aumentada a 400 revoluções por minuto. O pH foi ajustado a 5.5 e mantido pela adição automática de NaOH de 5 m. O meio anaeróbico fresco foi continuamente acrescentado no biorreator para manter uma biomassa e nível de acetato definidos no biorreator. A produtividade de 2,3-butanodiol é destacada na tabela 9.

Tabela 9: Produtividade de 2,3-butanodiol em uma cultura contínua.

Dia	Absorção média de CO (mmol/g/min)	Taxa média de produção de 2,3-butanodiol
1 a 87	0,3	< 0,1 g/L/dia
90 a 92	0,6	1,2 g/L/dia
93 a 95	0,4	0,87 g/L/dia

Durante os 89 primeiros dias da operação contínua, o fermentador foi funcionou sob condições limitadas de CO e o 2,3-butanodiol mínimo foi produzido. Contudo, por volta do dia 88, o fluxo de gás foi aumentado, a absorção específica de CO desse modo aumentou. Nesta etapa, a produtividade de 2,3-butanodiol aumentou significativamente a pelo menos 1,2 g/L / dia. Em volta do dia 92, o fluxo de gás foi reduzido de tal modo que a absorção específica da cultura diminuiu a aproximadamente 0,4 mmol/g/min e a produtividade de 2,3-butanodiol também caiu. Contudo, até em uma absorção específica média de aproximadamente 0,4 mmol/g/min, a produtividade de 2,3-butanodiol permaneceu em pelo menos 0,5 g/L/dia.

#### Exemplo 8: Fermentação de batelada em CSTR

Aproximadamente 1,3 L da solução A foram transferidos em um 2L fermentador e injetados com o nitrogênio. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (solução z 85%, 1,5ml) foi acrescentado e o pH ajustado a 5,3 utilizando NH<sub>4</sub>OH (aq) conc.. A Solu-

ção B (15 ml) foi acrescentada e a solução injetada com N<sub>2</sub>. O cloreto cromo (II) foi acrescentado até que o ORP da solução diminuísse a aproximadamente -150 mV. O polissulfito de sódio (1ml de um 3M solução) foi acrescentado e a solução injetada com N<sub>2</sub> durante 12 horas. As soluções de 0,1M de  
 5 FeCl<sub>2</sub> (3,75mL), CoCl<sub>2</sub> (1,875mL), NiCl<sub>2</sub> (1,875mL), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,375ml), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (0,375ml), MnCl<sub>2</sub> (0,375ml), Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> (0,375ml) e ZnCl<sub>2</sub> (0,2ml) foram acrescentadas e a solução injetada com o gás contendo CO (H<sub>2</sub> a 1%; N<sub>2</sub> a 14%; CO a 70%; CO<sub>2</sub> a 15%).

A resazurina (1mL de uma solução 2 g/L) foi acrescentada. O pH  
 10 foi ajustado a 5,5 com HCl concentrado e a solução foi injetada com o gás contendo CO durante uns 30 minutos adicionais antes da inoculação com uma cultura de *Clostridium autoethanogenum* com crescimento ativo a um nível de aproximadamente 5% (v/v). A tabela 10 mostra o produto de 2,3-butanodiol acumulado em um fermentador após operação de aproximada-  
 15 mente 2 semanas. As taxas de absorção específica de CO foram corrigidas para a viabilidade de cultura. A viabilidade de cultura foi determinada usando os métodos descritos na WO2009/022925, que é incorporado aqui pela referência.

20 Tabela 10: Acúmulo de 2,3-butanodiol após fermentação de batelada de 14 dias.

Dia	Absorção específica de CO (mmol/g/min)	2,3-butanodiol (produto acumulado)
13	0,6	8,67 g/L
14	0,5	9,27 g/L

Durante um período de 24 horas do dia 13 a 14, a absorção específica de CO foi mantida em aproximadamente 0,5 mmol/g/min e a produtividade de 2,3-butanodiol foi de 0,6g/L/dia.

Exemplo 9: Regulação dos genes de produção do 2,3-butanodiol em LZ1560

25 As amostras foram tomadas de três fermentações para determinar a expressão genética durante a produção de 2,3-butanodiol. Uma amostra foi tomada da fermentação de batelada descrita no exemplo 8 no dia 13, em que os produtos que incluem etanol e 2,3-butanodiol eram produzidos. A amostra é denominada de R12 nos resultados daqui por diante. A segunda  
 30 amostra foi tomada de uma fermentação de batelada que produziu tanto e-

tanol como 2,3-butanodiol. A amostra é denominada R11 nos resultados. A terceira amostra (R2) foi tomada da fermentação contínua que funcionou sob condições semelhantes como o exemplo 7 nos dias 1 a 89. A cultura microbiana foi limitado em CO e o caldo de fermentação tinha uma concentração de acetato estável de aproximadamente 13 g/L, concentração de etanol de menos do que 1 g/L e as quantidades insignificantes do 2,3-butanodiol. PCR em tempo real foi usado para determinar se os genes foram suprarregulado ou infrarregulado em relação a R2.

#### Extração de RNA e procedimento de síntese de cDNA:

RNA total foi isolado de aproximadamente  $2,5 \times 10^9$  células bacterianas usando *Aurum Total RNA Fatty e Fibrous Tissue Kit* (Biorad). A DNase em coluna foi digerida usando o conjunto *RNase-free DNase* (Biorad). O RNA total foi quantificado usando espectrofotômetro e a sua pureza (medido pela razão A260/280) foi determinada antes da síntese de cDNA usando o kit de síntese iScript Select cDNA (Biorad).

#### Procedimento de PCR em tempo real:

Iniciadores de PCR em Tempo real foram projetados usando o programa gratuito Primer 3 baseado na sequência de genoma interior proprietária de LanzaTech. Misturas de reação de PCR em tempo real que contêm 12. 5µL 2x SYBR Mistura Master de PCR Verde (Biorad), 1. 5µL de cada um de 1 µM de iniciador para a frente e reverso, 5µL de 10x diluiu o padrão de cDNA, e a água estéril a um volume total de 25µL foi montada. As misturas foram aquecidas a 95°C durante 3 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos. Para a detecção do iniciador dimerisation ou outros artefatos da amplificação, uma análise de curva da fusão foi executada imediatamente após a realização do PCR em tempo real (38 ciclos de 58°C a 95°C em 1°C/s). Todas as reações foram executadas em triplicata. A quantificação da expressão genética foi executada usando um Sistema de Detecção de PCR em Tempo real em Cor Única MyiQ (Biorad) e os dados em tempo real foram analisados usando o software de sistema ótico iQ5 (Biorad).

#### Resultados:

Os valores de Ct brutos, em conjunto com a expressão genética relativa e erros padrões, gerados do ensaio de PCR em tempo real são apresentados na tabela 11. A cadeia beta de polimerase de RNA (rpoB) foi selecionada como gene de referência para normalizar a expressão genética.

- 5 A quantificação relativa usando o método de  $\Delta C_T$  Comparação foi usada para calcular a expressão genética relativa de 2,3BDH. A cultura que produz o acetato (R2) foi selecionada como calibrador (padrão de referência) em toda a análise.

- 10 Tabela 11: Derivação da expressão genética relativa valoriza de dados Ct brutos. As expressões relativas foram normalizadas por rpoB e calibraram o Reator de utilização 2. SE = erro padrão da média. (Qualquer expressão relativa acima de 1 mostra a suprarregulação).

Genes	Reator	Ct Bruto	Ct Médio	SD Ct	Expressão relativa	Expressão relativa SE
rpoB	11	36,36	35,4	0,846	NA	NA
	11	35,07				
	11	34,77				
	12	32,47	32,7	0,258	NA	NA
	12	32,65				
	12	32,98				
	2	31,76	31,76	0,051	NA	NA
	2	31,81				
	2	31,71				
2,3BDH	11	27,01	26,57	0,422	4,75	1,8
	11	26,53				
	11	26,17				
	12	23,23	23,18	0,038	7,64	0,8
	12	23,15				
	12	23,17				
	2	24,81	25,18	0,559	1	0,23
	2	24,91				
	2	25,82				

Os dados de PCR em tempo real apresentados neste estudo mostram que a expressão genética de 2,3-butanodiol é significativamente mais alta em culturas solventogênicas (R11/R12) em comparação com culturas acetogênicas (R2). A cultura microbiana de R12, que produzia aproximadamente 0,6g/L/dia do 2,3-butanodiol no momento da colheita de célula, mostra a suprarregulação genética mais alta ( $7,64 \pm 0,8$  vezes), em relação R2. Isto é seguido por R11 com  $4,75 \pm 1,8$  vezes a supra-regulação do gene, que tinha uma produção de 2,3-butanodiol total de 1,53g/L, quando as células foram colhidas.

A figura 1 mostra a expressão genética relativa da 2,3-butanodiol desidrogenase (2,3BDH) em três fermentadores (R11, R12 e R2). R2 que produz o acetato é selecionado como calibrador e a expressão genética foi normalizada usando rpoB como gene de referência. Barra de Erro = média dos erros padrão. N=3. Claramente, a 2,3-butanodiol desidrogenase é suprarregulada em culturas microbianas que produzem o 2,3-butanodiol. A cultura microbiana em R2 faz um CO específico absorver aproximadamente 0,3 mmol/g/min, ao passo que a cultura em R12 tem uma absorção específica de aproximadamente 0,6 mmol/g/min. Aumentar a quantidade do CO fornecido à cultura resulta em um aumento na absorção de CO e um aumento subsequente na expressão genética 2,3-butanodiol desidrogenase. O aumento na expressão genética da 2,3-butanodiol desidrogenase resulta em um aumento na produtividade de 2,3-butanodiol total.

A presente invenção foi descrita aqui com referência a certas modalidades preferidas, para permitir ao leitor praticar a presente invenção sem experimentação excessiva. Aqueles versados na técnica apreciarão que a presente invenção é suscetível de variações e modificações diferentes daquelas especificamente descritas. Deve-se entender que a presente invenção inclui todas tais variações e modificações. Além disso, os títulos, os cabeçalhos, ou semelhantes são fornecidos para realçar a compreensão do leitor deste documento, e não devem ser lidos como uma limitação do alcance da presente invenção.

As descrições completas de todas as aplicações, patentes e pu-

blicações, citadas acima e abaixo, se algum houver, são aqui incorporadas pela referência.

5 A referência para qualquer técnica anterior neste relatório descritivo não é, e não deve ser tomada como, um reconhecimento ou nenhuma forma de sugestão de que aquela técnica anterior faça parte do conhecimento geral comum nos Estados Unidos da América ou qualquer outro país no mundo.

10 Em todas as partes do presente relatório descritivo e qualquer reivindicação que segue, a menos que o contexto necessite de outra maneira, as palavras "compreendem", "compreendendo" e assim por diante, devem ser interpretadas em um sentido inclusivo ao contrário de um sentido exclusivo, isto é, no sentido de "incluindo, mas não limitado a".

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir 2,3-butanodiol pela fermentação microbiana de um substrato gasoso compreendendo CO, o método caracterizado pelo fato de que compreende:
  - 5 a. continuamente fornecer o substrato gasoso a um biorreator; e
  - b. fermentar anaerobicamente o substrato gasoso no biorreator compreendendo uma cultura de pelo menos uma bactéria acetogênica para produzir 2,3-butanodiol; em que o substrato gasoso é fornecido de tal modo que é mantida uma taxa específica da absorção de CO de pelo menos
  - 10 0,4mmol CO/g de peso de células secas de bactérias/minuto pela cultura e 2,3-butanodiol é produzido a uma produtividade maior que 0,2g/L/dia.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato gasoso é fornecido de tal modo que é mantida uma taxa de absorção específica de pelo menos 0,6 mmol CO/g/min.
- 15 3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato gasoso é fornecido de tal modo que uma taxa de absorção específica de pelo menos 0,8 mmol CO/g/min é mantida.
4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato gasoso é fornecido de tal modo que uma taxa de
- 20 absorção específica de pelo menos 1,0 mmol CO/g/min é mantida.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a bactéria acetogênica é *Clostridium autoethanogenum*.
6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato gasoso compreende pelo menos de 15% a 100% de
- 25 CO em volume.
7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato gasoso compreende um gás obtido como um subproduto de um processo industrial.
8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
- 30 fato de que o substrato gasoso compreende um gás residual obtido de uma moagem de aço.
9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que compreende adicionalmente converter o 2,3-butanediol a um composto selecionado do grupo consistindo de buteno (s), butadieno, metiletil cetona (MEK) e misturas dos mesmos.

- 5        10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente converter o buteno(s), butadieno ou metiletil cetona a um produto químico.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a metiletil cetona é convertida em 2-butanol.

- 10       12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o etanol é produzido como um co-produto.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a bactéria acetogênica é a cepa *Clostridium autoethanogenum* depositada na Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas de Células (DSMZ) sob o número de acesso DSM 19630.



