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

(21) BR 112021004352-7 A2

(22) Data do Depósito: 26/09/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 25/05/2021

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS COM CLOSTRIDIUM SOBRE SUPORTE SÓLIDO

(51) Int. Cl.: C12P 7/04; C12P 7/06; C12P 7/16; C12P 7/28; C12M 1/12.

(30) Prioridade Unionista: 28/09/2018 FR 1871106.

(71) Depositante(es): IFP ENERGIES NOUVELLES.

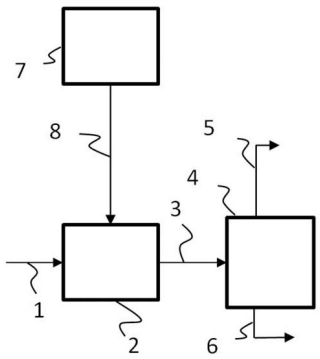
(72) Inventor(es): HELENA GONZALEZ PENAS; MARCEL ROPARS; ESZTER TOTH; VINCENT COUPARD; SANDRA MENIR; NICOLAS LOPES FERREIRA.

(86) Pedido PCT: PCT EP2019075972 de 26/09/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/064900 de 02/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 08/03/2021

(57) Resumo: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS COM CLOSTRIDIUM SOBRE SUPORTE SÓLIDO. A presente invenção refere-se a um processo para produção de álcoois, no qual um fluido com alta concentração de açúcares é introduzido em um reator de fermentação (2) para produzir um mosto fermentativo enriquecido em isopropanol, butanol, etanol e acetona em relação ao fluido com alta concentração de açúcares, o reator de fermentação (2) compreendendo uma biomassa produzida por uma cepa que pertence ao gênero Clostridium suportada sobre um suporte sólido (9) compreendendo uma espuma de poliuretano; e um reator de fermentação (2) compreendendo a referida biomassa suportada sobre o referido suporte sólido (9).



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS COM CLOSTRIDIUM SOBRE SUPORTE SÓLIDO".**

Domínio técnico

[001] A presente invenção refere-se a um processo de produção de álcoois por fermentação de um fluido com alta concentração de açúcares.

Técnica anterior

[002] Com a finalidade de responder aos desafios da transição energética, numerosas pesquisas estão sendo conduzidas para desenvolver os chamados "verdes", permitindo o acesso a intermediários químicos de forma alternativa ao refinamento de petróleo e/ou à petroquímica.

[003] Os álcoois resultantes de processos de fermentação (por exemplo, isopropanol e n-butanol) estão entre os substitutos de derivados petroquímicos mais promissores. A fermentação ABE (Acetona – Butanol – Etanol), realizada por micro-organismos pertencentes ao gênero *Clostridium*, é uma das mais antigas fermentações a ter sido industrializada (início do século 20) e desde então é largamente estudada. Mais recentemente, a fermentação IBE (Isopropanol – Butanol – Etanol) que produz uma mistura de isopropanol, butanol e etanol e é também efetuada por micro-organismos pertencentes ao gênero *Clostridium*, foi objeto de diversos estudos.

[004] No que diz respeito ao modo de realização da fermentação empregado neste tipo de processo, a produção em modo intermitente ("batch" segundo a terminologia anglo-saxônica) continua sendo o método convencional para as fermentações ABE e IBE, apesar da baixa produtividade associada a este tipo de processo, na faixa de 0,1-0,7 g/L.h (vide, par exemplo, Jones D. T., Woods D.R., 1986, Acetone-Butanol Fermentation Revisited. Microbiol. Rew., 50 (4), 484-524 ou

Tableau 16,6 Lopez-contreras A. et al chapter book 16, Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass, 2010). Porém, estas produtividades são baixas demais para que o processo seja considerado um processo industrial economicamente viável.

[005] Pode-se igualmente considerado um processo contínuo com células em suspensão em um reator homogêneo. Porém, a produtividade também é bastante baixa e dificilmente pode ser aumentada de forma significativa. Um dos maiores problemas técnicos é a concentração de células do meio de fermentação, principalmente controlado pela taxa de diluição aplicada ao processo. Esta não pode ser aumentada para evitar a lavagem de células ("wash out" segundo a terminologia anglo-saxônica) no fermentador. Por estes motivos, nos últimos anos, tem havido um grande interesse em métodos voltados para a alta retenção de biomassa microbiana. Existem duas maneiras: "a imibolização das células" e a "reciclagem" de células com uma retenção por meio de membranas filtrantes.

[006] Duas técnicas de imobilização para um processo contínuo são citadas com frequência: a adsorção em suporte sólido e o confinamento, estas duas técnicas já tendo sido estudadas na literatura para a produção de ABE.

[007] No primeiro caso de adsorção em suporte sólido. A adsorção física de micro-organismos em uma superfície sólida ocorre por forças eletrostáticas, forças de van der Waals, ou por ligação covalente entre a membrana celular bacteriana e o suporte. Como não há barreiras físicas entre o biofilme microbiano e a solução de fermentação, é possível atingir equilíbrios diferentes entre as taxas de adsorção, de desprendimento celular e de recolonização do suporte sólido em função do suporte sólido, da forma de realização e das condições operacionais. Deve-se observar que as células imobilizadas são tipicamente cercadas por polissacarídeos excretados pelos próprios micro-

organismos (EPS: "Extracellular Polymeric Substances" segundo a terminologia anglo-saxônica), e apresentam regimes de crescimento e de bioatividade diferentes daqueles de quando as células se encontram em suspensão (vide, par exemplo, Halan B., Buehler K., Schmid A., 2012, Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses, Trends in biotechnol., 30 (9), 453-465).

[008] Diversos suportes sólidos foram testados e se mostraram interessantes de acordo com a literatura de fermentação do tipo ABE, incluindo carvão (vide, por exemplo, Qureshi N., Maddox I.S., 1987, Continuous solvent production from whey permeate using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar, Enzyme Microb. Technol., (9), 668-371), tijolo (vide, por exemplo, Qureshi N., Schripsema J., Lienhardt J., Blaschek H.P., 2000, Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii BA101* immobilized by adsorption onto brick, World Journal of Microbiology & Biotechnology, (16), 377-382), e polpa celulósica (vide, por exemplo, Survase S.A., van Heiningen A., Granström T., 2012, Continuous bio-catalytic conversion of sugar mixture to acetone-butanol-etanol by immobilized *Clostridium acetobutylicum DSM 792,* Appl. Microbiol. Biotechnol., (93), 2309-2316). Por outro lado, tais suportes sólidos não são sintéticos e apresentam grandes problemas de reprodutibilidade para os processos de fermentação.

[009] No caso de uma encapsulação (imobilização por confinamento), os micro-organismos são introduzidos em uma matriz porosa, de forma a evitar difusão dos mesmos para o meio externo, permitindo a transferência de matéria para o substrato e os nutrimentos, assim como para os produtos reacionais. Exemplos de suportes que usam a técnica de confinamento por encapsulação incluem esferas de alginato (vide, por exemplo, Mollah A.H., Stuckey D.C., 1993, Maximizing the production of acetone-butanol in alginate bead fluidized bed reactor

using *Clostridium acetobutylicum*, J. Chem. Tech. Biotechnol., (56), 83-89), et de k-carrageenan (vide, por exemplo, Godia F., Howard I., Scott D., Davison B.H., 1990, Use of immobilized microbial membrane fragments to remove oxygen and favor the acetone-butanol fermentation, Biotechnol. Prog., 1990, 210-213).

Sumário da Invenção

[0010] Um primeiro objeto da presente invenção é apresentar um processo de fermentação do tipo IBEA (Isopropanol – Butanol – Etanol – Acetona) em um reator no qual a taxa de diluição hidráulica é diferente da taxa de diluição da biomassa ativa. Para tanto, um processo capaz de fixar pelo menos em parte a biomassa bacteriana por adsorção na forma de biofilme no reator de fermentação, aumentando a produtividade volumétrica, será descrito a seguir.

[0011] De acordo com um primeiro aspecto, o objeto citado acima, assim como outras vantagens, é obtido por um processo de produção de álcoois, no qual um fluido com concentração de açúcar é introduzido em um reator de fermentação para produzir um mosto fermentativo enriquecido em isopropanol, butanol, etanol e acetona em relação ao fluido com alta concentração de açúcares, o reator de fermentação compreendendo uma biomassa produzida por uma cepa que pertence ao gênero *Clostridium* suportada (i.e., imobilizada) sobre um suporte sólido compreendendo uma espuma de poliuretano.

[0012] De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 0,2 g/L de isopropanol, pelo menos 0,2 g/L de butanol, pelo menos 0,2 g/L de etanol e pelo menos 0,2 g/L de acetona, em relação ao fluido com alta concentração de açúcares. De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 0,2 g/L de isopropanol, de pelo menos 0,2 g/L de butanol, de menos de 0,2 g/L de etanol e de pelo menos 0,2 g/L de acetona, em relação ao fluido com

alta concentração de açúcares. De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 0,2 g/L de isopropanol, de pelo menos 0,2 g/L de butanol, de menos de 0,2 g/L de etanol e de menos de 0,2 g/L de acetona, em relação ao fluido com alta concentração de açúcares. De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 1 g/L de isopropanol, de pelo menos 2 g/L de butanol, em relação ao fluido com alta concentração de açúcares. De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 2 g/L de isopropanol, de pelo menos 4 g/L de butanol, em relação ao fluido com alta concentração de açúcares. De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 3 g/L de isopropanol, de pelo menos 6 g/L de butanol, em relação ao fluido com alta concentração de açúcares. De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 4 g/L de isopropanol, de pelo menos 8 g/L de butanol, em relação ao fluido com alta concentração de açúcares. De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 10 g/L de isopropanol, de pelo menos 20 g/L de butanol, em relação ao fluido com alta concentração de açúcares. De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 15 g/L de isopropanol, de pelo menos 30 g/L de butanol, em relação ao fluido com alta concentração de açúcares. De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 0,4 g/L de isopropanol + butanol, a razão isopropanol/(isopropanol + butanol) podendo variar de 0 a 1 (por exemplo, 0,01 a 0,99). De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 3 g/L de isopropanol + butanol, a razão isopropanol/(isopropanol + butanol) podendo variar

de 0 a 1 (por exemplo, 0,01 a 0,99). De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 6 g/L de isopropanol + butanol, a razão isopropanol/(isopropanol + butanol) podendo variar de 0 a 1 (por exemplo, 0,01 a 0,99). De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 9 g/L de isopropanol + butanol, a razão isopropanol/(isopropanol + butanol) podendo variar de 0 a 1 (por exemplo, 0,01 a 0,99). De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 12 g/L de isopropanol + butanol, a razão isopropanol/(isopropanol + butanol) podendo variar de 0 a 1 (por exemplo, 0,01 a 0,99). De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 30 g/L de isopropanol + butanol, a razão isopropanol/(isopropanol + butanol) podendo variar de 0 a 1 (por exemplo, 0,01 a 0,99). De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo compreende um teor de pelo menos 60 g/L de isopropanol + butanol, a razão isopropanol/(isopropanol + butanol) podendo variar de 0 a 1 (por exemplo, 0,01 a 0,99).

[0013] O processo de produção de acordo com o primeiro aspecto permite ainda manter uma melhor estabilidade dos micro-organismos (por exemplo, manter os desempenhos no período de duração). Além disso, embora se saiba que a partir de um determinado teor no meio de fermentação, os produtos de fermentação, e particularmente os álcoois (por exemplo, butanol), tenham um efeito inibidor para o micro-organismo, o processo de produção de acordo com o primeiro aspecto permite reduzir ao menos em parte os efeitos negativos desses produtores inibidores na atividade biológica presente no meio.

[0014] De acordo com um ou mais modos de realização, o fluido com alta concentração de açúcares é introduzido continuamente no reator de fermentação.

[0015] De acordo com um ou mais modos de realização, a espuma de poliuretano compreende pelo menos uma das seguintes características:

- cavidades volumétricas (i.e., poros ou células) cujo diâmetro de esfera equivalente está compreendido entre 0,1 e 5 mm, de preferência entre 0,25 mm e 1,1 mm, de preferência entre 0,55 e 0,99 mm, e

- uma densidade aparente (i.e., massa sobre volume aparente) medida no ar compreendida entre 10 e 90 g/L, de preferência entre 10 e 80 g/L, de preferência entre 15 e 45 g/L, tal como entre 20 e 45 g/L.

[0016] De acordo com um ou mais modos de realização, a fermentação é realizada a uma taxa de diluição (definida como a razão de taxa de fluxo de carga (volume líquido do fluido com alta concentração de açúcares) a ser convertida em relação ao volume líquido do reator de fermentação) compreendida entre 0,04 h^{-1} e 1 h^{-1}, de preferência entre 0,08 h^{-1} e 0,5 h^{-1}, tal como entre 0,12 h^{-1} e 0,3 h^{-1}.

[0017] De acordo com um ou mais modos de realização, o reator de fermentação compreende entre 10% e 90%, de preferência entre 20% e 50%, de preferência entre 20% e 40% (por exemplo, 25-30%) em volume aparente de suporte sólido em relação ao volume total do reator de fermentação.

[0018] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é imerso pelo menos em parte, de preferência totalmente, no meio reacional. De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é atravessado por convecção natural ou forçado por uma corrente de fluido com alta concentração de açúcares (por exemplo, circulação de fluido descendente, ascendente, ou radial, opcionalmente em convecção forçada (por exemplo, turbina radial do tipo Rushton ou axial ou através de um suporte)).

[0019] De acordo com um ou mais modos de realização, o reator de fermentação é um reator de circulação de fluido ascendente ou descendente ou radial e opcionalmente com liberação de gases contracorrente.

[0020] De acordo com um ou mais modos de realização, a biomassa é produzida por (e/ou compreende) um micro-organismo que pertence ao gênero *Clostridium* e é capaz de produzir misturas do tipo IBEA (por exemplo, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum*. *Clostridium tyrobutyricum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. butylicum e outra Clostridium sp*). O micro-organismo empregado pode ser geneticamente modificado ou não. De maneira mais geral, a maioria das espécies de *Clostridium* ditas "solvantogênicas" pode ser usada. As cepas preferivelmente empregadas são aquelas que pertencem à espécie *C. beijerinckii* ou *C. acetobutylicum*. Também podem ser cepas geneticamente modificadas ou não. Uma cepa geneticamente modificada corresponde a uma cepa cujo material genético (DNA) fora modificado em relação a uma cepa inicial. As modificações genéticas são efetuadas com o auxílio de ferramentas genéticas bastante conhecidas pelo especialista na técnica (cf Pyne et al Biotech Adv 2014 32(3):623-41 e Wasels et al J. Microbiol Methods 2017 140:5-11). As modificações genéticas podem corresponder a modificações do próprio conteúdo genômico da cepa empregada para melhorar seus desempenhos para a produção de isopropanol/butanol/etanol ou sua capacidade de modificar a seletividade para isopropanol ou para n-butanol. As modificações genéticas também podem corresponder à integração de um (ou mais) material genético que permita melhorar os desempenhos ou a seletividade para isopropanol ou para n-butanol das cepas de *Clostridium* utilisé no processo. Por material genético se entende um fragmento de DNA contendo um ou mais elementos genéticos (promotor, gene, terminador, estrutura regu-

ladora, etc.) integrados dentro do genoma da cepa geneticamente modificadas (cf. revisão de Walther & Francois Biotechnology Advances 34 (2016) 984–996 no que diz respeito à *Clostridium acetobutylicum*). De acordo com um ou mais modos de realização, a biomassa produzida pela cepa pertencente ao gênero *Clostridium* compreende uma bactéria geneticamente modificada ou não e pertencente à espécie *Clostridium beijerinckii* e/ou *Clostridium acetobutylicum*.

[0021] De acordo com um ou mais modos de realização, o fluido com alta concentração de açúcares compreende uma solução aquosa de açúcares oriundos de lignocelulose C5 e/ou C6, e/ou de açúcares oriundos de plantas sacarificadas (por exemplo, glicose, frutose e sacarose), e/ou açúcares oriundos de plantas amiláceas (por exemplo, dextrinas, maltose e outros oligômeros, até mesmo amido). De acordo com um ou mais modos de realização, a solução aquosa compreende de 20 a 800 g/L (por exemplo, de 20 a 500 g/L) de açúcar.

[0022] De acordo com um ou mais modos de realização, o fluido com alta concentração de açúcares é produzido a partir de uma carga de biomassa. De acordo com um ou mais modos de realização, a carga de biomassa é proveniente do tratamento de uma fonte renovável. De acordo com um ou mais modos de realização, a fonte renovável compreende biomassa lignocelulósica (por exemplo, substratos lenhosos, tais como resinosos e foliáceos (por exemplo, resinosos, tal como abetos ou pinheiros, ou foliáceos tal como eucalipto), subprodutos da agricultura (por exemplo, palha) ou de indústrias geradoras de rejeitos lignocelulósicos (por exemplo, indústrias agroalimentícias, fábricas de papel)), e/ou planta de cultura dedicadas (por exemplo, *miscanthus*, *Panicum virgatum* (capim-massai ou *switchgrass*)), e/ou plantas açucareiras, tais como beterraba-açucareira, cana-de-açúcar, topinambor e/ou plantas amiláceas (por exemplo, milho e trigo) e/ou tubérculos (por exemplo, mandioca, topinambur e batata). De acordo com um ou

mais modos de realização, a fonte renovável compreende ainda uma biomassa lignocelulósica de produtos e resíduos da indústria do papel e produtos de transformação de materiais lignocelulósicos.

[0023] De acordo com um ou mais modos de realização, a carga de biomassa compreende cerca de 35 a 50% em peso de celulose, 20 a 30% em peso de hemicelulose e 15 a 25% em peso de lignina em relação ao peso total da carga de biomassa.

[0024] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é colocado no interior do reator de fermentação antes e/ou depois da imobilização (por exemplo, por adsorção) da biomassa produzida pela cepa pertencente ao gênero *Clostridium* sobre o suporte sólido.

[0025] De acordo com um ou mais modos de realização, a biomassa produzida pela cepa pertencente ao gênero *Clostridium* é imobilizada sobre o suporte sólido em um reservatório secundário, e o suporte sólido que suporta a biomassa produzida pela cepa pertencente ao gênero *Clostridium* (também denominada biomassa bacteriana) é introduzido no reator de fermentação. É possível imobilizar a biomassa bacteriana no interior de um reservatório secundário funcionando em corrente rápida ("in stream" segundo a terminologia anglo-saxônica) em relação ao reator de fermentação. É particularmente possível efetuar uma etapa intermitente no processo da presente invenção, por exemplo, durante um período de 4-5 horas, par exemplo antes da introdução contínua do fluido com alta concentração de açúcares no reator de fermentação. De acordo com um ou mais modos de realização, o meio reacional que contém/cobre o suporte sólido sofre uma taca de inoculação com uma solução de inoculação de biomassa bacteriana (por exemplo, com células à taxa de crescimento substancialmente máxima) compreendida entre 0,5% e 20% em volume, de preferência entre 1% e 20% em volume em relação ao volume total do volume rea-

cional (por exemplo, 10% em volume). De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é imerso pelo menos parcialmente, de preferência totalmente, na solução de inoculação durante a referida etapa intermitente. De acordo com um ou mais modos de realização, a biomassa bacteriana é imobilizada sobre o suporte sólido na forma de biofilme (i.e., agrupamento microbiano que pode ser fixado a uma superfície sólida (orgânica ou inorgânica), ou formar flocos ou agregados de forma isolada, particularmente por auto-granulação, sobre a superfície sólida).

[0026] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é introduzido no reator de fermentação na forma de um ou mais blocos. De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido (por exemplo, na forma um bloco único) está substancialmente na forma de um cilindro circular linear tendo um diâmetro menor ou substancialmente igual ao diâmetro interno do reator de fermentação. De acordo com um ou mais modos de realização, o bloco tem um diâmetro substancialmente igual ao diâmetro interno do reator de fermentação. Embora o bloco e o reator de fermentação estejam descritos neste pedido como cilindros circulares lineares, fica entendido que o bloco e o reator de fermentação podem ser de qualquer formato. De acordo com um ou mais modos de realização, o bloco está no centro ou fora do centro em relação ao eixo principal (vertical) do reator de fermentação, ou preso a uma parede radial do reator de fermentação.

[0027] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é introduzido no reator de fermentação na forma de um fio delgado ou de um recipiente de malha compreendendo uma pluralidade de cubos, paralelepípedos ou quaisquer outras formas tridimensionais ("chips" segundo a terminologia anglo-saxônica) de espuma de poliuretano, par exemplo, pelo menos uma dimensão do qual sendo de pelo menos 3 mm. De acordo com um ou mais modos de realização, o fio

delgado ou o recipiente de malha é um cilindro circular linear tendo um diâmetro menor ou substancialmente igual ao diâmetro interno do reator de fermentação. De acordo com um ou mais modos de realização, o fio delgado ou o recipiente de malha tem um diâmetro substancialmente igual ao diâmetro interno do reator de fermentação. Embora o fio delgado, o recipiente de malha e o reator de fermentação estejam descritos neste pedido como cilindros circulares lineares, fica entendido que o fio delgado, o recipiente de malha e o reator de fermentação podem ser de qualquer formato.

[0028] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido forma um leito fluidificado ou um leito fixo no reator de fermentação. De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido forma um leito fluidificado mantido em imersão, pelo menos parcial e preferivelmente total, por uma grade.

[0029] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é agitado (por exemplo, mecanicamente). De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é imobilizado no interior de um fio delgado ou de um recipiente de malha concêntrico, por exemplo, exemplo, concêntrico ao eixo de agitação (por exemplo, uso de um reator do tipo Robinson Mahoney).

[0030] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido (por exemplo, blocos, fio delgado, recipiente de malha) está disposto no reator de fermentação de forma a emergir na superfície do meio reacional. De acordo com um ou mais modos de realização, o fluido com alta concentração de açúcares é introduzido diretamente acima ou abaixo dos blocos, fio delgado malha.

[0031] De acordo com um ou mais modos de realização, a fermentação é uma fermentação em condições de anaerobiose (por exemplo, rigorosa), tal como em uma atmosfera de gás inerte (por exemplo, nitrogênio).

[0032] De acordo com um ou mais modos de realização, a fermentação é realizada a uma temperatura compreendida entre 28°C e 40°C, de preferência entre 30°C e 37°C (por exemplo, 36°C), e/ou a uma pressão compreendida entre cerca de 0,1 MPa e 0,15 MPa (i.e., pressão atmosférica + alturas de água).

[0033] De acordo com um ou mais modos de realização, a fermentação é realizada em modo contínuo por um período de pelo menos 250 horas, de preferência pelo menos 500 horas sem qualquer limite superior (por exemplo, 5000 horas).

[0034] De acordo com um segundo aspecto, o objeto mencionado acima, bem como outras vantagens, é obtido por um reator de fermentação (2) compreendendo uma biomassa produzida por uma cepa que pertence ao gênero *Clostridium* suportada sobre um suporte sólido (9) compreendendo uma espuma de poliuretano.

[0035] De acordo com um ou mais modos de realização, pelo menos uma parte do mosto fermentativo obtido na saída do reator de fermentação é reciclado para a entrada do reator de fermentação. É particularmente possível atingir velocidades lineares independentes do tempo de residência global.

[0036] Modos de realização do processo mencionado acima bem como outras características e vantagens do referido processo tornar-se-ão aparentes a partir da leitura da descrição a seguir, dada exclusivamente a título ilustrativo e não limitativo, e com referência aos seguintes desenhos.

Lista de figuras

[0037] A figura 1 é uma vista esquemática de um processo de produção de álcoois de acordo com os modos de realização da presente invenção.

[0038] A figura 2 é uma vista esquemática de um suporte sólido cujo diâmetro é substancialmente igual ao diâmetro interno de um rea-

tor de fermentação de acordo com os modos de realização da presente invenção.

[0039] A figura 3 é uma vista esquemática de suportes sólidos no centro, fora do centro ou preso às paredes dos reatores de fermentação de acordo com os modos de realização da presente invenção.

[0040] A figura 4 é uma vista esquemática de suportes sólidos de acordo com modos de realização da presente invenção, compreendendo elementos de espuma de poliuretano confinados em um fio delgado ou um recipiente de malha.

[0041] A figura 5 é uma vista esquemática de um suporte sólido formando um leito fluidificado contido em imersão em um reator de fermentação de acordo com os modos de realização da presente invenção.

[0042] A figura 6 mostra uma vista esquemática de um processo de produção de álcoois de acordo com os modos de realização da presente invenção compreendendo ainda uma etapa de finalização de fermentação.

[0043] A figura 7 mostra a evolução da produtividade volumétrica de IBEA de um processo de referência em função da taxa de diluição estipulada.

Descrição de modos de realização

[0044] Modos de realização do processo de acordo com o primeiro aspecto e do reator de acordo com o segundo aspecto passarão a ser descritos em detalhes. Na descrição detalhada que se segue, numerosos detalhes específicos estão apresentados para proporcionar uma compreensão melhor do processo. Contudo, o especialista na técnica perceberá que o processo pode ser realizado sem esses detalhes específicos. Em outros casos, características bastante conhecidas são foram descritas detalhadamente para evitar complicar desnecessariamente a descrição.

[0045] A seguir, o termo "compreender" é sinônimo de (significa a mesma coisa que) "incluir" e "conter", e é inclusive ou aberto e não exclui outros elementos não mencionados. Além disso, na presente descrição, os termos "cerca de", "substancialmente", "substancialmente" e "aproximadamente" são sinônimos de (significam a mesma coisa que) margem inferior e/ou superior a 10% do valor dado.

O fluido com alta concentração de açúcares

[0046] De acordo com um ou mais modos de realização, o fluido com alta concentração de açúcares compreende uma solução aquosa de açúcares provenientes da lignocelulose C5 e/ou C6, e/ou de açúcares provenientes de plantas sacariferas (por exemplo, glicose, frutose e sacarose), e/ou de açúcares provenientes de plantas amiláceas (por exemplo, dextrinas, maltose e outros oligômeros, e mesmo amido). De acordo com um ou mais modos de realização, a solução aquosa de açúcares C5 e/ou C6 é resultante do tratamento de uma fonte renovável. De acordo com um ou mais modos de realização, a fonte renovável é do tipo biomassa lignocelulósica que pode compreender especialmente substratos lenhosos (por exemplo, folhas e resinas), subprodutos da agricultura (por exemplo, palha) ou subprodutos das indústrias geradoras de rejeitos lignocelulósicos (por exemplo, indústrias agroalimentícias, fábricas de papel). A fonte renovável também pode ser proveniente de plantas açucareiras, como, por exemplo, beterraba-açucareira e cana-de-açúcar ou ainda de plantas amiláceas como milho e trigo. A solução aquosa de açúcares C5 e/ou C6 também pode ser resultante de uma mistura de diferentes fontes renováveis.

A biomassa produzida pela cepa pertencente ao gênero Clostridium

[0047] A biomassa bacteriana é principalmente adsorvida na forma de biofilme sobre um suporte sólido. Preferivelmente, as bactérias são cepas que pertencem à espécie *Clostridium beijerinckii* e/ou *Clostridium acetobutylicum*. As bactérias usadas no processo podem ser de cepas

geneticamente modificadas ou não e naturalmente produtoras de isopropanol e/ou cepas de *Clostridium* naturalmente produtoras de acetona geneticamente modificadas para produzirem isopropanol.

O suporte sólido

[0048] O suporte sólido compreende une espuma de poliuretano. A espuma de poliuretano é particularmente vantajosa, pois dá acesso não apenas à produção de misturas do tipo IBEA, como também dá acesso à produção do tipo contínuo por imobilização da biomassa bacteriana. De fato, a requerente demonstrou que a espuma de poliuretano é capaz de fixar as bactérias do gênero *Clostridium* de forma suficientemente significativa (i.e., além da taxa de diluição que causa a lavagem celular) permitindo produzir em modo contínuo misturas do tipo IBEA. Além disso, a espuma de poliuretano é projetada para ser imobilizada por imersão em um reator.

[0049] De acordo com um ou mais modos de realização, a espuma de poliuretano apresenta:

- cavidades volumétricas (i.e., poros ou células) cujo diâmetro de esfera equivalente está compreendido entre 0,1 e 5 mm, de preferência entre 0,25 mm e 1,1 mm, de preferência entre 0,55 e 0,99 mm, e/ou

- uma densidade aparente (i.e., massa sobre volume aparente) medida no ar compreendida entre 10 e 90 g/L, de preferência entre 10 e 80 g/L, de preferência entre 15 e 45 g/L, tal como entre 20 e 45 g/L ou entre 25 e 45 g/L.

Descrição do método de medição do diâmetro dos poros: tomografia X.

[0050] O diâmetro de esfera equivalente das cavidades volumétricas pode ser particularmente obtido por análise no microscanner X (por exemplo, tubo HR 70kV 200 microA Point focal medium; detector Varian pixel: 6 microns; duração da aquisição: 2 horas) de uma amostra (por exemplo, 7 mm x 7mm x 15 mm) e reconstrução de um volume

representativo da espuma (por exemplo, volume reconstruído 5 mm x 5 mm x 5 mm com um tamanho de voxel de 6 microns) na hipótese de células esféricas.

[0051] As medições dos diâmetros são feitas por análise de imagens 3D com o software Avizo a partir de volumes 3D adquiridos pelo microscanner X. As células foram fechadas artificialmente por análise de imagens de forma a estimar o volume e depois o diâmetro das mesmas. O diâmetro de uma dada célula é semelhante àquela de uma esfera de mesmo volume. As diferentes etapas da análise de imagens são as seguintes:

- limiar das imagens (preto = células e branco = paredes);
- particionamento 2D das "células" pelo método das bacias de drenagem xy no software Avizo;
- particionamento 3D das "células" pelo método das bacias de drenagem 3D no software Avizo;
- eliminação das células de borda (células incompletas);
- medição dos volumes das células reconstruídas;
- estimativa dos diâmetros de célula (diâmetro de esferas equivalentes de mesmo volume); e
- distribuição por tamanho das células para comparação.

O processo

[0052] A figura 1 representa um esquema de produção de uma mistura de álcoois a partir de um substrato do tipo biomassa lignocelulósica.

[0053] Com referência à figura 1, o fluido com alta concentração de açúcares compreendendo, por exemplo, açúcares C5 e/ou C6 é introduzido pelo conduto 1 em um reator de fermentação 2 para passar por uma etapa de fermentação.

[0054] No reator de fermentação 2, o fluido com alta concentração de açúcares é colocado em contato com a biomassa bacteriana supor-

tada sobre um suporte sólido compreendendo uma espuma de poliuretano. Os açúcares fermentáveis (por exemplo, açúcares C5 e/ou C6) são então transformados em álcoois e/ou solventes pelos micro-organismos para produzir um (primeiro) mosto (ou suco de vinho) fermentativo, especialmente enriquecido em isopropanol, butanol, etanol e acetona em relação ao fluido com alta concentração de açúcares.

[0055] A etapa de fermentação no reator de fermentação 2 pode ser realizada a uma temperatura compreendida entre 28°C e 40°C, de preferência entre 30°C e 37°C, de maneira que o mosto fermentativo compreenda produtos da reação de fermentação do tipo IBEA, por exemplo, isopropanol que é em seguida descarregado por um conduto 3.

[0056] O mosto fermentativo é introduzido pelo conduto 3 em uma unidade de separação 4 (opcional) que permite separar e extrair os compostos de interesse do mosto de fermentação, estes últimos sendo descarregados pelo conduto 5. Os resíduos da separação, normalmente chamados de vinhaças, são descarregados da unidade de separação 4 pelo conduto 6. As vinhaças geralmente são compostas de água e de qualquer produto líquido ou sólido não convertido ou não extraído nas etapas precedentes. A unidade de separação 4 pode efetuar uma ou mais destilações, e opcionalmente uma separação das substâncias sólidas e/ou em suspensão, por exemplo, por centrifugação, decantação e/ou filtração.

[0057] Várias concretizações ou tecnologias de reator de fermentação existentes no estado da técnica são projetadas para imobilizar a biomassa bacteriana por adsorção no suporte sólido, e de modo que a operação ocorra no interior do reator de fermentação 2 ou em um reservatório secundário em modo "in stream". Por exemplo, a biomassa bacteriana pode ser imobilizada sobre um suporte sólido diretamente no reator de fermentação 2 ou indiretamente em um reservatório se-

cundário 7 (opcional), funcionando, por exemplo, em modo "in stream" em relação ao reator de fermentação 2. O suporte sólido assim carregado de biomassa bacteriana pode então ser introduzido no reator de fermentação, por exemplo, pelo conduto 8 ou por qualquer outro meio.

[0058] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido forma um leito fluidificado ou um leito fixo.

[0059] No caso de um leito fluidificado, a taxa fluxo de líquido pode ser estipulada diretamente no leito de espuma de poliuretano na direção descendente (uma vez que a densidade do mosto fermentativo geralmente é maior que a densidade da espuma de poliuretano). De acordo com um ou mais modos de realização, a velocidade superficial líquida do fluido com alta concentração de açúcares é mais alta que a velocidade mínima de fluidificação. De acordo com um ou mais modos de realização, a velocidade superficial líquida do fluido com alta concentração de açúcares é alterada (por exemplo, aumentada) em função da evolução da variação de densidade que ocorre durante a fermentação. Por exemplo, à medida que o biofilme se forma no suporte sólido, a densidade do suporte sólido pode ser levada a variar (por exemplo, aumentar), dando lugar a regimes hidráulicos evolutivos (por exemplo, taxas de reciclagem opcionais diferentes no início da fermentação e no fim da fermentação).

[0060] No caso de um leito fixo, um suporte sólido compreendendo um empilhamento a granel ou estruturado de partículas de espuma de poliuretano pode ser considerado, com ou sem agitação mecânica (por exemplo, no interior de uma coluna).

[0061] De acordo com um ou mais modos de realização, o meio fermentativo atravessa o leito sólido em corrente ascendente ou descendente ("upflow" ou "downflow" segundo a terminologia anglo-saxônica). Por exemplo, no caso de uma circulação líquida descendente, pode ser previsto um sistema que permite a liberação de gás con-

tra-corrente. De acordo com um ou mais modos de realização, uma circulação radial pode ser igualmente considerada no reator de fermentação 2, por exemplo, no caso em que se aplica uma agitação mecânica no centro do reator de fermentação 2 (por exemplo, turbina radial do tipo Rushton). De acordo com um ou mais modos de realização, o sólido é imobilizado no interior de um cesto concêntrico ao eixo de agitação, permitindo principalmente controlar as velocidades do meio reacional e a hidrodinâmica estipulada em torno deste último (por exemplo, reator do tipo Robinson Mahoney).

Imersão e uso do suporte sólido

[0062] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é parcial ou totalmente imerso, particularmente para aumentar a formação de biofilmes e melhorar os desempenhos.

[0063] De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido é introduzido na forma de um bloco único, por exemplo, na forma de um cilindro cujo diâmetro ou inferior ou substancialmente igual ao diâmetro interno do reator de fermentação 2. De acordo com um ou mais modos de realização, como mostrado na figura 2, o diâmetro do suporte sólido 9 é substancialmente igual ao diâmetro interno do reator de fermentação 2. O bloco pode assim corresponder a um meio filtrante no interior do qual os biofilmes vão se desenvolver. Embora seja possivelmente mais difícil gerar um aporte de insolúveis que possam ser arrastados com o fluido com alta concentração de açúcares, os desempenhos de um processo que utiliza um reator de fermentação 2 tal como mostrado na figura 1 estão entre os mais elevados. Por outro lado, o suporte sólido 9 tal como mostrado na figura 2 pode causar uma leve sobrepressão na fase líquida livre, no nível inferior. Deve-se observar que se a liberação de gás é importante durante a fermentação, uma bolsa de gás pode se formar sob o suporte sólido e passagens preferenciais no interior do suporte sólido 9 podem ser criadas no mo-

mento da evacuação do gás.

[0064] De acordo com um ou mais modos de realização, como mostrado na figura 3, o bloco de suporte sólido 9 pode estar no centro, fora do centro ou preso a uma parede do reator de fermentação 2. Vantajosamente, o suporte sólido 9 não atrapalha de forma alguma a circulação de líquido na entrada como na saída do processo, especificamente quando operado de forma contínua. Além disso, a presença opcional de insolúveis tais como aqueles provenientes de grandes cereais não representa um problema. O fluxo de fluido com alta concentração de açúcares que chega pelo conduto 1 também pode ser introduzido à direita dos blocos de suporte sólido 9, por exemplo, quando estes emergem na superfície do meio reacional do reator de fermentação 2. Vantajosamente, quando o suporte sólido emerge na superfície do meio reacional no nível da entrada do fluido com alta concentração de açúcares, o meio naquele local é menos concentrado em álcool e o crescimento de bactérias é favorecido.

[0065] Fica entendido que não é necessário utilizar um suporte sólido 9 de bloco único. De acordo com um ou mais modos de realização, o suporte sólido compreende um fio delgado ou um recipiente de malha 10 compreendendo cubos ou paralelepípedos ou outros elementos de quaisquer outras formas tridimensionais (por exemplo, poliedros) grandes ou pequenos (por exemplo, pelo menos uma dimensão entre 3 mm e 10 m, tal como de 2 cm a 1 m), tal como mostrado na figura 4, os elementos sendo constituídos de espuma de poliuretano. De acordo com um ou mais modos de realização, o fio delgado ou o recipiente de malha 10 forma um cilindro cujo diâmetro é inferior ou substancialmente igual ao diâmetro interno do reator de fermentação 2. De acordo com um ou mais modos de realização, o diâmetro do fio delgado ou do recipiente de malha 10 é substancialmente igual ao diâmetro interno do reator de fermentação 2.

[0066] É possível que as emissões gasosas tendam a elevar o suporte sólido 9. Por outro lado, uma placa perfurada, um simples fio delgado ou uma grade 11 (vide figura 5) pode ser suficiente para manter o suporte sólido, por exemplo, em movimento, no reator de fermentação 2.

[0067] Nos modos de realização das figuras 2 a 5, o reator de fermentação 2 tem circulação de fluido ascendente. Por outro lado, fica entendido que o sentido de circulação do fluido com alta concentração de açúcares pode ser descendente. Fica entendido também que o sentido de circulação pode ser globalmente ascendente ou descendente (visto de fora do reator de fermentação) e radial dentro do reator de fermentação 2.

Etapas de finalização

[0068] Como indicado na figura 6, o processo de produção de álcoois pode ser realizado em um reator de finalização 12 denominado "finalizador" (opcional). De acordo com um ou mais modos de realização, o mosto fermentativo decantado do reator de fermentação 2 pelo conduto 3 é introduzido no reator de finalização 12 projetado para produzir um segundo mosto fermentativo enriquecido em IBEA em relação ao mosto fermentativo decantado do reator de fermentação 2. O segundo mosto fermentativo é decantado do reator de finalização 12 e descarregado pelo conduto 6 e introduzido na unidade de separação 4 (opcional) que permite separar e extrair os compostos de interesse do mosto fermentativo, estes últimos sendo descarregados pelo conduto 5. O reator de finalização 12 de preferência não contém espuma PU. O finalizador é de preferência homogêneo e tem a finalidade de aproveitar ao máximo o potencial de título de IBEA da cepa *Clostridium*, permitindo um tempo de residência prolongado, e acrescentar uma quantidade substrato carbonato que corresponde às necessidades da cepa. O reator de finalização 12 permite em particular garantir um esgota-

mento de oses.

[0069] De acordo com um ou mais modos de realização, o processo de produção de álcoois realiza uma etapa de recuperação parcial dos compostos IBEA produzidos presentes no primeiro e/ou no segundo mosto fermentativo. Esta etapa de extração dos compostos IBEA faz uso de uma etapa de redução com um gás sob pressão enviado para o reator de fermentação 2 e/ou para o reator de finalização 12 para transportar os álcoois presentes para a fase aquosa.

[0070] De acordo com um ou mais modos de realização, o gás redutor é um gás produzido diretamente por fermentação e que fora previamente armazenado (por métodos conhecidos pelo especialista na técnica) antes de ser utilizado. O gás redutor compreende tipicamente dióxido de carbono e opcionalmente hidrogênio. Esta etapa de redução com gás permite controlar de forma vantajosa, durante a fermentação, o teor de álcoois presentes no meio para limitar os fenômenos de inibição dos micro-organismos que surgem quando o teor de álcool atinge um valor crítico. De acordo com um ou mais modos de realização, a etapa de redução com gás pode ser realizada de forma contínua ou de forma descontínua. O fluxo de gás de fermentação em relação ao volume do fermentador está compreendido, por exemplo, entre 0,5 e 2,5 l/l/min, de preferência compreendido entre 0,7 e 1,1 l/l/min.

[0071] De acordo com um ou mais modos de realização, o processo de recuperação pode ser igualmente realizado de forma que a etapa de redução seja operada em um finalizador 12 contendo um solvente orgânico imiscível em água, o solvente formando uma fase orgânica sobrenadante acima do mosto fermentativo. O solvente será aliás escolhido de forma a ser biocompatível com o micro-organismo.

[0072] O gás redutor é então injetado no mosto fermentativo de forma a transportar os álcoois produzidos para a fase orgânica sobrenadante e de forma que uma parte dos álcoois seja transferida para a

fase orgânica quando o gás redutor atravessar a referida fase orgânica.

Exemplos

Exemplo de referência: teste em modo contínuo de células em suspensão

[0073] Realiza-se de forma experimental um ensaio em modo contínuo com células em suspensão. Um biorreator dispondo de 5 L de volume total é preenchido com 1,8 L de meio fermentativo. A glicose inicial é fixada em 60 g/L, e o inóculo é fixado em 0,2 L, ou seja, uma taxa de inoculação de 10% em volume em relação ao volume total do meio fermentativo com células à taxa de crescimento máxima, depois de sofrerem uma purga de nitrogênio de 1 hora com o objetivo de garantir uma condição anaeróbica (rigorosa) desde o início do ensaio. A purga de nitrogênio é mantida durante a etapa intermitente preliminar (4-5 horas). O micro-organismo empregado é *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. A temperatura e a agitação mecânica são fixadas em 36°C e 60 rpm, respectivamente, desde o início do ensaio; a pressão é substancialmente a atmosférica + a altura de água do biorreator. O ensaio ocorre em 2 etapas:

- uma primeira etapa em modo intermitente (duração de 4-8 horas) correspondente ao tempo de latência ("lag time" segundo a terminologia anglo-saxônica) e início do crescimento exponencial (acompanhado pela geração de gás fermentativo); e
- uma segunda etapa em modo contínuo na qual são estipuladas taxas de diluição diferentes.

[0074] Aguarda-se um período de tempo correspondente ao mínimo de três vezes (de preferência menos de 5 vezes) o tempo de residência a cada nova instrução de estabilização. Em seguida, o mosto fermentativo é analisado quanto ao teor de glicose e principais metabólitos (i.e., isopropanol, butanol, etanol e acetona).

[0074] A figura 7 mostra a evolução da produtividade volumétrica r em IBEA g/L.h em função da taxa de diluição D estipulada no biorreator (h^{-1}). A taxa de diluição D é definida como o fluxo volumétrico que entrada no reator dividido pelo volume deste último. No caso de um processo com micro-organismos em suspensão, este parâmetro pode ser ao mesmo tempo considerado o inverso do tempo de residência pelo fluido e pelos micro-organismos. Consequentemente, além de uma determinada taxa de diluição surge um fenômeno de lavagem celular, levando a uma perda de produtividade volumétrica. Neste caso, a taxa de diluição crítica fica entre 0,04 e 0,06 h^{-1}, momento em que a produtividade máxima atinge um valor de cerca de 0,45 g/L.h de IBEA.

Exemplo 1 de acordo com a presente invenção: Teste em modo intermitente com espuma de poliuretano

[0075] Realiza-se de forma experimental um processo em modo intermitente: duas fermentações com suportes sólidos do tipo espuma de poliuretano (espuma 1, espuma 2) com características físicas e estruturais diferentes, e uma fermentação de controle (células em suspensão). As principais características dessas duas espumas estão apresentadas na tabela 1 abaixo:

Tabela 1

Suporte sólido	Espuma 1	Espuma 2
Diâmetro dos poros (mm)	0,73	1
Densidade aparente (g/L)	29,8	20,5

[0076] Vários biorreatores são preenchidos com 20 mL de meio fermentativo, que fora previamente colocado em condições de anaerobiose para garantir a ausência de oxigênio. Em cada biorreator são introduzidos 40% de volume de sólido (volume aparente) em relação ao volume total do biorreator. A glicose inicial é fixada em 90 g/L, a taxa de semeadura é de 10% (volume líquido) (mesmo inóculo para todas as fermentações) com células à taxa de crescimento máxima. O micro-

organismo empregado é *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. O conjunto de biorreatores é introduzido em uma redoma em condições de anaerobiose, e colocado sob calor (36°C), por um período fixo de 12 dias. A pressão é substancialmente a atmosférica + a altura de água do biorreator. Em seguida, o mosto de fermentação final é analisado, bem como os sólidos que suportam o biofilme. Cada condição operacional é realizada três vezes para garantir a repetitibilidade das experiências.

[0077] A presença de sólidos do tipo espuma de poliuretano tem vários efeitos no consequente consumo excessivo de glicose (vide tabela 2 abaixo) e no título final de IBEA.

Tabela 2

Suporte sólido	Espuma 1	Espuma 2
Consumo de glicose (g/L)	51,4	44,7
Consumo excessivo de glicose (%) (em relação ao controle que não tem suporte sólido de acordo com a presente invenção)	31,4	14,3

[0078] O título é quantidade a partir do rendimento de fermentação que é considerado invariável e do consumo de glicose em cada ensaio. Assim sendo, as fermentações em modo intermitente com a espuma 1 e a espuma 2 produziram, respectivamente, 17,5 g/L e 15,2 g/L de IBEA, título nos dois casos superior àquele obtido com a fermentação de controle (13,3 g/L de IBEA)

Exemplo 2 de acordo com a presente invenção: Teste em modo intermitente com espuma de poliuretano

[0079] Realiza-se de forma experimental o processo de acordo com os modos de realização da presente invenção, por meio de duas fermentações em modo contínuo com imobilização em suportes sólidos do tipo espuma de poliuretano (espuma 1, espuma 2) com características físicas e estruturais diferentes. As principais características dessas

duas espumas estão mostradas na tabela 1. O preenchimento é realizado a granel, com cubos de dimensões 3 mm x 5 mm x 5 mm.

[0079] No interior de uma coluna de vidro de 112 ml (dimensões: diâmetro interino = 32 mm, H= 13,9 cm) é introduzido o suporte sólido, a uma taxa volumétrica de 50% na coluna em relação ao volume interno total da coluna. A coluna é disposta no anel de recirculação de um segundo frasco de fermentação, cujo volume de meio fermentativo atinge 80 ml. Todo o sistema fermentativo fora previamente colocado em condições de anaerobiose por purga de nitrogênio para garantir a ausência de oxigênio. A glicose em um viveiro de carga é fixada em 90 g/L, e o suporte sólido sofre uma taxa de inoculação de 10% em volume com as células à taxa de crescimento máxima em relação ao volume total do meio de fermentação. O micro-organismo empregado é *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. O sistema é colocado sob calor (36°C), sem agitação. A pressão é substancialmente a atmosférica + a altura de água da coluna de vidro. O ensaio ocorre em 2 etapas:

- uma primeira etapa em modo intermitente (duração 4-5 horas) correspondente ao "tempo de latência" e início do crescimento exponencial (acompanhado pela geração de gás de fermentação); e
- uma segunda etapa em modo contínuo na qual são estipuladas taxas de diluição diferentes.

[0080] Aguarda-se um período de tempo correspondente ao mínimo de três vezes o tempo de residência a cada nova instrução de estabilização. Periodicamente, o mosto de fermentação final é removido de forma estéril da coluna e analisado quanto ao teor de glicose e principais metabólitos (i.e., isopropanol, butanol, etanol e acetona).

[0081] A presença de suporte sólido do tipo espuma de poliuretano tem vários efeitos na fermentação em modo contínuo: a tabela 3 abaixo mostra a evolução da fermentação, em função da taxa de diluição estipulada, da percentagem de consumo de glicose (%), do teor total

de IBEA (g/L), e da produtividade volumétrica (g/L.h de IBEA). Em relação às condições de células em suspensão (exemplo de referência), observa-se um aumento de produtividade no caso em que as células são imobilizadas na espuma 1 (fator 6) ou na espuma 2 (fator 3).

Tabela 3

	Espuma 1	Espuma 2	Células livres
Taxa de diluição (h^{-1})	0,14	0,14	0,05
Consumo de glicose (g/L)	48,6	23,4	28,8
Teor de IBEA (g/L)	17	9	9
Produtividade volumétrica (g/L.h)	2,46	1,3	0,4

[0082] Embora os modos de realização e exemplos mencionados abaixo estejam descritos detalhadamente, fica entendido que modos de realização suplementares são previstos. Por exemplo, a biomassa bacteriana utilizada no processo da presente invenção pode corresponder a uma fonte diferente de *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. Ainda, as espumas de poliuretano de acordo com a presente invenção podem ser diferentes daquelas descritas na tabela 1. Além disso, teores de IBEA e produtividades volumétricas melhores podem ser obtidos por meio da taxa de inoculação, da taxa de açúcar, da taxa de diluição, de temperaturas, de pressões, de agitações, de durações, etc. diferentes daquelas indicadas nos exemplos.

[0083] A menos que especificado em contrário no presente relatório descritivo, ficará evidente para o especialista na técnica que todos os modos de realização descritos acima podem ser combinados uns com outros. Por exemplo, a menos que especificado em contrário, todas das características dos modos de realização descritos acima podem ser combinadas ou substituídas por outras características de outros modos de realização.

Exemplo 3 de acordo com a presente invenção: Teste em modo intermitente com espuma de poliuretano

[0084] Realiza-se de forma experimental o processo de acordo com os modos de realização da presente invenção, por meio de duas fermentações em modo contínuo com imobilização em suportes sólidos do tipo espuma de poliuretano. O preenchimento é efetuado a granel, com cubos de dimensões 10 mm x 10 mm x 7 mm. As espumas apresentam um tamanho de macro-poros de cerca de 1 mm.

[0085] Os dois fermentadores são apresentados na forma de uma coluna de vidro de 250 ml de volume útil. As condições de preenchimento dos fermentadores estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4

	Fermentador 1	Fermentador 2
Massa de espumas (g)	2,03	3,04
Volume útil de líquido (mL)	250	250
Densidade aparente (g/L) (%)	37	37

[0086] Um anel de recirculação é disposto entre a entrada e a saída do reator para manter uma boa homogeneização no interior do fermentador. A saída do líquido é feita por transbordamento. Todo o sistema fermentativo fora previamente colocado em condições de anaerobiose por purga de nitrogênio para garantir a ausência de oxigênio. A concentração de glicose no viveiro de cargas é fixada em 60 g/L. O fermentador é inoculado a 10% em volume com células à taxa de crescimento máximo em relação ao volume total do meio fermentativo. O micro-organismo empregado é *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. O sistema tem a temperatura regulada em 34°C sem agitação além da recirculação. A pressão é substancialmente a atmosférica.

[0087] O ensaio ocorre em 2 etapas:

- uma primeira etapa em modo intermitente (duração 7 horas) correspondente ao "tempo de latência" e início do crescimento exponencial (acompanhado de geração de gás de fermentação); e
- uma segunda etapa em modo contínuo na qual são esti-

puladas taxas de diluição diferentes.

[0088] Na segunda etapa, a taxa de diluição é aumentada continuamente em função das concentrações dos solventes. Periodicamente, o mosto de fermentação é removido de forma estéril e analisado quanto ao teor de glicose e principais metabólitos (i.e., isopropanol, butanol, etanol e acetona). O pH também é medido.

[0089] Os dois fermentadores são operados por um período de 912 horas. A taxa de diluição varia entre 0,02 h-1 e 0,23 h-1. Depois de 200 horas de fermentação, o teor total de IBEA varia entre 8 e 16 g/L. Antes de 500 horas, a produtividade volumétrica máxima para os dois fermentadores é de 1,5 g/L.h en IBEA. Os melhores desempenhos de todo o ensaio dão uma produtividade volumétrica máxima de 2,44 g/L/h de IBEA para o fermentador 1 e de 2,24 g/L/h de IBEA para o fermentador 2.

Exemplo 4 de acordo com a presente invenção: Teste em modo intermitente com espuma de poliuretano dans un réacteur agité

[0090] Realiza-se de forma experimental ensaio em modo contínuo com as células imobilizadas sobre um suporte do tipo espuma de poliuretano. Um biorreator dispondo de 5 L de volume total é preenchido com 2 L de meio fermentativo. A glicose inicial é fixada em 60 g/L, e o inóculo é de 0,2L, ou seja, uma taxa de inoculação de 10% em volume em relação ao volume total do meio fermentativo com as células à taxa de crescimento máxima, depois de ter sofrido uma purga de nitrogênio de 1 hora com a finalidade de garantir uma condição em anaerobiose (rigorosa) desde o início do ensaio. A purga de nitrogênio é mantida durante a etapa intermitente preliminar (7 horas). O micro-organismo empregado é *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. a temperatura é fixada em 34°C. A agitação mecânica varia entre e 60 e 170 rpm. A pressão é substancialmente a atmosférica + a altura de água do biorreator.

[0091] O ensaio ocorre em 2 etapas:

- uma primeira etapa em modo intermitente (duração 7 horas) correspondendo ao tempo de latência ("lag time" segundo a terminologia anglo-saxônica) e início do crescimento exponencial (acompanhado pela geração de gás de fermentação); e

- uma segunda etapa em modo contínuo na qual são estipuladas taxas de diluição diferentes.

[0092] Na segunda etapa, a taxa de diluição é aumentada continuamente em função das concentrações dos solventes. Periodicamente, o mosto de fermentação é removido de forma estéril e analisado quanto ao teor de glicose e principais metabólitos (i.e., isopropanol, butanol, etanol e acetona). O pH também é medido.

[0093] Os dois fermentadores são operados por um período de cerca de 765 horas. A taxa de diluição varia entre 0,02 h-1 e 0,2 h-1. Depois de 100 horas, o teor de IBEA varia entre 5 e 16 g/L. A produtividade volumétrica máxima obtida para esta fermentação é de 1,6 g/L.h de IBEA.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção de álcoois, caracterizado pelo fato de que um fluido com alta concentração de açúcares é introduzido em um reator de fermentação (2) para produzir um mosto fermentativo enriquecido em isopropanol, butanol, etanol e acetona em relação ao fluido com alta concentração de açúcares, o reator de fermentação (2) compreendendo uma biomassa produzida por uma cepa que pertence ao gênero *Clostridium* suportada sobre um suporte sólido (9) compreendendo uma espuma de poliuretano.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a espuma de poliuretano apresenta: cavidades volumétricas cujo diâmetro esférico equivalente está compreendido entre 0,1 e 5 mm; e/ou uma densidade aparente medida no ar compreendida entre 10 e 90 g/L.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o fluido com alta concentração de açúcares é introduzido continuamente no reator de fermentação (2).

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a fermentação é realizada a uma taxa de diluição (D) do fluido com alta concentração de açúcares em relação ao volume do reator de fermentação (2) compreendida entre 0,04 h^{-1} e 1 h^{-1}.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a biomassa produzida pela cepa pertencente ao gênero *Clostridium* compreende uma bactéria que pertence a uma espécie selecionada dentre as espécies *Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Clostridium saccharobutylicum. Clostridium tyrobutyricum, C. saccharoperbutylacetonicum, C. butylicum.*

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a biomassa produzi-

da pela cepa pertencente ao gênero *Clostridium* compreende uma bactéria geneticamente modificada que pertence à espécie *Clostridium beijerinckii* naturalmente produtora de isopropanol e/ou *Clostridium acetobutylicum* geneticamente modificada para produção de isopropanol.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a biomassa produzida pela cepa pertencente ao gênero *Clostridium* é imobilizada sobre o suporte sólido (9) em um reservatório secundário (7), e o suporte sólido (9) que suporta a biomassa produzida pela cepa pertencente ao gênero *Clostridium* é introduzido no reator de fermentação (2).

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a biomassa produzida pela cepa pertencente ao gênero *Clostridium* é imobilizada sobre o suporte sólido na forma de biofilme.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido (9) é introduzido no reator de fermentação (2) na forma de um ou mais blocos, e/ou na forma de um fio delgado ou de um recipiente de malha (10) compreendendo uma pluralidade de cubos, paralelepípedos ou quaisquer outras formas tridimensionais de espuma de poliuretano.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido (9) está substancialmente na forma de um cilindro circular linear tendo um diâmetro menor ou substancialmente igual ao diâmetro interno do reator de fermentação (2).

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido (9) forma um leito fluidificado ou um leito fixo no reator de fermentação (2).

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido (9)

está disposto no reator de fermentação (2) de forma a emergir na superfície do meio reacional do reator de fermentação (2).

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a produção do mosto fermentativo é realizada por fermentação anaeróbica.

14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a fermentação é realizada a uma temperatura compreendida entre 28°C e 40°C, e/ou a uma pressão compreendida entre cerca de 0,1 MPa e 0,15 MPa, e/ou por um período de pelo menos 250 horas.

15. Reator de fermentação (2) caracterizado por compreender uma biomassa projetada para produção de isopropanol, butanol, etanol e acetona e produzida por uma cepa que pertence ao gênero *Clostridium* suportada sobre um suporte sólido (9) compreendendo uma espuma de poliuretano.

Fig 1

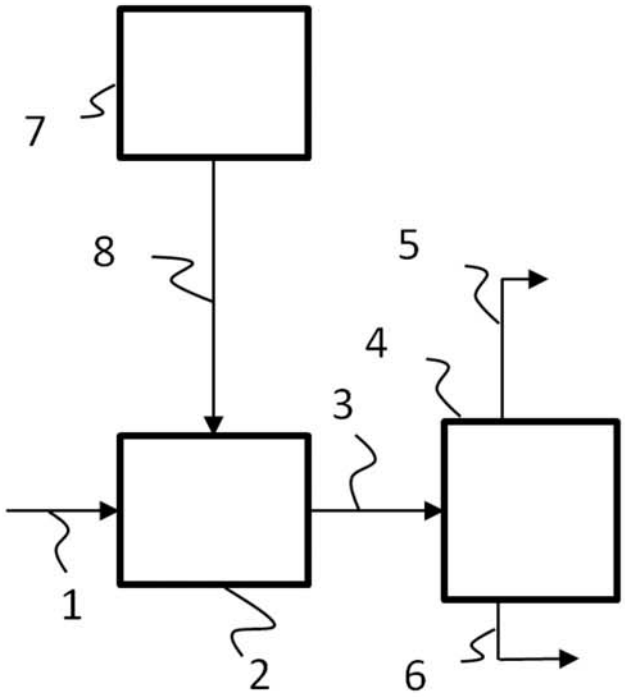


Fig 2

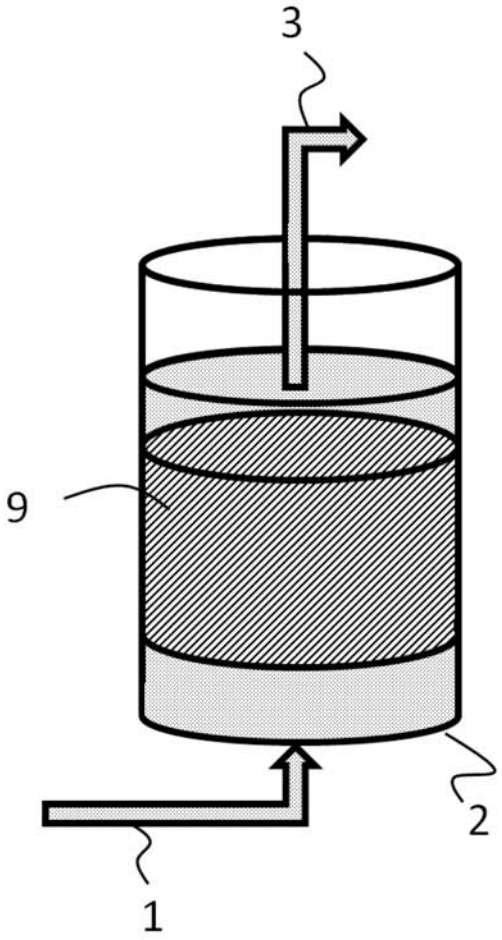


Fig 3

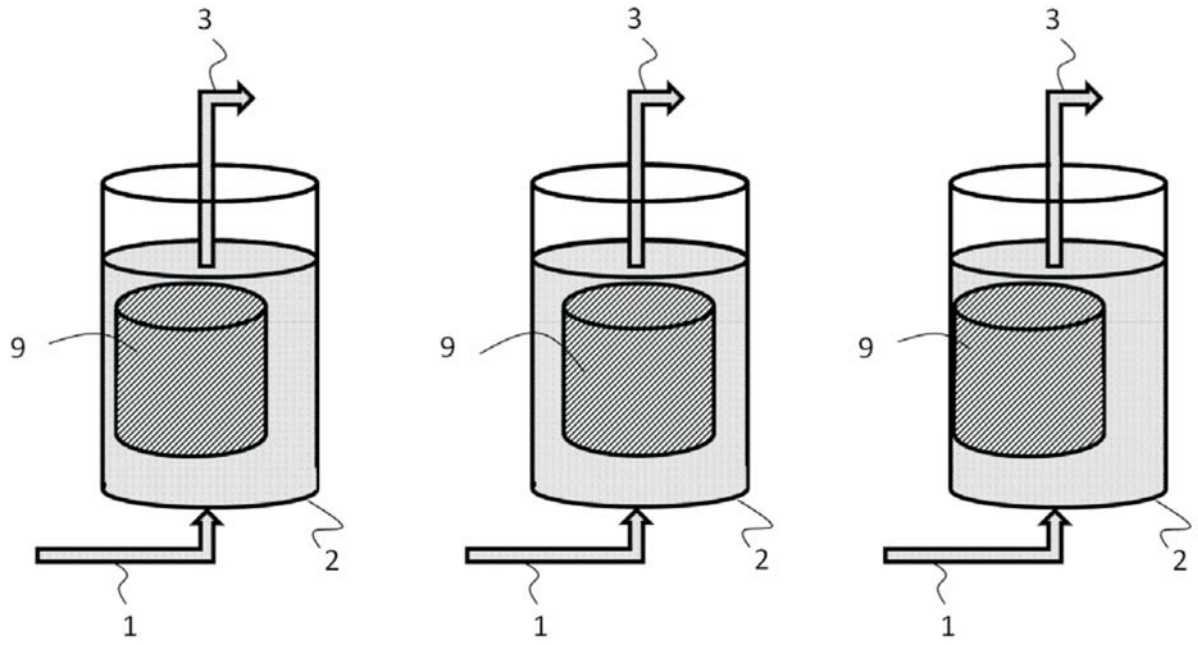


Fig 4

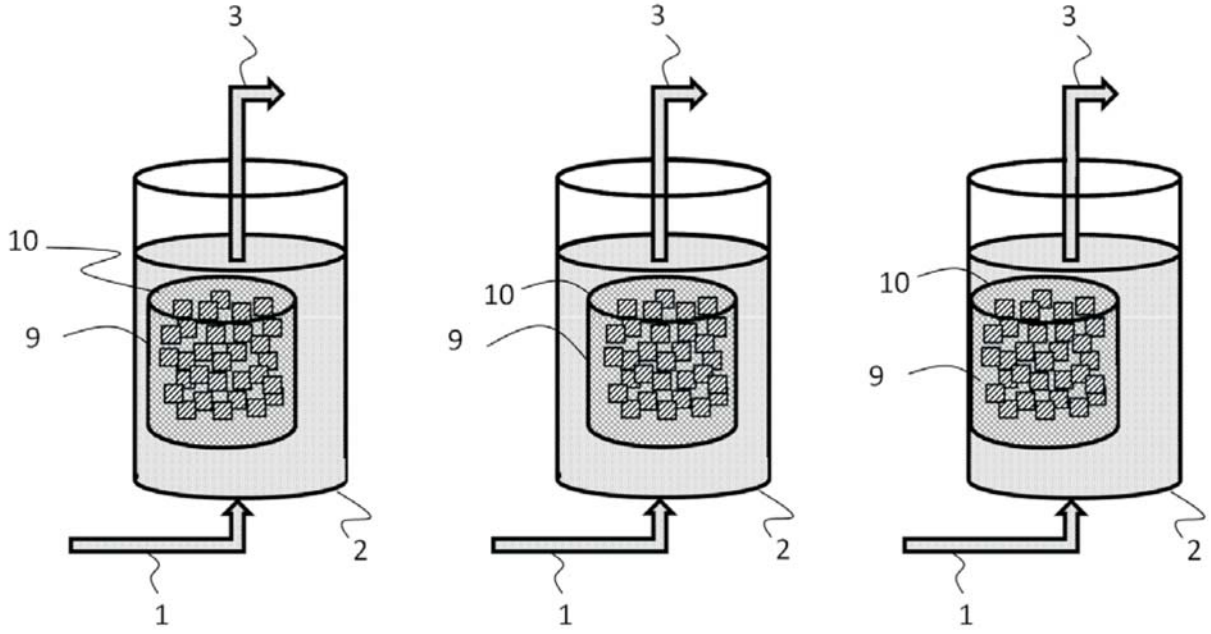


Fig 5

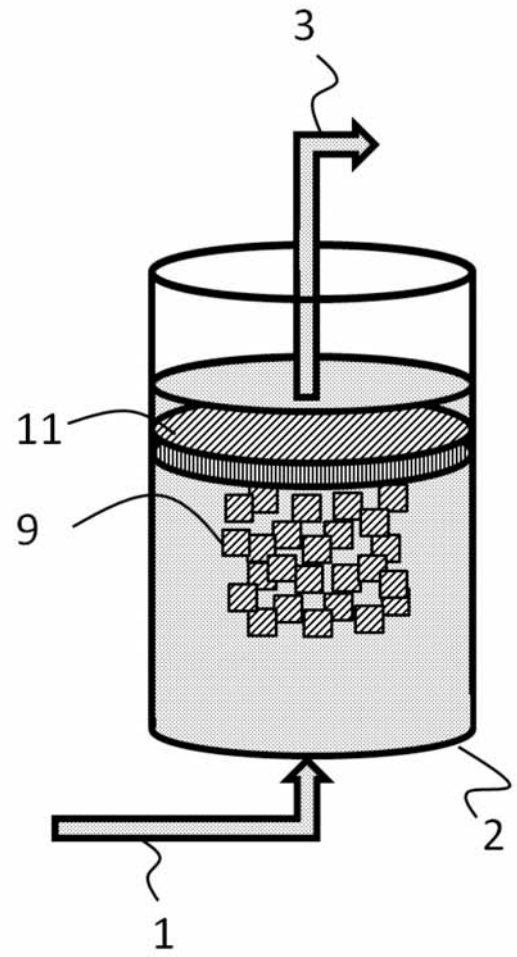


Fig 6

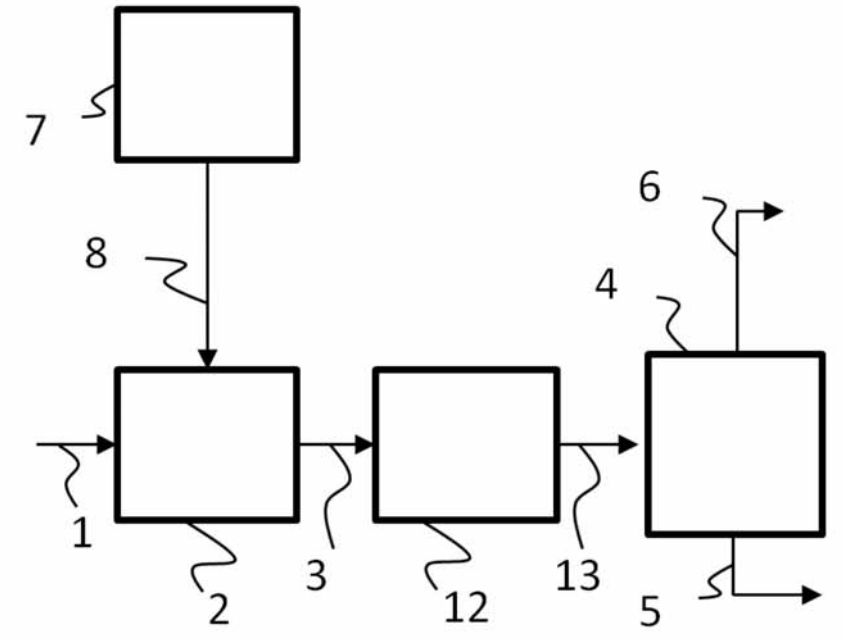
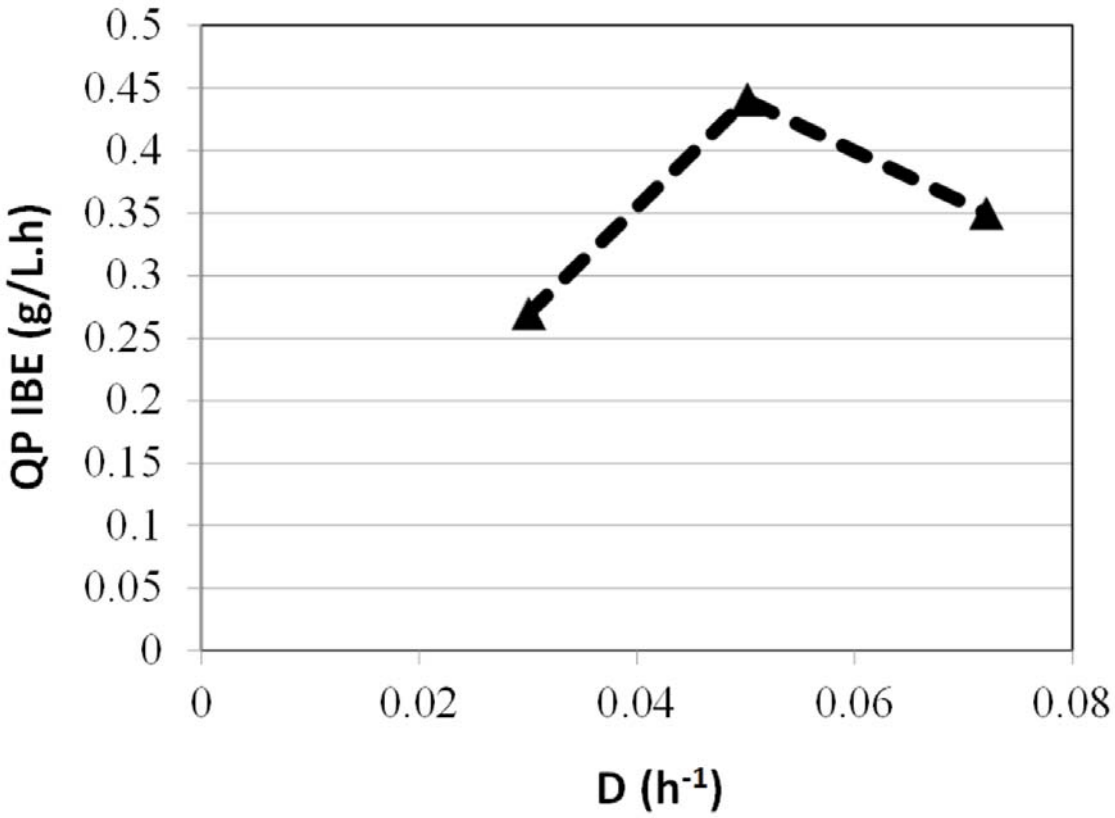


Fig 7


0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
QP IBE (g/L.h)
0
0.02
0.04
0.06
0.08
D (h-1)

RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS COM CLOSTRIDIUM SOBRE SUPORTE SÓLIDO".**

A presente invenção refere-se a um processo para produção de álcoois, no qual um fluido com alta concentração de açúcares é introduzido em um reator de fermentação (2) para produzir um mosto fermentativo enriquecido em isopropanol, butanol, etanol e acetona em relação ao fluido com alta concentração de açúcares, o reator de fermentação (2) compreendendo uma biomassa produzida por uma cepa que pertence ao gênero *Clostridium* suportada sobre um suporte sólido (9) compreendendo uma espuma de poliuretano; e um reator de fermentação (2) compreendendo a referida biomassa suportada sobre o referido suporte sólido (9).