



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

(21) BR 112012012219-3 A2



(22) Data do Depósito: 23/11/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 02/02/2021

(54) Título: MÉTODO PARA RECUPERAR BUTANOL, MÉTODOS PARA PRODUZIR BUTANOL E COMPOSIÇÃO

(51) Int. Cl.: C12P 7/16; C07C 29/86; C12N 1/28; C07C 33/00.

(30) Prioridade Unionista: 23/11/2009 US 61/263,519.

(71) Depositante(es): BUTAMAX (TM) ADVANCED BIOFUELS LLC..

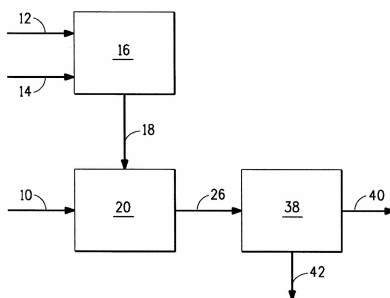
(72) Inventor(es): MICHAEL CHARLES GRADY; RANJAN PATNAIK.

(86) Pedido PCT: PCT US2010057791 de 23/11/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/063391 de 26/05/2011

(85) Data da Fase Nacional: 22/05/2012

(57) Resumo: MÉTODO PARA RECUPERAR BUTANOL, MÉTODOS PARA PRODUZIR BUTANOL E COMPOSIÇÃO A presente invenção refere-se a um método para produzir butanol pela fermentação microbiana, em que o produto butanol é removido durante a fermentação por extração em um extrator orgânico imiscível em água na presença de pelo menos um eletrólito em uma concentração que é pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação ao coeficiente na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação. O eletrólito pode compreender um sal que se dissocia no meio de fermentação, ou na fase aquosa de um meio de fermentação bifásico, para formar íons livres. Também é fornecido um método e uma composição para recuperar butanol a partir de um meio de fermentação.



“MÉTODO PARA RECUPERAR BUTANOL, MÉTODOS PARA PRODUIR BUTANOL E COMPOSIÇÃO”

REFERÊNCIA CRUZADA PARA OS PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício de prioridade para o Pedido
5 Provisório de Patente US 61/263.519, depositado em 23 de Novembro de 2.009, cuja divulgação é incorporada ao presente pela referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada ao campo dos
10 biocombustíveis. Mais especificamente, a invenção refere-se a um método para produzir butanol por meio da fermentação microbiana, em que pelo menos um eletrólito está presente no meio de fermentação em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para
15 fermentação, e o produto butanol é removido por extração em um extrator orgânico imiscível em água.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O butanol é um importante produto químico industrial que possui diversas aplicações, por exemplo, o seu uso como aditivo de combustível,
20 como um componente de mistura para o combustível diesel, como matéria-prima de químicos na indústria de plásticos e como um extrator grau alimentício na indústria de alimentos e condimentos. A cada ano cerca de 10 a 12 milhões de toneladas de butanol são produzidas por meios petroquímicos. Como a necessidade do butanol é crescente, o interesse em produzir este produto
25 químico a partir de recursos renováveis como o milho, cana de açúcar, ou fontes celulósicas pela fermentação está se expandindo.

Em um processo de fermentação para produzir butanol, a remoção do produto *in situ* reduz de maneira vantajosa a inibição do micro-

organismo pelo butanol e melhora as taxas de fermentação pelo controle das concentrações de butanol no caldo de fermentação. As tecnologias para a remoção do produto *in situ* incluem a extração, adsorção, pervaporação, extração em solvente por membrana e extração líquido-líquido. Na extração líquido-líquido, um agente extrator é contatado com o caldo de fermentação para a partição do butanol entre o caldo de fermentação e a fase extrator. O butanol e o extrator são recuperados por um processo de separação, por exemplo, pela destilação.

JJ Malinowski e AJ Daugulis, *AIChE Journal* (1994), 40(9):1459-1465, descrevem estudos experimentais para avaliar o efeito da adição de sal sobre a extração de 1-butanol, etanol e acetona a partir de soluções aquosas diluídas usando ciclopentanol, n-valeraldeído, álcool terc-amilíco, e Adol 85NF (composto em grande parte por álcool oleílico) como extratores. Os autores notam nas suas conclusões de que, apesar das vantagens que a adição de sal oferece na extração de etanol, 1-butanol e acetona a partir de soluções aquosas diluídas tipicamente encontradas nos processos de fermentação, a aplicação prática de tal processo de configuração é atualmente limitada. Como uma estratégia de recuperação *in situ* (fermentação extrativa) as concentrações de sais relativamente elevadas que podem ser necessárias poderiam ter efeitos severamente deletérios sobre as células resultantes do choque osmótico.

O Pedido de Patente Publicado US 2009/0171129 A1 revela métodos para a recuperação de alcoóis C_3-C_6 a partir de soluções aquosas diluídas, tais como caldos de fermentação. O método inclui o aumento da atividade do álcool C_3-C_6 , em uma porção da solução aquosa para que haja pelo menos saturação do álcool C_3-C_6 na porção. De acordo com um exemplo de realização da invenção, aumentar a atividade do álcool C_3-C_6 pode compreender a adição de um soluto hidrofílico na solução aquosa. É adicionado soluto hidrofílico suficiente para permitir a formação de uma

segunda fase líquida, seja unicamente pela adição do soluto hidrofílico ou pela combinação com outras fases do processo. O soluto hidrofílico adicional pode ser um sal, um aminoácido, um solvente solúvel em água, um açúcar ou combinações dos mesmos.

5 O Pedido de Patente US 12/478389 depositado em 04 de junho de 2009, descreve métodos para a produção e recuperação de butanol a partir de um caldo de fermentação, os métodos compreendem a etapa de contato do caldo de fermentação com um extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} ,
10 C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , e misturas destes, para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol.

Os Pedidos Provisórios de Patente US 61/168640, US 61/168642 e US 61/168645; depositados simultaneamente em 13 de abril de 2009; e US
15 61/231697, US 61/231698 e US 61/231699; depositados simultaneamente em 6 de agosto de 2009, divulgam métodos para a produção e recuperação de butanol a partir de um meio de fermentação, os métodos compreendem a etapa de contato do meio de fermentação com um extrator orgânico imiscível em água que compreende um primeiro solvente e um segundo solvente, sendo o
20 primeiro solvente selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , e misturas desses, e sendo o segundo solvente selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis C_7 a C_{11} , ácidos carboxílicos C_7 a C_{11} , ésteres de ácidos carboxílicos C_7 a C_{11} , aldeídos C_7 a C_{11} , e misturas
25 desses, para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol.

Métodos aperfeiçoados para a produção e recuperação do butanol a partir de um meio de fermentação estão constantemente sendo

procurados. É desejado um processo para a remoção do produto butanol *in situ* em que a adição de eletrólito a um meio de fermentação proporciona uma eficiência de extração do butanol melhorada e biocompatibilidade aceitável com o micro-organismo.

5

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um método para a recuperação do butanol a partir de um meio de fermentação compreendendo água, butanol, pelo menos um eletrólito, e um micro-organismo geneticamente modificado que produz butanol a partir de pelo menos uma fonte de carbono fermentável. O eletrólito está presente no meio de fermentação em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação. A presente invenção também fornece métodos para a produção de butanol usando tal micro-organismo um e um eletrólito adicionado. Os métodos incluem o contato do meio de fermentação com i) um primeiro extrator orgânico imiscível em água e, opcionalmente, ii) um segundo extrator orgânico imiscível em água, separando a fase orgânica contendo butanol da fase orgânica, e recuperando o butanol a partir da fase orgânica contendo butanol. Em um exemplo de realização da invenção, é fornecido um método para recuperar butanol a partir de um meio de fermentação, compreendendo o dito método:

a) fornecer um meio de fermentação compreendendo butanol, água, pelo menos um eletrólito em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação, e um micro-organismo geneticamente modificado que produz butanol a partir de pelo menos uma fonte de carbono fermentável;

b) colocar em contato o meio de fermentação com i) um primeiro

extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , amidas graxas C_{12} a C_{22} e misturas dos mesmos; e
5 opcionalmente, ii) um segundo extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_7 a C_{22} , ácidos graxos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_7 a C_{22} , aldeídos graxos C_7 a C_{22} , amidas graxas C_7 a C_{22} e misturas dos mesmos para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol;

10 c) opcionalmente separar a fase orgânica contendo butanol a partir da fase aquosa; e

d) recuperar o butanol a partir da fase orgânica contendo butanol para produzir butanol recuperado.

Em alguns exemplos de realizações, uma porção do butanol é removida simultaneamente do meio de fermentação por um processo
15 compreendendo as etapas de: a) dessorção (*stripping*) do butanol a partir do meio de fermentação com um gás para formar uma fase gasosa contendo butanol; e b) recuperação do butanol a partir da fase gasosa contendo butanol.

De acordo com os métodos da invenção, o eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação, ao primeiro extrator, ao segundo extrator
20 opcional, ou em uma combinação dos mesmos. Em alguns exemplos de realização, o eletrólito compreende um sal possuindo um cátion selecionado a partir do grupo que consiste em lítio, sódio, potássio, rubídio, cézio, magnésio, cálcio, estrôncio, bário, amônio, fosfônio, e combinações dos mesmos. Em alguns exemplos de realização, o eletrólito compreende um sal possuindo um ânion
25 selecionado a partir do grupo que consiste em sulfato, carbonato, acetato, citrato, lactato, fosfato, fluoreto, cloreto, brometo, iodeto, e combinações dos mesmos. Em alguns exemplos de realização, o eletrólito é selecionado a partir do grupo que consiste em sulfato de sódio, cloreto de sódio, e combinações dos mesmos.

De acordo com os métodos da invenção, em alguns exemplos de realizações o micro-organismo geneticamente modificado é selecionado a partir do grupo que consiste em bactérias, cianobactérias, fungos filamentosos e leveduras. Em alguns exemplos de realização, as bactérias são selecionadas a

5 partir do grupo que consiste em *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* e *Brevibacterium*. Em alguns exemplos de realização, a levedura é selecionada a partir do grupo que consiste em *Pichia*, *Candida*,

10 *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, e *Saccharomyces*.

De acordo com os métodos da invenção, o primeiro extrator pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em álcool oleílico, álcool behenílico, álcool cetílico, álcool laurílico, álcool miristílico, álcool estearílico, ácido oléico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, miristato de metila,

15 oleato de metila, aldeído láurico, 1-dodecanol e misturas destes. Em alguns exemplos de realização, o primeiro extrator compreende álcool oleílico. Em alguns exemplos de realização, o segundo extrator pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol, 2-undecanol, 1-nonanal, e uma combinação destes.

20 Em alguns exemplos de realização, o butanol é 1-butanol. Em alguns exemplos de realização, o butanol é 2-butanol. Em alguns exemplos de realização, o butanol é isobutanol. Em alguns exemplos de realização, o meio de fermentação compreende adicionalmente etanol, e a fase orgânica contendo butanol contém etanol.

25 Em um exemplo de realização da invenção, é fornecido um método para produzir butanol, compreendendo o dito método:

a) fornecer um micro-organismo geneticamente modificado que produz butanol a partir de pelo menos uma fonte de carbono fermentável;

b) crescer o micro-organismo em um meio de fermentação bifásico compreendendo uma fase aquosa e i) um primeiro extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , amidas graxas C_{12} a C_{22} , e misturas dos mesmos e, opcionalmente, ii) um segundo extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis C_7 a C_{22} , ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , aldeídos C_7 a C_{22} , amidas graxas C_7 a C_{22} , e misturas dos mesmos, em que o meio de fermentação bifásico compreende adicionalmente pelo menos um eletrólito, em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação, durante um tempo suficiente para permitir a extração do butanol no extrator orgânico para formar uma fase orgânica contendo butanol;

c) opcionalmente separar a fase orgânica contendo butanol da fase aquosa; e

d) recuperar o butanol a partir da fase orgânica contendo butanol para produzir butanol recuperado.

Em um exemplo de realização da invenção, é fornecido um método para produzir butanol, compreendendo o dito método:

a) fornecer um micro-organismo geneticamente modificado que produz butanol a partir de pelo menos uma fonte de carbono fermentável;

b) crescer o micro-organismo em um meio de fermentação no qual o micro-organismo produz o butanol no meio de fermentação para produzir um meio de fermentação contendo butanol;

c) adicionar pelo menos um eletrólito ao meio de fermentação para fornecer o eletrólito em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença

da concentração de sal do meio basal para fermentação;

- d) colocar em contato pelo menos uma porção do meio de fermentação contendo butanol com i) um primeiro extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , amidas graxas C_{12} a C_{22} e misturas dos mesmos, e opcionalmente, ii) um segundo extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis C_7 a C_{22} , ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , aldeídos C_7 a C_{22} , amidas graxas C_7 a C_{22} e misturas dos mesmos, para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol;
- e) opcionalmente, separar a fase orgânica contendo butanol da fase aquosa;
- f) recuperar o butanol a partir da fase orgânica contendo butanol; e
- g) opcionalmente, retornar pelo menos uma parte da fase aquosa para o meio de fermentação.

Em alguns exemplos de realização, o micro-organismo geneticamente modificado compreende uma modificação que inativa uma via que compete pelo fluxo de carbono. Em alguns exemplos de realização, o micro-organismo geneticamente modificado não produz acetona.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E DESCRIÇÕES DE SEQUÊNCIAS

A Figura 1 ilustra esquematicamente um exemplo de realização dos métodos da presente invenção, em que o primeiro extrator e o segundo extrator são combinados em um recipiente antes de entrarem em contato com o meio de fermentação no recipiente de fermentação.

A Figura 2 ilustra esquematicamente um exemplo de realização dos métodos da presente invenção, em que o primeiro extrator e o segundo extrator são adicionados separadamente a um recipiente de fermentação no

qual o meio de fermentação é contatado com os extratores.

A Figura 3 ilustra esquematicamente uma forma de realização dos métodos da invenção, em que o extrator primeiro e segundo o extrator são adicionados separadamente em diferentes recipientes de fermentação.

5 A Figura 4 ilustra esquematicamente um exemplo de realização dos métodos da presente invenção, em que a extração do produto ocorre a jusante do fermentador e o primeiro extrator e o segundo extrator são combinados em um recipiente antes do contato do meio de fermentação com os extratores em um recipiente diferente.

10 Figura 5: ilustra esquematicamente um exemplo de realização dos métodos da presente invenção, em que a extração do produto ocorre a jusante do fermentador e o primeiro extrator e o segundo extrator são adicionados separadamente a um recipiente no qual o meio de fermentação é colocado em contato com os extratores.

15 A Figura 6: ilustra esquematicamente um exemplo de realização dos métodos da presente invenção, em que a extração do produto ocorre a jusante do fermentador e o primeiro extrator e o segundo extrator são adicionados separadamente em um recipiente diferente para o contato com o meio de fermentação.

20 A Figura 7 ilustra esquematicamente um exemplo de realização dos métodos da presente invenção, em que a extração do produto ocorre em pelo menos um fermentador descontínuo (em batelada – ou *batch*) através do fluxo cocorrente de um extrator orgânico imiscível em água no, ou próximo do fundo de um mosto de fermentação para preencher o fermentador com o extrator que flui para fora do fermentador em um ponto no, ou próximo do topo do fermentador.

25 As sequências a seguir estão em conformidade com Título 37 do CFR §1.821-1.825 (*Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the*

Sequence Rules") e são consistentes com a Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI/WIPO), Standard ST.25 (1998) e os requisitos de listagem de sequências EPO e PCT (Regras 5.2 e 49,5 (a-bis), e na secção 208 e no Anexo C das instruções administrativas).

5

TABELA 1A**NÚMEROS DE SEQ ID DE CODIFICANTES E PROTEÍNAS**

| Descrição | Nº SEQ ID: ácido nucleico | NºSEQ ID: aminoácido |
|---|------------------------------|-------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae budB</i> (acetolactato sintase) | 1 | 2 |
| <i>E. coli ilvC</i> (ácido acetohidroxi reductoisomerase) | 3 | 4 |
| <i>E. coli ilvD</i> (ácido acetohidróxi desidratase) | 5 | 6 |
| <i>Lactococcus lactis kivD</i> (α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada) | 7 (códon-otimizado) | 8 |
| <i>Achromobacter xylosoxidans sadB</i> (butanol desidrogenase) | 9 | 10 |
| <i>Bacillus subtilis alsS</i> (acetolactato sintase) | 11 | 12 |
| <i>S. cerevisiae ILV5</i> (ácido acetohidroxi reductoisomerase; "KARI") | 13 | 14 |
| Mutant KARI (codificado pelo Pf5.ilvC-Z4B8) | 15 | 16 |
| <i>Streptococcus mutans ilvD</i> (ácido acetohidroxi desidratase) | 17 | 18 |
| <i>Bacillus subtilis kivD</i> (cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada) | 19 (códon-otimizado) | 20 |
| Álcool desidrogenase hepática de cavalo (HADH) | 56 (códon-otimizado) | 57 |
| <i>E. coli pflB</i> (piruvato formato-liase) | 71 | 70 |
| <i>E. coli frdB</i> (subunidade do complexo de enzimas fumarato redutase) | 73 | 72 |
| <i>E. coli ldhA</i> (lactato desidrogenase) | 77 | 76 |
| <i>E. coli adhE</i> (álcool desidrogenase) | 75 | 74 |
| <i>E. coli frdA</i> (subunidade do complexo de enzima fumarato redutase) | 91 | 90 |
| <i>E. coli frdC</i> (subunidade do complexo de enzima fumarato redutase) | 93 | 92 |
| <i>E. coli frdD</i> (subunidade do complexo de enzima fumarato redutase) | 95 | 94 |

TABELA 1B**NÚMEROS DE SEQ ID UTILIZADAS NAS CONSTRUÇÃO, PRIMERS E VETORES**

| Descrição | Nº SEQ ID: |
|----------------------------|------------|
| pRS425::GPM-sadB | 63 |
| Segmento GPM-sadB-ADHt | 21 |
| pUC19-URA3r | 22 |
| 114117-11A | 23 |
| 114117-11B | 24 |
| 114117-11C | 25 |
| 114117-11D | 26 |
| 114117-13A | 27 |
| 114117-13B | 28 |
| 112590-34F | 29 |
| 112590-34G | 30 |
| 112590-34H | 31 |
| 112590-49E | 32 |
| Segmento <i>ilvD-FBA1t</i> | 33 |
| 114117-27A | 34 |
| 114117-27B | 35 |
| 114117-27C | 36 |
| 114117-27D | 37 |
| 114117-36D | 38 |
| 135 | 39 |
| 112590-30F | 40 |
| URA3r2 <i>template</i> | 41 |
| 114117-45A | 42 |
| 114117-45B | 43 |
| PDC5::KanMXF | 44 |
| PDC5::KanMXR | 45 |
| PDC5kofor | 46 |
| N175 | 47 |
| Plasmídeo pLH475-Z4B8 | 48 |
| Promotor CUP1 | 49 |
| Terminador CYC1 CYC1-2 | 50 |
| Promotor ILV5 | 51 |
| Terminador ILV5 | 52 |
| Promotor FBA1 | 53 |
| Terminador CYC1 | 54 |
| Plasmídeo pLH468 | 55 |
| Vetor pNY8 | 58 |
| Promotor GPD1 | 59 |

| Descrição | Nº SEQ ID: |
|----------------------------|------------|
| Fragmento do promotor GPD1 | 60 |
| OT1068 | 61 |
| OT1067 | 62 |
| Promotor GPM1 | 64 |
| Terminador ADH1 | 65 |
| OT1074 | 66 |
| OT1075 | 67 |
| pRS423 FBA ilvD(Strep) | 68 |
| Terminador FBA | 69 |
| <i>pflB CkUp</i> | 78 |
| <i>pflB CkDn</i> | 79 |
| <i>frdB CkUp</i> | 80 |
| <i>frdB CkDn</i> | 81 |
| <i>ldhA CkUp</i> | 82 |
| <i>ldhA CkDn</i> | 83 |
| <i>adhE CkUp</i> | 84 |
| <i>adhE CkDn</i> | 85 |
| N473 | 86 |
| N469 | 87 |
| N695A | 88 |
| N695B | 89 |

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos para a recuperação de butanol a partir de um meio de fermentação microbiano compreendendo pelo menos um eletrólito pela extração em um extrator orgânico imiscível em água para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol. O eletrólito está presente no meio de fermentação em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação. A fase orgânica contendo butanol é separada da fase aquosa e o butanol pode ser recuperado. Também são fornecidos métodos para a produção de butanol.

DEFINIÇÕES

As definições a seguir são usadas na presente divulgação.

O termo “eletrólito” refere-se a um soluto que ioniza ou dissocia em uma solução aquosa e pode funcionar como um condutor iônico.

5 O termo “butanol” refere-se a 1-butanol, 2-butanol e/ou isobutanol, individualmente ou como misturas destes.

O termo “imiscível em água” refere-se a um componente químico, tal como um extrator ou solvente, que é incapaz de se misturar com uma solução aquosa, tal como um caldo de fermentação, de maneira a formar uma
10 fase líquida.

O termo “extrator” conforme utilizado no presente refere-se a um ou mais solventes orgânicos que são utilizados para extrair o butanol a partir de um caldo de fermentação.

O termo “meio de fermentação bifásico” refere-se a um meio de
15 crescimento de duas fases compreendendo um meio de fermentação (ou seja, uma fase aquosa) e uma quantidade adequada de um extrator orgânico imiscível em água.

O termo “fase orgânica” conforme utilizado no presente, refere-se a fase não aquosa de uma mistura bifásica obtida pelo contato de um caldo de
20 fermentação com um extrator orgânico imiscível em água.

O termo “fase aquosa” conforme utilizado no presente, refere-se a fase de uma mistura bifásica, obtida pelo contato de um meio de fermentação aquoso com um extrator orgânico imiscível em água, que compreende água.

O termo “remoção do produto *in situ*”, conforme utilizado no
25 presente, significa a remoção seletiva de um produto da fermentação específico a partir de um processo biológico, tal como a fermentação para controlar a concentração do produto no processo biológico.

O termo “caldo de fermentação” conforme utilizado no presente

significa a mistura de água, açúcares, sólidos dissolvidos, sólidos em suspensão, micro-organismos que produzem butanol, produto butanol e todos os outros constituintes do material existente no recipiente de fermentação em que butanol produto está sendo produzido pela reação de açúcares em butanol, água e dióxido de carbono (CO_2) pelos micro-organismos presentes. O caldo de fermentação pode compreender uma ou mais fontes de carbono fermentáveis, como os açúcares descritos no presente. O caldo de fermentação é a fase aquosa na extração fermentativa bifásica. De vez em quando, conforme utilizado no presente, o termo “meio de fermentação” pode ser usado como sinônimo de “caldo de fermentação”.

O termo “recipiente de fermentação” ou apenas “recipiente” conforme utilizado no presente, significa o recipiente no qual a reação de fermentação, através do qual o produto butanol é produzido a partir de açúcares, é realizado. O termo “fermentador” pode ser usado como sinônimo do termo “recipiente de fermentação”.

O termo “fonte de carbono fermentável” refere-se a uma fonte de carbono capaz de ser metabolizada pelos micro-organismos divulgados no presente. Fontes de carbono fermentáveis adequadas incluem, mas não estão limitadas a, monossacarídeos, como a glicose ou frutose; dissacarídeos, como a lactose ou sacarose; oligossacarídeos; polissacarídeos, como o amido, celulose; substratos de um carbono; e uma combinação destes, que podem ser encontrados no meio de fermentação. Fontes de carbono fermentáveis incluem carbono renovável, que é carbono obtido por outras fontes não provenientes do petróleo, incluindo o carbono de matérias-primas agrícolas, algas, celulose, hemicelulose, lignocelulose, ou qualquer combinação das mesmas.

O termo “ácido graxo” conforme utilizado na presente invenção refere-se a um ácido carboxílico possuindo uma cadeia alifática, longa, de C_7 a C_{22} átomos de carbono que é saturado ou insaturado.

O termo "álcool graxo" conforme utilizado na presente invenção refere-se a um álcool possuindo uma cadeia alifática longa de C_7 a C_{22} átomos de carbono que é saturado ou insaturado.

O termo "aldeído graxo" conforme utilizado na presente invenção
5 refere-se a um aldeído possuindo uma cadeia alifática longa de C_7 a C_{22} átomos de carbono que é saturado ou insaturado.

O termo "amida graxa" conforme utilizado na presente invenção refere-se a uma amida possuindo uma cadeia alifática longa de C_{12} a C_{22} átomos de carbono que é saturada ou insaturada.

10 O termo "coeficiente de partição", abreviado no presente como K_p , significa a relação entre a concentração de um composto em duas fases de uma mistura de dois solventes imiscíveis em equilíbrio. Um coeficiente de partição é uma medida da solubilidade diferencial de um composto entre dois solventes imiscíveis. Conforme usado no presente, o "coeficiente de partição
15 para o butanol" refere-se à relação de concentrações de butanol entre a fase orgânica compreendendo o extrator e a fase aquosa compreendendo o meio de fermentação. O coeficiente de partição, conforme utilizado no presente, é sinônimo do termo coeficiente de distribuição.

O termo "separação" conforme utilizado no presente é sinônimo
20 de "recuperação" e refere-se a remoção de um composto químico a partir de uma mistura inicial para obter o composto em maior pureza ou maior concentração do que a pureza ou concentração do composto na mistura inicial.

O termo "via biossintética do butanol" conforme utilizado no presente refere-se a uma via enzimática para a produção de 1-butanol, 2-
25 butanol ou isobutanol.

O termo "via biossintética do 1-butanol" conforme utilizado no presente, refere-se a uma via enzimática para a produção de 1-butanol a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA).

O termo “via biossintética do 2-butanol” conforme utilizado no presente, refere-se a uma via enzimática para a produção de 2-butanol a partir do piruvato.

O termo “via biossintética do isobutanol” conforme utilizado no presente, refere-se a uma via enzimática para a produção de isobutanol a partir do piruvato.

O termo “título efetivo” conforme utilizado na presente invenção, refere-se à quantidade total de butanol produzida pela fermentação por litro de meio de fermentação. A quantidade total de butanol inclui: (i) a quantidade de butanol no meio de fermentação; (ii) a quantidade de butanol recuperada a partir do extrator orgânico; e (iii) a quantidade de butanol recuperada a partir da fase gasosa, se a dessorção gasosa é utilizada.

O termo “taxa efetiva” conforme utilizado na presente invenção, refere-se à quantidade total de butanol produzida pela fermentação por litro de meio de fermentação por hora de fermentação.

O termo “rendimento efetivo” conforme utilizado no presente, refere-se à quantidade de butanol produzida por unidade de substrato de carbono fermentável consumida pelo biocatalisador.

O termo “condições aeróbias”, conforme usado na presente invenção, significa condições de crescimento na presença de oxigênio.

O termo “condições microaeróbias”, conforme usado na presente invenção, significa condições de crescimento com baixos níveis de oxigênio (ou seja, abaixo dos níveis normais de oxigênio atmosférico).

O termo “condições anaeróbias”, conforme usado na presente invenção, significa condições de crescimento na ausência de oxigênio.

O termo “meio mínimo”, conforme utilizado no presente, refere-se a meios de crescimento que possuem o mínimo de nutrientes possíveis para o crescimento, geralmente sem a presença de aminoácidos. Um meio mínimo

geralmente contém uma fonte de carbono fermentável e vários sais, que podem variar entre os micro-organismos e as condições de crescimento, estes sais geralmente fornecem elementos essenciais, como magnésio, nitrogênio, fósforo e enxofre, para permitir que o micro-organismo sintetize proteínas e
5 ácidos nucleicos.

O termo "meio definido" conforme utilizado no presente, refere-se a meios de crescimento que possuem quantidades conhecidas de todos os ingredientes presentes, por exemplo, uma fonte de carbono e fonte de nitrogênio definidas, e oligoelementos e vitaminas necessárias para o micro-
10 organismo.

O termo "biocompatibilidade" conforme utilizado no presente refere-se à medida da capacidade de um micro-organismo utilizar a glicose na presença de um extrator. Um extrator biocompatível permite que o micro-organismo utilize a glicose. Um extrator não biocompatível (ou seja, biotóxico)
15 não permite que o micro-organismo utilize a glicose, por exemplo, a uma taxa maior do que cerca de 25% da taxa quando o extrator não está presente.

O termo, "°C" significa graus Celsius.

O termo "OD" significa densidade óptica.

O termo "OD₆₀₀" refere-se a densidade óptica no comprimento de
20 onda de 600 nm.

O termo "ATCC", conforme utilizado no presente, refere-se a Coleção Americana de Culturas de Tipo "*American Type Culture Collection*", Manassas, VA.

O termo "sec" significa segundo(s).

25 O termo "min" significa minuto(s).

O termo "h" significa hora(s).

O termo "mL" significa mililitro(s).

O termo "L" significa litro(s).

O termo "g" significa gramas.

O termo "mmol" significa milimol(es).

O termo "M" significa molar.

O termo "μl" significa microlitro.

5 O termo "μg" significa micrograma.

O termo "μg/mL" significa micrograma por ~~litro~~ mililitro.

O termo "mL/min" significa mililitros por minuto.

O termo "g/L" significa grama por litro.

O termo "g/L/h" significa grama por litro por hora.

10 O termo "mmol/min/mg" significa milimoles por minuto por miligrama.

O termo "temp" significa temperatura.

O termo "rpm" significa rotações por minuto.

15 O termo "HPLC" significa cromatografia gasosa líquida de alta pressão.

O termo "GC" significa cromatografia gasosa.

Todas as publicações, patentes, pedidos de patentes, e outras referências mencionadas na presente invenção são expressamente e integralmente incorporadas ao presente pela referência para todos os fins.

20 Além disso, quando uma quantidade, concentração ou outro valor ou parâmetro é dado como um intervalo, faixa preferida, ou uma lista de valores superiores preferíveis e valores inferiores preferíveis, estes devem ser compreendidos como sendo divulgados especificamente em todos os intervalos formados a partir de qualquer par de qualquer intervalo de limites superiores ou valores

25 preferenciais e inferiores ou valores preferenciais, independentemente dos intervalos estarem ou não divulgados separadamente. Se um intervalo de valores numéricos é recitado no presente, salvo quando indicado de outra forma, o intervalo pretende incluir os pontos finais do mesmo, e todos os

números inteiros e frações dentro do intervalo. Não é pretendido que o escopo da invenção seja limitado aos valores específicos recitados quando um intervalo é definido.

MICRO-ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

5 Hospedeiros microbianos para a produção de butanol podem ser selecionados a partir de bactérias, cianobactérias, fungos filamentosos e leveduras. O hospedeiro microbiano utilizado deve ser tolerante ao produto butanol produzido, para que o rendimento não seja limitado pela toxicidade do produto para o hospedeiro. A seleção de um hospedeiro microbiano para a
10 produção do butanol está detalhadamente descrita abaixo.

Os micróbios que são metabolicamente ativos em altos níveis de título de butanol não são bem conhecidos no estado da técnica. Embora os mutantes tolerantes ao butanol tenham sido isolados a partir de Clostrídios solventogênicos, existe pouca informação disponível sobre a tolerância ao
15 butanol de outras as cepas bacterianas potencialmente úteis. A maioria dos estudos sobre a comparação entre a tolerância ao álcool em bactérias sugerem que o butanol é mais tóxico do que o etanol (de Cavalho *et al. Microsc. Res. Tech.* 64:215-22 (2004) e Kabelitz *et al. FEMS Microbiol. Lett.* 220:223-227 (2003)). Tomas *et al. (J. Bacteriol.* 186:2006-2018 (2004)) descreveram que o
20 rendimento de 1-butanol durante a fermentação do *Clostridium acetobutylicum* pode ser limitado pela toxicidade do butanol. O principal efeito do 1-butanol sobre o *Clostridium acetobutylicum* é a interrupção das funções de membrana (Hermann *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 50:1238-1243 (1985)).

Os hospedeiros microbianos selecionados para a produção de
25 butanol devem ser tolerantes ao butanol e devem ser capazes de converter carboidratos em butanol utilizando uma via biossintética introduzida, tal como a via descrita abaixo. Os critérios para a seleção dos hospedeiros microbianos apropriados incluem os seguintes: Tolerância intrínseca ao butanol, alta taxa de

utilização de carboidratos, disponibilidade de ferramentas genéticas para a manipulação gênica, e capacidade de gerar alterações cromossômicas estáveis.

As cepas hospedeiras adequadas com uma tolerância ao butanol
5 podem ser identificadas pela triagem com base na tolerância intrínsecas da cepa. A tolerância intrínseca de micróbios ao butanol pode ser mensurada pela determinação da concentração de butanol que é responsável por 50% de inibição da taxa de crescimento (IC_{50}) quando cultivados em meio mínimo. Os valores IC_{50} podem ser determinados usando métodos conhecidos no estado
10 da técnica. Por exemplo, os micróbios de interesse podem ser cultivados na presença de várias quantidades de butanol e a taxa de crescimento monitorada por meio da medição da densidade óptica em 600 nanômetros. O tempo de duplicação pode ser calculado a partir da parte logarítmica da curva de crescimento e utilizada como uma medida da taxa de crescimento. A
15 concentração de butanol, que produz 50% de inibição do crescimento pode ser determinada a partir de um gráfico de percentagem de inibição de crescimento em função da concentração de butanol. Preferencialmente, a cepa hospedeira deve ter um valor IC_{50} para o butanol maior que cerca de 0,5%. Mais adequado é uma cepa hospedeira com um IC_{50} para o butanol que é maior que cerca de
20 1,5%. Especialmente adequado é uma cepa hospedeira com um IC_{50} para o butanol que é maior que cerca de 2,5%.

Os hospedeiros microbianos para a produção de butanol também devem utilizar a glicose e/ou outros carboidratos em uma taxa elevada. A maioria dos micróbios é capaz de utilizar carboidratos. No entanto, certos
25 micróbios ambientais não podem utilizar carboidratos eficientemente e, portanto, não seriam hospedeiros adequados.

A capacidade de modificar geneticamente o hospedeiro é essencial para a produção de qualquer micro-organismo recombinante. Modos

de tecnologia de transferência gênica que podem ser usados incluem eletroporação, conjugação, transdução ou transformação natural. Uma ampla gama de plasmídeos conjugativos de hospedeiros e marcadores de resistência aos fármacos está disponível atualmente. Os vetores de clonagem usados com
 5 um organismo são adaptados ao organismo hospedeiro em função da natureza dos marcadores de resistência aos antibióticos que podem funcionar no mesmo hospedeiro.

O micro-organismo hospedeiro também pode ser manipulado de modo a inativar vias que competem pelo fluxo de carbono por meio da
 10 inativação de diversos genes. Isto exige a disponibilidade de *transposons* ou vetores de integração cromossômica para a inativação direta. Além disso, os hospedeiros de produção que são passíveis de mutagênese química podem sofrer melhorias na tolerância intrínseca ao butanol por meio da mutagênese química e seleção de mutantes.

15 Como um exemplo de inativação de vias concorrentes de fluxo de carbono, a piruvato Descarboxilase pode ser reduzida ou eliminada (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Publicado US 20090305363). Em realizações, o butanol é o principal produto do micro-organismo. Em realizações, o micro-organismo não produz acetona.

20 Com base nos critérios descritos acima, hospedeiros microbianos adequados para a produção de butanol incluem, mas não estão limitados a, membros dos gêneros *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*,
 25 *Brevibacterium*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia* e *Saccharomyces*. Hospedeiros preferidos incluem: *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus*

faecium, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Os micro-organismos mencionados acima podem ser
5 geneticamente modificados para converter fontes de carbono fermentáveis em
butanol, especificamente em 1-butanol, 2-butanol ou isobutanol, usando
métodos conhecidos no estado da técnica. Os micro-organismos adequados
incluem *Escherichia*, *Lactobacillus*, e *Saccharomyces*. Os micro-organismos
adequados incluem *E. coli*, *L. plantarum* e *S. cerevisiae*. Além disso, o micro-
10 organismo pode ser uma cepa tolerante ao butanol de um dos micro-
organismos listados acima, que é isolado utilizando o método descrito por
Bramucci *et al.* (Pedido de Patente US 11/761497 e WO 2007/146377). Um
exemplo de tal cepa é o *Lactobacillus plantarum* cepa PN0512 (ATCC: PTA-
7727, depósito biológico feito em 12 de julho de 2006 para o pedido de Patente
15 US 11/761497).

As vias biossintéticas adequadas para a produção de butanol são
conhecidas no estado da técnica, e algumas vias adequadas são descritas no
presente. Em exemplos de realizações, a via biossintética do butanol
compreende pelo menos um gene que é heterólogo para a célula hospedeira.
20 Em alguns exemplos de realizações, a via biossintética do butanol compreende
mais do que um gene que é heterólogo para a célula hospedeira. Em alguns
exemplos de realização, a via biossintética do butanol compreende genes
heterólogos codificando polipeptídeos correspondentes a cada etapa de uma
via biossintética.

25 Da mesma forma, certas proteínas adequadas possuindo a
capacidade de catalisar o substrato indicado para conversões de produtos são
descritas no presente e outras proteínas adequadas são fornecidas no estado
da técnica. Por exemplo, os Pedidos de Patente Publicados US 20080261230,

US 20090163376, e US 20100197519 descrevem as ácido acetohidroxi isomeroeductases assim como o pedido US 12/893077, depositado em 29 de Setembro de 2010; o Pedido de Patente Publicado US 20100081154 descreve dihidroxi-ácido desidratases; as álcool desidrogenases são descritas no Pedido de Patente Publicado US20090269823 e Pedido Provisório de Patente US 61/290636.

Os micro-organismos podem ser geneticamente modificados para conter uma via biossintética do 1-butanol para produzir 1-butanol. As modificações adequadas incluem aquelas descritas por Donaldson *et al.* no documento WO 2007/041269. Por exemplo, o micro-organismo pode ser geneticamente modificado para expressar uma via biossintética do 1-butanol compreendendo os seguintes substratos catalisados por enzimas para as conversões de produtos:

- a) acetil-CoA em acetoacetil-CoA;
- b) acetoacetil-CoA em 3-hidroxibutiril-CoA;
- c) 3-hidroxibutiril-CoA em crotonil-CoA;
- d) crotonil-CoA em butiril-CoA;
- e) butiril-CoA em butiraldeído; e
- f) butiraldeído em a-butanol.

Os micro-organismos também podem ser geneticamente modificados para expressarem uma via biossintética do 2-butanol para produzir 2-butanol. As modificações adequadas incluem as descritas por Donaldson *et al.* nas publicações de Pedidos de Patente US 2007/0259410 e US 2007/0292927, e no Pedido PCT WO2007/130518 e WO2007/130521. Por exemplo, em um exemplo de realização, o micro-organismo pode ser geneticamente modificado para expressar uma via biossintética do 2-butanol compreendendo os seguintes substratos catalisados por enzimas para as conversões de produtos:

- a) piruvato em alfa-acetolactato;
- b) alfa-acetolactato em acetoína;
- c) acetoína em 2,3-butanodiol;
- d) 2,3-butanodiol em 2-butanona; e
- e) 2-butanona em 2-butanol.

5

Os micro-organismos também podem ser geneticamente modificados para expressarem uma via biossintética do isobutanol para produzir isobutanol. As modificações adequadas incluem aquelas descritas por Donaldson *et al.* no Pedido de Patente US 2007/0092957 e documento WO

10

- a) piruvato em acetolactato;
- b) acetolactato em 2,3-dihidroxiisovalerato;
- c) 2,3-dihidroxiisovalerato em α -cetoisovalerato;
- d) α -cetoisovalerato em isobutiraldeído; e
- e) isobutiraldeído em isobutanol.

15

A cepa *Escherichia coli* pode compreender: (a) uma via biossintética do isobutanol codificadas pelos seguintes genes: *budB* (SEQ ID NO: 1) da *Klebsiella pneumoniae* que codifica a acetolactato sintase (dado como SEQ ID NO: 2), *ilvC* (dado como SEQ ID NO: 3) da *E. coli* que codifica a ácido acetohidróxi reductoisomerase (dado como SEQ ID NO : 4), *ilvD* (dado como SEQ ID NO: 5) da *E. coli* que codifica a ácido acetohidróxi desidratase (dado como SEQ ID NO: 6), *kivD* (dado como SEQ ID NO: 7) do *Lactococcus lactis* que codifica a cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada (dado como SEQ ID NO: 8), e *sadB* (dado como SEQ ID NO: 9) da *Achromobacter xylosoxidans* que codifica a butanol desidrogenase (dado como SEQ ID NO: 10). As enzimas codificadas pelos genes da via biossintética do isobutanol

25

catalisam o substrato para conversões de produto para a conversão do piruvato em isobutanol, conforme descrito acima. Especificamente, a acetolactato sintase catalisa a conversão do piruvato em acetolactato, a ácido acetohidróxi reductoisomerase catalisa a conversão de acetolactato em 2,3-
 5 dihidroxiisovalerato, a ácido acetohidróxi desidratase catalisa a conversão de 2,3-dihidroxiisovalerato em α -cetoisovalerato, a cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada catalisa a conversão de α -cetoisovalerato em isobutiraldeído e a butanol desidrogenase catalisa a conversão de isobutiraldeído em isobutanol. Essa cepa recombinante de *Escherichia coli* pode ser construída
 10 usando métodos conhecidos no estado da técnica (vide as Publicações dos Pedidos de Patentes copendentes US 12/478.389 e 12/477.946) e/conforme descrito abaixo. Contempla-se que as cepas adequadas podem ser construídas compreendendo uma sequência que possui cerca de pelo menos 70-75% de identidade, cerca de pelo menos 75-80% de identidade, e cerca de pelo menos
 15 80-85% de identidade, ou pelo menos, 85-90% de identidade com as sequências de proteínas descritas no presente.

A cepa de *Escherichia coli* pode compreender deleções dos seguintes genes para eliminar vias concorrentes que limitam a produção de isobutanol, *pflB* dado como SEQ ID NO: 71 (que codifica a piruvato formato
 20 liase), *ldhA*, dado como SEQ ID NO: 73, (que codifica a lactato desidrogenase), *adhE*, dado como SEQ ID NO: 77 (que codifica a álcool desidrogenase), e pelo menos um gene que compreende o óperon *frdABCD* (que codifica a fumarato redutase), especificamente, *frdA*, dado como SEQ ID NO: 90, *frdB*, dado como SEQ ID NO: 75, *frdC* dado como SEQ ID NO: 92, e *frdD*, dado como SEQ ID
 25 NO: 94.

A cepa *Saccharomyces cerevisiae* pode compreender: uma via biossintética do isobutanol codificada pelos seguintes genes: Região codificante *alsS* do *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO: 11) que codifica a acetolactato

sintase (SEQ ID NO: 12), *ILV5* da *S. cerevisiae* (SEQ ID NO: 13) que codifica a
 ácido acetohidróxi reductoisomerase (KARI; SEQ ID NO: 14) e/ou um KARI
 mutante como aquele codificado pelo *Pf5.IlvC-Z4B8* (SEQ ID NO: 15; proteína
 SEQ ID NO: 16), *ilvD* de *Streptococcus mutans* (SEQ ID NO: 17) que codifica a
 5 ácido acetohidróxi desidratase (SEQ ID NO: 18), *kivD* de *Bacillus subtilis*
 (códon otimizado dado como a SEQ ID NO: 19) que codifica a ceto ácido
 descarboxilase de cadeia ramificada (SEQ ID NO: 20), e *sadB* de
Achromobacter xylosoxidans (SEQ ID NO: 9) que codifica uma butanol
 desidrogenase (SEQ ID NO: 10). As enzimas codificadas pelos genes da via
 10 biossintética do isobutanol catalisam o substrato para conversões de produto
 para a conversão do piruvato em isobutanol, conforme descrito no presente.
 Contempla-se que as cepas adequadas podem ser construídas
 compreendendo uma sequência que possui cerca de pelo menos 70-75% de
 identidade, cerca de pelo menos 75-80% de identidade, e cerca de pelo menos
 15 80-85% de identidade, ou pelo menos, 85-90% de identidade com as
 sequências de proteínas descritas no presente.

Uma cepa de levedura que expressa uma via do isobutanol com
 atividade acetolactato sintetase (ALS) no citosol e com deleções dos genes da
 piruvato-descarboxilase endógena (PDC) está descrita no Pedido de Patente
 20 US 12/477942. Esta combinação de ALS citosólica e expressão reduzida de
 PDC revelou aumentar significativamente o fluxo de piruvato para acetolactato,
 que então flui para a via de produção do isobutanol. Tal cepa recombinante de
Saccharomyces cerevisiae pode ser construída usando os métodos conhecidos
 no estado da técnica e/ou descritos no presente. Outras cepas de levedura
 25 adequadas são conhecidas no estado da técnica. Exemplos adicionais são
 fornecidos nos Pedidos Provisórios US 61/379546, US 61/380563, e Pedido US
 12/893089.

Modificações adicionais adequadas para os micro-organismos

usados em conjunto com os processos fornecidos incluem modificações que reduzem a glicerol-3-fosfato desidrogenase, conforme descrito na Publicação do Pedido de Patente US 20090305363, modificações em uma célula hospedeira que fornece fluxo de carbono através de um aumento da via Entner-Doudoroff ou redução do equilíbrio de equivalentes tal como descrito na Publicação do Pedido de Patente US 20100120105. As cepas de levedura com atividade aumentada de proteínas heterólogas que requerem a ligação de um centro Fe-S para a sua atividade estão descritas na Publicação do Pedido de Patente US 20100081179. Outras modificações incluem as modificações em um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo possuindo papel duplo na atividade hexoquinase, descrito no Pedido Provisório US 61/290639, e a integração de pelo menos um polinucleotídeo codificante de um polipeptídeo que catalisa uma etapa em uma via biossintética que utiliza o piruvato descrito no Pedido Provisório US 61/380563.

Além disso, as células hospedeiras compreendendo pelo menos uma deleção, mutação e/ou substituição de um gene endógeno que codifica um polipeptídeo que afeta a biossíntese de centros Fe-S estão descritas nos Pedido Provisório de Patente US 1/305333, e células hospedeiras compreendendo um polinucleotídeo heterólogo codificante de um polipeptídeo com atividade fosfoacetolase e células hospedeiras compreendendo um polinucleotídeo heterólogo codificante de um polipeptídeo com atividade fosfotransacetilase estão descritas no Pedido Provisório de Patente US 61/356379.

CONSTRUÇÃO DE UMA CEPA DE LEVEDURA ADEQUADA

A NGI-049 é um exemplo de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* adequada. A NGI-049 é uma cepa com inserção-inativação de genes *PDC1*, *PDC5* e *PDC6* endógenos, contendo os vetores de expressão pLH475-Z4B8 e pLH468. Os genes *PDC1*, *PDC5* e *PDC6* codificam as três

principais isoenzimas da piruvato descarboxilase. A cepa expressa genes que codificam enzimas para uma via biossintética do isobutanol que são integradas ou estão em plasmídeos. A construção da cepa NGI-049 é fornecida no presente.

5 A atividade piruvato descarboxilase endógena na levedura converte o piruvato em acetaldeído, que é então convertido em etanol ou em acetil-CoA através do acetato. Portanto, a atividade piruvato descarboxilase endógena é um alvo para redução ou eliminação da formação de subproduto.

Exemplos de outras cepas de leveduras com atividade piruvato
10 descarboxilase reduzida devido a interrupção de genes que codificam a piruvato descarboxilase foram descritos para a *Saccharomyces* em Flikweert *et al.* (*Yeast* (1996) 12:247-257), para a *Kluyveromyces* em Bianchi *et al.* (*Mol. Microbiol.* (1996) 19 (1) :27-36), e a interrupção do gene regulador em Hohmann, (*Mol Gen Genet.* (1993) 241:657-666). As cepas de *Saccharomyces*
15 que não possuem atividade piruvato-decarboxilase estão disponíveis pela ATCC (Nº de acesso #200027 e #200028).

CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE INTEGRAÇÃO PDC6::GPM1-SADB E DELEÇÃO DE PDC6

Um cassete de integração *pdv6::GPM1p-sadB-ADH1t-URA3r* foi
20 feito pela união do segmento *GPM-sadB-ADHt* (SEQ ID NO: 21) do pRS425::*GPM-sadB* (SEQ ID NO: 63) com o gene *URA3r* do pUC19-*URA3r*. O pUC19-*URA3r* (SEQ ID NO: 22) contém o marcador *URA3* do pRS426 (ATCC # 77107) flanqueado por 75 pb de sequências de repetições homólogas para permitir a recombinação homóloga *in vivo* e remoção do marcador *URA3*. Os
25 dois segmentos de DNA foram unidos por SOE-PCR (conforme descrito por Horton *et al* (1989) *Gene* 77:61-68.) utilizando como molde os DNAs plasmidiais do pRS425::*GPM-sadB* e pUC19-*URA3r*, com a polimerase "Phusion DNA polimerase" (New England Inc. Biolabs, Beverly, MA; catálogo F-

540S) e *primers* 114117-11A até 114117-11D (SEQ ID NOs: 23, 24, 25 e 26), e 114117-13A e 114117-13B (SEQ ID NOs: 27 e 28).

Os *primers* externos para a SOE PCR (114117-13A e 114117-13B) continham regiões homólogas 5' e 3' de ~ 50 bp a montante e a jusante do promotor e terminador PDC6, respectivamente. O fragmento do cassete de PCR completo foi transformado em BY4700 (ATCC # 200866) e os transformantes foram mantidos em meio sintético completo sem uracila e suplementado com 2% de glicose a 30 °C por técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201-202). Os transformantes foram triados por PCR usando os *primers* 112590-34G e 112590-34H (SEQ ID NOs: 30 e 31), e 112590-34F e 112590-49E (SEQ ID NOs: 29 e 32) para verificar a integração no *locus* PDC6 com a deleção da região codificante de PDC6. O marcador *URA3r* foi reciclado pelo plaqueamento em meio completo sintético suplementado com 2% de glicose e 5-FOA, a 30 °C seguindo os protocolos-padrão.

A remoção dos marcadores foi confirmada pelo plaqueamento de colônias a partir de placas 5-FOA em meio SD-URA para verificar a ausência de crescimento. A cepa resultante identificada tinha o genótipo: BY4700 *cdc6::P_{GPM1}-sadB-ADH1t*.

CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE INTEGRAÇÃO PDC1::PDC1-ILVD E DELEÇÃO DE PDC1

Um cassete de integração *cdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t-URA3r* foi feito pela junção do segmento *ilvD-FBA1t* (SEQ ID NO: 33) a partir do pLH468 com o gene *URA3r* do pUC19-URA3r por meio da SOE PCR (conforme descrito por Horton *et al* (1989) *Gene* 77:61-68), utilizando como molde os DNAs plasmidiais do pLH468 e pUC19-URA3r, com a DNA polimerase "Phusion DNA polimerase" (New England Biolabs Inc., Beverly, MA;.. catálogo

F-540S) e *primers* 114117-27A até 114117-27D (SEQ ID NOs: 34, 35, 36 e 37).

Os *primers* externos para a SOE PCR (114117-27A e 114117-27D) continham regiões homólogas 5' e 3' de ~ 50 bp a jusante do promotor *PDC1* e a jusante da região de codificação de *PDC1*. O fragmento do cassete PCR completo foi transformado em BY4700 *cdc6::P_{GPM1}-sadB-ADH1t* e os transformantes foram mantidos em meio sintético completo sem uracila e suplementado com 2% de glicose a 30 °C por técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201-202). Os transformantes foram analisados por PCR usando os *primers* 114117-36D e 135 (SEQ ID NOs: 38 e 39), e *primers* 112590-49E e 112590-30F (SEQ ID NOs: 32 e 40) para verificar a integração no *locus* de *PDC1* com a deleção da região codificante de *PDC1*. O marcador *URA3r* foi reciclado pelo plaqueamento em meio completo sintético suplementado com 2% de glicose e 5-FOA, a 30 °C seguindo os protocolos-padrão. A remoção dos marcadores foi confirmada pelo plaqueamento de colônias a partir de placas 5-FOA em meio SD-URA para verificar a ausência de crescimento. A cepa resultante identificada "NYLA67" tinha o genótipo: BY4700 *cdc6::GPM1p-sadB-ADH1t cdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t*.

DELEÇÃO DE HIS3

Para deletar a região endógena codificadora de *HIS3*, um cassete *his3::URA3r2* foi amplificado por PCR a partir do DNA molde de *URA3r2* (SEQ ID NO: 41). O *URA3r2* contém o marcador *URA3* do pRS426 (ATCC # 77107) flanqueado por 500 pb de sequências de repetições homólogas para permitir a recombinação homóloga *in vivo* e remoção do marcador *URA3*. A PCR foi realizada utilizando a DNA polimerase "Phusion DNA polimerase" e os *primers* 114117-45A e 114117-45B (SEQ ID NOs: 42 e 43) para gerar um produto da PCR de ~ 2,3 kb. A porção *HIS3* de cada *primer* foi derivada da região 5' a montante do promotor *HIS3* e região 3' a jusante da região codificante, de tal

forma que a integração do marcador *URA3r2* resulta na substituição da região codificante de *HIS3*. O produto da PCR foi transformado em NYLA67 usando técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201-202), e os transformantes foram selecionados em meio completo sintético sem uracila e suplementado com 2% de glicose a 30 °C. Os transformantes foram selecionados para verificar a correta integração pela replicação de transformantes em placas com meio completo sintético sem histidina e suplementado com 2% de glicose a 30 °C. O marcador *URA3r* foi reciclado pelo plaqueamento em meio completo sintético suplementado com 2% de glicose e 5-FOA, a 30 °C seguindo os protocolos-padrão. A remoção dos marcadores foi confirmada pelo plaqueamento de colônias a partir de placas 5-FOA em meio SD-URA para verificar a ausência de crescimento. A cepa resultante identificada "NYLA73" tinha o genótipo: BY4700 *pdv6::GPM1p-sadB-ADH1t pdv1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δhis3*.

CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE INTEGRAÇÃO PDC5::KANMX E DELEÇÃO DE PDC5

O cassete *pdv5::kanMX4* foi amplificado por PCR a partir do DNA cromossômico da cepa YLR134W (ATCC # 4034091), utilizando a DNA polimerase "Phusion DNA polimerase" e os primers *PDC5::KanMXF* e *PDC5::KanMXR* (SEQ ID NOs: 44 e 45), que gerou um produto da PCR de ~ 2.2 kb. A porção *PDC5* de cada primer foi derivada da região 5' a montante do promotor *PDC5* e região 3' a jusante da região codificante de tal forma que a integração do marcador *kanMX4* resultou na substituição da região codificante de *PDC5*. O produto da PCR foi transformado na NYLA73 usando técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201-202), e os transformantes foram selecionados em meio YP suplementado com 1% de etanol e geneticina (200 µg/mL) a 30 °C. Os transformantes foram analisados por PCR para

verificar a correta integração no locus PDC com a substituição da região codificante de *PDC5* utilizando os *primers* *PDC5kofo*r e N175 (SEQ ID NOs: 46 e 47). Os transformantes corretos identificados possuem o genótipo: BY4700 *pdv6::GPM1p-sadB-ADH1t pdv1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δhis3 pdv5::kanMX4*.

5

CONSTRUÇÃO DO PLH475-Z4B8

O plasmídeo pLH475-Z4B8 (SEQ ID NO: 48) foi construído para a expressão de ALS e KARI em levedura. O pLH475-Z4B8 é um vetor pHR81 (ATCC # 87541), contendo os seguintes genes quiméricos:

1) o promotor CUP1 (SEQ ID NO: 49), região codificante da acetolactato sintase do *Bacillus subtilis* (*AlsS*; SEQ ID NO: 11; proteína SEQ ID NO: 12) e terminador *CYC1* (*CYC1-2*; SEQ ID NO: 50);

2) promotor *ILV5* (SEQ ID NO: 51), região codificante do *Pf5.ilvC-Z4B8* (SEQ ID NO: 15; proteína SEQ ID NO: 16) e terminador *ILV5* (SEQ ID NO: 52); e

3) promotor *FBA1* (SEQ ID NO: 53), da região codificante da KARI de *S. cerevisiae* (*ILV5*; SEQ ID NO: 13; proteína SEQ ID NO: 14) e terminador *CYC1* (SEQ ID NO: 54).

A região codificante do *Pf5.ilvC-Z4B8* é uma sequência de codificação da KARI derivada da *Pseudomonas fluorescens*, mas contendo as mutações, que foram descritas no Pedido de Patente US20090163376. O *Pf5.ilvC-Z4B8* que codifica KARI (SEQ ID NO: 16;) tem as seguintes alterações de aminoácidos em comparação ao KARI natural da *Pseudomonas fluorescens*:

C33L: cisteína na posição 33 alterada para leucina,
R47Y: arginina na posição 47 alterada para tirosina,
S50A: serina na posição 50 alterada para alanina,
T52D: treonina na posição 52 alterada para asparagina,
V53A: valina na posição 53 alterada para alanina,

L61F: leucina na posição 61 alterada para fenilalanina,
 T80I: treonina na posição 80 alterada para isoleucina,
 A156V: alanina na posição 156 alterada para treonina, e
 G170A: glicina na posição 170 alterada para alanina.

5 A região codificante do *Pf5.IlvC-Z4B8* foi sintetizada por DNA 2.0 (Palo Alto, CA; SEQ ID NO: 15) com base nos códons que foram otimizados para a expressão em *Saccharomyces cerevisiae*.

VETOR DE EXPRESSÃO PLH468

O plasmídeo pLH468 (SEQ ID NO: 55) foi construído para a
 10 expressão de DHAD, KivD e HADH em levedura.

As regiões codificantes da cetoisovalerato descarboxilase (KivD) do *B. subtilis* e álcool desidrogenase hepática de cavalo (HADH) foram sintetizadas por DNA2.0 com base nos códons que foram otimizados para a expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 19 e 56,
 15 respectivamente) e fornecidos em plasmídeos pKivDy-DNA2.0 e pHadhy-DNA2.0. As proteínas codificadas são as SEQ ID NOs: 20 e 57, respectivamente. Vetores de expressão individuais para *KivD* e *HADH* foram construídos. Para montar o pLH467 (pRS426::P_{GPD1}-*kivDy*-GPD1t), o vetor pNY8 (SEQ ID NO: 58; também denominado de pRS426::GPD-ald-GPDt,
 20 descrito no pedido de Patente US20080182308, Exemplo 17), foi digerido com enzimas *AscI* e *SfiI*, excisando desse modo o promotor *GPD1* (SEQ ID NO: 59) e a região codificante *ald*. Um fragmento do promotor *GPD1* (GPD1-2; SEQ ID NO: 60) a partir do pNY8 foi amplificado por PCR para adicionar um sítio *AscI* na extremidade 5', e um sítio *SpeI* na extremidade 3' utilizando o *primer* 5'
 25 OT1068 e *primer* 3' OT1067 (SEQ ID NOs: 61 e 62). O fragmento do vetor pNY8 digerido com *AscI*/*SfiI* foi ligado com o produto da PCR do promotor *GPD1* digerido com *AscI* e *SpeI*, e o fragmento *SpeI*-*SfiI* contendo o códon otimizado da região codificante do *kivD* isolado do vector pKivD-DNA2.0. A

tripla ligação gerou o vetor pLH467 (pRS426::P_{GPD1}-*kivDy-GPD1t*). O pLH467 foi verificado por meio do mapeamento de restrição e sequenciamento.

O pLH435 (pRS425::P_{GPM1}-*Hadhy-ADH1t*) foi derivado do vetor pRS425::GPM-sadB (SEQ ID NO: 63), que é descrito no Pedido de Patente US12/477942, Exemplo 3. O pRS425::GPM-sadB é o vetor pRS425 (ATCC # 77106) com um gene quimérico contendo o promotor GPM1 (SEQ ID NO: 64), a região codificante de uma butanol desidrogenase do *Achromobacter xylosoxidans* (*sadB*; SEQ ID NO: 9; proteína SEQ ID NO: 10: divulgado na Publicação do Pedido de Patente US 20090269823), e o terminador ADH1 (SEQ ID NO: 65). O pRS425::GPMp-sadB contém sítios *BbvI* e *PacI* nas extremidades 5' e 3' da região codificante do *sadB*, respectivamente. Um sítio *NheI* foi adicionado na extremidade 5' da região codificante do *sadB* por mutagênese mediada por oligonucleotídeo (sítio-dirigida) utilizando os *primers* OT1074 e OT1075 (SEQ ID NO: 66 e 67) para gerar o vetor pRS425-GPMp-sadB-*NheI*, que foi verificado por sequenciamento. O pRS425::P_{GPM1}-*sadB-NheI* foi digerido com *NheI* e *PacI* para a retirada da região codificante do *sadB*, e ligado com o fragmento *NheI-PacI* contendo a região codificante do HADH códon otimizado a partir do vetor pHadhy-DNA2.0 para criar o pLH435.

Para combinar os cassetes de expressão KivD e HADH em um único vetor, o vetor de levedura pRS411 (ATCC # 87474) é digerido com *SacI* e *NotI*, e ligado com o fragmento *SacI-Sall* do pLH467 que contém o cassete P_{GPD1}-*kivDy-GPD1t* juntamente com o fragmento *Sall-NotI* do pLH435 que contém o cassete P_{GPM1}-*Hadhy-ADH1t* em uma reação de ligação tripla. Isto produziu o vetor pRS411::P_{GPD1}-*kivDy-P_{GPM1}-Hadhy* (pLH441), que pode ser verificado por meio do mapeamento de restrição.

A fim de gerar um vetor de coexpressão para todos os três genes da via do isobutanol inferior: *ilvD*, *kivDy* e *Hadhy*, nós utilizamos o pRS423 FBA *ilvD(Strep)* (SEQ ID NO: 68), que está descrito no Pedido de Patente US

12/569636 como a fonte do gene *ilvD*. Este vetor transportador contém uma origem de replicação F1 (nt 1423-1879) para manutenção em *E. coli* e uma origem 2 micron (nt 8082-9426) para a replicação em levedura. O vetor tem um promotor FBA (nt 2111-3108; SEQ ID NO: 53) e terminador FBA (nt 4861-5860; SEQ ID NO: 69). Além disso, ele carrega o marcador His (nt 504-1163) para seleção em levedura e marcador de resistência a ampicilina (nt 7092-7949) para seleção em *E. coli*. A região de codificação do *ilvD* (nt 3116-4828; SEQ ID NO: 17; proteína SEQ ID NO: 18) de *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC # 700610) está entre o promotor FBA e o terminador FBA formando um gene quimérico para a expressão. Além disso, existe um marcador "tag lumio" fundido na região de codificação do *ilvD* (nt 4829-4849).

A primeira etapa foi linearizar o pRS423 FBA *ilvD*(Strep) (também denominado de pRS423-FBA(*SpeI*)-*ilvD*(*Streptococcus mutans*)-Lumio) com *SacI* e *SacII* (com o sítio *SacII* terminando em extremidades cegas utilizando a T4 DNA polimerase), para formar um vetor com comprimento total de 9.482 pb. A segunda etapa foi isolar o cassete *kivDy-hADHy* do pLH441 com *SacI* e *KpnI* (com o sítio *KpnI* formando extremidades cegas usando a T4 DNA polimerase), que formou um fragmento de 6063 pb. Este fragmento foi ligado com o fragmento de 9482 bp do vetor pRS423-FBA(*SpeI*)-*ilvD* (*Streptococcus mutans*)-Lumio. Esse vetor gerado pLH468 (*pRS423::P_{FBA1}-ilvD*(Strep) Lumio-*FBA1t-P_{GPD1}-kivDy-GPD1t-PGPM1-hadhy-ADH1t*), foi confirmado por mapeamento de restrição e sequenciamento.

Os vetores plasmidiais pLH468 e pLH475-Z4B8 foram transformados simultaneamente em cepas BY4700 *pdv6::GPM1p-sadB-ADH1t pdv1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δhis3 pdv5::kanMX4* usando técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201-202), e a cepa resultante foi mantida em meio sintético completo sem histidina e uracila e suplementado com 1% de

etanol a 30 °C. A cepa resultante foi denominada de NGI-049.

EXTRATORES ORGÂNICOS

O extrator é um solvente orgânico imiscível em água ou mistura de solvente possuindo características que o torna útil para a extração de butanol a partir de um caldo de fermentação. Um extrator orgânico adequado deve atender aos critérios de um solvente ideal para uma fermentação extrativa comercial de duas fases para a produção ou recuperação de butanol. O extrator deve, especificamente, (i) ser biocompatível com os micro-organismos, por exemplo, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, e *Saccharomyces cerevisiae*; (ii) ser substancialmente imiscível com o meio de fermentação; (iii) ter um alto coeficiente de partição (K_P) para a extração de butanol; (iv) ter baixo coeficiente de partição para a extração de nutrientes; (v) ter uma baixa tendência para formar emulsões com o meio de fermentação; e (vi) ser de baixo custo e não perigoso. Além disso, para uma operabilidade do processo melhorada e economia, o extrator: (vii) ter baixa viscosidade (μ), (viii) ter baixa densidade (ρ) em relação ao meio de fermentação aquoso; e (ix) ter um ponto de ebulição adequado para a separação a jusante do extrator e do butanol.

Em um exemplo de realização, o extrator pode ser biocompatível com o micro-organismo, ou seja, atóxico para o micro-organismo ou tóxicos apenas a tal ponto que o micro-organismo seja prejudicado a um nível aceitável, de modo que o micro-organismo continue a produzir o produto butanol no meio de fermentação. A extensão da biocompatibilidade de um extrator pode ser determinada pela taxa de utilização da glicose do micro-organismo na presença do extrator e o produto butanol, mensurada sob condições definidas de fermentação. Vide, por exemplo, os exemplos nos Pedidos Provisórios de Patentes US 61/168640; US 61/168642; e US 61/168,645. Enquanto um extrator biocompatível permite que o micro-organismo utilize a glicose, um extrator não biocompatível não permite que o

micro-organismo utilize a glicose em uma taxa maior do que, por exemplo, cerca de 25% da taxa quando o extrator não está presente. Como a presença do produto da fermentação butanol pode afetar a sensibilidade do micro-organismo ao extrator, o produto da fermentação deve estar presente durante os testes de biocompatibilidade do extrator. A presença de produtos da fermentação adicionais, por exemplo, o etanol, podem igualmente afetar a biocompatibilidade do extrator. A utilização de um extrator biocompatível é desejada para os processos em que a produção contínua de butanol é desejada após o contato do caldo de fermentação compreendendo o micro-organismo com um extrator orgânico.

Em um exemplo de realização, o extrator é selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_7 a C_{22} , ácidos graxos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_7 a C_{22} , aldeídos graxos C_7 a C_{22} , amidas graxas C_7 a C_{22} , e misturas dos mesmos. Exemplos de extratores adequados incluem um extrator compreendendo pelo menos um solvente selecionado a partir do grupo que consiste em álcool oleílico, álcool berrênico, álcool cetílico, álcool laurílico, álcool miristílico, álcool estearílico, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, miristato de metila, oleato de metila, aldeído láurico, 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol, 2-undecanol, 1-nonanal, 2-butiloctanol, ácido 2-butil-octanóico e misturas dos mesmos. Em exemplos de realizações, o extrator compreende álcool oleílico. Em exemplos de realizações, o extrator compreende um álcool saturado de cadeia ramificada, por exemplo, 2-butiloctanol, comercialmente disponível como ISOFAL[®] 12 (Sasol, Houston, TX) ou Jarcol I-12 (Jarchem Industries, Inc., Newark, NJ). Em exemplos de realizações, o extrator compreende um ácido carboxílico de cadeia ramificada, por exemplo, ácido 2-butil-octanóico, ácido 2-hexil-decanóico, ou ácido 2-deciltetradecanóico, comercialmente disponível como ISOCARB[®] 12, ISOCARB[®] 16, e ISOCARB[®] 24, respectivamente (Sasol, Houston, TX).

Em um exemplo de realização, o primeiro extrator orgânico imiscível em água é selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , amidas graxas C_{12} a C_{22} e misturas dos mesmos. O

5 Primeiro extrator adequado pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em álcool oleílico, álcool behenílico, álcool cetílico, álcool laurílico, também referido como 1-dodecanol, álcool miristílico, álcool estearílico, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, miristato de metila, oleato de metila, aldeído láurico, e misturas destes. Em um exemplo de realização, o
10 extrator compreende álcool oleílico.

Em um exemplo de realização, um segundo extrator orgânico imiscível em água opcional pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_7 a C_{22} , ácidos carboxílicos graxos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos carboxílicos graxos C_7 a C_{22} , aldeídos graxos C_7 a C_{22} , amidas graxas
15 C_7 a C_{22} , e misturas dos mesmos. O segundo extrator adequado pode ser adicionalmente selecionado a partir do grupo que consiste em 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol, 2-undecanol, 1-nonanal, e misturas dos mesmos. Em um exemplo de realização, o segundo extrator compreende 1-decanol.

Em um exemplo de realização, o primeiro extrator compreende
20 álcool oleílico e o segundo extrator compreende 1-decanol.

Quando um primeiro e um segundo extratores são utilizados, as quantidades relativas de cada um podem variar dentro de um intervalo adequado. Por exemplo, o primeiro extrator pode ser utilizado em uma quantidade que é de cerca de 30 por cento a cerca de 90 por cento, ou cerca
25 de 40 por cento a cerca de 80 por cento, ou cerca de 45 por cento a cerca de 75 por cento, ou cerca de 50 por cento a cerca de 70 por cento do volume combinado do primeiro e segundo extratores. A faixa ideal reflete a maximização das características do extrator, por exemplo, equilibrar um

coeficiente de partição para butanol relativamente alto com um nível aceitável de biocompatibilidade. Para uma fermentação extrativa em duas fases para a produção ou recuperação de butanol, a temperatura, tempo de contato, concentração de butanol no meio de fermentação, quantidades relativas de meio de fermentação e de extrator, o primeiro e segundo extrator específico sendo utilizado, as quantidades relativas do primeiro e segundo extratores, presença de outros solutos orgânicos, a presença e concentração de eletrólitos, e quantidade e tipo de micro-organismos estão relacionados; assim estas variáveis podem ser ajustadas conforme necessário dentro dos limites apropriados para otimizar o processo de extração conforme descrito na presente invenção.

Os extratores orgânicos adequados podem estar disponíveis comercialmente a partir de diversas fontes, tal como a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), em diversos graus, muitos dos quais podem ser adequados para utilização na fermentação extrativa para produzir ou recuperar o butanol. As qualidades (graus) técnicas podem conter uma mistura de compostos, incluindo o componente desejado e componentes com pesos moleculares mais altos e mais baixos. Por exemplo, um álcool oleílico de qualidade técnica disponível comercialmente contém cerca de 65% de álcool oleílico e uma mistura alcoóis graxos superiores e inferiores.

ELETRÓLITO

De acordo com o presente método, o meio de fermentação contém pelo menos um eletrólito em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação. O eletrólito pode compreender um ou mais dos sais contidos no meio basal para fermentação, caso em que o eletrólito está presente em uma concentração acima da concentração de sais totais contidos no meio basal para fermentação.

O eletrólito pode compreender um ou mais sais que não estão presentes no meio basal para fermentação. O meio basal para fermentação pode conter, por exemplo, sais de fosfato, magnésio, e/ou sais de amônio e geralmente é adaptado para um micro-organismo específico. As composições sugeridas de meios de fermentação basais podem ser encontradas nos manuais da Difco™ & BBL™ (Becton Dickinson & Company, Sparks, MD 21152, EUA). De modo geral, os sais fornecidos por oligoelementos podem ser ignorados no cálculo da concentração total de sal do meio basal para fermentação devido às suas concentrações extremamente baixas.

O eletrólito pode compreender um sal que se dissocia no meio de fermentação, ou na fase aquosa de um meio de fermentação bifásico, para formar íons livres. Por exemplo, o eletrólito pode compreender um sal possuindo um cátion selecionado a partir do grupo que consiste em lítio, sódio, potássio, rubídio, cézio, magnésio, cálcio, estrôncio, bário, amônio, fosfônio, e combinações dos mesmos. Por exemplo, o eletrólito pode compreender um sal possuindo um ânion selecionado a partir do grupo que consiste em sulfato, carbonato, acetato, citrato, lactato, fosfato, fluoreto, cloreto, brometo, iodeto, e combinações dos mesmos. O eletrólito pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em sulfato de sódio, cloreto de sódio, e combinações dos mesmos.

O eletrólito pode ser comercialmente disponível a partir de diversas fontes, como a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), em graus de pureza variados, muitos dos quais podem ser adequados para utilização na fermentação extrativa para produzir ou recuperar o butanol pelos métodos aqui descritos. O eletrólito pode ser recuperado por métodos conhecidos no estado da técnica a partir de um meio de fermentação ou a partir de uma fase aquosa formada pelo contato do meio de fermentação com um extrator ou por outros métodos físicos ou químicos tal como a precipitação, cristalização, e/ou

evaporação. O eletrólito recuperado pode ser usado em uma fermentação subsequente.

A quantidade de eletrólito necessária para atingir uma concentração no meio de fermentação que é pelo menos suficiente para
5 aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação pode ser determinada conforme descrito, por exemplo, pelos procedimentos dos EXEMPLOS descritos abaixo. A faixa de concentrações de eletrólito que têm um efeito positivo sobre o coeficiente de partição é determinada, por exemplo, pela experimentação. A
10 faixa de concentrações de eletrólito que demonstra uma biocompatibilidade aceitável com o micro-organismo de interesse é também determinada. A faixa de concentrações de eletrólito adequada é, em seguida, selecionada a partir da sobreposição destes dois intervalos, de modo que a quantidade de eletrólito necessária para se ter um efeito positivo sobre o coeficiente de partição do
15 butanol é equilibrada com o intervalo de concentrações que proporcionam um nível aceitável de biocompatibilidade com o micro-organismo. Considerações econômicas também pode ser um fator na seleção da quantidade de eletrólito ser utilizada.

Em um exemplo de realização, o eletrólito pode estar presente no
20 meio de fermentação em uma concentração que é biocompatível com o micro-organismo, isto é, uma concentração que seja atóxica para o micro-organismo ou tóxica apenas até certo ponto em que o micro-organismo é prejudicado a um nível aceitável, de modo que o micro-organismo continue a produzir o produto butanol no meio de fermentação na presença do eletrólito. A extensão
25 de biocompatibilidade de um eletrólito pode ser determinada pela taxa de crescimento do micro-organismo na presença de várias concentrações do eletrólito, conforme descrito no Exemplo 2 abaixo. Enquanto uma concentração de eletrólito biocompatível permite que o micro-organismo utilize glicose (ou

outra fonte de carbono) ou cresça, uma concentração de eletrólito não biocompatível não permite que o micro-organismo utilize a glicose (ou outra fonte de carbono) ou cresça a uma taxa maior do que, por exemplo, cerca de 25% da taxa de crescimento quando a quantidade em excesso de eletrólito não está presente. A presença de produtos da fermentação, por exemplo, butanol, também pode afetar os níveis de concentração do eletrólito que têm biocompatibilidade com o micro-organismo. O uso de um eletrólito dentro de intervalos de concentração com biocompatibilidade é desejado para os processos em que a produção contínua de butanol é necessária após o contato do meio de fermentação compreendendo o micro-organismo com o eletrólito. Em processos em que a produção contínua de butanol após o contato do meio de fermentação compreendendo o micro-organismo com o eletrólito não é necessária, um eletrólito pode ser utilizado em intervalos (faixas) de concentração que tem pouca, se alguma, biocompatibilidade com o micro-organismo.

Para atingir uma concentração de eletrólito no meio de fermentação que é pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação, o eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação ou à fase aquosa de um meio de fermentação bifásico durante a fase de crescimento do micro-organismo, durante a fase de produção de butanol, quando a concentração de butanol é inibitória, ou em uma combinação dessas fases. O eletrólito pode ser adicionado ao primeiro extrator, ao segundo extrator, ou a uma combinação desses. O eletrólito pode ser adicionado como um sólido, como uma suspensão espessa (*slurry*), ou como uma solução aquosa. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação e ao(s) extrator(es). O eletrólito pode ser adicionado de um modo contínuo, semi-contínuo, ou em batelada (descontínuo ou *batch*). O eletrólito

pode ser adicionado a todo fluxo ao qual é introduzido, por exemplo, ao meio de fermentação inteiro em um fermentador, ou a um fluxo parcial retirado a partir de um ou mais recipientes, por exemplo, um fluxo parcial a partir de um fermentador.

5 Em exemplos de realizações, a concentração total de eletrólito no meio de fermentação é maior do que cerca de 0,05M; 0,1M; 0,2M; 0,3M; 0,4M; 0,5M; 0,6M; 0,7M; 0,8M ou 1M. Em alguns exemplos de realização, a concentração de eletrólito na fermentação é menos do que cerca de 1M, e em alguns exemplos de realização, a concentração de eletrólito na fermentação é
10 inferior a 2M.

FERMENTAÇÃO

O micro-organismo pode ser cultivado em meio de fermentação adequado em um fermentador adequado para produzir butanol. Qualquer fermentador adequado pode ser utilizado, incluindo um fermentador de tanque
15 agitado, um fermentador tipo "airlift", um fermentador com borbulhadores "bubble", ou qualquer combinação destes. Materiais e métodos para a manutenção e o crescimento de culturas microbianas são bem conhecidos pelos técnicos hábeis na matéria da microbiologia ou ciência da fermentação (vide, por exemplo, Bailey *et al. Biochemical Engineering Fundamentals*,
20 Segunda edição, McGraw Hill, Nova Iorque, 1986). Quanto ao meio de fermentação adequado, deve ser dada grande atenção ao pH, temperatura, e requisitos para as condições aeróbicas, microaeróbicas ou anaeróbicas, dependendo das necessidades específicas do micro-organismo, a fermentação, e o processo. O meio de fermentação utilizado não é
25 fundamental, mas deve suportar o crescimento do micro-organismo utilizado e promover a via biossintética necessária para produzir o produto butanol desejado. Um meio de fermentação convencional pode ser usado, incluindo, mas não se limitado a, meios complexos contendo fontes de nitrogênio

orgânico, como extrato de levedura e peptona ou pelo menos uma fonte de carbono fermentável; meio mínimo e meio definido. Fontes de carbono fermentáveis adequadas incluem, mas não estão limitadas a, monossacarídeos, como a glicose ou frutose; dissacarídeos, como a lactose ou sacarose, oligossacarídeos, polissacarídeos, como o amido ou celulose, substrato de um carbono e misturas destes. Além de fonte de carbono adequada, o meio de fermentação pode conter uma fonte de nitrogênio adequada, como um sal de amônio, extrato de levedura e peptona, minerais, sais, cofatores, tampões e outros componentes, conhecidos pelos técnicos hábeis no assunto (Bailey *et al. supra*). Condições adequadas para a fermentação extrativa dependerá do micro-organismo usado e pode ser facilmente determinado por um técnico hábil na matéria usando a experimentação de rotina.

MÉTODOS PARA A RECUPERAÇÃO DO BUTANOL UTILIZANDO FERMENTAÇÃO

EXTRATIVA COM ADIÇÃO DE ELETRÓLITO

O butanol pode ser recuperado a partir de um meio de fermentação contendo água, butanol, pelo menos um eletrólito em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação, opcionalmente, em pelo menos uma fonte de carbono fermentável e um micro-organismo que foi geneticamente modificado (isto é, por engenharia genética) para produzir butanol por uma via biossintética a partir de pelo menos uma fonte de carbono. Tais micro-organismos geneticamente modificados podem ser selecionados a partir de bactérias, cianobactérias, fungos filamentosos e leveduras e incluem, por exemplo, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, e *Saccharomyces cerevisiae*. A primeira etapa no processo é colocar o meio de fermentação em contato com um extrator orgânico não miscível em água, e opcionalmente, um segundo

extrator orgânico não miscível em água para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol. "Contatar" ou "colocar em contato" significa que o meio de fermentação e o extrator orgânico são colocados em contato físico a qualquer momento durante o processo de fermentação. O eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação, ao primeiro extrator, ao segundo extrator opcional, ou a uma combinação dos mesmos. Em um exemplo de realização, o meio de fermentação compreende adicionalmente de etanol, e a fase orgânica contendo butanol pode conter etanol.

Quando um primeiro e um segundo extrator são utilizados, o contato pode ser realizado com o primeiro e segundo extrator sendo combinados previamente. Por exemplo, o primeiro e segundo extratores podem ser combinados em um recipiente, tal como um tanque de mistura, em seguida, os extratores combinados podem ser adicionados a um tanque contendo o meio de fermentação. Alternativamente, o contato pode ser realizado com o primeiro e segundo extratores sendo combinados durante o contato. Por exemplo, o primeiro e segundo extratores podem ser adicionados separadamente a um recipiente contendo o meio de fermentação. Em um exemplo de realização, o contato do meio de fermentação com o extrator orgânico compreende adicionalmente o contato do meio de fermentação com o primeiro extrator antes do contato do meio de fermentação e primeiro extrator com o segundo extrator. Em um exemplo de realização, o contato com o segundo extrator ocorre no mesmo recipiente em que o contato com primeiro extrator correu. Em um exemplo de realização, o contato com o segundo extrator pode ocorrer em um recipiente diferente daquele em que o contato com primeiro extrator correu. Por exemplo, o primeiro extrator pode ser contactado com o meio de fermentação em um recipiente, e o conteúdo transferido para outro recipiente no qual o contato com o segundo extrator

ocorre. Nestes exemplos de realização, o eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação, ao primeiro extrator, ao segundo extrator opcional, ou a uma combinação dos mesmos.

O extrator orgânico pode contatar com o meio de fermentação no
5 início da fermentação, formando um meio de fermentação bifásico. Alternativamente, o extrator orgânico pode contatar com meio de fermentação após o micro-organismo ter atingido uma quantidade desejada de crescimento, que pode ser determinada pela medição da densidade óptica da cultura. Em um exemplo de realização, o primeiro extrator pode contatar o meio de
10 fermentação em um recipiente, e o segundo extrator pode contatar o meio de fermentação e o primeiro extrator no mesmo recipiente. Em outro exemplo de realização, o segundo extrator pode contatar o meio de fermentação e o primeiro extrator em um recipiente diferente daquele em que o contato do primeiro extrator com meio da fermentação ocorreu. Nestes exemplos de
15 realização, o eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação, ao primeiro extrator, ao segundo extrator opcional, ou a uma combinação dos mesmos.

Além disso, o extrator orgânico pode ser colocado em contato com o meio de fermentação em um momento em que o nível butanol no meio
20 de fermentação atinge um nível pré-selecionado, por exemplo, antes da concentração de butanol atingir um nível tóxico ou inibitório. A concentração de butanol pode ser monitorada durante a fermentação, usando métodos conhecidos no estado da técnica, tais como cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alto desempenho. O eletrólito pode ser adicionado ao
25 meio de fermentação antes ou após a concentração de butanol atingir um nível tóxico ou inibitório. Em exemplos de realizações, o extrator orgânico compreende ácidos graxos. Em exemplos de realizações, os processos descritos no presente podem ser usados em conjunto com os processos

descritos nos Pedidos Provisórios de Patente US 61/368429 e US 61/379546 em que o butanol é esterificado com um ácido orgânico, tal como ácido graxo, usando um catalisador, tal como uma lipase, para formar ésteres de butanol.

A fermentação pode ser executada em condições aeróbias durante o tempo suficiente para a cultura atingir um nível pré-selecionado de crescimento, conforme determinado pela medição da densidade óptica. O eletrólito pode ser adicionado ao caldo de fermentação antes ou após o nível pré-selecionado de crescimento ser atingido. Um indutor pode ser adicionado para induzir a expressão da via biossintética do butanol no micro-organismo modificado, e as condições de fermentação são modificadas para condições microaeróbicas ou anaeróbicas para estimular a produção de butanol, conforme descrito em detalhes no Exemplo 6 do Pedido de Patente US 12/478.389. O extrator pode ser adicionado após a transição das condições de microaerobiose ou anaerobiose. O eletrólito pode ser adicionado antes ou após a alteração das condições de microaerobiose ou anaerobiose. Em um exemplo de realização, o primeiro extrator pode contatar o meio de fermentação antes do contato do meio de fermentação e primeiro extrator com o segundo extrator. Por exemplo, em um processo de fermentação descontínuo (*batch*), um período adequado de tempo pode ser permitido entre o tempo de contato do meio de fermentação com o primeiro e segundo extratores. Em um processo de fermentação contínuo, o contato do meio de fermentação com o primeiro extrator pode ocorrer em um recipiente, e o contato do conteúdo do recipiente com o segundo extrator pode ocorrer em um segundo recipiente. Nestes exemplos de realização, o eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação, ao primeiro extrator, ao segundo extrator opcional, ou a uma combinação dos mesmos.

Após o contato do meio de fermentação com o extrator orgânico na presença do eletrólito, o produto butanol se particiona no extrator orgânico,

diminuindo sua concentração na fase aquosa contendo o micro-organismo, limitando, desse modo, a exposição do micro-organismo produtor ao produto butanol inibitório. O volume do extrator orgânico a ser utilizado depende de uma série de fatores, incluindo o volume do meio de fermentação, o tamanho do fermentador, o coeficiente de partição do extrator para o produto butanol, a concentração do eletrólito e o modo de fermentação escolhido, conforme descrito abaixo. O volume do extrator orgânico pode ser de cerca de 3% a cerca de 60% do volume de trabalho do fermentador. A relação entre extrator e meio de fermentação é de cerca de 1:20 a cerca de 20:1 em uma base volume:volume, por exemplo, cerca de 1:15 a cerca de 15:1, ou cerca de 1:12 a cerca de 12:1, ou a partir de cerca de 1:10 a cerca de 10:1, ou cerca de 1:9 a cerca de 9:1, ou a partir de cerca de 1:8 a cerca de 8:1.

A quantidade do eletrólito a ser adicionada depende de diversos fatores, incluindo o efeito do eletrólito adicionado sobre as propriedades de crescimento do micro-organismo produtor de butanol, o efeito do eletrólito adicionado sobre o Kp do butanol em uma fermentação de duas fases. A quantidade ótima de eletrólito a ser adicionada também pode ser dependente da composição do meio basal para fermentação inicial. Uma concentração muito elevada de eletrólito, embora possivelmente aumente o Kp do butanol e alivie os efeitos de toxicidade do butanol ao micro-organismo, pode ser ela própria inibidora do micro-organismo. Por outro lado, uma concentração muito baixa de eletrólito pode não aumentar o Kp do butanol de maneira suficiente para aliviar o efeito inibitório do butanol no micro-organismo. Portanto, um equilíbrio deve ser encontrado através da experimentação para assegurar que o resultado final da adição de um excesso de eletrólito ao meio de fermentação resulte em um aumento global na taxa e titulação de produção do butanol. Além disso, pode-se modular a biocompatibilidade de sais ao micro-organismo pela adição de osmoprotetores ou osmólitos, seja de maneira exógena ao meio

ou por modificação genética do micro-organismo para produzir o(s) osmólito(s) endogenamente. Em exemplos de realizações, o Kp é aumentado em cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 100%, cerca de 150%, ou cerca de 200% em comparação com o Kp sem a adição do eletrólito. Em exemplos de realizações, o Kp é aumentado em pelo menos aproximadamente 2 vezes, pelo menos aproximadamente 3 vezes, pelo menos aproximadamente 4 vezes, pelo menos aproximadamente 5 vezes, ou pelo menos aproximadamente 6 vezes. Em exemplos de realizações, a concentração total de eletrólito é selecionada para aumentar o Kp por uma quantidade enquanto mantém a taxa de crescimento do micro-organismo em um nível que é pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 90% da taxa de crescimento na ausência da adição do eletrólito. Em realizações, a concentração total de eletrólito no meio de fermentação é suficiente para aumentar a taxa efetiva de produção do butanol em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou, pelo menos cerca de 100% em comparação com a taxa sem a adição do eletrólito. Em realizações, a concentração total de eletrólito no meio de fermentação é suficiente para aumentar o rendimento efetivo de butanol em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou, pelo menos cerca de 100% em comparação com o rendimento sem a adição do eletrólito. Em realizações, a concentração total de eletrólito no meio de fermentação é suficiente para aumentar a titulação efetiva de butanol em pelo menos cerca de

10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou, pelo menos cerca de 100% em comparação com a titulação sem a adição do eletrólito.

5 Em exemplos de realizações, a quantidade de eletrólito adicionada é suficiente para resultar em um título efetivo de pelo menos cerca de 7 g/L, pelo menos cerca de 10 g/L, pelo menos cerca de 15 g/L, pelo menos cerca de 20 g/L, pelo menos cerca de 25 g/L, pelo menos cerca de 30 g/L, ou pelo menos cerca de 40 g/L. Em exemplos de realizações, a quantidade de
10 eletrólito adicionada é suficiente para resultar em um rendimento efetivo de pelo menos cerca de 0,12, pelo menos cerca de 0,15, pelo menos cerca de 0,2, pelo menos cerca de 0,25, ou pelo menos cerca de 0,3. Em exemplos de realizações, a quantidade de eletrólito adicionada é suficiente para resultar em uma taxa efetiva de pelo menos cerca de 0,1 g/L/h, pelo menos cerca de 0,15
15 g/L/h, pelo menos cerca de 0,2 g/L/h, pelo menos, cerca de 0,3 g/L/h, pelo menos cerca de 0,4 g/L/h ou pelo menos cerca de 0,6 g/L/h, ou pelo menos cerca de 0,8 g/L/h, ou pelo menos cerca de 1 g/L/h, ou pelo menos cerca de 1,2 g/L/h. Em alguns exemplos de realização, a taxa efetiva é de cerca de 1,3 g/L/h.

20 A próxima etapa é opcionalmente a separação da fase orgânica contendo butanol da fase aquosa utilizando métodos conhecidos no estado da técnica, incluindo, mas não se limitando a, sifonagem, decantação, centrifugação, utilização de um decantador por gravidade, separação de fase auxiliada por membrana.

25 A recuperação do butanol a partir da fase orgânica contendo butanol pode ser feita usando métodos conhecidos no estado da técnica, incluindo, mas não se limitando a, destilação, adsorção por resinas, separação por peneiras moleculares e pervaporação. Especificamente, a destilação pode

ser usada para recuperar o butanol a partir da fase orgânica contendo butanol. O extrator pode ser reciclado para a produção e/ou processo de recuperação do butanol.

O eletrólito pode ser recuperado a partir do meio de fermentação ou a partir da fase aquosa de uma mistura de duas fases por métodos conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, a fase aquosa ou meio de fermentação pode ser concentrado por destilação, dessorção, pervaporação, ou outros métodos para se obter uma mistura aquosa concentrada compreendendo o eletrólito. Opcionalmente, o eletrólito pode ser retornado para um meio de fermentação e, assim, ser reciclado no processo de fermentação. Opcionalmente, o eletrólito obtido a partir de um meio de fermentação pode ser adicionado a um meio de fermentação para fornecer uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação.

A dessorção gasosa (*gas stripping*) pode ser utilizada simultaneamente com o extrator orgânico e a adição do eletrólito para remover o produto butanol a partir do meio de fermentação. A dessorção gasosa pode ser feita pela passagem de um gás como o ar, nitrogênio ou dióxido de carbono através do meio de fermentação, formando assim uma fase gasosa contendo butanol. O produto butanol pode ser recuperado a partir da fase gasosa contendo butanol usando métodos conhecidos no estado da técnica, como o uso de um coletor de água resfriado para condensar o butanol, ou a lavagem da fase gasosa com um solvente.

Qualquer butanol remanescente no meio de fermentação após a execução da fermentação estar completa pode ser recuperado por extração contínua usando extrator orgânico novo ou reciclado. Alternativamente, o butanol pode ser recuperado a partir do meio de fermentação usando métodos

conhecidos no estado da técnica, como a destilação, destilação azeotrópica, extração líquido-líquido, adsorção, dessorção gasosa, evaporação por membrana, pervaporação, e similares. No caso em que o meio de fermentação não é reciclado para o processo, um eletrólito adicional pode ser adicionado
5 para aumentar ainda mais o coeficiente de partição do butanol e melhorar a eficiência de recuperação do butanol.

O método de fermentação extrativa em duas fases pode ser realizado em um modo contínuo em um fermentador de tanque agitado. Neste modo, a mistura do meio de fermentação e o extrator orgânico contendo
10 butanol são removidos do fermentador. As duas fases são separadas por meios conhecidos no estado da técnica, incluindo, mas não se limitando a, sifonagem, decantação, centrifugação, utilizando um decantador por gravidade, separação de fase auxiliada por membrana, e similares conforme descrito acima. Após a separação, o meio de fermentação e o eletrólito nele podem ser
15 reciclados para o fermentador ou podem ser substituídos por meio fresco, ao qual o eletrólito adicional é adicionado. Em seguida, o extrator é tratado para recuperar o produto butanol conforme descrito acima. O extrator poderá ser reciclado de volta para o fermentador para extração adicional do produto. Alternativamente, extrator novo pode ser continuamente adicionado ao
20 fermentador para substituir o extrator removido. Este modo contínuo de operação oferece várias vantagens. Como o produto é continuamente removido do reator, um menor volume de extrator orgânico é necessário permitindo que seja utilizado um maior volume do meio de fermentação. Isso resulta em rendimentos de produção mais elevados. O volume do extrator orgânico pode
25 ser de cerca de 3% a cerca de 50% do volume de trabalho do fermentador, 3% a cerca de 20% do volume do volume de trabalho do fermentador, ou 3% a cerca de 10% volume de trabalho do fermentador. É benéfico utilizar a menor quantidade possível de extrator no fermentador para maximizar o volume da

fase aquosa e, desse modo, a quantidade de células no fermentador. O processo pode ser operado em um modo inteiramente contínuo, no qual o extrator é continuamente reciclado entre o fermentador e um aparelho de separação e o meio de fermentação é continuamente retirado do fermentador e alimentado com meio fresco. Neste modo inteiramente contínuo, não é permitido que o produto butanol atinja a concentração tóxica crítica e nutrientes frescos são continuamente fornecidos para que a fermentação possa ser realizada por longos períodos de tempo. O aparelho que pode ser usado para a realização destes modos de fermentações extrativas de duas fases é bem conhecido no estado da técnica. Exemplos são descritos, por exemplo, por Kollerup *et al.* na Patente US 4.865.973.

O modo de fermentação descontínuo (*batch* ou 'em batelada') também pode ser usado. A fermentação descontínua ("*batch*"), que é bem conhecida no estado da técnica, é um sistema fechado, no qual a composição do meio de fermentação é definida no início da fermentação e não está sujeita a alterações artificiais durante o processo. Neste modo, a quantidade de eletrólito complementar desejada e um volume de extrator orgânico são adicionados ao fermentador e o extrator não é removido durante o processo. O extrator orgânico pode ser formado no fermentador pela adição separada do primeiro e segundo extrator opcional, ou o primeiro e segundo extratores podem ser combinados para formar o extrator antes da adição de qualquer extrator ao fermentador. O eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação, ao primeiro extrator, ao segundo extrator opcional, ou a uma combinação dos mesmos. Embora este modo de fermentação seja mais simples do que o modo contínuo ou inteiramente contínuo descrito acima, ele necessita de um maior volume de extrator orgânico para minimizar a concentração do produto butanol inibitório no meio de fermentação. Consequentemente, o volume do meio de fermentação é menor e a quantidade

de produto produzido é menor do que aquele obtido usando o modo contínuo. O volume de extrator orgânico no modo descontínuo pode ser de 20% a cerca de 60% do volume de trabalho do fermentador, ou de 30% a cerca de 60% do volume de trabalho do fermentador. É benéfico utilizar o menor volume possível de extrator no fermentador, pelos motivos descritos anteriormente.

O modo de fermentação descontínuo alimentado (batelada-alimentada ou – “*Fed-Batch*”) também pode ser usado. A fermentação descontínua alimentada (*fed-batch*) é uma variação do sistema descontínuo padrão (*batch*), em que os nutrientes, por exemplo, a glicose, são incrementados durante a fermentação. A quantidade e a taxa de adição do nutriente podem ser determinadas pela experimentação de rotina. Por exemplo, a concentração de nutrientes críticos no meio de fermentação pode ser monitorada durante a fermentação. Alternativamente, fatores mais facilmente mensuráveis, tais como pH, oxigênio dissolvido, e pressão parcial de gases residuais, como dióxido de carbono, podem ser monitorados. A partir desses parâmetros analisados, a taxa de adição de nutrientes pode ser determinada. A quantidade de extrator orgânico utilizada e seus métodos de adição neste modo são os mesmos utilizados no modo descontínuo (*batch*), descrito acima. A quantidade de eletrólito adicionada pode ser a mesma utilizada nos outros modos de fermentação.

A extração do produto pode ser feita a jusante do fermentador, ao invés de “*in situ*”. Neste modo externo, a extração do produto butanol para o extrator orgânico é realizada no meio de fermentação removido do fermentador. O eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação retirado do fermentador. A quantidade de extrator utilizada é de cerca de 20% a cerca de 60% do volume de trabalho do fermentador, ou 30% a cerca de 60% do volume de trabalho do fermentador. O meio de fermentação pode ser removido do fermentador continuamente ou periodicamente, e a extração do produto

butanol pelo extrator orgânico pode ser feita com ou sem a remoção das células do meio de fermentação. As células podem ser retiradas do meio de fermentação por meios conhecidos no estado da técnica, incluindo, mas não se limitando a filtração ou centrifugação. O eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação, antes ou após a remoção das células. Após a separação do meio de fermentação do extrator pelos métodos descritos acima, o meio de fermentação pode ser reciclado no fermentador, descartado ou tratado para a remoção de qualquer produto butanol restante. Da mesma forma, as células isoladas também podem ser recicladas no fermentador. Após o tratamento para recuperar o produto butanol, o extrator pode ser reciclado para uso no processo de extração. Alternativamente, pode ser usado um novo extrator. Neste modo, o extrator não está presente no fermentador, de modo que a toxicidade do extrator é muito menos problemática. Se as células são separadas a partir do meio de fermentação antes do contato com o extrator, o problema de toxicidade do extrator pode ser adicionalmente reduzido. Além disso, com o uso desse modo externo há menos chance de formar uma emulsão, e a evaporação do extrator é minimizada, aliviando as preocupações ambientais.

MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE BUTANOL UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EXTRATIVA **COM ELETRÓLITO ADICIONADO**

É fornecido um método melhorado para a produção de butanol, em que um micro-organismo que foi geneticamente modificado para produzir butanol por meio de uma via biossintética de pelo menos uma fonte de carbono fermentável é cultivado em um meio de fermentação bifásico compreendendo uma fase aquosa e i) um primeiro extrator orgânico imiscível em água e, opcionalmente, ii) um segundo extrator orgânico imiscível em água, e o meio de fermentação bifásico compreende adicionalmente pelo menos um eletrólito, em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de

partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação. Tais micro-organismos geneticamente modificados podem ser selecionados a partir de bactérias, cianobactérias, fungos filamentosos e leveduras e incluem, por exemplo, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, e *Saccharomyces cerevisiae*. O primeiro extrator orgânico imiscível em água pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C₁₂ a C₂₂, ácidos graxos C₁₂ a C₂₂, ésteres de ácidos graxos C₁₂ a C₂₂, aldeídos graxos C₁₂ a C₂₂, amidas graxas C₁₂ a C₂₂ e misturas dos mesmos, e o segundo extrator orgânico imiscível em água opcional pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis C₇ a C₂₂, ácidos carboxílicos C₇ a C₂₂, ésteres de ácidos carboxílicos C₇ a C₂₂, aldeídos C₇ a C₂₂, amidas graxas C₇ a C₂₂ e misturas dos mesmos, em que o meio de fermentação bifásico compreende a partir de cerca de 10% a cerca de 90% em volume do extrator orgânico. Alternativamente, o meio de fermentação bifásico pode compreender cerca de 3% a cerca de 60% em volume de extrator orgânico, ou de cerca de 15% a cerca de 50%. O micro-organismo pode ser cultivado no meio de fermentação bifásico por um período suficiente para extrair butanol no extrator e formar uma fase orgânica contendo butanol. A concentração pelo menos suficiente do eletrólito no meio de fermentação pode ser alcançada pela adição de eletrólito na fase aquosa durante a fase de crescimento do micro-organismo, na fase aquosa durante a fase de produção de butanol, na fase aquosa quando a concentração de butanol na fase aquosa é inibitória, no primeiro extrator, no segundo extrator, ou em uma combinação dos mesmos.

Em um exemplo de realização, o meio de fermentação compreende adicionalmente de etanol, e a fase orgânica contendo butanol pode conter etanol. A fase orgânica contendo butanol é então separada da fase aquosa, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, o butanol é

recuperado da fase orgânica contendo butanol, conforme descrito anteriormente.

Também é fornecido um método aprimorado para a produção de butanol em que um micro-organismo que foi geneticamente modificado para produzir butanol através de uma via biossintética a partir de pelo menos uma fonte de carbono é cultivado em um meio de fermentação de modo que o micro-organismo produz o butanol no meio de fermentação para produzir um meio de fermentação contendo butanol. Tais micro-organismos geneticamente modificados podem ser selecionados a partir de bactérias, cianobactérias, fungos filamentosos e leveduras e incluem, por exemplo, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, e *Saccharomyces cerevisiae*. Pelo menos um eletrólito é adicionado ao meio de fermentação para fornecer o eletrólito em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação. Em alguns exemplos de realização, o eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação quando a fase de crescimento do micro-organismo reduz a velocidade. Em alguns exemplos de realização, o eletrólito pode ser adicionado ao meio de fermentação quando a fase de produção do butanol termina. Pelo menos uma porção do meio de fermentação contendo butanol é colocada em contato com um primeiro extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , amidas graxas C_{12} a C_{22} e misturas dos mesmos, e opcionalmente, ii) um segundo extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis C_7 a C_{22} , ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , aldeídos C_7 a C_{22} , amidas graxas C_7 a C_{22} e misturas dos mesmos, para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol. A fase orgânica

contendo butanol é então separada da fase aquosa, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, o butanol é recuperado da fase orgânica contendo butanol, conforme descrito anteriormente. Pelo menos uma parte da fase aquosa retorna para o meio de fermentação. Em um exemplo de
5 realização, o meio de fermentação compreende adicionalmente de etanol, e a fase orgânica contendo butanol pode conter etanol.

O isobutanol pode ser produzido por fermentação extrativa com a utilização de uma cepa modificada de *Escherichia coli* em combinação com um álcool oleílico como extrator orgânico, conforme divulgado no Pedido de
10 Patente US 12/478389. O método produz um maior título efetivo para isobutanol (ou seja, 37 g/L), em comparação ao uso de técnicas de fermentação convencionais (veja o Exemplo 6 do Pedido de Patente US 12/478389). Por exemplo, Atsumi et al. (*Nature* 451(3):86-90, 2008) descreveram títulos de isobutanol de até 22 g/L usando fermentação com uma
15 *Escherichia coli* que foi geneticamente modificada para conter uma via biossintética do isobutanol. O maior título de butanol obtido com o método de fermentação extrativa divulgado no Pedido de Patente US 12/478389 resultou, em parte, da remoção do produto butanol tóxico a partir do meio de fermentação, mantendo assim um nível abaixo do tóxico para o micro-
20 organismo. É razoável assumir que o presente método de fermentação extrativa empregando o uso de pelo menos um eletrólito em uma concentração no meio de fermentação que é pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação conforme definido no
25 presente, seria usado de maneira semelhante e proporcionaria resultados semelhantes.

O butanol produzido pelos métodos divulgados no presente pode ter um título efetivo maior que 22 g por litro do meio de fermentação.

Alternativamente, o butanol produzido pelos métodos divulgados pode ter um título efetivo de pelo menos 25 g por litro de meio de fermentação. Alternativamente, o butanol produzido pelos métodos descritos na presente invenção pode ter um título efetivo de pelo menos 30 g por litro de meio de fermentação. Alternativamente, o butanol produzido pelos métodos descritos na presente invenção pode ter um título efetivo de pelo menos 37 g por litro de meio de fermentação.

Os presentes métodos estão descritos abaixo de modo geral com referência a Figura 1 até a Figura 7.

Referindo-se agora a Fig. 1, é exibida uma representação esquemática de um exemplo de realização de processos para a produção e recuperação de butanol utilizando fermentação extrativa *in situ*. Um fluxo aquoso (10) de pelo menos uma fonte de carbono fermentável, contendo opcionalmente o eletrólito, é introduzido em um fermentador (20), que contém pelo menos um micro-organismo geneticamente modificado (não exibido) que produz butanol a partir de um meio de fermentação compreendendo pelo menos uma fonte de carbono fermentável. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado como um fluxo separado (não mostrado) ao fermentador. Um fluxo do primeiro extrator (12) e um fluxo de um segundo extrator opcional (14) são introduzidos a um recipiente (16), no qual o primeiro e segundo extratores são combinados para formar o extrator combinado (18). Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado (não mostrado) ao fluxo (18), ao recipiente (16), ao fluxo do primeiro extrator (12), ao fluxo do segundo extrator (14), ou a uma combinação dos mesmos. Um fluxo do extrator (18) é introduzido no recipiente (20), de modo que corre o contato do meio de fermentação com o extrator para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol. Um fluxo (26) que compreende ambas as fases aquosa e orgânica é introduzido em um recipiente (38), em que a

separação das fases aquosa e orgânica é realizada para produzir uma fase orgânica contendo butanol (40) e uma fase aquosa (42). Opcionalmente, pelo menos uma porção da fase aquosa (42) contendo eletrólito é retornada (não mostrado) para o fermentador (20) ou para outro fermentador (não mostrado).

- 5 O(s) ponto(s) de adição do eletrólito no processo é(são) selecionado(s) de tal modo que a concentração de eletrólito na fase aquosa (42) é pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação.

Referindo-se agora a Fig. 2, é exibida uma representação
10 esquemática de um exemplo de realização de processos para a produção e recuperação de butanol utilizando fermentação extrativa *in situ*. Um fluxo aquoso (10) de pelo menos uma fonte de carbono fermentável, contendo opcionalmente o eletrólito, é introduzido em um fermentador (20), que contém pelo menos um micro-organismo geneticamente modificado (não exibido) que
15 produz butanol a partir de um meio de fermentação compreendendo pelo menos uma fonte de carbono fermentável. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado como um fluxo separado (não mostrado) ao fermentador. Um fluxo do primeiro extrator (12) e um fluxo do segundo extrator opcional (14) são introduzidos separadamente no fermentador (20), de modo que o contato entre
20 o meio de fermentação com o extrator para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol ocorre. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado (não mostrado) ao fluxo (12), ao fluxo (14), ou a uma combinação dos mesmos. Um fluxo (26) que compreende ambas as fases aquosa e orgânica é introduzido em um recipiente
25 (38), em que a separação das fases aquosa e orgânica é realizada para produzir uma fase orgânica contendo butanol (40) e uma fase aquosa (42). Opcionalmente, pelo menos uma porção da fase aquosa (42) contendo eletrólito é retornada (não mostrado) para o fermentador (20) ou para outro

fermentador (não mostrado). O(s) ponto(s) de adição do eletrólito no processo é(são) selecionado(s) de tal modo que a concentração de eletrólito na fase aquosa (42) é pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação.

Referindo-se agora a Fig. 3, é exibida uma representação esquemática de um exemplo de realização de processos para a produção e recuperação de butanol utilizando fermentação extrativa *in situ*. Um fluxo aquoso (10) de pelo menos uma fonte de carbono fermentável, opcionalmente contendo o eletrólito, é introduzido em um primeiro fermentador (20), que contém pelo menos um micro-organismo geneticamente modificado (não exibido) que produz butanol a partir de um meio de fermentação compreendendo pelo menos uma fonte de carbono fermentável. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado como um fluxo separado (não mostrado) ao fermentador. Um fluxo do primeiro extrator (12) é introduzido ao fermentador (20), e um fluxo (22) compreendendo uma mistura do primeiro extrator e o conteúdo do fermentador (20) é introduzido em um segundo fermentador (24). Um fluxo do segundo extrator opcional (14) é introduzido no segundo fermentador (24), de modo que ocorre o contato do meio de fermentação com o extrator para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado (não mostrado) ao fluxo (12), ao fluxo (22), ao fluxo (14), ao recipiente (24) ou a uma combinação dos mesmos. Um fluxo (26) que compreende ambas as fases aquosa e orgânica é introduzido em um recipiente (38), em que a separação das fases aquosa e orgânica é realizada para produzir uma fase orgânica contendo butanol (40) e uma fase aquosa (42). Opcionalmente, pelo menos uma porção da fase aquosa (42) contendo eletrólito é retornada (não mostrado) para o fermentador (20) ou

para outro fermentador (não mostrado). O(s) ponto(s) de adição do eletrólito no processo é(são) selecionado(s) de tal modo que a concentração de eletrólito na fase aquosa (42) é pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação.

Referindo-se agora a Fig. 4, é exibida uma representação esquemática de um exemplo de realização de processos para a produção e recuperação de butanol no qual a extração do produto é realizada a jusante do fermentador, ao invés de "*in situ*". Um fluxo aquoso (110) de pelo menos uma fonte de carbono fermentável, contendo opcionalmente o eletrólito, é introduzido em um fermentador (120), que contém pelo menos um micro-organismo geneticamente modificado (não exibido) que produz butanol a partir de um meio de fermentação compreendendo pelo menos uma fonte de carbono fermentável. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado como um fluxo separado (não mostrado) ao fermentador. Um fluxo do primeiro extrator (112) e um fluxo de um segundo extrator opcional (114) são introduzidos a um recipiente (116), no qual o primeiro e segundo extratores são combinados para formar o extrator combinado (118). Pelo menos uma porção, mostrada como fluxo (122), do meio de fermentação no fermentador (120) é introduzido no recipiente (124). Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado (não mostrado) ao fluxo (112), ao fluxo (114), ao recipiente (116), ao fluxo (118), ao recipiente (124) ou a uma combinação dos mesmos. Um fluxo do extrator (118) também é introduzido no recipiente (124), de modo que ocorre o contato do meio de fermentação com o extrator para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol. Um fluxo (126) que compreende ambas as fases aquosa e orgânica é introduzido em um recipiente (138), em que a separação das fases aquosa e orgânica é realizada para produzir uma fase orgânica contendo butanol (140) e uma fase

aquosa (142). Pelo menos uma porção da fase aquosa (142) contendo eletrólito é retornada ao fermentador (120), ou opcionalmente para outro fermentador (não mostrado). O(s) ponto(s) de adição do eletrólito no processo é(são) selecionado(s) de tal modo que a concentração de eletrólito na fase aquosa (142) é pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação.

Referindo-se agora a Fig. 5, é exibida uma representação esquemática de um exemplo de realização de processos para a produção e recuperação de butanol no qual a extração do produto é realizada a jusante do fermentador, ao invés de "*in situ*". Um fluxo aquoso (110) de pelo menos uma fonte de carbono fermentável, contendo opcionalmente o eletrólito, é introduzido em um fermentador (120), que contém pelo menos um micro-organismo geneticamente modificado (não exibido) que produz butanol a partir de um meio de fermentação compreendendo pelo menos uma fonte de carbono fermentável. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado como um fluxo separado (não mostrado) ao fermentador. Um fluxo do primeiro extrator (112) e um fluxo do segundo extrator (114) são introduzidos separadamente em um recipiente (124), no qual o primeiro e segundo extratores são combinados para formar o extrator combinado. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado (não mostrado) ao fluxo (112), ao fluxo (114), ao fluxo (122), ao recipiente (124) ou combinações dos mesmos. Pelo menos uma porção, exibida como fluxo (122) do meio de fermentação no fermentador (120) também é introduzida no recipiente (124), de modo que ocorre o contacto entre o meio de fermentação e o extrator para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol. Um fluxo (126) que compreende ambas as fases aquosa e orgânica é introduzido em um recipiente (138), em que a separação das fases aquosa e orgânica é realizada para

produzir uma fase orgânica contendo butanol (140) e uma fase aquosa (142). Pelo menos uma porção da fase aquosa (142) contendo eletrólito é retornada ao fermentador (120), ou opcionalmente para outro fermentador (não mostrado). O(s) ponto(s) de adição do eletrólito no processo é(são) selecionado(s) de tal modo que a concentração de eletrólito na fase aquosa (142) é pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação.

Referindo-se agora a Fig. 6, é exibida uma representação esquemática de um exemplo de realização de processos para a produção e recuperação de butanol no qual a extração do produto é realizada a jusante do fermentador, ao invés de "*in situ*". Um fluxo aquoso (110) de pelo menos uma fonte de carbono fermentável, contendo opcionalmente o eletrólito, é introduzido em um fermentador (120), que contém pelo menos um micro-organismo geneticamente modificado (não exibido) que produz butanol a partir de um meio de fermentação compreendendo pelo menos uma fonte de carbono fermentável. Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado como um fluxo separado (não mostrado) ao fermentador. Um fluxo do primeiro extrator (112) é introduzido ao recipiente(128), e pelo menos uma porção, exibida como fluxo (122) do meio de fermentação no fermentador (120) é também introduzida no recipiente(128). Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado (não mostrado) ao fluxo (122), ao fluxo (112), ao recipiente (128), ou a uma combinação dos mesmos. Um fluxo (130) compreendendo a mistura do primeiro extrator e o conteúdo do fermentador (120) é introduzido em um segundo recipiente (132). Opcionalmente, o eletrólito pode ser adicionado (não mostrado) ao fluxo (130), ao fluxo (114), ao recipiente (132), ou a uma combinação dos mesmos. Um fluxo do segundo extrator opcional (114) é introduzido no segundo recipiente (132), de modo que corre o contato do meio

de fermentação com o extrator para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol. Um fluxo (134) que compreende ambas as fases aquosa e orgânica é introduzido em um recipiente (138), em que a separação das fases aquosa e orgânica é realizada para produzir uma fase orgânica contendo butanol (140) e uma fase aquosa (142). Pelo menos uma porção da fase aquosa (142) contendo eletrólito é retornada ao fermentador (120), ou opcionalmente para outro fermentador (não mostrado). O(s) ponto(s) de adição do eletrólito no processo é(são) selecionado(s) de tal modo que a concentração de eletrólito na fase aquosa (142) é pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação.

Os processos de extrativos descritos na presente invenção podem ser executados em um modo descontínuo (*batch*) ou podem ser executados em um modo contínuo onde extrator fresco é adicionado e o extrator utilizado é bombeado para fora de modo que a quantidade de extrator no fermentador permanece constante durante todo o processo de fermentação. Essa extração contínua de produtos e subprodutos da fermentação pode aumentar a taxa, título e o rendimento efetivo.

Em outro exemplo de realização adicional, também é possível operar a extração líquido-líquido de maneira co-corrente ou, alternativamente, de maneira contra-corrente que contribui para a diferença no perfil de operação descontínuo (*batch*) quando uma série de fermentadores tipo *batch* são utilizados. Neste cenário, os fermentadores são preenchidos com mosto fermentável que fornece pelo menos uma fonte de carbono fermentável e micro-organismo em uma forma contínua após o outro, enquanto a cultivo esteja operando. Referindo-se a Figura 7, uma vez que o Fermentador (F100) é preenchido com mosto e micro-organismos, a alimentação de mosto e micro-

organismos avança para o Fermentador (F101) e em seguida para o Fermentador (F102) e volta para o Fermentador (F100) em um *loop* contínuo.

O eletrólito pode ser adicionado (não mostrado) a um ou mais fermentadores, ao fluxo de entrada do fermentador, ao fluxo de saída do fermentador, ou a

uma combinação destes. A fermentação em qualquer um dos fermentadores começa quando o mosto e os micro-organismos estão presentes juntos e continua até que a fermentação esteja completa. O tempo de preenchimento de mosto e micro-organismos é igual ao número de fermentadores dividido pelo tempo de ciclo total (preenchimento, fermento, esvaziamento e limpeza). Se o

tempo de ciclo total é de 60 horas e existem 3 fermentadores então o tempo de preenchimento é de 20 horas. Se o tempo de ciclo total é de 60 horas e existem 4 fermentadores então o tempo de preenchimento é de 15 horas.

A extração co-corrente adaptativa segue o perfil de fermentação assumindo que o fermentador operando em um título mais elevado na fase do caldo pode utilizar o fluxo de solvente de extração mais rico na concentração de butanol e o fermentador operando em um título mais baixo na fase do caldo será beneficiado com o fluxo de solvente de extração mais pobre na concentração de butanol. Por exemplo, referindo-se novamente a Figura 7, considere o caso em que o Fermentador (F100) está no início da fermentação e operando em um título de butanol relativamente mais baixo na fase do caldo (B), o Fermentador (F101) está no meio da fermentação e operando em um título de butanol relativamente moderado na fase do caldo, e o fermentador (F102) está próximo do fim da fermentação e operando em um título de butanol relativamente mais elevado na fase do caldo. Neste caso, o solvente de extração pobre (S), com um mínimo ou nenhum butanol extraído, pode ser alimentado no Fermentador F100, o fluxo de "solvente de saída" (S') do Fermentador F100 com um componente butanol extraído pode ser alimentado no Fermentador F101 como um fluxo de "solvente de entrada" e o fluxo de

solvente de saída do F101 pode, então, ser alimentado no fermentador F102 como fluxo de solvente deste. O fluxo de saída de solvente do (F102) pode ser enviado para ser processado para recuperar o butanol presente no fluxo. O fluxo de solvente processado a partir do qual a maior parte do butanol é removida pode ser retornado para o sistema como solvente de extração pobre e seria o solvente na alimentação do Fermentador (F100) acima.

Como as fermentações procedem de forma ordenada as válvulas no coletor de solvente de extração podem ser reposicionadas para alimentar os solventes de extração mais pobres para o fermentador operando com um título de butanol mais baixo na fase do caldo. Por exemplo, supondo que (a) o Fermentador (F102) completa sua fermentação e foi recarregado e fermentação começa de novo, (b) o Fermentador (F100) está no meio de sua fermentação e operando em um título de butanol moderado na fase do caldo e (c) o Fermentador (F101) está próximo do final de sua fermentação e operando em um título de butanol mais elevado na fase do caldo. Nesse cenário o solvente de extração mais pobre iria alimentar o (F102), o solvente de extração saindo do (F102) iria alimentar o Fermentador (F100) e o solvente de extração saindo do Fermentador (F100) iria alimentar o Fermentador (F101).

A vantagem de operar dessa maneira pode ser a manutenção da fase do caldo em um título de butanol tão baixo quanto possível pelo maior tempo possível para promover melhora na produtividade. Além disso, pode ser possível baixar a temperatura nos outros fermentadores que tenham progredido adiante na fermentação que estão operando com títulos de butanol mais elevados na fase do caldo. A queda na temperatura pode permitir uma tolerância melhorada aos títulos mais elevados de butanol na fase do caldo.

VANTAGENS DOS MÉTODOS DA PRESENTE INVENÇÃO

Os presentes métodos de fermentação extrativa fornecem:

butanol que é conhecido por possuir um teor energético

semelhante ao da gasolina e que pode ser misturado com qualquer combustível fóssil. O butanol é favorecido como combustível ou aditivo de combustível, uma vez que produz apenas CO_2 e pouco ou nenhum SO_x e NO_x quando queimado em um motor à combustão interna padrão. Além disso, o
5 butanol é menos corrosivo que o etanol, o combustível preferido como combustível aditivo até a presente data.

Além de sua utilidade como um biocombustível ou aditivo de combustível, o butanol produzido de acordo com os presentes métodos tem o potencial de impactar os problemas de distribuição de hidrogênio na emergente
10 indústria da célula de combustível. As células de combustível são atualmente afetadas por questões de segurança associadas com o transporte e distribuição do hidrogênio. O butanol pode ser facilmente regenerado pelo seu conteúdo de hidrogênio e pode ser distribuído através de postos de combustíveis existentes na pureza necessária tanto para células quanto para
15 veículos. Além disso, os presentes métodos produzem butanol a partir de fontes de carbono derivados de vegetais, evitando o impacto ambiental negativo associado aos processos petroquímicos padrões para a produção de butanol.

As vantagens dos presentes métodos incluem a viabilidade de
20 produzir butanol em uma taxa, título e rendimento efetivo final que são significativamente mais elevados e mais econômicos do que os níveis limiares de butanol obtidos por um processo de fermentação extrativa de duas fases sem a adição de pelo menos um eletrólito em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação
25 àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação. O presente método pode também reduzir a quantidade final de extrator fresco ou reciclado necessária para atingir um nível desejado de produção de butanol a partir de uma fermentação descontínua (*batch*).

EXEMPLOS

A presente invenção é adicionalmente definida nos seguintes Exemplos. Deve ser compreendido que estes exemplos, embora indicando realizações preferidas da presente invenção, são dados apenas a título ilustrativo. A partir da discussão acima e destes Exemplos, um técnico hábil no assunto pode determinar as características essenciais da presente invenção, e sem se afastar do espírito e do escopo da presente invenção, pode fazer várias alterações e modificações na invenção para adaptá-la aos diversos usos e condições.

MATERIAIS

Os seguintes materiais foram utilizados nos exemplos. Todos os reagentes comerciais foram utilizados como recebidos.

Todos os solventes foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) e foram utilizados sem purificação adicional. O álcool oleílico utilizado foi de qualidade técnica, que continha uma mistura de álcool oleílico (65%) e alcoóis graxos superiores e inferiores. O isobutanol (pureza de 99,5%) foi obtido da Sigma-Aldrich e foi usado sem purificação adicional. Sulfato de sódio (Na_2SO_4 , CAS 7757-82-6, superior a 99% de pureza) foi obtido a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Cloreto de sódio (NaCl , CAS 7647-14-5, grau técnico) foi adquirido a partir da *EMD Chemicals, Inc.* (Gibbstown, NJ).

MÉTODOS GERAIS

A leitura da densidade óptica para mensurar a concentração de células de micro-organismos foi feita utilizando de um espectrofotômetro *Thermo Electron Corporation Helios Alpha*. As medidas foram tipicamente feitas utilizando um comprimento de onda de 600 nanômetros.

Concentração de glicose no caldo de cultura foi mensurada rapidamente usando um analisador "*2700 Select Biochemistry Analyzer*" (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH). Amostras de caldo de cultura foram

centrifugadas em temperatura ambiente por 2 minutos a 13.200 rpm em tubos Eppendorf de 1,8 mL, e o sobrenadante aquoso analisado quanto a concentração de glicose. O analisador realizou uma auto calibração com um padrão de glicose conhecido antes de avaliar cada conjunto de amostras de fermentador; um padrão externo também foi analisado periodicamente para garantir a integridade dos ensaios de caldo de cultura. As especificações do analisador para a análise foram as seguintes:

Tamanho da amostra: 15 µL

Sonda preta química: dextrose

10 Sonda branca química: dextrose

As concentrações de isobutanol e glicose na fase aquosa foram mensuradas por HPLC (Modelo *Waters Alliance*, Milford, MA ou Agilent série 1200, Santa Clara, CA) utilizando uma coluna BioRad Aminex HPX-87H, de 7,8 mm x 300 mm, (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA) com colunas de guarda adequadas, utilizando ácido sulfúrico aquoso 0,01 N, isocrático como eluente. A amostra passou através de um filtro de centrifuga de 0,2 µm (Nanosep MF nylon modificado) em um frasco de HPLC. As condições de execução do HPLC foram as seguintes:

Volume de Injeção: 10 µL

20 Vazão: 0,60 mL/minuto

Tempo de execução: 40 minutos

Temperatura da coluna: 40 °C

Detector: índice de refração

Temperatura do Detector: 35 °C

25 Detecção por UV: 210 nm, 8 nm de largura de banda

Após a execução, as concentrações nas amostras foram determinadas a partir de curvas padrões para cada um dos compostos. Os tempos de retenção foram 32,6 e 9,1 minutos para o isobutanol e glicose,

respectivamente.

O isobutanol e etanol na fase extrator orgânica foram mensurados por meio da cromatografia gasosa (GC) conforme descrito abaixo.

O seguinte método de GC foi usado para determinar a quantidade
5 de isobutanol e etanol na fase orgânica. O método de cromatografia gasosa utilizou uma coluna J&W Scientific DB-WAXETR (50 m x 0,32 mm ID, 1 µm de filme) da Agilent Technologies (Santa Clara, CA). O gás de arraste foi o hélio a uma vazão de 4 mL/min mensurado a 150 °C com uma pressão constante; injetor tipo *split* foi de 1:5 a 250 °C; a temperatura do forno foi de 40 °C por 5
10 min, 40 °C a 230 °C a 10 °C/min, e 230 °C por 5min. A detecção utilizando um detector por ionização de chama (FID) foi usada a 250 °C, com 230 mL/min de composição de gás hélio. Amostras de caldo de cultura foram centrifugadas antes da injeção.

O volume de injeção foi de 1.0 µL. Curvas-padrão calibradas
15 foram geradas para o etanol e isobutanol. Sob estas condições, o tempo de retenção do isobutanol foi de 9,9 minutos, e o tempo de retenção para o etanol foi de 8.7 minutos.

CONSTRUÇÃO DE UMA CEPA DE E. COLI POSSUINDO DELEÇÕES DOS GENES PFLB, FRDB, LDHA E ADHE

20 É fornecido na presente invenção um método adequado para a deleção dos genes *pflB*, *frdB*, *ldhA*, *adhE* a partir da *E. coli*. A coleção Keio de cepas de *E. coli* (Baba *et al.*, *Mol. Syst. Biol.*, 2:1-11, 2006) foi utilizada para a produção de oito dos nocautes. A coleção Keio (disponível a partir da NBRP no Instituto Nacional de Genética do Japão) é uma biblioteca de nocautes gênicos
25 criada na cepa BW25113 de *E. coli* pelo método de Datsenko e Wanner (Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97 6640-6645, 2000). Na coleção, cada gene deletado foi substituído por um marcador canamicina flanqueado por FRT que era removível pela recombinase Flp. A

cepa de *E. coli* carregando múltiplos nocautes foi construída pela remoção do marcador de canamicina-nocaute a partir da cepa doadora Keio pela transdução em bacteriófago P1 a uma cepa receptora. Após cada transdução de P1 para produzir um nocaute, o marcador canamicina foi removido pela recombinação Flp. Esta linhagem sem marcador agiu como a nova cepa receptora para a próxima transdução P1. Um dos nocautes descritos foi construído diretamente na cepa utilizando o método de Datsenko e Wanner (*supra*), em vez de utilizar a transdução P1.

A cepa de *E. coli* 4KO foi construída na Keio cepa JW0886 pelas transduções P1_{vir} com lisados de fago P1 preparados a partir de três cepas Keio. As cepas de Keio usadas estão listadas abaixo:

- JW0886: o marcador kan está inserido no *pflB*
- JW4114: o marcador kan está inserido no *frdB*
- JW1375: o marcador kan está inserido no *ldhA*
- JW1228: o marcador kan está inserido no *adhE*

[As sequências correspondentes aos genes inativados são: *pflB* (SEQ ID NO: 71), *frdB* (SEQ ID NO: 73), *ldhA* (SEQ ID NO: 77), *adhE* (SEQ ID NO: 75).]

A remoção do marcador canamicina flanqueada com FTR a partir do cromossomo foi realizada mediante a transformação da cepa resistente à canamicina com um pCP20, um plasmídeo resistentes à ampicilina (Cherepanov e Wackernagel, *supra*). Os transformantes foram semeados em placas LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. O plasmídeo pCP20 carrega a recombinase FLP de levedura sob o controle do promotor \square_{PR} e a expressão a partir deste promotor é controlada pelo repressor sensível à temperatura cl857 residente no plasmídeo. A origem de replicação do pCP20 também é sensível à temperatura.

A remoção do marcador canamicina flanqueada com *loxP* a partir

do cromossomo foi realizada pela transformação da cepa resistente à canamicina com um plasmídeo resistentes à ampicilina pJW168 (Wild *et al.*, *Gene*. 223:55-66, 1998) carregando a recombinase Cre do bacteriófago P1. A recombinase Cre (Hoess, RH e Abremski, K. *supra*) medeia a excisão do gene de resistência à canamicina via recombinação nos sítios *loxP*. A origem de replicação do pJW168 é a do pSC101 sensível à temperatura. Os transformantes foram semeados em placas LB contendo 100 µg/mL de ampicilina.

A cepa JW0886 ($\Delta pflB::kan$) foi transformada com o plasmídeo pCP20 e semeada sobre as placas LB contendo 100 µg/mL de ampicilina a 30 °C. Os transformantes resistentes à ampicilina foram selecionados, estriados sobre as placas LB e cultivados a 42 °C. As colônias isoladas foram plaqueadas sobre placas com meio seletivo para ampicilina e canamicina e placas LB. As colônias sensíveis a canamicina e ampicilina foram triadas por PCR de colônia com *primers pflB CkUp* (SEQ ID NO: 78) e *pflB CkDn* (SEQ ID NO: 79). Uma alíquota de 10 µL da mistura de reação da PCR foi analisada por eletroforese em gel. O produto da PCR esperado de aproximadamente 0,4 kb foi observado confirmando a remoção do marcador e criando a cepa "JW0886 sem marcação". Esta cepa tem uma deleção do gene *pflB*.

A cepa "JW0886 sem marcação" foi transduzida com um lisado de P1_{vir} a partir do JW4114 (*frdB::kan*) e foi estriada sobre placas LB contendo 25 µg/mL de canamicina. O transdutantes resistentes a canamicina foram selecionados por PCR de colônia com *primers frdB CkUp* (SEQ ID NO: 80) e *frdB CkDn* (SEQ ID NO: 81). Os clones que produziram o produto da PCR esperado de aproximadamente 1,6 kb foram tornados eletrocompetentes e transformados com o pCP20 para a remoção do marcador, conforme descrito acima. Os transformantes foram distribuídos primeiro sobre placas LB contendo 100 µg/mL de ampicilina a 30 °C e os transformantes resistentes a ampicilina

foram selecionados e semeados sobre placas LB e cultivados a 42 °C. As colônias isoladas foram semeadas sobre placas com meio seletivo para ampicilina e canamicina e placas LB. As colônias sensíveis a canamicina e ampicilina foram triadas por PCR de colônia com *primers frdB CkUp* (SEQ ID NO: 80) e *frdB CkDn* (SEQ ID NO: 81). O produto da PCR esperado de aproximadamente 0,4 kb foi observado confirmando a remoção do marcador e criando a cepa com duplo nocaute " $\Delta pflB$ *frdB*".

A cepa duplo nocaute foi transduzida com um lisado P1_{vir} a partir do JW1375 ($\Delta ldhA::kan$) e semeada sobre placas LB contendo 25 µg/mL de canamicina. Os transdutantes resistentes a canamicina foram selecionados por PCR de colônia com *primers ldhA CkUp* (SEQ ID NO: 82) e *ldhA CkDn* (SEQ ID NO: 83). Os clones que produziram o produto de PCR esperado de 1,5 kb foram tornados eletrocompetentes e transformados com o pCP20 para a remoção do marcador, conforme descrito acima. Os transformantes foram semeados sobre placas LB contendo 100 µg/mL de ampicilina a 30 °C e os transformantes resistentes à ampicilina foram semeados sobre placas LB e cultivados a 42 °C. As colônias isoladas foram plaqueadas sobre placas com meio seletivo para ampicilina e canamicina e placas LB. As colônias sensíveis à canamicina e sensíveis à ampicilina foram triadas por PCR com os *primers ldhA CkUp* (SEQ ID NO: 82) e *ldhA CkDn* (SEQ ID NO: 83) para um produto de 0,3 kb. Os clones que produziram o produto da PCR esperado de aproximadamente 0,3 kb confirmaram a remoção do marcador e criaram a cepa com nocaute triplo designada "3Ko" ($\Delta pflB$ *frdB ldhA*).

A cepa "3KO" foi transduzida com um lisado P1_{vir} a partir do JW1228 ($\Delta adhE::kan$) e semeada sobre placas LB contendo 25 µg/mL de canamicina. Os transdutantes resistentes à canamicina foram selecionados por PCR de colônia com *primers adhE CkUp* (SEQ ID NO: 84) e *adhE CkDn* (SEQ ID NO: 85). Os clones que produziram o produto da PCR esperado de 1,6 kb

foram denominados de 3KO *adhE::kan*. A cepa 3KO *adhE::kan* foi tornada eletrocompetente e transformada com pCP20 para a remoção do marcador. Os transformantes foram semeados sobre placas LB contendo 100 µg/mL de ampicilina a 30 °C. Os transformantes resistentes à ampicilina foram estriados sobre placas LB e cultivados a 42 °C. As colônias isoladas foram plaqueadas sobre placas seletivas para ampicilina e canamicina e placas LB. As colônias sensíveis à canamicina e sensíveis à ampicilina foram triadas por PCR com os primers *adhE* CkUp (SEQ ID NO: 84) e *adhE* CkDn (SEQ ID NO: 85). Os clones que produziram o produto da PCR esperado de aproximadamente 0,4 kb foram denominados de "4KO" ($\Delta pflB$ *frdB* *ldhA* *adhE*).

CONSTRUÇÃO DE UM HOSPEDEIRO DE PRODUÇÃO E. COLI (CEPA NGCI-031)
CONTENDO UMA VIA BIOSSINTÉTICA DO ISOBUTANOL E DELEÇÕES DOS GENES PFLB,
FRDB, LDHA, E ADHE

Um fragmento de DNA codificante do *sadB*, uma butanol desidrogenase (DNA: SEQ ID NO: 9; proteína: SEQ ID NO: 10) da *Achromobacter xylosoxidans* foi amplificado a partir do DNA genômico da *A. xylosoxidans* utilizando condições padrões. O DNA foi preparado usando o kit "Gentra Puregene" (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN; número de catálogo D-5500A), seguindo o protocolo recomendado para micro-organismos gram-negativos. A amplificação por PCR foi feita utilizando os primers direto (*forward*) e reverso (*reverse*), N473 e N469 (SEQ ID NOs: 86 e 87), respectivamente, com a DNA polimerase "Phusion High Fidelity DNA Polymerase" (New England Biolabs, Beverly, MA). O produto da PCR foi clonado por *TOPO-Blunt* em *pCR4 Blunt* (Invitrogen) para produzir o pCR4Blunt::*sadB*, que foi transformado em células de *E. coli* Mach-1. O plasmídeo foi posteriormente isolado a partir de quatro clones, e a sequência verificada.

A região de codificação *sadB* foi então clonada no vetor pTrc99a

(Amann *et al*, *Gene* 69:301-315, 1988.). O pCR4Blunt::sadB foi digerido com *EcoRI*, liberando o fragmento sadB, que foi ligado com o pTrc99a digerido com *EcoRI* para gerar o pTrc99a::sadB. Este plasmídeo foi transformado em células *E. coli* Mach-1 e os transformantes resultantes foram denominados Mach1/pTrc99a::sadB. A atividade da enzima expressa a partir do gene *sadB* nessas células foi determinada em 3,5 mmol/min/mg de proteína em extratos de células livres quando analisadas usando o isobutiraldeído como padrão.

O gene *sadB* foi então subclonado em um pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD conforme descrito abaixo. O pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD é o vetor de expressão pTrc-99a carregando um óperon para a expressão de isobutanol (descrito nos Exemplos 9-14 do Pedido de Patente Publicado US 20070092957). O primeiro gene no óperon do isobutano do pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD é o *budB* que codifica uma acetolactato sintase da *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25.955, seguido pelo gene *ilvC* codificante da ácido acetohidroxi reductoisomerase de *E. coli*. Este é seguido pelo gene *ilvD* codificante da ácido acetohidroxi desidratase de *E. coli* e por último o gene *kivD* codificante da cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada do *L. lactis*.

A região de codificação do *sadB* foi amplificada a partir do pTrc99a::sadB utilizando os *primers* N695A (SEQ ID NO: 88) e N696A (SEQ ID NO: 89) com a DNA polimerase "*Phusion High Fidelity DNA polimerase*" (New England Biolabs, Beverly, MA) A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial a 98 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 62 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C durante 20 segundos e um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 min, seguido por uma temperatura final de 4 °C.

O *primer* N695A continha um sítio de restrição *AvrII* para clonagem e um RBS a montante do códon de iniciação ATG da região de codificação do *sadB*. O *primer* N696A continha um sítio *XbaI* para clonagem. O

produto da PCR de 1,1 kb foi digerido com *AvrII* e *XbaI* (New England Biolabs, Beverly, MA) e purificado em gel usando um kit de extração “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (Qiagen Inc., Valencia, CA)).

O fragmento purificado foi ligado com pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD, que havia sido cortado com as mesmas enzimas de restrição, utilizando uma ligase de DNA T4 (New England Biolabs, Beverly, MA). A mistura de ligação foi incubada a 16 °C durante a noite, e depois transformada em células competentes *E. coli* Mach-1[®] (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante.

Os transformantes foram obtidos após o crescimento em ágar LB com 100 µg/ml de ampicilina. O DNA plasmidial a partir dos transformantes foi preparado com o kit “*QIAprep Spin Miniprep Kit*” (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. O plasmídeo resultante foi denominado de pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD-sadB.

As células eletrocompetentes das cepas 4KO foram preparadas conforme descrito e transformadas com pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD-sadB (“pBCDDDB”). Os transformantes foram semeados em estrias sobre placas LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. A cepa resultante carregando o plasmídeo pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD-sadB com 4KO (designada cepa NGCI-031) foi usada para estudos de fermentação nos Exemplos indicados.

EXEMPLO 1

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ELETRÓLITO SOBRE O COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

(K_p)

A finalidade deste exemplo foi a de avaliar o efeito de concentrações de eletrólito no meio de fermentação sobre o coeficiente de partição (K_p) do isobutanol quando o álcool oleílico foi usado como o agente extrator. O meio basal para fermentação (BFM) normalmente usado nas fermentações de *E. coli* foi utilizado como o meio de fermentação neste Exemplo. A composição do BFM é mostrada na Tabela 2.

TABELA 2**COMPOSIÇÃO DO BFM**

| Componentes | Concentração (g/L) ou conforme indicado | Concentração (milimoles/L; mM) |
|---------------------------------------|--|-----------------------------------|
| Fosfato de potássio monobásico | 13,3 | 97,73 |
| Fosfato de amônio dibásico | 4,0 | 30,28 |
| Ácido cítrico mono-hidrato | 1,7 | 8,09 |
| Sulfato de magnésio heptahidratado | 2,0 | 8,11 |
| Oligoelementos (mL/L) | 10,0 | -- |
| Cloridrato de tiamina (mg/L) | 4,5 | -- |
| Extrato de levedura | 5,0 | -- |
| Anti-espumante Sigma 204 (mL/L) | 0,20 | -- |
| Glicose | 30,0 | -- |

A solução de oligoelementos utilizada no meio acima foi preparada da seguinte forma. Os ingredientes listados abaixo foram adicionados na ordem listada e a solução aquecida a 50 – 60 °C até que todos os componentes estivessem completamente dissolvidos. O citrato férrico foi adicionado lentamente após outros ingredientes na solução. A solução foi esterilizada por filtração utilizando filtros de 0,2 micron.

EDTA

10

| | |
|--|----------|
| (Ácido Etilenodiaminotetracético) | 0,84 g/L |
| Dicloreto de cobalto hexahidratado (cloreto de cobalto 6-hidrato) | 0,25 g/L |
| Dicloreto de manganês tetra hidratado (cloreto de manganês 4-hidrato) | 1,5 g/L |

| | | |
|---|--------------------------------|----------|
| | Cloreto cúprico dihidratado | 0,15 g/L |
| | Ácido Bórico (H_3BO_3) | 0,30 g/L |
| | Molibdato de sódio dihidratado | 0,25 g/L |
| | Acetato de Zinco dihidratado | 1,30 g/L |
| 5 | Citrato férrico | 10,0 g/L |

O nível inicial de sais totais (soma de fosfato de potássio monobásico, fosfato de amônia dibásico, ácido cítrico monohidratado, e sulfato de magnésio heptahidratado) no BFM conforme mostrado na Tabela 2 é calculado para ser de aproximadamente 144,2 mM.

10 Uma vez que uma *E.coli* biocatalisadora foi utilizada nos Exemplos apresentados abaixo, o hidrocloreto de betaina (Sigma-Aldrich) a 0,31 g/L (2 mmoles/L) foi adicionado ao meio basal para fermentação, uma vez que ele é descrito na literatura (A, Cosquer *et al*; 1999; *Appl Environ Microbiol* 65:3304-3311) por melhorar a tolerância da *E.coli* ao sal.

15 O seguinte procedimento experimental foi utilizado para gerar os dados das Tabelas 3 e 4. Nestes experimentos de medição do K_p, uma quantidade especificada de eletrólito como sulfato de sódio (Na_2SO_4) ou cloreto de sódio (NaCl) foi adicionada ao meio basal para fermentação. Em 30 mL de BFM suplementado com sacarose, 10 mL de extrator isobutanol rico em álcool
20 oleílico (OA) contendo 168 g/L de isobutanol foram adicionados e misturados vigorosamente durante 4 - 8 horas a 30 °C com agitação a 250 rpm em um agitador de mesa (Innova 4230, *New Brunswick Scientific*, Edison, NJ) para atingir o equilíbrio entre as duas fases. As fases aquosa e orgânica em cada frasco foram separadas por decantação.

25 A fase aquosa foi centrifugada (2 minutos a 13.000 rpm com uma centrífuga *Eppendorf* modelo 5415R) para remover a fase de extrator residual e o sobrenadante analisado por HPLC para quantificar a glicose e isobutanol.

A análise dos níveis de isobutanol na fase aquosa após 4 horas de

agitação foi semelhante àquela obtida após 8 horas de mistura sugerindo que o equilíbrio entre as duas fases foi atingida dentro de 4 horas. A intenção foi demonstrar que o procedimento de mistura por mais de 4 horas não altera o K_p .

Os coeficientes de partição (K_p) para a distribuição de isobutanol entre as fases orgânica e aquosa foram calculados a partir da quantidade conhecida de isobutanol adicionado ao frasco e os dados de concentração de isobutanol mensurados na fase aquosa.

A concentração de isobutanol na fase extrator foi determinada pelo balanço de massa. O coeficiente de partição foi determinado como a razão entre as concentrações de isobutanol nas fases orgânica e aquosa, ou seja, $K_p = [\text{isobutanol}]_{\text{fase orgânica}} / [\text{isobutanol}]_{\text{fase aquosa}}$. Cada ponto de dados corresponde a um nível especificado de eletrólito conforme mostrado na Tabela 3 e Tabela 4 foi repetido duas vezes e os valores do K_p foram relatados como a média dos dois frascos.

TABELA 3

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE SÓDIO (Na_2SO_4) SOBRE O K_p DO

ISOBUTANOL

| Concentração total inicial de Sais no BFM (Tabela 2) moles/l (a) | Quantidade de Sulfato de Sódio adicionada ao BFM Na_2SO_4 (moles/l) (b) | Quantidade total de sais no experimento moles/l (a) + (b) | K_p |
|--|---|--|-------|
| 0,14 | 0,00 | 0,14 | 4,80 |
| 0,14 | 0,03 | 0,17 | 5,03 |
| 0,14 | 0,07 | 0,21 | 5,25 |
| 0,14 | 0,15 | 0,29 | 5,78 |
| 0,14 | 0,22 | 0,36 | 6,37 |
| 0,14 | 0,29 | 0,43 | 7,12 |
| 0,14 | 0,44 | 0,58 | 8,34 |
| 0,14 | 0,67 | 0,81 | 10,50 |
| 0,14 | 1,00 | 1,14 | 15,95 |
| 0,14 | 1,33 | 1,47 | 24,68 |
| 0,14 | 2,00 | 2,14 | 60,99 |

TABELA 4**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO (NaCl) SOBRE O K_p DO****ISOBUTANOL**

| Concentração total inicial de Sais no BFM (Tabela 2) moles/l (a) | Quantidade de Cloreto de Sódio adicionada ao BFM NaCl (moles/l) (b) | Quantidade total de sais no experimento moles/l (a) + (b) | K_p |
|--|---|--|-------|
| 0,14 | 0,00 | 0,14 | 4,87 |
| 0,14 | 0,01 | 0,15 | 4,87 |
| 0,14 | 0,04 | 0,18 | 4,89 |
| 0,14 | 0,07 | 0,21 | 4,95 |
| 0,14 | 0,11 | 0,25 | 5,00 |
| 0,14 | 0,14 | 0,28 | 5,00 |
| 0,14 | 0,21 | 0,35 | 5,22 |
| 0,14 | 0,33 | 0,47 | 5,04 |
| 0,14 | 0,67 | 0,81 | 5,91 |
| 0,14 | 1,00 | 1,14 | 6,88 |
| 0,14 | 1,33 | 1,47 | 8,06 |

Os resultados da Tabela 3 e Tabela 4 demonstram que a
 5 suplementação do meio de fermentação aquoso com os eletrólitos Na_2SO_4 e
 NaCl resultou em maior K_p para o isobutanol em um sistema de duas fases
 com álcool oleílico como fase extrator.

EXEMPLO 2**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ELETRÓLITO NA TAXA DE CRESCIMENTO DA E.COLI**

10 Para avaliar o efeito de eletrólitos, tal como o Na_2SO_4 sobre as
 propriedades de crescimento do biocatalisador, a *E. coli* cepa 4KO foi cultivada
 em frascos para agitação em meio BFM suplementado com 0,31 g/L de
 cloridrato de betaína e diferentes níveis de Na_2SO_4 (0 – 284 g/L) a 30 °C, 250
 RPM em agitadores de mesa da *Innova*. A partir de um frasco congelado, 25
 15 mL de cultura para semeadura foi cultivada em caldo LB da Difco, meio Miller,
 comprado da BD Laboratories (*Becton Dickinson and Company*, Sparks, MD,

21152, EUA) a 30 °C, 200 RPM. 1 mL desta cultura para semeadura foi adicionado a frascos para agitação contendo 30 mL de meio BFM suplementado com 0,31 g/L de cloridrato de betaína e diferentes níveis de Na_2SO_4 . As amostras foram retiradas nos pontos de tempo definidos para monitorar o crescimento de biomassa mensurado pela OD_{600} . As taxas de crescimento foram calculadas a partir dos perfis de tempo de biomassa pelo ajuste das equações de taxa de crescimento exponencial.

TABELA 5**EFEITO DO Na_2SO_4 SOBRE A TAXA DE CRESCIMENTO DA E. COLI CEPA 4KO**

| Concentração total inicial de sais no BFM (Tabela 2) moles/l (A) | Concentração de Na_2SO_4 (mol/L) adicionado ao BFM (B) | Quantidade total de sais no experimento moles/l A + B | Taxa de crescimento da E, coli (μ hr ⁻¹) |
|--|--|--|---|
| 0,14 | 0,00 | 0,14 | 0,79 |
| 0,14 | 0,03 | 0,17 | 0,79 |
| 0,14 | 0,07 | 0,21 | 0,79 |
| 0,14 | 0,15 | 0,29 | 0,79 |
| 0,14 | 0,22 | 0,36 | 0,74 |
| 0,14 | 0,29 | 0,43 | 0,69 |
| 0,14 | 0,44 | 0,58 | 0,60 |
| 0,14 | 0,67 | 0,81 | 0,55 |
| 0,14 | 1,00 | 1,14 | 0,14 |
| 0,14 | 1,33 | 1,47 | Crescimento insignificante |
| 0,14 | 2,00 | 2,14 | Crescimento Insignificante |

10

Os dados da taxa de crescimento mostrados na Tabela 5 sugerem que o biocatalisador pode tolerar níveis de sal tão elevados quanto cerca de 0,67 M de Na_2SO_4 (nível total de sal de 0,81 M) com uma perda de 30% da taxa de crescimento em comparação com qualquer eletrólito controle.

No entanto, existe uma queda significativa (superior a cerca de

80%) na taxa de crescimento em concentrações de sal de 1M.

Os dados da Tabela 3 mostram que na concentração de Na_2SO_4 a 0,67 M, o K_p para o butanol aumenta em duas vezes em comparação com qualquer controle de adição de sal quando o álcool oleílico está presente como a fase extrator.

Assim, o efeito final global obtido pela adição de um eletrólito em uma fermentação extrativa de 2 fases utilizando um micro-organismo recombinante produtor de butanol pode ser imprevisível, uma vez que por um lado os eletrólitos podem inibir o crescimento celular (Tabela 3), mas por outro lado eles podem aumentar o coeficiente de partição do produto butanol tóxico, o que pode atenuar os efeitos tóxicos sobre o micro-organismo.

EXEMPLO 3

EFEITO DA ADIÇÃO DE ELETRÓLITO NA TAXA, TÍTULO, E RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE BUTANOL EM UM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE DUAS FASES

A finalidade deste exemplo foi demonstrar as vantagens da adição de pelo menos uma quantidade suficiente de eletrólito na fase aquosa de uma fermentação extrativa de duas fases em que butanol é produzido por um micro-organismo recombinante, uma cepa de *Escherichia coli* (NGCI-031) que contém uma via biossintética do isobutanol. A fermentação extrativa utiliza o álcool oleílico como extrator orgânico imiscível em água.

A *Escherichia coli* cepa NGCI-031 foi construída conforme descrito na seção Métodos Gerais acima. Todas as culturas de semeadura para a preparação de inóculo foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) com ampicilina (100 mg/L) como o antibiótico de seleção. O meio de fermentação utilizado foi um meio semi-sintético suplementado com 2 mmoles/L de cloridrato de betaína, cuja composição é apresentada na Tabela 6.

TABELA 6**COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO**

| Ingrediente | Quantidade/L | Quantidade (mmoles/L) |
|--|--------------|-----------------------|
| Ácido fosfórico a 85% | 0,75 mL | 14,4 |
| Ácido sulfúrico (18 M) | 0,30 mL | 5,60 |
| De Balch com cobalto - 1000X (composição dada na Tabela 7) | 1,00 mL | NA |
| Fosfato de potássio monobásico | 1,40 g | 10,30 |
| Ácido cítrico | 2 g | 9,50 |
| Sulfato de magnésio heptahidratado | 2 g | 8,10 |
| Citrato de amônio férrico | 0,33 g | 1,25 |
| Cloreto de cálcio di-hidratado, | 0,20 g | 1,36 |
| Extrato de Levedura ^a | 5,00 g | |
| Anti-espumante 204 ^b | 0,20 mL | |
| Cloridrato de betaina | 0,32 g | |
| Cloridrato de tiamina, 5g/L, estoque | 1,00 mL | |
| Ampicilina, 25 mg/mL, estoque | 4,00 mL | |
| Glicose 50% em peso, estoque | 33,3 mL | |

^aObtido da *BD Diagnostic Systems*, Sparks, MD

^bObtido da *Sigma-Aldrich*

5

TABELA 7**TRAÇOS DE METAIS DE BALCH MODIFICADO – 1000X**

| Ingrediente | Concentração (g/L) |
|--|--------------------|
| Ácido cítrico | 40,0 |
| MnSO ₄ H ₂ O | 30,0 |
| NaCl | 10,0 |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 1,0 |
| CoCl ₂ 6H ₂ O | 1,0 |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 1,5 |
| CuSO ₄ 5H ₂ O | 0,1 |
| Ácido bórico (H ₃ BO ₃) | 0,1 |
| Molibdato de sódio (NaMoO ₄ 2H ₂ O) | 0,1 |

Os ingredientes de 1-11 da Tabela 6 foram adicionados à água na

concentração prescrita para fazer um volume final de 0,4 L no fermentador. O conteúdo do fermentador foi esterilizado em autoclave. Os componentes 12-14 foram misturados, esterilizados por filtração e então adicionados ao fermentador, após o meio autoclavado ser resfriado. O volume total final do meio de fermentação (na fase aquosa) foi de cerca de 0,5 L após a adição de 50 mL da semente de inóculo.

O eletrólito na forma de Na_2SO_4 foi adicionado em concentrações de 0 g/L, 40 g/L ou 60 g/L ao meio antes da esterilização. As soluções de ampicilina, cloridrato de tiamina, e glicose esterilizadas por filtros foram adicionadas ao meio fermentador, após a esterilização, em uma concentração final de 100 mg/L, 5 mg/L e 20 g/L, respectivamente. As fermentações foram realizadas utilizando um bioreator autoclavável de 1 L, Bio Console ADI 1025 (Applikon, Inc, Holanda), com um volume de trabalho de 900 mL. A temperatura foi mantida a 30 °C durante toda a fermentação e o pH foi mantido em 6,8 utilizando hidróxido de amônio. Após a inoculação do meio de fermentação estéril com a cultura para semeadura (2-10 %vol), o fermentador foi operado em condições aeróbias a 30% de oxigênio dissolvido (DO) fixado com 0,3 vvm de fluxo de ar, enquanto a taxa de agitação (rpm) foi controlada automaticamente. Quando a densidade óptica desejada (OD_{600}) foi alcançada (ou seja, $\text{OD}_{600} = 10$), a cultura foi induzida com a adição de 0,4-0,5 mM de beta-D-1- tiogalactopiranosídeo de isopropila para superexpressar da via biossintética do isobutanol. Quatro horas após a indução, as condições de fermentação foram alteradas para condições de microaerofilia, diminuindo o fluxo de ar para 0,13 slpm e configurando o ponto de DO (oxigênio dissolvido) em 3-5%.

A mudança para condições de microaerofilia iniciou a produção de isobutanol, minimizando a quantidade de carbono para a produção de biomassa, e desse modo, desacoplando a formação da biomassa da produção de isobutanol.

O álcool oleílico (cerca de 250 mL) foi adicionado durante a fase de produção de isobutanol para aliviar o problema de inibição devido ao acúmulo de isobutanol na fase aquosa. A glicose foi adicionada como um *bolus* (50 %peso da solução de estoque) em função da necessidade ao fermentador para manter os níveis de glicose entre 20 g/L e 2 g/L.

Devido à produção eficiente de isobutanol necessitar de condições microaeróbicas para permitir o equilíbrio redox na via biossintética, o ar era fornecido continuamente ao fermentador a 0,3 vvm. A aeração prolongada levou a uma significativa remoção de isobutanol a partir da fase aquosa do fermentador.

Para quantificar a perda de isobutanol, devido a dessorção, o gás de escape do fermentador foi enviado diretamente a um espectrômetro de massa (espectrômetro de massa Prima dB, Thermo Electron Corp . Madison, WI) para quantificar a quantidade de isobutanol no fluxo de gás. Os picos de isobutanol nas relações de carga de 74 ou 42 foram utilizados para determinar a quantidade de isobutanol presente no fluxo de gás.

Para a produção de isobutanol, o título efetivo, taxa efetiva e rendimento efetivo da produção de isobutanol, todos corrigidos pela perda de isobutanol devido a remoção, são mostrados abaixo na forma de tabela (Tabela 8). O isobutanol na fase aquosa foi mensurado utilizando o método de HPLC descrito acima no presente.

O isobutanol na fase extrator em álcool oleílico foi mensurado utilizando o método de GC descrito acima no presente. Os níveis de glicose foram monitorados utilizando HPLC e YSI, conforme descrito anteriormente.

Como pode ser observado a partir dos resultados na Tabela 8, o uso de eletrólitos em uma fermentação extrativa para a produção de isobutanol resulta em título efetivo, taxa efetiva, e rendimento efetivo significativamente maiores em comparação com o caso em que nenhum sal é adicionado.

O produto isobutanol, que é tóxico para a bactéria hospedeira, é continuamente extraído para a fase do álcool oleílico, diminuindo sua concentração na fase aquosa, reduzindo desse modo sua toxicidade para o micro-organismo.

- 5 Além disso, uma melhora inesperada na taxa efetiva, título efetivo, e rendimento efetivo é observada quando o sal é adicionado ao meio. A adição de sais, em princípio, poderia não apenas ter um efeito deletério sobre o metabolismo do biocatalisador produtor de butanol, como também poderia aliviar o efeito inibitório do butanol, aumentando o Kp do
- 10 butanol em comparação com qualquer controle sem a adição de sal.

O efeito final pela adição de sais em nosso sistema de extração de duas fases favorece a produção e recuperação aumentada de butanol.

TABELA 8

15 **EFEITO DE SAIS SOBRE A TAXA, TÍTULO E RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE BUTANOL NO EXEMPLO 3.**

| Concentração de Na_2SO_4 adicionado ao meio de fermentação na Tabela 6 (moles/l) | Quantidade total de sais no experimento (Tabela 6 + Na_2SO_4) moles/l | Taxa efetiva (g/L/h) | Título efetivo (g/L) | Rendimento efetivo (g/g) | Kp [Conc na fase OA]/[Conc na Fase Aq] |
|--|--|----------------------|----------------------|--------------------------|--|
| 0 | 0,05 | 0,09 | 6 | 0,06 | 3,1 |
| 0,28 | 0,33 | 0,14 | 9 | 0,10 | 4,5 |
| 0,42 | 0,47 | 0,14 | 9,4 | 0,12 | 5,4 |

A quantidade inicial de sais no meio de fermentação (Tabela 6) foi de cerca de 0,05 moles/L.

EXEMPLO 4**EFEITO DA ADIÇÃO DE ELETRÓLITO NA TAXA, TITULAÇÃO E RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE BUTANOL ACOPLADO COM EXTRAÇÃO GASOSA (DESSORÇÃO) DO BUTANOL DURANTE A FERMENTAÇÃO**

5 A fim de avaliar o efeito da adição de eletrólito na produção de butanol durante a fase aquosa de fermentação sem a adição de extrator álcool oleílico, Exemplo 3 foi repetido, exceto que o álcool oleílico não foi adicionado a qualquer um dos fermentadores. Neste exemplo, a dessorção do butanol a partir da fase aquosa foi prevalente devido a pulverização de

10 ar dos fermentadores. A quantidade de butanol evaporada para o gás de escape foi quantificada como no Exemplo 3 pela utilização da espectrometria de massa. A taxa efetiva, título efetivo, e rendimento efetivo, todos corrigidos pela perda de butanol devido a evaporação são mostrados abaixo na Tabela 9.

15

TABELA 9**EFEITO DE SAIS SOBRE A TAXA, TÍTULO E RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE BUTANOL ACOPLADO COM EXTRAÇÃO GASOSA (DESSORÇÃO) DO BUTANOL DURANTE A FERMENTAÇÃO PARA O EXEMPLO 4**

| Concentração de Na_2SO_4 adicionado ao meio de fermentação na Tabela 6 (moles/l) | Quantidade total de sais no experimento (Tabela 6 + Na_2SO_4) moles/l | Taxa efetiva (g/L/h) | Título efetivo (g/L) | Rendimento efetivo (g/g) | "Gramas" de isobutanol perdido devido à remoção |
|--|--|----------------------|----------------------|--------------------------|---|
| 0 | 0,05 | 0,08 | 6,0 | 0,11 | 2,55 |
| 0,28 | 0,33 | 0,16 | 10,6 | 0,17 | 4,25 |
| 0,42 | 0,47 | 0,17 | 10,9 | 0,14 | 5,01 |

[Quantidade inicial de sais no meio de fermentação (Tabela 9) foi de cerca de

20 0,05 moles/L].

Os resultados de tabela 9 mostram que a adição de eletrólito

na fase aquosa aumenta a taxa, título e rendimento efetivos da produção de butanol na ausência de álcool oleílico pelo aumento da taxa de dessorção do isobutanol. As gramas de butanol extraídas por dessorção são quase duas vezes mais elevadas na presença de sal quando comparado com o caso em que não houve a adição de eletrólito.

Embora exemplos de realizações específicas da presente invenção tenham sido descritos na descrição acima, será compreendido pelos técnicos hábeis no assunto que a invenção é suscetível de inúmeras modificações, substituições e rearranjos sem se afastar do espírito ou atributos essenciais da invenção. Deve ser feita referência às reivindicações anexas, ao invés do relatório descritivo acima mencionado, como indicativa do escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA RECUPERAR BUTANOL a partir de um meio de fermentação, caracterizado pelo fato de que compreende:

- a) fornecer um meio de fermentação compreendendo butanol, água, pelo menos um eletrólito em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação, e um micro-organismo geneticamente modificado que produz butanol a partir de pelo menos uma fonte de carbono fermentável;
- b) colocar em contato o meio de fermentação com i) um primeiro extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , amidas graxas C_{12} a C_{22} e misturas dos mesmos, e opcionalmente, ii) um segundo extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_7 a C_{22} , ácidos graxos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_7 a C_{22} , aldeídos graxos C_7 a C_{22} , amidas graxas C_7 a C_{22} , e misturas dos mesmos para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol; e
- c) recuperar o butanol a partir da fase orgânica contendo butanol para produzir butanol recuperado.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma porção do butanol é removida simultaneamente do meio de fermentação por um processo compreendendo as etapas de:

- a) dessorver (*stripping*) o butanol a partir do meio de fermentação com um gás para formar uma fase gasosa contendo butanol; e
- b) recuperar o butanol a partir da fase gasosa contendo butanol.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o eletrólito é adicionado ao meio de fermentação, ao primeiro extrator, ao segundo extrator opcional, ou à combinação dos mesmos.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o eletrólito compreende um sal possuindo um cátion selecionado a partir do grupo que consiste em lítio, sódio, potássio, rubídio, cézio, magnésio, cálcio, estrôncio, bário, amônio, fósforo, e combinações dos mesmos.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o eletrólito compreende um sal possuindo um ânion selecionado a partir do grupo que consiste em sulfato, carbonato, acetato, citrato, lactato, fosfato, fluoreto, cloreto, brometo, iodeto, e combinações dos mesmos.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o eletrólito é selecionado a partir do grupo que consiste em sulfato de sódio, cloreto de sódio, e combinações dos mesmos.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo geneticamente modificado é selecionado a partir do grupo que consiste em bactérias, cianobactérias, fungos filamentosos e leveduras.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a bactéria é selecionada a partir do grupo que consiste em *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* e *Brevibacterium*.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a levedura é selecionada a partir do grupo que consiste em *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia* e *Saccharomyces*.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o primeiro extrator é selecionado a partir do grupo que consiste em álcool oleílico, álcool berrênico, álcool cetílico, álcool laurílico, álcool miristílico, álcool estearílico, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, miristato de metila, oleato de metila, aldeído láurico, 1-dodecanol e uma combinação dos mesmos.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o primeiro extrator compreende álcool oleílico.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o segundo extrator é selecionado a partir do grupo que consiste em 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol, 2-undecanol, 1-nonanal, e uma combinação dos mesmos.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o butanol é 1-butanol.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o butanol é 2-butanol.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o butanol é isobutanol.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o meio de fermentação compreende adicionalmente etanol, e a fase orgânica contendo butanol contém etanol.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo geneticamente modificado compreende uma modificação que inativa uma via que compete pelo fluxo de carbono.

18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo geneticamente modificado não produz acetona.

19. MÉTODO PARA PRODUZIR BUTANOL, caracterizado

pelo fato de que compreende:

- a) fornecer um micro-organismo geneticamente modificado que produz butanol a partir de pelo menos uma fonte de carbono fermentável;
- b) crescer o micro-organismo em um meio de fermentação bifásico compreendendo uma fase aquosa e i) um primeiro extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , amidas graxas C_{12} a C_{22} , e misturas dos mesmos e, opcionalmente, ii) um segundo extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis C_7 a C_{22} , ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , aldeídos C_7 a C_{22} , amidas graxas C_7 a C_{22} , e misturas dos mesmos, em que o meio de fermentação bifásico compreende adicionalmente pelo menos um eletrólito, em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação, durante um tempo suficiente para permitir a extração do butanol no extrator orgânico para formar uma fase orgânica contendo butanol;
- c) separar a fase orgânica contendo butanol da fase aquosa;
- e
- d) opcionalmente, recuperar o butanol a partir da fase orgânica contendo butanol para produzir butanol recuperado.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o eletrólito é adicionado à fase aquosa durante a fase de crescimento do micro-organismo, à fase aquosa durante a fase de produção do butanol, à fase aquosa quando a concentração de butanol na fase aquosa é inibitória, ao primeiro extrator, ao segundo extrator opcional, ou a uma combinação dos mesmos.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado

pelo fato de que o eletrólito é obtido a partir de um meio de fermentação.

22. MÉTODO PARA PRODUZIR BUTANOL, caracterizado pelo fato de que compreende:

- a) fornecer um micro-organismo geneticamente modificado
5 que produz butanol a partir de pelo menos uma fonte de carbono fermentável;
- b) crescer o micro-organismo em um meio de fermentação no qual o micro-organismo produz o butanol no meio de fermentação para produzir um meio de fermentação contendo butanol;
- c) adicionar pelo menos um eletrólito ao meio de fermentação
10 para fornecer o eletrólito em uma concentração pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol em relação àquele na presença da concentração de sal do meio basal para fermentação;
- d) colocar em contato pelo menos uma porção do meio de fermentação contendo butanol com i) um primeiro extrator orgânico
15 imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , amidas graxas C_{12} a C_{22} e misturas dos mesmos e, opcionalmente, ii) um segundo extrator orgânico imiscível em
20 água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis C_7 a C_{22} , ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos carboxílicos C_7 a C_{22} , aldeídos C_7 a C_{22} , amidas graxas C_7 a C_{22} e misturas dos mesmos, para formar uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol;
- e) opcionalmente, recuperar o butanol a partir da fase
25 orgânica contendo butanol; e
- f) opcionalmente, retornar pelo menos uma parte da fase aquosa para o meio de fermentação.

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado

pelo fato de que o eletrólito é adicionado ao meio de fermentação na etapa (c), quando a fase de crescimento do micro-organismo reduz a velocidade.

24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o eletrólito é adicionado ao meio de fermentação na etapa (c),
5 quando a fase de produção do butanol está completa.

25. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1, 19 ou 22, caracterizado pelo fato de que a dita pelo menos uma fonte de carbono fermentável está presente no meio de fermentação e compreende carbono renovável de matérias-primas agrícolas, algas, celulose,
10 hemicelulose, lignocelulose, ou qualquer combinação das mesmas.

26. COMPOSIÇÃO, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) um meio de fermentação compreendendo butanol, água, pelo menos um eletrólito em uma concentração pelo menos suficiente para
15 aumentar o coeficiente de partição do butanol no meio iônico, e um micro-organismo geneticamente modificado que produz butanol a partir de pelo menos uma fonte de carbono fermentável;

(b) um primeiro extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_{12} a C_{22} , ácidos graxos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_{12} a C_{22} , aldeídos graxos C_{12} a C_{22} , amidas graxas C_{12} a C_{22} e misturas dos mesmos; e
20

(c) opcionalmente um segundo extrator orgânico imiscível em água selecionado a partir do grupo que consiste em alcoóis graxos C_7 a C_{22} , ácidos graxos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos graxos C_7 a C_{22} , aldeídos graxos C_7 a C_{22} , amidas graxas C_7 a C_{22} e misturas dos mesmos;
25

em que a dita composição forma uma mistura de duas fases compreendendo uma fase aquosa e uma fase orgânica contendo butanol no qual o butanol pode ser separado do meio de fermentação de (a).

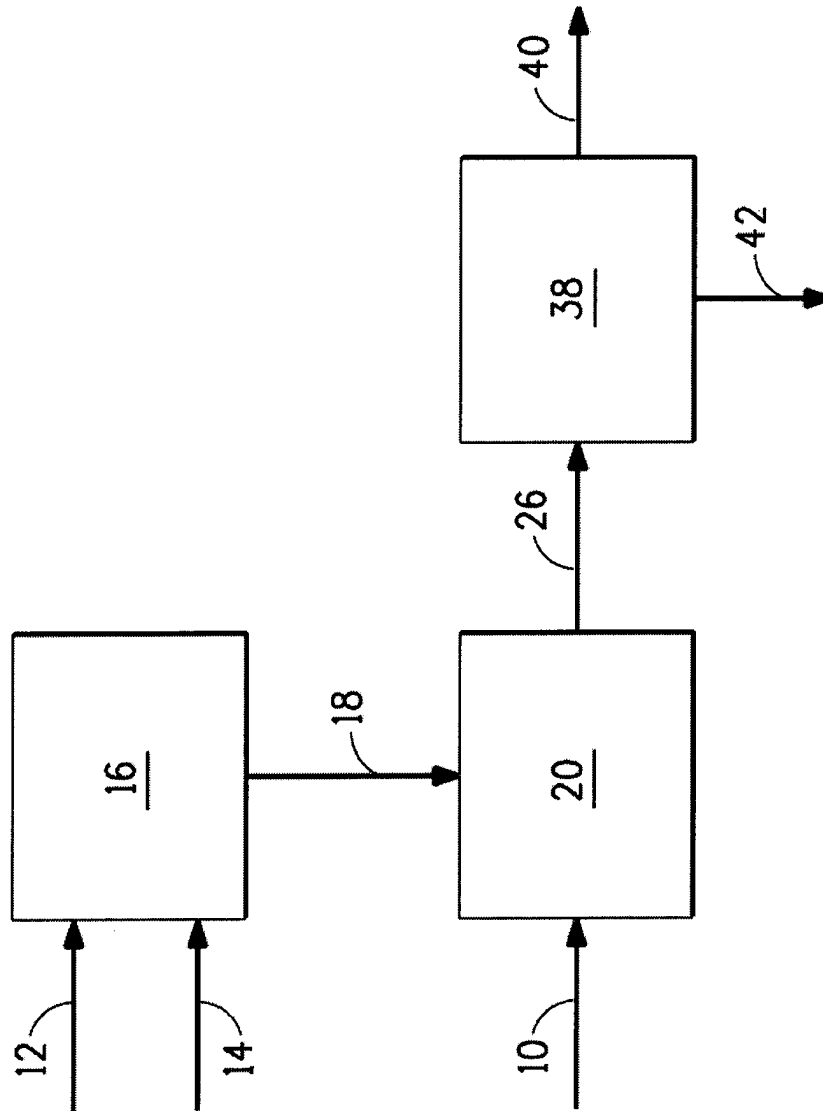


Fig. 1

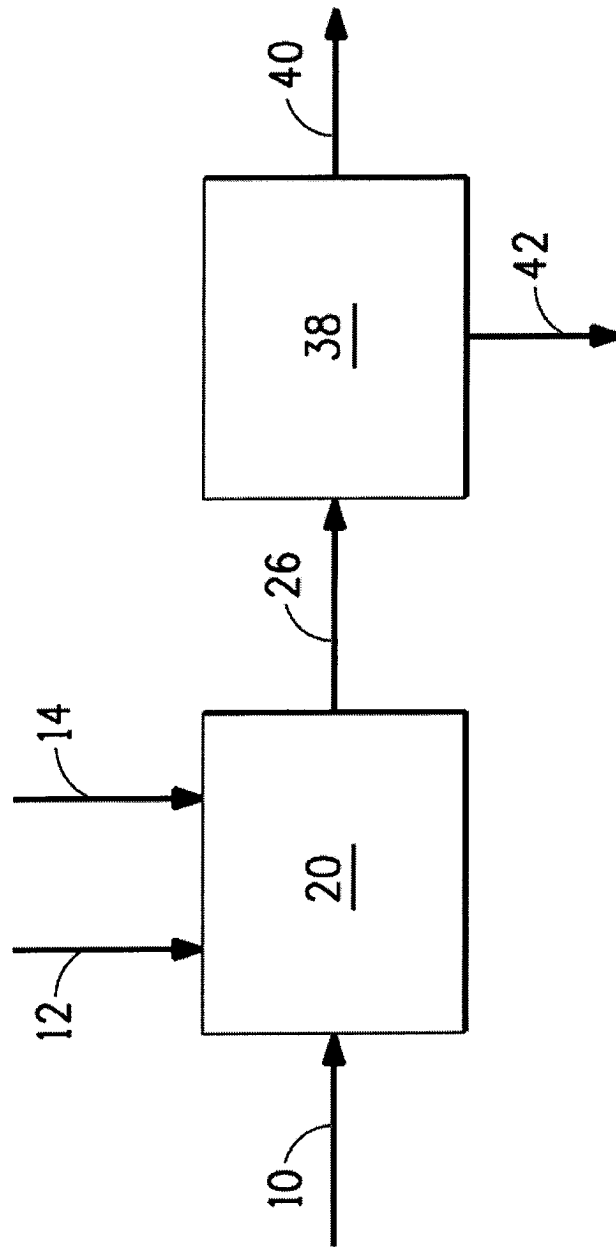


Fig. 2

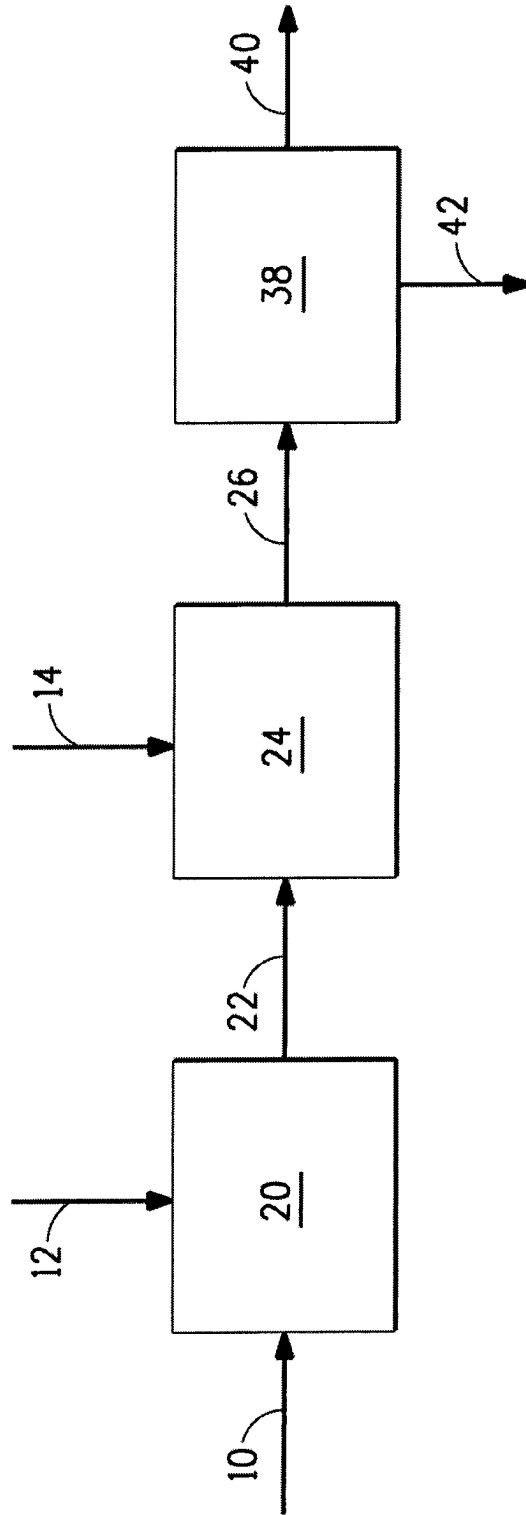


Fig. 3

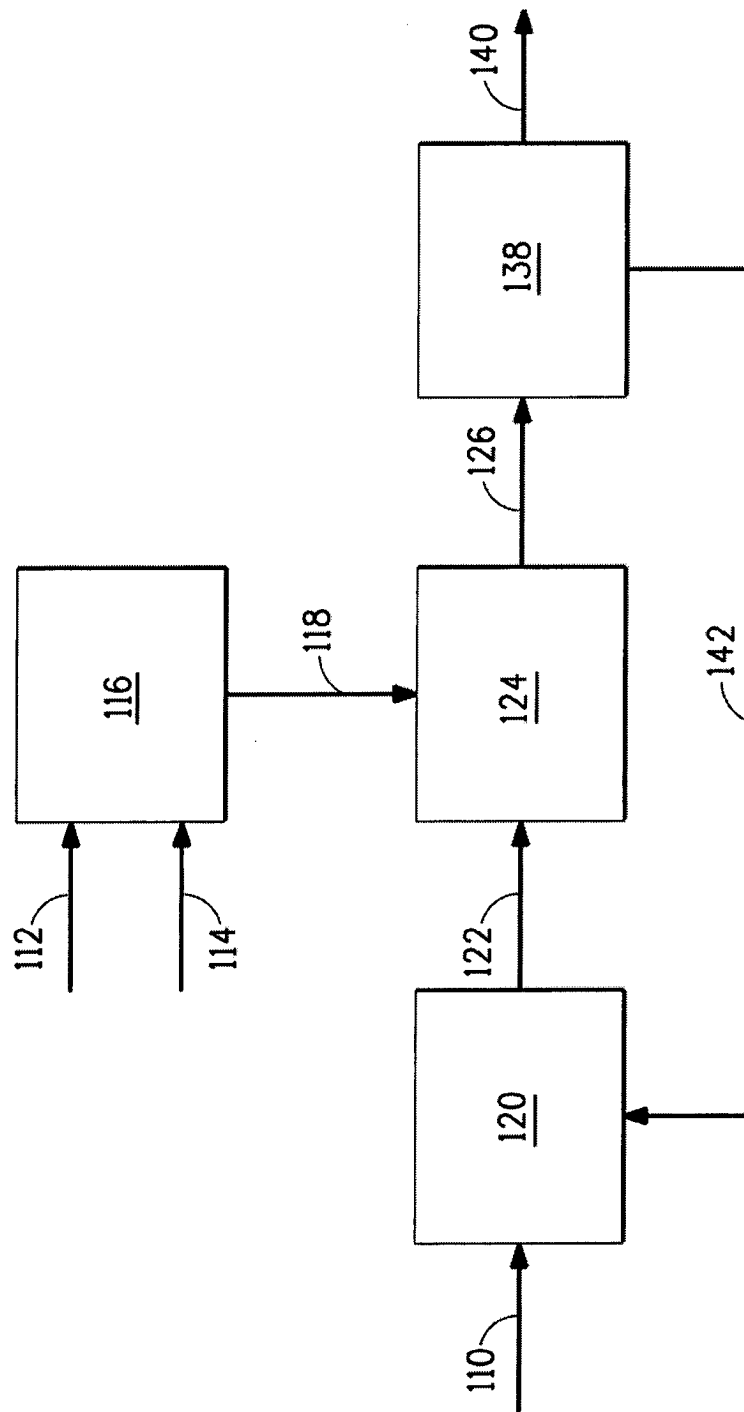
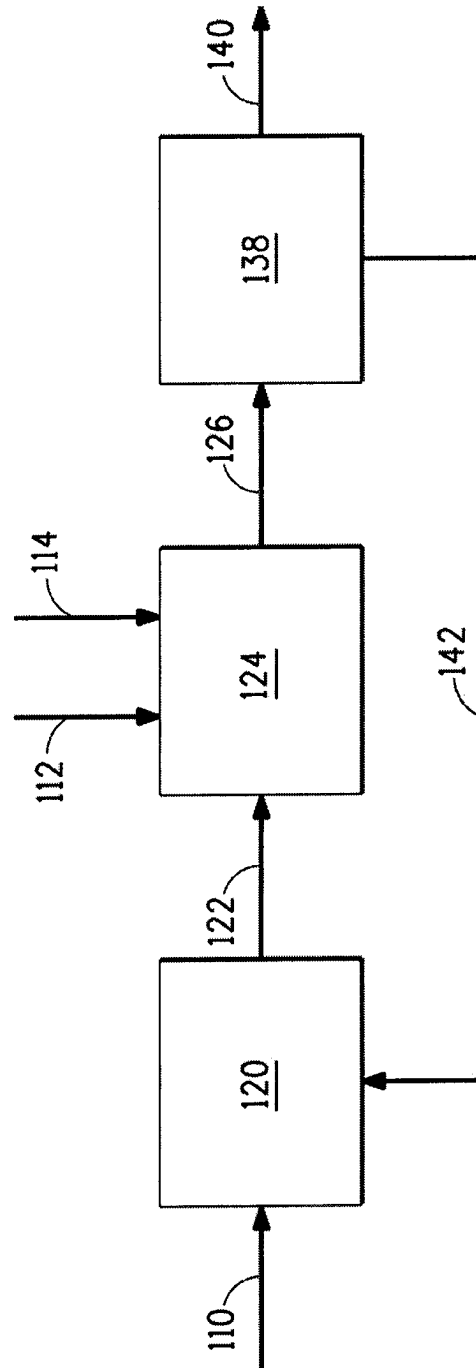
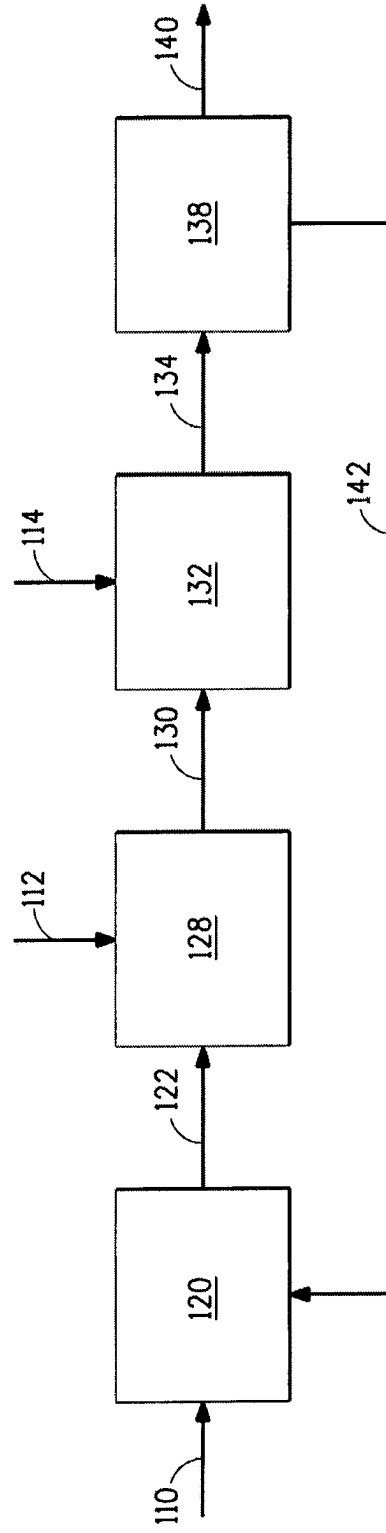


Fig. 4

**Fig. 5**

*Fig. 6*

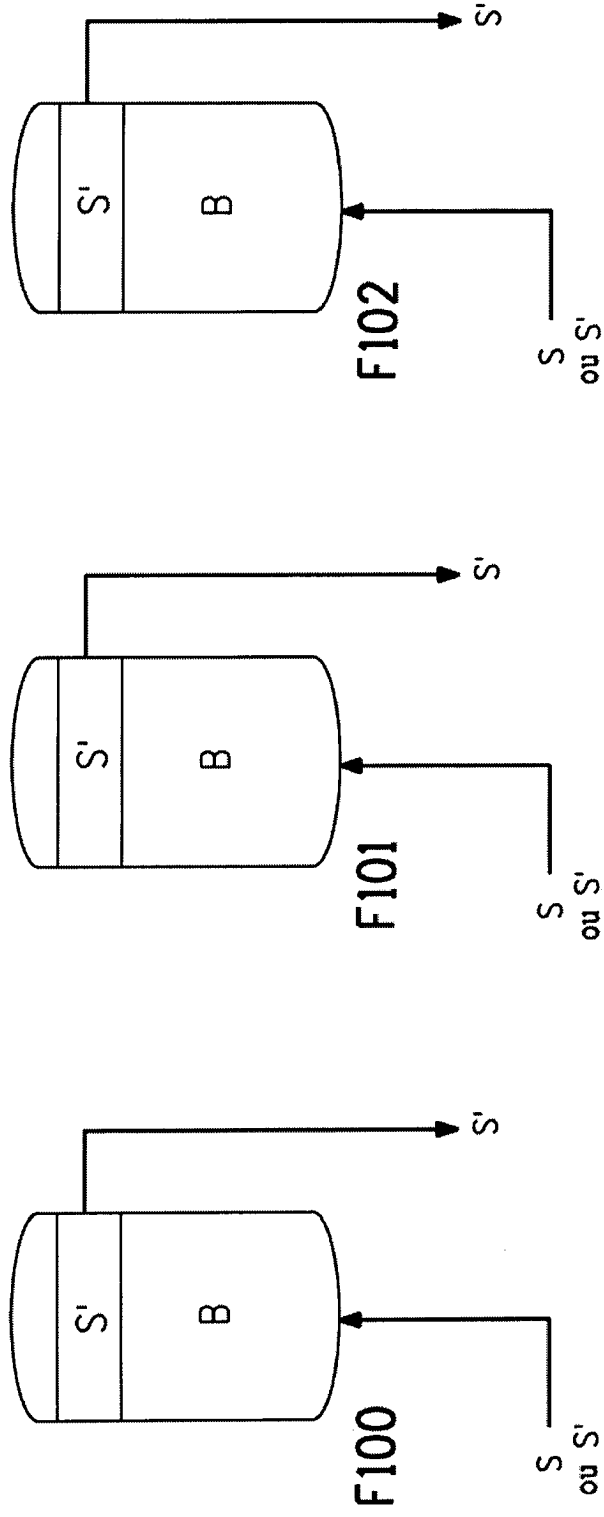


Fig. 7

RESUMO**“MÉTODO PARA RECUPERAR BUTANOL, MÉTODOS PARA PRODUZIR BUTANOL E COMPOSIÇÃO”**

A presente invenção refere-se a um método para produzir
5 butanol pela fermentação microbiana, em que o produto butanol é removido
durante a fermentação por extração em um extrator orgânico imiscível em
água na presença de pelo menos um eletrólito em uma concentração que é
pelo menos suficiente para aumentar o coeficiente de partição do butanol
em relação ao coeficiente na presença da concentração de sal do meio
10 basal para fermentação. O eletrólito pode compreender um sal que se
dissocia no meio de fermentação, ou na fase aquosa de um meio de
fermentação bifásico, para formar íons livres. Também é fornecido um
método e uma composição para recuperar butanol a partir de um meio de
fermentação.