



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

**(11) PI 0820556-6 B1**

**(22) Data do Depósito:** 13/11/2008

**(45) Data de Concessão:** 22/03/2016  
**(RPI 2359)**



\* B R P I 0 8 2 0 5 5 6 B 1 \*

---

**(54) Título:** BACTÉRIA E MÉTODOS PARA USO DAS MESMAS

**(51) Int.Cl.:** C12N 1/20; C12P 7/06

**(30) Prioridade Unionista:** 13/11/2007 US 60/987,755

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

**(72) Inventor(es):** SEAN DENNIS SIMPSON, RICHARD LLEWELLYN SYDNEY FORSTER, PHUONG TRAN TRAN, MATTHEW JAMES ROWE, IAN LINDSTRAND WARNER

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**BACTÉRIAS E MÉTODOS PARA USO DAS MESMAS**".

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5 A presente invenção refere-se de modo geral ao campo da fermentação microbiana de gases. Mais particularmente, refere-se a uma nova classe de bactérias com eficiência aperfeiçoada na produção de etanol por fermentação anaeróbica de substratos que contêm monóxido de carbono (CO).

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

10 Etanol está se tornando rapidamente o principal combustível líquido de transporte rico em hidrogênio ao redor do mundo. O consumo mundial de etanol em 2005 foi estimado em 46,2 bilhões de galões. Prevê-se também que o mercado global para a indústria de etanol combustível cresça nitidamente no futuro, devido a um crescente interesse em etanol na Europa,  
15 Japão, Estados Unidos e diversas nações em desenvolvimento.

Por exemplo, nos Estados Unidos, etanol é usado para produzir E10, uma mistura a 10% de etanol na gasolina. Em misturas E10 o componente etanol atua como agente de oxigenação, aperfeiçoando a eficiência de combustão e reduzindo a produção de poluentes do ar. No Brasil, etanol satisfaz aproximadamente 30% da demanda de combustível para transporte,  
20 tanto como agente de oxigenação misturado à gasolina quanto como combustível puro por direito. Também, na Europa, preocupações ambientais em torno das conseqüências de emissões de Gás de Efeito Estufa (GEE) foi o estímulo para a União Europeia (UE) estabelecer às nações-membro uma  
25 meta para o consumo de combustíveis de transporte sustentáveis tal como etanol derivado de biomassa.

A maior parte do etanol combustível é produzida através de processos tradicionais de fermentação à base de levedo que utiliza carboidratos derivados de vegetais, tal como sacarose extraída de cana de açúcar ou amido extraído de culturas de grãos, como a principal fonte de carbono. Entretanto, o custo dessas matérias-primas de carboidratos é influenciado por  
30 seu valor como alimento humano ou ração animal, enquanto o cultivo de

plantações que produzem amido ou sacarose para a produção de etanol não é economicamente sustentável em todas as áreas geográficas. Portanto, é de interesse desenvolver tecnologias para converter em etanol combustível fontes de carbono de menor custo e/ou mais abundantes.

5 CO é o principal subproduto livre rico em energia da combustão incompleta de materiais orgânicos tais como carvão mineral ou petróleo e produtos derivados do petróleo. Por exemplo, relata-se que a indústria do aço na Austrália produz e libera na atmosfera mais de 508.000 toneladas de CO anualmente.

10 Processos catalíticos poderão ser utilizados para converter em vários combustíveis e produtos químicos gases que consistem principalmente em CO e/ou CO e hidrogênio (H<sub>2</sub>). Micro-organismos poderão também ser usados para converter esses gases em combustíveis e produtos químicos.

15 A capacidade de micro-organismos crescerem sob CO como única fonte de carbono foi descoberta primeiramente em 1903. Mais tarde determinou-se ser isso uma propriedade de organismos que usam o caminho bioquímico acetil coenzima A (acetil CoA) de crescimento autotrófico (também conhecido como caminho de Woods-Ljungdahl ou caminho monóxido de carbono desidrogenase / acetil CoA sintase (CODH/ACS). Mostra-se  
20 que um grande número de organismos anaeróbicos que incluem organismos carboxidotróficos, fotossintéticos, metanogênicos e acetogênicos metabolizam CO em vários produtos finais, a saber CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, metano, n-butanol, acetato e etanol. Embora usem CO como única fonte de carbono, todos esses  
25 organismos produzem pelo menos dois desses produtos finais.

Tem-se demonstrado que bactérias anaeróbicas, tais como aquelas do gênero *Clostridium*, produzem etanol a partir de CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> via caminho bioquímico acetil CoA. Por exemplo, várias cepas de *Clostridium ljungdahlii* que produzem etanol de gases são descritas nas WO 00/68407,  
30 EP 117309, Patentes dos Estados Unidos N<sup>o</sup>s 5.173.429, 5.593.886 e 6.368.819, WO 98/00558 e WO 02/08438. A bactérias *Clostridium autoethanogenum* sp é também sabida produzir etanol a partir de gases (Abrini e co-

laboradores, *Archives of Microbiology* 161, pp. 345-351 (1994)).

No entanto, a produção de etanol por micro-organismos por meio de fermentação de gases é sempre associada à coprodução de acetato e/ou ácido acético. Como algum carbono disponível é convertido em acetato/ácido acético em vez de etanol, a eficiência de produção de etanol utilizando tais processos de fermentação poderá ser menos do que desejável. Também, a não ser que o subproduto acetato/ácido acético possa ser usado para algum outro fim, ele poderá se constituir em um problema de descarte de rejeito. Acetato/ácido acético é convertido em metano por micro-organismos e, portanto, apresenta o potencial de contribuir para emissões GEE.

Fermentação microbiana de CO na presença de H<sub>2</sub> pode levar a transferência de carbono substancialmente completa para um álcool. Contudo, na ausência de H<sub>2</sub> suficiente, algum CO é convertido em álcool, enquanto uma significativa porção é convertida em CO<sub>2</sub> conforme mostrado nas seguintes equações:



A produção de CO<sub>2</sub> representa ineficiência na captura de carbono total e, se liberado, também apresenta o potencial de contribuir para emissões de Gás de Efeito Estufa.

WO2007/117157 descreve um processo que produz alcoóis, particularmente etanol, por fermentação anaeróbica de gases contendo monóxido de carbono. Acetato produzido como subproduto do processo de fermentação é convertido em gás hidrogênio e gás dióxido de carbono, qualquer dos dois ou ambos poderão ser usados no processo de fermentação anaeróbica.

WO2008/115080 descreve um processo para a produção de álcool ou alcoóis em múltiplos estágios de fermentação. Subprodutos produzidos como resultado de fermentação anaeróbica de gás ou gases em um primeiro biorreator podem ser usados para produzir produtos em um segundo biorreator. Além disso, subprodutos do segundo estágio de fermentação

podem ser reciclados ao primeiro biorreator para produzir produtos.

5 Seria, assim, benéfico proporcionar micro-organismos que sejam capazes de fermentação de tais gases a etanol sob elevada eficiência, isto é, micro-organismos capazes de produzir mais etanol, e/ou uma maior razão de etanol para acetato do mesmo substrato, do que são capazes micro-organismos do estado da técnica.

10 Adicionalmente, em métodos do estado da técnica de fermentação bacteriana de gases que contêm CO a etanol que produzem altos níveis de etanol e/ou uma alta razão de etanol para acetato, o substrato gasoso usado normalmente compreende cerca de 30-65% de CO em volume e cerca de 20-30% de H<sub>2</sub> em volume (WO 00/68407).

15 Gases residuais contendo CO, que são substratos potenciais para fermentação microbiana para produzir etanol, poderão conter níveis maiores de CO e níveis menores de H<sub>2</sub> ou ambos. Seria, portanto, benéfico ter cepas bacterianas disponíveis que podem realizar fermentação eficiente de gás que contém CO com mais de 65% de CO em volume e/ou menos de 20% de H<sub>2</sub> em volume a etanol, por exemplo.

20 Trata-se de um objetivo da presente invenção proporcionar uma nova classe de bactérias que supera uma ou mais das limitações do estado da técnica na conversão de fontes gasosas que contêm CO em etanol, ou pelo menos proporcionar o público com uma escolha útil.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

25 Em um primeiro aspecto, a invenção proporciona um isolado biologicamente puro de uma bactéria capaz de produzir produtos que incluem etanol e opcionalmente acetato, por fermentação anaeróbica de um substrato que compreende CO, em que os produtos são produzidos sob uma razão de etanol para acetato de pelo menos 1,0.

30 Em outro aspecto, a invenção proporciona um isolado biologicamente puro de uma bactéria capaz de produzir etanol e acetato por fermentação anaeróbica em um meio de cultura aquoso suprido com um substrato que contém CO, particularmente um substrato gasoso que contém CO, compreendendo:

- (a) mais de cerca de 65% de CO em volume,
- (b) menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume, ou
- (c) mais de cerca de 65% de CO e menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume,

5 sob uma razão de etanol para acetato de pelo menos cerca de 1,0.

Em uma modalidade particular, a razão de etanol para acetato é de pelo menos cerca de 1,1, mais preferencialmente de pelo menos cerca de 1,2, mais preferencialmente de pelo menos cerca de 1,3 e ainda mais preferencialmente de pelo menos cerca de 1,4.

10 Em uma modalidade ainda, a bactéria é capaz de produzir o etanol sob uma concentração de pelo menos cerca de 2,0 g de etanol por litro de caldo de fermentação.

Em modalidades particulares, a concentração é de pelo menos cerca de 2,1 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,2 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,3 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,4 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,5 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,6 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,7 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,8 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,0 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,2 g de etanol por litro de caldo de fermentação, ou de pelo menos cerca de 3,4 g de etanol por litro de caldo de fermentação.

25 Em modalidades particulares, a produtividade da bactéria é de pelo menos cerca de 1,2 g de etanol/L de caldo de fermentação/dia, de pelo menos cerca de 1,6 g/L/dia, de pelo menos cerca de 1,8 g/L/dia, ou de pelo menos 2,0 g/L/dia.

Em certas modalidades, a produtividade específica da bactéria em termos de etanol é de pelo menos cerca de 0,7 g/L/grama de células bacterianas/dia, de pelo menos cerca de 0,9 g/L/grama de células bacterianas/dia, de pelo menos cerca de 1,1 g/L/grama de células bacterianas/dia, ou de pelo menos

cerca de 1,3 g/L/grama de células bacterianas/dia.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um isolado biologicamente puro de uma bactéria capaz de produzir produtos que incluem etanol e opcionalmente acetato, por fermentação anaeróbica de um substrato que compreende CO, em que a produtividade da bactéria é de pelo menos  
5 cerca de 1,2 g de etanol/L de caldo de fermentação/dia.

Ainda em um aspecto, a invenção proporciona um isolado biologicamente puro de uma bactéria capaz de produzir etanol por fermentação anaeróbica em um meio de cultura aquoso suprido com um substrato que  
10 contém CO, particularmente um substrato gasoso que contém CO, compreendendo:

- (a) mais de cerca de 65% de CO em volume,
  - (b) menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume, ou
  - (c) mais de cerca de 65% de CO e menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub>  
15 em volume,
- sob uma concentração de etanol de pelo menos cerca de 2,0 g de etanol por litro de caldo de fermentação.

Em modalidades particulares, a concentração é de pelo menos cerca de 2,1 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos  
20 cerca de 2,2 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,3 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,4 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,5 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,6 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos  
25 cerca de 2,7 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,8 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,0 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,2 g de etanol por litro de caldo de fermentação, ou de pelo menos cerca de 3,4 g de etanol por litro de caldo de fermentação.

30 Em modalidades particulares, a produtividade da bactéria é de pelo menos cerca de 1,2 g de etanol/L de caldo de fermentação/dia, de pelo menos cerca de 1,6 g/L/dia, de pelo menos cerca de 1,8 g/L/dia, ou de pelo menos 2,0

g/L/dia.

Em certas modalidades, a produtividade específica da bactéria em termos de etanol é de pelo menos cerca de 0,7 g/L/grama de células bacterianas/dia, de pelo menos cerca de 0,9 g/L/grama de células bacterianas/dia, de pelo menos cerca de 1,1 g/L/grama de células bacterianas/dia, ou de pelo menos cerca de 1,3 g/L/grama de células bacterianas/dia.

Em uma modalidade, acetato é produzido como um subproduto da fermentação.

Em uma modalidade particular, o etanol é produzido sob uma razão de etanol para acetato de pelo menos cerca de 1,0. Em modalidades particulares, a razão de etanol para acetato é de pelo menos cerca de 1,1, de pelo menos cerca de 1,2, de pelo menos cerca de 1,3 ou mais particularmente de pelo menos cerca de 1,4.

Em outro aspecto, a invenção proporciona uma bactéria acetogênica em que a bactéria apresenta uma ou mais das seguintes características de definição:

- capacidade de crescer em meio mínimo na presença ou ausência de extrato de levedo;
- capacidade de crescer mais rapidamente, para produzir uma razão maior de etanol para acetato, e/ou para produzir uma concentração maior de etanol, em um meio em que extrato de levedo não está presente, em comparação a um meio em que extrato de levedo está presente;
- pequena ou nenhuma capacidade de esporular;
- ser Gram-positiva;
- ter forma de bastonete;
- ser não móvel.

Em uma modalidade, as bactérias são adicionalmente capazes de produzir etanol por fermentação anaeróbica em um meio de cultura aquoso suprido com um substrato que contém CO, compreendendo:

- (a) mais de cerca de 65% de CO em volume,
- (b) menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume, ou
- (c) mais de cerca de 65% de CO e menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub>



em volume,

sob uma concentração de etanol de pelo menos cerca de 2,0 g de etanol por litro de caldo de fermentação, e/ou sob uma razão de etanol para acetato de pelo menos cerca de 1,0.

- 5                    Em modalidades particulares, a razão de etanol para acetato é de pelo menos cerca de 1,1, de pelo menos cerca de 1,2, de pelo menos cerca de 1,3 ou mais particularmente de pelo menos cerca de 1,4.

- Em modalidades particulares, a concentração de etanol produzido é de pelo menos cerca de 2,1 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,2 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,3 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,4 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,5 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,6 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,7 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,8 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,0 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,2 g de etanol por litro de caldo de fermentação, ou de pelo menos cerca de 3,4 g de etanol por litro de caldo de fermentação.

Em modalidades particulares, a produtividade da bactéria é de pelo menos cerca de 1,2 g de etanol/L de caldo de fermentação/dia, de pelo menos cerca de 1,6 g/L/dia, de pelo menos cerca de 1,8 g/L/dia, ou de pelo menos 2,0 g/L/dia.

- 25                  Em certas modalidades, a produtividade específica da bactéria em termos de etanol é de pelo menos cerca de 0,7 g/L/grama de células bacterianas/dia, de pelo menos cerca de 0,9 g/L/grama de células bacterianas/dia, de pelo menos cerca de 1,1 g/L/grama de células bacterianas/dia, ou de pelo menos cerca de 1,3 g/L/grama de células bacterianas/dia.

- 30                    Em uma modalidade, as bactérias da invenção são derivadas de *Clostridium autoethanogenum*.

                    Em uma modalidade particular, as bactérias apresentam duas ou

mais e mais preferencialmente todas as características de definição acima.

Em uma modalidade particular, a bactéria apresenta as características de definição da cepa LBS1560 de *Clostridium autoethanogenum* depositada em DSMZ sob o número de acesso DSM 19630. Em uma modalidade particular, a bactéria é a cepa LBS1560 de *Clostridium autoethanogenum* depositada em DSMZ sob o número de acesso DSM 19630.

Em uma modalidade o substrato compreende pelo menos cerca de 70% de CO em volume, pelo menos cerca de 75% de CO em volume, pelo menos cerca de 80% de CO em volume, pelo menos cerca de 85% de CO em volume, pelo menos cerca de 90% de CO em volume, ou pelo menos cerca de 95% de CO em volume.

Em uma modalidade ainda, o substrato compreende menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende menos de cerca de 15% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 10% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 5% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 4% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 3% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 2% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 1% de H<sub>2</sub> em volume, ou substancialmente nenhum H<sub>2</sub>.

Em uma modalidade ainda, o substrato compreende menos de ou é igual a cerca de 20% de CO<sub>2</sub> em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende menos de ou é igual a cerca de 15% de CO<sub>2</sub> em volume, menos de ou é igual a cerca de 10% de CO<sub>2</sub> em volume, ou menos de ou é igual a cerca de 5% de CO<sub>2</sub> em volume.

Em modalidades particulares, o substrato compreende pelo menos cerca de 85% de CO em volume e no máximo cerca de 15% de CO<sub>2</sub> em volume, pelo menos cerca de 90% de CO e no máximo cerca de 10% de CO<sub>2</sub>, ou cerca de 95% de CO em volume e cerca de 5% de CO<sub>2</sub> em volume.

Em certas modalidades, o meio de cultura aquoso é um meio mínimo de crescimento microbiano anaeróbico selecionado de, mas sem se limitar aos mesmos, LM23 ou LM33 como aqui definido.

Em uma modalidade, o meio não é suplementado com extrato de levedo.

Em um aspecto adicional, a invenção proporciona um método para a produção de um ou mais alcoóis a partir de um substrato que contém CO, compreendendo esse método manter uma cultura de um ou mais dos isolados bacterianos da invenção na presença do substrato, e a fermentação anaeróbica do substrato a um ou mais alcoóis por meio desse um ou mais isolados bacterianos.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para a produção de um ou mais alcoóis o qual compreende fermentar um substrato que contém CO usando uma ou mais das bactérias conforme descritas acima.

Em uma modalidade, o método compreende as etapas de:

- (a) proporcionar um substrato que contém CO a um biorreator que contém uma cultura de uma bactéria conforme descrita acima; e
- (b) fermentar anaerobicamente a cultura no biorreator para produzir um ou mais alcoóis.

Em um aspecto ainda, a invenção proporciona um método para reduzir as emissões totais de carbono atmosférico de um processo industrial, compreendendo o método:

- (a) capturar gás que contém CO produzido como resultado do processo industrial, antes de o gás ser liberado para a atmosfera;
- (b) a fermentação anaeróbica do gás que contém CO para produzir um ou mais alcoóis por meio de uma cultura que contém um ou mais isolados bacterianos da invenção.

Em certas modalidades dos aspectos do método, acetato é produzido como subproduto da fermentação. Preferencialmente, esse um ou mais alcoóis produzidos incluem etanol.

Em modalidades particulares dos aspectos do método, a bactéria ou isolado é mantida em um meio de cultura aquoso.

Em modalidades particulares dos aspectos do método, a fermentação do substrato ocorre em um biorreator.

Em certas modalidades, o substrato contém menos de cerca de 15% de H<sub>2</sub> em volume, tal como menos de cerca de 10% de H<sub>2</sub>, tal como

menos de cerca de 5% de H<sub>2</sub>.

Em certas modalidades, o substrato compreende mais de cerca de 65% de CO em volume, preferencialmente cerca de 70% de CO a cerca de 95% de CO em volume.

5 Em uma modalidade o substrato compreende pelo menos cerca de 70% de CO em volume. Em uma modalidade particular o substrato compreende pelo menos cerca de 80% de CO em volume, pelo menos cerca de 85% de CO em volume, pelo menos cerca de 90% de CO ou pelo menos cerca de 95% de CO em volume.

10 Em uma modalidade, o substrato compreende menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende menos de cerca de 15% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 10% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 5% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 4% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 3% de H<sub>2</sub> em volume, menos de  
15 cerca de 2% de H<sub>2</sub> em volume, menos de cerca de 1% de H<sub>2</sub> em volume, ou substancialmente nenhum H<sub>2</sub>.

Em uma modalidade, o substrato compreende menos de ou é igual a cerca de 20% de CO<sub>2</sub> em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende menos de ou é igual a cerca de 15% de CO<sub>2</sub> em vo-  
20 lume, menos de ou é igual a cerca de 10% de CO<sub>2</sub> em volume, ou menos de ou é igual a cerca de 5% de CO<sub>2</sub> em volume.

Em certas modalidades, o substrato compreende pelo menos cerca de 85% de CO em volume e no máximo cerca de 15% de CO<sub>2</sub> em vo-  
lume, pelo menos cerca de 90% de CO e no máximo cerca de 10% de CO<sub>2</sub>,  
25 ou cerca de 95% de CO em volume e cerca de 5% de CO<sub>2</sub> em volume.

Em certas modalidades, o substrato que contém CO é um substrato gasoso que contém CO.

Em certas modalidades, o substrato gasoso compreende um gás obtido como subproduto de um processo industrial.

30 Em certas modalidades, o processo industrial é selecionado do grupo que consiste em fabricação de produtos de metais ferrosos, fabricação de produtos não ferrosos, processos de refino de petróleo, gaseificação de

biomassa, gaseificação de carvão mineral, produção de energia elétrica, produção de negro de fumo, produção de amônia, produção de metanol e fabricação de coque.

5 Em uma modalidade, o substrato gasoso poderá compreender um gás obtido de uma usina siderúrgica.

Em outra modalidade, o substrato gasoso poderá compreender gases do escapamento de automóveis.

10 Em certas modalidades dos aspectos do método, o álcool é recuperado do caldo de fermentação, o caldo de fermentação sendo o meio de cultura aquoso que compreende células bacterianas e o álcool.

Em certas modalidades, acetato é produzido como subproduto da fermentação.

Em uma modalidade adicional, o álcool e o acetato são recuperados do caldo.

15 E outro aspecto, a invenção proporciona um método de seleção de um ou mais micro-organismos que produzem um ou mais ácidos, o método compreendendo: cultivar os micro-organismos em um meio nutriente em um biorreator; adicionar meio fresco sob um pH maior que o do meio nutriente, tal que o meio nutriente seja mantido sob um pH substancialmente constante; e remover pelo menos uma porção do meio nutriente e micro-organismos, tal que o meio no biorreator seja mantido sob um volume substancialmente constante.

20

Em uma modalidade particular, o método destina-se à seleção de micro-organismos de crescimento rápido. Em uma modalidade, a expressão um ou mais ácidos inclui acetato.

25

Em outro aspecto, a invenção proporciona um isolado biologicamente puro de uma bactéria produzida pelo método de seleção. Em uma modalidade, o isolado apresenta pouco ou nenhuma capacidade de esporular.

30 Embora a invenção seja amplamente como definida acima, a mesma não se limita a essa definição e também inclui modalidades de que a descrição seguinte proporciona exemplos.

## BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção será agora descrita em detalhes com referência às Figuras acompanhantes em que:

5            Figura 1: é uma representação esquemática de um sistema adaptado para selecionar crescimento microbiano rápido.

            Figura 2: mostra produção de etanol (quadrados) e acetato (diamantes) por *Clostridium autoethanogenum* LBS1560. Concentração de biomassa é representada pelos pontos de dados triangulares.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10            Em amplos termos, em um aspecto a presente invenção refere-se a uma nova bactéria e a um isolado biologicamente puro de uma bactéria com elevada eficiência em um processo de fermentação anaeróbica. Em um aspecto, a bactéria é capaz de produzir um álcool, preferencialmente etanol, a partir de um substrato que compreende:

- 15            (a)            mais de cerca de 65% de CO em volume,  
            (b)            menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume, ou  
            (c)            mais de cerca de 65% de CO e menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume.

            Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a um processo para produção de um álcool, preferencialmente etanol, por fermentação anaeróbica de um substrato que contém CO pela bactéria da invenção.

### *Definições*

            A não ser que definido de outra maneira, os seguintes termos conforme usados ao longo de todo este relatório são definidos como se-  
25            guem:

            Um "substrato que contém CO" e termos similares devem ser entendidos como incluindo qualquer substrato em que monóxido de carbono é disponível para bactérias para crescimento e/ou fermentação, por exemplo. Em modalidades particulares da invenção, o "substrato que contém CO"  
30            é gasoso. Tais substratos poderão ser referidos aqui como "substratos gasosos que contém CO" e similares.

Na descrição que segue, modalidades da invenção são descritas em termos de transporte e fermentação de um "substratos gasosos que contêm CO". No entanto, deve-se entender que o substrato gasoso poderá ser proporcionado em formas alternativas. Por exemplo, o substrato gasoso que  
5 contém CO poderá ser proporcionado dissolvido em um líquido. Essencialmente, um líquido é saturado com um gás que contém monóxido de carbono e, em seguida, esse líquido é adicionado ao biorreator. Isso pode ser obtido utilizando uma metodologia-padrão. À guisa de exemplo, um gerador de dispersão de microbolhas (Hensirisak e colaboradores, *Scale-up of microbubble*  
10 *dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volume 101, Número 3 / Outubro, 2002) poderia ser usado. À guisa de exemplo adicional, o substrato gasoso que contêm CO poderá ser adsorvido em um suporte sólido. Esses métodos alternativos são abrangidos pelo uso do termo "substrato que contêm CO".

15 Os termos "elevação de eficiência", "elevada eficiência" e similares, quando usados em relação a um processo de fermentação, incluem, mas sem se limitar ao mesmo, aumento de um ou mais de: a taxa de crescimento de micro-organismos que catalisam a fermentação, o volume de produto desejado (tais como alcoóis) produzidos por volume de substrato (tal  
20 como CO) consumido, a concentração do produto desejado (tais como alcoóis) produzido no meio de cultura, a taxa de produção ou nível de produção do produto desejado, e a proporção relativa do produto desejado produzido em comparação a outros subprodutos da fermentação.

O termo "acetato" inclui tanto sal de acetato isoladamente quanto  
25 uma mistura de ácido acético e sal de acetato moleculares ou livres, tal como a mistura de sal de acetato e ácido acético livre presentes em um caldo de fermentação conforme descrito aqui. A razão de ácido acético molecular para acetato no caldo de fermentação é dependente do pH do sistema.

O termo "biorreator" inclui um dispositivo de fermentação que  
30 consiste em um ou mais recipientes e/ou torres ou disposição de tubos, o que inclui o Reator com Agitação Contínua (RAC), Reator com Células Imobilizadas (RCI), Reator de Leito Gotejante (RLG), Coluna de Bolhas, Fer-

mentador com Ascensão de Gases, Misturador Estático ou outro recipiente ou outro dispositivo adequado para contato gás-líquido.

Bactérias da invenção, ou culturas ou isolados das mesmas, poderão ser descritas encontrando-se em uma forma "isolada" ou "biologicamente pura".

- 5 Esses termos destinam-se a significar que as bactérias foram separadas de um ambiente ou de um ou mais constituintes, celulares ou outros, aos quais as mesmas poderão estar associadas quer encontradas na natureza ou não. Os termos "isolado" ou "biologicamente puro" não devem ser tomados para
- 10 uma modalidade os isolados ou culturas das bactérias contêm uma predominância de bactérias da invenção.

A invenção proporciona um isolado biologicamente puro de uma bactéria capaz de produzir etanol e acetato por fermentação anaeróbica em um meio de cultura aquoso suprido com um substrato gasoso que contém

- 15 CO compreendendo:

- (a) mais de cerca de 65% de CO em volume,
- (b) menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume, ou
- (c) mais de cerca de 65% de CO e menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume,

- 20 sob uma razão de etanol para acetato de pelo menos cerca de 1,0. Em uma modalidade, a bactéria é derivada de *C. autoethanogenum* como descrito em outra parte aqui.

- Em certas modalidades, a razão de etanol para acetato é de pelo menos cerca de 1,1, ou de pelo menos cerca de 1,2, ou de pelo menos
- 25 cerca de 1,3, ou de pelo menos cerca de 1,4.

- Em modalidade adicionais, a bactéria é capaz de produzir o etanol sob uma concentração de pelo menos cerca de 2,1 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,2 g de etanol por litro de
- 30 caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,3 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,4 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,5 g de etanol por litro de
- caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,6 g de etanol por litro de



caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,7 g de etanol por litro de  
caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,8 g de etanol por litro de  
caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,0 g de etanol por litro de  
caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,2 g de etanol por litro de  
5 caldo de fermentação, ou de pelo menos cerca de 3,4 g de etanol por litro de  
caldo de fermentação.

A produtividade de etanol é a produtividade volumétrica de etanol, calculada como a razão da concentração de etanol e do tempo exigido para produzir essa concentração em sistemas descontínuos ou de batelada.

10 A produtividade pode também ser calculada para fermentação microbiana em sistemas contínuos. Em modalidades particulares da invenção, a produtividade da bactéria é de pelo menos 1,2 g de etanol/L de caldo de fermentação/dia, ou de pelo menos 1,6 g/L/dia, ou de pelo menos 1,8 g/L/dia, ou de pelo menos 2,0 g/L/dia.

15 A produtividade específica de uma cultura microbiana depende da proporção de micro-organismo ativo vivo em uma cultura microbiana. Em certas modalidades da presente invenção, a produtividade específica de etanol é de pelo menos 0,7 g/L/grama de células bacterianas/dia, ou de pelo menos 0,9 g/L/grama de células bacterianas/dia, ou de pelo menos 1,1  
20 g/L/grama de células bacterianas/dia, ou de pelo menos 1,3 g/L/grama de células bacterianas/dia.

A invenção também proporciona um isolado biologicamente puro de uma bactéria capaz de produzir etanol por fermentação anaeróbica em um meio de cultura aquoso suprido com um substrato gasoso que contém  
25 CO compreendendo:

- (a) mais de cerca de 65% de CO em volume,
- (b) menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume, ou
- (c) mais de cerca de 65% de CO e menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume,

30 sob uma concentração de etanol de pelo menos 2,0 g de etanol por litro de caldo de fermentação. Em uma modalidade, a bactéria é derivada de *C. autoethanogenum* como descrito em outra parte aqui.

Em modalidades adicionais, a bactéria é capaz de produzir etanol sob uma concentração de pelo menos cerca de 2,1 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,2 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,3 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,4 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,5 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,6 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,7 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 2,8 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,0 g de etanol por litro de caldo de fermentação, de pelo menos cerca de 3,2 g de etanol por litro de caldo de fermentação, ou de pelo menos cerca de 3,4 g de etanol por litro de caldo de fermentação.

Em modalidades particulares da invenção, a produtividade da bactéria é de pelo menos 1,2 g de etanol/L de caldo de fermentação/dia, ou de pelo menos 1,6 g/L/dia, ou de pelo menos 1,8 g/L/dia, ou de pelo menos 2,0 g/L/dia.

Em certas modalidades da presente invenção, a produtividade específica de etanol é de pelo menos 0,7 g/L/grama de células bacterianas/dia, ou de pelo menos 0,9 g/L/grama de células bacterianas/dia, ou de pelo menos 1,1 g/L/grama de células bacterianas/dia, ou de pelo menos 1,3 g/L/grama de células bacterianas/dia.

Normalmente, acetato é produzido como um subproduto da fermentação. Em uma modalidade, o etanol é produzido sob uma razão de etanol para acetato de pelo menos cerca de 1,0. Em modalidades particulares, a razão de etanol para acetato é de pelo menos cerca de 1,1, ou de pelo menos cerca de 1,2, ou de pelo menos cerca de 1,3, ou de pelo menos cerca de 1,4.

A invenção também proporciona bactérias acetogênicas que apresentam uma ou mais das seguintes características de definição como observadas sob as condições experimentais descritas aqui a seguir: uma capacidade de crescer em meio mínimo na presença ou ausência de extrato

de levedo; uma capacidade de crescer mais rapidamente, para produzir uma razão maior de etanol para acetato, e/ou para produzir uma concentração maior de etanol, em um meio em que extrato de levedo não está presente, em comparação a um meio em que extrato de levedo está presente; pequena ou nenhuma capacidade de esporular; ser Gram-positiva; ter forma de bastonete; ser não móvel.

Em uma modalidade, as bactérias substancialmente não apresentam capacidade de esporular. Em uma modalidade, substancialmente nenhuma das populações bacterianas exibem esporos sob as condições descritas aqui a seguir.

Em uma modalidade, as bactérias acetogênicas são adicionalmente capazes de produzir etanol por fermentação anaeróbica em um meio de cultura aquoso suprido com um substrato que contém CO compreendendo: mais de cerca de 65% de CO em volume; menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume; ou mais de cerca de 65% de CO e menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume, sob uma concentração de etanol de pelo menos cerca de 2,0 g de etanol por litro de caldo de fermentação, e/ou sob uma razão de etanol para acetato de pelo menos cerca de 1,0.

As bactérias da invenção podem ser derivadas de *Clostridium autoethanogenum*.

A observação de que as bactérias de certas modalidades da invenção apresentam pouca a nenhuma capacidade de esporular é surpreendente. Isso proporciona um inesperado benefício sobre outras cepas de *Clostridia*, incluindo *Clostridium autoethanogenum*. Esporulação é uma fase estagnante de atividade limitada. Reduzir ou aperfeiçoar a capacidade de formar esporos apresenta várias vantagens. Por exemplo, uma única célula bacteriana pode apenas dividir-se e produzir metabólitos (tais como acetato e/ou etanol) enquanto em uma condição não esporulada. Consequentemente, a escala de tempo para divisão e produção de metabólitos pode ser estendida onde bactérias não esporulam. A falta de capacidade de esporular poderá também proporcionar controle adicional sobre uma cultura inteira, em que toda a população viva pode ser adaptada para promover crescimento

e/ou produção de metabólitos por períodos prolongados. Portanto, uso de bactérias da presente invenção poderá aumentar a eficiência global de um processo de fermentação para produzir produtos tais como acetato e/ou etanol.

5                    Em certas modalidades da invenção, as bactérias apresentam duas ou mais e mais preferencialmente todas as características de definição acima. Em algumas modalidades da invenção, as bactérias apresentam as características de definição da cepa LBS1560 de *Clostridium autoethanogenum* depositada em DSMZ, Alemanha, de acordo com o Tratado de Budapeste, em 19 de outubro de 2007, e alocada sob o número de acesso DSM  
10                    19630. Em uma modalidade particular, a bactéria é a cepa LBS1560 de *Clostridium autoethanogenum*, DSM 19630.

A invenção também refere-se a bactérias derivadas das bactérias da invenção.

15                    Em certas modalidades, as bactérias da invenção são capazes de produzir as concentrações de etanol, e as razões de etanol para acetato discutidas acima, sob níveis elevados de CO no substrato gasoso. O substrato gasoso poderá compreender pelo menos cerca de 70% de CO em volume. Em certas modalidades, o substrato gasoso compreende pelo menos  
20                    cerca de 80% de CO em volume, ou pelo menos cerca de 85% de CO em volume, ou pelo menos cerca de 90% de CO em volume, ou pelo menos cerca de 95% de CO em volume.

Similarmente, as concentrações de etanol e as razões de etanol para acetato discutidas acima são obteníveis em certas modalidades em  
25                    níveis de H<sub>2</sub> baixos a não existentes no substrato gasoso. O substrato gasoso poderá compreender menos de cerca de 20% de H<sub>2</sub> em volume. Em modalidades particulares, o substrato gasoso compreende menos de cerca de 15% de H<sub>2</sub> em volume, ou o substrato gasoso compreende menos de cerca de 10% de H<sub>2</sub> em volume, ou o substrato gasoso compreende menos de  
30                    cerca de 5% de H<sub>2</sub> em volume, ou o substrato gasoso compreende menos de cerca de 4% de H<sub>2</sub> em volume, ou o substrato gasoso compreende menos de cerca de 3% de H<sub>2</sub> em volume, ou o substrato gasoso compreende

menos de cerca de 2% de H<sub>2</sub> em volume, ou o substrato gasoso compreende menos de cerca de 1% de H<sub>2</sub> em volume, ou o substrato gasoso não compreende H<sub>2</sub>.

Em certas modalidades, as bactérias da invenção podem também produzir concentrações de etanol e razões de etanol para acetato quando alimentadas com substrato gasoso que compreende relativamente pouco CO<sub>2</sub>. Em uma modalidade, o substrato gasoso compreende menos de ou é igual a cerca de 20% de CO<sub>2</sub> em volume. Em certas modalidades, o substrato compreende menos de ou é igual a cerca de 15% de CO<sub>2</sub> em volume, ou menos de ou é igual a cerca de 10% de CO<sub>2</sub> em volume, ou menos de ou é igual a cerca de 5% de CO<sub>2</sub> em volume.

Em certas modalidades, o substrato gasoso compreende cerca de 85% de CO em volume e cerca de 15% de CO<sub>2</sub> em volume, ou substrato gasoso compreende pelo menos cerca de 90% de CO e no máximo cerca de 10% de CO<sub>2</sub>, ou o substrato gasoso compreende cerca de 95% de CO em volume e cerca de 5% de CO<sub>2</sub> em volume.

Em certas modalidades, a cultura é mantida em um meio de cultura aquoso. Preferencialmente, o meio de cultura aquoso é um meio mínimo de crescimento microbiano anaeróbico. Meios adequados são conhecidos no estado da técnica e descritos, por exemplo, nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.173.429 e 5.593.886, e WO 02/08438, e em Klasson e colaboradores (1992). *Bioconversion of Synthesis Gas into Liquid or Gaseous Fuels. Enz. Microb. Technol.* 14:602-608], Najafpour e Younesi [(2006). *Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of Clostridium ljungdahlii. Enzyme and Microbial Technology*, Volume 38, Edições 1-2, pp. 223-228], e Lewis e colaboradores [(2002). *Making the connection-conversion fo biomass-generated producer gas to ethanol. Abst. Bioenergy*, pp. 2091-2094]. Em modalidades particulares da invenção, o meio mínimo de crescimento microbiano anaeróbico é LM23 ou LM33 como definido aqui.

Em certas modalidades, o meio é suplementado com componentes adicionais, tais como, mas sem se limitar aos mesmos, aminoácidos e tripticase. Preferencialmente, o meio não é suplementado com componen-

tes adicionais.

Em certas modalidades, o meio poderá ser suplementado com extrato de levedo. Em certas modalidades, a cultura cresce mais rapidamente quando o meio não é suplementado com extrato de levedo do que quando o meio é suplementado com extrato de levedo. Em uma modalidade adicional, a razão de etanol para acetato produzida é maior quando o meio não é suplementado com extrato de levedo do que quando o meio é suplementado com extrato de levedo. Em uma modalidade adicional, a concentração de etanol produzido por litro de meio de cultura é maior quando o meio não é suplementado com extrato de levedo do que quando o meio é suplementado com extrato de levedo. Em uma modalidade particular, o meio não é suplementado com extrato de levedo.

A invenção também proporciona métodos para a produção de um ou mais alcoóis a partir de um substrato gasoso que compreende CO, compreendendo os métodos de manter uma cultura de um ou mais isolados bacterianos da invenção na presença do substrato gasoso, e a fermentação anaeróbica do substrato gasoso a um ou mais alcoóis por meio desse um ou mais isolados bacterianos.

A invenção também proporciona um método para reduzir as emissões de carbono atmosférico total de um processo industrial, compreendendo esse método:

- (a) capturar gás que contém CO produzido como resultado do processo industrial, antes de o gás ser liberado para a atmosfera;
- (b) a fermentação anaeróbica do gás que contém CO para produzir um ou mais alcoóis por meio de uma cultura que contém um ou mais isolados bacterianos da invenção.

Em certas modalidades dos métodos da invenção, acetato é produzido como subproduto da fermentação. O álcool produzido é etanol.

Em certas modalidades, a cultura é mantida em um meio de nutriente líquido.

A fermentação poderá ser realizada em qualquer biorreator adequado, tal como um reator com agitação contínua (RAC), um reator de colu-

na de colhas (RCB) ou um reator de leite gotejante (RLG). Também, em algumas modalidades preferidas da invenção, o biorreator poderá compreender um primeiro reator de crescimento em que os micro-organismos são cultivados e um segundo reator de fermentação, ao qual caldo de fermentação do reator de crescimento é alimentado e no qual a maior parte do produto de fermentação (etanol e acetato) é produzida.

Como descrito acima, a fonte de carbono para a reação de fermentação é um substrato gasoso que contém CO. O substrato gasoso poderá ser um gás residual que contém CO como subproduto de um processo industrial, ou de alguma outra fonte tal como de gases do escapamento de automóveis.

Em certas modalidades, o processo industrial é selecionado do grupo que consiste em fabricação de produtos de metais ferrosos, tal como uma usina siderúrgica, fabricação de produtos não ferrosos, processos de refino de petróleo, gaseificação de carvão mineral, produção de energia elétrica, produção de negro de fumo, produção de amônia, produção de metanol e fabricação de coque. Nessas modalidades, o gás que contém CO poderá ser capturado do processo industrial antes do mesmo ser emitido para a atmosfera, utilizando qualquer método conveniente. Dependendo da composição do substrato gasoso que contém CO, poderá também ser desejável tratá-lo para remover quaisquer impurezas indesejadas, tais como partículas de pó, antes de introduzi-lo na fermentação. Por exemplo, o substrato gasoso poderá ser filtrado ou limpo usando métodos conhecidos.

Adicionalmente, é frequentemente desejável aumentar a concentração de CO de uma corrente de substrato (ou a pressão parcial de CO em um substrato gasoso) e, assim, elevar a eficiência de reações de fermentação em que CO é um substrato. Aumento da pressão parcial de CO em um substrato gasoso aumenta a transferência de massa de CO para um meio de fermentação. A composição de correntes de gás usadas para alimentar uma reação de fermentação pode ter um significativo impacto na eficiência e/ou custos dessa reação. Por exemplo, O<sub>2</sub> poderá reduzir a eficiência de um processo de fermentação anaeróbica. Processamento de gases indesejáveis

ou desnecessários em estágios de um processo de fermentação antes ou depois da fermentação pode aumentar o limite em tais estágios (por exemplo, onde a corrente gasosa é comprimida antes de entrar em um biorreator, energia desnecessária poderá ser usada para comprimir gases que não são necessários na fermentação). Consequentemente, poderá ser desejável tratar correntes de substrato, particularmente correntes de substrato derivadas de fontes industriais, para remover componentes indesejáveis e elevar a concentração de componentes desejáveis.

Correntes de substrato derivadas de uma fonte industrial são normalmente variáveis em composição. Além disso, correntes de substrato derivadas de fontes industriais que compreendem altas concentrações de CO (tal como pelo menos 50% de CO ou pelo menos 65%) frequentemente apresentam um componente com baixo teor de H<sub>2</sub> (tal como menos 20% ou menos 10% ou 0%). Como tal, é particularmente desejável que microorganismos sejam capazes de produzir produtos por fermentação anaeróbica de substratos que compreendem uma faixa de concentrações de CO e H<sub>2</sub>, particularmente altas concentrações de CO e baixas concentrações de H<sub>2</sub>. Os inventores testaram *C. autoethanogenum* (obtida de DSMZ sob número de acesso DSM 10061) e observaram se a mesma não cresceria e produziria produtos em substratos gasosos compreendendo CO sem um componente de H<sub>2</sub>. Entretanto, as bactérias da presente invenção apresentam a surpreendente capacidade de crescer e produzir produtos (etanol e acetato) mediante fermentação de um substrato que compreende CO (e sem H<sub>2</sub>).

A presença de hidrogênio na corrente de substrato pode levar a um aperfeiçoamento na eficiência de captura de carbono total e/ou produtividade de etanol. Por exemplo, WO02/08438 descreve a produção de etanol utilizando corrente de gás de várias composições. WO02/08438 relata uma corrente de substrato que compreende 63% de H<sub>2</sub>, 32% de CO e 5% de CH<sub>4</sub> em que é fornecida a uma cultura de *C. ljungdahlii* em um biorreator para promover crescimento microbiano e produção de etanol. Quando a cultura atingiu um estado estacionário e crescimento microbiano não era mais o objetivo princi-



pal, a corrente de substrato foi mudada para 15,8% de H<sub>2</sub>, 36,5% de CO, 38,4% de N<sub>2</sub> e 9,3% de CO<sub>2</sub> a fim de proporcionar CO sob um ligeiro excesso e promover produção de etanol. Esse documento também descreve correntes gasosas com maiores e menores concentrações de CO e de H<sub>2</sub>.

5 Entender-se-á que os processos da presente invenção conforme descritos aqui podem ser usados para reduzir as emissões de carbono atmosférico total de processos industriais, mediante captura de gases contendo CO produzidos como resultado de tais processos e usando-os como substratos para os processos de fermentação descritos neste relatório.

10 Alternativamente, em outras modalidades da invenção, o substrato gasoso que contém CO poderá ter como fonte a gaseificação de biomassa. O processo de gaseificação envolve combustão parcial de biomassa em uma alimentação restrita de ar ou oxigênio. O gás resultante normalmente compreende principalmente CO e H<sub>2</sub>, com volumes mínimos de CO<sub>2</sub>, metano, etileno e etano. Por exemplo, subprodutos de biomassa obtidos durante a extração e processamento de matérias-primas tal como açúcar de cana-de-açúcar, ou amido de milho ou grãos, ou rejeito de biomassa não alimentícia gerado pela indústria madeireira, poderão ser gaseificados para produzir um gás que contém CO adequado para uso na presente invenção.

20 É geralmente preferido que o substrato gasoso que contém CO contenha uma maior proporção de CO. Em modalidades particulares, o substrato gasoso compreende pelo menos cerca de 65%, ou pelo menos cerca de 70% a cerca de 95%, de CO em volume. Não é necessário que o substrato gasoso contenham qualquer hidrogênio. O substrato gasoso também contém opcionalmente algum CO<sub>2</sub>, tal como cerca de 1% a cerca de 30% em volume, tal como cerca de 5% a cerca de 10% de CO<sub>2</sub>.

25 Entender-se-á que para crescimento das bactérias e para que ocorra fermentação de CO a etanol, além do gás de substrato que contém CO será necessário que um meio nutriente líquido adequado seja alimentado ao biorreator. Um meio nutriente conterá vitaminas e minerais suficientes para permitir crescimento do micro-organismo usado. Meios anaeróbicos adequados para a fermentação de etanol usando CO como única fonte de

30

carbono são conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, meios de cultura adequados são descritos *in* Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.173.429 e 5.593.886, e WO 02/08438, bem como outras publicações referidas acima. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura é LM23 conforme descrito nos exemplos a seguir.

A fermentação deve desejavelmente ser realizada sob condições apropriadas para que a fermentação CO a etanol ocorra. Condições de reação que devem ser consideradas incluem pressão, temperatura, vazão de gás, vazão de líquido, pH do meio de cultura, potencial redox do meio de cultura, taxa de agitação (se utiliza um reator com agitação contínua), nível de inoculo, concentrações máximas de substrato gasoso para assegurar que CO na fase líquida não se torne limitativo, e concentrações máximas de produto para evitar inibição de produto.

As condições de reação ótimas dependerão parcialmente do micro-organismo particular da invenção usado. No entanto, em geral, prefere-se que a fermentação seja realizada a pressão maior que a pressão ambiente. Operar a pressões elevadas permite um significativo aumento na taxa de transferência de CO da fase gasosa para a fase líquida em que o mesmo pode ser absorvido pelo micro-organismo como fonte de carbono para a produção de etanol. Isso, por sua vez, significa que o tempo de retenção (definido como o volume de líquido no biorreator dividido pela vazão de gás de entrada) pode ser reduzido quando biorreatores são mantidos a pressão elevada em vez de a pressão atmosférica.

Também, uma vez que uma dada taxa de conversão de CO a etanol é em parte uma função do tempo de retenção de substrato e atingir um tempo de retenção desejado, por sua vez, dita o volume exigido de um biorreator, o uso de sistemas pressurizados pode grandemente reduzir o volume do biorreator exigido e, conseqüentemente, o custo de capital do equipamento de fermentação. De acordo com exemplos dados na Patente dos Estados Unidos No. 5.593.886, o volume do reator pode ser reduzido em proporção linear a elevações na pressão de operação do reator, isto é, biorreatores operados a 10 atmosferas de pressão precisam apenas de um

décimo do volume daqueles operados a 1 atmosfera de pressão.

Os benefícios de conduzir uma fermentação de gás a etanol a pressões elevadas são também descritos em outro lugar. Por exemplo, WO 02/08438 descreve fermentações de gás a etanol realizadas sob pressões de 0,2 MPa manométrico e 0,5 MPa manométrico, fornecendo produtividades de etanol de 150 g/l/dia e 369 g/l/dia, respectivamente. Contudo, verificou-se que fermentações como exemplos realizadas utilizando meios de cultura similares e composições de gás na entrada a pressão atmosférica produziram entre 10 e 20 vezes menos etanol por litro ao dia.

É também desejável que a taxa de introdução de substrato gasoso que contém CO seja tal de modo a assegurar que a concentração de CO na fase líquida não se torne limitativa. Isso ocorre porque uma consequência de condições limitadas de CO poderá ser aquela em que o produto etanol é consumido pela cultura.

Em certas modalidades, um processo de fermentação de acordo com a presente invenção descrito acima resultará em um caldo de fermentação que compreende etanol, bem como células bacterianas, no meio de cultura aquoso. Em modalidades preferidas do método, o etanol é recuperado do caldo de fermentação.

Em certas modalidades, a recuperação de etanol compreende remover continuamente uma porção de caldo e recuperar o álcool da porção removida do caldo.

Em modalidades particulares, a recuperação de etanol inclui passar a porção removida do caldo que contém etanol através de uma unidade de separação para separar células bacterianas do caldo, para produzir um permeado que contém álcool sem células e retornar as células bacterianas ao biorreator.

Em certas modalidades, os métodos da invenção são processos contínuos.

Em modalidades particulares, acetato é produzido como subproduto da fermentação.

Em uma modalidade adicional, o etanol e o acetato são recupe-

rados do caldo.

Em certas modalidades, a recuperação de etanol e acetato compreende remover continuamente uma porção de caldo e recuperar separadamente etanol e acetato da porção removida do caldo.

5 Em algumas modalidades, a recuperação de etanol e acetato inclui passar a porção removida do caldo que contém etanol e acetato através de uma unidade de separação para separar células bacterianas do etanol e acetato, para produzir um permeado que contém etanol e acetato sem células e retornar as células bacterianas ao biorreator.

10 Nas modalidades acima, a recuperação de etanol e acetato inclui preferencialmente remover primeiro etanol do permeado sem células seguido de remoção de acetato do permeado sem células. Preferencialmente, o permeado sem células é, então, retornado ao biorreator.

15 Em certas modalidades, os métodos da invenção são processos contínuos.

Etanol é o produto final desejado preferido da fermentação. O etanol poderá ser recuperado do caldo de fermentação por meio de métodos conhecidos no estado da técnica, tais como destilação fracionada ou evaporação e fermentação extrativa. Destilação de etanol de um caldo de fermentação produz uma mistura azeotrópica de etanol e água (isto é, 95% de etanol e 5% de água). Etanol anidro pode subsequentemente ser obtido pelo uso de tecnologia de desidratação de etanol por meio de peneira molecular, que é também bastante conhecida no estado da técnica. Procedimentos de fermentação extrativa envolvem o uso de solvente miscível em água que apresenta baixo risco de toxicidade ao organismo da fermentação, para recuperar o etanol do caldo de fermentação diluído. Por exemplo, álcool oleílico é um solvente que poderá ser usado nesse tipo de processo de extração. Álcool oleílico é continuamente introduzido em um fermentador, após o que esse solvente eleva-se formando uma camada no alto do fermentador que é continuamente extraída e alimentada por meio de uma centrífuga. Água e células são então imediatamente separadas do álcool oleílico e retornadas ao fermentador enquanto o solvente que transporta etanol é alimentado a

20

25

30

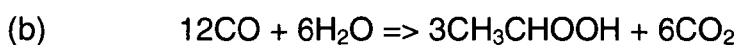
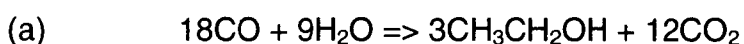
uma unidade de vaporização instantânea. A maior parte do etanol é vaporizada e condensada enquanto o álcool oleílico é não volátil e é recuperado para reutilização na fermentação.

5 Acetato poderá também ser recuperado do caldo de fermentação usando métodos conhecidos no estado da técnica. Métodos para a recuperação de acetato são descritos em detalhes na WO2007/117157 e WO2008/115080.

10 Em certas modalidades da invenção, etanol e acetato são recuperados do caldo de fermentação removendo continuamente uma porção do caldo do biorreator de fermentação, separando células microbianas do caldo (convenientemente por filtração) e recuperando primeiro etanol e em seguida acetato do caldo. O etanol poderá ser convenientemente recuperado por destilação e o acetato poderá ser recuperado por adsorção sobre carvão vegetal ativado, utilizando métodos descritos acima. As células microbianas  
15 separadas são preferencialmente retornadas ao biorreator de fermentação. O permeado sem células remanescente após o etanol e acetato terem sido removidos é também preferencialmente retornado ao biorreator de fermentação. Nutrientes adicionais (tais como vitaminas B) poderão ser adicionados ao permeado sem células para reabastecer o meio nutriente antes do mesmo ser retornado ao biorreator. Também, se o pH do caldo for ajustado como descrito acima para aumentar adsorção de ácido acético no carvão vegetal ativado, o pH deverá ser reajustado em um pH similar àquele do caldo no  
20 biorreator de fermentação, antes de ser retornado ao biorreator.

#### *Estequiometria da reação*

25 Sem desejar estar vinculado em qualquer teoria, acredita-se que as reações químicas para a fermentação de CO a etanol (a) e ácido acético (b) no processo da presente invenção são como seguem:



30 A invenção será agora descrita mais detalhadamente com referência aos exemplos seguintes não limitativos.

**EXEMPLOS***Meio de Cultura*

A composição de componentes do meio de cultura usados nos exemplos seguintes é fornecida nas tabelas 1 e 2.

5 **Tabela 1: Composição de Meio de Cultura Para *C. autoethanogenum***

Componente do Meio de Cultura	Concentração por 1,0 L de Meio de Cultura (LM17)	Concentração por 1,0 L de Meio de Cultura (LM23)	Concentração por 1,0 L de Meio de Cultura (LM33)
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,5 g	0,5 g	0,5 g
NaCl	0,2 g	0,2 g	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,2 g	0,2 g	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g	-	-
Tampão de fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0)*	-	160 ml	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	2,04 g
NH <sub>4</sub> Cl	-	0,6 g	2,5 g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a 85%	0,05 ml	0,05 ml	-
KCl	0,15 g	0,15 g	0,15 g
Solução metálica com traços de composto (LS06)	10 mL	10 mL	10 mL
Solução de vitamina B composta (LS03)	10 mL	10 mL	10 mL
Resazurina (1.000 mg/L de estoque)	1 mL	1 mL	2 mL
FeCl <sub>3</sub>	0,0025 g	0,0025 g	0,01 g
Monidrato de cisteína-HCl	0,75 g	0,75 g	0,5 g
Agarose (opcional)		15 g	15 g
Água destilada	Até 1 litro	Até 1 litro	Até 1 litro

\* Combinação de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (13,2 g) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,1 g) em H<sub>2</sub>O (1 L).

**Tabela 2: Soluções de mineral composto de *C. autoethanogenum* e vitaminas**

Solução compósita de vitamina B (LS03)	por L de estoque	Solução metálica com traços de composto (LS06)	por L de estoque
Biotina	20,0 mg	Ácido Nitrotriacético	1,5 g
Ácido fólico	20,0 mg	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,0 g
Cloridreto de piridoxina	10,0 mg	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,5 g
Tiamina.HCl	50,0 mg	NaCl	1,0 g
Riboflavina	50,0 mg	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Ácido nicotínico	50,0 mg	Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,8 g
Pantotenato de cálcio D (*)	50,0 mg	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 g
Vitamina B12	50,0 mg	ZnO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Ácido p-aminobenzoico	50,0 mg	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Ácido tióctico	50,0 mg	AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,02 g
Água destilada	Até 1 litro	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,30 g
		NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03 g
		Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,02 g
		NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02 g
		Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02 g
		Água Destilada	Até 1 litro

Meios de cultura LM17, LM23 e LM33 foram preparados sob pH 5,5 como segue. Todos os ingredientes, com exceção de cisteína-HCl, foram misturados em dH<sub>2</sub>O até um volume total de 1 L. Essa solução foi tornada anaeróbica mediante aquecimento até fervura e deixando-a resfriar até temperatura ambiente sob um fluxo constante de gás com 95% de CO, 5% de CO<sub>2</sub>. Uma resfriada, a cisteína-HCl foi adicionada e o pH da solução ajustado em 5,5; anaerobicidade foi mantida por todos os experimentos.

#### 10 *Determinações de etanol e acetato*

Determinações de etanol e acetato nos exemplos seguintes foram feitas usando um cromatógrafo a gás HP 5890 série II, utilizando um detector de ionização por chama (DIC), removível, vidro desativado, revestimento de porta de injeção, reguladores associados, linhas de gás e septos com autoinjeter de amostra HP 7673A. As separações foram efetuadas em

uma Coluna Capilar GC EC1000-*Alltech* EC1000 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m.

O Cromatógrafo a Gás foi operado no modo divisão com um fluxo total de hidrogênio de 50 mL/min com 5 mL de fluxo de purga (divisão 1:10), uma pressão aérea na coluna de 0,1 MPa manométrico resultando em  
5 uma velocidade linear de 45 cm/s. O programa de temperatura foi iniciado a 60°C, mantida por 1 minuto, em seguida, elevada para 170°C a 30°C por minuto. Isso resultou em um tempo de execução total de 4,65 minutos. A temperatura do injetor foi de 180°C e a temperatura do detector, de 225°C.

Os reagentes usados foram Propan-1-ol, grau reagente – Schar-  
10 lau AL0437, Ensaio mínimo por CG 99,5%; Etanol absoluto – Scharlau ET0015, Ensaio mínimo por CG 99,9%; Ácido acético 100% glacial – BDH 100015N, Ensaio mínimo por CG 99,8%;  
Ácido ortofosfórico – BDH 294214, Ensaio mínimo por CG 99,0%; Gás de recuperação de CG Nitrogênio – BOC Sem Oxigênio; Gás de transporte de  
15 CG Hidrogênio – BOC Sem Oxigênio e combustível de DIC; Oxidante de DIC zero ar; Água desionizada.

#### *Densidade celular*

Para determinar a densidade celular nesses experimentos, a absorvância das amostras foi medida a 600 nm (espectrofotômetro) e a  
20 massa seca determinada através de cálculo de acordo com procedimentos publicados. O nível de metabólitos foi caracterizado utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e em alguns casos Cromatografia Gasosa (CG).

#### *CLAE*

25 Sistema de CLAE *Agilent* Série 1100. Fase Móvel: Ácido Sulfúrico 0,0025 N. Fluxo e pressão: 0,800 mL/min. Coluna: *Alltech IOA*; No. de Catálogo 9648, 150 x 6,5 mm, tamanho das partículas, 5  $\mu$ m. Temperatura da coluna: 50°C. Detector: Índice de Refração. Temperatura do detector: 45°C.

30 O método de preparação de amostra para CLAE foi como segue: 400  $\mu$ L de amostra e 50  $\mu$ L de ZnSO<sub>4</sub> 0,15 M e 50  $\mu$ L de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,15M são carregados em um tubo de Eppendorf. Os tubos são centrifugados por 10



min a 12.000 rpm, 4°C. 200 µL de sobrenadante são transferidos para um frasco de CLAE e 5 µL são injetados no instrumento de CLAE.

### **Exemplo 1: Produção de um novo isolado bacteriano da invenção**

5 A nova cepa LBS1560 de *Clostridium autoethanogenum* foi produzida por meio de um programa dedicado de seleção e propagação de culturas microbianas iniciadas da cultura de *C. autoethanogenum* mãe (DSMZ 10061) por um período de 18 meses.

#### *Métodos*

10 Um estoque gelado de *C. autoethanogenum* 10061 (obtido de DSMZ) foi inicialmente descongelado e usado para inocular meio LM23 preparado com 5 g/litro de extrato de levedo na presença de 95% de CO e 5% de CO<sub>2</sub>. Essa cultura não podia ser feita para crescer em meio LM23 na ausência de Extrato de Levedo. Em um esforço para superar as culturas de dependência de extrato de levedo por um período de meses, culturas microbianas que crescem ativamente e que foram observadas produzir a maior parte de etanol e a mais alta razão de etanol para acetato foram subcultivadas repetidamente em meio de cultura contendo concentrações sempre decrescentes de extrato de levedo, sempre na presença de 95% de gás CO, 5% de gás CO<sub>2</sub> no espaço superior. Após esse período, culturas que crescem e produzem etanol e acetato na ausência de extrato de levedo podiam ser observadas. Esse protocolo de seleção foi ativamente mantido para adicionalmente identificar e selecionar culturas que:

- 25 i) cresceram mais rapidamente;
- ii) produziram a maior parte de etanol;
- iii) produziram a mais alta razão de etanol para acetato; e
- iv) cresceram na ausência de extrato de levedo no meio de cultura líquido.

#### **Exemplo 1.1: Seleção de crescimento rápido**

30 A fim de selecionar culturas de crescimento rápido, foram explorados os micro-organismos propensos a produzir ácido acético como subproduto do metabolismo de energia durante períodos de crescimento sob uma corrente de 95% de CO, 5% de gás CO<sub>2</sub>. O acúmulo de ácido acético

no meio de crescimento tem o efeito de baixar o pH do processo. Consequentemente, foi desenvolvida uma configuração de fermentador que diluísse a cultura de uma maneira dependente de crescimento a fim de introduzir uma pressão que selecionaria as populações de mais rápido crescimento.

5 Uma configuração exemplar é mostrada na figura 1, nem que uma cultura de micro-organismos foi fermentada em um biorreator 1. O pH do meio nutriente 2 foi monitorado por meio de uma sonda de pH 3 convencional. Desvios na leitura do pH do ponto de ajuste de 5,5 levou uma bomba 4 a ser ativada, contudo, em vez de o sinal da sonda ser transmitido a uma bomba que do-

10 sava uma solução básica ou ácida; nesse caso, a bomba foi ligada a um frasco 5 contendo meio anaeróbico fresco LM17 sob pH 5,8. Assim, à medida que a cultura crescia, ácido acético era produzido; o pH do meio 2 começou a cair provocando a ativação de uma bomba 4 que introduziu meio sob pH 5,8. A bomba 4 foi somente desativada uma vez o pH do meio retornado

15 a 5,5 ou mais. O nível de líquido no reator 1 foi mantido usando uma sonda de nível 6 ligada a uma segunda bomba 7 que operava para manter o nível de líquido no biorreator 1 em ou abaixo de um nível fixo. Meio bombeado do biorreator 1 foi passado para recipiente de rejeito/meio 8. Por conseguinte, a população de cultura de crescimento foi diluída de maneira ligada a cresci-

20 mento, e quanto mais rápido o crescimento da população, mais acetato era produzido e mais meio fresco era introduzido até afinal volumes de meio relativamente grandes serem introduzidos no fermentador para manter pH que seleciona eficazmente as populações de crescimento mais rápido, na medida em que estas não seriam lavadas em um esforço para manter o volume

25 de líquido do recipiente em um nível fixo. Essa configuração de fermentador foi mantida por diversos meses em certo momento como cultura contínua a fim de isolar culturas de crescimento rápido. A cada 14 dias, uma alíquota da cultura foi removida e deixada crescer em um frasco de soro de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura e 0,2 MPa manométrico de 95% de CO, 5%

30 de CO<sub>2</sub> na parte aérea. Uma vez ativamente em crescimento, a cultura foi preparada e armazenada como estoque em glicerol para trabalho comparativo com aos estoques de cultura originais.

### Resultados

O processo de seleção e subcultura por um período de 18 meses descritos acima resultaram na nova cepa LBS1560 que mostrou ótimo desempenho para cada uma das características i) a iv) acima. A nova cepa de bactérias foi observada ser Gram-positiva (a mesma corou Gram-positiva), não móvel, apresentar forma de bastonete e exibir surpreendentemente pouca a nenhuma capacidade de esporular (conforme descrito adicionalmente a seguir).

LBS1560 foi depositado na DSMZ, Alemanha, de acordo com o Tratado de Budapeste, em 19 de outubro de 2007, e alocado sob o número de acesso DSM 19630.

#### **Exemplo 2: Cultura e Armazenamento de LBS1560**

LBS1560 de *C. autoethanogenum* pode ser cultivada usando as seguintes condições: crescimento sob 95% de gás CO (5% de CO<sub>2</sub>), 0,2 MPa em meio LM23, a 37°C, pH 5,5, com agitação (agitação a 200 rpm) sob condições anaeróbicas. O crescimento pode ser monitorado medindo a DO a 600 nm e efetuando análise microscópica.

Para armazenamento, uma cultura de LBS1560 em fase logarítmica em LM23 + 20% de glicerol é congelada instantaneamente e em seguida armazenada a -80°C.

#### **Exemplo 3: Comparação da nova cepa LBS1560 de *C. autoethanogenum* com a cepa-mãe original DSMZ 10061 de *C. autoethanogenum***

Esse experimento demonstra a eficiência aperfeiçoada da nova cepa LBS1560 para a fermentação anaeróbica a etanol de um substrato gasoso contendo CO, em comparação com a cepa-mãe DSMZ 10061 de *C. autoethanogenum*. Esse experimento também demonstra fermentação eficiente de gás contendo CO a etanol pela nova cepa LBS1560 na presença de altos níveis de CO e na ausência de H<sub>2</sub>.

### Métodos

Estoques congelados da cultura microbiana selecionada LBS1560 e a cultura-mãe original DSMZ 10061 foram tomados, congelados e usados para inocular tubos Hungate de 15 ml selados contendo 5 ml de

meio mínimo líquido de crescimento microbiano anaeróbico (LM23) na presença ou ausência de extrato de levedo (EL) a 0,1% (p/v). Todos os tubos Hungate foram mantidos sob atmosfera com 95% de gás CO, 5% de gás CO<sub>2</sub>. Para cada tubo Hungate, crescimento microbiano e produção de etanol e acetato foram monitorados durante um período de cultura de 7 dias.

### Resultados

Os resultados são apresentados na Tabela 3 abaixo.

**Tabela 3. Comparação de fermentação pela cepa LBS1560 e pela cepa-mãe DSMZ 10061**

Cultura	Meio de Cultura	de Crescimento (g de massa seca)	Etanol (g/l)	Acetato (g/l)	Razão Etanol:Acetato
DSMZ 10061	LM23 + EL	0,443	0,08	3,45	0,023
LBS1560	LM23 + EL	0,0963	0,19	2,07	0,09
DSMZ 10061	LM23	Sem crescimento	N/D	N/D	N/D
LBS1560	LM23	0,583	2,74	1,95	1,41

Os dados apresentados na Tabela 3 ressaltam diversas diferenças reproduzíveis entre a cepa LBS1560 e a cepa-mãe DSMZ 10061. DSMZ 10061 foi incapaz de crescer em meio de cultura mínimo em que faltou extrato de levedo, enquanto LBS1560 pôde crescer em meio de cultura na presença ou ausência de extrato de levedo, mas funcionou melhor em meio de cultura mínimo em que faltou extrato de levedo. LBS1560 crescido em meio de cultura mínimo funcionou melhor em termos de crescimento, produção de etanol e razão de etanol para acetato do que DSMZ 10061 crescido em meio de cultura contendo extrato de levedo.

### Exemplo 4: Características de esporulação de LBS1560

Para identificar características de esporulação, LBS1560 foi exposto a várias condições conhecidas para induzir formação de esporos em bactérias de acordo com a metodologia detalhada abaixo.

- *Inanição*: uma cultura de LBS1560 foi suspensa em água destilada estéril.
- *Exposição a Oxigênio*: ar estéril foi injetado no espaço superior de um tubo Hungate contendo 5 ml de cultura de crescimento, em seguida o

tubo foi colocado em um agitador e incubado a 37°C.

- *Exposição a meio de cultura com baixo pH (pH 3):* micróbios foram crescidos em LM23 (pH 5,5) até uma alta concentração de células, em seguida o meio foi trocado por meio de cultura de crescimento de pH 3.
- 5 • *Exposição a Oxigênio e Frutose como fonte de carbono e de energia:* meio de cultura líquido contendo 5 g/L de frutose e sem agente redutor (isto é, cisteína-HCl) foi saturado com oxigênio e uma alta concentração de células foi suspensa nesse meio por dois dias.

A capacidade de LBS1560 esporular foi determinada por exame microscópico. Amostras bacterianas foram coradas com azul de *coomassie*, o que facilita a observação de esporos. LBS1560 foi observado em várias ocasiões. Essencialmente nenhuma população bacteriana foi observada exibir esporos. Notou-se que enquanto esporos isolados eram observados por microscopia, em alguns casos os mesmos foram estimados ser significativamente menores que 0,1% da população microbiana global. Isso se revelou surpreendente e inesperado, uma vez que a cepa-mãe e cepas afins de *Clostridia* são sabidas esporular. A incapacidade de esporular proporciona vantagens às bactérias da invenção como descrita aqui acima.

#### **Exemplo 5: Produção de etanol por LBS1560**

20 Este exemplo descreve produção contínua de etanol por LBS1560 por um período prolongado. A Figura 2 proporciona um resumo das concentrações de acetato, etanol e biomassa durante um período de duas semanas.

#### *Procedimento*

- 25 1. 1 L de meio de fermentação anaeróbica LM33 em um RAC de 1 litro foi inoculado com uma cultura (DSMZ 19630) de *Clostridium autoethanogenum* (LBS1560) de crescimento ativo em um nível de 5% (v/v). Um fluxo contínuo de gás com 70% de CO e 15% de CO<sub>2</sub>, 1% de H<sub>2</sub>, 14% de N<sub>2</sub>, foi introduzido no fundo do fermentador através de um borrifador de difusão sob
- 30 uma vazão volumétrica de 19 ml/minuto. O pH inicial do fermentador foi ajustado em 5,5 e a velocidade de agitação, ajustada em 400 rpm.
2. Durante a maior parte do experimento, a concentração de ácido

acético da cultura foi mantida abaixo de 4 g/L por meio de um sistema de reciclo de células e troca de meio de cultura. As células foram passadas através de uma membrana de fluxo cruzado *Viva 200*, o filtrado foi coletado e as células retornadas ao reator. O filtrado foi substituído por meio de cultura fresco para assegurar que o volume do meio dentro do reator permanecesse constante.

3. A cultura foi operada continuamente por pelo menos 14 dias. O sistema de reciclo de células removeu 1-1,5 L de meio nutriente líquido a cada 1-2 dias sem remover bactérias do biorreator. O meio removido foi substituído por meio fresco, para manter constante o volume.

4. O pH do fermentador foi elevado de 5,6 para 6,0 nos primeiros quatro dias do experimento.

#### *Resultados*

A fase de crescimento rápido de bactérias acetogênicas (tal como *C. autoethanogenum*) é normalmente associada à alta produção de acetato em um ambiente de fermentação controlada. Nesse experimento, usando a nova cepa LBS1560, durante a fase de crescimento (0-3 dia) a cultura produziu uma média de 0,3 g/L/dia de acetato e 0,16 g/L/dia de etanol. Após a fase de crescimento (3<sup>o</sup>-13<sup>o</sup> dia), a cultura produziu uma média de 1,03 g/L/dia de de acetato e uma média de 1,4 g/L/dia de etanol. Durante o período de produção de álcool, o etanol total produzido foi de 14 g/L. Os resultados mostram um nível de produção de acetato menor que o esperado e significativamente maior que a produção de etanol.

Os métodos e composições específicos descritos aqui são representativos de modalidades preferidas, são exemplares e não pretendem ser limitações do escopo da invenção. Outros objetivos, aspectos e modalidades ocorrerão àqueles habilitados no estado da técnica após consideração deste relatório descritivo, e são abrangidos pelo escopo e espírito da invenção. Será imediatamente evidente àquele habilitado no estado da técnica que substituições e modificações variáveis poderão ser efetuadas na invenção aqui descrita sem se afastar do escopo e espírito da invenção. A invenção ilustrativamente descrita aqui poderá de maneira adequada ser

- praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, ou limitação ou limitações, que não são especificamente descritos aqui como essenciais. Assim, por exemplo, em cada caso descrito neste relatório, em modalidades ou exemplos da presente invenção, os termos "compreendendo", "que compreende(m)", "incluindo", "que inclui(em)", "contendo", "que contém (êm)", etc., devem ser lidos amplamente e sem limitação. Adicionalmente, títulos, cabeçalhos ou similares são proporcionados para aumentar a compreensão do leitor(a) deste documento, e não devem ser lidos como limitativos do escopo da presente invenção.
- 10                   As descrições completas de todos os pedidos, patentes e publicações, citados acima e abaixo, se houver, são incorporados aqui como referência. No entanto, a referência a quaisquer pedidos, patentes e publicações neste relatório não é e não deve ser tomada como reconhecimento ou qualquer forma de sugestão de que os mesmos constituem estado da técnica válido ou formam parte do conhecimento geral comum em qualquer país do mundo.
- 15

## REIVINDICAÇÕES

1. Isolado biologicamente puro, caracterizado pelo fato de que o dito isolado biologicamente puro é a cepa de *Clostridium autoethanogenum* depositada em DSMZ sob o número de acesso DSM 19630.

5 2. Isolado biologicamente puro de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita bactéria possui as seguintes características:

a. nenhuma habilidade de esporular;

b. uma capacidade de crescer em meio mínimo na presença ou  
10 ausência de extrato de levedo; e (i) uma capacidade de crescer mais rapidamente, (ii) uma capacidade para produzir uma razão maior de etanol para acetato, (iii) uma capacidade para produzir uma concentração maior de etanol a partir de um substrato que compreende CO; ou uma combinação de (i) a (iii), em um meio em que extrato de levedo não está presente comparado  
15 a um meio em que extrato de levedo está presente; e em que o isolado biologicamente puro é não móvel.

3. Isolado biologicamente puro de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o isolado biologicamente puro fermenta um substrato que compreende CO a produtos que compreendem etanol e  
20 acetato por fermentação anaeróbica e a razão de etanol para acetato é de pelo menos 1,0.

4. Isolado biologicamente puro de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a produtividade do isolado biologicamente puro é de pelo menos 1,2g de etanol/L de caldo de  
25 fermentação/dia.

5. Isolado biologicamente puro de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a razão de etanol para acetato é de pelo menos 1,2.

6. Isolado biologicamente puro de acordo com qualquer uma das  
30 reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a produtividade do isolado biologicamente puro é de pelo menos cerca de 2,0g de etanol/L de



caldo de fermentação/dia.

7. Método para a produção de um ou mais álcoois, ácidos ou uma combinação dos mesmos, caracterizado pelo fato de que compreende fermentar um substrato que contém CO usando um ou mais isolados biologicamente puros como definido na reivindicação 1.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

- (a) proporcionar um substrato que contém CO a um biorreator que contém uma cultura do isolado biologicamente puro como definido na reivindicação 1; e,
- (b) fermentar anaerobicamente a cultura no biorreator para produzir um ou mais álcoois e/ou ácidos.

9. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o substrato é um substrato gasoso que contém CO obtido como um subproduto de um processo industrial.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o substrato gasoso compreende um gás obtido de uma usina siderúrgica.

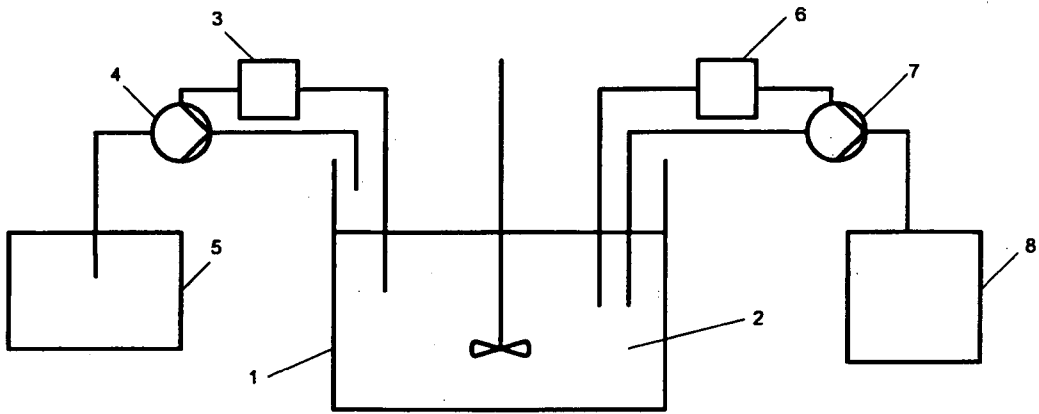


FIG. 1

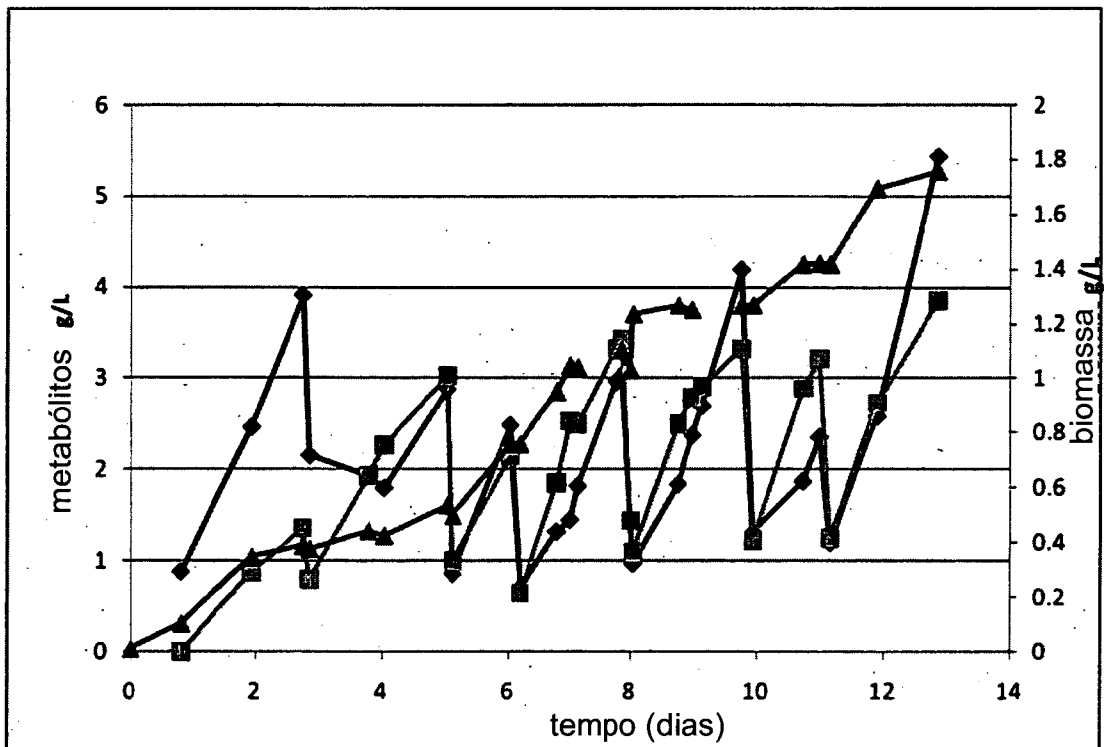


FIG. 2

## RESUMO

Patente de Invenção: "**BACTÉRIAS E MÉTODOS PARA USO DAS MES-  
MAS**

5 A presente invenção refere-se a uma nova classe de bactérias que apresentam eficiência aperfeiçoada na produção de etanol por fermentação anaeróbica de substratos que contêm monóxido de carbono.