

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 605**

51 Int. Cl.:

C12P 7/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2008** **PCT/IN2008/000864**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2009** **WO09087680**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2008** **E 08869279 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017** **EP 2238257**

54 Título: **Procedimiento de alto rendimiento para la producción de biobutanol**

30 Prioridad:

24.12.2007 IN MU25442007

30.06.2008 IN MU13672008

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.11.2017

73 Titular/es:

**RELIANCE LIFE SCIENCES PVT., LTD. (100.0%)
Dhirubhai Ambani Life Sciences Center Plot No.
R-282, TTC Area of MIDC Thane Belapur Road
Rabale, Navi, Mumbai 400 701, MAH, IN**

72 Inventor/es:

**VIDHYA, RANGASWAMY;
JASMINE, ISAR y
PRADEEP, VERMA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 605 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de alto rendimiento para la producción de biobutanol

Campo de la invención

La presente invención versa sobre un procedimiento mejorado de producción de alto rendimiento de butanol usando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132. La presente invención in particular documenta una cepa con mayor tolerancia al butanol en condiciones optimizadas. La presente divulgación también versa sobre un método rápido y eficaz de estimación cuantitativa del butanol durante el proceso de fermentación. La presente divulgación versa, en particular, sobre un método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la estimación cuantitativa del butanol producida por fermentación anaeróbica llevada a cabo usando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132.

Antecedentes de la invención

El butanol o alcohol butílico (a veces denominado también *biobutanol* cuando es producido biológicamente) es un alcohol primario y una estructura con 4 átomos de carbono y la fórmula molecular $C_4H_{10}O$. Es usado fundamentalmente como disolvente, como intermediario en la síntesis química y como combustible. En la actualidad hay un gran interés en producir combustibles como el butanol y el etanol usando microorganismos mediante fermentación que se concentran en los aspectos medioambientales y en la naturaleza renovable de este modo de producción. El butanol es un combustible superior y tiene más valor calorífico que el etanol (Qureshi y Blaschek, 2000). El butanol tiene mayor contenido energético que el etanol (110.000 Btu por galón (30.659 kJ por litro) para el butanol en vez de los 84.000 Btu por galón (23.412 kJ por litro) para el etanol). Es seis veces menos “evaporativo” que el etanol y 13,5 veces menos evaporativo que la gasolina, puede ser transportado a través de oleoductos existentes de combustibles, mientras que el etanol debe ser transportado mediante ferrocarril, barcaza o camión (Jones y Woods, 1986).

El butanol es un producto químico industrial importante. Comparado con el etanol, aditivo de combustible actualmente en boga, el butanol es más miscible con la gasolina y el gasóleo, tiene una menor presión de vapor y es menos miscible con el agua, cualidades que hacen del butanol un aditivo de combustible superior al etanol. Los precios actuales del butanol como producto químico son del orden de \$3,75 por galón (99 centavos de dólar por litro), con un mercado mundial de 370 millones de galones (1.400 millones de litros) por año. Se espera que la demanda del mercado aumente drásticamente si puede producirse económicamente butanol ecológico a partir de biomasa de bajo coste. Además de su uso como combustible, el butanol puede ser usado como disolvente para una amplia variedad de procesos químicos y textiles, en la síntesis orgánica y como producto químico intermedio. También se usa como disolvente de pintura y como disolvente en otras aplicaciones de revestimiento en las que se usa como disolvente latente de evaporación relativamente lenta en lacas y esmaltes curados al medio ambiente. Encuentra otros usos, tales como un componente de líquidos hidráulicos y de frenos (Mutschlechner *et al.*, 2000). También se usa como base para perfumes, pero por sí solo tiene un aroma intensamente alcohólico.

Desde la década de 1950, la mayor parte del butanol en los Estados Unidos es producido comercialmente a partir de combustibles fósiles. El proceso más común parte del propano, al que se hace atravesar una reacción de hidroformilación para formar butanal, que a continuación es reducido con hidrógeno hasta obtener butanol. El butanol se produce mediante fermentación a partir de maíz, hierba, hojas, residuos agrícolas y biomasa diversa.

La producción de butanol y acetona industriales a través de la fermentación, usando *Clostridium acetobutylicum*, se inició en 1916. Chaim Weizmann, alumno de Louis Pasteur, aisló el microbio que formaba la acetona. Hasta la década de 1920, la acetona era el producto buscado, pero por cada kilogramo de acetona fermentado, se formaban dos kilogramos de butanol. Una creciente industria de pintura para la automoción dio la vuelta al mercado y ya en 1927 el butanol se volvió lo principal y la acetona se convirtió en el producto secundario.

La producción de butanol por fermentación declinó desde la década de 1940 y durante la de 1950, principalmente porque el precio de los productos petroquímicos cayó por debajo del de los sustratos a base de fécula y azúcar, tales como los de maíz y melaza. Los gastos generales del sistema de fermentación por lotes, que requiere mucha mano de obra, combinados con las bajas producciones, contribuyeron a la situación. La producción de acetona y butanol derivados de la fermentación cesó a finales de la década de 1950.

La fermentación de acetona-butanol-etanol (ABE) por *Clostridium acetobutylicum* es una de las fermentaciones industriales conocidas desde hace más tiempo. Ocupó el segundo puesto en su escala de producción, solo por detrás de la fermentación de etanol por levadura, y es uno de los mayores procedimientos biotecnológicos jamás conocidos. Sin embargo, la fermentación en sí, ha sido muy complicada y difícil de controlar. La fermentación ABE ha declinado continuamente desde la década de 1950, y ahora casi todo el butanol se produce mediante rutas petroquímicas. En una fermentación ABE típica, en primer lugar, el *C. acetobutylicum* produce los ácidos butírico, propiónico, láctico y acético, el pH del cultivo cae y experimenta un cambio metabólico “en mariposa” y se forman butanol, acetona, isopropanol y etanol. En fermentaciones ABE convencionales, la producción de butanol a partir de glucosa es baja, normalmente de aproximadamente el 15 por ciento y rara vez superando el 25 por ciento.

La producción de butanol estuvo limitada por una grave inhibición causada por el producto. El butanol a una concentración del 1 por ciento puede inhibir significativamente el desarrollo celular y el proceso de fermentación. En consecuencia, la concentración de butanol en las fermentaciones ABE convencionales suele ser menor del 1,3 por ciento. El problema clave asociado con la producción de butanol es la toxicidad del butanol o su inhibición del microorganismo fermentador, lo que da como resultado un bajo título de butanol en el caldo de fermentación (Ezeji *et al.*, 2007). El butanol es sumamente tóxico para los organismos biológicos a concentraciones muy bajas del 2% (Jones y Wood, 1986). Esta toxicidad puede deberse a que el butanol se localiza en la membrana plasmática y altera varios procesos fisiológicos, incluyendo la permeabilidad de la membrana, el transporte de solutos, el mantenimiento de la fuerza motriz de los protones, la conformación y la actividad de las proteínas intrínsecas de la membrana. Se están haciendo esfuerzos para mejorar el nivel de tolerancia del butanol en diferentes especies de *Clostridia* con distintos grados de éxito (Evan y Wang, 1988). El reciente interés en la producción de butanol ha llevado a la reevaluación de la fermentación de acetona-butanol-etanol (ABE), incluyendo estrategias para reducir o eliminar la toxicidad del butanol para el cultivo.

En los últimos veintitantos años, ha habido numerosos intentos de diseño por mejorar la producción de butanol en fermentación ABE, incluyendo el reciclado de células y la inmovilización de células para aumentar la densidad de las células y la productividad del reactor y usando una fermentación extractiva para minimizar la inhibición del producto. A pesar de muchos esfuerzos, los mejores resultados jamás obtenidos para las fermentaciones ABE hasta la fecha siguen siendo de menos del 2 por ciento en concentración de butanol, 4,46 g/L/h de productividad, y un rendimiento de menos del 25 por ciento a partir de glucosa. Hace tiempo que viene siendo una meta de la industria optimizar el proceso de fermentación ABE.

Con ello en mente, se desarrolló un procedimiento alternativo usando cultivos inmovilizados continuos de *Clostridium tyrobutyricum* y *Clostridium acetobutylicum* para producir una productividad óptima de 4,64 g/L/h y un rendimiento del 42 por ciento. En términos simples, un microbio maximiza la producción de hidrógeno y ácido butírico, mientras que el otro convierte el ácido butírico en butanol. En comparación con la fermentación ABE convencional, este proceso elimina la producción de los ácidos acéticos, láctico y propiónico, acetona, isopropanol y etanol. El proceso de fermentación ABE solo produce hidrógeno, ácido butírico, butanol y dióxido de carbono, y dobla la producción de butanol de una fanega de maíz, de 1,3 a 2,5 galones (1,38 a 2,66 litros) por fanega. Las desventajas asociadas con tal proceso son dobles: tener que mantener dos conjuntos de condiciones para los dos cultivos, mantener completa anaerobiosis en el sistema inmovilizado, enfrentarse a los gases producidos durante la fermentación y su efecto en el mantenimiento de la integridad de la matriz usada para la inmovilización.

En las fermentaciones ABE convencionales, la producción de butanol a partir de glucosa es baja —del 15%-25%— y la concentración de butanol en la fermentación suele ser menor del 1,3%. (El butanol a una concentración del 1% puede inhibir significativamente el desarrollo celular y el proceso de fermentación). Ha habido numerosos esfuerzos a lo largo de los años para mejorar la producción de butanol usando diversas técnicas para minimizar la inhibición del producto.

En este respecto, para desarrollar un procedimiento para la producción y la tolerancia máximas de este importante combustible mediante diseño de procedimientos, estandarización de medios y de condiciones de fermentación, la mejora de cepas es de suma importancia (Agarwal *et al.*, 2005). Está documentado que factores fisiológicos y nutricionales tales como la concentración inicial de azúcares, fuentes complejas de nitrógeno, tamaño del inóculo, concentraciones del ion carbonato, pH y temperatura del medio de cultivo son los factores más críticos que afectan tanto al desarrollo celular como a la producción de butanol (Samuelov *et al.*, 1991; Nghiem *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999).

La patente estadounidense 4.757.010 y la solicitud de patente europea EP 00111683 proporcionan una cepa mejorada de *Clostridium* para una mayor tolerancia al butanol. El documento JP03058782 proporciona la cepa de *Clostridium pasteurianum* CA 101 (FERM P-10817) como mutante del género de bacteria *Clostridium* que tiene resistencia analógica al compuesto intermedio fermentado de butanol y la productividad de butanol. La patente estadounidense 4.539.293 demuestra el uso del cocultivo de microorganismos del género *Clostridium*, favoreciendo uno de ellos la producción de ácido butírico y soportando el otro la formación de butanol. La solicitud de patente japonesa JP 63157989 presenta la producción de butanol cultivando una cepa diferente de *Clostridium pasteurianum* var. I-53 (FERM P-9074) en un medio líquido que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y otras sales inorgánicas a 28-33°C en una condición de pH ligeramente ácido en estado anaeróbico durante 2-4 días.

Sin embargo, los problemas asociados en estas cepas modificadas son que el uso de cepas genéticamente modificadas para la producción de combustible no puede competir con la forma natural, ya que hay que esterilizar la materia prima para cerciorarse de que no hay competencia para los organismos genéticamente modificados. Además, los organismos o diversas cepas genéticamente modificados son costosos de desarrollar y no hallan relevancia en productos de gran volumen.

Se usan diversas técnicas alternativas *in situ*/en línea de eliminación de butanol, incluyendo sistemas a base de membranas, tales como pervaporación, extracción líquido-líquido y arrastre por gas.

La patente estadounidense nº 4.777.135 describe un método de producción de butanol por fermentación que comprende cultivar en condiciones anaerobias microorganismos productores de butanol en un medio de cultivo que contiene fluorocarbono. Este procedimiento no es viable a escala comercial, dado que el fluorocarbono no es ecológico.

- 5 La patente estadounidense 4.605.620 proporciona un procedimiento para obtener butanol usando un medio que contiene un hidrato de carbono y fosfato, en el que los experimentos se llevaron a cabo con un contenido total de fosfato de 1,0-0,4 mmoles. Este procedimiento plantea una restricción, porque se requiere el medio limitante de fosfato.

- 10 La patente estadounidense 4.560.658 proporciona un procedimiento para la producción de butanol mediante fermentación de compuestos con contenido de carbono con *Clostridium acetobutylicum* en el que la fermentación se realiza en un medio acuoso que contiene una concentración suficiente de monóxido de carbono disuelto. Sin embargo, el uso de monóxido de carbono hace el procedimiento poco seguro medioambientalmente.

- 15 La patente estadounidense 4.520.104 proporciona un procedimiento para la producción continua de butanol por fermentación de hidratos de carbono con *C. acetobutylicum*. Este procedimiento combina una producción continua de inóculo con una tasa de disolución elevada y el sometimiento del caldo de fermentación a un ciclo a través de material que adsorbe butanol, por lo que se mantiene una población vigorosa de células en el reactor de fermentación para periodos prolongados de tiempo. El proceso está ideado para eliminar el butanol producido en el caldo para evitar su toxicidad sobre las células.

- 20 La patente japonesa JP 62278989 proporciona un procedimiento de fermentación para la producción de acetona y butanol manteniendo una cepa productora de butanol en estado de reposo, añadiendo una fuente de carbono a las células para efectuar la producción de acetona y butanol en poco tiempo, recuperando y concentrando la cepa productora de butanol, sometiéndola a un golpe de calor y añadiéndola a un tanque de fermentación. En el procedimiento se requiere un golpe de calor para activar las esporas de *Clostridium*, y es muy rutinario.

- 25 La solicitud de patente japonesa proporciona un germen celulolítico anaeróbico; por ejemplo, se inoculan *Clostridium cellobioparum* ATCC15832 o *Ruminococcus albus* ATCC27211, y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* en un medio de cultivo que contiene un material que contiene celulosa —por ejemplo, madera, desperdicios de papel o pasta papelera— como fuente principal de carbono, y se cultiva a 25-45°C y 4-9 de pH en condiciones anaerobias durante aproximadamente 2-20 días para recoger del cultivo resultante el compuesto deseado, que contiene oxígeno, y que consiste esencialmente en butanol. Este proceso lleva mucho tiempo y requiere aproximadamente 20 días para su terminación; por ende, no es viable a gran escala.

- 30 La patente japonesa 63269988 da a conocer una fermentación de butanol en la que se somete a levadura a una autodigestión en un tanque de fermentación y a proliferación antes de la inoculación de la cepa productora de butanol. El espacio en el tanque de fermentación se vuelve anaerobio y la temperatura aumenta por la proliferación de la levadura para llevar a cabo la fermentación de butanol. Una autodigestión ineficaz llevaría a la contaminación del caldo por la levadura.

El documento US20050233031 proporciona un procedimiento de producción de butanol que incluye tratar material de origen vegetal para proporcionar un agua madre acuosa que contiene azúcares en un proceso de fermentación para producir un producto de fermentación. El procedimiento implica varias etapas y, por lo tanto, resulta engorroso y tedioso.

- 40 La patente japonesa JP 200535328801 proporciona un método de producción de butanol en el que se prepara una solución de cultivo usando una formulación del residuo alimenticio con posos de licor destilado japonés y agua, y la fermentación de butanol se lleva a cabo en la solución de cultivo. El uso de licor destilado japonés está limitado a los experimentos de producción llevados a cabo en Japón.

- 45 La patente francesa FR2550222 proporciona un procedimiento en dos etapas en el que una primera etapa de siembra con *Clostridium acetobutylicum* y una segunda etapa de siembra con una levadura que produce etanol, comenzando la segunda etapa cuando el pH del medio de fermentación de la primera etapa ha alcanzado un valor mínimo. La invención se aplica en particular a la producción de butanol, acetona y etanol a partir de jugos de remolacha azucarera y de patata. El proceso requiere un tratamiento previo, lo que lo hace engorroso.

- 50 Aunque hay informes sobre la explotación de microbios para la producción de butanol por fermentación, aún está por desarrollar un proceso biosintético económicamente viable para la producción de butanol (Jesse *et al.*, 2002).

Mustafa *et al* proporcionaron espectroscopia infrarroja media unida a un análisis de inyecciones secuenciales para la monitorización en línea del proceso de fermentación de acetona-butanol. Esto implica el uso de instrumentos/técnicas sumamente sofisticados que no están disponibles en muchos laboratorios (Mustafa K. *et al.*, *Spectroscopy Letters*, 38, 677-702 (2005)).

- 55 La cromatografía de gases y sensores de pasarela para la estimación en línea del estado de fermentaciones complejas (fermentación de butanol-acetona) mostraron un sistema de fermentación que ha sido diseñado para

demostrar el uso de cromatografía de gases (CG) para la monitorización en línea del butanol-acetona y de otras fermentaciones sacarolíticas complejas (McLaughlin JK, Meyer CL, Papoutsakis ET. (1985) *Biotechnology and Bioengineering*, Volumen 27, Número 8, páginas 1246 - 1257). Sin embargo, los parámetros incluyen la concentración de glucosa y la composición de los gases, así como varios parámetros inobservables (tales como Y_{ATP} , exceso de ATP, y NAD reducida por FdH_2), que caracterizan el estado de la fermentación. Por ende, este método es muy tedioso, al requerir la monitorización de numerosos parámetros.

Las patentes estadounidenses 4521516, 4520104, 4560658 y 4649112 dan a conocer métodos de determinación de butanol por HPLC en los que los componentes eran analizados cromatográficamente por elución con H_2SO_4 0,006N a partir de una resina de intercambio catiónico en forma de hidrógeno. Los componentes eluidos fueron detectados por medio de un refractómetro diferencial, trazados en un registrador y cuantificados usando un integrador electrónico. El área bajo la curva que representa la concentración de cada componente está documentada como un porcentaje del área total. El procedimiento general seguido fue el dado en "Analysis of Carbohydrate Mixtures by Liquid Chromatography", Am. Soc. Brew. Chem. Proc., 1973, pp. 43-46. Las separaciones se efectuaron en una columna HPX-87 de 1 pie (30 centímetros) en forma de hidrógeno, disponible en Bio-Rad Laboratories, Richmond, California. Los hidratos de carbono residuales totales (RTC) en el medio de fermentación se midieron mediante el método de fenol/ácido sulfúrico que ha sido descrito con detalle por Dubois, *et al*, "Colorimetric Method Determination of Sugars and Related Substances", Anal. Chem., 28, 350-356 (1956).

Por ende, estos métodos citados en lo que antecede, en los que generalmente se usa la CG para la estimación de butanol (Bryant y Blaschek, 1988), requieren extracción o derivatización de butanol en hexano u otros disolventes antes de analizar las muestras. Esto hace el procedimiento tedioso y puede haber algunas pérdidas durante las etapas de extracción o derivatización. Se ha documentado un par de métodos de HPLC (Ehrlich *et al.*, 1981) para la estimación de butanol. Pero incluso en estos métodos, el tiempo de elución es demasiado largo (30-50 min) para detectar el butanol. Por ende, no se puede usar tal método para analizar un gran número de muestras.

Artículo titulado "Development of a cost-effective glucose-corn steep medium for production of butanol by *Clostridium beijerinckii*". Autores: M Parekh., J Formanek y HP Blaschek (véase Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1998) 21, 187-191). El artículo evaluó un medio de agua de remojo de maíz (CSW) (1,6% sólidos más 6% glucosa) para el desarrollo y la producción de butanol por la forma natural de *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 y por la cepa mutante BA101, hiperproductora de butanol e hiperamilolítica.

Patente estadounidense nº 4.757.010 titulada "Production of *Clostridium Acetobutylicum* mutants of high Butanol and Acetone productivity, the resultant mutants and the use of these mutants in the joint production of Butanol and Acetone" - Herman *et al.* Cesionario: Institute Française du Pétrole. La publicación da a conocer el mutante *Clostridium acetobutylicum* IFP 904 (ATCC 39058) y que puede ser usado para producir una mezcla de butanol y acetona de mayor concentración.

Artículo titulado "Comparative investigations of growth and solvent formation in '*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*' and *Clostridium acetobutylicum* DSM 792" - Autor: H Biebl (véase Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1999) 22, 115-120).

Artículo titulado "Production of solvents by *Clostridium acetobutylicum* cultures maintained at neutral pH". Autor: Robert H. Holt (véase Applied and Environment Microbiology, diciembre de 1984, p. 1166-1170, Vol. 48, nº 6).

Artículo titulado "Ethanol fermentation of beet molasses by *Clostridium thermohydrosulfuricum*". Autor: Sedat Dönmez y Filiz Özçelik (véase Enzyme Microb. Technol, 1992, Vol. 14, mayo).

Artículo titulado "Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose". Autor: Joseph Formanek *et al* (véase Applied and Environmental Microbiology, junio de 1997, pp. 2306-2310, Vol. 63, nº 6). El artículo evaluó la producción de butanol a partir del *Clostridium beijerinckii* BA101.

Objetos de la invención

Dado que existe la necesidad de un procedimiento que dé una mayor producción de butanol, la presente invención proporciona una condición de cultivo ideal para la cepa natural de *Clostridium* que da como resultado una mayor tolerancia al butanol y, subsiguientemente, en la producción de butanol.

Dado que existe la necesidad de desarrollar un método de análisis de butanol durante la fermentación, la presente divulgación proporciona un método eficaz y robusto de análisis de butanol mediante HPLC que supera los inconvenientes asociados con los métodos conocidos de análisis de butanol. La presente divulgación proporciona un método de HPLC simple y rentable en el que se puede lograr la estimación cuantitativa del butanol sin la necesidad de extracción y en un tiempo de retención corto. La presente invención ha mejorado con éxito la velocidad del análisis, monitorizando así eficazmente el proceso de fermentación.

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la producción de butanol con rendimiento elevado sin ningún cambio en la cepa del microorganismo.

El objeto de la presente invención es proporcionar condiciones óptimas de fermentación para una mayor producción de butanol, usando *Clostridium acetobutylicum*.

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento con condiciones óptimas de fermentación que dé como resultado mayor tolerancia al butanol por parte del microorganismo.

- 5 El objeto de la presente invención es proporcionar una condición de cultivo para altos rendimientos de la fermentación de butanol.

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para mayores producciones de butanol en condiciones de fermentación en una sola tanda.

- 10 El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la obtención de biobutanol usando biomasa diversa.

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento rentable y escalable industrialmente para la obtención de butanol.

Compendio de la invención

- 15 La presente invención versa sobre un procedimiento eficaz para la producción de butanol con alto rendimiento usando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132, sin ningún cambio en la cepa del microorganismo, lo que da como resultado una mayor producción de butanol. La presente invención busca en particular proporcionar condiciones óptimas de cultivo que resulten en mayor tolerancia al butanol por parte del microorganismo. La presente invención busca, además, proporcionar un procedimiento rentable y escalable industrialmente para la producción de butanol.

- 20 Un problema asociado con la fermentación ABE por el *C. acetobutylicum* y el *C. beijerinckii* es la toxicidad del butanol para el cultivo. Esta toxicidad requiere la eliminación continua de los productos tóxicos durante el proceso para la máxima producción de los disolventes. Un aspecto novedoso de la presente invención es la producción de altos rendimientos de butanol (hasta de 20 g/L) en un proceso en una única tanda, sin arrastrar el butanol producido. El proceso no implica ninguna etapa de tanda de alimentación que implicara la etapa adicional de adición de nutrientes. Ni se requiere ningún arrastre de disolventes para alcanzar esta elevada producción. A diferencia de muchos procedimientos documentados que emplean el modo continuo de fermentación, aumentando con ello la probabilidad de contaminación, el presente procedimiento puede completarse en un modo de lote único. Una optimización cuidadosa del medio y la aclimatación han dado como resultado una cepa que es capaz de producir y tolerar tales producciones elevadas de butanol en el caldo. Así, todos estos parámetros hacen el procedimiento de la presente invención más rentable. Además, los inventores también han podido demostrar con éxito el procedimiento en la escala de 5 L.

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de butanol, comprendiendo el procedimiento:

- 35 establecer y mantener un cultivo en un fermentador, comprendiendo dicho cultivo el microorganismo solventogénico *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 y un medio nutriente que comprende hidratos de carbono asimilables, 5% de extracto de vacuno como fuente de nitrógeno y 0,5% de Na_2CO_3 y/o iones de calcio;

mantener la concentración de hidratos de carbono en el fermentador a un nivel suficiente para mantener el proceso de producción;

- 40 mantener la concentración de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 a un nivel suficiente para mantener el proceso de producción;

en el que el proceso se lleva a cabo sin extraer butanol del fermentador;

en el que las condiciones de fermentación están optimizadas a una temperatura entre 33 y 39°C y a un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, para que el proceso dé como resultado una producción de butanol de 20 g/L o dé como resultado una concentración de butanol del 2,5% en el medio de fermentación.

- 45 La presente invención proporciona un procedimiento con mayor tolerancia al butanol sin la necesidad de modificar la cepa. En un aspecto preferente, la presente invención proporciona tolerancia hasta una concentración de butanol del 2,5% en condiciones optimizadas de medio dirigida a un procedimiento para proporcionar la mayor producción de butanol proporcionada en esta invención. La razón más probable de su elevada tolerancia al butanol puede ser que la optimización de procesos haya dado como resultado el conjunto final de condiciones físico-químicas bajo las cuales las limitaciones mencionadas anteriormente se mitigan. Por ejemplo, el potencial redox, la osmolaridad y el flujo de electrones pueden haber sido alterados en las condiciones optimizadas. En las condiciones optimizadas, puede haberse activado o inducido cierto conjunto de enzimas requeridas para la tolerancia al butanol y su producción. El cultivo puede haberse adaptado en el curso del proceso de optimización a un nivel de butanol elevado.

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento con mayor producción de butanol. En un aspecto, la presente invención documenta un aumento de hasta 9 veces en la producción de butanol en botellas anaeróbicas de 500 ml que contienen 300 ml del medio optimizado de azúcar anaerobio (AnS) en contraposición con el medio inicial no optimizado de AT (50 ml).

- 5 La presente divulgación proporciona un procedimiento para la evaluación del biobutanol usando biomasa diversa. En un aspecto preferente, se usaron semillas de jatrofa y tallos de banano. También se estudió la producción de biobutanol usando semillas y tallos pretratados en condiciones diferentes, tales como alcalina, ácida y la digestión por microondas.

- 10 En un aspecto, la presente invención proporciona un proceso que puede graduarse al alza a gran escala. Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria y están incluidos para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente divulgación, las invenciones de la cual pueden entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en esta memoria.

- 15 La presente divulgación proporciona un método simple, eficaz y reproducible para la estimación cuantitativa del butanol empleando HPLC. Las condiciones para la HPLC han sido desarrolladas para obtener un tiempo de retención menor que el de los métodos convencionales. Esto contribuye a reducir el tiempo para la estimación del butanol y también contribuye a monitorizar de manera eficaz el avance de la fermentación. El método de HPLC desarrollado también puede ser usado para el análisis rutinario de gran número de muestras. La presente divulgación proporciona en particular un método HPLC de determinación del butanol durante su proceso de fermentación.

20 La presente divulgación describe la utilización de una columna seleccionada de una serie de columnas de intercambio iónico.

La presente divulgación describe la utilización de un sistema detector que mide el índice de refracción.

- 25 La presente divulgación versa sobre la determinación del butanol durante el proceso de fermentación mediante un método HPLC simple. El método es simple porque el análisis no requiere ninguna extracción de producto y la muestra requerida para la inyección es el sobrenadante del medio de cultivo de fermentación.

- 30 El análisis de la muestra implica la detección de butanol, que es lineal hasta el 2,5%. El procedimiento puede ser usado para la estimación tanto cuantitativa como cualitativa del butanol. El método se usa, en particular, para la detección de butanol en el caldo de fermentación, que puede ser aplicada para el análisis de un gran número de muestras de forma rutinaria.

Breve descripción de los dibujos

La **Fig. 1** muestra el efecto de pH diferentes en la producción de butanol por *Clostridium acetobutylicum* después de 84 h de incubación.

- 35 Se observó que, aunque el butanol se produjo en el intervalo de pH de 5,0 a 7,0, el pH óptimo para la producción es 6,5, produciendo 3,2 g/l de butanol en 84 h.

La **Fig. 2** muestra el efecto de diferentes temperaturas (°C) en la producción de butanol por *Clostridium acetobutylicum* después de 84 h de incubación.

Los resultados sobre el efecto de diferentes temperaturas (25, 33, 37, 39 y 45°C) mostraron que se producían 3,0 g/l de butanol a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ en 84 h. Sin embargo, a 25 y 55°C, no se observó ninguna producción de butanol significativa.

- 40 La **Fig. 3** muestra el efecto de diferentes fuentes de carbono (2%) en la producción de butanol.

Mientras se estudiaba el efecto de los factores nutricionales, se observó que ninguna de las fuentes de carbono sometidas a ensayo soportaba tanto butanol ($3,2 \text{ gL}^{-1}$) como el producido en el control, o sea, en glucosa. Esta fue seguida por el extracto de malta, que soportó $2,4 \text{ gL}^{-1}$ de butanol en 84 h.

La **Fig. 4** muestra el efecto de diferentes concentraciones de glucosa en la producción de butanol.

- 45 Se halló que una concentración de glucosa del 2,0% p/v soporta una producción máxima de $3,2 \text{ gL}^{-1}$ de butanol.

La **Fig. 5** muestra el efecto de diferentes concentraciones de extracto de malta en la producción de butanol.

Se varió la concentración de extracto de malta, la segunda fuente mejor de azúcar, en el medio (1,0-10%). Se produjeron $4,82 \text{ gL}^{-1}$ de butanol cuando se añadió un 5% de extracto de malta junto con un 2% de glucosa en el medio de AnS.

- 50 La **Fig. 6** muestra el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno (1,0%) en la producción de butanol.

Se halló que el extracto de vacuno era la mejor fuente de nitrógeno entre diversas fuentes de nitrógeno sometidas a ensayo, dando como resultado la producción de $5,2\text{gL}^{-1}$ de butanol.

La **Fig. 7** muestra el efecto de diferentes concentraciones de extracto de vacuno en la producción de butanol.

- 5 La optimización de la concentración demostró que un 5,0% p/v de extracto de vacuno es óptimo para la producción de butanol ($7,8\text{gL}^{-1}$).

La **Fig. 8** muestra el efecto de diferentes iones metálicos (0,5%) en la producción de butanol.

Se logró un aumento significativo en la producción de butanol ($11,1\text{gL}^{-1}$) cuando el medio optimizado hasta ese momento fue complementado con Na_2CO_3 al 0,5%. Esto es seguido por iones de calcio, lo que dio como resultado la producción de $9,2\text{gL}^{-1}$ de butanol. Un ion metálico como Cu no soportó ninguna cantidad de producción de butanol.

- 10 La **Fig. 9** muestra el efecto de diferentes concentraciones de carbonato sódico en la producción de butanol.

Se observó que un 0,5% p/v de Na_2CO_3 es óptimo para la producción de butanol ($11,0\text{gL}^{-1}$).

La **Fig. 10** muestra el efecto de la densidad de inóculo en la producción de butanol.

Se observó que se produjeron $14,5\text{gL}^{-1}$ de butanol a la densidad de inóculo de 1%. Sin embargo, con el aumento en la densidad de inóculo más allá del 2%, la producción de butanol decayó.

- 15 La **Figura 11** muestra el perfil de fermentación del butanol en una escala de 5 L.

El perfil de fermentación en una escala de 5 L indica que la producción de butanol es mucho más rápida a una escala mayor, alcanzando la producción 20 g/L en 48 h y alcanzando un estancamiento posteriormente.

La **Figura 12** muestra el efecto del butanol en el desarrollo de *C. acetobutylicum* en un medio no optimizado de AnS.

La **Figura 13** muestra el efecto del butanol en el desarrollo de *C. acetobutylicum* en un medio optimizado de AnS.

- 20 La **Figura 14** muestra los resultados de un análisis de transferencia de Western para la detección de GroEL.

La **Figura 15** muestra un cromatograma HPLC de butanol estándar.

La **Figura 16** muestra un cromatograma HPLC del butanol presente en la muestra (caldo de fermentación).

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

- 25 El término "butanol" o "biobutanol", usado en la presente memoria, se refiere al n-butanol.

La expresión "tolerancia al butanol", usada en la presente memoria, se refiere a la capacidad de la bacteria de sobrevivir y desarrollarse en presencia de $\geq 1,3\%$ butanol en el medio.

El término *Clostridium acetobutylicum* se refiere a la bacteria que tiene la capacidad de producir butanol junto con acetona y etanol en una fermentación anaeróbica.

- 30 El término "producción", usado en la presente memoria, se refiere a la cantidad de butanol producida en el caldo de fermentación en g/L.

El término "HPLC", usado en la presente memoria, se refiere a cromatografía líquida de alta eficacia.

El término "impurezas", usado en la presente memoria, se refiere a subproductos como la acetona, el etanol, etc. producidos durante el proceso.

- 35 **Métodos para la producción de butanol:** Dado que el pH es uno de los factores importantes que afectan tanto al desarrollo como a la producción de moléculas asociada al desarrollo, la producción de butanol fue examinada a diferentes pH. El pH óptimo para la producción de butanol por parte del *Clostridium acetobutylicum* en la presente invención fue 6,5. Esto coincide con los hallazgos de Robson y Jones (1982), que documentaron que el *C. acetobutylicum* P262 presentaba buenos niveles de producción de disolvente en el intervalo de pH de 5,0-6,5. De modo similar, Bielbl (1999) documentó que el *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 presentaba desarrollo y producción de disolvente mucho mejores al pH de 5,5 que al pH 5,0 o inferior.

- 40 La presente invención ha hallado que la temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ es la temperatura óptima para la producción de butanol a partir del *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132. Esto contrasta con los hallazgos anteriores de McCutchan y Hickey (1954), que documentaron una disminución (de hasta el 23%) en la producción de disolvente por *Clostridium* sp. a 37°C , en contraposición con los rendimientos bastante constantes de 31% a 30 y 33°C .

Se estudió el efecto de las fuentes de carbono en la producción de butanol por el *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132, y se observó que la glucosa soportaba la mayor producción de butanol. Esta era seguida por el extracto de malta, la segunda mejor fuente de carbono. Sin embargo, fuentes de carbono como el glicerol y la sacarosa soportaron una cantidad moderada de butanol. Azúcares como la ramnosa no fueron utilizadas en absoluto por la cepa. La razón más probable podría ser que la cepa fuera incapaz de transportar el azúcar 2-desoxi glucosa.

El estudio de la concentración de los azúcares reveló que un 2% de glucosa soportaba 3,2 gL⁻¹ de butanol. Cifras similares fueron documentadas por Biebl (1999), que observó una producción máxima de butanol por el *C. acetobutylicum* ATCC 824 en un medio que contenía un 2,8% de glucosa. Sin embargo, en la mayoría de los estudios, se ha descubierto que 6-7% es la concentración óptima de glucosa para la producción de butanol. En esta dirección, Parekh *et al.* (1998) documentaron que un 6,0% de glucosa en el medio producía 10,0 g/l de butanol a partir de la cepa *C. beijerinckii* 8052 después de 90 h de incubación.

Posteriormente, cuando se variaron los niveles de extracto de malta en el medio en el intervalo 1,0 - 10% p/v mientras se mantenía constante la concentración de glucosa (al 2%), se produjeron 4,8 gL⁻¹ de butanol a un 5% de extracto de malta. De forma similar, varios expertos han investigado el efecto de la limitación de nutrientes en el inicio y el mantenimiento de la producción de disolvente. Por ejemplo, Long *et al.* (1984) documentaron que en la fermentación de lotes usando *Clostridium acetobutylicum* P262, solo se producían ácidos cuando se limitaba la concentración de las fuentes de carbono.

Al complementar el medio con un 5% de extracto de vacuno, se produjo un máximo de 5,3 gL⁻¹ de n-butanol en contraposición con el control (1% de peptona), en el que se observaron 4,8 gL⁻¹ de producción de butanol. La razón más probable de que el extracto de vacuno sea una buena fuente de nitrógeno es que no solo proporciona nitrógeno, sino también vitaminas y otros nutrientes que son esenciales para el desarrollo del microorganismo.

Es sabido que los iones metálicos desempeñan un importante papel en el mantenimiento del metabolismo celular y las actividades enzimáticas (Isar *et al.*, 2006). Se logró un aumento significativo en la producción de butanol cuando el medio optimizado hasta ese momento fue complementado con Na₂CO₃. La razón podría ser que Na⁺ es un cofactor para la mayoría de las enzimas implicadas en el sistema anaerobio. Strobel *et al.* (1991) y Lee *et al.*, (2000) documentaron que los iones de sodio son un factor importante para la captación de nutrientes. Estos iones están implicados en la formación de un gradiente de pH transmembrana y la regulación del pH de intracelular. Entre las diferentes sales de iones de sodio investigadas, se halló que el carbonato y el bicarbonato eran los radicales más efectivos para la producción, resultando en aproximadamente 11,2 gL⁻¹ de butanol.

El cambio en la densidad de inóculo del 1 al 2% no influye significativamente en la producción de butanol. Sin embargo, el aumento en la densidad del inóculo más allá del 2% da como resultado un declive en la producción del disolvente. La razón más probable podría ser que cuando el tamaño del inóculo aumenta más allá del 2%, hay una limitación de la nutrición.

La presente invención proporciona el efecto de diferentes parámetros fisiológicos y nutricionales sobre la producción de butanol por el *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132. Esta cepa produjo inicialmente 0,2 gL⁻¹ de butanol en 84 h en medio alternativo de tioglicolato.

Sin embargo, cuando se empleó la optimización del procedimiento, se produjeron 20,0 gL⁻¹ de butanol en 300 ml del medio optimizado de AnS consistente en glucosa (2%), extracto de vacuno (5%), extracto de malta (5%), extracto de levadura (0,5%), K₂HPO₄ (0,3%), Na₂CO₃ (0,6%), (NH₄)₂SO₄ (0,1%), CaCl₂·2H₂O (0,02%), MgCl₂·7H₂O (0,02%), Na₂S (0,002%), a un pH de 6,5 y 37°C, en condiciones estáticas (con agitación manual intermitente suave) en 96 h. Curiosamente, también se observó que la cepa es tolerante a un 2,5% de butanol en un medio y condiciones optimizados.

La verificación del proceso en un medio de 300 ml indicó con claridad que el procedimiento puede ser aumentado de escala hasta un tamaño mayor y que podrían producirse aproximadamente 20 gL⁻¹ de butanol. La razón más probable de este aumento en la producción podría ser la disponibilidad de un mayor espacio vacío en botellas de mayor tamaño, en contraposición con las botellas menores.

La cepa de *Clostridium* usada en la presente invención ha mostrado tolerancia a un 2,5% de butanol. La razón más probable de esta elevada tolerancia al butanol puede ser que la optimización del proceso ha dado como resultado el conjunto final de condiciones físico-químicas en el que se superan las limitaciones anteriormente mencionadas. Por ejemplo, el potencial redox, la osmolaridad y el flujo de electrones pueden haber sido alterados en las condiciones optimizadas. En las condiciones optimizadas, puede haberse activado o inducido cierto conjunto de enzimas requeridas para la tolerancia al butanol y su producción. El cultivo puede haberse adaptado en el curso del estudio (proceso de optimización). Dado que el nivel real de tolerancia de esta cepa nunca ha sido documentado con anterioridad, también puede tratarse de una propiedad intrínseca no aprovechada de la cepa. En varios casos, una cepa de la que no consta que produzca normalmente una biomolécula empieza a crearla en cantidades significativas después de una optimización de procedimientos (Isar *et al.*, 2006).

Se llevaron a cabo estudios adicionales sobre la utilización de biomasa diversa para la producción de butanol usando las condiciones descritas anteriormente. En particular, la biomasa estudiada fue la torta de semillas de

jatrofa y tallos de banano. Se dieron diversos pretratamientos a la biomasa antes de su uso para la producción de butanol. Estos pretratamientos ponen los azúcares de la biomasa a disposición de la fermentación. Los pretratamientos incluyen su sometimiento a degradación fúngica, al tratamiento ácido, al tratamiento alcalino o a la digestión por microondas.

5 La torta de semillas de jatrofa fue incubada con un cultivo fúngico de *Pluroteous osteratus* a 23°C durante un mes y la biomasa fue extraída con un tampón. Después de su extracción, la biomasa fue usada como suplemento a concentraciones diferentes (1, 3, 5 y 10%) en un medio azucarado anaerobio que tenía un 0,5% de carbonato cálcico. Se obtuvo una producción de 8,4 g/l de butanol después de 48 h usando un 3% de la torta de semillas de jatrofa pretratada fúngicamente.

10 Además de esto, cuando se añadió un 1% de harina de soja en un medio de AnS complementado con un 0,5% de carbonato cálcico y un 4% de extracto de vacuno, se obtuvo una producción máxima de 10,5 g/L de butanol después de 96 h.

También se realizaron experimentos en tallos de banano y semillas de jatrofa pretratados con hidróxido sódico. La biomasa tratada con el álcali fue suplementada a diversas concentraciones en un medio de AnS que tenía un 0,5% de carbonato cálcico. Con una suplementación del 1%, se obtuvo una producción de 8,1 g/L de butanol en un medio de AnS que contenía tallos de banano predigeridos, en contraposición de 5,0 g/L de butanol con torta de semillas de jatrofa predigerida.

Con suplementación de biomasa digerida por microondas se obtuvo una producción de 6,9 g/l de butanol después de 84 h cuando se añadió un 2% de tallos de banano tratados por microondas a un medio de AnS que tenía un 0,5% de carbonato cálcico. Con una suplementación del 1% de torta de semillas de jatrofa digerida por microondas, se obtuvieron 7,0 g/l de butanol después de 84 h.

La suplementación con biomasa tratada con ácido sulfúrico 0,1 N en un medio de AnS que tenía un 0,5% de carbonato cálcico dio como resultado una producción de 5,0 g/l de butanol después de 84 h para un 1% de tallos de banano y una producción de 4,0 g/l de butanol después de 84 h para un 1% de torta de semillas de jatrofa.

25 Cuantificación por HPLC de la producción de butanol

La presente divulgación versa sobre el uso del método de HPLC para la estimación cuantitativa del butanol, que lleva menos tiempo, resulta más rentable, al tener mayor viabilidad industrial, al ser mucho menor el tiempo de elución que indica la presencia de n-butanol: solo 7,3 min en comparación con los 30-50 min de los métodos disponibles en el dominio público. Los factores que son responsables de reducir el tiempo de ejecución son la combinación óptima de los disolventes de la fase móvil acetonitrilo y 0,5mM H₂SO₄ (1:9). El caudal también ha sido optimizado hasta 1,5 ml/min. El método es usado en particular para la detección de butanol en el caldo de fermentación, que puede ser aplicada para el análisis de un gran número de muestras de manera rutinaria.

La presente divulgación versa sobre el desarrollo de un método rápido y eficaz de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la estimación del butanol producido a través de la fermentación anaeróbica llevada a cabo usando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132. Aquí se usa una columna PRP 300X (Hamilton) para la estimación de butanol en un sistema HPLC en el que se usan acetonitrilo y 0,5mM H₂SO₄ (1:9) como fase móvil, a un caudal de 1,5 ml/min a 37°C. Como detector se usa el IR.

Según se ha afirmado más arriba sobre los informes previos sobre el uso de HPLC, el tiempo de ejecución para la estimación de butanol es de hasta 30-50 min, lo que dificulta el análisis de gran número de muestras. De modo similar, el método de CG documentado para la estimación de butanol requiera la extracción o derivatización de la muestra, lo que puede llevar a una pérdida por manipulación.

Hasta la fecha no ha habido ninguna publicación sobre los informes del uso de HPLC que muestre un tiempo de ejecución reducido por debajo de 30 min para la estimación de butanol. Los inventores han desarrollado un procedimiento que proporciona el tiempo de ejecución, que es de solo 7,6 min para detectar una muestra y no requiere ningún procedimiento de extracción. La importancia está en que lleva muy poco tiempo (7,3 min) detectar eficazmente el butanol presente en el caldo de fermentación. Por ende, puede analizarse un enorme número de muestras de manera rutinaria en muy poco tiempo.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferentes de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas que el inventor ha descubierto que funcionan bien en la puesta en práctica de la invención y que, así, se puede considerar que constituyen modos preferentes para su puesta en práctica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Organismo y condiciones de desarrollo

Se cultivó *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 en 125 ml de botellas anaeróbicas que contenían 50 ml del medio de azúcar anaerobio (AnS) con la composición (g L^{-1}): glucosa (20,0); peptona (10,0); extracto de levadura (5,0); K_2HPO_4 (3,0); NaCl (1,0); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2); y Na_2CO_3 (1,0), pH 6,5.

- 5 El medio fue esterilizado (15min, a 121°C) en botellas de vidrio selladas con tapones de caucho butílico. El espacio vacío se llenó con N_2 , y se añadió $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,02%) para eliminar trazas de oxígeno disuelto (Samuelov *et al.* 1991; Lee *et al.*, 2000). El medio reducido fue inoculado con un 2% de inóculo de siembra e incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 96 h con agitación suave intermitente.

Ejemplo 2: Métodos para la estimación del butanol

- 10 Después del periodo de incubación deseado, el cultivo fue retirado de los viales sellados usando jeringas desechables esterilizadas y fue centrifugado a $8000 \times g$ en una centrifugadora Eppendorf (modelo nº 54151) durante 10 min. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de $0,45 \mu$. Las muestras (20 μl) fueron analizadas mediante HPLC, (Ehrlich *et al.*, 1981) en una columna PRP 300X (Hamilton) usando acetonitrilo y $0,5\text{mM H}_2\text{SO}_4$ (9:1) como fase móvil, a un caudal de $1,5 \text{ ml/min}$ a 37°C . El butanol fue detectado usando un detector del IR.

Ejemplo 3: Procedimiento en la fermentación en lotes

- 15 Diversos medios sometidos a ensayo para la producción de butanol fueron el medio de azúcar anaerobio (AnS) (Isar *et al.*, 2006); el medio clostridial reforzado (RC) (Lin y Blaschek, 1983); el medio de fécula soluble (SSM) (Moreira *et al.*, 1981); medios alternativos de tioglicolato (AT) (Lin y Blaschek, 1983); medios de fécula de patata (PSM) (Fouad *et al.*, 1976). Entre los medios sometidos a ensayo, el medio de AnS fue el mejor, produciendo $3,2 \text{ g/l}$ de butanol (Tabla 1). La producción de butanol fue optimizada en el medio de AnS, en el que se estudiaron los efectos de
20 diferentes parámetros fisiológicos y nutricionales.

Tabla 1: Producción de butanol (g/l) en diferentes medios

Tiempo (h)	Medios				
	AnS	RC	AT	SSM	PSM
12	0,31	-	-	-	-
24	0,43	-	0,02	-	-
36	0,6	0,01	0,03	-	-
48	1,2	0,02	0,09	0,01	0,09
60	2,1	0,05	0,1	0,04	0,09
72	2,2	0,10	0,2	0,07	0,10
84	3,2	0,13	0,2	0,09	0,11
96	3,0	0,11	0,1	0,08	0,09

- 25 Subsiguientemente, se estudió el efecto del pH (5- 7) y la temperatura ($25 - 45^\circ\text{C}$) en el medio seleccionado para la producción de butanol. Se observó que el pH óptimo para la producción es 6,5, produciendo $3,2 \text{ g/l}$ de butanol en 84 h (Fig. 1). Los resultados sobre el efecto de diferentes temperaturas (25, 33, 37, 39 y 45°C) demostraron que a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ se producían $3,0 \text{ g/l}$ de butanol en 84 h (Fig. 2).

- 30 Se llevó a cabo la optimización de los parámetros nutricionales, incluyendo la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y los iones metálicos requeridos para una producción máxima de butanol. Diversas fuentes de carbono empleadas incluyen glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, extracto de malta y glicerol a una concentración del 2,0% p/v en el medio. Ninguna de las fuentes de carbono soportó tanta producción de butanol ($3,2 \text{ g L}^{-1}$) como la glucosa en 84 h (Fig. 3). Además, 2,0% p/v de glucosa da el rendimiento más alto, es decir, $3,2 \text{ g L}^{-1}$ de butanol (Fig. 4). Aproximadamente, se produjeron $4,82 \text{ g L}^{-1}$ de butanol cuando se añadió un 5% de extracto de malta junto con un 2% de glucosa en el medio de AnS (Fig. 5).

- 35 Para la optimización de la fuente de nitrógeno, la peptona (1% p/v) del medio fue sustituida por diferentes fuentes de nitrógeno inorgánicas (fosfato amónico ácido, cloruro amónico, nitrato sódico y urea) y orgánicas (extracto de levadura, extracto de vacuno, agua madre de remojo de maíz y triptona) a la misma concentración. Se halló que el extracto de vacuno era la mejor fuente de nitrógeno, dando como resultado la producción de $5,2 \text{ g L}^{-1}$ de butanol (Fig.6). La optimización de concentración demostró que un 5,0% p/v de extracto de vacuno es óptimo para la producción de butanol ($7,8 \text{ g L}^{-1}$) (Fig. 7).

Para evaluar el efecto de los iones metálicos, se añadieron al medio, por separado, las sales carbonato/sulfato/cloruro de diferentes iones metálicos (Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , K^+ , Mn^{++}) a la concentración de 0,5%. Se logró un aumento significativo en la producción de butanol ($11,1 \text{ gL}^{-1}$) cuando el medio optimizado hasta ese momento fue complementado con Na_2CO_3 al 0,5%. Un ion metálico como Cu no soportó ninguna cantidad de

5

Entre las diversas sales de sodio investigadas, incluyendo cloruro, carbonato, sulfato y fosfato, el carbonato fue la más eficaz para la producción, dando como resultado $11,2 \text{ gL}^{-1}$ de butanol (**Tabla 2**). Además, tras optimizar la concentración de Na_2CO_3 , se observó que un 0,5% p/v es óptimo para la producción de butanol ($11,0 \text{ gL}^{-1}$) (**Fig. 9**).

Tabla 2: Efecto de diferentes sales del ion metálico seleccionado en la producción de butanol

Sales minerales	Butanol, gL^{-1}
Na_2CO_3	11,2
Na_2SO_4	9,1
NaCl	9,7
NaNO_3	10,2
Na_2HPO_4	9,0
NaHCO_3	11,1

10

Se investigó el efecto del tamaño del inóculo en la producción de butanol. El medio optimizado fue inoculado con diferentes tamaños de inóculo (1-10%). Se halló que el inóculo al 1% producía el máximo de butanol ($14,5 \text{ gL}^{-1}$) (**Fig. 10**). Sin embargo, con el aumento en la densidad de inóculo más allá del 2%, la producción de butanol decayó.

Ejemplo 4: Determinación de la tolerancia al butanol

Se evaluó la tolerancia de la cepa usada en la presente investigación al nivel de butanol. La cepa fue inoculada en 50 ml del medio optimizado de AnS que contenía diferentes concentraciones de butanol (0,5%, 1,0%, 1,3%, 1,5%, 1,8%, 2,0%, 2,5%). Se incubaron botellas durante 96 h a 37°C en condiciones estáticas con agitación manual intermitente suave. Se halló que la cepa toleraba hasta un 2,5% de butanol en el medio.

Ejemplo 5: Verificación del procedimiento en un medio de 300 ml

La producción de butanol en el medio optimizado fue validada en botellas anaeróbicas de 500 ml que contenían 300 ml del medio optimizado. Se añadió asépticamente en las botellas un 1% del inóculo con la ayuda de una jeringa y se incubó a 37°C durante 96 h. Se produjo un máximo de 20 gL^{-1} de butanol.

Ejemplo 6: Graduación al alza de la producción del biobutanol a escala de 5 L

Se graduó al alza la producción de butanol en un medio optimizado usando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 hasta un nivel de 5 L en un fermentador de 10L (Bioflow IV, NBS, EE. UU.). El medio optimizado de AnS fue esterilizado *in situ* a 110°C durante 15 min. El medio fue inoculado con un 2% del inóculo de siembra ($\text{OD}_{660\text{nm}} \approx 0,6$) y la fermentación se llevó a cabo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 84 h. La velocidad de la hélice fue ajustada inicialmente a 100 rpm e inicialmente se lavó durante 30 min con N_2 estéril comprimido para crear un entorno anaerobio y posteriormente se asperjó con él intermitentemente en el fermentador a una cadencia de 0,5 vvm. Se tomaron muestras periódicamente en un intervalo de 12 h y fueron analizadas en busca de su producción de butanol usando HPLC y CG. Se monitorizaron y regularon continuamente parámetros de fermentación tales como temperatura, suministro de N_2 y frecuencia de agitación.

25

30

La producción de butanol comenzó a las 24 h en el fermentador y en 48 h se produjo un máximo de $20,3 \text{ gL}^{-1}$ de butanol. Posteriormente, no hubo ningún aumento significativo en la producción de butanol (**Figura 11 y Tabla 3**), indicando una reducción significativa en el tiempo de producción de butanol a mayor escala.

35

Tabla 3: Perfil de fermentación en la escala de 5 L

Periodo de incubación (h)	Producción de butanol (gL^{-1})
12	-
24	5,9

Periodo de incubación (h)	Producción de butanol (g/L ⁻¹)
36	14,6
48	20,3
60	21,2
72	19,4
84	19,1

Ejemplo comparativo 7: Estudio de biomasa diversa para la producción de biobutanol

En la Tabla 4 se enumeran los resultados obtenidos usando biomasa diversa.

1. Pretratamiento de semillas de jatrofa con un cultivo fúngico de *Pluroteous osteratus*

- 5 Se suspendieron semillas de jatrofa finamente molidas (100 g, tamaño aproximado de tamiz, 50 mm) en 50 ml de medio salino basal (0,5% glucosa, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,05% KCl, 0,05% extracto de levadura). A esto se añadieron 50 ml de la solución madre I y otros tantos de la solución madre II (solución madre I: 0,02% FeSO₄·7H₂O y solución madre II: 0,016% Mn(CH₃COO)₂·4H₂O, 0,004% Zn(NO₃)₂·4H₂O, 0,1% Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0,006% CuSO₄·5H₂O). Toda la mezcla fue sometida a autoclave a 121°C durante 30 min y fue inoculada con 5-6
- 10 bloques pequeños (1 cm × 1 cm) de agar con extracto de malta (2%) de *Pluroteous osteratus* de dos semanas de edad (cultivado a 25°C). El matraz fue incubado a 23°C durante 30 días. Después de la incubación, se añadieron 500ml de 50mM de tampón de citrato (pH 5,0) y el contenido se mezcló completamente por agitación en el agitador giratorio (200 rpm) durante 2 h. El contenido del matraz fue estrujado usando tela de muselina y la biomasa sólida fue usada como suplemento a diferentes concentraciones (1, 3, 5 y 10%) en 50 ml de medio azucarado anaeróbico
- 15 (AnS) que tenía un 0,5% de carbonato cálcico contenidos en 125 ml de las botellas anaeróbicas selladas. Se obtuvo una producción máxima de 8,4 g/l de butanol después de 48 h usando un 3% de la torta de semillas de jatrofa pretratada fúngicamente.

Además de esto, cuando se añadió un 1% de harina de soja en el medio de AnS complementado con un 0,5% de carbonato cálcico y un 4% de extracto de vacuno, se obtuvo una producción máxima de 10,5 g/L de butanol después de 96 h.

2. Método de digestión de tallos de banano y semillas de jatrofa pretratados con hidróxido sódico

- (a) El tallo de banano fue cortado en trozos pequeños y 100 g de estos trozos de tallo de banano fueron mantenidos en 500 ml de NaOH 0,5M durante 24 h con agitación suave intermitente. Después de 24 h, estos trozos fueron lavados con agua corriente de grifo para eliminar el álcali y fueron añadidos al medio de AnS que tenía 0,5% de CaCO₃ a diferentes concentraciones para estudiar su efecto sobre la producción de butanol. La mayor producción de butanol de 8,1 g/L se logró en un medio de AnS que contenía un 1% de los tallos de banano predigeridos.
- (b) Las semillas de jatrofa fueron finamente molidas y fueron puestas en 500 ml de NaOH 0,5M durante 24 h a temperatura ambiente. Después de 24 h, estos trozos fueron lavados con agua corriente de grifo para eliminar el hidróxido sódico. Las diferentes concentraciones de la torta de semillas de jatrofa pretratadas fueron añadidas al medio de AnS (que contenía 0,5% de carbonato cálcico). La mayor producción de butanol de 5,0 g/L se logró cuando se añadió un 1% de las semillas de jatrofa predigeridas a un medio de AnS que tenía un 0,5% de carbonato cálcico.

3. Digestión de microondas para tallos de banano y semillas de jatrofa

- (a) El tallo de banano fue cortado en trozos pequeños y parcialmente digerido en un horno microondas durante 10 min. El tallo de banano digerido fue molido en una batidora y el banano finamente molido fue digerido de nuevo en un microondas durante 5 min. El azúcar fue analizado mediante el método DNS. Se obtuvo una producción máxima de 6,9 g/l de butanol después de 84 h cuando se añadió un 2% de tallos de banano tratados por microondas a un medio de AnS que tenía un 0,5% de carbonato cálcico.
- (b) Las semillas de jatrofa finamente molidas (20g) fueron añadidas a 500 ml de agua destilada y cocidas durante 10 min en un horno microondas. Las semillas de jatrofa tratadas por microondas se enfriaron y volvieron a ser tratadas durante 10 min en el horno microondas. El azúcar fue analizado mediante el método DNS. Los resultados mostraron que se obtuvo un máximo de 7,0 g/l de butanol después de 84 h usando un 1% de la torta de semillas de jatrofa tratada en microondas en un medio de AnS complementado con un 0,5% de carbonato cálcico y 0,5 ml de glicerol.

4. Tallos de banano and semillas de jatrofa pretratados con ácido sulfúrico 0,1N

- (a) El tallo de banano fue cortado en trozos pequeños. Aproximadamente, 100 g de estos trozos de tallo de banano fueron mantenidos en 500 ml de ácido sulfúrico 0,1N durante 24 h. A continuación, estos trozos fueron lavados con agua corriente de grifo y secados completamente. Las diferentes concentraciones de estos tallos de banano pretratados fueron añadidas a medios de AnS que contenían un 0,5% de carbonato cálcico. Los resultados mostraron que se obtenía una producción máxima de 5,0 g/l de butanol después de 84 h cuando se añadió un 1% de tallos de banano tratados con ácido a un medio de AnS que contenía un 0,5% de carbonato cálcico.
- (b) La torta de semillas de jatrofa fue molida. Aproximadamente 50 g de las semillas de jatrofa molidas fueron tratadas con 500 ml de ácido sulfúrico 0,1 N durante 24 horas. Después de 24 h, estos trozos fueron lavados con agua corriente de grifo para eliminar el ácido sulfúrico. La torta de semillas de jatrofa predigerida fue secada completamente. Esta torta de semillas de jatrofa pretratada fue añadida a medios de AnS (que contenían un 0,5% de carbonato cálcico) a diferentes concentraciones. Se obtuvo una producción de 4,0 g/l de butanol después de 84 h usando un 1% de torta de semillas de jatrofa pretratada con ácido.

Tabla 4. Producción de butanol usando biomasa

Biomasa	Pretratamiento	Butanol, g/L
Torta de semillas de jatrofa	Tratamiento fúngico con <i>Pluteus osteratus</i>	8,4
	NaOH 0,5 M	5,0
	Ácido sulfúrico 0,1 N	4,0
	Digestión por microondas	7,0
Tallos de banano	NaOH 0,5 M	8,1
	Ácido sulfúrico 0,1 N	5,0
	Digestión por microondas	6,9

Ejemplo 8: Tolerancia del *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 a los disolventes

Se estudió la tolerancia del *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 al butanol sometiendo las bacterias a diversas concentraciones de butanol en el medio de cultivo que oscilaban entre el 1,5% y el 3,5%. Se comprobó la tolerancia tanto en el medio no optimizado de AnS como en el medio optimizado de AnS. Las botellas fueron inoculadas con *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132. Después de la inoculación, el medio fue incubado a 37°C durante 144 h y la OD a 600 nm fue monitorizada a un intervalo regular de 12 h. Los resultados indican claramente que la forma natural del *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 puede tolerar hasta un 3,0% de butanol en condiciones no optimizadas (Fig. 12) y 3,5% de butanol en condiciones optimizadas (Fig. 13).

Ejemplo 9: Mecanismo de la tolerancia a los disolventes en el *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132

Se evaluó el mecanismo de tolerancia a los disolventes en el *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 buscando la sobreexpresión de la proteína de choque térmico GroEL. La cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132, tolerante al butanol, fue cultivada en un vial anaeróbico sellado de 125 ml que contenía 50 ml de un medio azucarado anaeróbico (AnS) con un 2,3% de butanol, mientras que la cepa no adaptada de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 fue cultivada en un medio de AnS carente de butanol. Las botellas fueron incubadas durante 24 h a 37°C en condiciones estáticas.

Se buscó en las células, mediante transferencia de Western, la sobreexpresión de GroEL. Después del periodo de incubación deseado, se retiró 1,0 ml del cultivo de cada vial con la ayuda de una jeringa esterilizada desechable y se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 20 min. El gránulo fue recogido y distribuido en 100 µl de tampón de Tris 0,1 M (pH 8,0). El gránulo fue sometido a ultrasonidos y centrifugado durante 1 min a 8500 rpm a 4°C. Se recogió el sobrenadante como extracto en bruto. Para la electroforesis de proteínas, se eluyeron extractos en bruto de la cepa tolerante al butanol y de la cepa no tolerante sobre gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE). En el extracto se normalizó la concentración de proteínas del extracto.

Análisis de transferencia de Western

Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas Immun-Blot de difluoruro de polivinilideno de 0,2 µm (Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas con un 5% de leche desnatada en suero fisiológico con tampón de Tris más Tween 20 (TBST) durante 12-16 h antes de la hibridación.

La membrana bloqueada fue incubada durante 1 h con anticuerpo anti GroEL producido en conejo (Sigma), a diluciones de 1:10.000. Después de la incubación, la membrana fue lavada tres veces con tampón de TBST durante 5 min cada vez. Como anticuerpo secundario se usaron inmunoglobulinas monoclonales anticonejo - fosfatasa alcalina, anticuerpo producido en ratón a una dilución de 1:10.000 (Sigma). La membrana fue incubada con el anticuerpo secundario durante 1 h. Todas las diluciones de anticuerpos fueron preparadas en tampón de TBST. La membrana fue lavada con tampón de TBST tres veces durante 5 min cada vez. La membrana se reveló con 5 ml de solución BCIP-NBT (Sigma). La cepa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 tolerante a los disolventes muestra la presencia de una banda prominente de GroEL (Fig. 14, línea 2), mientras que, en la cepa no adaptada, la banda es apenas visible (Fig. 14, línea 1).

Ejemplo 10: Purificación de butanol mediante destilación fraccionaria

Para la purificación de butanol a partir del caldo de fermentación, el caldo fue centrifugado para la separación de las células. El sobrenadante fue sometido a destilación fraccionaria. Se recogió la fracción de destilado obtenida a temperatura de vapor de 96°C y las fracciones fueron analizadas mediante CG en busca de su contenido de butanol en un cromatógrafo de gas Agilent equipado con una columna capilar DB Wax 624 de 30 m × 0,53 mm (J & W Scientific, EE. UU.) y un detector de ionización a la llama. Se usó N₂ como gas de arrastre. La relación de separación fue fijada en 10:1. La temperatura del detector fue de 300°C. Se inyectó un microlitro de la muestra (temperatura del inyector, 250°C) en el sistema para su análisis. La recuperación mediante destilación fraccionaria fue del 47%, con una pureza del 91% (Tabla 5).

Tabla 5. Recuperación de butanol

Muestra	Volumen	Cono de butanol (g/L)	Butanol total	% Recuperación
Caldo inicial	200 ml	15,0 g/L	3,0 g	
Fracción	2,4 ml	612 g/L	1,4 g	47

Ejemplo comparativo 11: Parámetros generales para la determinación basada en HPLC

(a) Evaluación de diferentes columnas, fases móviles y tiempos de retención

Se probaron tres columnas y fases móviles diferentes para estimar el butanol en la HPLC (monitor Shimadzu RID-10A, bomba LC-10AT, horno de columna LTO-10AS). Estas incluyen:

(i) Columna	-	Rezex ROA, 300 mm × 7,8 m (Phenomenex, EE. UU.)
Detector	-	Índice de refracción
Temperatura del horno	-	37°C
Fase móvil	-	Agua MilliQ
Caudal	-	0,6 ml/minuto
Tiempo de retención	-	42,0 min

(ii) Columna	-	Aminex HPX -87H (Biorad)
Detector	-	Índice de refracción
Temperatura del horno	-	37°C
Fase móvil	-	0,5 mM H ₂ SO ₄
Caudal	-	0,6 ml/minuto
Tiempo de retención	-	32,0 min

(iii) Columna	-	Hamilton PRP-X 300 (Hamilton)
Detector	-	Índice de refracción
Temperatura del horno	-	37°C
Fase móvil	-	Acetonitrilo: 0,5 mM H ₂ SO ₄ (1:9)
Caudal	-	1,5 ml/minuto
Tiempo de retención	-	7,3 min

En las dos primeras columnas —es decir, las columnas Rezex Organic y Aminex HPX—, el tiempo de retención para la estimación del butanol fue de 42 y 32 min, respectivamente. Sin embargo, en la columna Hamilton PRP300X, el butanol podía ser eluido en solo 7,3 min.

5 **(b) Evaluación del método en diferentes momentos de muestreo de la fermentación para seguir la velocidad de la reacción**

10 Se recogieron muestras en diferentes periodos de incubación hasta las 96 h y fueron analizadas para hallar su concentración de butanol usando una columna PRP 300X. La concentración de butanol aumenta gradualmente hasta que alcanza un máximo a las 84 h. Posteriormente, la concentración de butanol permanece casi constante.

Ejemplo comparativo 12: Condiciones estandarizadas de análisis

La columna usada es Hamilton PRP 300X.

La fase móvil es acetonitrilo:0,5 mM H₂SO₄ (1:9).

El dispositivo de detección implica el índice de refracción (IR) a un caudal de 1,5 ml/min a 37°C.

15 **Preparación de la muestra:**

Las muestras fueron sacadas de los viales sellados usando jeringas esterilizadas desechables. A continuación, estas muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de 0,45 µ antes de su análisis.

20 El procedimiento de muestreo del medio de cultivo de la fermentación implica la recogida del caldo de las botellas anaeróbicas selladas, usando jeringas esterilizadas desechables, después del periodo de incubación deseado. A continuación, el caldo es centrifugado a 8000×g en una centrifugadora Eppendorf durante 10 min. Acto seguido, el sobrenadante es sacado y filtrado a través de un filtro de 0,45 µ y se inyectan 20 µl des esta muestra filtrada del sobrenadante en la columna PRP 300X (Hamilton).

25 **El análisis:** La muestra (20 µl) fue inyectada en la columna usando una jeringa Hamilton. Se registró que el tiempo de retención del butanol fue 7,3 min. La concentración del butanol fue calculada eluyendo el butanol estándar (Sigma) en el intervalo de 0,5-50 g/L, como resulta evidente por las Figuras 15 y 16. Los cromatogramas mostrados en estas figuras indican claramente que el n-butanol estándar se eluye en un tiempo de retención of 7,3 min (Fig. 15). La muestra también presentó un pico a los 7,3 min que indicaba la presencia de n-butanol (Fig. 16).

Referencias

- Aganval, L., Isar, J., Saxena, R.K. (2005).** Rapid screening procedures for identification of succinic acid producers. *JBiochem Biophys Methods*. 63 (1): 24-32.
- 5 **Biebl, H. (1999).** Comparative investigations of growth and solvent formation in '*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*' DSM 2152 and *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 22: 115-120.
- Ehrlich, G.G., Georlitz, D.F., Bourell, J.H., Eisen, G.V. y Godsy, E.M. (1981).** Liquid Chromatographic Procedures for fermentation products analysis in identification of anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (5): 878-885.
- 10 **Evan, P. J., y Wang, H.Y. (1988).** Enhancement of butanol formation by *Clostridium acetobutylicum* in the presence of decanol-olely alcohol mixed extractants. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1662-1667.
- Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P. (2007).** Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Curr. Opin Biotechnol.* 18: 220- 227.
- 15 **Fouad M, Abou-Zeid AA, Yassein M. (1976).** The fermentative production of acetone-butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Acta Biol Acad Sci Hung.* 27 (2-3): 107-17.
- Herrera, S. (2004).** Industrial biotechnology—a chance at redemption. *Nature Biotechnol.* 22 (6): 671-678.
- Isar, J., Agarwal, L., Saran, S., Gupta, P. y Saxena, R. K. (2006).** Effect of process parameters on succinic acid production in *Escherichia coli* W3110 and enzymes involved in the reductive tricarboxylic acid cycle. *Can. J. Microbiol.* 52 (9): 893-902.
- 20 **Jesse, T. W., Ezeji, T. C., Qureshi, N. y Blaschek, H. P. (2002).** Production of butanol from starch based waste packing peanuts and agricultural waste. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 117-123.
- Jones, D.T. y Woods, D.R. (1986).** Acetone butanol fermentation Revisited. *Microbiol. Rev.* 50 (4): 484-524.
- Lee, P.C., Lee, W.G., Lee, S.Y., Chang, H.N. (1999).** Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. *Process Biochem.* 35:49-55.
- 25 **Lee, P.C., Lee, W.G., Kwon, S., Lee, S.Y., y Chang, H.N. (2000).** Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 23-27.
- Lin, Y.L. y Blaschek, H.P. (1983).** Butanol production by a butanol-tolerant train of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth. *Appl. Environ Microbiol.* 45: 966- 973.
- 30 **Long, S., Long, D. T., y Woods, D. R. (1984).** Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 256-261.
- McCutchan, W.N., y Hickey, R.J. (1954).** The butanol-acetone fermentation. *Ind. Ferment.* 1: 347-388.
- Moon, S.H. y Parulekar, S.J. (1991).** A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 467-483.
- 35 **Moreira, A. R., Ulmer, D.C., Linden, J.C. (1981).** Butanol toxicity in the butylic fermentation. *Biotechnol Bioeng. Symp.* 11: 567-579.
- Mutschlechner O, Swoboda H, Gapes JR (2000).** Continuous two-stage ABE-fermentation using *Clostridium beijerinckii* NRLL B592 operating with a growth rate in the first stage vessel close to its maximal value. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 (1):101-5.
- 40 **Nghiem, N.P., Davidson, B.H., Suttle, B.E., Richardson, G.R. (1997).** Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl Biochem Biotechnol* 63-65: 565-576.
- Parekh, M., Formanek y Blaschek, H.P. (1998).** Development of a cost-effective glucose-corn steep medium for production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. *J Ind. Microbiol Biotechnol.* 21: 187-191.
- 45 **Qureshi, N. y Blaschek, H.P. (1999).** Production of acetone butanol ethanol (ABE) by a hyper-producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and recovery by pervaporation. *Biotechnol. Prog.* 15: 594-602.
- Qureshi, N., Lolas, A., Blaschek, H.P. (2001).** Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA 101. *J Ind. Microbiol Biotechnol.* 26: 290-295.

Robson, P.M., y Jones, D.T. (1982). Production of acetone-butanol by industrial fermentation, en O. Chaude y Durand, G (ed.), *Industrielle et Biotechnologie*, pp. 169-214.

Samuelov NS, Lamed R, Lowe S, Zeikus JG. (1991). Influence of CO₂ HCO₃⁺ levels and pH on growth, succinate production and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3013-9.

- 5 **Strobel, H.J., Russel, J.B. (1991).** Role of sodium in the growth of a ruminal selenomonad. *Appl Environ Microbiol.* 57: 1663-1669.

Zeikus, J.G. (1980). Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Ann Rev Microbiol* 34: 423-464.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de butanol, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 establecer y mantener un cultivo en un fermentador, comprendiendo dicho cultivo el microorganismo solventogénico *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 y un medio nutriente que comprende hidratos de carbono asimilables, 5% de extracto de vacuno como fuente de nitrógeno y 0,5% de Na₂CO₃ y/o iones de calcio;
 - mantener la concentración de hidratos de carbono en el fermentador a un nivel suficiente para mantener el proceso de producción;
 - 10 mantener la concentración de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 a un nivel suficiente para mantener el proceso de producción;
 - en el que el proceso se lleva a cabo sin extraer butanol del fermentador;
 - en el que las condiciones de fermentación están optimizadas a una temperatura entre 33 y 39°C y a un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, para que el proceso dé como resultado una producción de butanol de 20 g/L o dé como resultado una concentración de butanol del 2,5% en el medio de fermentación.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el hidrato de carbono asimilable es glucosa.
3. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que la concentración de glucosa en el medio nutriente es el 2%.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el hidrato de carbono asimilable es extracto de malta.
5. El procedimiento de la reivindicación 4 en el que la concentración de extracto de malta en el medio nutriente está entre el 1% y el 10%.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el hidrato de carbono asimilable es glucosa y extracto de malta.
7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que la concentración de glucosa en el medio nutriente es el 2% y la concentración de extracto de malta en el medio nutriente es del 5%.
8. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la fermentación se lleva a cabo a una temperatura de 37°C.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que los microorganismos se encuentran en una densidad de inóculo del 1-2%.

Fig. 1. Efecto de diferentes pH en la producción de butanol por el *Clostridium acetobutylicum* después de 84 h de incubación

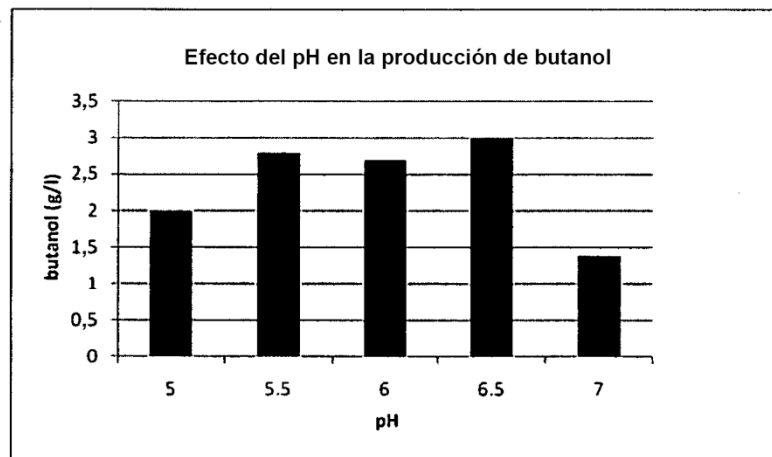


Fig. 2. Efecto de diferentes temperaturas (°C) en la producción de butanol por el *Clostridium acetobutylicum* después de 84 h de incubación

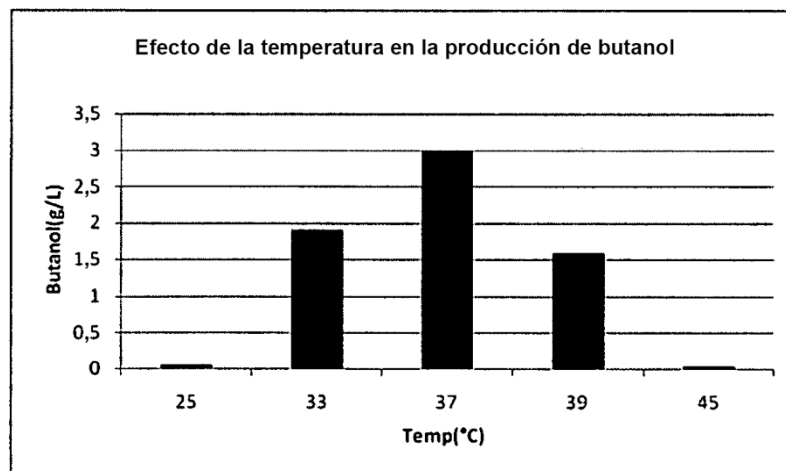


Fig. 3. Efecto de diferentes fuentes de carbono (2%) en la producción de butanol

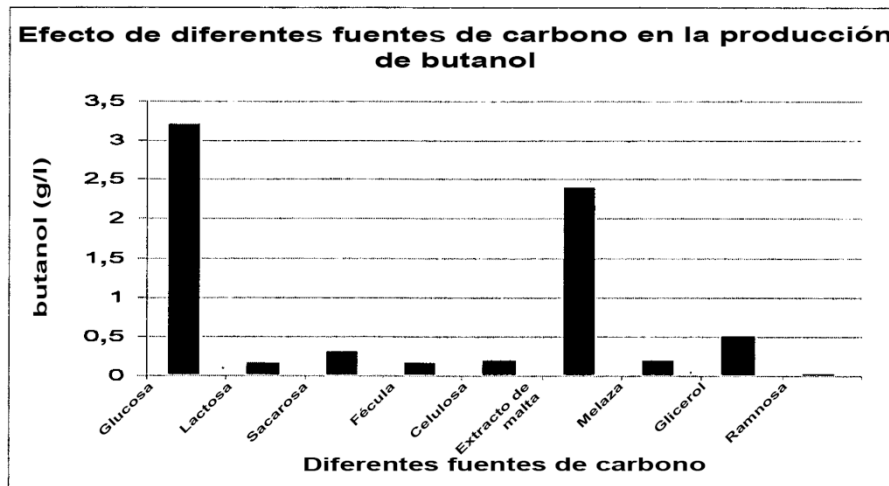


Fig. 4. Efecto de diferentes concentraciones de glucosa en la producción de butanol

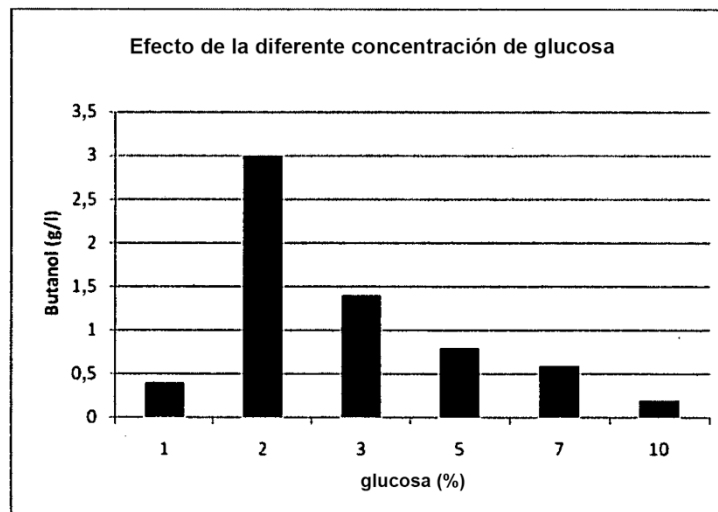


Fig. 5: Efecto de diferentes concentraciones de extracto de malta en la producción de butanol

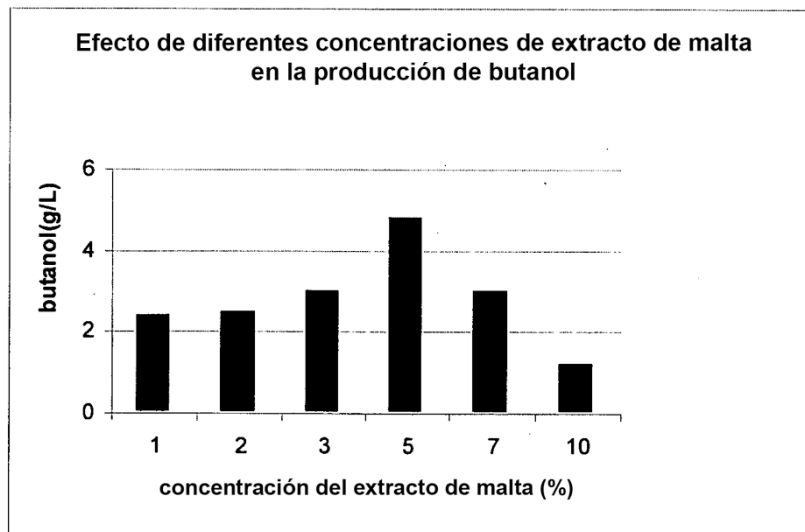


Fig. 6: Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno (1,0%) en la producción de butanol

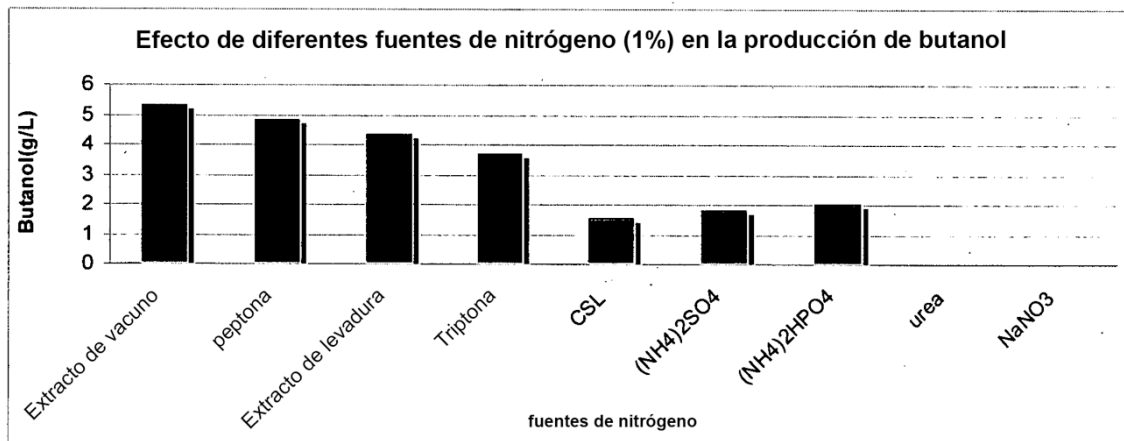


Fig. 7. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de vacuno en la producción de butanol

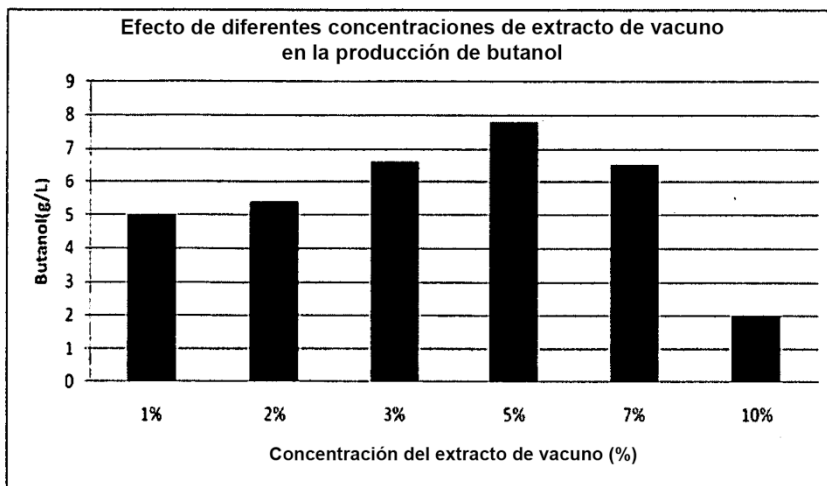


Fig. 8. Efecto de diferentes iones metálicos (0,5%) en la producción de butanol

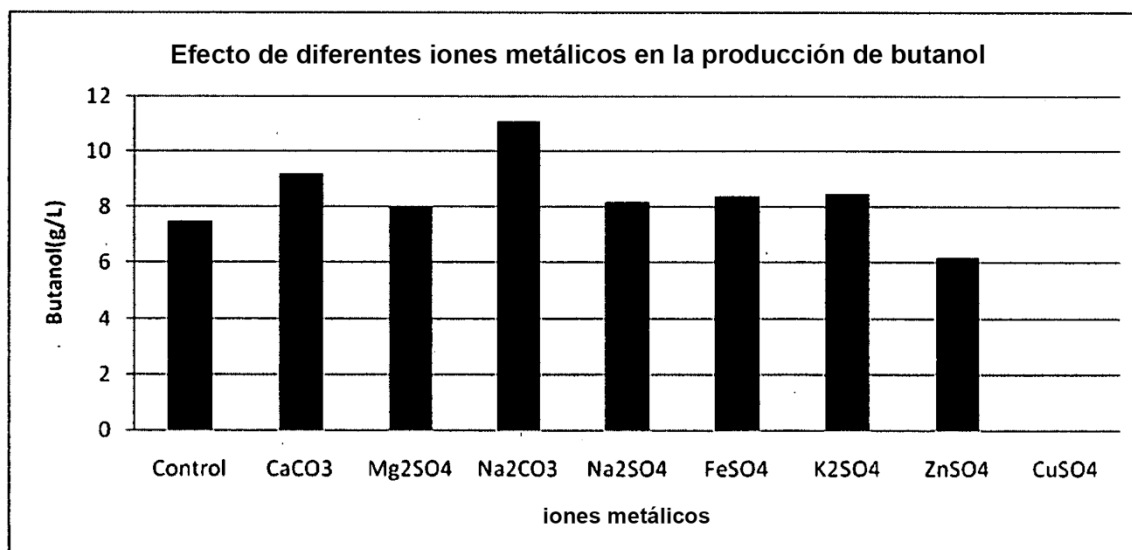


Fig. 9. Efecto de diferentes concentraciones de carbonato sódico en la producción de butanol

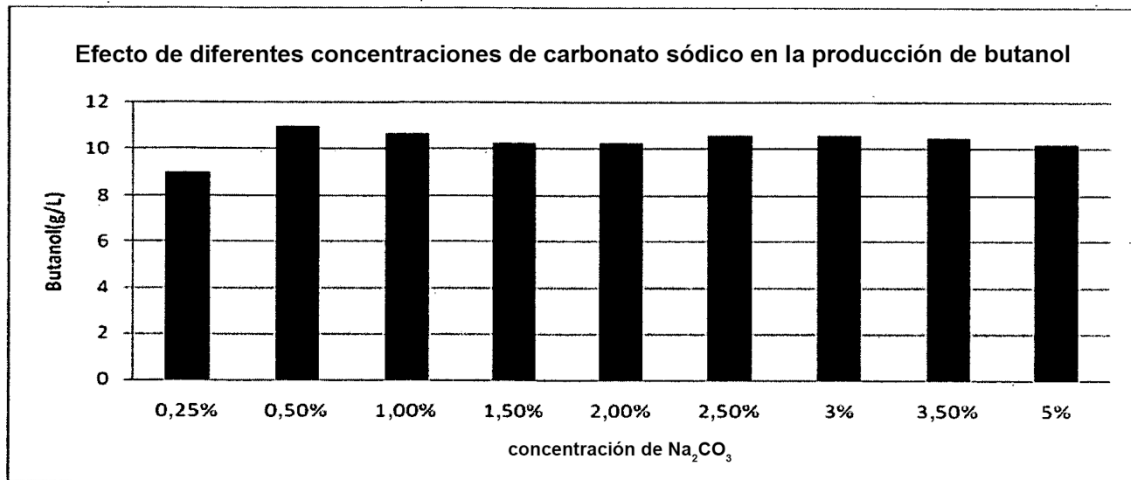


Fig. 10. Efecto de la diferente densidad del inóculo en la producción de butanol

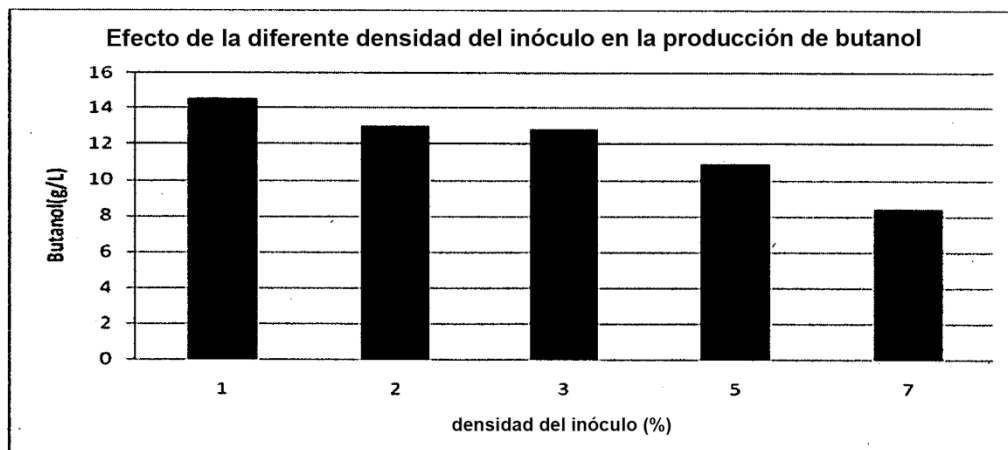


Fig. 11: Perfil de fermentación de butanol en una escala de 5L

Producción de butanol en fermentador de 10L

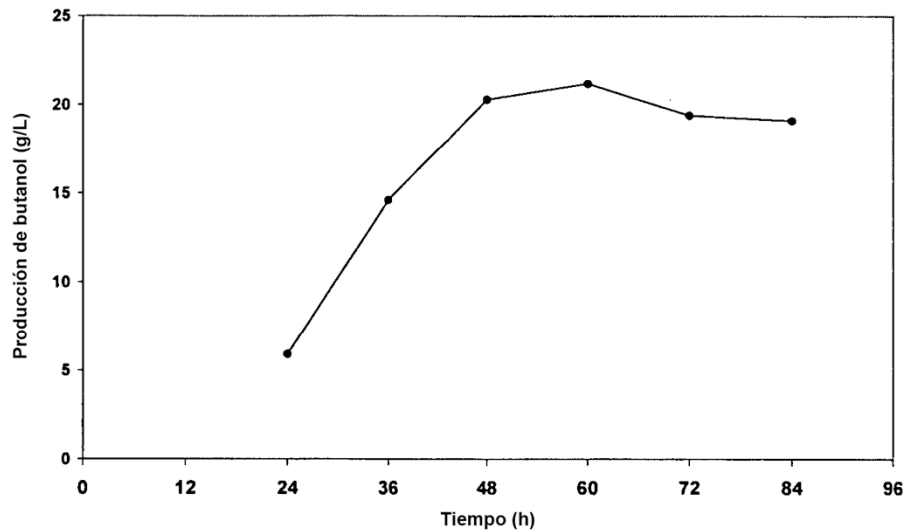


Fig. 12: Efecto del butanol en el desarrollo de *C. acetobutylicum* en un medio no optimizado de AnS

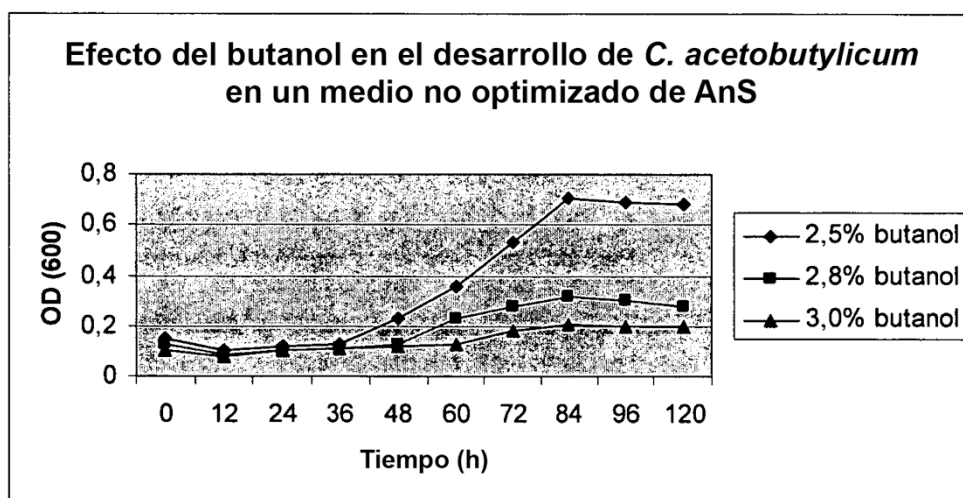


Fig. 13: Efecto del butanol en el desarrollo de *C. acetobutylicum* en un medio optimizado de AnS

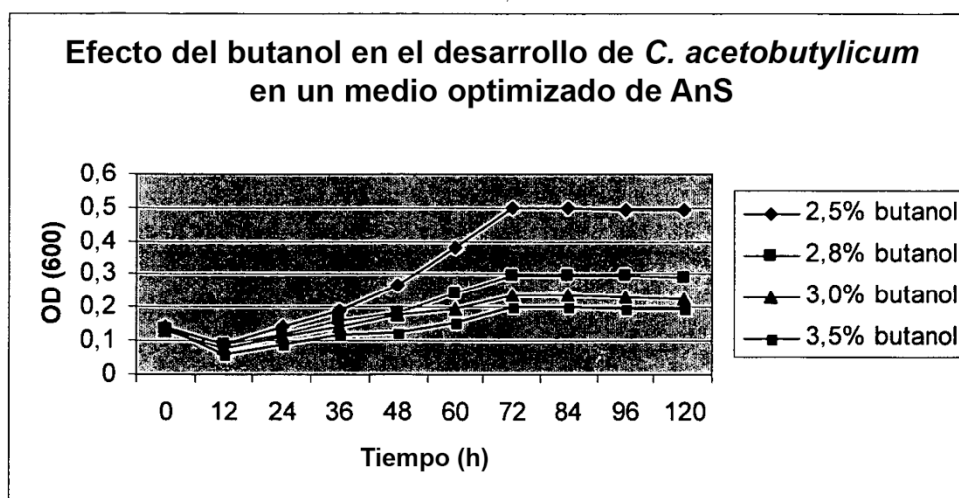
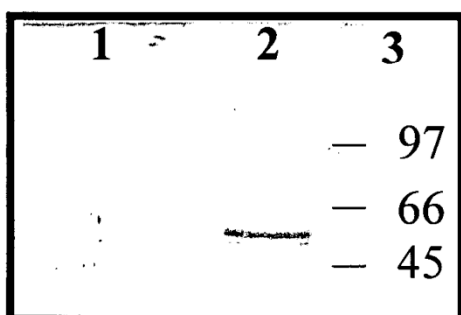


Fig. 14: Análisis de transferencia de Western para la detección de GroEL



Línea 1: Cepa no adaptada de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132; Línea 2: Cepa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 tolerante a disolventes; Línea 3: Marcador arcoíris

Figura 15. Cromatograma HPLC de butanol estándar (2,0%)

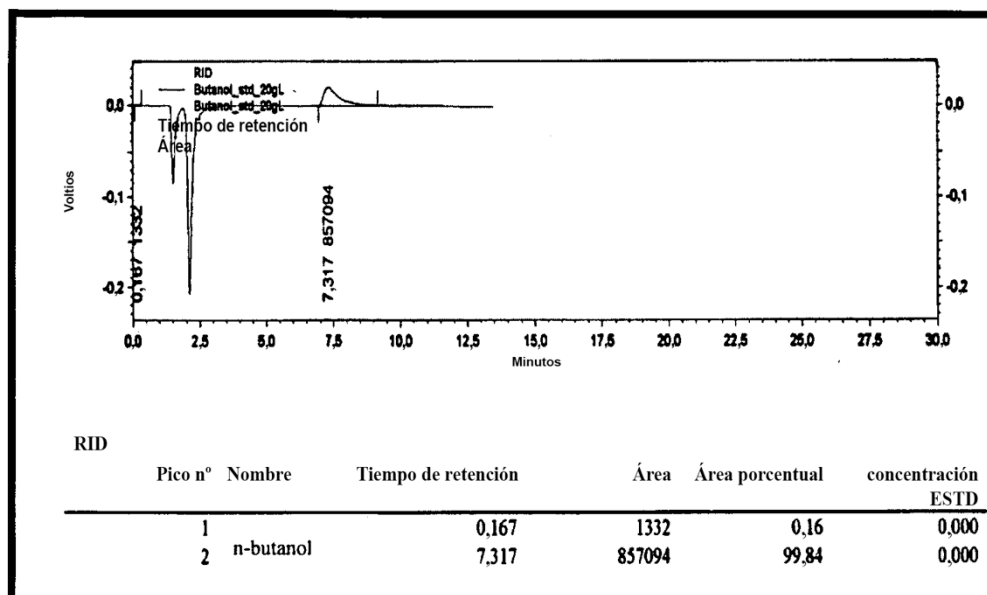


Figura 16. Cromatograma HPLC del butanol presente en la muestra (caldo de fermentación)

