

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 390**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

C12R 1/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2012 PCT/IN2012/000536**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2012 E 12813531 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2739722**

54 Título: **Fermentación de butanol con biomasa pretreada con ácido**

30 Prioridad:

01.08.2011 IN 2181MU2011

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

22.03.2018

73 Titular/es:

**RELIANCE INDUSTRIES LIMITED (100.0%)
3rd Floor, Maker Chamber-IV 222 Nariman Point
Mumbai 400 021 Maharashtra, IN**

72 Inventor/es:

**VIDHYA, RANGASWAMY;
JASMINE, ISAR y
HARSHVARDHAN, JOSHI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 660 390 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

Fermentación de butanol con biomasa pretreada con ácido

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un cultivo de una cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum* y un procedimiento para la producción de un butanol de alto rendimiento usando una cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum* con tolerancia mejorada de butanol, en el que dicha cepa mutante se denomina MTCC 5587.

Antecedentes de la invención

10 Durante siglos, los combustibles derivados del petróleo han servido a la humanidad. Sin embargo, el reciente despertar sobre la realización del desalentador escenario de la disponibilidad de combustibles fósiles, los peligros del agotamiento de los recursos petroleros y la estricta legislación ambiental que rige en todo el mundo, ha llevado a buscar fuentes de energía alternativas (Herrera et al., 2004; Li et al 2010). Por lo tanto, se están investigando varios combustibles alternativos, que pueden reemplazar completamente los derivados del petróleo (gasolina y diésel) o que pueden mezclarse con combustibles de petróleo en ciertas proporciones, sin requerir motores especialmente adoptados en los vehículos.

15 Entre los otros combustibles alternativos se encontró que el butanol era la mejor opción, ya que es un reemplazo superior para la gasolina, y satisface las necesidades de la sociedad. El biobutanol es inequívocamente un mejor reemplazo de combustible para la gasolina y es preferido en otras industrias por razones de seguridad. Al ser renovable, el butanol ayuda a reducir el ahora conocido "carbono" y otras emisiones nocivas en forma de hidrocarburos; material particulado; benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEX, por sus siglas en inglés); y otros elementos indeseables (Sharma et al., 2010).

20 El butanol o alcohol butílico (a veces también denominado *biobutanol cuando se produce biológicamente*), es un alcohol primario con una estructura de 4 carbonos y la fórmula molecular de $C_4H_{10}O$. Se usa principalmente como solvente, como intermediario en síntesis química y como combustible. Hoy en día, existe un gran interés en la producción de combustibles como el butanol y el etanol utilizando microorganismos por fermentación, centrándose en los aspectos ambientales y la naturaleza renovable de este modo de producción. El butanol es un combustible superior y tiene más poder calorífico que el etanol (Qureshi y Blascher, 2000). El butanol tiene un mayor contenido de energía (110,000 Btu por galón de butanol vs. 84,000 Btu por galón de etanol). Es seis veces menos "evaporativo" que el etanol y 13.5 veces menos que la gasolina, puede despacharse a través de tuberías de combustible existentes, mientras que el etanol debe ser transportado por ferrocarril, embarcación o camión (Jones y Woods, 1986).

25 El butanol es un disolvente industrial importante y potencialmente un mejor extensor de combustible que el etanol. Los precios actuales de butanol como químico están en \$3.75 por galón, con un mercado internacional de 370 millones de galones por año. Se espera que la demanda del mercado aumente dramáticamente si el butanol ecológico puede producirse económicamente a partir de biomasa de bajo costo. Además de su uso como combustible, el butanol puede usarse como solvente para una amplia variedad de procesos químicos y textiles, en síntesis orgánica y como intermedio químico. También se usa como diluyente de pintura y solvente en otras aplicaciones de revestimiento donde se usa como solvente latente de evaporación relativamente lenta en lacas y esmaltes curados ambientales. Encuentra otros usos, como un componente de fluidos hidráulicos y de frenos (Mutschlechner *et al*, 2000). Asimismo, sirve como base para perfumes, pero por sí solo tiene un aroma altamente alcohólico.

30 Desde la década de 1950, la mayoría del butanol en los Estados Unidos se produce comercialmente a partir de combustibles fósiles. El proceso más común comienza con el propeno, que discurre a través de una reacción de hidroformilación para formar butanal, que luego se reduce con hidrógeno a butanol. El butanol se produce por fermentación, a partir de maíz, hierba, hojas, desechos agrícolas y otras biomásas.

35 La producción de butanol industrial y acetona a través de la fermentación, utilizando *Clostridium acetobutylicum*, comenzó en 1916. Chime Wizemann, un estudiante de Louis Pasteur, aisló el microbio que producía acetona. Hasta la década de 1920, la acetona era el producto buscado, pero por cada libra de acetona fermentada, se formaban dos libras de butanol. Una creciente industria de pintura de automóviles cambió el mercado, y en 1927 el butanol fue el artículo principal y la acetona se convirtió en el subproducto.

40 La producción de butanol por fermentación disminuyó desde la década de 1940 hasta la de 1950, principalmente porque el precio de los productos petroquímicos cayó por debajo del de los sustratos de almidón y azúcar, como el maíz y la melaza. La sobrecarga del sistema de fermentación por lotes intensivos en mano de obra, combinada con los bajos rendimientos, contribuyó a la situación. La producción de acetona y butanol derivada de la fermentación cesó a fines de los años cincuenta.

55 La fermentación de acetona butanol etanol (ABE, por sus siglas en inglés) por *Clostridium acetobutylicum* es una de las fermentaciones industriales más antiguas conocidas. Fue clasificada en segundo lugar después de la

5 fermentación de etanol por la levadura en su escala de producción, y es uno de los procesos biotecnológicos más grandes jamás conocidos. La fermentación real, sin embargo, ha sido bastante complicada y difícil de controlar. La fermentación ABE ha disminuido continuamente desde la década de 1950, y casi todo el butanol ahora se produce a través de rutas petroquímicas. En una fermentación ABE típica, los ácidos butírico, propiónico, láctico y acético son producidos primero por *C. acetobutylicum*, el pH del cultivo desciende y sufre un cambio metabólico de "mariposa", y se forman el butanol, acetona, isopropanol y etanol. En fermentaciones ABE convencionales, el rendimiento de butanol a partir de glucosa es bajo, normalmente alrededor del 15 por ciento y rara vez más de 25 por ciento.

10 El problema clave asociado con la producción de butanol es su toxicidad y la inhibición del microorganismo en fermentación, que da como resultado un bajo título de butanol en el caldo de fermentación. (Ezeji *et al.*, 2007). La producción de butanol estuvo limitada por la severa inhibición del producto. El butanol a una concentración del 1 % puede inhibir significativamente el crecimiento celular y el proceso de fermentación. Por consiguiente, la concentración de butanol en las fermentaciones ABE convencionales suele ser inferior al 1,3 por ciento. El butanol es altamente tóxico para los sistemas biológicos a concentraciones bastante bajas del 2 % (Jones y Wood, 1986). Esta toxicidad puede deberse a que el butanol se localiza en la membrana plasmática e interrumpe una serie de procesos fisiológicos que incluyen la permeabilidad de la membrana, el transporte de solutos y el mantenimiento de la fuerza motriz del protón, la conformación y la actividad de las proteínas intrínsecas de la membrana. Se están realizando esfuerzos para mejorar el nivel de tolerancia de butanol en diferentes especies de Clostridia con diversos grados de éxito (Evan y Wang, 1988). El reciente interés en la producción de butanol ha llevado a un nuevo análisis de la fermentación ABE, que incluye estrategias para reducir o eliminar su toxicidad en el cultivo.

20 En los últimos 20 años, se han realizado numerosos intentos de la ingeniería para mejorar la producción de butanol en la fermentación ABE, incluyendo el reciclado y la inmovilización celular para aumentar la densidad celular y la productividad del reactor y usar la fermentación extractiva para minimizar la inhibición del producto. A pesar de múltiples esfuerzos, hasta la fecha, los mejores resultados obtenidos para las fermentaciones ABE aún son menores. Durante mucho tiempo, perfeccionar el proceso de fermentación ABE ha sido un objetivo de la industria.

25 Actualmente, el butanol se produce en todo el mundo en más de 1,4 billones de galones al año por vía química. Se espera que la demanda del mercado aumente de forma drástica si se puede producir butanol económicamente a partir de biomasa de bajo costo. Por lo tanto, el desarrollo de procesos para producir biobutanol utilizando fuentes de energía renovables tales como cultivos lignocelulósicos está ganando ímpetu (Qureshi *et al.*, 2010).

30 La patente 4.521.516 en los Estados Unidos proporciona una nueva cepa asporogénica de *C. acetobutylicum* producida por crecimiento de una cepa formadora de esporas en un reactor de cultivo continuo. El cultivo se realiza a una velocidad de dilución que evita la acumulación de butanol y acetona en el medio. El cultivo a esta velocidad continúa hasta que se obtiene la cepa asporogénica.

35 El documento 5.192.673 en los Estados Unidos proporciona un mutante aspergénico biológicamente puro de *C. acetobutylicum* que se produce al cultivar *C. acetobutylicum* ATCC 4259 esporogénico y al tratar la cepa madre con metanosulfonato de etano. El mutante que se ha designado *C. acetobutylicum* ATCC 55025 es útil en un proceso de fermentación de ABE mejorado, y produce altas concentraciones de butanol y disolventes totales. Sin embargo, la fermentación del presente documento incluye una fermentación continua en tres etapas, por lo que el proceso es costoso y requiere mucho tiempo.

40 El documento 6358717 en los Estados Unidos proporciona un método para producir altos niveles de butanol utilizando un proceso de fermentación que emplea una cepa mutante de *Clostridium beijerinckii*. El mutante es una cepa hiper amilolítica que puede producir altos títulos de butanol en un medio rico en glucosa/almidón. Sin embargo, no hay ninguna afirmación sobre la tolerancia del solvente de la cepa.

45 La patente 4.757.010 en los Estados Unidos y la solicitud de patente europea EP 00111683 proporcionan una cepa mejorada de *Clostridium* para aumentar la tolerancia al butanol. JP03058782 brinda la existencia de *Clostridium pasteurianum* CA101 (FERM P-10817) como un mutante del género *Clostridium* bacterium, que tiene resistencia análoga al intermediario fermentado de butanol y a la producción del este. La patente 4.539.293 en Estados Unidos demuestra el uso de co-cultivo de microorganismos del género *Clostridium*, favorece la producción de ácido butírico y el otro apoya la formación de butanol. La solicitud de patente japonesa J P 63157989 proporciona la producción de butanol cultivando una cepa diferente de *Clostridium pasteurianum* var. 1-53 (FERM P-9074) en un medio líquido que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y otras sales inorgánicas a 28-33 grados C en condiciones de pH ligeramente ácido en estado anaeróbico durante 2-4 días.

50 La patente N.º 4.777.135 en Estados Unidos describe un método para producir butanol por fermentación que comprende cultivar, en condiciones anaeróbicas, un microorganismo que produce butanol en un medio de cultivo que contiene fluorocarbonos. Este proceso no es factible a escala comercial, ya que los fluorocarbonos no son ambientalmente seguros

55 **[0018]**La patente 4.605.620 en los Estados Unidos proporciona un proceso para butanol utilizando un medio que contiene carbohidrato y fosfato, en el que los experimentos se realizaron con un contenido total de fosfato de 1,0-0,4 mmoles. Este proceso plantea una restricción en la que se requiere el medio limitante de fosfato.

La patente 4.560.658 en los Estados Unidos proporciona un proceso para la producción de butanol por fermentación de compuestos que contienen carbono con *C. acetobutylicum*, en el que la fermentación se realiza en un medio acuoso que tiene una concentración suficiente de monóxido de carbono disuelto. Sin embargo, el uso de monóxido de carbono hace que el proceso sea nocivo para el medio ambiente.

5 La patente 4.520.104 en los Estados Unidos proporciona un procedimiento para la producción continua de butanol por fermentación de carbohidratos con *C. acetobutylicum*. Este proceso combina la producción de inóculo continuo a una tasa de dilución alta y el ciclismo del caldo de fermentación a través de un material que adsorbe butanol, por lo que se mantiene una población celular vigorosa en el reactor de fermentación durante periodos de tiempo prolongados. El proceso está diseñado para eliminar el butanol producido en el caldo para evitar su toxicidad en las
10 células

La patente japonesa JP 62278989 proporciona un proceso de fermentación para la producción de acetona y butanol, que mantiene una cepa productora de butanol en estado de reposo; añade una fuente de carbono a la célula para efectuar la producción de acetona y butanol en poco tiempo; ayuda a la recuperación y concentración de la cepa productora de butanol, sometida al choque térmico; y la añade a un tanque de fermentación. Se requiere un choque
15 térmico en el proceso para activar las esporas de *Clostridium*, esto es bastante rutinario.

La solicitud de patente japonesa proporciona un germen celulolítico anaeróbico, p. ej. *Clostridium cellobioparum* ATCC 15832 o *Ruminococcus albus* ATCC2721 1, y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, que se inocula en un medio de cultivo que tiene un material con celulosa, p. ej. madera, papel usado o pulpa, como principal fuente de carbono, y es cultivado a 25-45°C y pH 4-9 en condiciones anaeróbicas durante aproximadamente 2-20 días, para recoger el compuesto deseado, que contiene oxígeno, y consiste esencialmente en butanol del cultivo restante. Este
20 proceso lleva mucho tiempo y tarda unos 20 días en completarse, por lo que no es factible a gran escala.

La patente japonesa 63269988 describe la fermentación de butanol en la que la levadura se somete a autodigestión en un tanque de fermentación y prolifera antes de la inoculación de la cepa productora de butanol. El espacio en el tanque de fermentación se vuelve anaeróbico y la temperatura aumenta por la proliferación de levadura para realizar
25 la fermentación de butanol. Una autodigestión ineficiente causaría la contaminación del caldo por la levadura.

El documento US20050233031 proporciona un proceso para producir butanol, que incluye tratar material derivado de plantas para proporcionar un licor acuoso que contiene azúcares en un proceso de fermentación para producir un producto de fermentación. El proceso implica varios pasos y, por lo tanto, es laborioso y tedioso.

30 La patente japonesa JP 200535328801 proporciona un método para producir butanol en el que se prepara una solución de cultivo usando una formulación del residuo alimenticio con las borras japonesas de alcohol destiladas y, finalmente, se lleva a cabo la fermentación con agua y butanol en la solución de cultivo. El uso de alcohol destilado japonés se limita a los experimentos de producción realizados en dicho país.

La patente francesa FR2550222 proporciona un proceso de dos etapas, en el que la primera etapa es de siembra con *C. aceto-* foufy/Zcumanda, y la segunda es de sembrado con levadura que produce etanol; esta última fase comienza cuando el pH del medio de fermentación de la primera etapa ha alcanzado un valor mínimo. La información se aplica en particular a la producción de butanol, acetona y etanol a partir de remolacha azucarera y jugos de alcachofa de Jerusalén.
35

La solicitud de patente india 2544/MUM/2007 proporciona un proceso para la producción de altos rendimientos de butanol por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132. El proceso puede completarse en un lapso más corto, usando un procedimiento por lotes a través de la manipulación de diversos parámetros de proceso. El proceso también puede usarse para la producción de butanol a base de biomasa. Requiere medios comerciales, mientras que en la presente descripción se utiliza material de alimentación pretratado con ácido junto con la cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum*, que da como resultado rendimientos más altos de butanol con una mayor tolerancia al mismo.
40

45 El documento WO2009/087680 se refiere a un proceso para la producción y cuantificación de un alto rendimiento de biobutanol. Isar y Rangaswamy (Biomass and Bioenergy 37 (2012): 9-15) se refiere a la producción mejorada de n-butanol por *Clostridium beijerinckii*, que es tolerante a los disolventes.

Las materias primas comúnmente empleadas, según se hace referencia en la bibliografía para la síntesis de biobutanol, son maíz (*Zea mays*), tallos de plátano (*Musa sapientum*), jatropha (*Jatropha curcas*) y karanja (*Pongamia pinnata*) (Liang et al., 2010, Pfromm. et al., 2010). Sin embargo, el uso de cultivos alimenticios como el maíz, la caña de azúcar, etc. conducirá a la situación del combustible vs. alimentos. Para evitar esto, es imprescindible explorar las posibles materias primas no comestibles y su idoneidad para la síntesis de biobutanol.
50

Entre las muchas materias primas disponibles para la producción de biobutanol, la jatropha y karanja han resultado ser las más adecuadas debido a sus cualidades favorables, como la naturaleza resistente, el corto tiempo de gestación de aproximadamente 3 años, la vida productiva de 50 a 100 años, la falta de interés de los animales en ellas, la adaptabilidad a diversas condiciones agroclimáticas y tipo de suelo, resistencia a la sequía y el hecho que no compiten con los cultivos alimentarios por las fuentes de tierra y agua.
55

La presente descripción proporciona el uso de biomasa lignocelulósica, como la pasta de semillas de jatropha y la pasta de semillas de pongamia, que se trata previamente con ácido para desorganizar la estructura celulósica con el fin de extraer el azúcar reducido al máximo. El azúcar hidrolizado se utilizó junto con los componentes medios de AnS para la producción de biobutanol.

- 5 La presente descripción también proporciona el uso de la biomasa rica en celulosa, es decir, tallos de plátano, que es ácido pretratado con respecto a esa liberación de azúcar que después de la hidrólisis produce biobutanol.

Aunque hay informes de que se han explotado microbios para la producción de butanol por fermentación, surge la necesidad de un proceso biosintético económicamente viable para la producción de butanol que aún está por desarrollarse (Jesse *et al*, 2002).

- 10 El inconveniente asociado con la producción de butanol es la toxicidad/inhibición de butanol del microorganismo en fermentación, dando como resultado un bajo título de butanol en el caldo de fermentación. El análisis económico ha sugerido que si los títulos de butanol pudieran elevarse de 12 g/L a 19 g/L, el costo de separación podría reducirse a la mitad (Papoutsakis, 2008). Normalmente, el título final de butanol en fermentación no supera 13 g/L debido a la inhibición de la retroalimentación (Jones y Wood, 1986). Más allá de este nivel, el butanol es tóxico para las células bacterianas y altera la fluidez y la función de la membrana (Volherbst-Schneck *et al.*, 1984).

- 15 Para combatir el efecto de la toxicidad del butanol, las cepas tolerantes expresan ciertas proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) como GroEL (Thomas *et al.*, 2003, 2004) y altera su composición lipídica al tener más ácidos grasos saturados. Se cree que esta respuesta, conocida como "adaptación homeoviscosa", compensa los cambios físicos causados por el medio ambiente y permite a la célula mantener su membrana con una viscosidad adecuada y un medio iónico superficial para una función celular óptima (Baeretal., 1987).

- 20 De acuerdo con la bibliografía existente (Nishino y Yamaguchi, 2004), la rodamina 6G es un sustrato de glicoproteínas P, que actúa como mediadora en el flujo de salida dependiente de la energía de ciertos compuestos tóxicos de las células bacterianas. La existencia de bombas de descarga de disolvente en las células puede, por lo tanto, confirmarse mediante la acumulación de rodamina 6G en células bacterianas (Lazaroaie, 2009). Los autores de la presente invención han usado la bibliografía anterior de referencia para analizar la cepa mutante tolerante a los disolventes y la cepa de tipo salvaje de *C. acetobutylicum* utilizada para la producción de butanol.

- 25 Se han practicado técnicas tales como el arrastre con gas para superar el efecto inhibitor del butanol producido durante la etapa de fermentación (Ezeji *et al.*, 2007). Sin embargo, el proceso está plagado de resultados inconsistentes y un alto gasto de energía. En la presente descripción, el efecto inhibitor del butanol se solucionó mejorando la tolerancia al butanol del microbio usando mutagénesis química.

- 30 Para combatir los inconvenientes de las invenciones anteriores citadas en la técnica anterior, surge la necesidad de un procedimiento que dé como resultado una producción mejorada de butanol. Frente a esa realidad, la presente divulgación se ha centrado en desarrollar una condición de cultivo ideal para la cepa mutante de *Clostridium*, que dará como resultado una mayor tolerancia al butanol y, posteriormente, el aumento en los rendimientos de butanol.

35 **Objeto de la invención**

Es objeto de la presente descripción proporcionar un procedimiento eficiente para la producción de alto rendimiento de butanol a partir de biomasa pretratada usando un mutante tolerante a los disolventes de *Clostridium acetobutylicum*.

- 40 Es objeto de la presente descripción proporcionar condiciones de fermentación óptimas para la producción mejorada de butanol, usando un mutante de *Clostridium acetobutylicum*.

Es objeto de la presente descripción emplear mutagénesis química para la improvisación de la cepa, para una mejor tolerancia y producción de butanol.

Es objeto de la presente descripción proporcionar un proceso con condiciones de fermentación óptimas, que dará como resultado una mayor tolerancia a butanol del microorganismo.

- 45 Es objeto de la presente descripción proporcionar una condición de cultivo para altos rendimientos de fermentación de butanol.

Es objeto de la presente descripción proporcionar un procedimiento para aumentar los rendimientos de butanol en condiciones de fermentación de un solo lote.

- 50 Es objeto de la presente descripción proporcionar un proceso para biobutanol usando diversas biomazas pretratadas con ácido.

Es objeto de la presente descripción proporcionar un proceso rentable y escalable industrialmente para butanol.

Resumen de la invención

La invención proporciona un cultivo de una cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum*, en el que ésta se denomina MTCC 5587, que tiene una tolerancia incrementada al butanol de 1,5 % (v/v) a 3,5 % (v/v) en comparación con una cepa de tipo salvaje de *C. acetobutylicum*, designada ATCC 4259.

5 La invención también proporciona un proceso de producción de un alto rendimiento de butanol a partir de biomasa pretratada utilizando una cepa mutante de *C. acetobutylicum*, mejorada en la tolerancia al butanol, en el que dicha cepa mutante se designa MTCC 5587, cuyo proceso comprende la fermentación de biomasa pretratada en presencia de un medio nutriente que consta de azúcar.

10 También se describe aquí un proceso eficiente para la producción de alto rendimiento de butanol usando *Clostridium acetobutylicum* mutante tolerante a los disolventes a partir de biomasa. Se describen las condiciones de cultivo óptimas que darían como resultado una mayor tolerancia al butanol de la cepa mutante del microorganismo. También se puede proporcionar un proceso rentable y escalable industrialmente para la producción de butanol.

15 Asimismo, se describe la producción de altos rendimientos de butanol (hasta 19 g/L) en un único procesamiento por lotes, sin eliminar el butanol producido. El proceso puede no involucrar ningún paso de lote alimentado (fed-batch) que implique un paso extra de adición de nutrientes, ni se requiere ningún desmoldeo con disolvente para alcanzar este alto rendimiento. A diferencia de muchos procesos informados en el dominio público que emplean el modo continuo de fermentación, aumentando así las posibilidades de contaminación, la presente descripción incluye un proceso que se puede completar en un único procesamiento por lotes. La optimización cuidadosa del medio, la aclimatación y la mutagénesis química para la improvisación han dado como resultado una cepa mutante que es capaz de producir y tolerar tales altos rendimientos de butanol en el caldo. Por lo tanto, todos estos parámetros hacen que el proceso descrito aquí sea más rentable. Además, los inventores también han podido demostrar con éxito el proceso a escala de 15 L.

20 Asimismo se describe un proceso para incrementar la tolerancia al butanol por mutagénesis química de la cepa. Puede proporcionarse tolerancia a aproximadamente 3,5 % de concentración de butanol en un medio optimizado, así como condiciones dirigidas a un proceso para proporcionar el rendimiento incrementado de butanol. La razón más probable de su alta tolerancia al butanol puede ser que la optimización del proceso ha resultado en el conjunto final de condiciones fisicoquímicas bajo las cuales se alivian las limitaciones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, el potencial de óxido-reducción, la osmolaridad, el flujo de electrones pueden haberse alterado bajo las condiciones optimizadas. Cierta conjunto de enzimas requeridas para la tolerancia y producción de butanol pueden haberse activado o inducido bajo las condiciones optimizadas. El cultivo puede haberse adaptado durante el curso del proceso de optimización a un alto nivel de butanol.

25 También se puede proporcionar un proceso para la evaluación del biobutanol usando diversas biomásas. Puede usarse la pasta de semillas de jatropha y pongamia y los tallos de plátano. De igual forma se estudió el rendimiento de biobutanol usando la pasta de semillas y los tallos pretratados usando hidrólisis ácida.

35 Se proporciona también un proceso que puede ampliarse a gran escala.

Breve descripción de los planos

Los siguientes planos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente descripción, que puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos planos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas.

40 **Fig.1. Tolerancia y crecimiento de la cepa mutante, designada como B90, en presencia de diferentes concentraciones de butanol.**

Se observó que la cepa de tipo salvaje *C. acetobutylicum* ATCC 4259 podía tolerar hasta 1,5 % de butanolina, el medio más allá del cual había cese de crecimiento, mientras que la cepa mutante *C. acetobutylicum* MTCC 5587 (B90) podía tolerar hasta 3,5 % (v/v) de butanol en el medio AT. El crecimiento a estos niveles de butanol fue extremadamente lento y débil debido a la toxicidad del disolvente. A concentraciones más altas, es decir, 3,8 % y 4 %, no hubo crecimiento.

Fig.2 Comparación del perfil de ácidos grasos de tipo salvaje (A) y cepa mutante (B)

Los lípidos totales del tipo salvaje y la cepa mutante tolerante a los disolventes se extrajeron y analizaron mediante GC. Se encontró que la composición lipídica del mutante *C. acetobutylicum* MTCC 5587 se alteró en comparación con la cepa de tipo salvaje. El perfil GC (Fig. 2B) mostró la presencia de los ácidos grasos saturados, es decir, ácido mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), que comprenden aproximadamente el 50 % de los ácidos grasos totales en la cepa tolerante a los disolventes con solo trazas de ácidos grasos insaturados. Mientras que, en el tipo salvaje, el ácido graso insaturado, el ácido oleico (C18:1) era abundante y constituía aproximadamente el 75 % de los ácidos grasos totales, mientras que los saturados estaban presentes en cantidades significativamente menores (11 % de C16:0) (Fig. 2A).

Fig. 3 Acumulación de rodamina G en tipo salvaje (A) y mutante tolerante a solvente de C acetobutylicum (B).

Al ser estudiado y observado, se descubrió que después de 24 horas de incubación en una placa que contenía el

colorante tóxico rodamina 6G, la cepa mutante tenía una gran acumulación de rodamina 6G que aparecía de manera intracelular como una colonia rosa (**Fig. 3**). La colonia de la cepa de tipo salvaje era de un color rosa pálido con una acumulación de colorante comparativamente menor. Esto indica la existencia de un mecanismo de tolerancia a compuestos tóxicos, tales como butanol, en la cepa mutante.

5 **Fig. 4 Cromatogramas HPLC de butanol (A) y el caldo fermentado (B).**

El proceso se amplió aún más hasta un nivel de 15 L en un biorreactor de 20 L usando un 7 % (w/v) de pasta de semilla de jatropha y un 2 % de glucosa. Se alcanzó un título de butanol de 18,6 g/L en 72 horas.

Fig.5 Perfil de aumento de la producción de butanol a partir de hidrolizado de pasta de semilla de jatropha.

10 El azúcar inicial fue de 44 g/L y el azúcar final fue de 4 g/L (**Fig. 5**). El desplazamiento típico de mariposa se pudo observar cuando la fase acidogénica disminuyó y comenzó la fase solventogénica.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

El término butanol o biobutanol, como se usa en este documento, se refiere a n-butanol.

15 El término tolerancia a butanol, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de la bacteria para sobrevivir y crecer en presencia de 2,5- 3,5 % de 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. El término rendimiento se refiere a la cantidad de butanol producido en el caldo de fermentación en g/L.

20 El término cepa mutante se refiere a *C. acetobutylicum* MTCC 5587. Esta cepa mutante se ha depositado en Microbial Type Culture Collection, Chandigarh, India, bajo el tratado de Budapest y ha designada con el número MTCC 5587.

Uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento y la producción de moléculas asociadas al crecimiento es el pH. Por lo tanto, la producción de butanol se examinó a diferentes niveles de pH. El pH óptimo para la producción de butanol por *Clostridium acetobutylicum* mutante puede ser 6,5. Esto concuerda con los hallazgos de Robson y Jones (1982), quienes informaron que *C. acetobutylicum* P262 mostró buenos niveles de producción de solventes dentro del rango de pH de 5,0-6,5. De manera similar, Bielbl (1999) informó que *Clostridium beijerinckii* NCI MB 8052 mostró un crecimiento mucho mejor y producción de solvente al nivel de pH 5,5 que a 5,0 o inferior.

30 Otro factor importante que afecta tanto al crecimiento como a la producción de moléculas asociada al crecimiento es la temperatura. Se encontró que a temperaturas óptimas de crecimiento había un mayor rendimiento de butanol para el MTCC 5587 mutante. Esto contrasta con los hallazgos anteriores de McCutchan y Hickey (1954), que informaron una disminución (de hasta 23 %) en la producción de disolvente por *Clostridium* sp. a 37°C frente a los rendimientos bastante constantes del 31 % a 30 y 33°C.

35 Es bien conocido que entre los parámetros nutricionales, la fuente de carbono es uno de los factores más importantes responsable del crecimiento celular y la producción de biomoléculas (Samulov et al, 1991). Según la presente descripción, la fuente de carbono primaria utilizada puede ser el azúcar resultante después de la hidrólisis de la biomasa. Sin embargo, para mejorar aún más el crecimiento celular y la producción de butanol, se añadió glucosa a diferentes concentraciones (0-2 %) al hidrolizado. Los resultados mostraron que la adición de glucosa (2 %) al hidrolizado de la pasta de semilla de jatropha pretratada con ácido (7 %), apoyaba la producción de butanol hasta 14,3 g/L en 120 horas, en viales anaeróbicos de 125 ml. No obstante, cuando no la glucosa fue añadida, se obtuvo un título muy bajo de butanol (4,2 g/L). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Parekh *et al.* (1998), que informaron que el medio de agua de maceración de maíz (CSW, por sus siglas en inglés) por sí solo no era un sustrato adecuado, mientras que la adición de glucosa (6 %) apoyaba el crecimiento y la producción de butanol. El efecto de la limitación nutricional en el inicio y mantenimiento de la producción de solvente también ha sido investigado por otros autores. Por ejemplo, Long et al. (1984) reportaron que en la fermentación por lotes utilizando *Clostridium acetobutylicum* P262, solo se produjeron ácidos cuando la concentración de las fuentes de carbono era limitada. Además, se sabe que la pasta de semillas de jatropha es tóxica debido a la presencia de ésteres de forbol. Por lo tanto, el hidrolizado de pasta de semilla de jatropha por sí solo puede no ser propicio para el crecimiento del organismo y la producción de butanol.

50 Como se discutió anteriormente, la toxicidad del butanol también es un factor importante que afecta su producción. Esta toxicidad se debe a su localización en la membrana plasmática, que da como resultado la interrupción de una serie de procesos fisiológicos que incluyen permeabilidad de membrana, transporte de solutos, mantenimiento de la fuerza motriz del protón, la conformación y la actividad de las proteínas de membrana intrínsecas (Sikkema *et al.*, 1995). Las bacterias tolerantes a los disolventes evaden estas reacciones mediante adaptaciones celulares que incluyen la composición lípida de membrana alterada, el sistema de flujo de salida que disminuye activamente la concentración de disolvente dentro de la célula, la degradación de disolventes o proteínas de estrés que se sobreexpresan, como las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) (Tomas *et al.*, 2003, 2004).

Uno de los factores que han desempeñado un papel fundamental es lograr un alto título de butanol mediante un proceso de una sola etapa sin recurrir a ningún disolvente decapado o la dilución del caldo, que es la capacidad

tolerante del disolvente de la cepa mutante. Para investigar el mecanismo detrás de la tolerancia, se determinó la composición de ácidos grasos de los lípidos totales. Una alta proporción de ácidos grasos saturados C14:0 y C16:0 en el mutante, en comparación con C18:1 en el tipo salvaje, indica una alteración impulsada por estímulos de la composición de los lípidos para la supervivencia.

- 5 Baeret *al.* (1987), informó que al sintetizar una mayor cantidad de ácidos grasos saturados, el SA-1 mutante de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 desarrolló un mecanismo para combatir el estrés de butanol.

Otro hallazgo fue la capacidad de la cepa mutante para acumular una cantidad incrementada de rodamina 6G en comparación con el tipo salvaje. Esto indicó la existencia de un mecanismo de tolerancia a compuestos tóxicos, a saber, n-butanol, que concuerda con el informe de Lazaroaie (2009) sobre el mecanismo implicado en la resistencia a disolventes orgánicos en bacterias gram negativas.

10 La cepa de *Clostridium* mutante utilizada en la presente invención ha mostrado tolerancia al 3,5 % (v/v) de butanol. La razón más probable de su alta tolerancia al butanol puede ser que la mutagénesis química indujo la alteración genética de la cepa de *Clostridium* y la optimización del proceso que dio como resultado el conjunto final de condiciones fisicoquímicas, superando así los inconvenientes de los procesos citados en el dominio público. Por ejemplo, aunque la cepa de tipo salvaje apenas producía butanol, el mutante producía 4-5 g/L de butanol en un medio complejo rico en nutrientes en condiciones no optimizadas. Posteriormente, después de la optimización en un medio que contiene pasta de semilla de jatropha, como se representa en la Tabla 1, el mutante produjo 14,3 g/L de butanol, un aumento triple.

20 Se realizaron más estudios sobre el uso de diversas biomásas para la producción de butanol utilizando las condiciones descritas anteriormente. En particular, la biomasa estudiada fue la pasta de semillas de jatropha, la pasta de semillas de pongamia y el tallo de plátano. Todos los tres tipos de biomasa se sometieron a hidrólisis ácida y los niveles totales de reducción de azúcar se estimaron mediante el método del ácido dinitro salicílico.

25 La pasta de semillas de jatropha desaceitada y la pasta de semillas de pongamia fueron secadas y molidas para obtener un polvo fino. Se trataron diferentes concentraciones de la pasta de semilla finamente molida con 1-3 % de HCl o H₂SO₄ durante 1-3 horas a temperaturas superiores a 100°C. Después del tratamiento con ácido, la suspensión se filtró usando un paño de muselina y el filtrado se neutralizó usando NaOH. Estos filtrados pretratados con ácido fueron suplementados con medio AnS. El pH del medio se ajustó entre 6-7 usando un con. H₂SO₄ o NaOH. Al usar hidrolizado de pasta de semilla de jatropha como única fuente de carbono el título de butanol fue muy pobre, con un máximo de 4,2 g/L en una botella que contenía 7 % de hidrolizado de pasta de semilla de jatropha. De forma similar, con un 7 % de hidrolizado de pasta de semilla de pongamia solo, se logró un título de 2,4 g/L. Esto indica que para que la fermentación de butanol tenga éxito, se debe complementar la fuente adicional de carbono. La adición de una cantidad creciente de glucosa condujo al correspondiente aumento en el título (**Tabla 1 y 2**) tanto para hidrolizados de jatropha como de pongamia. Se produjo un título de 14,3 g/L de butanol en el medio AnS, que tiene un 7 % de hidrolizado de jatropha con un 2 % de glucosa, en 120 horas (**Tabla 1**). Mientras que, con un 2 % de glucosa y un 7 % de hidrolizado de pongamia, se produjeron 8,7 g/L de butanol (**Tabla 2**).

35 También se realizaron experimentos en tallos de plátano. Los tallos se cortaron en trozos pequeños, fueron secados al sol y finamente pulverizados. Se trataron diferentes concentraciones de la pasta de semilla finamente molida con 1-3 % de HCl o H₂SO₄ durante 1-3 horas a temperaturas superiores a 100°C. Después del tratamiento con ácido, la suspensión se filtró usando un paño de muselina y el filtrado se neutralizó usando NaOH. Estos filtrados pretratados con ácido fueron suplementados con medio AnS. El pH del medio se ajustó entre 6-7 usando conc. H₂SO₄ o NaOH. El hidrolizado de tallo de plátano soportó la producción de butanol sin un suplemento de fuente de carbono adicional y se logró un título de 9,1 g/L con una concentración de hidrolizado del 10 %. Sin embargo, la fortificación con glucosa al 2 % junto con el hidrolizado de tallo de plátano aumentó el título a 18,0 g/L de butanol (**Tabla 3**).

45 Las materias primas como la pasta de semillas de jatropha y la de semillas de pongamia, son ricas en contenido de lignina en la forma en que se usan en la presente invención. La pasta de semilla de jatropha contiene 29,1 % de lignina y 15,9 % de celulosa. La lignina es un polímero complejo de unidades de fenilpropano, que están reticuladas entre sí por diferentes enlaces químicos. Es particularmente difícil de biodegradar y reduce la biodisponibilidad de los otros constituyentes de la pared celular. Es el componente más recalcitrante de la pared celular de la planta; cuanto mayor es la proporción de lignina, menor es la biodisponibilidad del sustrato (Sjostrom, 1993).

50 Por otro lado, el tallo de plátano consiste en 63,9 % de celulosa y 12,3 % de lignina. La celulosa es un polisacárido y es fácilmente hidrolizable (Zainol y Rehman, 2008). Por lo tanto, se requieren métodos eficientes de tratamientos previos para la hidrólisis del componente de lignina de estas materias primas.

55 La hidrólisis ácida de dos materias primas lignocelulósicas tales como la pongamia y la pasta de semilla de jatropha (a concentración del 2 %, 5 %, 7 %, 10 %) se llevó a cabo para la hidrólisis de azúcar junto con biomasa celulósica, es decir, el tallo de plátano.

Aunque se obtuvo el máximo azúcar en el hidrolizado de tallo de plátano (a una concentración del 10 %), se realizaron estudios detallados únicamente sobre el hidrolizado de pasta de semillas de jatropha debido a su fácil disponibilidad. Tras la hidrólisis ácida de diferentes concentraciones de pasta de semilla de jatropha, se pudo

obtener una cantidad máxima (17,2 g/L) de azúcares reductores a partir de un 7 % de pasta.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las representaciones preferidas de la invención. Los expertos apreciarán que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las especificaciones descritas y aún obtener un resultado igual o similar sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Organismo y condiciones de crecimiento

Se cultivó *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 en botellas de 125 ml que contenían 50 ml del medio de azúcar anaerobio (AnS, en inglés), cuya composición fue de (g/L): glucosa, 20; peptona, 10; extracto de levadura, 5,0; K₂HPO₄, 3,0; NaCl, 1,0; (NH₄)₂SO₄, 1,0; CaCl₂·2H₂O, 0,2; MgCl₂·6H₂O, 0,2; y Na₂CO₃, 1,0 y el pH se ajustó a 6,5.

El espacio vacío se purgó con N₂, y se añadió Na₂S·9H₂O (0,02 % (w/v)) para eliminar las trazas de oxígeno disuelto (Samuelov *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2000). Las botellas de vidrio se sellaron con tapones de goma de butilo y se esterilizaron durante 10 minutos a 121°C. El medio estéril se inoculó con cultivo de siembra al 1-3 % (v/v) y se incubó a 37°C durante 132 horas con agitación suave intermitente.

Ejemplo 2: Estudios de mutaciones

La mutagénesis química se llevó a cabo usando MNNG (1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina). Se inocularon medios alternativos de tioglicolato (AT) con *C. acetobutylicum* ATCC 4259 del cultivo de punción. Después de 12 horas de crecimiento a 37°C, el cultivo se recogió y se centrifugó. El sedimento celular fue lavado con 2 ml de solución reguladora de citrato (pH 5,8) y se añadieron 100 µl de MNNG (solución madre de 100 mg/ml preparada en agua destilada esterilizada) a las células, que se incubaron a 30°C durante 70 minutos. La masa celular mutagenizada se centrifugó y el sobrenadante se descartó adecuadamente en contenedores de riesgo biológico. Las células se lavaron dos veces con caldo AT y volvieron a suspenderse en 1 ml de caldo AT. Los mutantes se criaron en placas de agar AT que contenían 13 g/L de butanol y se incubaron a 37°C durante 12-16 horas.

Ejemplo 3: Tolerancia y perfil de crecimiento del mutante tolerante a butanol

Los mutantes tolerantes a 1,3 % de butanol fueron rastreados adicionalmente para determinar la tolerancia a una mayor concentración de butanol en un medio de agar AT que contenía (v/v), a saber, 1,5 %, 1,8 %, 2,0 %, 2,5 % y 3,0 % de butanol. Un mutante que crecía en 3,0 % de butanol que contenía una placa de medio de agar AT se transfirió a botellas selladas de 125 ml con 50 ml de medio AT, que tenía diversas cantidades de butanol, (v/v) 2,0 %, 2,5 %, 3,0 % y 3,5 %. La tolerancia y el perfil de crecimiento del mutante fueron monitoreados con respecto al tiempo.

La cepa de tipo salvaje *C. acetobutylicum* ATCC 4259 pudo tolerar hasta 1,5 % de butanol en el medio más allá del cual había cesado el crecimiento. Mientras que la cepa mutante *C. acetobutylicum* MTCC 5587 podía tolerar hasta 3,5 % (v/v) de butanol en el medio AT (**Fig. 1**). El crecimiento a estos niveles de butanol fue extremadamente lento y débil debido a la toxicidad del disolvente. A concentraciones más altas, es decir, 3,8 % y 4 %, no hubo crecimiento. El mutante se ha depositado en Microbial Type Culture Collection, Chandigarh, India, bajo el tratado de Budapest y ha designada con el número MTCC 5587.

Ejemplo 4: Extracción de lípidos y análisis

Se extrajeron lípidos totales de las células, como se describe en (Baer *et al.* 1987). Los lípidos se transesterificaron y los FAMES fueron analizados mediante GC.

Se extrajeron los lípidos totales de la cepa de tipo salvaje y de la mutante tolerante a los disolventes, y fueron analizados mediante GC. Se encontró que la composición lipídica del mutante *C. acetobutylicum* MTCC 5587 se alteró en comparación con la cepa de tipo salvaje. El perfil GC (**Fig. 2B**) mostró la presencia de los ácidos grasos saturados, es decir, ácido mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), que comprenden aproximadamente el 50 % de los ácidos grasos totales en la cepa tolerante a los disolventes con solo trazas de ácidos grasos insaturados. Mientras que, en el tipo salvaje, el ácido graso insaturado, el ácido oleico (C18:1) era abundante y constituía aproximadamente el 75 % de los ácidos grasos totales, mientras que los saturados estaban presentes en cantidades significativamente menores (11 % de C16:0) (**Fig. 2A**).

Ejemplo 5: Acumulación de rodamina 6G

Las células del cultivo overnight (de la noche a la mañana) de tipo salvaje y de las mutantes tolerantes a los disolventes *C. acetobutylicum* MTCC 5587 se detectaron en agar AT con o sin rodamina 6G (100 µg/ml) y fueron incubadas a 37°C en una cámara anaerobia durante 24 horas. La acumulación de rodamina 6G fue monitoreada con luz ultravioleta (Lazaroaie, 2009).

Después de 24 horas de incubación en una placa que contenía el colorante tóxico rodamina 6G, se encontró que la

cepa mutante tenía una gran acumulación de rodamina 6G intracelular, que apareció como una colonia rosa (**Fig. 3**). La colonia de la cepa de tipo salvaje era de un color rosa pálido con una acumulación de colorante comparativamente menor. Esto indica la existencia de un mecanismo de tolerancia a compuestos tóxicos, tales como butanol, en la cepa mutante.

5 **Ejemplo 6: Optimización del proceso en fermentación por lotes**

Todos los experimentos de optimización se llevaron a cabo en 50 ml de medio AnS en botellas de 125 ml. Se sometieron diferentes biomásas, como pasta de semillas de jatropha, el tallo de plátano y la pasta de semillas de pongamia, a un proceso de hidrólisis ácida, como se describe a continuación. Todos los experimentos se llevaron a cabo al menos tres veces para garantizar la reproducibilidad.

10 **Ejemplo 7: Hidrólisis ácida de diferentes materias primas**

a. Pasta de semillas de jatropha y pasta de semillas de pongamia

15 La pasta de semillas de jatropha desaceitada y la pasta de semillas de pongamia fueron secadas y molidas para obtener un polvo fino. Se trataron diferentes concentraciones de la pasta de semilla finamente molida con 1-3 % de HCl o H₂SO₄ durante 1-3 horas a temperaturas superiores a 100°C. Después del tratamiento con ácido, la suspensión se filtró usando un paño de muselina y el filtrado se neutralizó usando NaOH. Estos filtrados pretratados con ácido fueron suplementados con medio AnS. El pH del medio se ajustó a 6,5 usando conc. H₂SO₄ o NaOH.

b. Tallo de plátano

20 Los tallos de plátano fueron cortados en pequeños trozos, secados al sol y finamente pulverizados. Se pretrataron diferentes concentraciones de tallos de plátano finamente pulverizados de la misma manera que se describió para la pasta de semillas de jatropha y de pongamia.

25 Todos los tres tipos de biomasa se sometieron a hidrólisis ácida y los niveles totales de reducción de azúcar se estimaron mediante el método del ácido dinitro salicílico. Al usar hidrolizado de pasta de semilla de jatropha como única fuente de carbono el título de butanol fue muy pobre, con un máximo de 4,2 g/L en una botella que contenía 7 % de hidrolizado de pasta de semilla de jatropha. De manera similar, con un 7 % de hidrolizado de pasta de semilla de Pongamia solo, se logró un título de 2,4 g/L. Esto indica que para que la fermentación de butanol tenga éxito, se debe complementar la fuente adicional de carbono.

30 La adición de una cantidad creciente de glucosa condujo al correspondiente aumento en el título (**Tabla 1 y 2**) tanto para hidrolizados de jatropha como de pongamia. Se produjo un título de 14,3 g/L de butanol en el medio AnS, que tiene un 7 % de hidrolizado de jatrofa con un 2 % de glucosa, en 120 horas (**Tabla 1**). Mientras que, con un 2 % de glucosa y un 7 % de hidrolizado de pongamia, se produjeron 8,7 g/L de butanol (**Tabla 2**).

El hidrolizado de tallo de plátano soportó la producción de butanol sin suplemento de fuente de carbono adicional y se consiguió un título de 9,1 g/L a una concentración de hidrolizado del 10 %. Sin embargo, la fortificación con glucosa al 2 % junto con el hidrolizado de tallo de plátano aumentó el título a 18,0 g/L de butanol (**Tabla 3**).

35 **Tabla 1. Producción de butanol (g/L) en diferentes proporciones de glucosa e hidrolizado de pasta de semilla de jatropha**

Glucosa (%)	Concentración de pasta de semilla de jatropha			
	2 %	5 %	7 %	10 %
0	2,0	3,2	4,2	3,9
0,5	5,2	6,4	8,9	8,1
1,0	7,1	8,9	10,8	10,2
1,5	8,5	10,1	12,2	12,0
2,0	9,1	12,8	14,3	13,8

Tabla 2. Producción de butanol (g/L) en diferentes proporciones de glucosa e hidrolizado de pasta de semilla de pongamia

Glucosa (%)	Concentración de pasta de semilla de pongamia			
	2 %	5 %	7 %	10 %
0	1,4	1,9	2,4	2,0
0,5	3,3	4,0	4,9	4,3
1,0	4,9	5,8	6,2	6,0
1,5	6,0	7,0	8,0	8,1
2,0	6,6	7,9	8,7	8,4

5 Tabla 3. Producción de butanol (g/L) en diferentes proporciones de glucosa y de hidrolizado de tallos de plátano.

Glucosa (%)	Concentración de tallo de plátano			
	2 %	5 %	7 %	10 %
0	2,7	3,4	5,3	9,1
0,5	5,5	8,9	9,6	10,7
1,0	7,8	11,6	12,4	13,8
1,5	10,3	12,2	15,8	17,8
2,0	11,6	13,7	16,9	18,0

Ejemplo 8: Estimación de butanol y azúcar residual

10 El sobrenadante del cultivo se analizó para obtener butanol por HPLC en una columna PRP 300X (Hamilton) con acetonitrilo y 0,5 mM H₂SO₄ (1:9) como la fase móvil a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min utilizando el detector R1. El butanol eluye a un tiempo de retención de 7,3 minutos. El azúcar residual en el medio de fermentación se estimó mediante el método del ácido dinitro salicílico (Tasun y Ghen, 1970).

Ejemplo 9: Validación del proceso de producción en botellas anaeróbicas de 500 ml

15 La producción de butanol en el medio optimizado se validó a una escala de 300 ml en una botella de 500 ml. La fermentación se llevó a cabo durante 132 horas y se estimó la producción de butanol. La validación del proceso a escala de 300 ml en botellas de 500 ml dio como resultado 14,8 g/L de butanol en 96 horas en medio AnS, con un 7 % de hidrolizado de pasta de semilla de jatropha y un 2 % de glucosa.

Ejemplo 10: Aumento del tamaño del proceso a 15 L

20 En las condiciones óptimas, el aumento de la producción de butanol se llevó a cabo en un biorreactor de 20 L con un volumen de trabajo de 15 L. La fermentación ocurrió durante 108 horas a 37°C, con agitación constante a 150 rpm. El pH inicial del medio se estableció en 6,5. La formación de espuma se controló añadiendo un agente antiespumante de silicio. La anaerobiosis se mantuvo durante todo el experimento mediante la inyección constante de gas N₂ en el medio a una velocidad de 0,5 L/min a través de un filtro estéril. Se obtuvieron muestras en un intervalo de tiempo regular de 12 horas y se procesaron para la estimación del azúcar residual, el pH y la concentración de butanol en el caldo de fermentación.

25 El proceso se amplió adicionalmente hasta un nivel de 15 L en un biorreactor de 20 L usando un 7 % (w/v) de pasta de semilla de jatropha y un 2 % de glucosa. Se alcanzó un título de butanol de 18,6 g/L en 72 horas (**Fig. 4 y Fig. 5**). El azúcar inicial fue de 44 g/L y el azúcar final fue de 4 g/L (**Fig. 5**). El desplazamiento típico de mariposa se pudo observar cuando la fase acidogénica disminuyó y comenzó la fase solventogénica.

Ejemplo 11: Estimación de la proporción de acetona, butanol y etanol

30 La proporción de los disolventes producidos durante el proceso de fermentación ABE se analizó por HPLC en columna de ácido orgánico Rezex usando 0,1 N H₂SO₄ como la fase móvil a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min utilizando un detector RID. El análisis del caldo de fermentación en la columna de HPLC de ácido orgánico Rezex reveló que la relación de acetona: butanol: etanol era 2,6: 6,6: 0,8, similar a la proporción obtenida en una

fermentación ABE típica.

REFERENCIAS [0089]

1. Baer, S.H., Biaschek, H.P., Smith, T.L. (1987). Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2854-2861.
2. Ezeji, T.C., Qureshi, N., Biaschek, H.P. (2007). Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18: 220-227.
3. Herrera, S. (2004). Industrial biotechnology-a chance at redemption. *Nature Biotechnol.* 22 (6): 671-678.
4. Jones, D.T., Woods, D.R. (1986). Acetone butanol fermentation Revisited. *Microbiol. Rev.* 50:484-524.
5. King, A. J., He, W., Cuevas, J.A., Freudenberger, M., Ramiaramananana, D., Graham, LA. (2009). Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *J. Exp. Bot.* 60: 2897-2905.
6. Lazaroaie, M.M. (2009). Mechanisms Involved In Organic Solvent Resistance in Gram-Negative Bacteria. *World Acad. Sci, Eng., Technol.* 54:648-658.
7. Lee, P.C., Lee, W.G., Kwon, S., Lee, S.Y., Chang, N. (2000). Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 23-27.
8. Liang, Y., Siddaramu, T., Yesuf, J., Sarkany, N. (2010). Fermentable sugar release from *Jatropha* seed cakes following lime pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 101 : 6417-6424.
9. Li, J., Zhao, J.B., Zhao, M., Yang, Y.L., Jiang, W.H., Yang, S. (2010). Screening and characterization of butanol tolerant microorganisms. *Letts. Appl. Microbiol.* 50: 373-379.
10. Long, S., Long, D.T., Woods, D.R. (1984). Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 256-261.
11. Nishino, K., Yamaguchi, A. (2004). Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186 1423-1429.
12. Papoutsakis, E.T (2008). Engineering solventogenic *Clostridia*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 420-429.
13. Parekh, M., Formanek, J., Biaschek, 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.
14. Pfomm, H. P., Amanor-Boadu, V., Richard N., Vadlani, P., Madl, R. (2010). Biobutanol vs. bio-ethanol: A technical and economic assessment for corn and switchgrass fermented by yeast or *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioener.* 34: 515-524.
15. Qijreshi, N., Saha C. B., Ronald E. H., Bruce, D., Stephen, H., Siqing, L., Loren, I., Michael J. B., Gaul am, S., Michael, A. C. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II - Use of corn stover and switchgrass hydrolysates (2010). *Biomass and Bioener.* 34: 566 - 571.
16. Samuelov, N.S., Lamed, R., Lowe, S., Zeikus, J.G. (1991). Influence of CO₂/HC₃ + levels and pH on growth, succinate production and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3013-3019.
17. Sharma, Y., Singh B., Korstad, J. (2010). High yield and conversion of biodiesel from a nonedible feedstock (*Pongamia pinnata*). *J. Agric. Food Chem.* 58(1): 242-247.
18. Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59: 201-222.
19. Sjoström, E. W (1993). *Chemistry: Fundamentals and Application*. Academic Press: Orlando. 293 pp.
20. Tasun, K., Chose, P., Ghen, K. (1970). Sugar determination by DNS method. *Biotech. Bioeng.* 12: 991-992.
21. Tomas, C.A., Welker, N.E., Papoutsakis, E.T. (2003). Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4951-4965.
22. Tomas, C.A., Beamish, J., Eleftherios (2004). Transcriptional analysis of butanol stress and *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* 186(7):2006-2018.
23. Volherbst-Schneck, K., Sands, J.A., Montencourts, B.S. (1984). Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:193-194.
24. Zainol, N., Rahman, R. A. (2008). Anaerobic cellulose recovery from banana stem waste. *Proceedings of the 1st International Conference of the IET Brunei Darussalam Network, 26-27 May.*

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo de cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum*, en el que dicha cepa se denomina MTCC 5587 y tiene una tolerancia incrementada al butanol de 1,5 % (v/v) a 3,5 % (v/v) en comparación con un tipo salvaje de cepa de *C. acetobutylicum*, designada ATCC 4259.
- 5 2. La cepa mutante de la declaración 1, en la que la tolerancia al butanol está asociada con un contenido aumentado en ácidos grasos saturados de membrana de 4 a 5 %, en comparación con dicho tipo salvaje.
3. La cepa mutante de la declaración 1, en la que la tolerancia al butanol en la cepa mutante está asociada con una tolerancia incrementada a compuestos tóxicos en comparación con dicho tipo salvaje, particularmente con rodamina 6G.
- 10 4. Un proceso de producción de alto rendimiento de butanol a partir de biomasa pretratada utilizando una cepa mutante de *C. acetobutylicum* con tolerancia mejorada de butanol, en el que dicha cepa mutante se denomina MTCC 5587, cuyo proceso comprende la fermentación de biomasa pretratada en presencia de un nutriente medio compuesto de azúcar.
- 15 5. El proceso de la declaración 4, en el que la biomasa se selecciona del grupo que consiste en un tallo de plátano, una pasta de semilla de pongamia y una pasta de semilla de jatropha.
6. El procedimiento de la declaración 4, en el que el medio nutriente se complementa con azúcar, particularmente glucosa, que tiene una concentración del 2 %.
7. El procedimiento de la declaración 4, en el que dicha fermentación se lleva a cabo a una temperatura que varía entre 33 y 37°C.
- 20 8. El procedimiento de la declaración 4, que incluye la etapa de someter la biomasa a pretratamiento con ácido, con 1-3 % de ácido clorhídrico concentrado o ácido sulfúrico.
9. El procedimiento de la declaración 8, en el que el pretratamiento de la biomasa con ácido se lleva a cabo a más de 100°C durante 1-5 horas.
- 25 10. El procedimiento de la declaración 8, que comprende además una etapa de neutralización de la biomasa pretratada con ácido con hidróxido sódico.
11. El procedimiento según la declaración 4, en el que la tolerancia a butanol de la cepa mutante se potencia desde 1,5 % (v/v) a 3,5 % (v/v) en comparación con la cepa salvaje de *C. acetobutylicum*, designada ATCC 4259.
12. El procedimiento de la declaración 4, en el que el rendimiento de butanol es de hasta 19 g/L a una escala de 15 L con hidrolizado de pasta de semilla de jatropha.
- 30 13. El procedimiento de la declaración 4, en el que el rendimiento de butanol es de hasta 18,0 g/L con hidrolizado de tallo de plátano, a una escala de 50 ml.
14. El procedimiento de la declaración 4, en el que el rendimiento de butanol es de hasta 14,3 g/L con hidrolizado de pasta de semilla de jatropha, a una escala de 50 ml.
- 35 15. El procedimiento de la declaración 4, en el que el proceso produce disolventes en la relación de 2,6: 6.6: 0,8 de acetona: butanol: etanol, similar a la relación obtenida en una fermentación típica de acetona, butanol, etanol (ABE).

Fig. 1. Tolerancia y crecimiento de la cepa mutante en presencia de diferentes concentraciones de butanol.

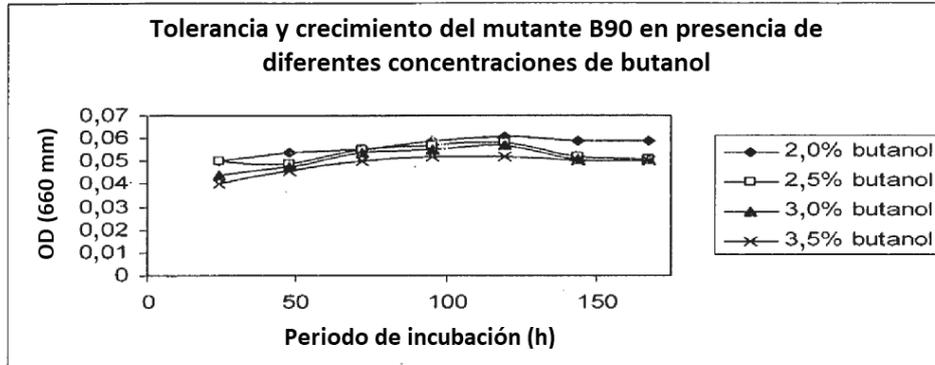


Fig. 2. Comparación del perfil de ácidos grasos de tipo salvaje (A) y cepa mutante (B)

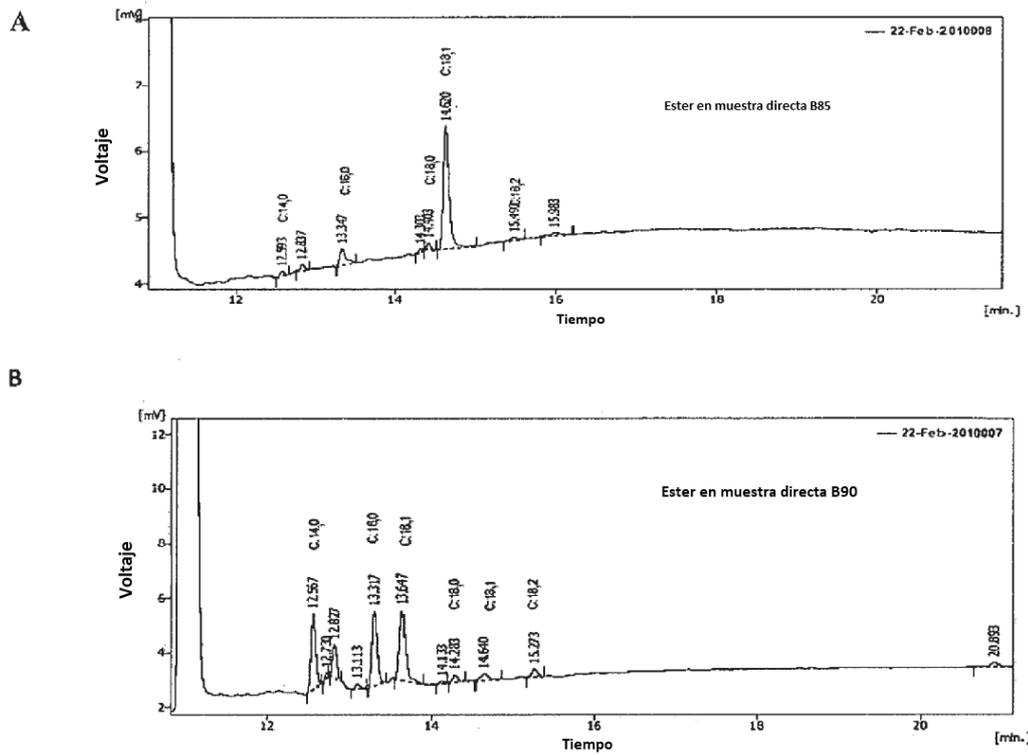


Fig. 3 Acumulación de rodamina G en tipo salvaje y mutante tolerante a solvente de *C. Acetobutylicum*

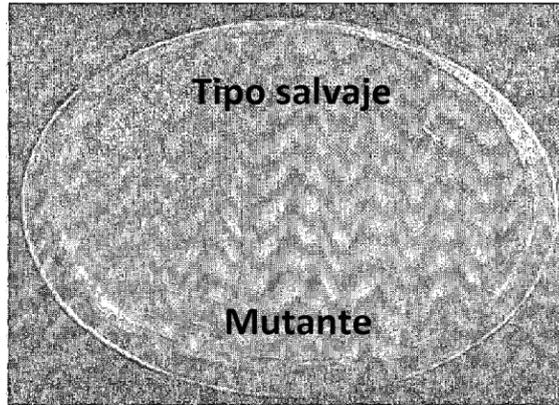


Fig. 4. Cromatogramas de HPLC del butanol estándar (A) y el caldo fermentado (B).

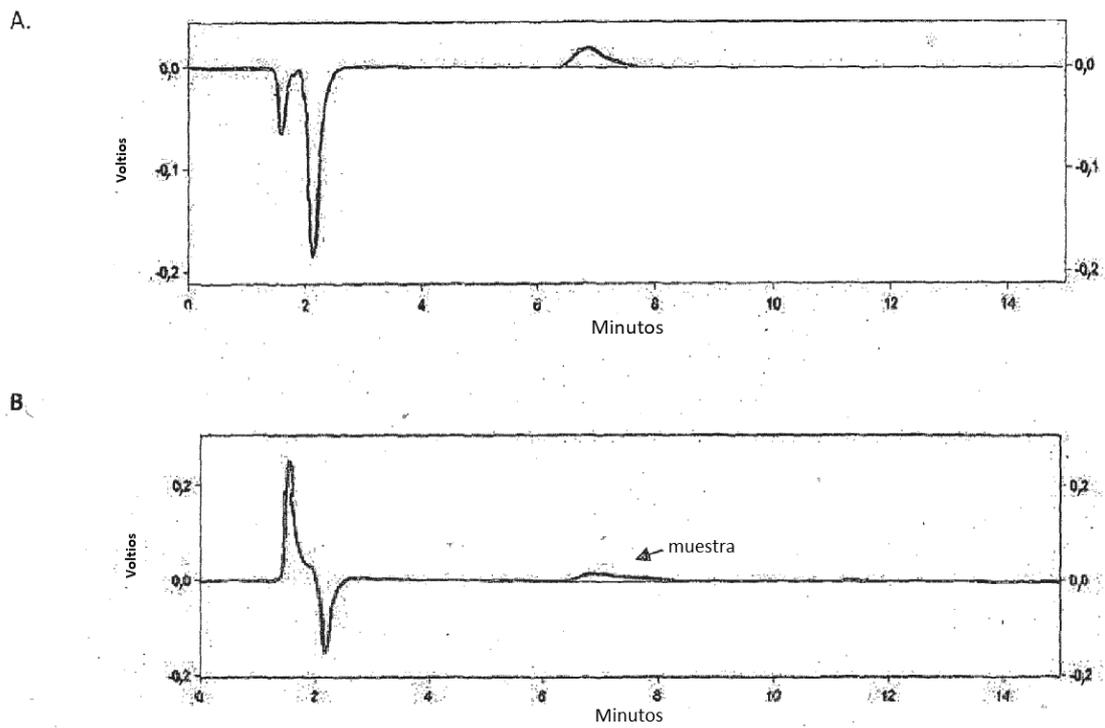


Fig.5 Perfil de aumento de la producción de butanol a partir de hidrolizado de pasta de semilla de jatropha.

