(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 693 392**

(21) Número de solicitud: 201730779

(51) Int. Cl.:

C12P 7/16 (2006.01)
C12P 7/28 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12R 1/145 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

07.06.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

11.12.2018

(71) Solicitantes:

ABENGOA RESEARCH, S.L. (100.0%)
C/ Energia solar, 1 Campus Palmas Altas
41014 Sevilla ES

(72) Inventor/es:

PUERTA FERNÁNDEZ, Elena;
HIDALGO GARCÍA, María;
MONTOYA SOLANO, José David;
ESCOBAR NIÑO, Almudena y
RAMOS MARTÍN, Juan Luis

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **MUTANTES DE CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII HIPERPRODUCTORES DE BUTANOL**

(57) Resumen:
Mutantes de Clostridium beijerinckii hiperproductores de butanol.
La presente invención se refiere a cepas mutantes de Clostridium beijerinckii, particularmente producidas por mutagénesis química de los parentales C. beijerinckii BA101 y NCIMB 8052. Dichos mutantes son capaces de producir más butanol, mediante procesos de fermentación anaeróbica, que la cepa parental de la que proceden utilizando distintos sustratos como fuente de carbono. Por lo tanto, la invención también se refiere al empleo de dichas cepas mutantes en métodos de producción de acetona, butanol y etanol (ABE) por fermentación y a un método de obtención de dichas cepas mutantes.

ES 2 693 392 A1

DESCRIPCIÓN

MUTANTES DE *CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII* HIPERPRODUCTORES DE BUTANOL

La presente invención se encuadra dentro del campo de los procesos industriales de producción de butanol, preferiblemente de acetona, butanol y etanol (ABE), por fermentación con cepas de *Clostridium*. En concreto, la invención se refiere a cepas mutantes de *Clostridium beijerinckii* capaces de producir más butanol que la cepa parental de la que proceden, utilizando distintos sustratos como fuente de carbono. La invención también se refiere al empleo de dichas cepas mutantes en métodos de producción de ABE por fermentación y a un método de obtención de dichas cepas mutantes.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El butanol es un importante químico industrial. Comparado con el etanol, el butanol es más miscible en gasolina y diésel, tiene una menor presión de vapor y es menos miscible en agua. Además contiene alrededor de un 22% de oxígeno, lo que hace que cuando se emplea como biocombustible resulte en una combustión más completa produciendo una menor cantidad de humo. Estas cualidades hacen que sea un extensor de combustible superior al etanol. El butanol se emplea además como sustancia química en la industria del plástico y como extractante alimentario en la industria alimentaria y del sabor.

Por ello, hay un creciente interés en conseguir una producción eficiente de este biocombustible líquido a partir de biomasa barata y renovable, lo que supondría una solución a varios problemas simultáneamente: asegurar el suministro mundial de biocombustibles, porque podrían ser producidos localmente en sistemas adecuados, reducir los gases de efecto invernadero, y reciclar los productos deshecho que se producen como resultado de la actividad de otras industrias o incluso de las ciudades.

En los últimos años los procesos de fermentación para la producción de acetona/butanol/etanol (ABE) han recibido una considerable atención por ser procesos que permiten producir productos químicos básicos desde biomasa. La fermentación

ABE es la más ampliamente estudiada de entre todos los procesos de fermentación anaeróbica.

Se sabe que algunas cepas de *Clostridium* producen butanol a partir de carbohidratos a través del proceso llamado fermentación ABE. Durante esta fermentación se producen tres disolventes, acetona, butanol y etanol, en una proporción 3:6:1. La cepa de *Clostridium* más comúnmente utilizada para fermentación ABE es *Clostridium acetobutylicum*, que es la bacteria modelo de Clostridios solventogénicos. Sin embargo, esta cepa tiene los genes implicados en la producción de butanol en un megaplásmido, pudiendo originarse inestabilidades genéticas de la cepa.

Otro Clostridio solventogénico muy relevante es *C. beijerinckii*, el cual posee los genes de producción de butanol en el cromosoma, lo que la hace una estirpe más robusta para su uso industrial. Además, esta estirpe es menos proclive a sufrir el fenómeno conocido como “acid crash”, que hace que las células dejen de producir butanol y empiecen a esporular. Las ventajas de emplear *C. beijerinckii* en lugar de *C. acetobutylicum* incluyen que la primera puede usar un rango más amplio de sustratos y llevar a cabo la fermentación en un mejor rango de pH, posee la capacidad de producir butanol durante su fase de crecimiento exponencial y tiene una mayor estabilidad en lo que se refiere a la degeneración microbiana. Además, como ya se ha indicado, los genes solventogénicos en *C. beijerinckii* están localizados en el cromosoma, mientras que en *C. acetobutylicum* estos genes se localizan en un plásmido, lo que hace a *C. beijerinckii* más estable genéticamente.

Durante el curso de la fermentación ABE las células pasan, en primer lugar, por una fase conocida como “fase acidogénica”, en la cual se producen los ácidos (acético y butírico) que serán convertidos en los disolventes (butanol, acetona y etanol) durante la fase solventogénica. Ambas fases están muy conectadas, y los genes que se expresan durante la solventogénesis están regulados para su expresión tras la acidogénesis.

Por lo tanto, la fermentación de carbohidratos a acetona, butanol y etanol por microorganismos solventogénicos, incluyendo microorganismos del género *Clostridium*, es conocida. Así, por ejemplo, la patente US5192673 describe un proceso de fermentación mejorado para producir altos niveles de butanol usando una cepa mutante de *C. acetobutylicum* denominada *Clostridium acetobutylicum* ATCC 55025.

La patente US6358717 describe la producción de disolventes ABE mediante fermentación anaeróbica de una cepa mutante de *C. beijerinckii* denominada *Clostridium beijerinckii* BA101 ATCC No. PTA-1550 en un medio nutritivo con carbohidratos asimilables y la posterior recuperación de butanol, acetona y etanol. Esta cepa mutante BA101 se describe como una cepa hiperproductora de butanol obtenida mediante mutagénesis de la cepa silvestre *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Annous, B. A., H. P. Blaschek. 1991. Appl. Environ. Microbiol. 57:2544-2548; Formanek, J., R. Mackie, H. P. Blaschek. 1997. Appl. Environ. Microbiol. 63:2306-2310). Por otro lado, la solicitud de patente AU2014216024 describe cepas solventogénicas de *Clostridium* modificadas genéticamente que comprenden una expresión o estructura génica alterada que resulta en una eficiencia de producción de butanol incrementada. En algunas realizaciones la especie de *Clostridium* modificada según se describe en dicho documento es *C. beijerinckii.*

También se ha estudiado la ruta de biosíntesis de butanol en los Clostridia productores de estos disolventes y se han purificado y caracterizado algunas de las enzimas implicadas en el proceso (Boynton *et al*., 1996, Journal of Bacteriology 178, 3015-3024; Durre *et al*., 1995, Fems Microbiol Rev 17, 251 262).

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de diseñar microorganismos solventogénicos mejorados que presenten una eficiencia incrementada en la producción de butanol a partir de diversos sustratos, que sean cepas estables y con un rendimiento de producción mejorado con respecto a las cepas actualmente existentes. Además, uno de los problemas asociados a la fermentación ABE por *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii* es la toxicidad por butanol en el cultivo. Esta toxicidad requiere la eliminación continua de los productos tóxicos durante el proceso para conseguir una máxima producción de disolventes. Así, existe la necesidad de desarrollar microorganismos solventogénicos mejorados capaces de producir disolventes, en particular ABE, más en particular butanol, con un mayor rendimiento y una mayor tolerancia al producto y preferiblemente también al sustrato.

Por lo tanto, para que la producción de butanol a nivel industrial sea rentable, se necesita disponer de microorganismos capaces de incrementar los niveles de butanol producidos durante la fermentación, o capaces de producir butanol más rápidamente, así como de utilizar una diversidad de sustratos de partida.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona tres mutantes de la especie *Clostridium beijerinckii* obtenidos mediante mutagénesis química aleatoria de las cepas parentales *C. beijerinckii* BA101 y NCIMB 8052, que son capaces de producir más butanol o de producirlo más eficientemente que sus cepas parentales utilizando distintos sustratos como fuente de carbono y bajo diversas condiciones.

Por tanto, la presente invención se refiere a tres cepas mutantes de *C. beijerinckii* que producen significativamente más butanol, o bien que son capaces de producirlo más rápidamente, que las cepas parentales de las que proceden, incrementando así la productividad del proceso fermentativo para la producción de ABE.

Estos mutantes son capaces además de mantener un pH más alto, dentro del rango ácido, durante su crecimiento. Es decir, estos mutantes presentan una menor acidez o acidogénesis que sus cepas parentales, por lo que reducen el riesgo de que se produzca el efecto conocido como “acid crash” que hace que las células dejen de producir butanol y empiecen a esporular. Además, el que causen menos acidez en el medio de cultivo significa que pueden estar derivando los ácidos hacia disolventes más rápidamente, de modo que pueden producir una mayor cantidad de éstos (butanol, preferiblemente ABE) en menor tiempo.

Los mutantes de la invención pueden además utilizar como fuente de carbono para la fermentación tanto azúcares C6 (por ejemplo, glucosa) como C5 (por ejemplo, xilosa y arabinosa), y los consumen más eficientemente que sus correspondientes cepas parentales. Estos mutantes pueden incluso, bajo ciertas condiciones, consumir ambos tipos de azúcares, C5 y C6, simultáneamente. Asimismo, pueden utilizar sustratos complejos de interés industrial, como por ejemplo desechos urbanos o vegetales, con lo que favorecen el reciclado y aprovechamiento de los productos de deshecho derivados de otras industrias o de la actividad urbana.

A estas tres cepas mutantes se les ha denominado en la presente invención BP11, BP25 y BP31, donde la primera cepa procede de la cepa parental *C. beijerinckii* NCIMB 8052 y las dos últimas cepas proceden de la cepa parental *C. beijerinckii* BA101. Estos tres mutantes descritos en la invención suponen, por tanto, una solución a la necesidad de disponer de microorganismos solventogénicos mejorados que

presenten una eficiencia y rendimiento incrementados en la producción de butanol por fermentación a partir de diferentes tipos de carbohidratos.

Se propone, por consiguiente, en la presente invención el empleo de estos tres mutantes para la producción de disolventes mediante fermentación anaeróbica, preferiblemente para la producción de butanol, más preferiblemente para la producción de acetona, butanol y etanol (ABE).

Para la generación de los tres mutantes concretos descritos en la presente invención, los inventores han desarrollado y puesto a punto un procedimiento de mutagénesis inducida en células parentales de *C. beijerinckii*. La optimización de este procedimiento pasa, entre otros factores, por identificar las células parentales de partida adecuadas, el agente mutagénico apropiado y por definir la concentración adecuada del mismo para lograr una proporción óptima de mutagénesis/muerte celular en *C. beijerinckii*. Otros mutantes de la especie *C. beijerinckii* que presenten baja acidogénesis y/o capacidad mejorada de producción de butanol distintos a los descritos en la presente invención podrían obtenerse también por medio de este procedimiento.

Por ello, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un método para la obtención o generación de cepas mutantes de la especie *C. beijerinckii* con baja acidogénesis y/o con capacidad mejorada de producción de butanol, preferiblemente de ABE, a partir de carbohidratos mediante fermentación anaeróbica, donde dicho método comprende las etapas de:

a. inducir mutagénesis química en una célula de *C. beijerinckii*, preferiblemente en la cepa *C. beijerinckii* NCIMB 8052 o *C. beijerinckii* BA101, más preferiblemente en *C. beijerinckii* NCIMB 8052, y
b. seleccionar aquellos mutantes producidos tras la etapa (a) que presentan baja acidogénesis, donde dicha selección se realiza mediante el cultivo de los mutantes en placas selectivas que comprenden un indicador de pH,

donde la mutagénesis química de la etapa (a) se realiza incubando la célula, o un cultivo celular comprendiendo la misma, con el mutágeno químico etil-metano-sulfonato (EMS) a una concentración de, preferiblemente 15 μl de EMS por ml de cultivo, durante preferiblemente 1 hora, y

donde el indicador de pH de la etapa (b) es, preferiblemente, Bromocresol Púrpura.

Se entiende por mutantes “de baja o menor acidez o acidogénesis” aquellas células de la especie *C. beijerinckii* que bajan el pH del medio de cultivo durante su crecimiento en menor medida que la cepa parental de la que proceden, transcurrido el mismo o similar periodo de tiempo en cultivo, en presencia de un medio de cultivo de idéntica o similar composición y bajo unas condiciones de cultivo (Tª, pH al inicio del cultivo, anaerobiosis, agitación, volumen del medio, saturación, densidad óptica, etc.) idénticas o similares. Preferiblemente, los mutantes que presentan “baja o menor acidez o acidogénesis” de acuerdo con la invención son aquellos que mantienen el pH del medio de cultivo por encima de 5 durante su crecimiento. Esta propiedad de las células se puede determinar, por ejemplo pero sin limitarnos, mediante el cultivo *in vitro* de las mismas en placas selectivas con indicador de pH como se ha indicado más arriba.

Se entiende por mutantes con “capacidad mejorada de producción de butanol” aquellos mutantes que producen más cantidad de butanol, preferiblemente en g/l, que la cepa parental de *C. beijerinckii* de la que proceden, transcurrido el mismo o similar periodo de tiempo de fermentación, bajo las mismas o similares condiciones de fermentación (Tª, pH, anaerobiosis, agitación, volumen del medio, saturación, densidad óptica, etc.) y en presencia de un medio de cultivo comprendiendo una fuente de carbono o carbohidratos de la misma o similar composición. Así, los mutantes con capacidad mejorada de producción de butanol dan lugar a un mayor rendimiento del proceso de fermentación para la producción de butanol, en comparación con el rendimiento obtenido cuando se emplea la cepa parental de *C. beijerinckii.* Los mutantes con capacidad mejorada de producción de butanol utilizan por tanto más eficientemente la fuente de carbono empleada como sustrato. La eficiencia incrementada o capacidad mejorada de producción de butanol se puede determinar mediante una variedad de métodos conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarnos, midiendo la concentración (peso/volumen) del disolvente producido en el medio de fermentación, o el rendimiento (peso/peso) del disolvente por cantidad de sustrato, o el ratio de formación de disolvente (peso/volumen/tiempo). A modo de ejemplo, estas medidas de productos o disolventes se pueden llevar a cabo por HPLC, espectrometría de masas, inmunoensayo, ensayos de actividad o cualquier otro método conocido por los expertos en la materia.

El razonamiento para asumir que los mutantes son hiper- o sobre-productores de butanol o que presentan capacidad mejorada de producción de butanol en base a la baja acidez que provocan en el medio de cultivo es que las células que acidifican menos el medio pueden estar derivando los ácidos hacia disolventes más rápidamente, de modo que pueden producir una mayor cantidad de éstos (butanol, preferiblemente ABE) en menor tiempo.

El “Bromocresol Púrpura”, preferiblemente empleado en la etapa (b) de este método de generación de mutantes, es un indicador orgánico para la valoración ácido-base cuyo intervalo de transición de pH oscila entre 5,2 y 6,8, virando de amarillo a púrpura en el rango mencionado. Así, es morado a pH básico y se vuelve amarillo a pH ácido. De este modo, las células cultivadas en presencia de este compuesto que más acidifican el medio forman colonias con un halo amarillo alrededor, mientras que las células menos ácidas (es decir, aquellas que mantienen el medio a un mayor pH, preferiblemente dentro del rango ácido) no cambian el color de las placas, manteniéndolas moradas. Por lo tanto, cuando se usa este compuesto en la etapa (b) del método descrito, se seleccionan aquellos mutantes que presentan un menor halo amarillo o que carecen de él, manteniendo el color morado de las placas de cultivo.

Cuando se emplea Bromocresol Púrpura como indicador de pH para la selección de la etapa (b), las células no se pueden sembrar directamente en dicho medio selectivo debido a que su toxicidad no permite el crecimiento de colonias saludables. Por ello, en primer lugar los mutantes obtenidos tras la etapa (a) se deben sembrar en un medio de cultivo estándar para el crecimiento de *C. beijerinckii,* por ejemplo, pero sin limitarnos en un medio comprendiendo extracto de levadura, triptona, acetato de amonio, acetato de magnesio, sulfato de hierro, fosfato potásico y/o sulfato de magnesio, y una fuente de carbono, por ejemplo, glucosa. Así, se obtienen colonias con suficiente biomasa para resembrar a continuación las placas selectivas. Posteriormente, los mutantes así crecidos se aíslan y se resiembran en las placas comprendiendo Bromocresol Púrpura para finalmente aislar y seleccionar aquellos mutantes que generen un menor halo amarillo en relación a su cepa parental o una ausencia del mismo.

El término “mutágeno químico” se refiere a un agente químico que incrementa la frecuencia de mutación por encima de la tasa de mutación espontánea.

Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa mutante de la especie *C. beijerinckii* con baja acidogénesis o acidez y/o con capacidad mejorada de producción de butanol, preferiblemente de ABE, a partir de carbohidratos mediante fermentación anaeróbica, producida, obtenible u obtenida por el método de generación de mutantes descrito anteriormente en la presente invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa o célula mutante de *C. beijerinckii* (preferiblemente obtenida por mutagénesis química de la cepa *C. beijerinckii* NCIMB 8052) caracterizada porque dicha cepa mutante comprende en su genoma las siguientes mutaciones con respecto al genoma de la cepa parental *C. beijerinckii* NCIMB 8052:

a. T en lugar de C en la posición 82 del gen Cbei_0583 (SEQ ID NO: 26), el cual comprende las posiciones 693796 a 694347 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
b. A en lugar de G en la posición 1108 del gen Cbei_1540 (SEQ ID NO: 27), el cual comprende las posiciones 1814444 a 1816660 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
c. T en lugar de G en la posición 255 del gen Cbei_2475 (SEQ ID NO: 28), el cual comprende las posiciones 2865706 a 2866320 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
d. T en lugar de G en la posición 740 del gen Cbei_2489 (SEQ ID NO: 29), el cual comprende las posiciones 2884426 a 2885343 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
e. AA en lugar de GT en las posiciones 506 y 507 del gen Cbei_R0112 (SEQ ID NO: 30), el cual comprende las posiciones 5742945 a 5741441 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
f. T en lugar de C en la posición 490 del gen Cbei_R0112 (SEQ ID NO: 30), el cual comprende las posiciones 5742945 a 5741441 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052, y
g. C en lugar de A en la posición 703 del gen Cbei_5101 (SEQ ID NO: 31), el cual comprende las posiciones 5998873 a 5999637 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052.

De ahora en adelante se hará referencia a esta cepa como “mutante BP11”, y comprende todas las mutaciones indicadas en (a) a (g) arriba. Este mutante ha sido

preferiblemente obtenido por el método de generación de mutantes anteriormente descrito.

Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa o célula mutante de *C. beijerinckii* (preferiblemente obtenida por mutagénesis química de la cepa *C. beijerinckii* BA101) caracterizada porque dicha cepa mutante comprende en su genoma las siguientes mutaciones con respecto al genoma de la cepa parental *C. beijerinckii* BA101:

a. A en lugar de G en la posición 567 del gen Cbei_0436 (SEQ ID NO: 32), el cual comprende las posiciones 528599 a 530101 del genoma de *C. beijerinckii* BA101,
b. T en lugar de C en la posición 391 del gen Cbei_0529 (SEQ ID NO: 33), el cual comprende las posiciones 636881 a 637588 del genoma de *C. beijerinckii* BA101,
c. A en lugar de G en la posición 14 del gen Cbei_1397 (SEQ ID NO: 34), el cual comprende las posiciones 1644433 a 1644753 del genoma de *C. beijerinckii* BA101,
d. A en lugar de G en la posición 435 del gen Cbei_2084 (SEQ ID NO: 35), el cual comprende las posiciones 2427766 a 2428383 del genoma de *C. beijerinckii* BA101,
e. C en lugar de T en la posición 111 del gen Cbei_2113 (SEQ ID NO: 36), el cual comprende las posiciones 2461021 a 2461281 del genoma de *C. beijerinckii* BA101, y
f. T en lugar de G en la posición 28 del gen Cbei_2475 (SEQ ID NO: 37), el cual comprende las posiciones 2865706 a 2866320 del genoma de *C. beijerinckii* BA101.

De ahora en adelante se hará referencia a esta cepa como “mutante BP31”, y comprende todas las mutaciones indicadas en (a) a (f) arriba. Este mutante ha sido preferiblemente obtenido por el método de generación de mutantes anteriormente descrito.

No obstante, de entre todos los mutantes descritos en la presente invención el llamado “mutante BP25” es el preferido, ya que presenta unos rendimientos de producción de ABE, especialmente de butanol, mayores que los demás mutantes en los sustratos ensayados. Por ejemplo, la Fig. 3A muestra que el mutante BP25 produce más butanol

en presencia de glucosa, no solo en comparación con su cepa parental, sino también en comparación con el mutante BP31 que también procede de la misma cepa parental. La Fig. 7 muestra que el mutante BP25 produce butanol más rápidamente en presencia de un sustrato complejo, como es un hidrolizado de residuos urbanos, que el mutante BP31 que no es capaz de mejorar la producción de butanol con respecto a su cepa parental en presencia de este sustrato concreto. La Fig. 10 muestra que el mutante BP25 es capaz de producir más butanol en presencia de hidrolizado de paja de maíz que el mutante BP31. Por último, la Fig. 12 muestra que, aunque el mutante BP11 inicialmente consume arabinosa más rápidamente, a partir de las 48h frena su consumo de arabinosa y la producción de butanol, al contrario que el mutante BP25 que sigue produciendo butanol durante las 72h que se siguió el análisis de la fermentación, lo que significa que el mutante BP25 alcanza un mayor rendimiento final de producción, consumiendo más arabinosa en el proceso.

Además, el mutante BP25 presenta una capacidad mejorada de producción de butanol en comparación con su cepa parental, en diversos sustratos. Por ejemplo, la Fig. 3A demuestra una mayor producción de butanol por parte de este mutante en presencia de glucosa en relación con su parental *C. beijerinckii* BA101. La Fig. 4A muestra que este mutante produce butanol más rápidamente, y por tanto más eficientemente, en presencia de maíz molido que su cepa parental, alcanzando unos niveles elevados de butanol en un menor tiempo. Las Fig. 7A y 10 muestran que BP25 produce mayores niveles de butanol en presencia de hidrolizado de residuos sólidos urbanos y de hidrolizado de paja de maíz, respectivamente, que su cepa parental. La Fig. 11B demuestra una mayor producción de butanol y un consumo más eficiente y rápido de arabinosa y glucosa por parte de BP25 en presencia de un medio comprendiendo estos dos azúcares en comparación con su cepa parental. La Fig. 12 demuestra una mayor producción de butanol por parte de BP25 en presencia de un medio comprendiendo arabinosa por encima de la obtenida con los otros dos mutantes (BP11 y BP31) y con la cepa parental *C. beijerinckii* BA101.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una cepa o célula mutante de *C. beijerinckii* (preferiblemente obtenida por mutagénesis química de la cepa *C. beijerinckii* BA101) caracterizada porque dicha cepa mutante comprende en su genoma las siguientes mutaciones con respecto al genoma de la cepa parental *C. beijerinckii* NCIMB 8052:

a. A en lugar de G en la posición 235 del gen Cbei_0083 (SEQ ID NO: 1), el cual comprende las posiciones 107490 a 108176 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
b. T en lugar de C en la posición 151 del gen Cbei_0769 (SEQ ID NO: 2), el cual comprende las posiciones 935299 a 936627 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
c. A en lugar de G en la posición 54 del gen Cbei_R0027 (SEQ ID NO: 3), el cual comprende las posiciones 144366 a 147274 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
d. A en lugar de G en la posición 186 del gen Cbei_0123 (SEQ ID NO: 4), el cual comprende las posiciones 159137 a 161611 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
e. A en lugar de G en la posición 201 del gen Cbei_0196 (SEQ ID NO: 5), el cual comprende las posiciones 222653 a 224272 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
f. A en lugar de G en la posición 871 del gen Cbei_0316 (SEQ ID NO: 6), el cual comprende las posiciones 381944 a 382879 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
g. T en lugar de C en la posición 731 del gen Cbei_1206 (SEQ ID NO: 7), el cual comprende las posiciones 1427189 a 1428124 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
h. T en lugar de C en la posición 437 del gen Cbei_1472 (SEQ ID NO: 8), el cual comprende las posiciones 1734309 a 1734908 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
i. C en lugar de T en la posición 968 del gen Cbei_1854 (SEQ ID NO: 9), el cual comprende las posiciones 2148319 a 2150055 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
j. A en lugar de C en la posición 139 del gen Cbei_1935 (SEQ ID NO: 10), el cual comprende las posiciones 2234469 a 2235623 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
k. T en lugar de G en la posición 31 del gen Cbei_1975 (SEQ ID NO: 11), el cual comprende las posiciones 2295746 a 2297452 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,
l. T en lugar de G en la posición 2113 del gen Cbei_3078 (SEQ ID NO: 12), el cual comprende las posiciones 3591316 a 3593580 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

m. G en lugar de A en la posición 88 del gen Cbei_3625 (SEQ ID NO: 13), el cual comprende las posiciones 4172987 a 4174981 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

n. T en lugar de C en la posición 160 del gen Cbei_3757 (SEQ ID NO: 14), el cual comprende las posiciones 4310570 a 4310908 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

o. A en lugar de G en la posición 325 del gen Cbei_4026 (SEQ ID NO: 15), el cual comprende las posiciones 4626006 a 4627097 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

p. A en lugar de G en la posición 1079 del gen Cbei_4207 (SEQ ID NO: 16), el cual comprende las posiciones 4851118 a 4852431 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

q. T en lugar de G en la posición 628 del gen Cbei_4256 (SEQ ID NO: 17), el cual comprende las posiciones 4915930 a 4916709 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

r. deleción de G en la posición 672 del gen Cbei_4308 (SEQ ID NO: 18), el cual comprende las posiciones 4961979 a 4962692 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

s. T en lugar de G en la posición 1766 del gen Cbei_4400 (SEQ ID NO: 19), el cual comprende las posiciones 5075330 a 5077168 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

t. A en lugar de G en la posición 1732 del gen Cbei_4548 (SEQ ID NO: 20), el cual comprende las posiciones 5265930 a 5267861 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

u. A en lugar de G en la posición 1465 del gen Cbei_4691 (SEQ ID NO: 21), el cual comprende las posiciones 5449160 a 5450662 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

v. A en lugar de G en la posición 997 del gen Cbei_4699 (SEQ ID NO: 22), el cual comprende las posiciones 5462404 a 5464674 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

w. C en lugar de T en la posición 101 del gen Cbei_4761 (SEQ ID NO: 23), el cual comprende las posiciones 5555079 a 5556296 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052,

x. A en lugar de G en la posición 27 del gen Cbei_4865 (SEQ ID NO: 24), el cual comprende las posiciones 5699972 a 5701330 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052, y

y. A en lugar de G en la posición 708 del gen Cbei_4918 (SEQ ID NO: 25), el cual comprende las posiciones 5785244 a 5787250 del genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052.

De ahora en adelante se hará referencia a esta cepa como “mutante BP25”, y comprende todas las mutaciones indicadas en (a) a (y) arriba. Este mutante ha sido preferiblemente obtenido por el método de generación de mutantes anteriormente descrito. Este mutante BP25 además ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino 9, 46980 Paterna (Valencia, España), bajo el número de acceso CECT 9306 en fecha 21.03.2017. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, esta cepa mutante de *Clostridium beijerinckii* es la depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso CECT 9306.

La cepa *C. beijerinckii* BA101 es un mutante hiperproductor de butanol obtenido mediante mutagénesis a partir de la cepa silvestre *C. beijerinckii* NCIMB 8052. Dicha cepa mutante BA101 comprende por tanto el genoma de la cepa silvestre NCIMB 8052 además de las mutaciones indicadas arriba para los genes Cbei_0769, Cbei_1854, Cbei_1935, Cbei_1975, Cbei_3078, Cbei_4308, Cbei_4400 y Cbei_4761. Por ello, de todas las mutaciones indicadas en (a) a (y) arriba, las mutaciones en estos genes concretos son compartidas entre el mutante BP25 y la cepa *C. beijerinckii* BA101.

El término “mutantes de la invención”, tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier cepa mutante de la especie *C. beijerinckii* producida, obtenible u obtenida por el método de generación de mutantes descrito anteriormente en la presente invención, preferiblemente a los mutantes BP11, BP31 y BP25.

La cepa parental *C. beijerinckii* NCIMB 8052 está disponible en, por ejemplo aunque sin limitarnos, la autoridad de depósito internacional *National Collection of Industrial and Marine Bacteria* (NCIMB), 23 St Machar Drive, Aberdeen, Ab2 1RY, Escocia, Inglaterra. El genoma completo de esta cepa está descrito, por ejemplo, en el GenBank bajo el número de acceso CP000721.1.

La cepa parental *C. beijerinckii* BA101 se puede preparar como se describe en Annous, B. A., *et al*., Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57: 2544-2548. El genoma de esta cepa es el genoma de *C. beijerinckii* NCIMB 8052 que además comprende las

mutaciones indicadas en la presente invención en los genes Cbei_0769, Cbei_1854, Cbei_1935, Cbei_1975, Cbei_3078, Cbei_4308, Cbei_4400 y Cbei_4761.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los mutantes de la invención, preferiblemente de los mutantes BP11, BP31 y BP25, más preferiblemente del mutante BP25, para la producción de disolventes.

Se entiende por “disolventes” cualquier disolvente conocido en el estado del arte, incluyendo mezclas de acetona, butanol, isopropanol y/o etanol. En una realización preferida, el disolvente es butanol, es decir, el principal componente de la mezcla de disolventes obtenida es el butanol. En una realización más preferida, los disolventes son acetona, butanol y etanol (ABE), es decir, los disolventes producidos comprenden una mezcla de estos tres. Se incluye dentro del alcance de la presente invención la producción de cualquier combinación o proporción de acetona, butanol y/o etanol mediante el empleo de los mutantes de la invención.

En otra realización preferida, la producción de disolventes por parte de los mutantes de la invención se lleva a cabo por medio de un proceso de fermentación anaeróbica en presencia de un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono o carbohidratos.

“Medios de cultivo” adecuados para ser empleados en la presente invención son todos aquellos conocidos en el estado de la técnica como apropiados para el crecimiento, actividad fermentadora y mantenimiento en cultivo de cepas de *C. beijerinckii*. Ejemplos de estos medios de cultivo son, por ejemplo, aunque sin limitarnos, P2, TGY, PT ó TYA, preferiblemente TYA. Preferiblemente, el medio de cultivo además comprende al menos un ácido orgánico, como por ejemplo acetato y/o butirato. Este ácido orgánico puede proceder de la fase acidogénica del microorganismo empleado en la fermentación o bien puede ser añadido externamente. Preferiblemente, la cantidad de ácido orgánico añadida al cultivo está entre 20 mM y 80 mM. La adición de uno o más ácidos orgánicos incrementa la cantidad de disolventes recuperados tras la fermentación. Además, previene la degeneración de la cepa durante el proceso fermentativo, favoreciendo su estabilidad y evitando la degeneración del cultivo. El medio de cultivo puede comprender además sales y/o tampones.

El medio de cultivo está, además, suplementado con una fuente de carbono, la cual puede comprender, por ejemplo pero sin limitarnos, azúcares C6 (como glucosa), azúcares C5 (como xilosa y/o arabinosa), o una mezcla de ambos tipos de azúcares. En una realización preferida, la fuente de carbono comprende glucosa, maltodextrina, xilobiosa, celobiosa, xilosa y/o arabinosa, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, la fuente de carbono comprende glucosa, celobiosa, xilosa y/o arabinosa. Más preferiblemente, la fuente de carbono comprende xilosa, glucosa o arabinosa o cualquiera de sus combinaciones, aún más preferiblemente comprende glucosa y arabinosa, ya que los mutantes de la presente invención, especialmente el mutante BP25, son particularmente útiles para consumir estos dos azúcares y en el caso de BP25 incluso cuando ambos están presentes conjuntamente en el medio (ver Figs. 11B y 12), produciendo así altas cantidades de butanol. En otra realización preferida, la fuente de carbono comprende xilosa y glucosa.

Ejemplos de fuentes de carbono que podrían emplearse en la presente invención son, aunque sin limitarnos, productos de desecho de la industria maderera, forestal, del papel, agrícola, ganadera, pesquera, azucarera, acuícola, procesado de arroz o similares, así como productos de desecho sólidos urbanos. Por tanto, la fuente de carbohidratos pueden ser productos de desecho urbanos, preferiblemente productos de desecho orgánicos urbanos o “waste syrup”, o biomasa vegetal, como por ejemplo maíz, caña de azúcar, almidón, trigo, soja, cáscaras de frutos como nueces, almendras o frutos grasos como el fruto del árbol de palma o el aguacate, etc. En otra realización preferida la fuente de carbono se selecciona de la lista que consiste en: glucosa, maíz molido, hidrolizado de residuos orgánicos urbanos, o hidrolizado de biomasa vegetal.

Cuando se emplea glucosa como fuente de carbono en la presente invención, ésta se encuentra en el medio de cultivo en una concentración de entre, preferiblemente, 0,5 y 100 g/l, más preferiblemente 60 g/l.

Cuando se emplea maíz molido o “corn mash” como fuente de carbono en la presente invención, éste se encuentra en el medio de cultivo en una concentración de, preferiblemente, entre el 0,1 y 50 % (v/v), más preferiblemente el 25% (v/v), del volumen total del medio. Preferiblemente, el maíz molido es tratado previamente con enzimas hidrolasas, preferiblemente amilasas, para incrementar la glucosa soluble y

posteriormente se clarifica (centrifuga) antes de ser añadido al medio de cultivo como fuente de carbono para la fermentación.

En una realización más preferida, la fuente de carbono es hidrolizado de residuos orgánicos urbanos. Cuando se emplea hidrolizado de residuos orgánicos urbanos como fuente de carbono en la presente invención, éste se encuentra en el medio de cultivo en una concentración de entre el 0,1 y 25 % (v/v), preferiblemente el 5% (v/v) o inferior, del volumen total del medio. Preferiblemente, el “hidrolizado de residuos orgánicos urbanos” es el producto resultante de la hidrólisis enzimática de la parte orgánica de los residuos urbanos sólidos.

En otra realización preferida, el hidrolizado de biomasa vegetal es hidrolizado de paja de maíz o “corn stover”. Cuando se emplea hidrolizado de paja de maíz como fuente de carbono en la presente invención, éste se encuentra en el medio de cultivo en una concentración de entre el 0,1 y 25 % (v/v), preferiblemente el 16% (v/v) o inferior, del volumen total del medio. Preferiblemente, el “hidrolizado de paja de maíz” es el producto resultante de la hidrólisis enzimática de la paja de maíz sometida a un pre-tratamiento preferiblemente ácido y de explosión de vapor.

Preferiblemente, en la presente invención, la fuente de carbono comprendida en el medio de cultivo es pretratada antes de ser añadida a dicho medio. El objetivo es transformarla en una forma más accesible para el proceso fermentativo. El pretratamiento utiliza diversas técnicas que incluyen, pero no se limitan a, explosión de la fibra con amonio, tratamiento químico, explosión con vapor a elevadas temperaturas para alterar la estructura de la biomasa celulósica y volver la celulosa más accesible, hidrólisis ácida y/o hidrólisis enzimática, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, el medio de cultivo además comprende uno o varios de los siguientes elementos: extracto de levadura, triptona, acetato de amonio, acetato de magnesio, sulfato de hierro, fosfato potásico y/o sulfato de magnesio.

El volumen de medio de cultivo empleado para la fermentación en la presente invención está, preferiblemente, entre el 10 y 90 % de la capacidad del reactor.
La cantidad de cepa mutante empleada para la fermentación en la presente invención está, preferiblemente, entre 10^3 y 10^{10} células / ml, más preferiblemente entre 10^7 y 10^8 células / ml.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de disolventes, de ahora en adelante “método de la invención para la producción de disolventes”, que comprende las siguientes etapas:

a. fermentar la cepa mutante de la invención, preferiblemente BP11, BP31 o BP25, más preferiblemente BP25, en presencia de un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono, y
b. recuperar del medio de cultivo los disolventes producidos por la cepa.

La fermentación de la etapa (a) es una fermentación anaeróbica, es decir, se lleva a cabo en ausencia de oxígeno. Para asegurar la anaerobiosis se puede, por ejemplo pero sin limitar a este método, gasificar el medio de cultivo con N_2.

El medio de cultivo adecuado para la etapa de fermentación, así como la fuente de carbono comprendida en el mismo, son aquellos descritos anteriormente como útiles para la presente invención.

Esta fermentación de la etapa (a) puede darse, por ejemplo pero sin limitarnos, en batch, continuo, discontinuo, feed-batch o una combinación de al menos dos de estos procesos.

Durante la fermentación se pueden monitorizar y controlar las condiciones del proceso, como por ejemplo volumen, O_2 disuelto, Tª, pH, concentración de la cepa productora y/o concentración de carbohidratos presentes en el medio, y se pueden ir adicionando o eliminando cantidades de cepa productora, de agentes que controlen el pH, de medio de cultivo y/o de carbohidratos, para mantener el pH y las concentraciones deseadas de cada uno de estos elementos durante el proceso fermentativo. Así, preferiblemente, la fermentación de la etapa (a) tiene lugar en el interior de un bioreactor, preferiblemente de tamaño industrial, el cual más preferiblemente lleva acoplados medios y sistemas adecuados para la monitorización y suministro de, por ejemplo, medio de cultivo, carbohidratos, cepa productora y/o agua, a la reacción. Estos medios adecuados son, por ejemplo, válvulas y tuberías o cañerías conectadas desde el bioreactor, donde está teniendo lugar la reacción de fermentación, a uno o varios tanques de almacenamiento o, en el caso del suministro de la cepa productora, a uno o varios tanques de cultivo donde se mantiene una biomasa adecuada de la

cepa productora en crecimiento. El bioreactor donde se está produciendo la fermentación puede, además, llevar acoplados sistemas o dispositivos para el control del volumen de reacción, O_2, pH y/o Tª del medio de fermentación.

En una realización preferida del método para la producción de disolventes de la invención, la fermentación de la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 y 40 ºC, preferiblemente de 37 ºC, durante un tiempo de entre 30 y 275 horas, preferiblemente durante 72h, más preferiblemente en agitación. Esta agitación es, preferiblemente, baja agitación, es decir, alrededor de 50 rpm. Más preferiblemente, el pH durante la etapa de fermentación se mantiene en o por encima de 5, aún más preferiblemente el pH es de entre 5,5 y 6.

En otra realización preferida de este método, el disolvente producido es butanol. En una realización más preferida, los disolventes producidos son acetona, butanol y etanol (ABE).

En otra realización preferida, la fuente de carbono comprendida en el medio de cultivo empleado en este método de la invención comprende glucosa, maltodextrina, xilobiosa, celobiosa, xilosa y/o arabinosa, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, la fuente de carbono comprende glucosa, celobiosa, xilosa y/o arabinosa. Más preferiblemente, la fuente de carbono comprende xilosa, glucosa o arabinosa o cualquiera de sus combinaciones, aún más preferiblemente comprende glucosa y arabinosa. En otra realización preferida, la fuente de carbono comprende xilosa y glucosa. En una realización particular, la arabinosa es L-arabinosa y la xilosa es D-xilosa.

En otra realización preferida, la fuente de carbono comprendida en el medio de cultivo empleado en este método de la invención se selecciona de la lista que consiste en: glucosa, maíz molido, hidrolizado de residuos sólidos orgánicos urbanos, o hidrolizado de biomasa vegetal, tal y como se han descrito anteriormente en esta memoria. Preferiblemente, la fuente de carbono es hidrolizado de residuos sólidos orgánicos urbanos. En una realización más preferida, el hidrolizado de biomasa vegetal es hidrolizado de paja de maíz.
En otra realización preferida, la concentración de hidrolizado de residuos sólidos orgánicos urbanos en el medio de cultivo empleado en este método de la invención es del 5% (v/v) o inferior.

En otra realización preferida, la concentración de hidrolizado de paja de maíz en el medio de cultivo empleado en este método de la invención es del 16% (v/v) o inferior.

En otra realización preferida, el medio de cultivo empleado en este método de la invención además comprende al menos uno de los siguientes elementos: extracto de levadura, triptona, acetato de amonio, acetato de magnesio, sulfato de hierro, fosfato potásico y/o sulfato de magnesio.

Uno de los problemas asociados a la fermentación ABE por *C. beijerinckii* es la toxicidad por butanol en el cultivo. Esta toxicidad requiere la eliminación continua de los productos tóxicos durante el proceso de fermentación para conseguir una máxima producción de disolventes. Así, el bioreactor en el que está teniendo lugar el método para la producción de disolventes de la invención preferiblemente comprende además uno o varios sistemas acoplados para la extracción de los disolventes producidos, preferiblemente butanol, mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, pervaporación, perstracción, destilación, extracción de solventes, osmosis reversa, adsorción, separación por membranas, extracción líquido-líquido, corriente de gas, gas de barrido o similares.

El término “recuperación”, tal y como se emplea en la etapa (b) del método para la producción de disolventes de la invención, se refiere a la recogida de los disolventes obtenidos después de la fermentación de la etapa (a). Dicha recuperación se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo métodos mecánicos y/o manuales, preferiblemente los descritos en el párrafo anterior.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. **Análisis de la mortalidad de *C. beijerinckii* en presencia de diferentes concentraciones de etil-metanosulfonato (EMS).** EMS es el agente químico mutagénico utilizado para el aislamiento de mutantes de *C. beijerinckii*. La mortalidad se determina mediante cuantificación del número de unidades formadoras de colonia (CFUs) por mililitro de cultivo. Las células se cultivaron en botella, en condiciones de anaerobiosis. El medio utilizado para el cultivo fue TYA-glucosa, gasificado previamente con N_2 para asegurar la anaerobiosis. Un cultivo saturado se utilizó para inocular una botella a una OD_{660}= 0,1, y el cultivo se incubó durante unas 5-6 horas hasta que se alcanzó una OD_{660}=1. En este momento, 1 ml de cultivo se recogió y se centrifugó, decantándose el sobrenadante. Las células recogidas se trataron con diferentes concentraciones de EMS durante 1 hora. Tras el tratamiento, las células se lavaron dos veces con medio TYA, para finalmente crecerse en medio fresco (TYA-glucosa) durante dos horas, y permitir la recuperación de las células. Tras este tiempo las células se sembraron (tras diluir el cultivo adecuadamente) para determinar el número de CFUs en el cultivo. Este dato (CFUs/ml) se representó en función de la cantidad de EMS utilizada, dando lugar a la gráfica que se presenta en esta figura. Como se observa, 15 µl de EMS causa una mortalidad del 90%, y fue ésta la cantidad de EMS que se utilizó en los distintos ensayos de mutagénesis.

FIG. 2. Selección de mutantes en placas de Bromocresol púrpura. Un cultivo de *C. beijerinckii* fue tratado con el mutágeno EMS y, tras la recuperación del cultivo, las células se diluyeron convenientemente y se sembraron en placas de TYA-glucosa. Las células se cultivaron durante dos días, para asegurar colonias con suficiente biomasa para re-sembrar en placas de Bromocresol púrpura. Los mutantes que acidifican menos el medio durante el crecimiento forman colonias carentes del característico halo amarillo que muestra una colonia de *C. beijerinckii* (tanto de la cepa 8052 como de BA101). La figura muestra un ejemplo de una de las placas de Bromocresol Púrpura empleada en la selección, y se señala, marcado con asterisco, un mutante que muestra un fenotipo de baja acidez.

FIG. 3. Producción de butanol por mutantes de baja acidez. A) Perfil de producción de dos mutantes de baja acidez (BP25 y BP31) y su cepa parental correspondiente (BA101, wt) en medio TYA-glucosa. El cultivo se realizó en anaerobiosis, en botella, sin control de pH. Los metabolitos (glucosa, butanol y butirato) analizados en el medio de cultivo se representan en función del tiempo para las tres estirpes estudiadas. Como se observa en la figura, los dos mutantes, BP25 y BP31, producen más butanol

y consumen más glucosa que su cepa parental. **B)** Perfil de producción de la cepa NCIMB 8052 y el mutante de baja acidez aislado desde ésta, BP11. Las fermentaciones se realizan en medio TYA-glucosa, anaerobiosis y en botella sin control de pH. En estas condiciones, la cepa parental no produce butanol, mientras que el mutante aislado sí es capaz de producirlo.

FIG. 4. Producción de butanol desde maíz molido (corn mash). A) El mutante BP25 y su cepa parental BA101 producen butanol desde maíz molido y clarificado. Las fermentaciones se llevaron a cabo en reactores de 1 l de volumen, con 500 ml de medio TYA con un 25% de maíz molido clarificado como fuente de azúcares. El pH se mantuvo por encima de 5,5 durante la fermentación con NH_4^+ diluido. La producción de butanol del mutante es mayor en las primeras 24 horas, incrementándose la productividad. La producción al final de la fermentación es similar para ambas cepas. **B)** El mutante BP11 se ensayó, frente a su cepa parental, en las condiciones descritas en A). El mutante presenta mayor productividad y producción final de butanol.

FIG. 5. Crecimiento de *C. beijerinckii* BA101 en hidrolizado de residuos sólidos urbanos (waste syrup). Se monitorizó el crecimiento de las células a lo largo del tiempo en un medio TYA con distintas concentraciones de hidrolizado de residuos sólidos urbanos. Como se observa en la figura, *C. beijerinckii* puede crecer en un medio conteniendo hasta un 5% del sustrato complejo. Observamos también que incrementar la concentración de hidrolizado de residuo sólido urbano hasta un 10% es letal para las células, que no forman colonias tras las primeras 12 horas de cultivo. TYA(-): medio TYA sin glucosa.

FIG. 6. Producción de butanol utilizando hidrolizado de residuos sólidos urbanos como fuente de carbono. La producción de butanol de la estirpe BA101 en un medio TYA con distintas concentraciones de hidrolizado de residuo sólido urbano se analizó en botellas de 50 ml de volumen de trabajo. Como se observa en la figura, BA101 puede producir butanol en este medio de cultivo, siendo máxima la producción en el medio con el 5% de hidrolizado de residuo sólido urbano. Prácticamente toda la glucosa presente en este medio se consume en las primeras 50 horas, con una alta productividad en referencia a la producción de butanol desde esta glucosa. No se observa producción en medio TYA sin glucosa. Los resultados mostrados son la media de dos experimentos independientes, con barras de error representando la desviación estándar.

FIG. 7. Producción de butanol en un medio conteniendo hidrolizado de residuos sólidos urbanos y las sales presentes en el TYA. Se ensayó la producción en un nuevo medio de cultivo que contiene únicamente las sales presentes en el TYA (acetato de magnesio, sulfato de hierro, fosfato potásico y sulfato de magnesio) y 5% de hidrolizado de residuo sólido urbano como fuente de carbono. Las tres cepas ensayadas producen butanol en este medio, y la producción del mutante BP25 es mejor que la de la cepa parental BA101 **(A).** Sin embargo, la producción del mutante BP31 no mejora la producción de la cepa parental en este medio **(B).** Los datos son la media de dos experimentos independientes.

FIG. 8. Producción de butanol del mutante BP11 en un medio conteniendo hidrolizado de residuo sólido urbano (waste syrup). La producción de butanol del mutante BP11 se analizó en un medio que contenía *waste syrup* como fuente de carbono. La concentración de hidrolizado de residuo sólido urbano presente es de aproximadamente el 1%, con una concentración de glucosa inicial rondando los 4 g/l **(A).** Las células se cultivaron a saturación en medio TYA con glucosa, y este cultivo se utilizó para inocular botellas de medio conteniendo TYA y el hidrolizado de residuo sólido urbano como fuente de carbono. Como se observa en la figura, el mutante BP11 produce más butanol que la cepa BA101 en las condiciones ensayadas, y ambas cepas consumen la glucosa en las primeras 24 horas (A). Un análisis de otros azúcares presentes en la muestra **(B)** indica que la xilosa es consumida por ambas cepas de un modo similar, mientras que se aprecian diferencias en el consumo de celobiosa y arabinosa.

FIG. 9. A) Viabilidad de *C. beijerinckii* BA101 en hidrolizado de paja de maíz. Se determinó la viabilidad de BA101 en un medio que contiene las sales del TYA y distintas concentraciones de hidrolizado de paja de maíz. Las células se cultivaron a saturación en medio TYA con glucosa, y este cultivo se utilizó para inocular medio conteniendo sales de TYA y distintas concentraciones de hidrolizado de paja de maíz. La viabilidad se determinó como CFUs/ml, y como se observa en la figura las células crecen normalmente cuando el hidrolizado de maíz se encuentra en una concentración hasta el 16%. Cuando el hidrolizado llega a una concentración del 25% es letal para las células. **B)** Análisis de los azúcares presentes en el hidrolizado de paja de maíz. Se muestran las concentraciones de azúcares representativos presentes en el medio TYA con 16% de hidrolizado de paja de maíz, tanto al inicio de la fermentación (t0),

como a las 72 horas (t72). Se muestran duplicados de una fermentación de *C. beijerinckii* BA101 (wt).

FIG. 10. Producción de butanol usando hidrolizado de paja de maíz como fuente de carbono. Se ensayó la producción de butanol de la cepa BA101 (wt), y de los dos mutantes de baja acidez BP25 y BP31, en un medio que contenía las sales presentes en TYA y un 16% de hidrolizado de paja de maíz. En la figura se aprecia que todas las cepas pueden utilizar este sustrato como fuente de carbono, y producir butanol. El mutante BP25 produce más butanol que la cepa parental, y se observa que toda la glucosa del medio se consume en las primeras 48 horas. Los datos mostrados son la media de dos experimentos independientes.

FIG. 11. Producción de butanol usando arabinosa como fuente de carbono. Las cepas BA101 (wt) y BP25 se analizaron por su capacidad de producir butanol en un medio TYA con arabinosa **(A)** o arabinosa y glucosa **(B)** como fuente de carbono. Un cultivo saturado se utilizó para inocular los medios a ensayar a una OD_{660}=0,1. La producción de butanol se siguió en el tiempo, y, como se muestra en A, las dos cepas pueden utilizar la arabinosa para producir butanol. Sin embargo, cuando tenemos glucosa y arabinosa en el medio de cultivo, la glucosa se consume en las primeras 24 horas, mientras que únicamente el mutante BP25 consume arabinosa tras el uso de glucosa. La producción de butanol es mejor para el mutante BP25 que para su cepa parental BA101 en el caso de que ambos azúcares estén presentes en el medio.

FIG. 12. Producción de butanol de las cepas BP11, BP25 y BP31 usando arabinosa como fuente de carbono. Las cepas BA101, BP11, BP25 y BP31 se analizaron por su capacidad de producir butanol en un medio TYA con arabinosa como fuente de carbono. Un cultivo saturado se utilizó para inocular los medios a ensayar a una OD_{660}=0,1. La producción de butanol se siguió en el tiempo, y, como se observa en la figura los mutantes de baja acidez producen butanol desde este azúcar C5 más eficientemente que la cepa BA101. El mutante BP11 logra mayores títulos de producción en las primeras horas, utilizando la arabinosa más eficientemente; sin embargo, tanto el mutante BP25 como el mutante BP31 alcanzan un mayor rendimiento final de producción, consumiendo también más arabinosa en el proceso.

FIG. 13. **Producción de butanol de mutantes de baja acidez usando xilosa como fuente de carbono.** La producción de butanol de BA101 (wt) y los dos mutantes de

baja acidez BP25 y BP31 se analizó en un medio que contiene xilosa **(A)** o xilosa y glucosa **(B)** como fuente de carbono. Un cultivo en TYA-glucosa saturado se usó para inocular el medio deseado a una OD_{660}= 0,1. La producción de butanol se analizó a lo largo del tiempo, y los resultados muestran que las tres estirpes pueden utilizar xilosa como fuente de carbono para producir butanol (A), y que cuando hay glucosa y xilosa en el medio, los dos azúcares se usan simultáneamente y, en el caso de los mutantes, son consumidos en las primeras 24 horas.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto los altos rendimientos de los mutantes desarrollados en la presente invención en la producción de ABE a partir de diferentes fuentes de carbono.

Ejemplo 1. Generación y selección de los mutantes de *C. beijerinckii*.

Los mutantes se generaron mediante mutagénesis con el químico etil-metano-sulfonato (EMS). Para llevar a cabo la mutagénesis, en primer lugar se definió la concentración de EMS adecuada para lograr una buena proporción de mutagénesis/muerte celular en *Clostridium beijerinckii*. Como se observa en la Fig. 1, la concentración de EMS para la mutagénesis de *Clostridium beijerinckii* se estableció en 15 µl para 1 ml de cultivo con una OD_{660} de 1. Este tratamiento causa la muerte de alrededor del 90% de las células. La mutagénesis se llevó a cabo cultivando las células toda la noche en anaerobiosis. Como medio de cultivo se utilizó TYA (composición detallada en el ejemplo 8), suplementado con 60 g/l de glucosa, y gasificado con N_2 para eliminar todo el O_2 y asegurar condiciones de anaerobiosis. Un cultivo de toda la noche se utilizó para inocular una botella de medio TYA a una densidad óptica a 660 (OD_{660}) de 0,1. Tras crecimiento en anaerobiosis durante 5 ó 6 horas, cuando el cultivo ha alcanzado una densidad óptica a 660 nm (OD_{660}) de 1, se recoge un mililitro de cultivo, se centrifuga y se trata con 15 µl de EMS durante una hora. Tras el tratamiento las células se lavan tres veces con TYA, y finalmente se incuban en 5 ml de medio fresco durante dos horas (tiempo de regeneración). Tras la regeneración, las células se siembran en un medio adecuado para proceder a la selección.

Para el aislamiento de mutantes se utilizó un método de selección que permite identificar células que reducen menos el pH que la parental. El razonamiento para la obtención de mutantes sobre-productores de butanol basado en la baja acidez del cultivo es el siguiente: las células que causan menos acidez en el medio de cultivo pueden estar derivando los ácidos hacia disolventes más rápidamente, de modo que pueden producir más disolventes (butanol). Para el aislamiento de las células que causan una menor acidez del medio de cultivo se utilizan placas selectivas, con un indicador de pH, Bromocresol Púrpura, que es morado a pH básico, y que se vuelve amarillo a pH ácido. De este modo, las células que más acidifican el medio, forman colonias con un halo amarillo alrededor (Fig. 2). Las células menos ácidas (mayor pH en el rango ácido) no cambian el color de las placas, manteniéndolas moradas.

Como cepas parentales en esta selección se utilizaron dos cepas de *Clostridium beijerinckii*, *C. beijerinckii* NCIBM 8052 (8052; cepa de colección), y *C. beikjerinckii* BA101 (BA101). BA101 es un mutante de 8052, obtenido por mutagénesis química, y seleccionado por su mayor capacidad amilolítica, que se ha descrito que produce más butanol que la cepa silvestre. En referencia a la selección empleada, decir que ambas cepas producen el halo amarillo alrededor de la colonia en placas de bromocresol púrpura, aunque el halo de la cepa 8052 es más pronunciado. Para la selección, tras las mutagénesis, las células no se pueden sembrar directamente en el medio selectivo con Bromocresol Púrpura, debido a la toxicidad de este medio, que no permite el crecimiento de colonias saludables. Los mutantes se sembraron en primer lugar en medio TYA-glucosa, y mutantes ya aislados se resembraron en placas con Bromocresol Púrpura para aislar aquellos que presentaran un menor halo amarillo. Más de 5000 mutantes fueron sembrados en las placas selectivas, y unos 50 mutantes fueron seleccionados carentes de halo amarillo alrededor de la colonia, para un posterior ensayo de su capacidad productora de butanol.

Ejemplo 2. Producción de butanol a partir de glucosa con los mutantes generados.

Para analizar la capacidad de producir butanol de los distintos mutantes, los cultivos se iniciaban en botella de 50 ml, en anaerobiosis, desde un cultivo saturado, a una OD_{660}=0,1. Los cultivos se crecían en TYA con glucosa (60 g/l), a 37ºC y durante 72 horas. En cada caso se tomaron alícuotas a distintos tiempos (como mínimo cuatro puntos) para analizar la producción de butanol. Las muestras, de 1,5 ml, se tomaban

utilizando una jeringa y aguja, a través de un septo, de modo que no se interrumpía la atmosfera anaerobia del cultivo. Una vez recogidas las muestras, se procedía a la centrifugación de las mismas para separar las células (13000 rpms, 10 minutos), y el sobrenadante se tomaba para determinar glucosa, butirato y butanol mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC; GE Healthcare). El método de cromatografía usa una columna de tipo Aminex HPX-87H (Biorad), de un tamaño de 300 X 7,8 mm, con una temperatura de columna de 40ºC y un flujo de 0,6 ml/min. El volumen de inyección es de 20 µl, y el tiempo de cromatografía de 40 minutos. Como fase móvil se utiliza agua acidulada (0,05M H_2SO_4), y los tiempos de retención (en minutos) para los distintos compuestos es de 8,6 para glucosa, 21,6 para butirato, y 36,2 para butanol. Para la cuantificación se utilizó un estándar interno que incluía concentraciones conocidas de los distintos metabolitos.

Los resultados obtenidos muestran que tres de los mutantes de baja acidez (mutantes BP11, BP25 y BP31) producen más butanol que sus respectivos parentales. La cepa parental del mutante BP11 es la estirpe *C. beijerinckii* 8052, mientras que el parental de los mutantes BP25 y BP31 es la estirpe *C. beijerinckii* BA101 (Fig. 3). En las condiciones usadas en este ensayo, la cepa silvestre 8052 no produce butanol, ya que el pH del cultivo baja por debajo de 5 durante el crecimiento, dando lugar al fenómeno conocido como “acid crash”, que conduce a una disminución del crecimiento de las células y una inhibición de la producción de butanol.

Ejemplo 3. Producción de butanol a partir de maíz molido con los mutantes generados.

Además de la producción en TYA-glucosa, se analizó la producción de butanol en un medio que contenía maíz molido (corn mash) como fuente de carbono. El medio contenía las sales presentes en TYA junto con un 25% de maíz molido, tratado con amilasa para incrementar la glucosa soluble, y clarificado (centrifugado). En este caso el cultivo de las distintas cepas se hizo en fermentadores de 1 litro, con 500 ml de volumen de trabajo, y en condiciones en las cuales se controlaba el pH por encima de 5,5. La agitación se estableció a 50 rpm, y la temperatura a 37ºC. El cultivo se iniciaba utilizando 25 ml de un cultivo saturado (crecido durante unas 16 horas). Como se observa en la figura 4, todas las cepas pueden utilizar el maíz molido y clarificado como fuente de carbono, y los mutantes producen significativamente más butanol en las primeras 24 horas que sus correspondientes cepas parentales, incrementando, por

tanto, la productividad del proceso. Además, y como se observa en la figura 4, la producción del mutante BP11 a las 72 horas es significativamente mayor que la producción de su cepa parental.

Ejemplo 4. Producción de butanol a partir de hidrolizado de residuos urbanos con los mutantes generados.

También se analizó la capacidad de producir butanol cuando se utilizan como fuente de carbono distintos productos de desecho. Como productos de desecho se utilizaron un hidrolizado de residuos sólidos urbanos (waste syrup) y un hidrolizado de biomasa vegetal (paja de maíz o corn stover).

El hidrolizado de residuos urbanos sólidos es el producto resultante tras la hidrólisis enzimática de la parte orgánica de los residuos sólidos urbanos. Utilizando este sirope se realizó en primer lugar un estudio de viabilidad con concentraciones crecientes del mismo (0%, 1,5%, 5% y 10%). El crecimiento se analizó determinando el número de unidades formadoras de colonia (CFU/ml) por mililitro de cultivo, a lo largo del tiempo. Para determinar las CFUs/ml se tomaron alícuotas del cultivo a distintos tiempos, y, tras diluir adecuadamente, se sembraron en placas de TYA-glucosa, de modo que las colonias quedaran lo suficientemente aisladas para proceder al conteo de las mismas. Estos ensayos se hicieron con la cepa BA101, y los resultados muestran que *C. beijerinckii* BA101 no puede crecer en un medio que contenga un 10% de waste syrup, mientras que concentraciones de hasta el 5% de waste syrup permiten el crecimiento de BA101 (Figura 5). En estas condiciones se analizó la producción de butanol de la cepa BA101, observándose que con el 5% de sirope de residuos sólidos urbanos ésta puede producir butanol con una productividad muy alta en relación al consumo de glucosa (la cual se consume casi totalmente en las primeras 50 horas de fermentación; Figura 6).

Para el análisis de los mutantes de baja acidez se utilizó un medio de cultivo que contenía únicamente las sales presentes en el TYA y 5% de sirope de residuos sólidos urbanos (composición del medio en el ejemplo 8). Los datos (Figura 7A) muestran que el mutante BP25 produce butanol más rápidamente cuando utiliza este sustrato como fuente de carbono, mientras que el mutante BP31 produce el mismo butanol que la cepa parental (Figura 7B).

La composición de azúcares de este medio se analizó mediante cromatografía (HPLC), utilizando una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm). El método de análisis utiliza agua acidulada como fase móvil, una temperatura de columna de 60ºC, y una temperatura del detector de 40ºC. El análisis de los azúcares después de la fermentación indicó que las cepas empleadas pueden consumir los azúcares C6 y C5 presentes en este medio.

La capacidad de fermentar sirope de residuos sólidos urbanos del mutante BP11 también se analizó en un medio que contenía TYA y una menor concentración de sirope de residuos sólidos urbanos. Los experimentos se realizaron en botella, sin control de pH. En estas condiciones la cepa parental del mutante BP11 (la cepa 8052) no produce butanol, como ya hemos descrito. Es por ello que la capacidad de producir butanol de este mutante se comparó con la de la estirpe BA101. Como se observa en la figura 8A el mutante BP11 produce butanol utilizando este sustrato complejo como fuente de carbono, y lo produce con mejores títulos que la cepa BA101. En esta figura se aprecia que la glucosa presente en este medio se consumió en las primeras 24 horas, y que ambas cepas la consumen por igual. Al mismo tiempo se analizaron otros azúcares presentes en la muestra, y, como se observa en la figura 8B, la xilosa es consumida completamente en las primeras 24 horas por ambas estirpes. Sin embargo, existen diferencias en el consumo de celobiosa y arabinosa, que el mutante BP11 parece consumir más eficientemente (Figura 8B).

Ejemplo 5. Producción de butanol a partir de hidrolizado de paja de maíz con los mutantes generados.

El segundo de los sustratos de desecho empleado fue el hidrolizado de paja de maíz (corn stover). Éste es el resultado de la hidrólisis enzimática de paja de maíz sometida a tratamiento ácido y de explosión de vapor. La paja de maíz es un tipo de residuo agrícola que ha sido ampliamente estudiado como sustrato (tras la hidrólisis enzimática) para la producción de bio-etanol de segunda generación. Utilizando este sustrato como fuente de carbono (composición del medio en el ejemplo 8), se analizó la viabilidad de la cepa BA101. Un cultivo saturado de BA101 (cultivado durante 16 horas) se utilizó para inocular (OD_{660}=0,1) 50ml de TYA con distintas concentraciones de hidrolizado de paja de maíz (0%, 16% y 25%). La viabilidad se analizó determinando CFUs/ml, como ya se ha descrito. Los resultados muestran que BA101 no puede crecer cuando el medio contiene un 25% de hidrolizado de paja de maíz. Sin

embargo, el crecimiento es adecuado cuando la concentración de sustrato se disminuye hasta el 16% (Figura 9A). Los azúcares presentes en este medio tras la fermentación se analizaron, y se observa nuevamente que BA101 consume azúcares C6 y C5 durante el crecimiento (Figura 9B).

Finalmente, se analizó la producción de butanol de los distintos mutantes en un medio con 16% de hidrolizado de paja de maíz. Los resultados (Figura 10) muestran que todas las cepas ensayadas producen butanol utilizando esta fuente de carbono, y que el mutante BP25 produce más butanol que la cepa parental.

Ejemplo 6. Producción de butanol a partir de azúcares C5 con los mutantes generados.

Los resultados obtenidos en fermentaciones con sustratos complejos mostraron que las cepas de *C. beijerinckii* pueden consumir los C5 presentes en estos sustratos. Para analizar la capacidad de las distintas cepas de consumir azúcares C5, tanto la cepa BA101 como los mutantes BP25 y BP31 se crecieron en medio TYA conteniendo distintos azúcares C5 como sustratos, y se analizó la producción de butanol. Los C5 elegidos para el ensayo fueron L-arabinosa y D-xilosa. Para determinar la producción de butanol y el consumo de azúcares C5 tras la fermentación se empleó cromatografía líquida (HPLC), con el método anteriormente descrito para determinación de butanol. El tiempo de retención de la arabinosa en este método es de 10,1 minutos, mientras que la xilosa se identifica a los 9,2 minutos de cromatografía.

Consumo de arabinosa

Los resultados muestran que, cuando la fermentación se produce en un medio que contiene únicamente arabinosa (TYA + arabinosa), tanto BA101 como BP25 pueden utilizar arabinosa como fuente de carbono, y producir butanol desde ella (Figura 11A).

Analizando el comportamiento en un medio que contiene tanto glucosa como arabinosa (y ambas en concentraciones limitantes para analizar el patrón de consumo de azúcares, y determinar si C6 y C5 se consumen simultáneamente o consecutivamente), se observó que el consumo de arabinosa no ocurre hasta que la glucosa ha sido completamente consumida (Figura 11B), y el uso de la misma no es

muy eficiente (únicamente el mutante BP25 la consume, y no completamente), mostrándose una inhibición por glucosa en el consumo de arabinosa.

La utilización de arabinosa por el mutante BP11 era más eficiente que la de la cepa BA101 en el sustrato complejo de sirope de residuos sólidos urbanos (Figura 8), por lo que también se analizó la producción de butanol desde este azúcar de este mutante. Los ensayos se realizaron en botellas de 50 ml, sin control de pH. En estas condiciones, la cepa parental del mutante BP11, no produce butanol, con lo que se incluyeron como controles para valorar la producción del mutante BP11, las cepas BA101, BP25 y BP31. Como se observa en la figura 12, los mutantes producen más butanol que la cepa BA101, y el mutante BP11, aunque inicialmente consume arabinosa más rápido, a partir de las 48 horas frena su consumo de arabinosa y la producción de butanol, al contrario que los mutantes BP25 y BP31 que siguen produciendo butanol durante las 72 horas que se siguió el análisis de la fermentación.

Consumo de xilosa

En el caso del azúcar C5 xilosa, cuando está presente como única fuente de carbono en el medio, los resultados muestran que las estirpes ensayadas (BA101, BP25 y BP31) consumen xilosa y producen butanol desde este azúcar (Figura 13A). Resulta interesante que cuando la xilosa se encuentra en el medio junto con glucosa (ambos en concentraciones limitantes), las células pueden consumir ambos azúcares simultáneamente, y completamente en las primeras 30 horas de fermentación (Figura 13B). En estas condiciones se observa que la producción de butanol en las primeras 24 horas es mejor para los mutantes de baja acidez que para la cepa parental, mientras que la producción al final de la fermentación es muy similar en las tres estirpes.

Ejemplo 7. Análisis del ADN genómico de los tres mutantes generados.

El ADN genómico de los tres mutantes de baja acidez fue secuenciado, y la secuencia del genoma se comparó con la de su correspondiente cepa parental. Así, se identificaron los genes que aparecen mutados en cada cepa.

Los resultados mostraron que hay varios procesos biológicos que pueden estar alterados en los mutantes, y conducir al fenotipo de mayor producción de butanol.

El mutante BP11 muestra una mutación en el gen Cbei_1540, el cual codifica una pppGpp sintasa, y parece el más probable para explicar el fenotipo sobreproductor de este mutante, comparado con su cepa parental. pppGpp es una señal intracelular que causa una respuesta a estrés por activación del factor transcripcional RpoS. Se ha descrito previamente que la disminución intracelular de esta molécula resulta en una menor respuesta a estrés, y una mayor tolerancia a butanol de las células. Un incremento en la tolerancia a butanol podría conducir hacia una mayor producción, o a una desregulación de los procesos que resulte en una producción de butanol más rápida. Otra mutación interesante es la que aparece en el gen Cbei_2475. Este gen codifica un regulador transcripcional de tipo tetR, y está situado en 5' de un gen codificante de una bomba de extrusión. Esta mutación podría conducir hacia una mayor tolerancia a butanol, y, por tanto, a una mayor producción.

El mutante BP25 muestra 25 mutaciones. Entre las mutaciones que podrían causar el fenotipo estudiado, se han identificado varias que podrían afectar al proceso de producción de butanol. Hay varios genes implicados en quimiotaxis que aparecen mutados, lo cual sugiere que la quimiotaxis puede ser importante para el proceso de producción de butanol. Por otro lado, el mantenimiento de un estado redox intracelular adecuado es fundamental para la producción de butanol, ya que hay varios cofactores que cambian su estado redox durante el proceso de producción. Este mutante muestra tres genes (Cbei_0316, Cbei_1206 y Cbei_1472) que están implicados en el mantenimiento del estado redox celular; las mutaciones en estos genes pueden ser responsables del fenotipo observado. Además, se encontraron dos genes mutados (Cbei_4691 y Cbei_4699) cuya función es la del mantenimiento de la pared celular y la síntesis de peptidoglicano. Las mutaciones en estos genes pueden conducir a un incremento de la tolerancia a butanol, lo cual puede resultar en una mayor producción. Por último varios genes implicados en el metabolismo de purinas aparecen mutados en esta estirpe. La concentración de ATP intracelular es importante para la producción de butanol, y se ha descrito que un aumento del ATP intracelular conduce a una mayor producción de butanol.

El mutante BP31 muestra seis mutaciones con respecto a su cepa parental, sin embargo únicamente tres de ellas son no conservativas, siendo, por tanto, las posibles responsables del fenotipo observado. La que parece tener más relevancia es la que aparece en el gen Cbei_2475, gen que también está mutado en el mutante BP11, y cuya función, y relevancia con respecto al fenotipo de producción de butanol ya se ha

descrito. Las otras dos mutaciones aparecen en los genes Cbei_0436 y Cbei_1397. El primero codifica para una histidina quinasa, implicada en procesos de transducción de señales. El proceso de producción de butanol está estrechamente ligado al proceso de esporulación, el cual está altamente regulado mediante fosforilaciones mediadas por histidin-quinasas. Sin embargo, ésta en particular no está descrita como implicada en estos procesos. El segundo de estos genes codifica para una transposasa, que a priori no parece implicada en el proceso de producción de butanol.

Ejemplo 8. Composición de los distintos medios de cultivo empleados en los ensayos.

TYA:
Glucosa: 60 g/l
Extracto de levadura: 2 g/l
Bacto triptona: 6 g/l
Acetato de amonio: 3 g/l
KH_2PO_4: 0,5 g/l
$FeSO_4.7H_2O$: 0,01g/l
Ajuste de pH a 6,5 y autoclave a 110ºC
$MgSO_4$ (1M): 1,22 ml por litro

TYA-placas:
Glucosa: 60 g/l
Extracto de levadura: 2 g/l
Bacto triptona: 6 g/l
Acetato de amonio: 3 g/l
KH_2PO_4: 0,5 g/l
FeSO4.7H_2O: 0,01g/l
Bacto agar: 15 g/l
Ajuste de pH a 6.5 y autoclave a 110ºC
$MgSO_4$ (1M): 1,22 ml por litro

Placas Bromocresol Púrpura:
Glucosa: 60 g/l
Extracto de levadura: 2 g/l
Bacto triptona: 6 g/l

Acetato de amonio: 3 g/l
KH_2PO_4: 0,5 g/l
$FeSO4.7H_2O$: 0,01g/l
Bromocresol Púrpura: 0,4 g/l
Bacto agar: 15 g/l
Ajuste de pH a 6.5 y autoclave a 110ºC
$MgSO_4$ (1M): 1,22 ml por litro

TYA (-):
Extracto de levadura: 2 g/l
Bacto triptona: 6 g/l
Acetato de amonio: 3 g/l
KH_2PO_4: 0,5 g/l
$FeSO4.7H_2O$: 0,01g/l
NaCl: 35 g/l
Bacto-agar: 15 g/l
Ajuste de pH a 6.5 y autoclave a 110ºC
$MgSO_4$ (1M): 1,22 ml por litro

TYA sales + 5% hidrolizado de residuos urbanos:
Acetato de amonio: 3 g/l
KH_2PO_4: 0,5 g/l
$FeSO4.7H_2O$: 0,01g/l
NaCl: 35 g/l
Bacto-agar: 15 g/l
Hidrolizado de residuos urbanos: 50 ml/l
Ajuste de pH a 6,5 y autoclave a 110ºC
$MgSO_4$ (1M): 1,22 ml por litro

TYA sales + 16% hidrolizado de paja de maíz:
Acetato de amonio: 3 g/l
KH_2PO_4: 0,5 g/l
$FeSO4.7H_2O$: 0,01g/l
NaCl: 35 g/l
Bacto-agar: 15 g/l
Hidrolizado de paja de maíz: 160 ml/l

Ajuste de pH a 6,5 y autoclave a 110ºC

$MgSO_4$ (1M): 1,22 ml por litro

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante de *Clostridium beijerinckii* caracterizada porque comprende en su genoma las siguientes mutaciones con respecto al genoma de la cepa parental *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052:

   a. A en lugar de G en la posición 235 del gen Cbei_0083,
   b. T en lugar de C en la posición 151 del gen Cbei_0769,
   c. A en lugar de G en la posición 54 del gen Cbei_R0027,
   d. A en lugar de G en la posición 186 del gen Cbei_0123,
   e. A en lugar de G en la posición 201 del gen Cbei_0196,
   f. A en lugar de G en la posición 871 del gen Cbei_0316,
   g. T en lugar de C en la posición 731 del gen Cbei_1206,
   h. T en lugar de C en la posición 437 del gen Cbei_1472,
   i. C en lugar de T en la posición 968 del gen Cbei_1854,
   j. A en lugar de C en la posición 139 del gen Cbei_1935,
   k. T en lugar de G en la posición 31 del gen Cbei_1975,
   l. T en lugar de G en la posición 2113 del gen Cbei_3078,
   m. G en lugar de A en la posición 88 del gen Cbei_3625,
   n. T en lugar de C en la posición 160 del gen Cbei_3757,
   o. A en lugar de G en la posición 325 del gen Cbei_4026,
   p. A en lugar de G en la posición 1079 del gen Cbei_4207,
   q. T en lugar de G en la posición 628 del gen Cbei_4256,
   r. deleción de G en la posición 672 del gen Cbei_4308,
   s. T en lugar de G en la posición 1766 del gen Cbei_4400,
   t. A en lugar de G en la posición 1732 del gen Cbei_4548,
   u. A en lugar de G en la posición 1465 del gen Cbei_4691,
   v. A en lugar de G en la posición 997 del gen Cbei_4699,
   w. C en lugar de T en la posición 101 del gen Cbei_4761,
   x. A en lugar de G en la posición 27 del gen Cbei_4865, y
   y. A en lugar de G en la posición 708 del gen Cbei_4918.

2. Cepa según la reivindicación 1, que es la cepa mutante de *Clostridium beijerinckii* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso CECT 9306.

3. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la producción de disolventes.

4. Uso de la cepa según la reivindicación 3, donde el disolvente es butanol.

5. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde los disolventes son acetona, butanol y etanol (ABE).

6. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde la producción de disolventes se lleva a cabo por medio de un proceso de fermentación anaeróbica en presencia de un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono.

7. Uso de la cepa según la reivindicación 6, donde la fuente de carbono comprende glucosa, celobiosa, xilosa y/o arabinosa.

8. Uso de la cepa según la reivindicación 7, donde la fuente de carbono comprende glucosa y arabinosa.

9. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde la fuente de carbono se selecciona de la lista que consiste en: glucosa, maíz molido, hidrolizado de residuos orgánicos urbanos, o hidrolizado de biomasa vegetal.

10. Uso de la cepa según la reivindicación 9, donde el hidrolizado de biomasa vegetal es hidrolizado de paja de maíz.

11. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el medio de cultivo además comprende extracto de levadura, triptona, acetato de amonio, acetato de magnesio, sulfato de hierro, fosfato potásico y/o sulfato de magnesio.

12. Método para la producción de disolventes que comprende las siguientes etapas:

    a. fermentar la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en presencia de un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono, y
    b. recuperar del medio de cultivo los disolventes producidos por la cepa.

13. Método según la reivindicación 12, donde el disolvente es butanol.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde los disolventes son acetona, butanol y etanol (ABE).

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde la fuente de carbono comprende glucosa, celobiosa, xilosa y/o arabinosa.

16. Método según la reivindicación 15, donde la fuente de carbono comprende glucosa y arabinosa.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, donde la fuente de carbono se selecciona de la lista que consiste en: glucosa, maíz molido, hidrolizado de residuos sólidos orgánicos urbanos, o hidrolizado de biomasa vegetal.

18. Método según la reivindicación 17, donde el hidrolizado de biomasa vegetal es hidrolizado de paja de maíz.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, donde la concentración de hidrolizado de residuos sólidos orgánicos urbanos en el medio de cultivo es del 5% (v/v) o inferior.

20. Método según la reivindicación 18, donde la concentración de hidrolizado de paja de maíz en el medio de cultivo es del 16% (v/v) o inferior.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, donde el medio de cultivo además comprende extracto de levadura, triptona, acetato de amonio, acetato de magnesio, sulfato de hierro, fosfato potásico y/o sulfato de magnesio.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, donde la fermentación de la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 y 40 ºC, durante un tiempo de entre 30 y 275 horas, preferiblemente en agitación.

FIG. 1

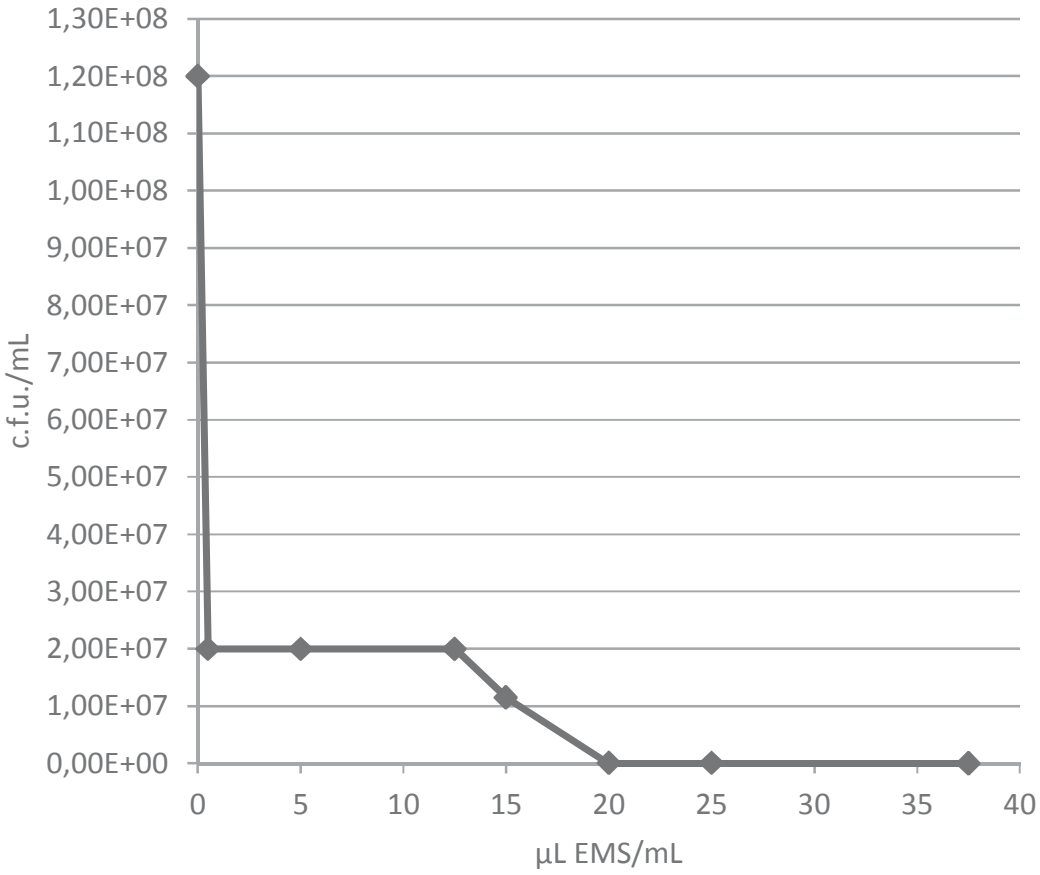

1,30E+08
1,20E+08
1,10E+08
1,00E+08
9,00E+07
8,00E+07
7,00E+07
6,00E+07
5,00E+07
4,00E+07
3,00E+07
2,00E+07
1,00E+07
0,00E+00
c.f.u./mL
0
5
10
15
20
25
30
35
40
µL EMS/mL

FIG. 2

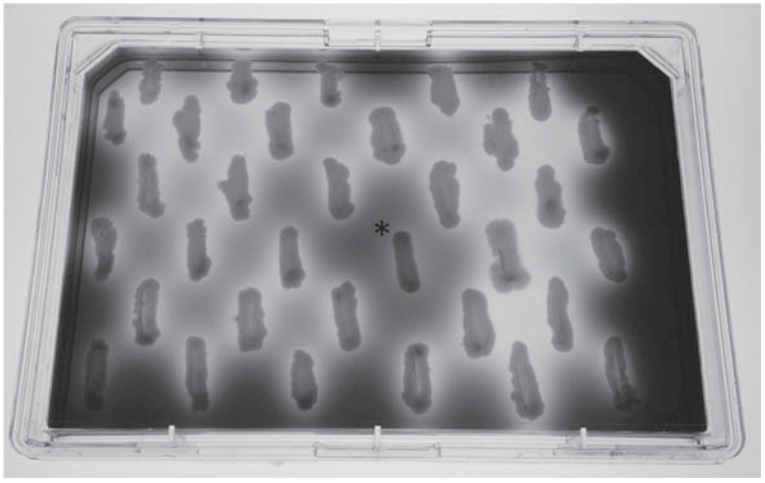
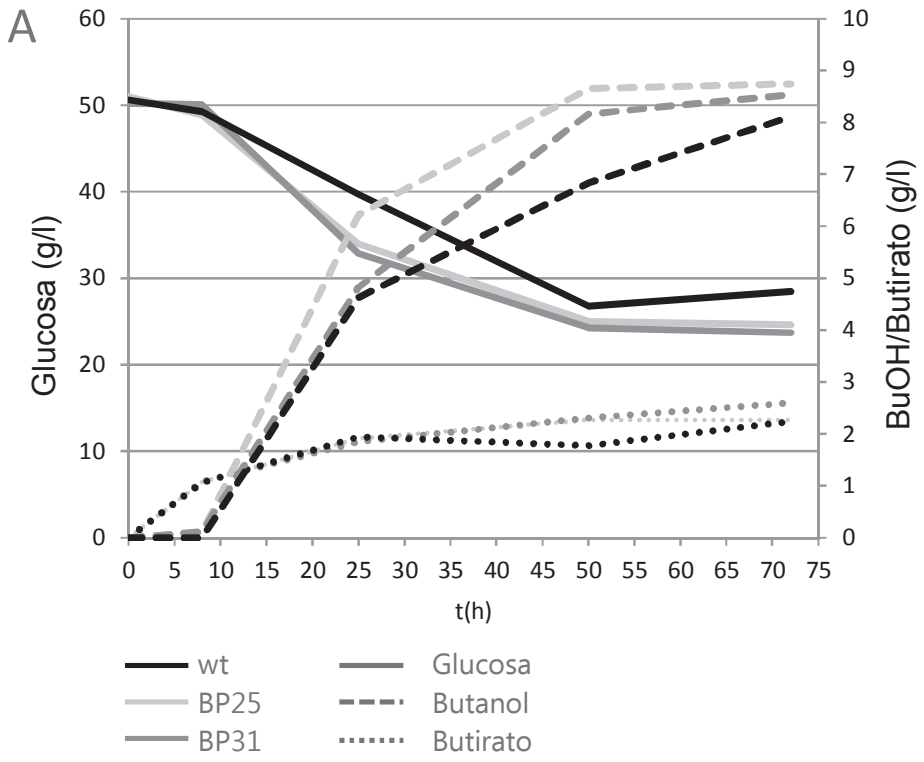

*

FIG. 3


A
Glucosa (g/l)
BuOH/Butirato (g/l)
t(h)
wt
BP25
BP31
Glucosa
Butanol
Butirato

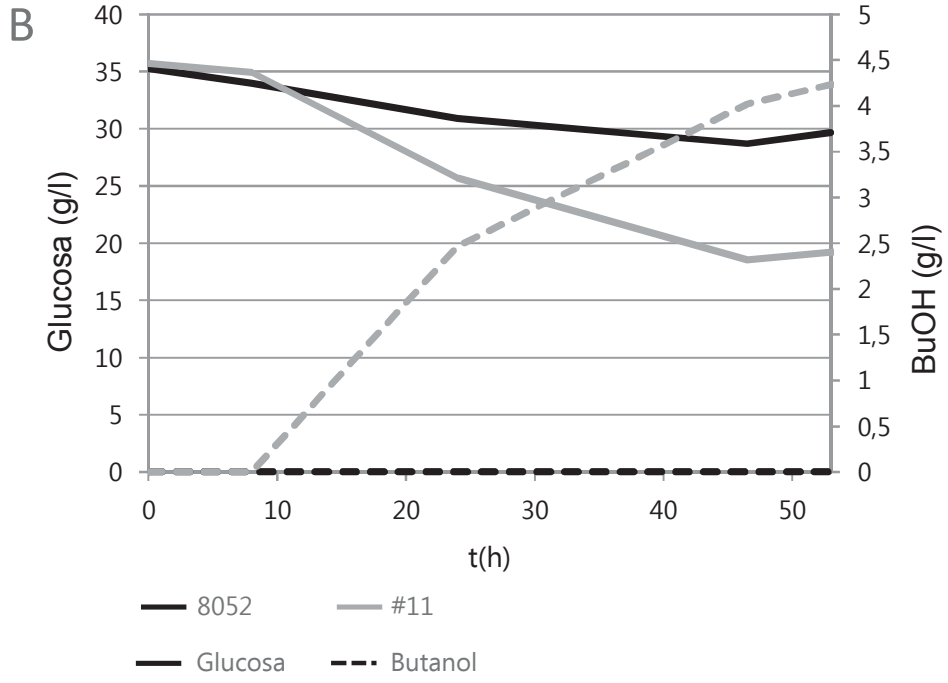
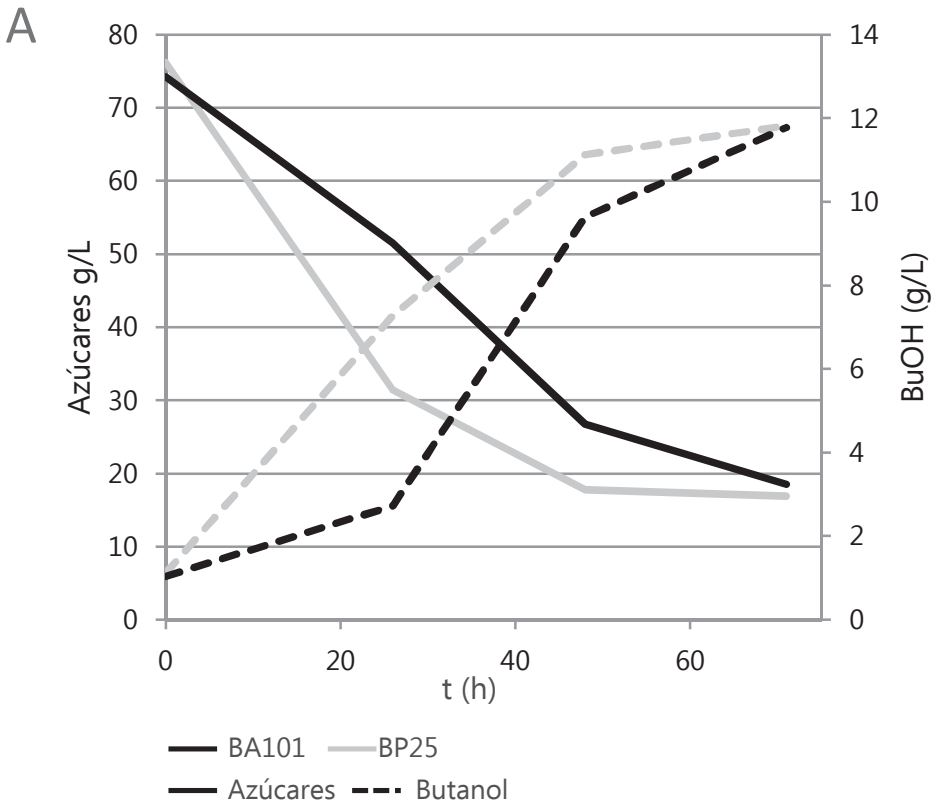

B
Glucosa (g/l)
BuOH (g/l)
t(h)
8052
#11
Glucosa
Butanol

FIG. 4


A
Azúcares g/L
BuOH (g/L)
t (h)
BA101
BP25
Azúcares
Butanol

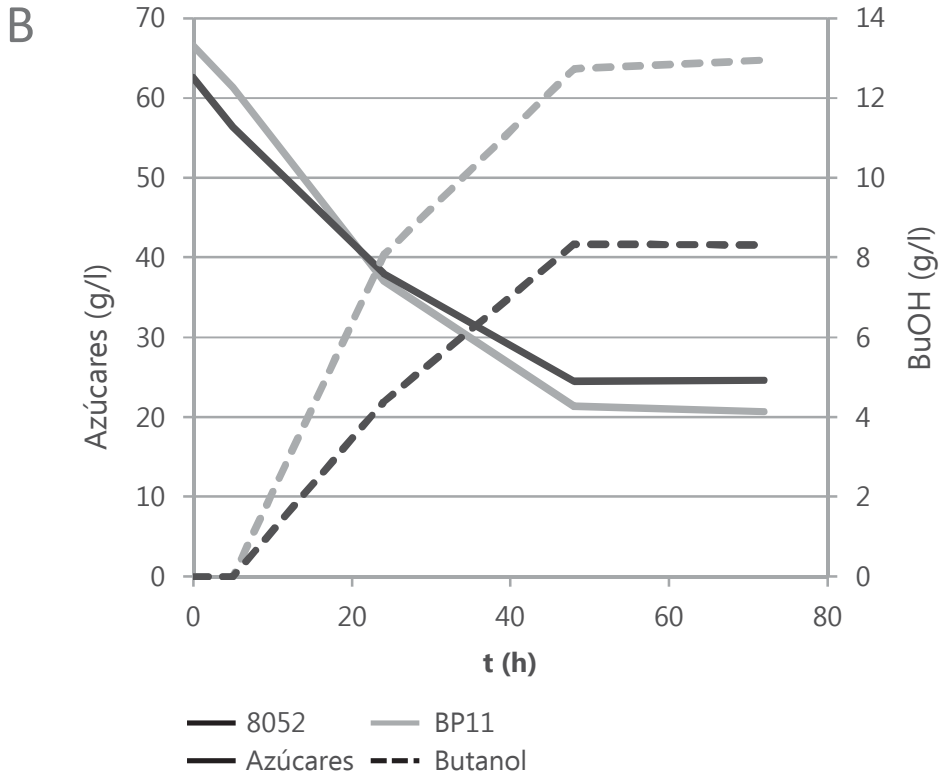

B
Azúcares (g/l)
BuOH (g/l)
t (h)
8052
BP11
Azúcares
Butanol

FIG. 5

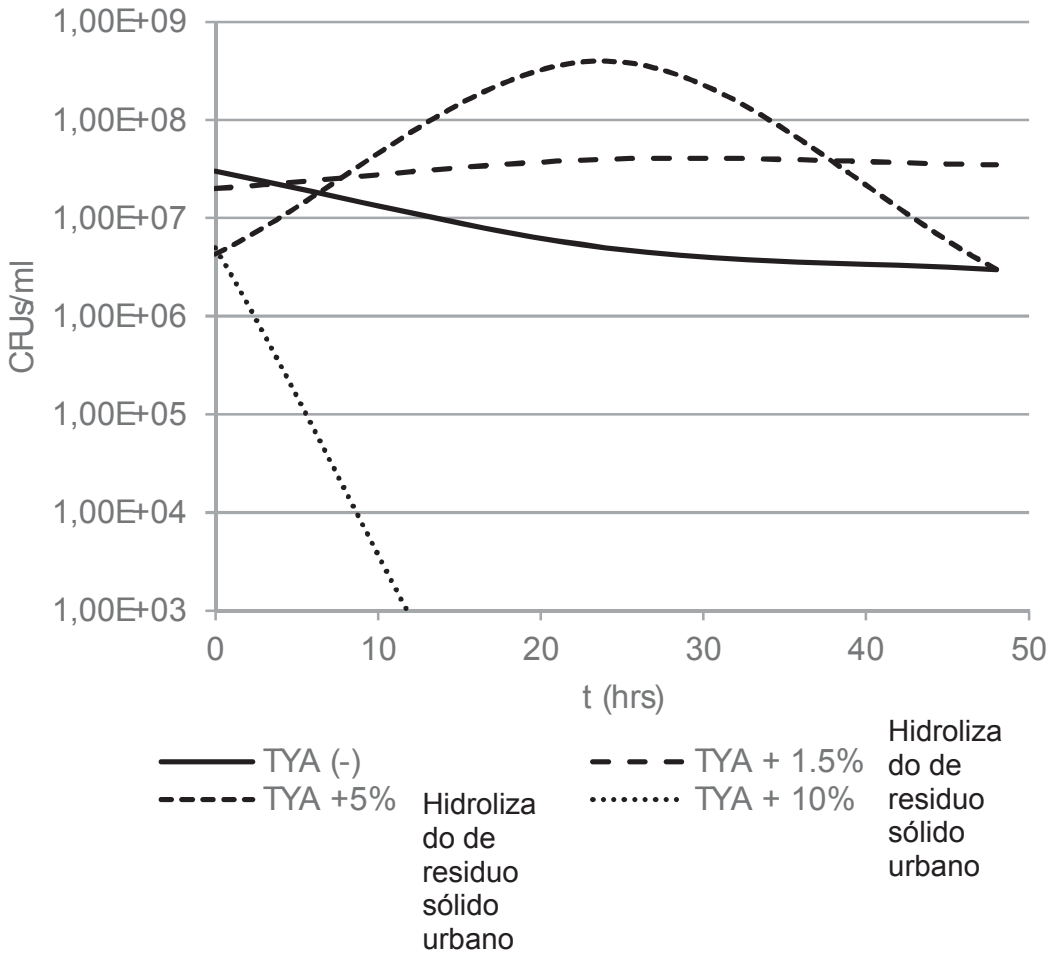

1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
1,00E+04
1,00E+03
CFUs/ml
0
10
20
30
40
50
t (hrs)
TYA (-)
TYA +5%
Hidroliza do de residuo sólido urbano
TYA + 1.5%
TYA + 10%
Hidroliza do de residuo sólido urbano

FIG. 6

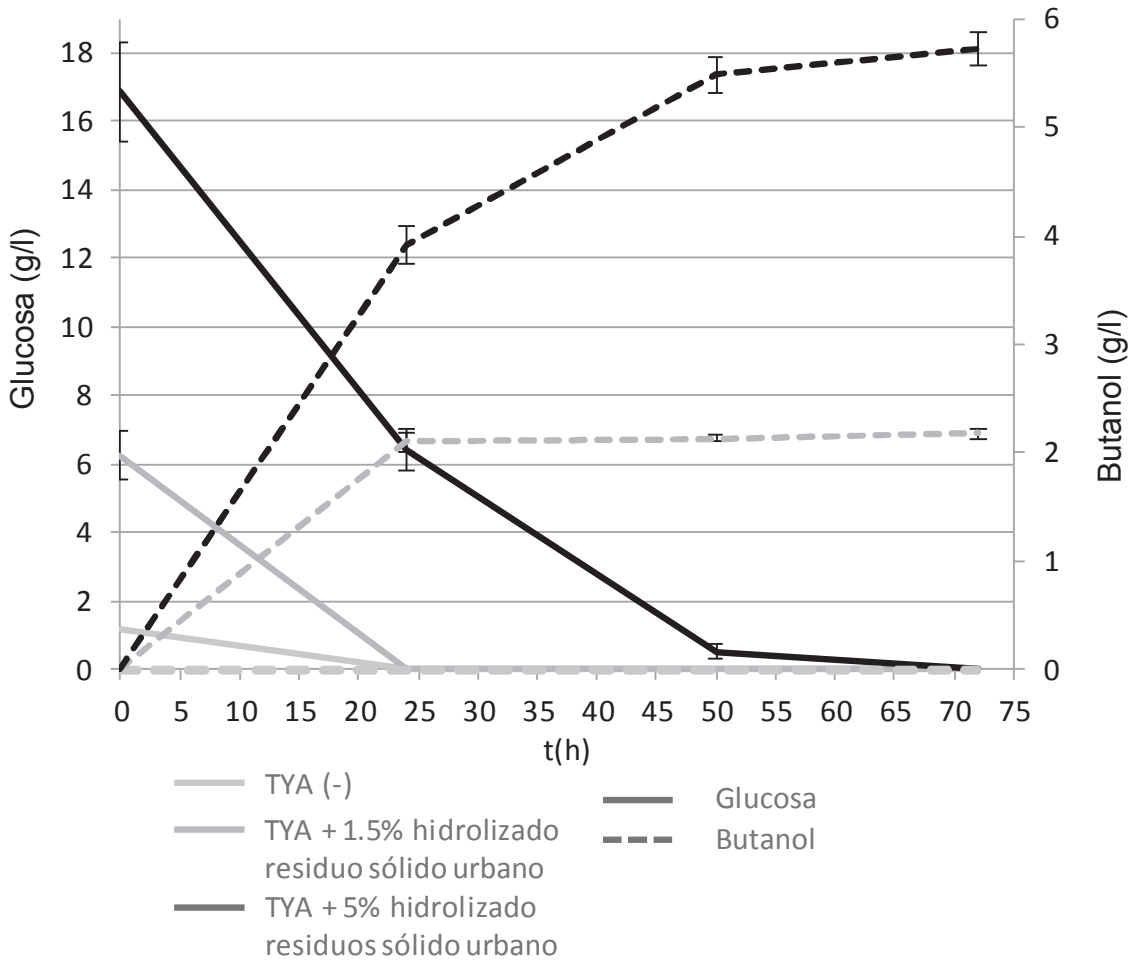

Glucosa (g/l)
Butanol (g/l)
t(h)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
1
2
3
4
5
6
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
TYA (-)
TYA + 1.5% hidrolizado residuo sólido urbano
TYA + 5% hidrolizado residuos sólido urbano
Glucosa
Butanol

FIG. 7

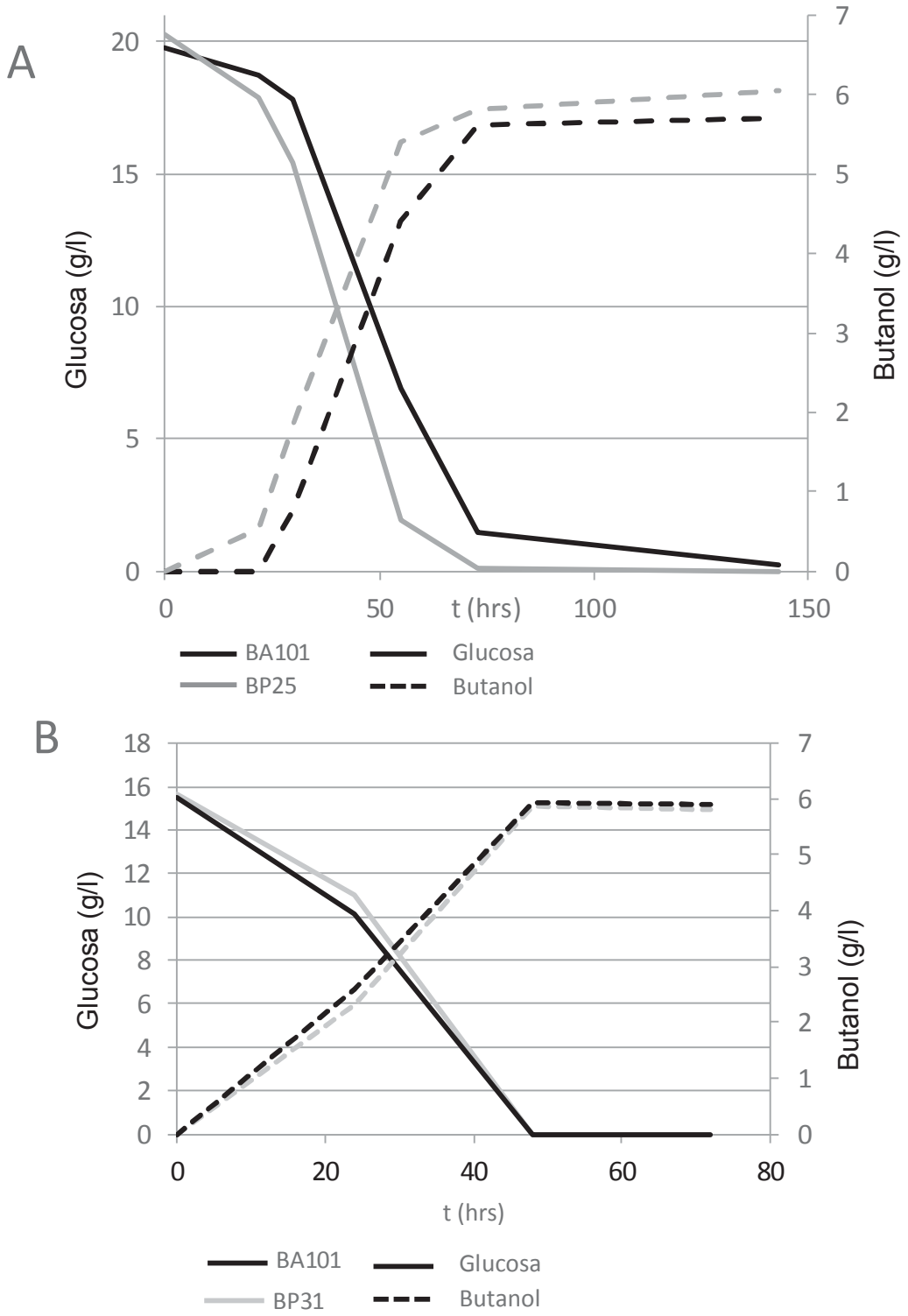

A
Glucosa (g/l)
Butanol (g/l)
t (hrs)
BA101
BP25
Glucosa
Butanol
B
Glucosa (g/l)
Butanol (g/l)
t (hrs)
BA101
BP31
Glucosa
Butanol

FIG. 8

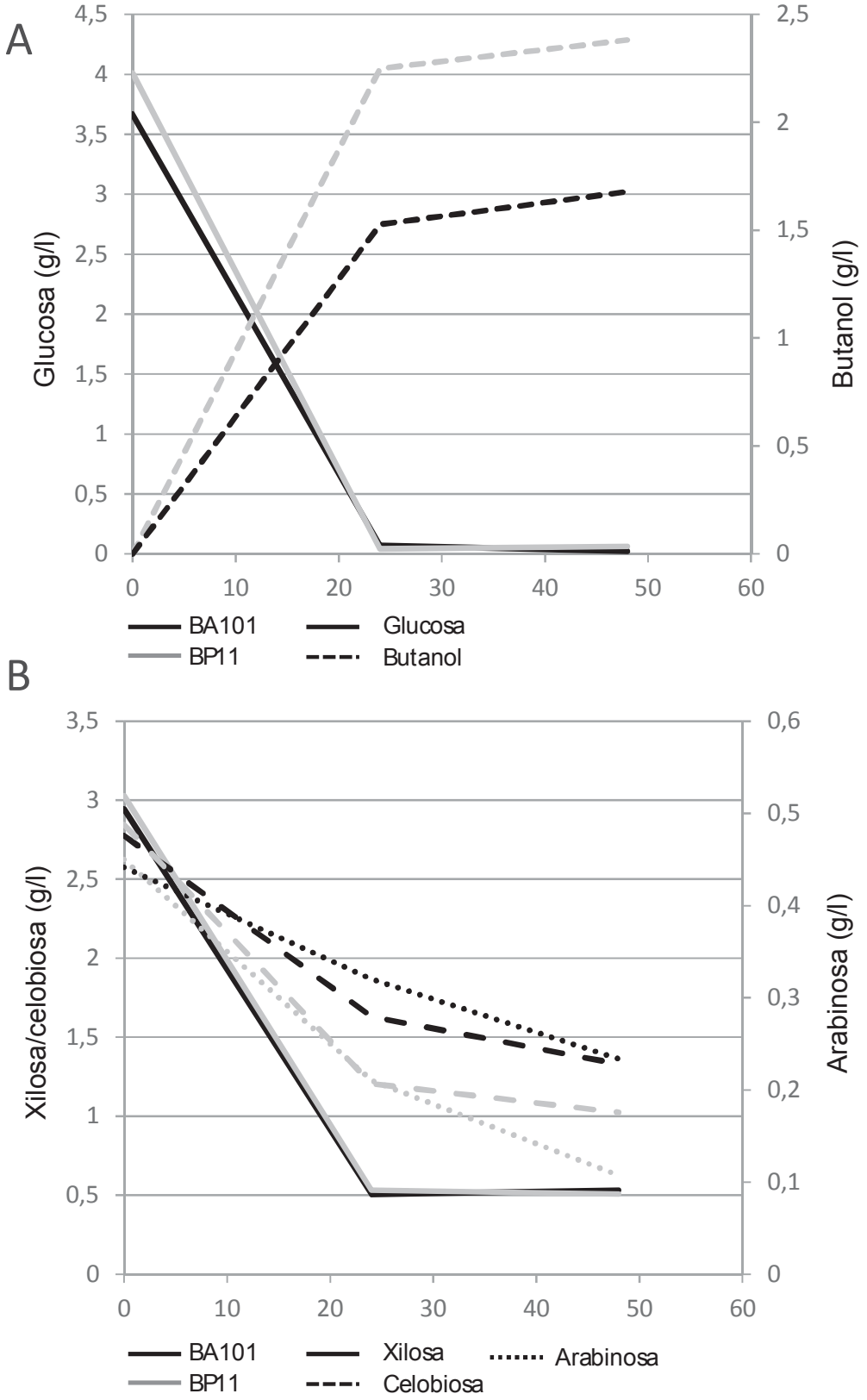
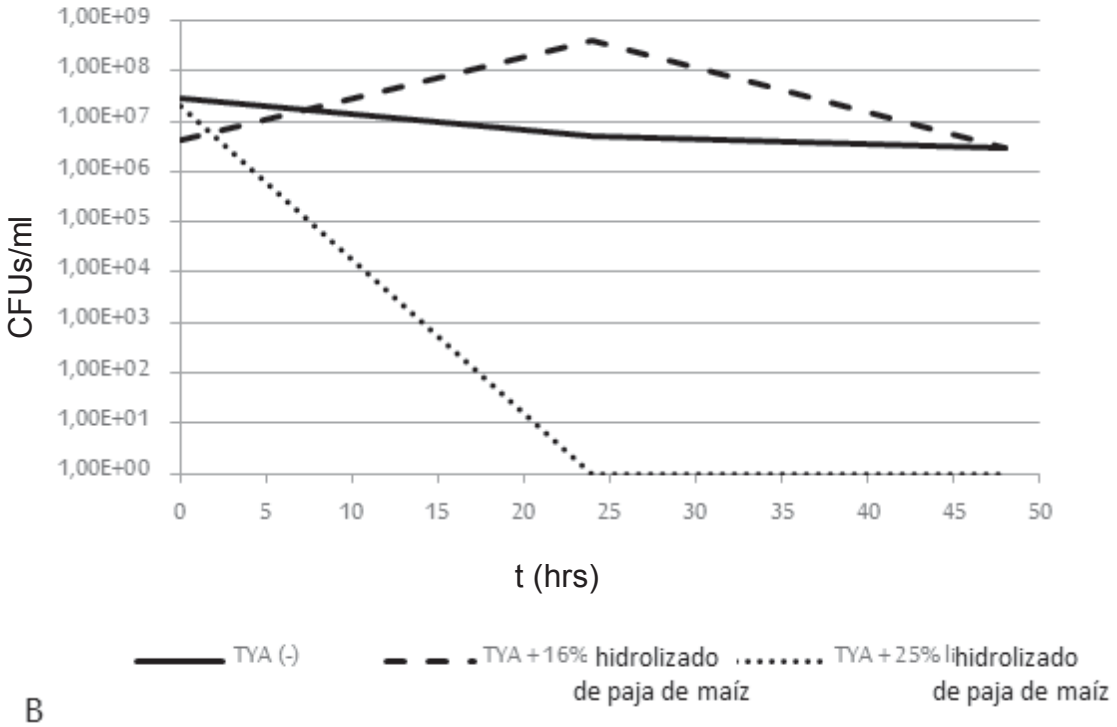

A
Glucosa (g/l)
Butanol (g/l)
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
10
20
30
40
50
60
BA101
BP11
Glucosa
Butanol
B
Xilosa/celobiosa (g/l)
Arabinosa (g/l)
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
10
20
30
40
50
60
BA101
BP11
Xilosa
Celobiosa
Arabinosa

FIG. 9

A



B

Producto (g/l)	wt (1) t0	wt (2) t0	wt (1) t72	wt (2) t72
Celobiosa	0,68309149	0,669238784	0,00000	0,00000
Xilobiosa	1,4369277	1,407787621	0,187685253	0,297485462
Glucosa	10,231229	10,0237455	0,00000	0,00000
Xilosa	6,62514203	6,490787923	1,919415942	1,935945775
Arabinosa	0,89856466	0,88034228	0,360345285	0,450701705

FIG. 10

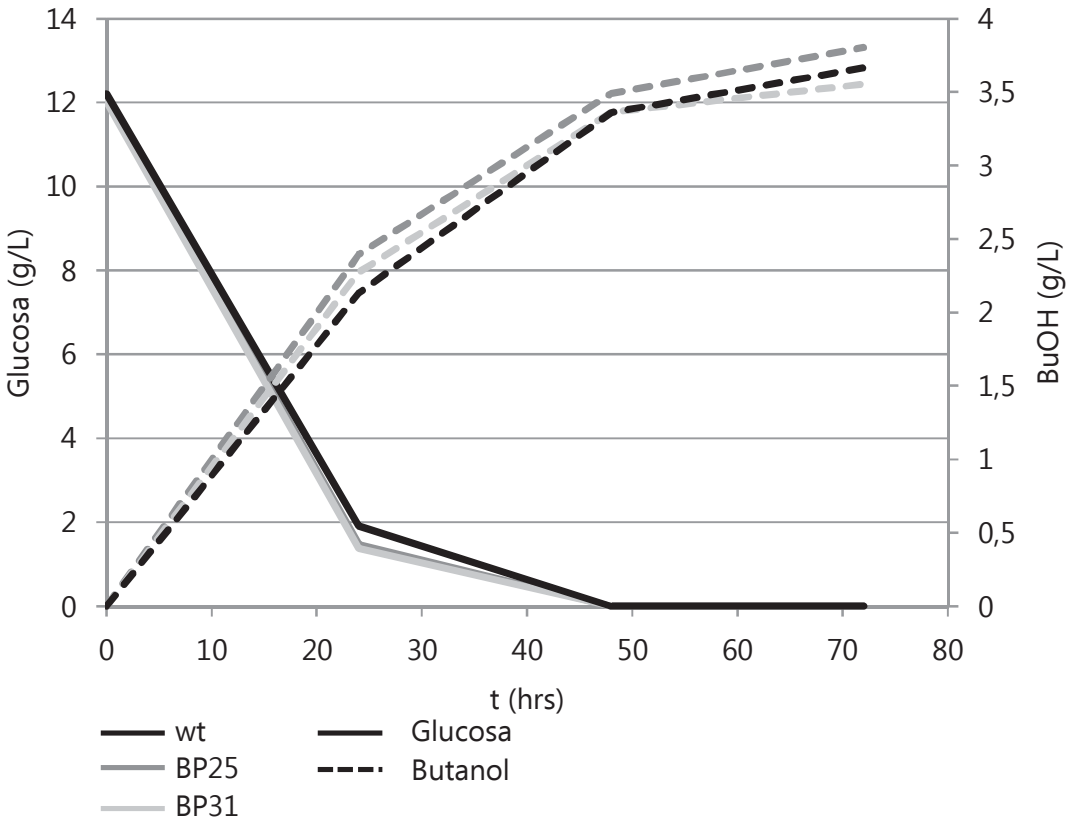
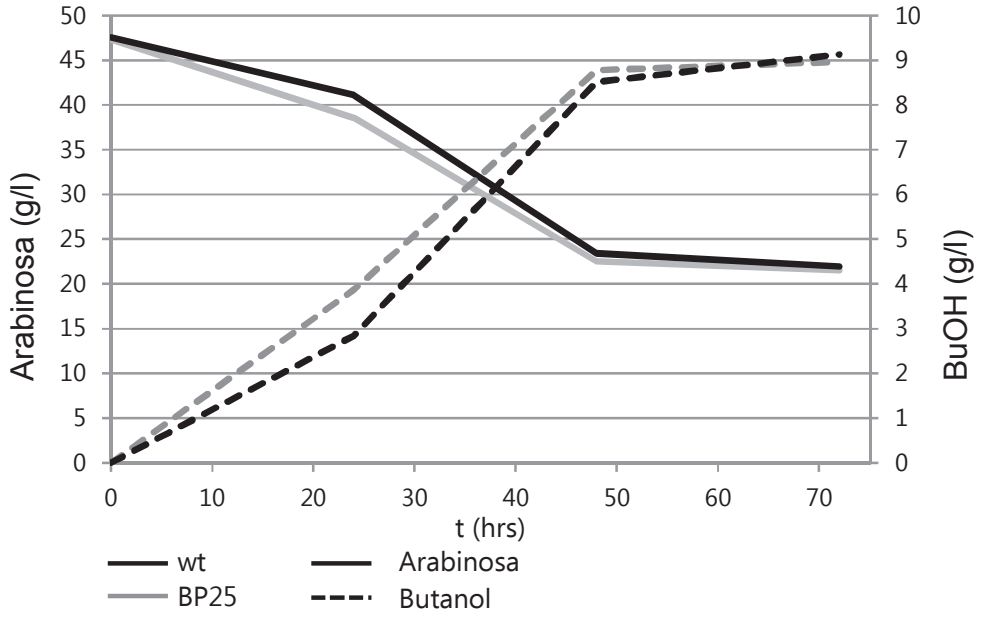

14
12
10
8
6
4
2
0
Glucosa (g/L)
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
BuOH (g/L)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
t (hrs)
wt
BP25
BP31
Glucosa
Butanol

FIG. 11

A


Arabinosa (g/l)
BuOH (g/l)
t (hrs)
wt
BP25
Arabinosa
Butanol

B

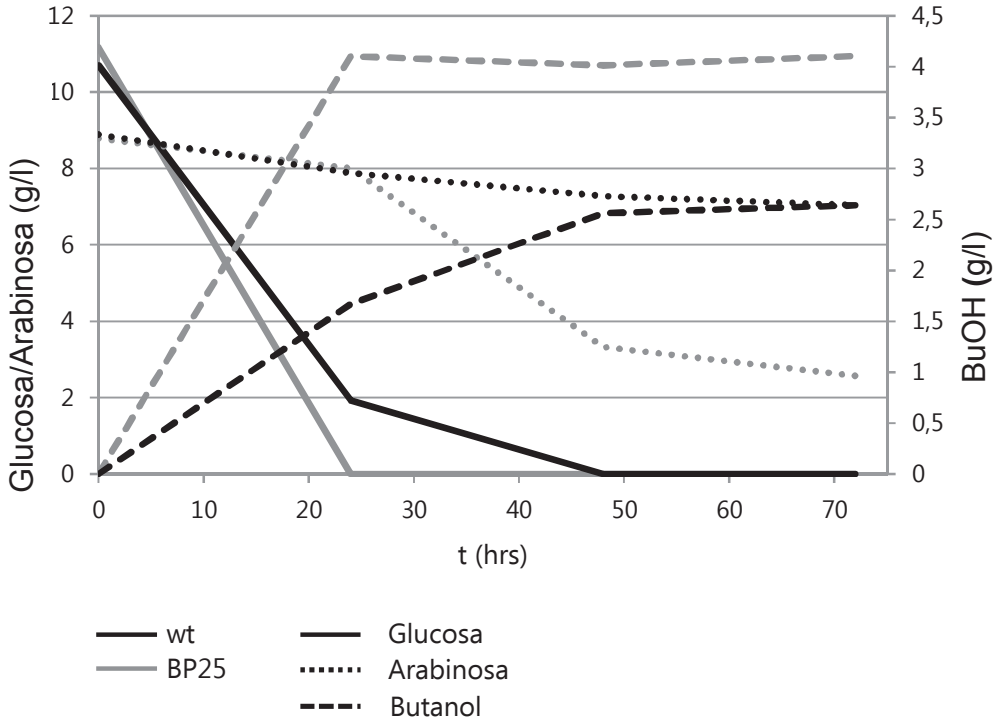

Glucosa/Arabinosa (g/l)
BuOH (g/l)
t (hrs)
wt
BP25
Glucosa
Arabinosa
Butanol

FIG. 12

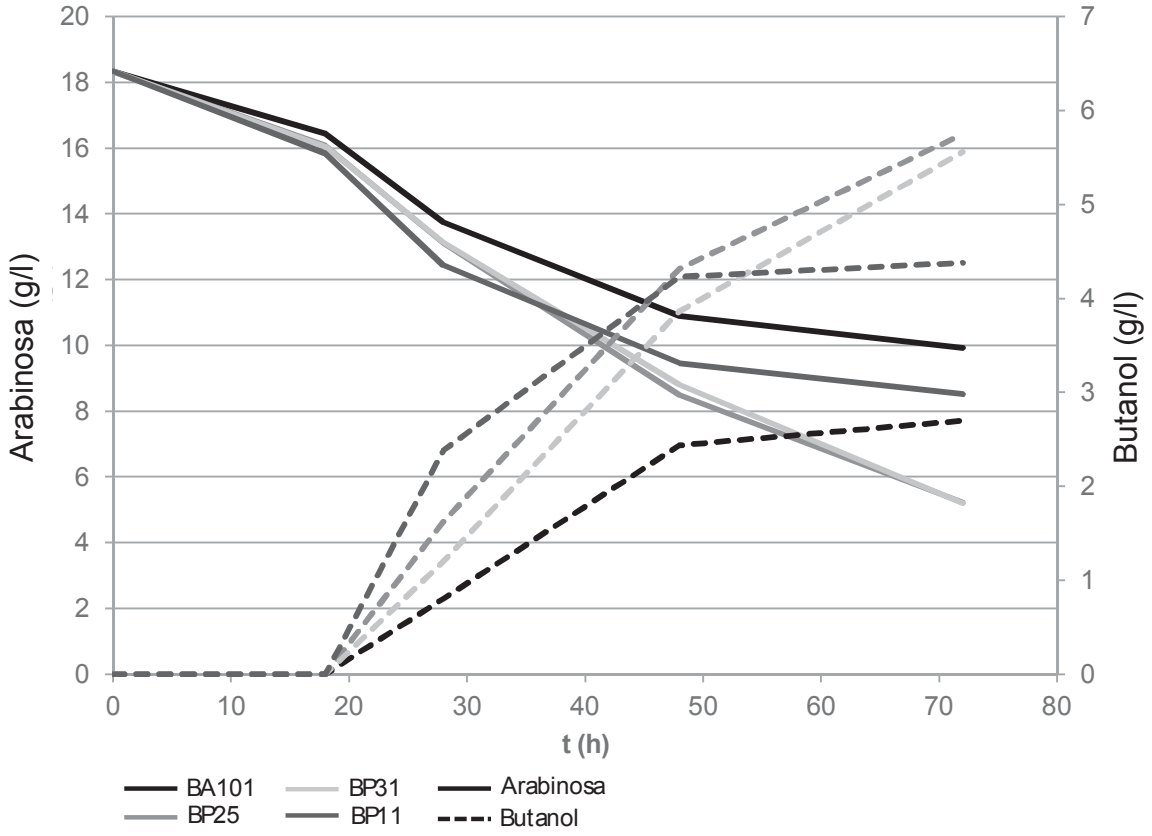
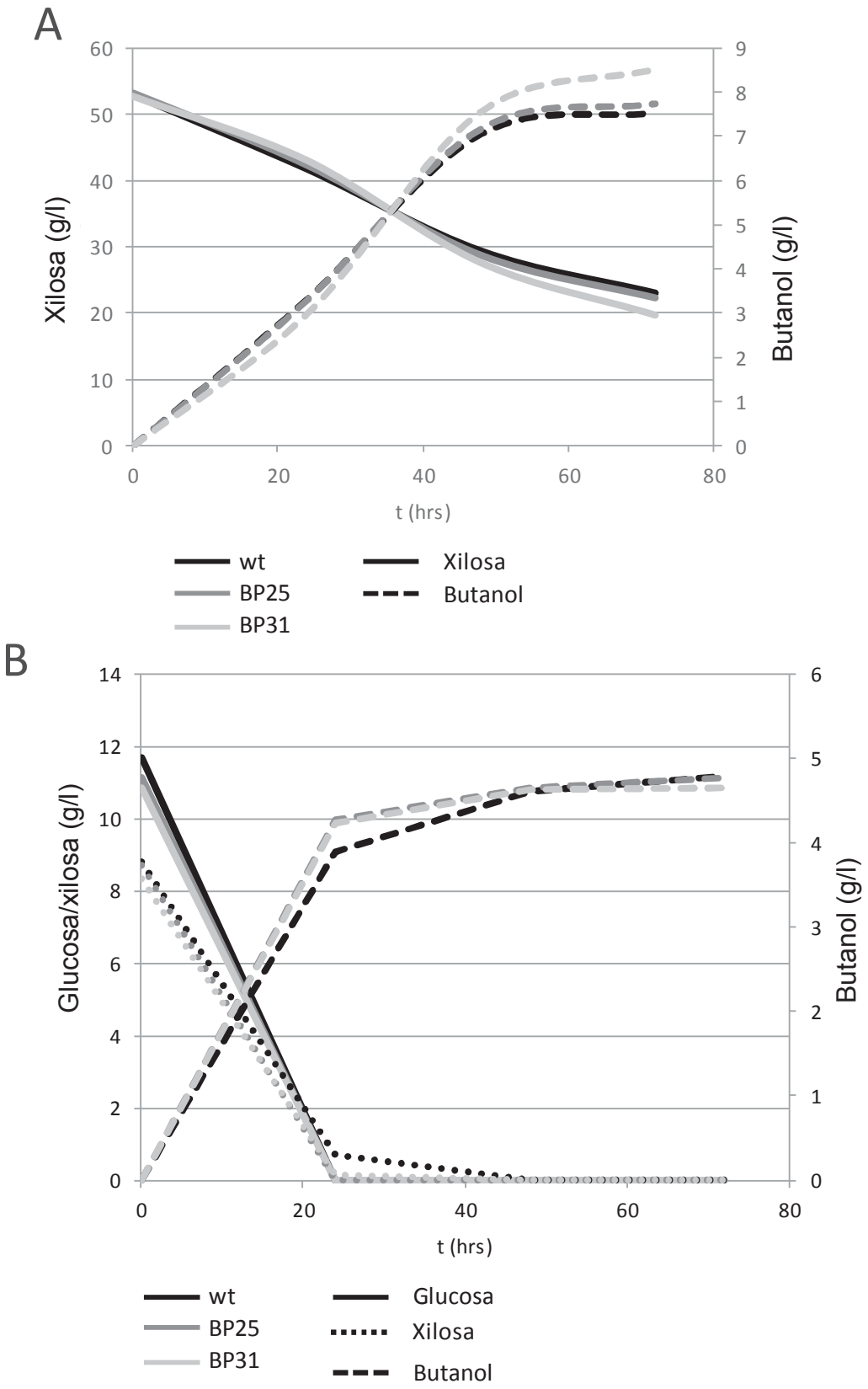

Arabinosa (g/l)
Butanol (g/l)
t (h)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
1
2
3
4
5
6
7
0
10
20
30
40
50
60
70
80
BA101
BP25
BP31
BP11
Arabinosa
Butanol

FIG. 13


A
Xilosa (g/l)
Butanol (g/l)
t (hrs)
wt
BP25
BP31
Xilosa
Butanol
B
Glucosa/xilosa (g/l)
Butanol (g/l)
t (hrs)
wt
BP25
BP31
Glucosa
Xilosa
Butanol

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201730779

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 07.06.2017

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9851813 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS [US/US]) 19/11/1998, todo el documento.	1-22
A	WO 2016192871 A1 (IFP ENERGIES NOUVELLES [FR/FR] & STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK [-/NL]) 08/12/2016, página 3, línea 3 - página 4, línea 21.	1-22
A	WO 2012035420 A1 (ENI S.P.A. [IT/IT]) 22/03/2012, Página 7, línea 21 – página 9, línea 114.	1-22
A	ES 2016038 A6 (INSTITUT FRANÇAIS DU PÉTROLE) 01/10/1990, columna 1, líneas 20-67.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
18.12.2017	M. D. García Grávalos	1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P7/16 (2006.01)
C12P7/28 (2006.01)
C12P7/06 (2006.01)
C12R1/145 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.