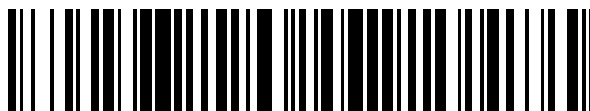


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 198**

51 Int. Cl.:

C12P 7/18 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2010 PCT/EP2010/056078**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10128070**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2010 E 10716352 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 2427562**

54 Título: **Cultivo continuo para la producción de 1,3-propanodiol que utiliza una concentración de glicerina elevada**

30 Prioridad:

05.05.2009 EP 09159401
05.05.2009 US 175564 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.05.2020

73 Titular/es:

METABOLIC EXPLORER (100.0%)
Biopole Clermont-Limage
63360 Saint Beuzire, FR

72 Inventor/es:

CHATEAU, MICHEL;
DUBOIS, JEAN-YVES y
SOUCAILLE, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 762 198 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

Cultivo continuo para la producción de 1,3-propanodiol que utiliza una concentración de glicerina elevada.

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de 1,3-propanodiol que comprende el cultivo de un microorganismo en un medio de cultivo con un contenido elevado de glicerina. La invención se refiere además a un nuevo microorganismo, o cepa de microorganismo, adaptado para la producción de 1,3-propanodiol a partir de un medio que comprendía un elevado contenido de glicerina. La invención se refiere además a un "microorganismo adaptado" el metabolismo de glicerol del cual se refiere a la producción de 1,3-propanodiol, y que se deja crecer en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial. La exposición se refiere además a 1,3-propanodiol de origen biológico obtenido mediante el procedimiento de la invención. Finalmente, la exposición se refiere a la utilización del 1,3-propanodiol de origen biológico como extensor de cadena en poliuretano termoplástico, como monómeros en tereftalato de polítrimetileno y como componente en formulaciones cosméticas.

15

Antecedentes de la invención

El 1,3-propanodiol (PDO) es uno de los productos de fermentación más antiguos que se conocen. Fue identificado fiablemente por primera vez en 1881 por August Freund, en un cultivo mixto fermentador de glicerol que contenía evidentemente *Clostridium pasteurianum* como el organismo activo. El análisis cuantitativo de la fermentación de diferentes enterobacterias productoras de PDO (trimetilglicol, propilenglicol) se inició en la escuela de microbiología de Delft en 1928 y se continuó con éxito en Ames, Iowa en los años 1940. En los años 1960, el interés se desplazó a los enzimas atacantes del glicerol, en particular a glicerol deshidratasa y diol deshidratasa, ya que estos enzimas eran peculiares en que requerían coenzima B12. Los clostridios formadores de PDO se describieron por primera vez en 1983 como parte de un procedimiento para obtener un producto especializado a partir de algas excretoras de glicerol (Nakas et al., 1983). El PDO es un producto típico de la fermentación del glicerol y no se ha encontrado en conversiones anaeróbicas de otros sustratos orgánicos. Sólo unos pocos organismos, todos ellos bacterias, son capaces de producirlo. Entre ellos se incluyen enterobacterias de los géneros *Klebsiella* (*K. pneumoniae*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*) y *Citrobacter* (*C. freundii*), lactobacilos (*L. brevis* y *L. buchneri*) y clostridios del grupo de *C. butyricum* y *C. pasteurianum*.

El análisis de los productos de fermentación muestra que parte del glicerol se convierte en los mismos productos que en la fermentación del azúcar de estas diferentes especies, es decir ácido acético, 2,3-butanodiol, ácido butírico, ácido láctico, etanol y ácido succínico. Esta conversión proporciona la energía necesaria para el crecimiento, aunque, para muchos de los productos, asimismo se liberan equivalentes reductores, los cuales se utilizan en una conversión reductora del glicerol en PDO. La formación de butirato, que reduce el rendimiento de PDO en clostridios, es comparable en cierto modo a la formación de etanol en *Klebsiella*, aunque aparentemente es más dependiente de la tasa de crecimiento. El butirato se reduce rápidamente con la tasa de dilución, incluso en ausencia de exceso de sustrato. En cualquier caso, los cambios en la proporción de acetato/butirato no presentan un impacto tan grande sobre el rendimiento de PDO.

El PDO, como compuesto orgánico bifuncional, podría utilizarse potencialmente para muchas reacciones de síntesis, en particular como monómero para policondensaciones para producir poliésteres, poliéteres y poliuretanos. El PDO puede producirse mediante diferentes rutas químicas, aunque generan corrientes de residuos que contienen sustancias extremadamente contaminantes y en este caso el coste de producción es elevado y el PDO producido químicamente no puede competir con los dioles disponibles petroquímicamente como 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol y 1,4-butanodiol. Por lo tanto, en el pasado el PDO sólo ha encontrado aplicaciones muy concretas de volumen de mercado despreciable. Este es el motivo de que en 1995 Dupont iniciase un programa de investigación para la conversión biológica de la glucosa en PDO. Aunque este procedimiento es medioambientalmente respetuoso, presenta la desventaja de que: i) utiliza vitamina B12, que es un cofactor muy caro, e ii) es un procedimiento discontinuo debido a la inestabilidad de la cepa productora. Debido a la disponibilidad de grandes cantidades de glicerol emitidas por la industria del biodiésel, un procedimiento continuo libre de vitamina B12 con un rendimiento más elevado de carbono resultaría ventajoso.

Es conocido de la técnica que el PDO puede producirse a partir de glicerina, un producto secundario no deseado de la producción de biodiésel que contiene aproximadamente 80-85% de glicerol mezclado con sales y agua.

Se ha descrito anteriormente que *C. butyricum* es capaz de crecer y producir PDO a partir del glicerol industrial en fermentaciones por lotes y continuas en dos etapas (Papanikolaou et al., 2000). Sin embargo, a la concentración de glicerol más alta, el título de PDO máximo obtenido era de 48.1 g/l a una tasa de dilución de 0.02 h⁻¹, suponiendo una productividad de 0.9 g/l/h. Los cultivos se llevaron a cabo con una concentración máxima de glicerol en el medio alimentado de 90 g/l y en presencia de extracto de levadura, un compuesto costoso que contiene nitrógeno orgánico que es conocido por el experto en la materia que ayuda a incrementar la producción bacteriana de biomasa.

65

El documento nº WO2006/128381 da a conocer la utilización de dicha glicerina para la producción de PDO con

cultivos por lotes y alimentados por lotes utilizando organismos productores de PDO naturales, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *C. butyricum* o *C. pasteuricum*. Además, el medio utilizado en el documento nº WO2006/128381 asimismo contiene extracto de levadura. Tal como se indica en dicha solicitud de patente, la productividad máxima alcanzada estaba comprendida entre 0.8 y 1.1 g.l.h⁻¹.

El rendimiento de una cepa de *C. acetobutylicum* modificada para contener la glicerol-deshidratasa independiente de vitamina B12 y la PDO-deshidrogenasa de *C. butyricum*, denominada *C. acetobutylicum* DG1 pSPD5 ha sido descrito en González-Pajuelo et al., 2005. Esta cepa crece y produce originalmente PDO con un medio alimentado que contiene hasta 120 g l⁻¹ de glicerol puro. Además, los análisis con un medio alimentado que contenía un máximo de 60 g l⁻¹ de glicerol puro o industrial no identificaron ninguna diferencia. Al comparar *C. butyricum* con *C. acetobutylicum* DG1 pSPD5, los autores González-Pajuelo et al. (2006) observaron un comportamiento global similar.

Sin embargo, la misma cepa *C. acetobutylicum* DG1 pSPD5 sometida a ensayo con 105 g l⁻¹ de glicerol industrial en un medio alimentado sintético sin nitrógeno orgánico no pudo proporcionar los mismos rendimientos que con la misma concentración de glicerol puro (ver el ejemplo 1).

La presente invención proporciona unos medios para la producción de 1,3-propanodiol con una concentración elevada de glicerina industrial y en los que puede conseguirse un título y productividad de PDO más elevados.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de 1,3-propanodiol en un proceso de fermentación continua de glicerina, que comprende cultivar una cepa de *Clostridium* modificada genéticamente para presentar su metabolismo del glicerol dirigido a la producción de 1,3-propanodiol en un medio de cultivo, y recuperar el 1,3-propanodiol, caracterizado por que el medio de alimentación comprende una concentración elevada de glicerina industrial, siendo dicha glicerina industrial un producto secundario de la producción de biodiésel y comprendiendo más de 70% de glicerol, estando presente dicho glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l y estando comprendida la tasa de dilución entre 0.005 y 0.1 h⁻¹, y en el que la cepa de *Clostridium* está previamente adaptada al crecimiento en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial mediante un cultivo continuo a una tasa de dilución comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹ en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial en el medio de alimentación, comprendiendo dicha glicerina industrial más de 70% de glicerol, encontrándose presente dicho glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l, y en el que dicho medio de cultivo no contiene ninguna fuente de nitrógeno orgánico.

En formas de realización preferidas, el glicerol se encuentra presente a una concentración de aproximadamente 105 g/l.

El medio de cultivo es preferentemente un medio sintético, y en particular sin extracto de levadura.

La cepa de *Clostridium* modificada genéticamente para presentar su metabolismo del glicerol dirigido a la producción de 1,3-propanodiol es preferentemente *Clostridium acetobutylicum*.

En una forma de realización preferida, la actividad de glicerol deshidratasa en la cepa de *Clostridium* modificada genéticamente es independiente de la presencia de coenzima B12 o uno de sus precursores y deriva de *Clostridium butyricum*.

Preferentemente, la cepa modificada genéticamente de *Clostridium* se ha adaptado previamente al crecimiento en el medio de cultivo que presenta una concentración elevada de glicerina industrial, mediante el cultivo del microorganismo sobre un medio de cultivo que comprende una concentración elevada de glicerina industrial a una tasa de dilución baja comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹ y la selección del microorganismo adaptado.

Finalmente, se purifica adicionalmente el 1,3-propanodiol.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la modificación de un microorganismo del género *Clostridium* en un microorganismo adaptado para crecer en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial, siendo dicha glicerina industrial un producto secundario de la producción de biodiésel y comprendiendo más de 70% de glicerol, comprendiendo dicho procedimiento cultivar continuamente el microorganismo sobre un medio de cultivo que no contiene ninguna fuente de nitrógeno orgánico, comprendiendo el medio de alimentación una concentración elevada de glicerina industrial, encontrándose presente el glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l, y siendo alimentado a una tasa de dilución baja comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹ y durante un periodo comprendido entre 24 horas y 10 días, y seleccionando el microorganismo adaptado capaz de crecer sobre el medio de cultivo que presenta una concentración elevada de glicerina industrial.

El microorganismo se cultiva a una tasa de dilución baja durante un periodo comprendido entre 24 horas y 10 días, preferentemente superior a 2 días, más preferentemente de aproximadamente 8 días.

La tasa de dilución está comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹, preferentemente de entre 0.005 y 0.02 h⁻¹. La tasa de dilución puede modificarse durante el procedimiento de adaptación, finalmente con una primera etapa comprendida entre 0.005 y 0.02 h⁻¹ y una segunda etapa en la que se incrementa la tasa de dilución hasta 0.1 h⁻¹, preferentemente 0.06 h⁻¹.

La presente invención se refiere además a un microorganismo adaptado, un microorganismo productor del género *Clostridium* modificado genéticamente para que su metabolismo del glicerol esté dirigido a la producción de 1,3-propanodiol adaptada para crecer en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial obtenible mediante el procedimiento dado a conocer anteriormente y a continuación en la presente memoria.

La exposición se refiere además a 1,3-propanodiol de origen biológico obtenido mediante el procedimiento de la invención. La exposición se refiere además a un 1,3-propanodiol de origen biológico caracterizado por una combinación de valores isotópicos de ¹³C y ¹⁸O seleccionados de $\delta^{13}\text{C}$ inferior a -34 ‰ y $\delta^{18}\text{O}$ inferior a 21.9 ‰ y 0.5 ‰, preferentemente $\delta^{13}\text{C}$ es inferior a -35 ‰ y $\delta^{18}\text{O}$ está comprendido entre 21.9 ‰ y 0.5 ‰, más preferentemente $\delta^{13}\text{C}$ está comprendido entre -35.05 ‰ y -36.0 ‰ y $\delta^{18}\text{O}$ está comprendido entre 21.9 ‰ y 17.34 ‰.

El 1,3-propanodiol de origen biológico se caracteriza por un valor de la proporción isotópica $\delta^{13}\text{C}/\delta^{18}\text{O}$ comprendido entre -2 y 0, preferentemente entre -1 y -0.2, y más preferentemente entre -0.65 y -0.4.

La presente exposición se refiere además a la utilización de 1,3-propanodiol de origen biológico obtenido mediante el procedimiento de la invención, o tal como se ha definido anteriormente, como un extensor de cadena en poliuretano termoplástico, como monómeros en tereftalato de politrimetileno o como un componente en formulaciones cosméticas.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la producción de 1,3-propanodiol en un proceso de fermentación continua de glicerina, que comprende cultivar una cepa de *Clostridium* modificada genéticamente para presentar su metabolismo del glicerol dirigido a la producción de 1,3-propanodiol en un medio de cultivo, y recuperar el 1,3-propanodiol, caracterizado por que el medio de alimentación comprende una concentración elevada de glicerina industrial, siendo dicha glicerina industrial un producto secundario de la producción de biodiésel y comprendiendo más de 70% de glicerol, estando presente dicho glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l y estando comprendida la tasa de dilución entre 0.005 y 0.1 h⁻¹, y en el que la cepa de *Clostridium* está previamente adaptada al crecimiento en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial mediante un cultivo continuo a una tasa de dilución comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹, comprendiendo dicha glicerina industrial más de 70% de glicerol, encontrándose presente dicho glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l, y en el que dicho medio de cultivo no contiene ninguna fuente de nitrógeno orgánico.

La cepa de *Clostridium* es preferentemente *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium butyricum*.

El término "*Clostridium*" se refiere a todo tipo de bacterias pertenecientes a esta familia o género.

La expresión "cepa productora de *Clostridium*" o "cepa productora de *Clostridium*" se refiere a un microorganismo o a una cepa de microorganismo en la que el metabolismo del glicerol está dirigido a la producción de 1,3-propanodiol.

Un "microorganismo que se ha adaptado" se refiere a un microorganismo que ha sido modificado para poder crecer bajo concentraciones elevadas de glicerina industrial.

Un "medio de cultivo apropiado" o un "medio de cultivo" se refiere a un medio de cultivo optimizado para el crecimiento y la producción de diol de la cepa productora.

Las expresiones "contenido elevado de glicerina" o "concentración elevada de glicerina" se refiere a que el medio de cultivo comprende glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l, preferentemente aproximadamente 105 g/l.

La expresión "glicerina industrial" se refiere a un producto de glicerina obtenido a partir de un procedimiento industrial sin purificación sustancial. La glicerina industrial asimismo puede denominarse "glicerina en bruto", "glicerol en bruto" o "glicerol industrial". La glicerina industrial contiene más de aproximadamente 70% de glicerol, preferentemente más de aproximadamente 80%, menos de 15% de agua e impurezas, tales como sales minerales y ácidos grasos. La concentración de sales minerales es inferior a 10%, preferentemente inferior a 5%. La concentración de ácidos grasos es inferior a 20%, preferentemente inferior a 5%. Los ácidos grasos más representados en la glicerina industrial son el ácido palmítico, el ácido esteárico, el ácido oleico, el ácido linoléico, el ácido linoleico y el ácido araquídico.

Los procedimientos industriales a partir de los que se obtiene glicerina industrial son, entre otros, procedimientos de fabricación en los que se procesan grasas y aceites, particularmente grasas y aceites de origen vegetal, para formar productos industriales, tales como detergentes o lubricantes. En dichos procedimientos de fabricación, la glicerina industrial se considera un producto secundario.

En una forma de realización particular, la glicerina industrial comprende impurezas conocidas de glicerina obtenidas a partir de la producción del biodiésel, que comprenden aproximadamente 80% a 85% de glicerol con sales, agua y algunos otros compuestos orgánicos, tales como ácidos grasos. La glicerina industrial obtenida de la producción del biodiésel no se ha sometido a etapas de purificación adicionales.

La expresión “medio sintético” se refiere a un medio de cultivo que comprende un sustrato definido químicamente sobre el que se cultivan organismos.

En el medio de cultivo de la presente invención, el glicerol es ventajosamente la única fuente de carbono. Este medio de cultivo no contiene ninguna fuente de nitrógeno orgánico. El nitrógeno es un elemento natural que resulta esencial para el crecimiento y la reproducción en tanto plantas como animales. Se encuentra en los aminoácidos y en muchos otros compuestos orgánicos e inorgánicos. La expresión “nitrógeno orgánico” se refiere, según la invención, a un compuesto orgánico que comprende nitrógeno obtenido a partir de organismos vivos. Las fuentes habituales de nitrógeno orgánico para el cultivo bacteriano comprenden extracto de levadura.

En una forma de realización preferida, la cepa de *Clostridium* es *Clostridium acetobutylicum*.

La expresión “una cepa de *Clostridium* modificada genéticamente” se refiere a que la cepa ha sido transformada con el objetivo de modificar sus características genéticas. Los genes endógenos pueden atenuarse, eliminarse o sobreexpresarse. Pueden introducirse genes exógenos, transportados mediante un plásmido, o integrarse en el genoma de la cepa, para la expresión en la célula.

El término “plásmido” o “vector” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un elemento extracromosómico que con frecuencia es portador de genes que no son parte del metabolismo central de la célula y habitualmente se encuentran en forma de moléculas de ADN circular de doble cadena.

En otra forma de realización de la invención, el procedimiento se caracteriza por que la cepa modificada genéticamente de *Clostridium* presenta una actividad de glicerol deshidratasa que es independiente de la presencia de coenzima B12 o uno de sus precursores, y que se deriva de *Clostridium butyricum*.

En particular, la cepa modificada genéticamente de *Clostridium* presenta un flujo incrementado de producción de 1,3-propanodiol mediante la introducción de copias adicionales del operón del 1,3-propanodiol procedentes de *C. butyricum* (codificantes para enzimas que participan en la ruta del 1,3-propanodiol independiente de vitamina B12) sobreexpresadas por un plásmido o integradas en el cromosoma del microorganismo. Por ejemplo, el plásmido pSPD5 puede utilizarse para la sobreexpresión del operón del 1,3-propanodiol.

Los procedimientos para dirigir el metabolismo del glicerol hacia la producción de 1,3-propanodiol son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, el documento nº WO2006/128381; González-Pajuelo et al., 2006).

En la presente invención, la cepa productora de *Clostridium* ha sido previamente adaptada al crecimiento en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial. Dicha “adaptación” de la cepa productora de *Clostridium* se obtiene mediante cultivo continuo de la cepa de *Clostridium* a una tasa de dilución comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹ en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial en el medio de alimentación, comprendiendo dicha glicerina industrial más de 70% de glicerol, estando presente dicho glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l y seleccionando el microorganismo adaptado para el crecimiento en el medio de cultivo que presenta una concentración elevada de glicerina industrial.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la modificación de un microorganismo del género *Clostridium* en un microorganismo adaptado para crecer en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial.

El experto en la materia podrá seleccionar varios “procedimientos de adaptación” para la transformación del microorganismo productor en un microorganismo productor que permita el crecimiento en presencia de una concentración de elevada de glicerina industrial.

Según la presente invención, la modificación de un microorganismo del género *Clostridium* en un microorganismo adaptado para crecer en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial, siendo un producto secundario de la producción de biodiésel y comprendiendo más de 70% de glicerol, comprende cultivar continuamente el microorganismo sobre un medio de cultivo que no contiene ninguna fuente de nitrógeno orgánico, comprendiendo el medio de alimentación una concentración elevada de glicerina industrial, encontrándose presente el glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l, y siendo alimentado a una tasa de dilución

baja comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹ y durante un periodo comprendido entre 24 horas y 10 días, y seleccionando el microorganismo adaptado capaz de crecer sobre el medio de cultivo que presenta una concentración elevada de glicerina industrial.

- 5 El microorganismo se cultiva a una tasa de dilución baja durante un periodo comprendido entre 24 horas y 10 días, preferentemente superior a 2 días, más preferentemente de aproximadamente 8 días.

10 La tasa de dilución está comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹, preferentemente de entre 0.005 y 0.02 h⁻¹. La tasa de dilución puede modificarse durante el procedimiento de adaptación, finalmente con una primera etapa comprendida entre 0.005 y 0.02 h⁻¹ y una segunda etapa en la que se incrementa la tasa de dilución hasta 0.1 h⁻¹, más preferentemente 0.06 h⁻¹. Al modificar la tasa de dilución durante el procedimiento de adaptación, las tasas de dilución entre 0.005 y 0.02 h⁻¹ se denominan “tasas de dilución bajas”, mientras que las tasas de dilución de entre 0.02 y 0.1 h⁻¹ son tasas de dilución habituales.

15 La invención se refiere además a un microorganismo del género *Clostridium* modificado genéticamente para que su metabolismo del glicerol esté dirigido a la producción de 1,3-propanodiol, adaptado para el crecimiento en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial y en un medio de cultivo que no contiene ninguna fuente de nitrógeno orgánico susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento indicado anteriormente, siendo dicha glicerina industrial un producto secundario de la producción de biodiésel y comprendiendo más de 70% de glicerol, y encontrándose presente el glicerol de un cultivo continuo en el medio de alimentación a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l.

20 El microorganismo adaptado mediante el procedimiento de la presente invención es preferentemente un microorganismo productor adaptado adicionalmente para el crecimiento en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial

25 Dicho microorganismo adaptado asimismo puede ser un microorganismo adaptado en primer lugar al crecimiento en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial, modificado adicionalmente para que su metabolismo del glicerol esté dirigido a la producción de 1,3-propanodiol.

30 El “microorganismo adaptado” según la invención es un microorganismo producto adaptado para el crecimiento en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial y presenta dos características esenciales:

- 35
- su metabolismo del glicerol está dirigido a la producción de 1,3-propanodiol, y
 - puede crecer en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial tal como se define en la presente memoria.

40 En una forma de realización específica de la invención, la cepa *C. acetobutylicum* DG1 pSPD5 se cultiva en cultivo continuo mediante la utilización de un medio de alimentación que contiene 105 g l⁻¹ de glicerol en bruto procedente de la producción de biodiésel a una tasa de dilución baja comprendida entre 0.005 y 0.02 h⁻¹, preferentemente 0.02 h⁻¹. Durante un periodo máximo de 10 días, preferentemente de entre 5 y 8 días, la cepa se adapta a la concentración elevada de glicerina presente en el medio de alimentación y la tasa de dilución puede incrementarse hasta 0.1 h⁻¹, preferentemente hasta 0.06 h⁻¹ (ver el ejemplo 2).

45 El incremento gradual de la tasa de dilución puede llevarse a cabo entre el final de la etapa de lotes y 10 días, preferentemente tras 5 días, entre 5 y 8 días, aproximadamente 7 días, dando como resultado una productividad mejorada del cultivo continuo (ver el ejemplo 3).

50 Ventajosamente, después de la etapa de adaptación, la concentración de glicerol en el medio de alimentación puede incrementarse hasta 120 g.l⁻¹. Sin embargo, no resulta posible el intento directo de adaptar la cepa con 120 g l⁻¹ de glicerol industrial, incluso a una tasa de dilución de 0.02 h⁻¹ con una concentración de glicerol de 105 g l⁻¹, nuevamente demostrando que la cepa no es capaz de crecer en presencia de una concentración elevada de glicerina en el medio de alimentación sin adaptación previa.

55 El procedimiento de la invención mediante la utilización de un microorganismo modificado genéticamente y de medio sin fuente adicional de nitrógeno orgánico conduce a la producción de 1,3-propanodiol con un rendimiento comprendido entre 0.4 y 0.6 g.g⁻¹ y una productividad comprendida entre 1.8 y 3.5 g.l⁻¹.h⁻¹ para una tasa de dilución comprendida entre 0.05 y 0.6 g h⁻¹. Preferentemente, el rendimiento está comprendido entre 0.5 y 0.56 g.g⁻¹ y la productividad, entre 2 y 2.9 g.l⁻¹.h⁻¹.

60 En un aspecto específico de la invención, el 1,3-propanodiol producido se purifica adicionalmente.

65 Los procedimientos de fermentación continua son conocidos por el experto en la materia.

El proceso de fermentación se lleva a cabo generalmente en reactores con un medio de cultivo inorgánico de composición definida conocida adaptado a las bacterias utilizadas, que contiene por lo menos glicerina, un producto secundario de la producción del biodiésel que contiene glicerol, y en caso necesario, un cosustrato para la producción del metabolito.

Este procedimiento de la invención se lleva a cabo como procedimiento continuo. El experto en la materia conoce cómo controlar cada una de dichas condiciones experimentales y cómo definir las condiciones de cultivo para los microorganismos según la invención. En clostridios particulares, se fermenta a una temperatura de entre 20°C y 60°C, preferentemente de entre 25°C y 40°C para *C. acetobutlicum*.

Los procedimientos para recuperar y finalmente purificar el 1,3-propanodiol a partir de un medio de fermentación son conocidos por el experto en la materia. El 1,3-propanodiol puede aislarse mediante destilación. En la mayoría de formas de realización, el 1,3-propanodiol se destila a partir del medio de fermentación con un producto secundario, tal como acetato, y después se purifica adicionalmente mediante procedimientos conocidos.

La presente exposición se refiere además a 1,3-propanodiol de origen biológico obtenido según el procedimiento mencionado anteriormente.

La presente exposición se refiere además a 1,3-propanodiol de origen biológico caracterizado por sus proporciones isotópicas. El análisis de las proporciones isotópicas de hidrógeno (D/H) y carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) proporciona autenticidad a productos específicos, tales como la miel (Grenier-Loustalot et al., 2006) o el vino (Guillou et al, 2001). La proporción $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ proporciona indicadores para la discriminación de las fuentes y refleja la ruta metabólica biosintética del producto específico y la materia prima utilizada. En efecto, podría diferenciarse entre plantas C3, que utilizan el ciclo fotosintético de Calvin-Benson, y plantas C4, que utilizan el ciclo fotosintético de Hatch-Slack. La solicitud de patente nº WO 01/11070 describe una proporción isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de 1,3-propanodiol de origen biológico producido a partir de glucosa de entre -10,9 y -15,4; una proporción isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de 1,3-propanodiol de origen biológico producido a partir de glicerol de entre -22,41 y -22,60, mientras que la proporción isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de 1,3-propanodiol producido químicamente está comprendida entre -17,95 y -18,33.

Según la presente exposición, se determinó la proporción D/H del 1,3-propanodiol (indicada como δD), la proporción $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (indicada como $\delta^{13}\text{C}$), la proporción $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (indicada como $\delta^{18}\text{O}$) mediante espectrometría de masas después de la combustión. Se calculó la proporción isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ como δ en tanto por mil (‰) en referencia al estándar internacional (PDB=belemnita de Pee Dee). Se calculó la proporción isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ como δ en tanto por mil (‰) en referencia al estándar internacional agua oceánica media (SMOW). Se calculó la proporción isotópica D/H en ppm en referencia al estándar internacional agua oceánica media (SMOW). Aunque la proporción D/H y las proporciones $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ son bien conocidas para la caracterización de un producto dado, se utiliza principalmente la proporción $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ para el análisis de aguas como indicado paleoclimático.

La comparación entre diferentes tipos de 1,3-propanodiol muestra que δD no es discriminante. δD para el 1,3-propanodiol de origen biológico a partir de glicerol (objetivo de la invención) es de entre 147.38 ppm y 145.84 ppm, mientras que es de 145 ppm para el 1,3-propanodiol de origen biológico obtenido a partir de glucosa, y de entre 150.19 ppm y 139.37 ppm para el 1,3-propanodiol químico.

La exposición se refiere al 1,3-propanodiol de origen biológico susceptible de ser obtenido según el procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ inferiores a -34 ‰, preferentemente inferiores a -35 ‰ y más preferentemente comprendidos entre -35.05‰ y -36.09‰. La exposición se refiere al 1,3-propanodiol de origen biológico susceptible de ser obtenido según el procedimiento descrito anteriormente, caracterizado por valores isotópicos de $\delta^{18}\text{O}$ inferiores a 21,5 ‰, preferentemente inferiores a 15‰ y más preferentemente comprendidos entre 21.9‰ y 17.34‰.

La exposición se refiere además a 1,3-propanodiol de origen biológico caracterizado por una de las características siguientes o una combinación de las mismas:

- valores isotópicos de ^{13}C y ^{18}O seleccionados de $\delta^{13}\text{C}$ inferior a -34 ‰ y $\delta^{18}\text{O}$ de entre 21.9‰ y 0.5‰,
- preferentemente $\delta^{13}\text{C}$ inferior a -35 ‰ y $\delta^{18}\text{O}$ de entre 21.9‰ y 0.5‰,
- más preferentemente $\delta^{13}\text{C}$ de entre -35.05‰ y -36.09‰ y $\delta^{18}\text{O}$ de entre 21.9‰ y 17.34‰ (ver el ejemplo 4).

El 1,3-propanodiol de origen biológico se caracteriza por un valor de la proporción isotópica $^{18}\text{C}/^{13}\text{O}$ comprendido entre -2 y 0, preferentemente entre -1 y -0.2, y más preferentemente entre -0.65 y -0.4.

Preferentemente, el 1,3-propanodiol de origen biológico caracterizado por las proporciones isotópicas anteriormente indicadas se obtiene mediante fermentación basada en glicerol como materia prima. Más

preferentemente, el 1,3-propanodiol de origen biológico caracterizado mediante las proporciones isotópicas anteriores se obtiene a partir del procedimiento de la invención para la producción de 1,3-propanodiol.

La presente exposición se refiere además a la utilización de 1,3-propanodiol de origen biológico obtenido mediante el procedimiento de la invención, o tal como se ha definido anteriormente, como un extensor de cadena en poliuretanos termoplásticos, como monómeros en tereftalato de polítrimetileno o como un componente en formulaciones cosméticas. El 1,3-propanodiol de origen biológico puede utilizarse en todas las aplicaciones conocidas de 1,3-propanodiol químico. El experto en la materia conoce cómo obtener dichos productos finales a partir de 1,3-propanodiol.

La presente exposición se refiere a procedimientos de preparación de poliuretanos termoplásticos utilizando como extensor de cadena un 1,3-propanodiol de origen biológico según la invención. Se refiere además a procedimientos de preparación de composiciones cosméticas que contienen 1,3-propanodiol de origen biológico según la invención. Se refiere además a procedimientos de síntesis de tereftalato de polítrimetileno utilizando 1,3-propanodiol de origen biológico según la invención como monómero.

Dibujos

Figura 1: PDO $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en ‰ del estándar internacional: PDO1: PDO producido según el procedimiento descrito; PDO2: PDO producido a partir de glucosa como sustrato; PDO3: PDO producido mediante procedimiento químico.

Figura 2: proporción $\delta^{18}\text{O}/\delta^{13}\text{C}$ de PDO: PDO1: PDO producido según el procedimiento descrito; PDO2: PDO producido a partir de glucosa como sustrato; PDO3: PDO producido mediante procedimiento químico.

Ejemplos

Ejemplo 1

El medio sintético utilizado para los cultivos por lotes de *Clostridium* contenía por litro de agua desionizada: glicerol, 30 g; KH_2PO_4 , 0.5; K_2HPO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g, H_2SO_4 , 0.1 ml; NH_4Cl , 1.5 g, biotina, 0.16 mg; ácido p-amino benzoico, 32 mg y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.028 g. Se ajustó el pH del medio a 6.3 con NH_4OH 3N. Para el cultivo por lotes, se utilizó glicerol comercial adquirido de Sigma (pureza: 99.5%). El medio de alimentación para los cultivos continuos contenía por litro de agua corriente: glicerol en bruto, 105 g; KH_2PO_4 , 0.5; K_2HPO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.026 g; NH_4Cl , 1.5 g, biotina, 0.16 mg; ácido p-amino benzoico, 32 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g, antiespumante, 0.05 ml; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 40 mg, H_3BO_3 , 2 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.8 mg. No se ajustó el pH del medio en este caso. El glicerol en bruto resultante del procedimiento de trans-esterificación de la producción de biodiésel fue suministrado por SAIPOL (Le Meriot, Francia) y contenía 83% de glicerol (p/p).

Se llevaron a cabo cultivos continuos en un biorreactor de 2 l Trton (Pierre Guerin, Francia) con un volumen de trabajo de 1000 ml. El volumen de cultivo se mantuvo constante a 1000 ml mediante regulación automática del nivel del cultivo. Los cultivos se agitaron a 200 RPMI a una temperatura de 35°C y se mantuvo el pH a 6.5 mediante adición automática de NH_4OH 3 N. Se controló el poder oxidorreductor del medio de cultivo, expresado en mV, y se registró durante el experimento. Para crear condiciones aeróbicas, el medio esterilizado en el recipiente se enjuagó con nitrógeno estéril libre de O_2 durante una hora a 60°C y se enjuagó nuevamente hasta alcanzar 35°C. La salida de gases del biorreactor se protegió del oxígeno con un dispositivo de pirogalol (Vasconcelos et al., 1994). Tras la esterilización, el medio de alimentación asimismo se enjuagó con nitrógeno estéril libre de O_2 hasta alcanzar la temperatura ambiente y se mantuvo bajo presión de nitrógeno a 200 mbar para evitar la entrada de O_2 .

Se midió la densidad celular turbidimétricamente a 620 nm y se correlacionó con el peso seco celular evaluado directamente. Se midieron mediante análisis de HPLC las concentraciones de glicerol, 1,3-propanodiol, etanol, butanol, ácidos acético y butírico y otros ácidos de niveles traza. La separación se llevó a cabo en una columna Biorad Aminex HPX-87H y la detección se llevó a cabo a partir del índice de refracción. Las condiciones operativas fueron las siguientes: fase móvil de ácido sulfúrico 0.5 mM; caudal de 0.5 ml/min y temperatura de 25°C.

Como inóculo (al 5% v/v) se utilizó un cultivo en crecimiento en matraces de 100 ml en medio sintético (el mismo que para el medio de cultivo por lotes indicado anteriormente, aunque con adición de ácido acético: 2,2 g l⁻¹ y MOPS 23.03 g l⁻¹) obtenido al final de la etapa de crecimiento exponencial. Los cultivos se cultivaron en primer lugar por lotes. Al iniciarse la etapa de crecimiento exponencial, se añadió un pulso de glicerol comercial: se define un pulso como una adición de medio sintético (el mismo que el indicado para el cultivo por lotes) con glicerol comercial 120 g l⁻¹ a un caudal de 50 ml h⁻¹ durante 3 horas (es decir, una adición de 18 g de glicerol). A continuación, se prolongó el crecimiento por lotes y antes del final de la etapa de crecimiento exponencial, se inició la alimentación continua con una tasa de dilución de 0.06 h⁻¹ y un medio de alimentación que contenía 105 g l⁻¹ de glicerol en bruto.

Tabla 1: cultivo continuo de *C. acetobutylicum* DG1 (pSPD5) sobre glicerol en bruto a 105 g l⁻¹ (D = 0.06 h⁻¹, pH 6.5 y T°C=35°C). Los valores proporcionados representan una media de 7 puntos bajo condiciones de estado estable obtenidas tras 3 cambios de volumen.

	Media y desviación estándar
Glicerol alimentado (g l ⁻¹)	106.1 +/-0.00
1,3-propanodiol (g l ⁻¹)	32.68 +/- 1.16
Y _{1,3-PDO} (g-g ⁻¹)	0.50 +/- 0.02
Q _{1,3PDO} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	2.00 +/- 0.09
Tasa de dilución (h ⁻¹)	0.061 +/-0.003
Glicerol residual (g l ⁻¹)	36.38 +/- 1.88
Biomasa (g l ⁻¹)	1.83 +/-0.09
Ácido acético (g l ⁻¹)	0.99 +/- 0.07
Ácido butírico (g l ⁻¹)	7.65 +/- 0.44
Recuperación de carbono (%)	96.9 +/- 2.5

Y_{1,3-PDO} : Rendimiento de PDO (g/g de glicerol consumido) Q_{1,3PDO} : Productividad volumétrica de PDO

Para el cálculo de la recuperación de carbono, se estimó la concentración de dióxido de carbono a partir de las concentraciones de los productos finales.

5

Ejemplo 2

Los medios sintéticos utilizados eran los mismos que los indicados en el ejemplo 1. El precultivo, la inoculación y el crecimiento por lotes se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente.

10

La alimentación continua se inició con una tasa de dilución de 0.02 h⁻¹ y un medio de alimentación que contenía 105 g l⁻¹ de glicerol en bruto. Tras unos cuantos días bajo estas condiciones (es decir, 8 a 10 días después de la inoculación del biorreactor correspondiente a cambios de por lo menos 3 volúmenes), se incrementó la tasa de dilución de 0.02 h⁻¹ a 0.05 h⁻¹ según el esquema siguiente: i) incremento de 0.01 h⁻¹ unidades en 48 horas e ii) etapa de reposo de 24 a 48 horas, 3 repeticiones. Se realizó un seguimiento de la estabilidad del cultivo mediante análisis de los productos utilizando el protocolo de HPLC indicado anteriormente. Cabe destacar que en el contexto de la presente invención se esperó a que el contenido de glicerol residual fuese el más bajo posible para producir un incremento final de la tasa de dilución de 0.06 h⁻¹ en 48 horas.

15

20

Tabla 2: cultivo continuo de *C. acetobutylicum* DG1 (pSPD5) en glicerol en bruto a 105 g l⁻¹ (D=0.05 h⁻¹ y 0.06 h⁻¹, pH 6.5 y T°C = 35°C). Los valores proporcionados representan una media de 3 o 4 puntos en condición de estado estable

	Media y desviación estándar para D=0.05 h ⁻¹	Media y desviación estándar para D=0.06 h ⁻¹
Glicerol alimentado (g l ⁻¹)	108.36 +/- 0.00	110.01 +/- 0.00
1,3-propanodiol (g l ⁻¹)	51.92 +/- 0.29	50.95 +/- 0.52
Y _{1,3-PDO} (g-g ⁻¹)	0.53 +/- 0.00	0.51 +/- 0.01
Q _{1,3PDO} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	2.68 +/- 0.04	2.87 +/- 0.02
Tasa de dilución (h ⁻¹)	0.052 +/- 0.001	0.056 +/- 0.000
Glicerol residual (g l ⁻¹)	3.66 +/- 0.40	4.51 +/- 0.33
Biomasa (g l ⁻¹)	1.94 +/- 0.07	OD
Ácido acético (g l ⁻¹)	3.27 +/- 0.11	2.67 +/- 0.06
Ácido butírico (g l ⁻¹)	10.75 +/- 0.44	10.97 +/- 0.21
Recuperación de carbono (%)	97.4 +/- 1.4	95.1 +/- 1.2

Y_{1,3-PDO} : rendimiento de PDO (g/g de glicerol consumido)

Q_{1,3PDO} : Productividad volumétrica de PDO.

Para el cálculo de la recuperación de carbono, se estimó la concentración de dióxido de carbono a partir de las concentraciones de los productos finales.

25

Otro cultivo llevado a cabo bajo las mismas condiciones produjo los mismos resultados.

Ejemplo 3

30

Los medios sintéticos utilizados fueron los mismos que los indicados en el ejemplo 1, excepto en que el medio de alimentación contenía 120 g l⁻¹ de glicerol en bruto. El precultivo, la inoculación y el crecimiento por lotes se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones que las indicadas anteriormente.

A) La alimentación continua se inició con una tasa de dilución de 0.02 h⁻¹ y un medio de alimentación que contenía 120 g l⁻¹ de glicerol en bruto.

Tabla 3: cultivo continuo de *C. acetobutylicum* DG1 (pSPD5) sobre glicerol en bruto a 120 g l⁻¹ (D = 0.02 h⁻¹, pH 6,5 y T°C = 35°C). Los valores proporcionados representan una media de 7 puntos bajo condiciones de estado estable obtenidas tras 3 cambios de volumen.

5

	Media y desviación estándar
Glicerol alimentado (g l ⁻¹)	123.67 +/- 0.00
1,3-propanodiol (g l ⁻¹)	43.13 +/- 1.47
Y _{1,3-PDO} (g-g ⁻¹)	0.50 +/- 0.01
Q _{1,3PDO} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	1.01 +/- 0.05
Tasa de dilución (h ⁻¹)	0.023 +/- 0.001
Glicerol residual (g l ⁻¹)	30.87 +/- 2.62
Biomasa (g l ⁻¹)	1.19 +/- 0.09
Ácido acético (g l ⁻¹)	2.36 +/- 0.18
Ácido butírico (g l ⁻¹)	9.32 +/- 0.45
Recuperación de carbono (%)	94.2 +/- 1.4

Y_{1,3-PDO}: rendimiento de PDO (g/g de glicerol consumido)
 Q_{1,3PDO}: productividad volumétrica de PDO
 Para el cálculo de la recuperación de carbono, se estimó la concentración de dióxido de carbono a partir de las concentraciones de los productos finales.

B) La alimentación continua se inició con una tasa de dilución de 0.02 h⁻¹ y un medio de alimentación que contenía 105 g l⁻¹ de glicerol en bruto. Tras unos cuantos días bajo estas condiciones (correspondiente a un cambio de por lo menos 3 volúmenes), la tasa de dilución se incrementó de 0.02 h⁻¹ a 0.06 h⁻¹ según el esquema indicado anteriormente. A continuación, se modificó la tasa de dilución de la alimentación a 0.05 h⁻¹ y un medio de alimentación que contenía 120 g l⁻¹ de glicerol en bruto.

10

Tabla 4: cultivo continuo de *C. acetobutylicum* DG1 (pSPD5) sobre glicerol en bruto a 120 g l⁻¹ (D=0.05 h⁻¹, pH 6.5 y T°C=35°C) después de alimentar glicerol en bruto 105 g l⁻¹ con D=0.06 h⁻¹. Los valores proporcionados representan una media de 3 puntos obtenidos tras por lo menos 20 cambios de volumen.

15

	Media y desviación estándar
Glicerol alimentado (g l ⁻¹)	123.68 +/- 0.00
1,3-propanodiol (g l ⁻¹)	53.53 +/- 0.59
Y _{1,3-PDO} (g-g ⁻¹)	0.53 +/- 0.02
Q _{1,3PDO} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	2.86 +/- 0.02
Tasa de dilución (h ⁻¹)	0.053 +/- 0.000
Glicerol residual (g l ⁻¹)	15.58 +/- 3.56
Biomasa (g l ⁻¹)	1.14 +/- 0.18
Ácido acético (g l ⁻¹)	4.30 +/- 0.10
Ácido butírico (g l ⁻¹)	9.29 +/- 0.17
Recuperación de carbono (%)	94.8 +/- 2.3

Y_{1,3-PDO}: Rendimiento de PDO (g/g de glicerol consumido)
 Q_{1,3PDO}: Productividad volumétrica de PDO
 Para el cálculo de la recuperación de carbono, se estimó la concentración de dióxido de carbono a partir de las concentraciones de los productos finales.

Ejemplo 4

20 Procedimiento de cálculo de los valores δ¹³C y δ¹⁸O

Los niveles de ¹³C y ¹⁸O convencionalmente se expresan como valores relativos. Normalmente se expresan en forma de un porcentaje (δ) en comparación con dos referencias internacionales.

25 Para ¹³C, la referencia es la "belemnita de Viena PD", que es un carbonato fósil a partir del cual se conoce el valor de ¹³C.

La fórmula para el cálculo de δ es la siguiente:

30

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{spl}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{ref}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{ref}}} \times 1000$$

Para ¹⁸O, la referencia es el "agua oceánica media estándar" (SMOW), con un valor de ¹⁸O conocido. La fórmula

es idéntica a la de ^{13}C , con el valor de referencia de ^{18}O .

Materiales utilizados y preparación de muestras

5 ^{13}C

Se calculó la proporción isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de PDO basándose en el espécimen de dióxido de carbono medido experimentalmente. Con este fin, las muestras se combustionaron en un analizador elemental y el dióxido de carbono obtenido se inyectó en un espectrómetro de masas (Finnigan MAT DELTA) acoplado a un analizador elemental (CARLO ERBA NA 2100) para la determinación de la proporción isotópica. De esta manera, se separaron y cuantificaron las masas 44, 45 y 46 del dióxido de carbono. A continuación, se calculó la proporción isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en la escala delta en tantos por mil mediante la comparación de los resultados con una de las referencias de trabajo (ácido glutámico) que se había calibrado previamente respecto al estándar internacional.

15 ^{18}O

La medición de la proporción isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ se llevó a cabo en un flujo continuo de un compuesto orgánico. Con este fin, las muestras se combustionaron mediante pirólisis al nivel de un horno microanalizador y el monóxido de carbono producido se envió al espectrómetro de masas (OPTIMA acoplado a un analizador elemental Fisons NA1500 serie 2 o un espectrómetro de masas Delta V acoplado a un analizador elemental TC/EA de Thermoelectron). Se determinaron los diferentes isótopos de 28, 29, 30 en el monóxido de carbono producido mediante pirólisis. A continuación, se calculó la proporción isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ en la escala delta en tantos por mil mediante la comparación de los resultados con SMOW.

25 Resultados

Para el PDO producido a partir de glicerol en bruto se obtuvo un valor medio $\delta^{13}\text{C}$ de $-35.57 \pm 0.52 \text{‰}$, el PDO producido a partir de glucosa presentaba un valor $\delta^{13}\text{C}$ medio de -12.6‰ y el PDO producido químicamente presentaba un valor $\delta^{13}\text{C}$ medio de $-30.05 \pm 5.02\text{‰}$.

El PDO producido a partir de glicerol en bruto presentaba un valor $\delta^{18}\text{O}$ medio de $19.76 \pm 2.42\text{‰}$, el PDO producido a partir de glucosa presentaba un valor $\delta^{18}\text{O}$ medio de 22.0‰ y el PDO producido químicamente presentaba un valor $\delta^{18}\text{O}$ medio de $-0.80 \pm 1.27\text{‰}$.

De esta manera, la medición de $\delta^{13}\text{C}$ permite distinguir el PDO producido mediante un proceso de fermentación de materia prima diversa. El $\delta^{13}\text{C}$ de PDO producido químicamente muestra una variabilidad elevada (-30.05 ± 5.02) y únicamente es ligeramente superior al $\delta^{13}\text{C}$ del PDO producido a partir de glicerol. El $\delta^{18}\text{O}$ del PDO producido químicamente presenta un valor muy bajo (-0.8 ± 1.27) que permite distinguir entre el PDO producido químicamente y el PDO de origen biológico, a partir de glucosa o de glicerol (figura 1).

El valor $\delta^{18}\text{O}/\delta^{13}\text{C}$ permite claramente la identificación de los diferentes PDO (figura 2) con una proporción $\delta^{18}\text{O}/\delta^{13}\text{C}$ de -0.56 para PDO a partir de glicerol, -1.75 para PDO a partir de glucosa y 0.03 para PDO producido químicamente. En conclusión, el PDO producido a partir de glicerol puede identificarse mediante las mediciones de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ seguido de la determinación de $\delta^{18}\text{O}/\delta^{13}\text{C}$.

45 Referencias

1. Cotte JF, Casabianca H, Lhéritier J, Perrucchietti C, Sanglar C, Waton H y Grenier-Loustalot MF. 2007. Study and validity of ^{13}C stable carbon isotopic ratio analysis by mass spectrometry and ^2H site specific natural isotopic fractionation by nuclear magnetic resonance isotopic measurements to characterize and control the authenticity of honey. *Analytica Chimica Acta* 582: 125-136.
2. Gonzalez-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Andrade JC, Vasconcelos I, y Soucaille P. 2005. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering* 7: 329-336.
3. Gonzalez-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Soucaille P. y Vasconcelos I. 2006. Microbial conversion of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG (pSPD5). *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 96-101.
4. Guillou C, Jamin E, Martin GJ, Reniero F, Wittkowski R y Wood R. 2001. Analyses isotopiques du vin et des produits derives du raisin. *Bulletin de l'O.I.V* : 839-840.
5. Nakas JP, Schaedle M, Parkinson CM, Coonley CE, y Tanenbaum SW. 1983. System development for linked-fermentation products of solvents from algal biomass. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 1017-1023.

- 5
6. Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B, Blanchard F y Fick M. 2000. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology*. 77: 191-2008.
7. Documento nºWO2006/128381. Method for preparing 1,3-propanediol by using glycerine as the by-product of the biological diesel oil.
- 10
8. Documento nºWO01/11070. 1,3-propanediol and polymer derivatives from a fermentable carbon source.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción de 1,3-propanodiol en un proceso de fermentación continuo, que comprende cultivar una cepa de *Clostridium* modificada genéticamente para presentar su metabolismo de glicerol dirigido a la producción de 1,3-propanodiol en un medio de cultivo y recuperar el 1,3-propanodiol, caracterizado por que:
- 10 - el medio de alimentación comprende una concentración elevada de glicerina industrial, siendo dicha glicerina industrial un producto secundario de la producción de biodiésel y que comprende más de 70% de glicerol, estando presente dicho glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l y la tasa de dilución está comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹,
 - 15 - en el que la cepa de *Clostridium* es adaptada previamente mediante un cultivo continuo a una tasa de dilución comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹ en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial en el medio de alimentación, comprendiendo dicha glicerina industrial más de 70% de glicerol, estando presente dicho glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l,
 - en el que dicho medio de cultivo no contiene ninguna fuente de nitrógeno orgánico.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la cepa de *Clostridium* es una cepa de *Clostridium acetobutylicum*.
- 25 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la actividad de glicerol deshidratasa en la cepa modificada genéticamente de *Clostridium* es independiente de la presencia de coenzima B12 o uno de sus precursores y deriva de *Clostridium butyricum*.
- 30 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la cepa modificada genéticamente de *Clostridium* se adapta en un microorganismo productor cultivando el microorganismo en un medio de cultivo que comprende una concentración elevada de glicerina industrial a una tasa de dilución baja comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹ y seleccionándose el microorganismo adaptado apto para crecer sobre el medio de cultivo que presenta una concentración elevada de glicerina industrial.
- 35 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el 1,3-propanodiol es purificado adicionalmente.
- 40 6. Procedimiento para la modificación de un microorganismo del género *Clostridium* en un microorganismo adaptado para crecer en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial, siendo dicha glicerina industrial un producto secundario de la producción de biodiésel y comprendiendo más de 70% de glicerol, comprendiendo dicho procedimiento cultivar continuamente el microorganismo en un medio de cultivo que no contiene ninguna fuente de nitrógeno orgánico, comprendiendo el medio de alimentación una concentración elevada de glicerina industrial, estando presente el glicerol a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l, y alimentándose a una tasa de dilución baja comprendida entre 0.005 y 0.1 h⁻¹ y durante un periodo comprendido entre 24 horas y 10 días, y seleccionando el microorganismo adaptado apto para crecer sobre el medio de cultivo que presenta una concentración elevada de glicerina industrial.
- 45 7. Microorganismo del género *Clostridium* modificado genéticamente para presentar su metabolismo del glicerol dirigido a la producción de 1,3-propanodiol adaptado para crecer en presencia de una concentración elevada de glicerina industrial y en un medio de cultivo que no contiene ninguna fuente de nitrógeno orgánico susceptible de obtenerse mediante el procedimiento según la reivindicación 6, siendo dicha glicerina industrial un producto secundario de la producción de biodiésel y comprendiendo más de 70% de glicerol, y estando presente en el medio de alimentación el glicerol de un cultivo continuo a una concentración comprendida entre 90 y 120 g/l.
- 50

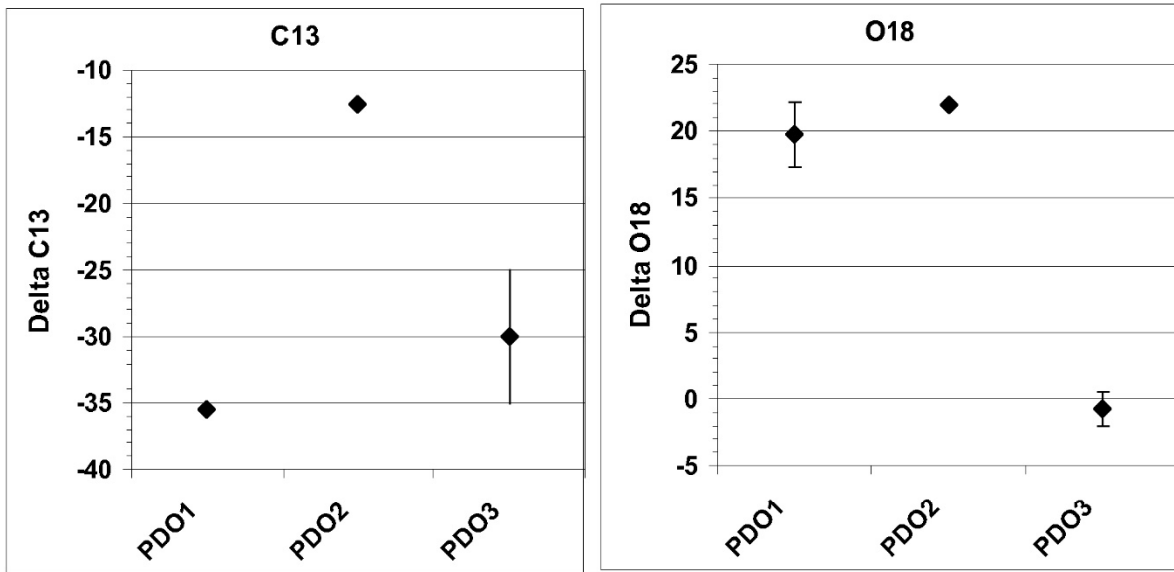


Figura 1

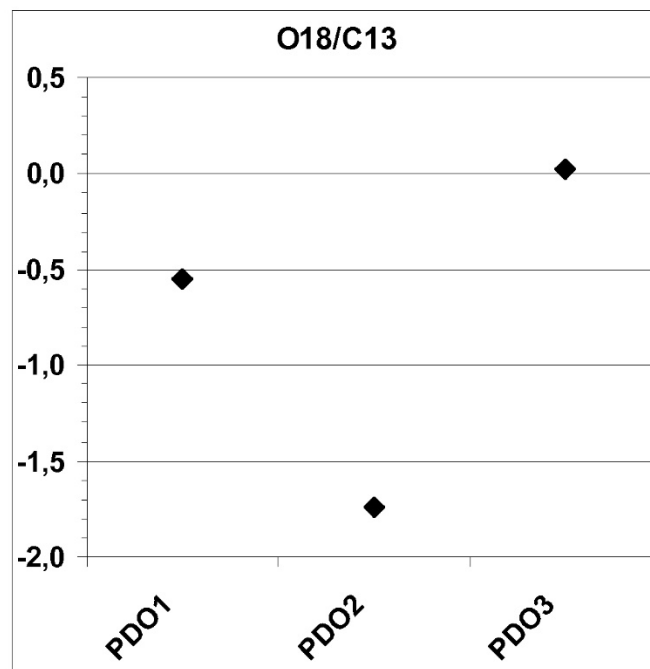


Figura 2