



No. 03-002550- -00023-0000

Fecha: 2010-03-08 15:12:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 16

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

P-2056

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **03-002.550**
Solicitud de patente a nombre de **Emmaus Foundation, Inc**

Yo, DILIA MARIA RODRIGUEZ D’ALEMAN, actuando como apoderada sustituta de acuerdo con la sustitución presentada el 17 de abril de 2009, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la carrera 11 A No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **Emmaus Foundation, Inc**, domiciliada en Fayetteville, Arkansas, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 14391 notificado por fijación en lista el 11 de diciembre de 2009 relacionado con el concepto técnico de fondo No. 3970, me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio en el cual se han realizado las siguientes modificaciones:

1.1 Se modificó el capítulo reivindicatorio el cual ahora consta de 10 cláusulas dirigidas al método estable y continuo para la producción de etanol a partir de la fermentación anaeróbica bacteriana de un sustrato gaseoso que contiene monóxido de carbono.

El sustento para estas nuevas reivindicaciones se ilustra en la siguiente tabla:

Nueva reivindicación	Sustento
1	Antigua reivindicación 1, página 6 primer y segundo párrafo, página 28, líneas 17 a 19 de la descripción.
2	Antigua reivindicación 2, página 8 segundo párrafo de la descripción.
3	Antigua reivindicación 3, página 18, tercer párrafo de la descripción.

4	Antigua reivindicación 4, página 8 cuarto párrafo de la descripción.
5	Antigua reivindicación 5, página 23 tercer párrafo, página 57 desde el tercer párrafo hasta la página 79 primer párrafo de la descripción.
6	Antigua reivindicación 6, página 11 último párrafo hasta el primer párrafo de la página 12 de la descripción.
7	Antiguas reivindicaciones 7 a 12, página 5 segundo párrafo hasta la 6 último párrafo de la descripción.
8	Antigua reivindicación 22, página 24 segundo párrafo de la descripción.
9	Antigua reivindicación 19, página 24, líneas 20 a 23.
10	Antigua reivindicación 25, páginas 51 párrafos 2 y 3 de la descripción.

Nos permitimos decir que las anteriores modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones planteadas por el señor examinador en su concepto técnico no. 3970.

Teniendo en cuenta el concepto técnico emitido por el Señor Superintendente Delegado para la propiedad intelectual GianCarlo Marcenaro Jiménez a la doctora Ana Maria Castro Wey, que da alcance a las comunicaciones No. 09-001524 y 09-012566, no se presenta una tasa adicional, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio comprende menos de 15 reivindicaciones y la solicitud fue presentada con anterioridad al 1 de enero de 2009.

2. Novedad

El señor examinador manifiesta que las características esenciales definidas en la antigua reivindicación 1 se encuentran contenidas en el documento D1 (US 5,173,429).

Con relación a la argumentación presentada en el concepto técnico No. 3970, resulta pertinente dirigir la atención del señor examinador al artículo 16 de la Decisión 486 donde se establece que: **“Una invención *se considera nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica.*”**

El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso, de la prioridad reconocida....”(El resaltado es nuestro).

Si de acuerdo con el espíritu de la norma legal indicada, la invención no se considera como nueva si está “comprendida” en el estado de la técnica, dicha norma se está refiriendo, naturalmente, a la totalidad del invento y no a alguno o a algunos de los componentes que hacen parte de la nueva solicitud.

En efecto, para que la invención pierda su calidad de novedosa, es claro que ella, TODA ELLA, ha de estar contenida en el “*conjunto de conocimientos existentes que son aplicables al proceso industrial*” como define el estado de la técnica el Tribunal de justicia del Acuerdo de Cartagena (Proceso No. 6-IP-89, sentencia de 31 de octubre de 1989, publicada en Jurisprudencia del Tribunal de Justicia del Acuerdo de Cartagena, Tomo 11, BID-INTAL, Buenos Aires, 1994, página 60).

Esto se conoce como NOVEDAD ABSOLUTA, de conformidad con lo cual para desvirtuar el requisito de novedad de una invención será necesario que lo reivindicado por la invención bajo estudio corresponda de forma total con lo revelado en un documento o anterioridad señalada, conclusión a la que se llega después de un análisis exhaustivo mediante una comparación entre el capítulo reivindicatorio de la invención en estudio y la divulgación citada por ese despacho como anterioridad.

Ahora bien, si un determinado elemento, condición o circunstancia de la nueva creación ya hace parte del estado de la técnica no quiere ello decir, desde luego, que la invención deba ser rechazada por carecer del requisito de novedad. No sin razón ha dicho el mencionado Tribunal: “*hay que advertir que toda creación es en cierta forma, producto del estado de la técnica existente, en el sentido de que el inventor ha de tener en cuenta un conjunto de conocimientos técnicos que le permitan crear nuevos procedimientos aplicables a la industria*” (Ibidem, páginas 53 y 54) (El subrayado es nuestro).

Por lo tanto y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, como mínimo la novedad debe contemplar los siguientes aspectos:

-Que la invención en estudio esté contenida de forma TOTAL y ABSOLUTA en el documento que se menciona como anterioridad; y

-Que la invención en cuestión puede partir de conocimientos conocidos, caso en el cual habrá que hacer la comparación no de lo conocido sino de lo inédito y novedoso, teniendo que analizarse el valor agregado que aporta la invención con sus nuevas características al campo técnico al cual pertenece la solicitud en estudio.

Aplicando lo anterior al caso concreto, para que las razones que aduce ese despacho para desvirtuar la novedad fuesen ciertas, sería forzoso que se demostrara que la invención de mi mandante está comprendida en el estado de la técnica de forma **TOTAL**, lo cual no sucede debido a que la presente invención requiere que el pantotenato de calcio sea alimentado al bio-reactor de fermentación a una cantidad de 0.5 hasta 50 $\mu\text{g/g}$ de célula seca de bacteria producida en el bio-reactor y se mantenga una proporción específica de captación de monóxido de carbono de al menos 0.5 mmol de CO/g de célula seca de bacteria /minuto en el bio-reactor, de tal modo que el etanol estable es producido a una grado de producción mayor que 10 g/L/ día.

La presencia del pantotenato de calcio en las proporciones definidas y la proporción específica de la captación de monóxido de carbono son características diferentes que no se encuentran expresamente reveladas en el documento D1. Es más, en el ejemplo 2 de esta anterioridad mencionado por el señor examinador, no se enuncia la presencia de la fuente de carbono, es decir, que no se incluye en dicho ejemplo el sustrato gaseoso como el mostrado en la presente invención.

Así las cosas, respetuosamente nos permitimos hacer énfasis sobre el hecho que la solicitud en estudio tiene diferencias en su reivindicación 1 modificada en relación con lo establecido en D1.

Aún más, si estas diferencias son sutiles debido a la cantidad de pantotenato o de CO para el sustrato según el ejemplo 1, que tampoco es idéntico al proceso de la invención en estudio, pues D1 no hace ninguna sugerencia al hecho que el etanol pueda ser obtenido de manera preferida a pH entre 4.5 y 5.5 a través de la bacteria ***C. ljungdahlii***. Es más, D1 sugiere que a estos valores de pH y a condiciones normales de crecimiento el microorganismo ***C. ljungdahlii*** tiende más a la producción de acetato que de etanol.

En este sentido, atentamente dirigimos la atención del señor examinador a la columna 2 entre las líneas 20 a 23 de D1 donde se expone que “En una modalidad de la presente invención, el microorganismo produce acetato en lugar de etanol bajo condiciones normales de crecimiento, típicamente entre pH 5,0 y 7,0.” (La traducción es nuestra).

En ese orden de ideas, es necesario señalar que las diferencias aunque sutiles son precisamente los rasgos técnicos que caracterizan la invención y la hacen novedosa de lo ya existente en la técnica. De hecho, el Manual Andino en su página 66 tercer párrafo sobre el particular, señala que: “Si todas las características técnicas de la reivindicación independiente se encuentran descritas en un mismo antecedente y

además se encuentran íntimamente relacionadas, el objeto de dicha reivindicación carece de novedad. **Si una característica, aunque sea banal, no se encuentra contenida en el antecedente, la reivindicación es nueva.**” (El resaltado es nuestro). Por lo tanto hay que tener presentes las características del pH, del sustrato gaseoso y la presencia del pantotenato en el bio-reactor y que hacen que la invención sea novedosa frente a la anterioridad citada por ese despacho.

En consecuencia, solicitamos respetuosamente sean retiradas las objeciones de novedad a la luz de los anteriores argumentos y del nuevo pliego reivindicatorio.

3. Nivel inventivo.

El señor examinador manifiesta en el folio 256 bajo el acápite 4.2 que: “Tal como se mencionó en el numeral anterior el estado de la técnica más cercano es D1, el cual plantea un método para obtener etanol a partir de la misma especie bacterial utilizada en la solicitud, suministrando como fuente de carbono un sustrato gaseoso de CO y en donde además se establecen las condiciones para optimizar la producción del etanol en cambio del acetato, incluye la adición en el medio de cultivo de una solución de vitamina-B que contiene pantotenato de calcio.

La diferencia entre D1 y la solicitud es que esta última menciona como alternativa para desarrollar la invención que el método para la producción de etanol requiere un pH entre 4.5 a 5.5.... o que el pH debe estar por encima de 4.5...”

Nuevamente nos permitimos señalar que la anterioridad D1 no hace ninguna sugerencia al hecho que el etanol pueda ser obtenido de manera preferida a pH entre 4.5 y 5.5 a través de la bacteria **C. ljungdahlii**. Es más, D1 sugiere que a estos valores de pH y a condiciones normales de crecimiento el microorganismo **C. ljungdahlii tiende a la producción de acetato en lugar de etanol**. Es más, en la columna 2 entre las líneas 20 a 23 de D1 se pone de manifiesto que “En una modalidad de la presente invención, **el microorganismo produce acetato en lugar de etanol bajo condiciones normales de crecimiento, típicamente entre pH 5,0 y 7,0.**” Así las cosas, no hay razón alguna aparente para que una persona versada en la materia encontrara evidente la presente invención mediante la combinación de las enseñanzas de D1 con lo divulgado en D3.

En efecto, la persona medianamente versada en la materia que tuviera en cuenta las enseñanzas mostradas en el artículo D3, ratificaría lo enunciado en D1, pues en la página 233 del artículo D3 titulado “*Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic species in Clostridial rRNA Homology Group I” se pone de

manifiesto que el cultivo de *C. ljungdahlii* es un productor de ácido acético debido a que el balance de fermentación reportado en dicho artículo muestra que se produce principalmente ácido acético en lugar de etanol. Esto, claramente lo puede corroborar el señor examinador en la segunda columna de la página 233 que nos permitimos presentar a continuación:

Cultures of *C. ljungdahlii* quantitatively converted 4 mmol of hydrogen and 2 mmol of carbon dioxide into 1 mmol of acetic acid or 1 mmol of fructose into 2.44 mmol of acetic acid; no other end products of metabolism were detected in these experiments. The fermentation balances demonstrate that *C. ljungdahlii* is an acetogen, a bacterium which can synthesis acetate from one-carbon compounds (19). Most acetogens quantitatively convert carbohydrates to acetate: 1 hexose $\rightarrow$ 3 acetic acid. The conversion by *C. ljungdahlii* of 1 fructose molecule to 2.44 acetate molecules is similar to the yields of acetate observed for other acetogens: 2.1 to 2.3 acetate molecules per hexose molecule for *Acetobacterium carbinolicum* (10); 2.2 to 2.8 acetate molecules per fructose molecule for *Acetobacterium woodii* in media supplemented with yeast extract and/or Trypticase (22a); 2.3 to 3.0 (average, 2.5) acetate molecules per glucose molecule for *Acetogenium kivui* (18); an average of 2.55 acetate molecules per

Es claro que una persona medianamente versada en la materia entenderá que es muy distinto el hecho de mantener el pH entre 4.0 y 7.0 para el crecimiento de la bacteria, que mantener un pH menor a 5.5 para producir etanol en lugar de ácido acético. De hecho, en el aparte del documento D3 anteriormente citado, se puede observar que el mismo autor indica que no se detectaron otros productos de metabolismo en dichos experimentos diferentes a ácido acético.

Aunado a lo anterior, en la página 234 penúltimo párrafo de la columna derecha, el autor también hace referencia a que en la técnica anterior se ha encontrado cantidades muy mínimas de etanol en el producto final del metabolismo de estas bacterias, lo cual se ha observado en otras bacterias acetogénicas que tienen la misma capacidad de producir y consumir etanol:

Cultures of *C. ljungdahlii*, which was isolated for its ability to convert synthesis gas to ethanol (2, 25), often have 0 to 2 mM ethanol present as an end product of metabolism. The ability to both produce and consume ethanol has been observed in other acetogens (specifically, in species of the genus *Acetobacterium*) (4). Cultures may also produce 0 to 0.3 CO₂ molecule per fructose molecule fermented. Vega et al. (25) noted that *C. ljungdahlii* produced trace amounts of CO₂ when it fermented fructose and produced CO₂ and traces of H₂ when it metabolized CO.

Por estas razones, no existe ningún indicio o sugerencia de que en el balance a dichas condiciones se produzca mayor cantidad de etanol en lugar de ácido

acético. Así las cosas, si la persona versada en la materia no encontraría evidente el método reclamado en la presente solicitud a partir de la combinación de los documentos D1 y D3.

De lo anterior se puede concluir que nuevamente el análisis de nivel inventivo realizado por el señor examinador es claramente el resultado de un análisis del tipo "hindsight", pues, como se puede constatar nuevamente, el examinador no ha enfocado su análisis en el momento en el que el solicitante plantea un problema con el fin de solucionar fallas técnicas existentes en los productos convencionales de un campo técnico específico, sino que se encauza en la solución dada al problema planteado y en la búsqueda de documentos con conceptos análogos.

A este respecto dirigimos la atención del señor examinador al "*Manual para Examen de Solicitudes de Patentes de Invención en las Oficinas de Propiedad Industrial de los Países de la Comunidad Andina*, publicado en la página Web de la Comunidad Andina, donde se establece en la página 74 en cuanto al nivel inventivo "...que la búsqueda de anterioridades se efectúa a posteriori, tomando como punto de partida la misma invención,...el examinador debe realizar el esfuerzo intelectual de colocarse en la situación que ha tenido que afrontar el técnico con conocimientos medios en la materia en un momento en que la invención no era conocida, es decir antes de la invención".(El resaltado es nuestro)

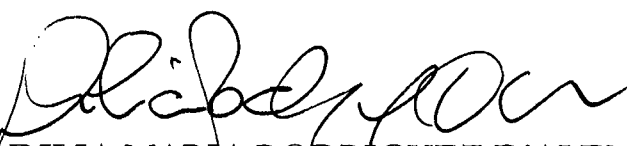
En el presente caso, para el examinador puede resultar "obvio" que el objeto de la presente solicitud se derive de la materia objeto de los documentos citados como referencia D1 y D3, sin dar mayor importancia al trabajo desplegado y a la capacidad inventiva del solicitante para lograr llegar a la solución del problema planteado. Es decir, que el examinador no hace su análisis partiendo del problema mismo que existía en la técnica en el momento en que el solicitante dirige todos sus esfuerzos para encontrar una solución, sino que enfoca su estudio en el momento en que el problema ya fue resuelto.

En consecuencia, para una persona normalmente versada en la materia técnica, como se establece en el artículo 18 de la Decisión 486, no habría sido obvia la combinación de un documento como D1 que hace alusión al aislamiento de microorganismos del tipo C ljunghalii susceptibles de producir tanto acetato como etanol, con las enseñanzas de la referencia D3 que reporta (columna derecha, página 235 cuarto párrafo) que el ácido acético es el mayor producto obtenido del metabolismo de dicha bacteria y que el etanol se puede encontrar a nivel de trazas.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *"habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares"* y *"(..) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso"*, respectivamente (El subrayado es nuestro).

En consecuencia, pedimos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional

Señor Superintendente,



DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

CC. 41.654.882

TP 20824 CSJ

NRA

P-2056

REIVINDICACIONES

①. Un método estable continuo para la producción de etanol a partir de la fermentación anaeróbica bacteriana de un sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono, el método comprende cultivar en un bio-reactor de fermentación bacterias *Clostridium ljungdahlii* que son capaces de producir etanol en un medio líquido nutriente que incluye pantotenato de calcio y a un pH menor de 5.5 siendo la concentración de ácido acético libre en el bio-reactor de fermentación de menos de 5 g/L y la proporción de etanol a acetato en el caldo de fermentación dentro del bio-reactor de desde 1:1 a 20:1, **caracterizado porque** el pantotenato de calcio es alimentado al bio-reactor de fermentación a una cantidad de 0.5 hasta 50 $\mu\text{g/g}$ de célula seca de bacteria producida en el bio-reactor y se mantiene una proporción específica de captación de monóxido de carbono de al menos 0.5 mmol de CO/g de célula seca de bacteria /minuto en el bio-reactor, de tal modo que el etanol estable es producido a una grado de producción mayor que 10 g/L/día.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el bio-reactor de fermentación incluye un reactor de crecimiento el cual alimenta el caldo de fermentación resultante hacia un segundo bio-reactor en el cual se produce la mayoría del etanol.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque además incluye la remoción del caldo de fermentación desde el bio-reactor, destilando el etanol del caldo y recuperando el etanol.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado además porque incluye recircular el agua que contiene acetato desde el paso de destilación de regreso hacia el bio-reactor.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado porque** la bacteria de *Clostridium ljungdahlii* se selecciona de las cepas PETC, ERI2, O-52 y C-01.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado porque** el sustrato gaseoso es seleccionado de (a) monóxido de carbono, (b) monóxido de carbono e hidrógeno, (c) monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno y (d) cualquiera de (a) hasta (c) con nitrógeno o metano.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado porque** además incluye un paso seleccionado de:

- a) alterar al menos un parámetro seleccionado de por lo menos un parámetro seleccionado del grupo formado por contenido del medio de nutrientes, velocidad de alimentación de los nutrientes, velocidad de alimentación del medio acuoso, presión de operación, pH de operación, contenido del sustrato gaseoso, velocidad de alimentación de gases, velocidad de agitación del caldo de fermentación, paso de inhibición por producto, densidad de células, inhibición por sustrato y combinaciones de los mismos;
- b) purgar periódicamente las células bacterianas desde el bio-reactor de fermentación hacia una concentración de

células menor que la concentración estable que utiliza todo el gas de reducción o sustratos de nutrientes en el bio-reactor;

- c) incrementar la velocidad de alimentación del medio acuoso cuando la porción de ácido acético libre del acetato presente en el caldo de fermentación excede 2 g/L, de tal forma que se reduce cualquier incremento indeseado en la concentración de ácido acético libre;
- d) reducir la velocidad de alimentación del sustrato gaseoso para aliviar la inhibición del sustrato y mantener la productividad.
- e) reducir la velocidad de agitación para aliviar la inhibición del sustrato y mantener la productividad,
- f) suministrar el sustrato gaseoso al bio-reactor de fermentación a una velocidad de 0.3 hasta 2 mmol de CO/gramo de célula seca de bacteria en dicho bio-reactor / minuto;
- g) incrementar la cantidad de CO presente en el bio-reactor de fermentación de tal modo que la cantidad de CO sea mayor que la cantidad requerida para mantener la bacteria a una concentración de bacteria estable que utilizaría completamente el CO suministrado;
- h) mantener el CO presente en el bio-reactor en una cantidad que mantiene de preferencia la producción de etanol a la producción de acetato;

- i) alimentar dentro del bio-reactor de fermentación el medio de nutrientes que además incluye cobalto, en donde el Cobalto es mantenido en el bio-reactor a una cantidad de 5 hasta 100 μg de cobalto/gramo de célula seca de bacteria producida; y
- j) aumentar el pH del cultivo por encima de 4.5.

8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** además incluye el paso de prevención de la aclimatación de la bacteria en el bio-reactor para la cantidad de pantotenato calcio mediante el ajuste de los parámetros seleccionados de la velocidad del gas, la velocidad del líquido, la velocidad de agitación, la velocidad de alimentación de los nutrientes y la presión parcial del gas de hidrógeno.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** además incluye suministrar exceso de gas de reducción de hidrógeno al bio-reactor de fermentación.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** el paso (i) definido en la reivindicación 7 es realizado y la aclimatación de la bacteria en el bio-reactor de fermentación para el cobalto es prevenida mediante el mantenimiento de una concentración constante de cobalto y el ajuste de los parámetros seleccionados de velocidad del gas, velocidad del líquido, velocidad de agitación, velocidad de alimentación de los nutrientes y presión parcial del gas de hidrógeno.

Clostridium ljungdahlii sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I

RALPH S. TANNER,^{1*} LETRISA M. MILLER,¹ AND DECHENG YANG²

*Department of Botany and Microbiology, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma 73019,¹ and
 Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801²*

Clostridium ljungdahlii sp. nov. strain ATCC 49587^T (T = type strain) was isolated from chicken yard waste for its ability to produce ethanol from synthesis gas. This gram-positive, motile, sporeforming rod's metabolism was primarily acetogenic. *C. ljungdahlii* grew with carbon monoxide, hydrogen and carbon dioxide, ethanol, pyruvate, arabinose, xylose, fructose, or glucose. Methanol, ferulic acid, lactate, galactose, and mannose did not support growth. The G+C content was 22 to 23 mol%. *C. ljungdahlii* is the first acetogen in clostridial 23S rRNA homology group I.

The potential for microbial production of liquid fuels (e.g., ethanol) and commodity chemicals (e.g., acetic acid) from synthesis gas (CO-H₂-CO₂) derived from coal has been recognized (27) and has prompted investigations of microorganisms which can metabolize the components of synthesis gas under anoxic conditions. A strain which could produce ethanol from synthesis gas was isolated from chicken yard waste (2, 25). In this report we describe this strain, a new, anaerobic, gram-positive, spore-forming rod which is the first acetogenic species in clostridial rRNA group I, as described by Johnson and Francis (15).

(A portion of this work has appeared previously [24].)

MATERIALS AND METHODS

The acetogenic clostridium described here was isolated by Sudhakar Barik at the University of Arkansas from an enrichment inoculated with chicken yard waste at an initial pH of 5.0 and incubated at 37°C under an atmosphere of synthesis gas (CO-H₂-CO₂-CH₄, 73:15:10:2) (2). This isolate was named *Clostridium ljungdahlii*. The single strain was designated strain PETC^T (T = type strain) and was deposited in the American Type Culture Collection as strain ATCC 49587^T.

Media. The media used for routine growth and characterization experiments were prepared by using strict anoxic techniques (1) and contained (per liter) 1.0 g of NH₄Cl, 0.8 g of NaCl, 0.1 g of KCl, 0.1 g of KH₂PO₄, 0.2 g of MgSO₄ · 7H₂O, 0.02 g of CaCl₂ · 2H₂O, 1.0 g of NaHCO₃, 1.0 g of yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), 0.2 g of cysteine hydrochloride, 0.2 g of Na₂S · 9H₂O, 10 ml of a trace metal solution (22), and 10 ml of a vitamin solution (22). An atmosphere containing N₂ and CO₂ (80:20, pressurized to 70 kPa) was used for growth with organic substrates, which were added to a final concentration of 5 g/liter. H₂-CO₂ (80:20, pressurized to 200 kPa) or CO-N₂-CO₂ (75:20:5, pressurized to 140 kPa) was used for growth on gaseous substrates. The initial medium pH was 5.8 to 5.9. Cultures were incubated at 37°C. The optimum pH (initial pH) was determined in medium containing fructose as the substrate and sodium acetate, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), or N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid (TES) (Sigma Chemical Co., St. Louis,

Mo.) as a buffer (1.0 g/liter). The optimum temperature for growth was determined by using fructose as the substrate.

Fermentation balance. A fermentation balance was determined for growth on fructose or H₂-CO₂. Fructose was measured by using a phenol-sulfuric acid carbohydrate assay (9). Utilization of H₂-CO₂ (80:20) was determined by using a pressure transducer system (8) to measure the reduction of gas pressure in sealed culture tubes (1). Individual gases were measured with a gas chromatograph equipped with a thermal conductivity detector (Varian, Sugar Land, Tex.) and a Porapak Super Q column (Alltech, Deerfield, Ill.). The following equation was used to calculate the amount of gas consumed: 4H₂ + 2CO₂ → CH₃COOH + 2H₂O (19). Acetic acid was measured by ion-exclusion high-performance liquid chromatography on an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Richmond, Calif.). Ethanol was measured enzymatically with alcohol dehydrogenase (kit 332-B; Sigma) or by gas chromatography on a GP 10% SP-1200/1% H₃PO₄ Chromosorb WAW column (Supelco, Inc., Bellefonte, Pa.).

Electron microscopy. Cells of fructose- or H₂-CO₂-grown *C. ljungdahlii* were allowed to settle onto carbon-coated Formvar film on copper electron microscope grids. For whole-cell transmission electron microscopy, cells were fixed with glutaraldehyde or left untreated and then negatively stained with phosphotungstic acid or uranyl acetate or left unstained. Electron micrographs were obtained with a Zeiss model EM-10 transmission electron microscope. Energy-dispersive spectroscopy (12) of unstained fructose- or H₂-CO₂-grown cells was performed with a JOEL model 2000 transmission electron microscope equipped with a Delta 4 Quantum thin-window X-ray detector (Kevex, San Carlos, Calif.).

16S rRNA sequence analysis. Cells of *Clostridium barkeri* ATCC 25849, *Clostridium lituseburense* ATCC 25759, *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013, and *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 were provided by John L. Johnson. The 16S rRNA sequences of *C. barkeri*, *C. lituseburense*, *C. ljungdahlii*, *C. pasteurianum*, and *C. tyrobutyricum* were determined in the laboratory of Carl R. Woese (17, 20). The 16S rRNA sequences of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* have been published previously (3, 13). Sequences were analyzed by a distance matrix analysis by using a program for fitting trees to distance matrix data, as adapted by workers in the laboratory of Carl R. Woese (7, 16, 20).

Analytical procedures. Growth was determined by measuring turbidity in aluminum seal tubes (1). DNA from *C. ljungdahlii* was purified, and the G+C content was deter-

* Corresponding author.

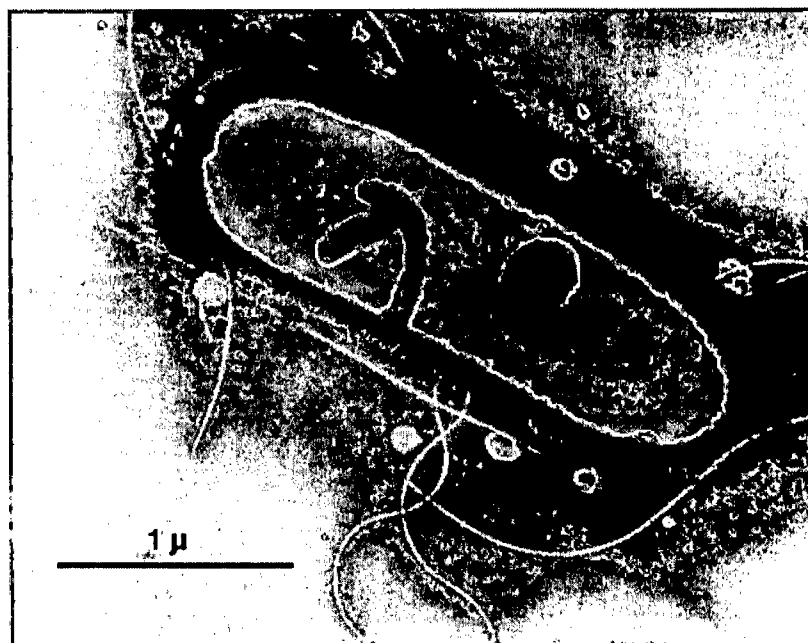


FIG. 1. Transmission electron micrograph of *C. ljungdahlii*. Cells were spread on a carbon-coated Formvar grid and negatively stained with 1% phosphotungstic acid (pH 7). The micrograph was taken with a Zeiss model EM-10 transmission electron microscope.

mined from the melting temperature by using a Beckman model DU-8B spectrophotometer equipped with a melting temperature module (14). Indole production and esculin hydrolysis were determined by using standard assays (21).

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences of *C. barkeri*, *C. lituseburense*, *C. ljungdahlii*, *C. pasteurianum*, and *C. tyrobutyricum* were deposited in the GenBank library under accession numbers M23927, M59107, M59097, M23930, and M59113, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Cellular morphology. Electron and phase-contrast microscopy revealed that cells of *C. ljungdahlii* were motile, straight rods (0.6 by 2 to 3 μm) occurring mostly as single cells (Fig. 1). Spores were rarely observed; terminal to subterminal nonswelling structures tentatively identified as forespores were observed infrequently. Cells were peritrichous and had a thick (0.1- to 0.2-μm) coat of material of unknown composition surrounding each cell. Electron microscopy of *C. ljungdahlii* was problematic. The majority of cells in unstained or stained specimens that were not fixed or were fixed with glutaraldehyde were electron opaque. Energy-dispersive spectroscopy (Fig. 2) indicated that these electron-opaque cells contained calcium, as shown by the X-ray peaks at 3.7 keV ($K\alpha_1$) and 4.0 keV (K edge) (12). The calcium was probably associated with the cell envelope, since lysed cells also were frequently opaque to transmission electron microscopy (data not shown).

Physiology. *C. ljungdahlii* grew autotrophically with H_2 - CO_2 or CO and used a number of organic compounds, including ethanol, pyruvate, and some simple carbohydrates, as carbon and energy sources (Table 1). Growth on formate was poor. Cultures partially metabolized malate, as indicated by a pH change in the medium after incubation with this substrate. Improved control of culture pH near the

optimum value (see below) might result in better growth of *C. ljungdahlii* with formate or malate. Methanol, even when tested at a concentration of 1 g/liter, as well as the methoxylated compounds ferulic acid and trimethoxybenzoate, did not support growth.

Addition of a vitamin solution (22) was required for growth of *C. ljungdahlii*. Addition of yeast extract (1 g/liter) or Casamino Acids (2 g/liter) was also required for reliable, reproducible growth. The exact nutritional requirements of *C. ljungdahlii* were not determined.

The optimum initial culture pH for growth was 6.0; the initial culture pH range at which growth occurred was 4.0 to 7.0. A final pH of 3.9 to 4.1 was obtained when *C. ljungdahlii* was cultured in unbuffered media. The optimum temperature for growth was 37°C; the growth temperature range was 30 to 40°C. Under the optimal pH and temperature conditions, a doubling time of 0.26 h⁻¹ was obtained for growth with either fructose or H_2 - CO_2 .

Cultures of *C. ljungdahlii* quantitatively converted 4 mmol of hydrogen and 2 mmol of carbon dioxide into 1 mmol of acetic acid or 1 mmol of fructose into 2.44 mmol of acetic acid; no other end products of metabolism were detected in these experiments. The fermentation balances demonstrate that *C. ljungdahlii* is an acetogen, a bacterium which can synthesize acetate from one-carbon compounds (19). Most acetogens quantitatively convert carbohydrates to acetate: 1 hexose → 3 acetic acid. The conversion by *C. ljungdahlii* of 1 fructose molecule to 2.44 acetate molecules is similar to the yields of acetate observed for other acetogens: 2.1 to 2.3 acetate molecules per hexose molecule for *Acetobacterium carbinolicum* (10); 2.2 to 2.8 acetate molecules per fructose molecule for *Acetobacterium woodii* in media supplemented with yeast extract and/or Trypticase (22a); 2.3 to 3.0 (average, 2.5) acetate molecules per glucose molecule for *Acetogenium kivui* (18); an average of 2.55 acetate molecules per

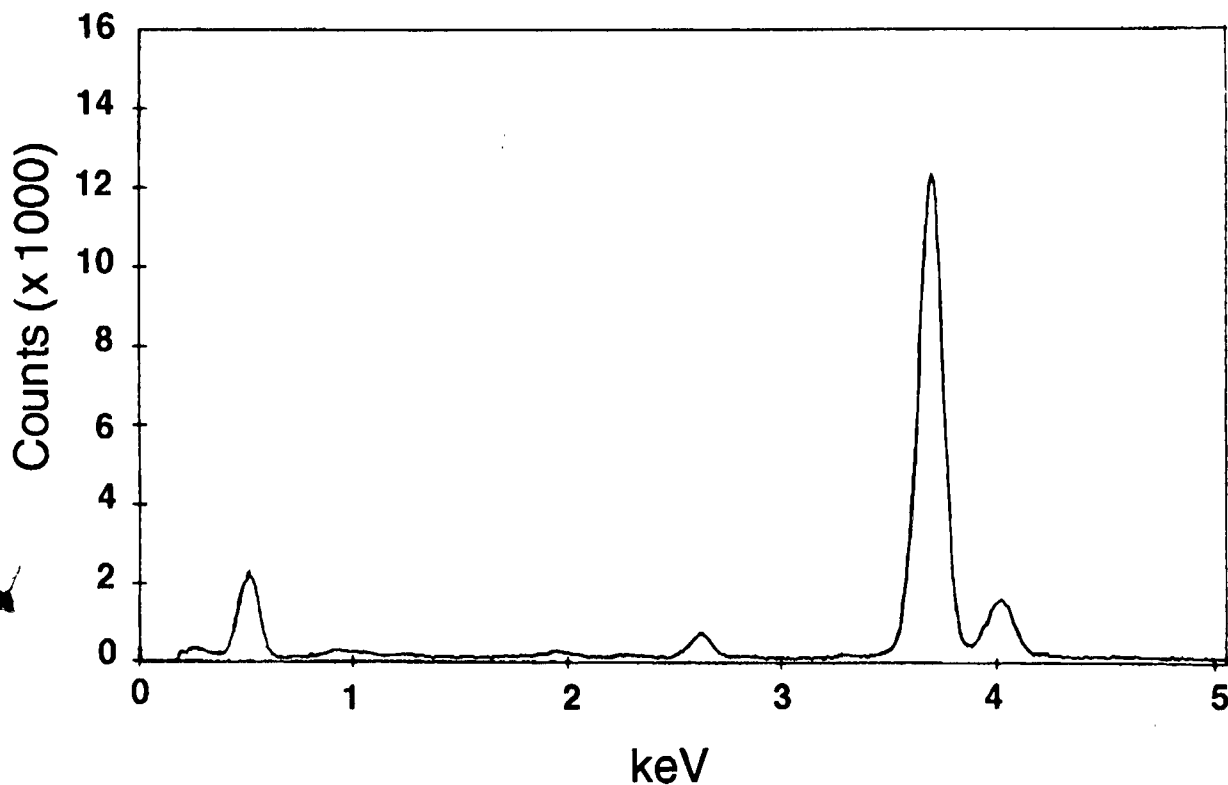


FIG. 2. X-ray spectrum from a cell of *C. ljungdahlii*.

TABLE 1. Substrate utilization by *C. ljungdahlii*

Substrate ^a	Result ^b	Substrate	Result
H ₂ -CO ₂	+	Ribose	+
CO	+	Xylose	+
Sodium formate	+/-	Glucose	+ ^d
Methanol	-	Fructose	+
Ethanol	+	Galactose	-
Sodium pyruvate	+	Mannose	-
Sodium lactate	-	Sorbitol	-
Glycerol	-	Sucrose	-
Sodium citrate	-	Lactose	-
Sodium succinate	-	Maltose	-
Sodium fumarate	+	Starch	-
Malic acid	- ^c	Ferulic acid	-
Erythrose	+	Trimethoxybenzoic acid	-
Threose	+	Casamino Acids	+/-
Arabinose	+	Alanine	-

^a Each substrate was tested for the ability to support growth of *C. ljungdahlii*. Gaseous substrates were added to the gas phase of a crimp-sealed tube. Other substrates were added at a concentration of 5 g/liter to a medium containing 1 g of yeast extract per liter. A 2% inoculum of fructose-grown cells was used; no growth or poor growth results were confirmed by using H₂-CO₂-grown cells as an inoculum.

^b Growth was measured in each aluminum seal tube (1). Levels of growth (compared with the control) were scored as follows: +, A₆₀₀ of >0.1; +/-, A₆₀₀ between 0.1 and 0.01; and -, A₆₀₀ of <0.01.

^c Malate was metabolized by *C. ljungdahlii*, as indicated by a change in the culture pH.

^d Cultures grown previously on fructose or H₂-CO₂ required adaptation for growth on glucose.

glucose molecule for *Clostridium thermoaceticum* (11); and 2.5 acetate molecules per glucose molecule for *Clostridium thermoautotrophicum* (26). When, examined, the balance of the hexose utilized was converted into cell mass (10). In the strictest sense, an acetogen is a bacterium that uses the Wood-Ljungdahl pathway to reduce CO₂ to acetate (19). The quantitative conversion of CO₂ and H₂ to acetic acid by *C. ljungdahlii* is consistent with the probability that this organism possesses this pathway.

Cultures of *C. ljungdahlii*, which was isolated for its ability to convert synthesis gas to ethanol (2, 25), often have 0 to 2 mM ethanol present as an end product of metabolism. The ability to both produce and consume ethanol has been observed in other acetogens (specifically, in species of the genus *Acetobacterium*) (4). Cultures may also produce 0 to 0.3 CO₂ molecule per fructose molecule fermented. Vega et al. (25) noted that *C. ljungdahlii* produced trace amounts of CO₂ when it fermented fructose and produced CO₂ and traces of H₂ when it metabolized CO.

Cultures did not hydrolyze esculin and produced indole from tryptophan.

Phylogeny. The phylogenetic relationship of *C. ljungdahlii* to other clostridia is shown in Fig. 3. *C. ljungdahlii* was found to be closely related to *C. tyrobutyricum*, which ferments carbohydrates to butyrate and acetate (5). *C. ljungdahlii* is a member of clostridial 23S rRNA homology group I; the 16S rRNA sequence analysis clustered *C. ljungdahlii* with two other group I clostridia, *C. pasteurianum* and *C. tyrobutyricum*. *C. lituseburense* is a species in clostridial rRNA homology group II, and *C. barkeri* is a representative of the clostridia whose DNAs have compar-

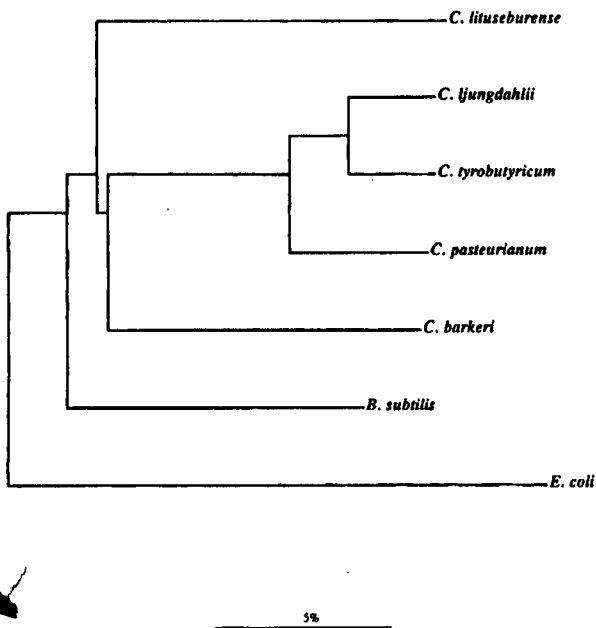


FIG. 3. Phylogeny of *C. ljungdahlii* as determined from a 16S rRNA sequence analysis. The total horizontal distance between two species indicates the difference between their sequences. The bar indicates a distance corresponding to a 5% difference.

atively high G+C contents and which do not belong to either rRNA homology group, as described by Johnson and Francis (15). *C. ljungdahlii* is the first known acetogen in clostridial rRNA homology group I. The phylogeny of six other acetogens (*Acetobacterium woodii*, *Acetogenium kivui*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *C. thermoaceticum*, and *Eubacterium limosum*) was examined by 16S rRNA oligonucleotide cataloging, which showed that none of these species belonged to either homology group I or group II of the clostridia (23). A more recent examination of the phylogeny of the clostridia, including the rRNA homology groups, has been published (6).

C. ljungdahlii's DNA had a G+C content of 22 to 23 mol%, as determined by the melting temperature method. *Clostridium putrefaciens* is another clostridium with a very low G+C content (22 to 25 mol%) reported for its DNA (5). This G+C content is significantly lower than the G+C contents reported for other acetogens (19).

Phenotypically, *C. ljungdahlii* is distinguishable from most clostridia since its metabolism is basically acetogenic. *C. ljungdahlii* is phenotypically distinct from other acetogens as follows (5, 19): from *Acetogenium kivui*, *C. thermoaceticum*, and *C. thermoautotrophicum*, which are thermophiles; from *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium woodii*, *C. formicoaceticum*, *C. thermoaceticum*, *C. thermoautotrophicum*, and *Eubacterium limosum*, which can grow with methanol; from *C. formicoaceticum* and *Clostridium magnum*, which do not grow with H₂-CO₂; from *C. thermoaceticum* and *Eubacterium limosum*, which are not motile; from *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium wieringae*, and *Acetobacterium woodii*, which can grow with lactate; and from *C. aceticum*, whose pH optimum is 8.3. The optimum growth pH is lower than that reported for most acetogens (19); only *C. thermoautotrophicum* has a lower reported optimum pH (pH 5.7).

C. ljungdahlii is the first known acetogenic member of rRNA homology group I, which includes solvent-producing species, such as *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, and *Clostridium butyricum* (5, 15). A comparative biochemical study of these species could be helpful for improving the conversion of synthesis gas to ethanol catalyzed by *C. ljungdahlii* (2, 25).

Description of *Clostridium ljungdahlii* sp. nov. *Clostridium ljungdahlii* (ljung.dahl'i.i. M.L. gen. n. *ljungdahlii*, of Ljungdahl, in recognition of Lars G. Ljungdahl's research contributions in both the study of acetogens and the study of clostridia). Cells are gram-positive, motile rods (0.6 by 2 to 3 μm) and occur mostly singly. Cells rarely sporulate. Growth occurs only under anoxic conditions. The optimum temperature and initial pH for growth are 37°C and 6.0, respectively.

Grows autotrophically with H₂-CO₂ or CO and chemoor-ganotrophically with formate, ethanol, pyruvate, fumarate, erythrose, threose, arabinose, xylose, glucose, and fructose. Methanol, ferulate, trimethoxybenzoate, lactate, glycerol, citrate, succinate, galactose, mannose, sorbitol, sucrose, lactose, maltose, and starch are not utilized. Acetic acid is the major end product of metabolism; traces of ethanol may also be produced.

The G+C content of the DNA is 22 to 23 mol% (as determined by the melting temperature method). A member of clostridial 23S rRNA homology group I, as determined by 16S rRNA sequence analysis.

The type strain, strain PETC, was isolated from chicken yard waste and has been deposited in the American Type Culture Collection as strain ATCC 49587.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sudhakar Barik, who originally isolated *C. ljungdahlii*, Ellen Johnson, and E. C. Clausen for their interest and assistance. We also thank John L. Johnson for providing some of the clostridial tissues used in this study and Carl R. Woese for the 16S rRNA sequence analysis. Greg Strout and Scott Russell at the Samuel Roberts Noble Laboratory of Electron Microscopy were instrumental in the electron microscopy work. We also thank Bill Lorowitz for helpful discussions.

Part of this work was supported by contract DE-AC22-85PC80012 from the U.S. Department of Energy (to E. C. Clausen) and grant BSR-87-05352 from the National Science Foundation (to C. R. Woese).

REFERENCES

1. Balch, W. E., and R. S. Wolfe. 1976. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. Appl. Environ. Microbiol. 32:781-791.
2. Barik, S., S. Prieto, S. B. Harrison, E. C. Clausen, and J. L. Gaddy. 1988. Biological production of alcohols from coal through indirect liquefaction. Appl. Biochem. Biotechnol. 18: 363-378.
3. Brosius, J., J. L. Palmer, J. P. Kennedy, and H. F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4801-4805.
4. Buschhorn, H., P. Durre, and G. Gottschalk. 1989. Production and utilization of ethanol by the homoacetogen *Acetobacterium woodii*. Appl. Environ. Microbiol. 55:1835-1840.
5. Cato, E. P., W. L. George, and S. M. Finegold. 1986. Genus *Clostridium*, p. 1141-1200. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
6. Cato, E. P., and E. Stackebrandt. 1989. Taxonomy and phylogeny, p. 1-26. In N. P. Minton and D. J. Clarke (ed.), Clostridia. Plenum Press, New York.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Radicación N° 03-2550
Clasificación internacional (IPC): C12P 7/06
Concepto Técnico: 1045

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (fase nacional)	☒	Cap. I	☐
		Cap. II	☒
No. Sol. Internacional	PCT/US2001/23149		
Fecha de Presentación Internal.	23/07/2001		

Como resultado del examen definitivo de fondo, realizado con fundamento en el artículo 48 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción: Folios: 28 a 115 como se radicó inicialmente.

Reivindicaciones: Folios: 116 a 121 como se radicó inicialmente.
Folios: 199 a 203 modificadas el 29/10/2007
Folios: 267 a 270 modificadas el 08/03/2010

Figuras: Folios: 122 a 123 como se radicó inicialmente.

Prioridad: US 60/2220,794 del 25 de Julio de 2000

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: “Métodos para incrementar la producción de etanol en una fermentación microbiana”

El objeto de la presente solicitud de patente se refiere a un método estable y continuo para producir etanol a partir de fermentación de bacterias anaerobias de un sustrato gaseoso, el método comprende: cultivar bacterias anaeróbicas acetogénicas de *Clostridium ljungdahlii* en un bioreactor con un medio líquido en un pH de 5.5; suministrar a dicho reactor el sustrato gaseoso que comprende al menos un gas reductor seleccionado del grupo consistente de monóxido de carbono e hidrógeno; y manipular dichas bacterias reduciendo el potencial redox o incrementando la proporción de NAD(P)H a NAD(P) en el caldo de fermentación después de que la bacteria alcanza una concentración celular estable, estas condiciones de cultivo incrementan la producción de etanol, quedando en una proporción etanol: acetato de 1:1 a 1:20.

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de incrementar la fermentación de bacterias acetogénicas de manera que se dirija la producción hacia la formación de etanol en lugar de acetato.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un método estable y continuo en el cual se adecuan las condiciones de cultivo para que la fermentación se dirija a la producción de etanol, a partir de un sustrato gaseoso.

El objeto de la solicitud definida anteriormente se clasificó en la IPC C12P 7/06

3. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria – 25/07/2000

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud, no encontrándose documentos relevantes:

4. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

4.1. Novedad (artículo 16 D486)

La solicitud en estudio reclama un método estable y continuo para producir etanol a partir de la fermentación anaeróbica bacteriana de un sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono, el método comprende cultivar en un bio-reactor de fermentación bacterias de *Clostridium ljungdahlii* que son capaces de producir etanol en un medio líquido nutriente que incluye pantotenato de calcio y a un pH menor de 5.5 siendo la concentración de ácido acético libre en el bio-reactor de fermentación de menos de 5 g/L y la proporción de etanol a acetato en el caldo de fermentación dentro del bio-reactor de 1:1 a 20:1, caracterizado porque el pantotenato de calcio es alimentado al bio-reactor de fermentación a una cantidad de 0.5 hasta 50 µg/g de célula seca de bacteria producida en el bio-reactor y se mantiene una proporción específica de captación de monóxido de carbono de al menos 0.5 mmol de CO/g de célula seca de bacteria /minuto en el bio-reactor, de tal modo que el etanol estable es producido a un grado de producción mayor que 10 g/L/día (Reivindicación 1).

Teniendo en cuenta que en el estado de la técnica, específicamente en D1, se había reportado la capacidad de producir etanol de la bacteria *Clostridium ljungdahlii*, detallando la forma en que se dirige la producción de etanol o de acetato de acuerdo con las condiciones del cultivo (resumen), en especial por mantener el pH entre 4.0 y 4.5 para favorecer la producción de etanol (columna 2, líneas 24 a 26). Divulgando la habilidad de este microorganismo para fermentar etanol a partir de sustrato gaseoso tipo CO y H₂O y/o CO₂ y H₂ (columna 2, línea 62 a 66).

Sin embargo, en D1 no se obtiene una producción de etanol igual a la obtenida en la solicitud, puesto que en los diferentes ejemplos la producción de etanol estable nunca es mayor de 10 g/L*día. Por tanto, la característica del nivel de producción de etanol hace novedosa a la invención frente a D1.

De esta manera, la solicitud en estudio cumple con el requisito de novedad establecido en el artículo 16 de la D486.

4.2. Nivel inventivo (artículo 18 D486)

El estado de la técnica más cercano es D1, el cual plantea un método para obtener etanol a partir de la misma especie bacterial utilizada en la solicitud, suministrando como fuente de carbono un sustrato gaseoso de CO y en donde además se establecen las condiciones para optimizar la producción del etanol en cambio del acetato, incluye la adición en el medio de cultivo de una solución de vitamina-B que contiene pantotenato de calcio.

Sin embargo, la solicitud en estudio presenta un avance frente al estado de la técnica en lo referente a:

- Producción de etanol: la solicitud en sus diferentes modalidades, logra una producción de etanol mayor a 12g/L, que corresponde a una productividad de etanol mayor a 10g/L*día, mientras que en D1 la producción de etanol máxima era de 7µg/ml.
- Las modificaciones técnicas realizadas al método de producción de etanol se refieren a variables no sugeridas por el estado del arte: específicamente, modificaciones en la concentración de H₂, utilización de células recicladas y suministro de alta presión al bio-reactor fueron las condiciones que lograron optimizar el proceso de producción de etanol; mientras que en D1 se sugiere que una producción alta de etanol ocurre cuando la *C. ljungdahlii* es mantenida en condiciones de crecimiento limitado, por ejemplo alterando el pH y los niveles de nutrientes del organismo.

Por su parte, D3 no hacía mención a estas modificaciones o condiciones relacionadas con la conversión del proceso preferentemente a producción de etanol. Por tanto, se considera que en estos aspectos no afecta el nivel inventivo de la solicitud.

De acuerdo con lo anterior la materia reclamada en la solicitud cumple con el requisito de nivel inventivo establecido en el artículo 18 de la Decisión 486.

4.3. Aplicabilidad Industrial

La solicitud cumple con el requisito de aplicabilidad industrial por proveer un método estable continuo para la producción de etanol, que puede ser usado en la industria química.

5. **Conclusión:**

La presente solicitud cumple con los requisitos de patentabilidad y por tanto, se recomienda **conceder beneficio de patente a las reivindicaciones 1 a 10** de los folios 267 a 270.

CONCEPTO TÉCNICO No. 1045	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202052
-------------------------------------	---