



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-124646- -00000-0000

21. EXPEDIENTE N° _____

Fecha: 2011-09-23 14:29:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 158

54. TÍTULO PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS FINALES
FERMENTATIVOS DE CLOSTRIDIUM sp.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12P 1/04

71. SOLICITANTE QTEROS, INC.

DOMICILIO Marlborough, Massachusetts, Estados Unidos de América

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 11-124646- -00000-0000

Fecha: 2011-09-23 14:29:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 158

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1 SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: QTEROS, INC.

Dirección: 100 Campus, Drive, 6th Floor
Marlborough, Massachusetts 01752, Estados
Unidos de América.

Nacionalidad o domicilio: Marlborough,
Massachusetts, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Massachusetts,
Estados Unidos de América.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 **Fax:** 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER HOJA ANEXA

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/026730 Fecha 09 de marzo de 2010

Publicación Internacional No. WO 2010/104896 A9 Fecha 16 de septiembre de 2010

6 TÍTULO (54) PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS FINALES FERMENTATIVOS
DE CLOSTRIDIUM sp.

7 Clasificación Internacional (51) C12P 1/04

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

(32) Fecha

09 de marzo de 2009

09 de marzo de 2009

20 de abril de 2009

(31) Número de Solicitud

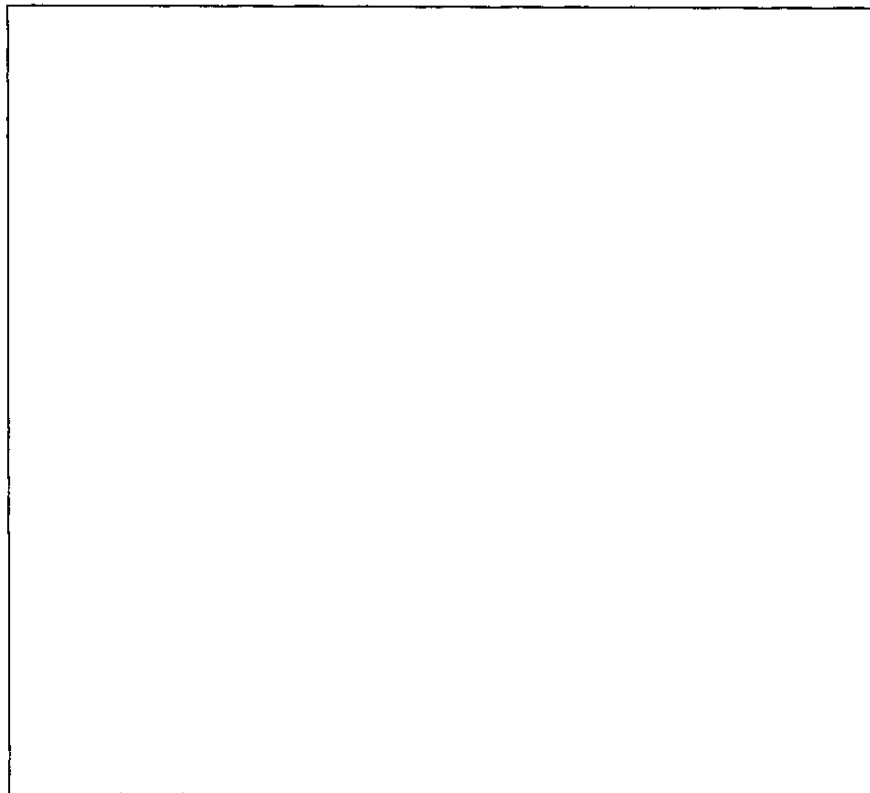
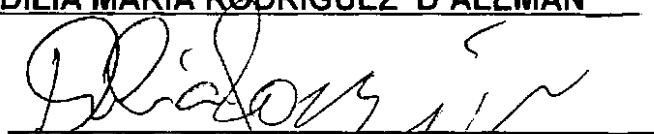
61/158.581

61/158.600

61/171.077

9 Comprobante de pago No.11-87286 // 11-92802 // 11-92803 Fecha 07 de septiembre de 2011

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente**NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMANFIRMA: 

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXO
INVENTORES

1.) PAREKH, Sarad

(4 Morgan Drive, Grafton, Massachusetts 01536, Estados Unidos de América);

2.) KARIM, Khursheed

(4 Autum Lane, Amherst, Massachusetts 01002, Estados Unidos de América);

3.) KILBANE, John

(4 Shrewsbury Green Drive, Unit 1, Shrewsbury, Massachusetts 01545, Estados Unidos de América).

000002

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

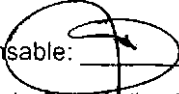
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0087286
		Bogotá D.C., Septiembre 07 de 2011 - 16:44:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

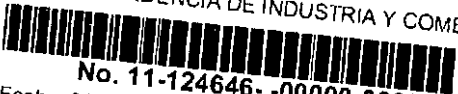
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325037926	07/09/2011	51.575.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-124646-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 14:29:05 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 158

000003

P = 3086

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0092802

Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2011 - 16:32:06

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353179256	21/09/2011	65.400.000.00

*** Conceptos Pagados ***

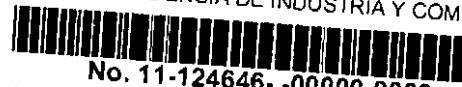
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00
				500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-124646-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 14:29:05 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 158

000004

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Septiembre 21 de 2011 - 16:32:22

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0092803

Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2011 - 16:32:06

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353179256	21/09/2011	65.400.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. JUDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-124646- -00000-0000

Fecha: 2011-09-23 14:29:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 158

000005

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Septiembre 21 de 2011 - 16:32:22

PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS FINALES FERMENTATIVOS
DE *CLOSTRIDIUM* sp.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

En un aspecto, se describen métodos para aumentar la producción de etanol y otros productos finales fermentativos a partir de una amplia variedad de materias primas por los microorganismos de *Clostridio*, tales como *Clostridium phytofermentans*. Se describe un método de mejorar el rendimiento de la fermentación de los microorganismos de *Clostridio*, tales como *Clostridium phytofermentans* mediante el uso de una estrategia discontinua alimentada, así como métodos de producir los productos finales fermentativos, tales como alcoholes y/o agentes químicos con microorganismos de *Clostridium* fermentadores, tales como *Clostridium phytofermentans* en presencia de compuestos que contienen ácidos grasos y/o a pH reducido.

000006

**PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS FINALES FERMENTATIVOS
DE *CLOSTRIDIUM sp.***

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud provisional U.S. Serie No. 61/158.581, presentada el 9 de marzo de 2009, Solicitud provisional US Serie No. 61/158.600, presentada el 9 de marzo de 2009, Solicitud provisional US Serie No. 61/171.077, presentada el 20 de abril de 2009, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

[0002] El costo creciente de los combustibles de transporte basados en petróleo, las reservas de petróleo cada vez más escasas y las preocupaciones sobre el impacto ambiental de la combustión de combustibles de petróleo están impulsando una fuerte demanda de alternativas viables para reemplazar los combustibles basados en petróleo. En particular, en los últimos años se ha destacado la promesa de producir biocombustibles a través de la bioconversión de una variedad de material de biomasa pretratado, tal como material lignocelulósico, almidón, o residuos/subproductos agrícolas, en combinación con enzimas y sistemas de levadura/bacterias. Un desafío particular es desarrollar tecnología con el potencial para convertir económicamente materiales que contienen polisacáridos tales como materiales de plantas leñosas o no leñosas, así como materiales de residuo y productos secundarios del procesamiento de material de planta en combustibles para transporte de alto valor y otras formas de energía o materias primas químicas. Varios ejemplos de estos materiales que contienen polisacáridos incluyen material celulósico, lignocelulósico, y hemicelulósico; material que contiene pectina; almidón; madera; rastrojo de maíz; pasto varilla, papel; y lodos de pulpa de papel.

[0003] Algunos procesos para convertir estos materiales que contienen polisacáridos en biocombustibles tales como etanol requieren primero la conversión de los sustratos de biomasa pretratados tales como materiales que contienen almidón o

000007

celulosa en azúcares simples (sacarificación) a través de, por ejemplo, hidrólisis enzimática, y la subsiguiente conversión (fermentación) de estos azúcares simples en biocombustibles tales como etanol mediante la fermentación con levaduras. Sin embargo, las tecnologías de bioconversión actuales han enfrentado problemas de costos de producción altos y desviación de los productos agrícolas del suministro de alimentos.

[0004] En algunas fermentaciones para la producción de etanol, un azúcar simple, tal como sacarosa, se obtiene y fermenta directamente en etanol. Tales procesos se usan, por ejemplo, en Brasil para convertir caña de azúcar en etanol de grado combustible. Estos procedimientos están limitados geográficamente a donde las fuentes de azúcares simples son económicas, tal como en las regiones de cultivo de caña de azúcar. En forma adicional, estos procesos acarrear el aspecto indeseable de desviar una fuente alimenticia valiosa, tal como el azúcar, para usos industriales más que alimenticios.

[0005] Algunas fermentaciones para la producción de etanol utilizan material que primero requiere la hidrólisis, o conversión en azúcares menos complejos o de peso molecular más bajo antes de la conversión en etanol. Tales procesos a menudo se describen para la producción de etanol de maíz, el almidón extraído del maíz se degrada, por ejemplo por enzimas agregadas, y luego finalmente se convierte en etanol con organismos tales como una especie de *Saccharomyces* o *Zymomonas*. El uso de otros materiales, tales como materiales celulósicos, hemicelulósico o lignocelulósico también requiere con frecuencias la hidrólisis con enzimas agregadas o por otros medios químicos/térmicos es un tema de mucha investigación, pero porco éxito histórico.

[0006] El uso de estas enzimas que se agregan al proceso es poco conveniente desde el punto de vista del costo y debido al hecho de que el procesador generalmente se limita a las enzimas que están fácilmente disponibles en el comercio. Históricamente, las enzimas disponibles en el comercio se han seleccionado para procesos tales como la conversión de almidón en azúcares simples tales como glucosa o fructosa, aplicaciones de lavado de ropa, y alimentos de cereal. Estas son generalmente altamente

000008

especializadas, lo que significa que no se puede usar una sola enzima con el material alimenticio de amplia variación. En cambio, con frecuencia se usan numerosas enzimas y se combinan en un "cóctel de enzimas". Con tales mezclas se obtiene una actividad más amplia, sin embargo esta actividad más amplia puede venir con un precio significativamente más alto, ya que solo una porción de las enzimas agregadas puede ser útil con el sustrato particular que se usa en cualquier lote particular. Otras enzimas, que son parte del cóctel, pueden no ser activas en un sustrato pero se incluyen en la mezcla para proporcionar utilidad para otros sustratos alimenticios que se pueden usar. Como resultado, en cualquier lote particular al menos una porción de las enzimas agregadas puede no contribuir significativamente al procesamiento y se desechan.

[0007] En consecuencia, es de desear un proceso de fermentación para producir etanol u otros productos convenientes de varias materias primas con alto rendimiento y productividad.

[0008] La fermentación del etanol a partir de la biomasa que incluyen biomasa que contiene material celulósico, lignocelulósico, pectina, poliglucosa y/o polifruetosa puede proporcionar soluciones muy necesarias para el problema de energía mundial. Se han informado especies de levaduras, hongos y bacterias capaces de convertir la biomasa celulósica de sus azúcares monoméricos en etanol. Sin embargo, muchos de estos microorganismos producen etanol solo en concentraciones bajas. Esta limitación se puede deber a una carencia general de tolerancia al etanol por el organismo, o un mecanismo de inhibición o supresión por retroalimentación presente en el organismo, o a algún otro mecanismo así como alguna combinación de estos mecanismos. Tales limitaciones de la producción de etanol pueden afectar además el título del etanol, que también afecta la productividad del etanol.

[0009] Se han descrito numerosos microorganismos de tipo salvaje y genéticamente modificados para la producción de alcohol por fermentación. Entre estos están *Thermoanaerobacter etanolicus*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium beijerinickii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium tyrobutyricum*,

000009

Clostridium thermobutiricum, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, y *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Moorella* ssp., *Carboxydocella* ssp., *Zymomonas mobilis*, recombinant *E. Coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Clostridium beijerickii* así como otros microorganismos. Las dificultades para usar estos u otros microorganismos para la producción de alcohol en escala industrial pueden incluir toxicidad celular en concentraciones de alcohol relativamente bajas, reducción de crecimiento o viabilidad celular en concentraciones de alcohol relativamente bajas, título de alcohol bajo, o productividad de alcohol baja. La tolerancia al alcohol es muy dependiente de la especie y cepa. Por ejemplo, en algunos procesos de fermentación, producción de alcohol pueden lenificarse o detenerse por completo a alrededor de 10-20 g/L de alcohol. Algunos organismos mueren o se deterioran severamente a alrededor de 20 g/L de alcohol, tal como etanol.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0010] En un aspecto, se proporciona en la presente un método para producir un producto final fermentativo que comprende: cultivar un medio que comprende *Clostridium* durante un primer período de tiempo en condiciones adecuadas para la producción de un producto final fermentativo por el mismo; añadir uno o más nutrientes al medio que comprende *Clostridium* antes de recolectar el producto final fermentativo; cultivar un medio que comprende *Clostridium* durante un segundo período de tiempo; y recolectar un producto final fermentativo del medio. En una forma de realización, la cepa de *Clostridium* es *Clostridium phytofermentans*. En otra forma de realización, el producto final fermentativo es etanol. En otra forma de realización, el medio comprende un material celulósico y/o lignocelulósico. En otra forma de realización, el material celulósico o lignocelulósico no se trata enzimáticamente con una cantidad suficiente de enzimas para convertir más de 15% del material celulósico o lignocelulósico a azúcares simples dentro de 24 horas.

[0011] En un aspecto, se proporciona en la presente un método de producir un producto final fermentativo que comprende las

000010

etapas de: cultivar una cepa de *Clostridium phytofermentans* en un medio; mantener la concentración total de compuestos de azúcar en el medio al menos aproximadamente 18 g/L; y recolectar un producto final fermentativo del medio. En una forma de realización, mantener la concentración total de los compuestos de azúcar comprende añadir uno o más componentes del medio, al menos uno de los cuales comprende uno o más compuestos de azúcar en el medio al menos una vez durante el cultivo, donde los componentes del medio se añaden a un recipiente que contiene el cultivo. En otra forma de realización, la concentración total de compuestos de azúcar en el medio se mantiene dentro del rango de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 100 g/L para una porción del cultivo. En otra forma de realización, la concentración total de compuestos de azúcar en el medio varía en menos de aproximadamente 25% durante el período de producción del producto final fermentativo. En otra forma de realización, el producto final fermentativo es etanol. En otra forma de realización, que además comprende añadir un componente del medio que comprende uno o más materiales que contienen nitrógeno en el medio al menos once durante la fermentación, y donde el componente del medio se añade a una recipiente que contiene el cultivo. En otra forma de realización, uno o más de los componentes del medio comprende uno o más materiales que contienen nitrógeno. En otra forma de realización, el medio comprende un material celulósico o lignocelulósico. En otra forma de realización, el material celulósico o lignocelulósico no se trata enzimáticamente con una cantidad suficiente de enzimas para convertir más de 15% del material celulósico o lignocelulósico a azúcares simples dentro de 24 horas.

[0012] En un aspecto, se proporciona en la presente un método de producir un producto final fermentativo, el método que comprende las etapas de: cultivar una cepa de *Clostridium* en un medio; y añadir uno o más componentes del medios al medio durante el cultivo del *Clostridium* donde uno o más de los componentes del medio comprende uno o más compuestos de azúcar, y el uno o más compuestos de azúcar se añaden en relación con una cantidad de azúcar convertido por el *Clostridium* en otros compuestos. En una

000011

forma de realización, uno o más de los componentes del medio comprende una fuente de nitrógeno. En otra forma de realización, la fuente de nitrógeno incluye prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina. En otra forma de realización, los componentes del medio comprenden un material celulósico o lignocelulósico. En otra forma de realización, el material celulósico o lignocelulósico no se trata enzimáticamente con una cantidad suficiente de enzimas para convertir más de 15% del material celulósico o lignocelulósico en azúcares simples dentro de 24 horas.

[0013] En un aspecto, se proporciona en la presente un método de producir a producto final fermentativo, el método que comprende: añadir un primer inóculo de una cepa de *Clostridium* a un medio; cultivar el *Clostridium* en condiciones adecuadas para la producción de etanol; añadir células viables adicionales de *Clostridium* sp. al medio más de cinco horas después de añadir el primer inóculo de *Clostridium* al medio; y recolectar el producto final fermentativo del medio. En una forma de realización, el método también comprende añadir uno o más componentes del medio al medio después de añadir el primer inóculo de *Clostridium*. En otra forma de realización, una adición de componentes del medio y una adición de células viables se produce en forma sucesiva o simultánea.

[0014] En un aspecto, se proporciona en la presente un método de producir etanol, el método que comprende las etapas de: eliminar una impureza de un material de etanol impuro para producir un material de etanol purificado, donde el material de etanol purificado es más de aproximadamente 90% (peso) de etanol, y el material de etanol impuro se deriva de un medio de fermentación obtenido por el cultivo de células de *Clostridium phytofermentans* en un cultivo discontinuo alimentado, y donde la concentración de etanol en el medio de fermentación es mayor de aproximadamente 7 g/L.

[0015] En un aspecto, se proporciona en la presente un método de producir un producto final fermentativo, el método que comprende las etapas de: cultivar un medio que comprende una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde el producto f000012

fermentativo se produce con una productividad instantánea de al menos aproximadamente 3 g/L día.

[0016] En un aspecto, se proporciona en la presente un método de producir un producto final fermentativo, que comprende: proporcionar un material celulósico, donde dicho material celulósico no se ha tratado con agentes químicos o enzimas suministrados exógenamente; combinar el material celulósico con un microbio en un medio, donde el medio no comprende enzimas suministradas en forma exógena; y fermentar el material celulósico en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir un producto final fermentativo.

[0017] En un aspecto, se proporciona en la presente un método de producir un producto final fermentativo, el método que comprende: fermentar la células de *Clostridium phytofermentans* en presencia de un modificador de pH, donde se produce un producto final fermentativo. En una forma de realización, el producto final fermentativo es etanol. En otra forma de realización, la fermentación de las células se produce a un pH, entre aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,2. En otra forma de realización, el pH es aproximadamente 6,5.

[0018] En un aspecto, se proporciona en la presente un método de producir un producto final fermentativo, el método que comprende: fermentar las células de una cepa de *Clostridium* en presencia de un material de ácido graso agregado, donde se produce un producto final fermentativo. En una forma de realización, el material que comprende ácido graso comprende uno o más de aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de canola, aceite de soja, o aceite de colza oleaginosa. En otra forma de realización, el material que comprende ácido graso comprende un fosfolípido o un lisofosfolípido.

[0019] En un aspecto, se proporciona en la presente un medio de fermentación, el medio que comprende células de *Clostridium phytofermentans* y un modificador de pH, donde se produce un producto final fermentativo.

[0020] En un aspecto, se proporciona en la presente un medio de fermentación, el medio que comprende células de una cepa de

000013

Clostridium y un compuesto que contiene ácido grado agregado, donde se produce un producto final fermentativo.

[0021] En un aspecto, se proporciona en la presente un medio de fermentación que comprende una cepa de *Clostridium phytofermentans*, una fuente de nitrógeno que comprende prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina, y un material celulósico o lignocelulósico.

[0022] En un aspecto, se proporciona en la presente un método de producir alcohol, el método que comprende: fermentar las células de una cepa de *Clostridium* y la presencia de un modificador de pH y un material de ácido graso, donde se produce un producto final fermentativo.

[0023] En un aspecto, se proporciona en la presente una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho fermentador está configurado para mantener una cantidad de compuestos de azúcar en un nivel que varía en menos de aproximadamente 25% durante la fermentación.

[0024] En un aspecto, se proporciona en la presente una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho fermentador está configurado para suplementar periódicamente dicho medio con componentes de medio adicionales o células viables adicionales de *Clostridium phytofermentans*.

[0025] En un aspecto, se proporciona en la presente una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho medio comprende un modificador de pH y un material celulósico o lignocelulósico. En una forma de realización, dicho medio también comprende un material de ácido graso.

[0026] En un aspecto, se proporciona en la presente una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho medio comprende una fuente de nitrógeno que comprende prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina, y un material celulósico o lignocelulósico.

000014

[0027] En un aspecto, se proporciona en la presente una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho medio comprende a material de ácido graso y un material celulósico o lignocelulósico.

[0028] En un aspecto, se proporciona en la presente un producto final fermentativo producido por la fermentación de un material celulósico o lignocelulósico con una cepa de *Clostridium phytofermentans*, en un medio que comprende una cantidad de compuestos de azúcar en un nivel que varía en menos de aproximadamente 25% durante la fermentación.

[0029] En un aspecto, se proporciona en la presente un producto final fermentativo producido por la fermentación de un material celulósico o lignocelulósico con una cepa de *Clostridium phytofermentans*, en un medio que comprende un modificador de pH.

[0030] En un aspecto, se proporciona en la presente un producto final fermentativo producido por la fermentación de un material celulósico o lignocelulósico con una cepa de *Clostridium phytofermentans*, en un medio que comprende un ácido graso.

[0031] En un aspecto, se proporciona en la presente un producto final fermentativo producido por la fermentación de un material celulósico o lignocelulósico con una cepa de *Clostridium phytofermentans*, en un medio que comprende a fuente de nitrógeno que comprende prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina.

[0032] En otro aspecto de la invención, se describe un método para la producción de etanol. El método comprende (1) inocular un medio de cultivo con una cepa de *Clostridium phytofermentans* para formar un caldo; (2) cultivar el caldo en condiciones adecuadas para el crecimiento del *Clostridium phytofermentans* y la producción de etanol por *Clostridium phytofermentans*; (3) añadir uno o más nutrientes al caldo mientras que está presente el *Clostridium phytofermentans*; y (4) continuar el cultivo del caldo en condiciones adecuadas para el crecimiento del *Clostridium phytofermentans* y la producción de etanol por el *Clostridium phytofermentans*, donde el etanol está presente en el caldo en una concentración de aproximadamente 5 g/L o más.

000015

[0033] En una forma de realización del proceso descrito anteriormente, el etanol está presente en el caldo con una concentración de aproximadamente 7 g/L o más. En otra forma de realización, el etanol está presente en el caldo con una concentración de aproximadamente 9 g/L o más. En otra forma de realización, el etanol está presente en el caldo con una concentración de aproximadamente 11 g/L o más. En otra forma de realización, el etanol está presente en el caldo con una concentración de aproximadamente 13 g/L o más. En otra forma de realización, el etanol está presente en el caldo con una concentración de aproximadamente 10-14 g/L.

[0034] En otra forma de realización, el medio de cultivo comprende un material celulósico y/o lignocelulósico. En otra forma de realización, el medio de cultivo comprende un material celulósico o lignocelulósico, donde el material celulósico o lignocelulósico no fue tratado enzimáticamente con una cantidad suficiente de enzimas para convertir más de 15% del material celulósico o lignocelulósico en azúcares simples dentro de 24 horas.

[0035] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) cultivar una cepa de *Clostridium phytofermentans* en un caldo; (2) mantener la concentración total de compuestos de azúcar en el caldo en más de aproximadamente 18 g/L; y (3) producir etanol con una concentración de aproximadamente 10 g/L o más. En una forma de realización del proceso descrito anteriormente, el caldo en algún momento durante el cultivo comprende etanol en más de aproximadamente 7 g/L.

[0036] En otra forma de realización, mantener la concentración total de compuestos de azúcar comprende añadir uno o más suplementos al medio, al menos uno de los cuales comprende uno o más compuestos de azúcar al caldo al menos una vez durante el cultivo, donde los suplementos del medio se añaden a un recipiente que contiene el cultivo.

[0037] En otra forma de realización, la concentración total de compuestos de azúcar en el caldo se mantiene en más de

000016

aproximadamente 25 g/L para una porción del cultivo. En otra forma de realización, la concentración total de compuestos de azúcar en el caldo se mantiene dentro de un rango de aproximadamente 30 g/L a aproximadamente 100 g/L para una porción del cultivo.

[0038] En otra forma de realización, mantener la concentración total de compuestos de azúcar comprende añadir uno o más suplementos del medio, al menos uno de los cuales comprende uno o más compuestos de azúcar al caldo al menos una vez durante el cultivo, y uno o más de los suplementos del medio comprenden fitato, donde los suplementos del medio se añaden a un recipiente que contiene el cultivo.

[0039] En otra forma de realización, la concentración total de compuestos de azúcar en el caldo se mantiene durante un período, donde el período es al menos aproximadamente 10 horas.

[0040] En otra forma de realización, la concentración total de compuestos de azúcar en el caldo se mantiene durante un período, donde el período es al menos aproximadamente 10 horas y la concentración total de compuestos de azúcar en el caldo varía en menos de aproximadamente 25% durante el período.

[0041] En otra forma de realización, el proceso también comprende añadir un suplemento del medio que comprende uno o más materiales que contienen nitrógeno al caldo al menos una vez durante la fermentación, y donde el suplemento del medio se añade a un recipiente que contiene el cultivo.

[0042] En otra forma de realización, mantener la concentración total de compuestos de azúcar comprende añadir uno o más suplementos del medio, al menos uno de los cuales comprende uno o más compuestos de azúcar al caldo al menos una vez durante el cultivo, y uno o más de los suplementos del medio comprende uno o más materiales que contienen nitrógeno, donde los suplementos del medio se añaden a un recipiente que contiene el cultivo.

[0043] En otra forma de realización, el caldo comprende un material celulósico o lignocelulósico. En otra forma de realización, el caldo comprende un material celulósico o lignocelulósico, y el material celulósico o lignocelulósico no fue tratado enzimáticamente con una cantidad suficiente de

000017

enzimas para convertir más de 15% del material celulósico o lignocelulósico en azúcares simples dentro de 24 horas.

[0044] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) cultivar una cepa de *Clostridium phytofermentans* en un caldo; y (2) añadir uno o más componentes del medio al caldo durante el cultivo del *Clostridium phytofermentans*, donde uno o más de los suplementos del medio comprende uno o más compuestos de azúcar, y el uno o más compuestos de azúcar se añaden en relación con una cantidad de azúcar convertida por el *Clostridium phytofermentans* en otros compuestos, y el etanol se produce en más de aproximadamente 10 g/L.

[0045] En una forma de realización del proceso descrito anteriormente, uno o más de los componentes del medio comprenden una fuente de nitrógeno. En otra forma de realización, uno o más de los componentes del medio comprenden una fuente de nitrógeno y la fuente de nitrógeno incluye prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina. En otra forma de realización, uno o más de los componentes del medio comprende a fuente de nitrógeno, donde la fuente de nitrógeno incluye prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina, y la prolina, glicina, histidina, o isoleucina se proporciona en una cantidad de al menos 0,9 g/L.

[0046] En otra forma de realización, el cultivo de *Clostridium phytofermentans* incluye una fase de crecimiento y al menos una porción del componente del medio se añade al caldo durante la fase de crecimiento.

[0047] En otra forma de realización, el cultivo de *Clostridium phytofermentans* incluye una fase estacionaria, y al menos una porción del suplemento del medio se añade al caldo durante la fase estacionaria.

[0048] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) cultivar un caldo que comprende *Clostridium phytofermentans* en condiciones adecuadas para la producción de etanol; y (2) recolectar el etanol producido por el *Clostridium phytofermentans* en el caldo, donde

000018

la concentración de etanol en el caldo es más de aproximadamente 8 g/L. En una forma de realización del proceso descrito anteriormente, la concentración de etanol en el caldo en algún punto durante el cultivo del *Clostridium phytofermentans* está en el rango de aproximadamente 8 a aproximadamente 14 g/L.

[0049] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende cultivar un caldo que comprende *Clostridium phytofermentans* en condiciones adecuadas para la producción de etanol, donde el caldo comprende etanol en una concentración mayor de aproximadamente 8 g/L.

[0050] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) añadir un primer inóculo de *Clostridium phytofermentans* a un medio para formar un caldo; (2) cultivar el caldo que comprende *Clostridium phytofermentans* en condiciones adecuadas para la producción de etanol; (3) añadir células viables adicionales de *Clostridium phytofermentans* al caldo más de cinco horas después de agregar el primer inóculo de *Clostridium phytofermentans* al medio, y (4) continuar el cultivo del caldo, donde el etanol se produce en más de aproximadamente 8 g/L.

[0051] En una forma de realización del proceso descrito anteriormente, el proceso también comprende añadir uno o más componentes del medio al caldo después de añadir el primer inóculo de *Clostridium phytofermentans*.

[0052] En otra forma de realización, el proceso también comprende añadir uno o más componentes del medio al caldo después de añadir el primer inóculo de *Clostridium phytofermentans*, y una adición de componentes del medio y una adición de células viables se produce en forma sucesiva o simultánea.

[0053] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) eliminar una impureza de un material de etanol impuro para producir un material de etanol purificado, donde el material de etanol purificado es más de aproximadamente 90% (peso) de etanol, y el material de etanol

000019

impuro se extrae de un caldo de fermentación obtenido por el cultivo de células de *Clostridium phytofermentans* en un cultivo discontinuo alimentado, y donde la concentración de etanol en el caldo de fermentación fue mayor de aproximadamente 7 g/L.

[0054] En una forma de realización del proceso descrito anteriormente, la impureza eliminada del material de etanol impuro comprende agua.

[0055] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) inocular un medio con microorganismos de *Clostridium phytofermentans* para formar un caldo; (2) cultivar el caldo en condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos y la producción del etanol por los microorganismos; (3) aumentar el volumen del caldo por la adición de medio al caldo mientras los microorganismos están presentes; y (4) continuar cultivando el caldo en condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo y la producción del etanol por los microorganismos, donde la fase de crecimiento para los microorganismos se extiende en más de aproximadamente seis horas.

[0056] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) cultivar un caldo que comprende una cepa de *Clostridium phytofermentans*, y una fuente de nitrógeno que comprende prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina, en condiciones adecuadas para la producción de etanol con una concentración mayor de o igual a aproximadamente 8 g/L.

[0057] En una forma de realización del proceso descrito anteriormente, se proporciona prolina, glicina, histidina, o isoleucina en una cantidad de al menos aproximadamente 0,09 g/L. En otra forma de realización, al menos se obtiene una porción de la fuente de nitrógeno se obtiene del licor de maceración de maíz o polvo de maceración de maíz. En otra forma de realización, el caldo también comprende al menos aproximadamente 0.4 g/L fitato. En otra forma de realización, el caldo también comprende a material celulósico o lignocelulósico. En otra forma de realización, el caldo también comprende un material celulósico o

000020

lignocelulósico, donde el material celulósico o lignocelulósico no fue tratado enzimáticamente con una cantidad suficiente de enzimas para convertir más de 15% del material celulósico o lignocelulósico a azúcares simples dentro de 24 horas. En otra forma de realización, el caldo también comprende al menos aproximadamente 0,4 g/L de fitato, y la prolina, glicina, histidina, o isoleucina se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 0,09 g/L.

[0058] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) cultivar un caldo que comprende una cepa de *Clostridium phytofermentans*, una fuente de nitrógeno, y fitato, donde el fitato está presente en una concentración de aproximadamente 0,4 g/L o mayor, en condiciones adecuadas para la producción del etanol en una concentración mayor de o igual a aproximadamente 8 g/L.

[0059] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) cultivar un caldo que comprende una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde el etanol se produce en una productividad instantánea de al menos aproximadamente 3 g/L-día. En una forma de realización del proceso, el etanol se produce en una velocidad instantánea de aproximadamente 3 g/L-día a aproximadamente 15 g/L-día. En otra forma de realización, el etanol se produce con una productividad instantánea de aproximadamente 5 g/L-día a aproximadamente 12 g/L-día. En otra forma de realización, el etanol se produce en una productividad instantánea de aproximadamente 7 g/L-día a aproximadamente 10 g/L-día.

[0060] En otra forma de realización, el caldo comprende fitato. En otra forma de realización, el caldo comprende prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina. En otra forma de realización, el caldo comprende un material celulósico o lignocelulósico. En otra forma de realización, el caldo comprende un material celulósico o lignocelulósico, donde el material celulósico o lignocelulósico no fue tratado enzimáticamente con una cantidad suficiente de enzimas para convertir más de 15% del material

000021

celulósico o lignocelulósico a azúcares simples dentro de 24 horas.

[0061] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) inocular un medio adecuado para el crecimiento del *Clostridium phytofermentans* con un cultivo de *Clostridium phytofermentans* que produce un caldo de *Clostridium phytofermentans*, donde el cultivo de *Clostridium phytofermentans* se usó previamente para producir etanol.

[0062] En una forma de realización del proceso descrito anteriormente, el proceso también comprende cultivar el caldo de *Clostridium phytofermentans* en condiciones adecuadas para producir etanol, producir etanol, y recuperar un material que comprende etanol del caldo.

[0063] En otra forma de realización, el proceso también comprende cultivar el caldo de *Clostridium phytofermentans* en una concentración de etanol mayor de aproximadamente 6 g/L. En otra forma de realización, el proceso también comprende cultivar el caldo de *Clostridium phytofermentans* en una concentración de etanol de aproximadamente 6 a aproximadamente 180 g/L. En otra forma de realización, el proceso también comprende cultivar el caldo de *Clostridium phytofermentans* en una concentración de etanol de aproximadamente 15 a aproximadamente 160 g/L. En otra forma de realización, el proceso también comprende cultivar el caldo de *Clostridium phytofermentans* en una concentración de etanol de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 g/L. En otra forma de realización, el proceso también comprende cultivar el caldo de *Clostridium phytofermentans* en una concentración de etanol de aproximadamente 30 a aproximadamente 80 g/L. En otra forma de realización, el proceso también comprende cultivar el caldo de *Clostridium phytofermentans* en una concentración de etanol de aproximadamente 8 a aproximadamente 14 g/L. En otra forma de realización, el proceso también comprende cultivar el caldo de *Clostridium phytofermentans* en condiciones adecuadas para producir etanol, producir etanol y recuperar un material que comprende etanol del caldo.

000022

[0064] En otro aspecto, se describe un proceso de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención para obtener etanol. El proceso comprende (1) inocular un volumen de medio adecuado para el crecimiento del *Clostridium phytofermentans*, con un volumen de cultivo de *Clostridium phytofermentans* que produce un caldo de *Clostridium phytofermentans*; una relación del volumen del cultivo al cultivo del medio que es mayor de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1; y (2) cultivar el caldo de *Clostridium phytofermentans* en condiciones adecuadas para producir etanol, y recuperar el material que comprende etanol del caldo de *Clostridium phytofermentans*.

[0065] En una forma de realización del proceso descrito anteriormente, el etanol está presente mientras que se cultiva el caldo con una concentración de aproximadamente 8 a aproximadamente 150 g/L. En otra forma de realización, la relación del volumen del cultivo al cultivo del medio es aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1. En otra forma de realización, el etanol está presente mientras que el cultivo del caldo a una concentración mayor de aproximadamente 8 g/L.

[0066] Se proporcionan métodos y composiciones para la producción de un combustible. En un aspecto las invenciones proporcionan métodos para producir alcohol. En algunas formas de realización, los métodos comprenden fermentar las células de *Clostridium phytofermentans* en presencia de un modificador de pH agregado, donde se produce un alcohol. En algunas formas de realización, el alcohol es etanol.

[0067] En algunas formas de realización de este aspecto, la fermentación de las células se produce a un pH, donde el pH es aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,2. En otras formas de realización, fermentación de las células se produce a un pH, donde el pH es aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,8.

[0068] En algunas formas de realización de este aspecto, el alcohol se produce con una concentración de aproximadamente 15 a aproximadamente 200 g/L. En otras formas de realización, el alcohol se produce con una concentración de aproximadamente 15 a aproximadamente 150 g/L. En otras formas de realización, el

000023

alcohol se produce con una concentración de aproximadamente 18 a aproximadamente 100 g/L. En otras formas de realización, el alcohol se produce con una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 g/L.

[0069] En otro aspecto la invención proporciona métodos para producir alcohol por la fermentación de las células de *Clostridium phytofermentans* en presencia de un material agregado que comprende ácido graso, donde se produce un alcohol. En algunas formas de realización, el material que comprende ácido graso es una grasa o aceite comestible. En algunas formas de realización, el material que comprende ácido graso comprende un ácido graso con una insaturación en la posición delta 9. En algunas formas de realización, el material que comprende ácido graso comprende un ácido graso con una insaturación en la posición de omega 9. En algunas formas de realización, el material que comprende ácido graso comprende uno o más de ácido oleico y ácido linoleico. En algunas formas de realización, el material que comprende ácido graso comprende uno o más de aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de canola, aceite de soja, o aceite de colza oleaginosa. En algunas formas de realización, el material que comprende ácido graso comprende un fosfolípido o un lisofosfolípido.

[0070] En otro aspecto la invención proporciona un caldo de fermentación, el caldo que comprende células de *Clostridium phytofermentans* y un modificador de pH agregado, donde se produce un alcohol.

[0071] En otro aspecto la invención proporciona un caldo de fermentación, el caldo que comprende células de un *Clostridium phytofermentans* y un compuesto que contiene ácido graso agregado, donde se produce un alcohol.

[0072] En otro aspecto la invención proporciona métodos de producir alcohol que comprende fermentar las células de *Clostridium phytofermentans* y la presencia de un modificador de pH y un material que comprende ácido graso, donde se produce alcohol.

000024

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

[0073] Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patentes mencionados en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente por referencia en el mismo grado que si cada publicación, patente, o solicitud de patente individual se indicara en forma específica e individual que está incorporada por referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0074] Las nuevas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones anexas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrán con referencia a la siguiente descripción detallada que expone formas de realización ilustrativas, en el cual se utilizan los principios de la invención, y cuyos dibujos acompañantes son:

[0075] La **FIG 1** es un gráfico de las concentraciones de sustrato y etanol de una fermentación discontinua con *Clostridium phytofermentans*.

[0076] La **FIG. 2** es un gráfico de las concentraciones de sustrato y etanol de fermentaciones discontinuas alimentadas con *Clostridium phytofermentans*.

[0077] La **FIG. 3** es un gráfico de la concentración de etanol en función del tiempo durante la fermentación de *Clostridium phytofermentans* con extracto de levadura.

[0078] La **FIG 4** muestra un grafico de la concentración de etanol respecto del tiempo para las condiciones de fermentación de diferentes ácidos grasos.

[0079] La **FIG 5** muestra un grafico de concentración de etanol respecto del tiempo para diferentes condiciones de fermentación de pH.

[0080] La **FIG 6** muestra un grafico de concentración de etanol respecto del tiempo para diferentes condiciones de fermentación de ácido graso y pH.

[0081] La **FIG 7** es un mapa del plásmido pIMPT1029 usado para transformar el *Clostridium phytofermentans*.

[0082] La **FIG 8** es un ejemplo de un método para producir productos finales fermentativos de la biomasa por tratar primero

000025

la biomasa con un ácido a temperatura y presión elevadas en una unidad de hidrólisis.

[0083] La FIG 9 ilustra un método para producir productos finales fermentativos a partir de biomasa por el cargado de la biomasa en un vaso de fermentación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERIDA

Definiciones

[0084] A menos que se caracterice de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención.

[0085] "Aproximadamente" significa una indicación numérica mencionada más o menos 10% de esta indicación numérica mencionada. Por ejemplo el término aproximadamente 4 debe incluir un rango de 3,6 a 4,4.

[0086] "Producto final fermentativo" se usa en la presente para incluir biocombustibles, agentes químicos, compuestos adecuados como combustibles líquidos, combustibles gaseosos, reactivos, materias primas químicas, aditivos químicos, auxiliares de procesamiento, aditivos alimenticios y otros productos. Los ejemplos de productos finales fermentativos incluyen pero sin limitación 1,4 diácidos (succínico, fumárico y málico), ácido 2,5 furan dicarboxílico, ácido 3 hidroxipropiónico, ácido aspártico, ácido glucárico, ácido glutámico, ácido itacónico, ácido levulínico, 3-hidroxibutirolactona, glicerol, sorbitol, xilitol/arabinitol, butanodiol, butanol, metano, metanol, etano, eteno, etanol, n-propano, 1-propeno, 1-propanol, propanal, acetona, propionato, n-butano, 1-butenol, 1-butanol, butanal, butanoato, isobutanal, isobutanol, 2-metilbutanal, 2-metilbutanol, 3-metilbutanal, 3-metilbutanol, 2-butenol, 2-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, 3-hidroxibutanona, 2,3-butanodiona, etilbenceno, etenilbenceno, 2-feniletanol, fenilacetaldehído, 1-fenilbutano, 4-fenil-1-butenol, 4-fenil-2-butenol, 1-fenil-2-butenol, 1-fenil-2-butanol, 4-fenil-2-butanol, 1-fenil-2-butanona, 4-fenil-2-butanona, 1-fenil-2,3-butanodiol, 1-fenil-3-hidroxibutanona, 4-fenil-3-hidroxibutanona, 1-fenil-2,3-butanodiona, n-pentano, etilfenol,

000026

etenilfenol, 2-(4-hidroxifenil)etanol, 4-
 hidroxifenilacetaldehído, 1-(4-hidroxifenil) butano, 4-(4-
 hidroxifenil)-1-buteno, 4-(4-hidroxifenil)-2-buteno, 1-(4-
 hidroxifenil)-1-buteno, 1-(4-hidroxifenil)-2-butanol, 4-(4-
 hidroxifenil)-2-butanol, 1-(4-hidroxifenil)-2-butanona, 4-(4-
 hidroxifenil)-2-butanona, 1-(4-hidroxifenil)-2,3-butandiol, 1-(4-
 hidroxifenil)-3-hidroxi-2-butanona, 4-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-
 2-butanona, 1-(4-hidroxifenil)-2,3-butanonodiona, indoliletano,
 indolileteno, 2-(indol-3-)etanol, n-pentano, 1-penteno, 1-
 pentanol, pentanal, pentanoato, 2-penteno, 2-pentanol, 3-
 pentanol, 2-pentanona, 3-pentanona, 4-metilpentanal, 4-
 metilpentanol, 2,3-pentanodiol, 2-hidroxi-3-pentanona, 3-hidroxi-
 2-pentanona, 2,3-pentanodiona, 2-metilpentano, 4-metil-1-penteno,
 4-metil-2-penteno, 4-metil-3-penteno, 4-metil-2-pentanol, 2-
 metil-3-pentanol, 4-metil-2-pentanona, 2-metil-3-pentanona, 4-
 metil-2,3-pentanodiol, 4-metil-2-hidroxi-3-pentanona, 4-metil-3-
 hidroxi-2-pentanona, 4-metil-2,3-pentanodiona, 1-fenilpentano, 1-
 fenil-1-penteno, 1-fenil-2-penteno, 1-fenil-3-penteno, 1-fenil-2-
 pentanol, 1-fenil-3-pentanol, 1-fenil-2-pentanona, 1-fenil-3-
 pentanona, 1-fenil-2,3-pentanodiol, 1-fenil-2-hidroxi-3-
 pentanona, 1-fenil-3-hidroxi-2-pentanona, 1-fenil-2,3-
 pentanodiona, 4-metil-1-fenilpentano, 4-metil-1-fenil-1-penteno,
 4-metil-1-fenil-2-penteno, 4-metil-1-fenil-3-penteno, 4-metil-1-
 fenil-3-pentanol, 4-metil-1-fenil-2-pentanol, 4-metil-1-fenil-3-
 pentanona, 4-metil-1-fenil-2-pentanona, 4-metil-1-fenil-2,3-
 pentanodiol, 4-metil-1-fenil-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-fenil-3-
 hidroxi-2-pentanona, 4-metil-1-fenil-2-hidroxi-3-pentanona, 1-(4-
 hidroxifenil) pentano, 1-(4-hidroxifenil)-1-penteno, 1-(4-
 hidroxifenil)-2-penteno, 1-(4-hidroxifenil)-3-penteno, 1-(4-
 hidroxifenil)-2-pentanol, 1-(4-hidroxifenil)-3-pentanol, 1-(4-
 hidroxifenil)-2-pentanona, 1-(4-hidroxifenil)-3-pentanona, 1-(4-
 hidroxifenil)-2,3-pentanodiol, 1-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-3-
 pentanona, 1-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-pentanona, 1-(4-
 hidroxifenil)-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)
 pentano, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-penteno, 4-metil-1-(4-
 hidroxifenil)-3-penteno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-1-penteno, 4-
 metil-1-(4-hidroxifenil)-3-pentanol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-

000027

2-pentanol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-pentanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-pentanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-pentanodiol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-pentanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-3-pentanona, 1-indol-3-pentano, 1-(indol-3)-1-penteno, 1-(indol-3)-2-penteno, 1-(indol-3)-3-penteno, 1-(indol-3)-2-pentanol, 1-(indol-3)-3-pentanol, 1-(indol-3)-2-pentanona, 1-(indol-3)-3-pentanona, 1-(indol-3)-2,3-pentanodiol, 1-(indol-3)-2-hidroxi-3-pentanona, 1-(indol-3)-3-hidroxi-2-pentanona, 1-(indol-3)-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-(indol-3)-pentano, 4-metil-1-(indol-3)-2-penteno, 4-metil-1-(indol-3)-3-penteno, 4-metil-1-(indol-3)-1-penteno, 4-metil-2-(indol-3)-3-pentanol, 4-metil-1-(indol-3)-2-pentanol, 4-metil-1-(indol-3)-3-pentanona, 4-metil-1-(indol-3)-2-pentanona, 4-metil-1-(indol-3)-2,3-pentanodiol, 4-metil-1-(indol-3)-2,3-pentanodiona, 4-metil-1-(indol-3)-3-hidroxi-2-pentanona, 4-metil-1-(indol-3)-2-hidroxi-3-pentanona, n-hexano, 1-hexeno, 1-hexanol, hexanal, hexanoato, 2-hexeno, 3-hexeno, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-hexanona, 3-hexanona, 2,3-hexanodiol, 2,3-hexanodiona, 3,4-hexanodiol, 3,4-hexanodiona, 2-hidroxi-3-hexanona, 3-hidroxi-2-hexanona, 3-hidroxi-4-hexanona, 4-hidroxi-3-hexanona, 2-metilhexano, 3-metilhexano, 2-metil-2-hexeno, 2-metil-3-hexeno, 5-metil-1-hexeno, 5-metil-2-hexeno, 4-metil-1-hexeno, 4-metil-2-hexeno, 3-metil-3-hexeno, 3-metil-2-hexeno, 3-metil-1-hexeno, 2-metil-3-hexanol, 5-metil-2-hexanol, 5-metil-3-hexanol, 2-metil-3-hexanona, 5-metil-2-hexanona, 5-metil-3-hexanona, 2-metil-3,4-hexanodiol, 2-metil-3,4-hexanodiona, 5-metil-2,3-hexanodiol, 5-metil-2,3-hexanodiona, 4-metil-2,3-hexanodiol, 4-metil-2,3-hexanodiona, 2-metil-3-hidroxi-4-hexanona, 2-metil-4-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-2-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-3-hidroxi-2-hexanona, 4-metil-2-hidroxi-3-hexanona, 4-metil-3-hidroxi-2-hexanona, 2,5-dimetilhexano, 2,5-dimetil-2-hexeno, 2,5-dimetil-3-hexeno, 2,5-dimetil-3-hexanol, 2,5-dimetil-3-hexanona, 2,5-dimetil-3,4-hexanodiol, 2,5-dimetil-3,4-hexanodiona, 2,5-dimetil-3-hidroxi-4-hexanona, 5-metil-1-fenilhexano, 4-metil-1-fenilhexano, 5-metil-1-fenil-1-hexeno, 5-metil-1-fenil-2-hexeno, 5-metil-1-fenil-3-hexeno, 4-metil-1-fenil-1-hexeno, 4-metil-1-fenil-2-hexeno, 4-metil-1-fenil-3-

000028

hexeno, 5-metil-1-fenil-2-hexanol, 5-metil-1-fenil-3-hexanol, 4-metil-1-fenil-2-hexanol, 4-metil-1-fenil-3-hexanol, 5-metil-1-fenil-2-hexanona, 5-metil-1-fenil-3-hexanona, 4-metil-1-fenil-2-hexanona, 4-metil-1-fenil-3-hexanona, 5-metil-1-fenil-2,3-hexanodiol, 4-metil-1-fenil-2,3-hexanodiol, 5-metil-1-fenil-3-hidroxi-2-hexanona, 5-metil-1-fenil-2-hidroxi-3-hexanona, 4-metil-1-fenil-3-hidroxi-2-hexanona, 4-metil-1-fenil-2-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-1-fenil-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-fenil-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)hexano, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-1-hexeno, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexeno, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexeno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-1-hexeno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexeno, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexeno, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexanol, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexanol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexanol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexanol, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexanona, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hexanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hexanona, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-hexanodiol, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-hexanodiol, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-hexanona, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-3-hexanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-hexanona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-(4-hidroxifenil)-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-(indol-3-)hexano, 5-metil-1-(indol-3)-1-hexeno, 5-metil-1-(indol-3)-2-hexeno, 5-metil-1-(indol-3)-3-hexeno, 4-metil-1-(indol-3)-1-hexeno, 4-metil-1-(indol-3)-2-hexeno, 4-metil-1-(indol-3)-3-hexeno, 5-metil-1-(indol-3)-2-hexanol, 5-metil-1-(indol-3)-3-hexanol, 4-metil-1-(indol-3)-2-hexanol, 4-metil-1-(indol-3)-3-hexanol, 5-metil-1-(indol-3)-2-hexanona, 5-metil-1-(indol-3)-3-hexanona, 4-metil-1-(indol-3)-2-hexanona, 4-metil-1-(indol-3)-3-hexanona, 5-metil-1-(indol-3)-2,3-hexanodiol, 4-metil-1-(indol-3)-2,3-hexanodiol, 5-metil-1-(indol-3)-3-hidroxi-2-hexanona, 5-metil-1-(indol-3)-2-hidroxi-3-hexanona, 4-metil-1-(indol-3)-3-hidroxi-2-hexanona, 4-metil-1-(indol-3)-2-hidroxi-3-hexanona, 5-metil-1-(indol-3)-2,3-hexanodiona, 4-metil-1-(indol-3)-2,3-hexanodiona, n-heptano, 1-hepteno, 1-heptanol, heptanal, heptanoato, 2-

000029

hepteno, 3-hepteno, 2-heptanol, 3-heptanol, 4-heptanol, 2-heptanona, 3-heptanona, 4-heptanona, 2,3-heptanodiol, 2,3-heptanodiona, 3,4-heptanodiol, 3,4-heptanodiona, 2-hidroxi-3-heptanona, 3-hidroxi-2-heptanona, 3-hidroxi-4-heptanona, 4-hidroxi-3-heptanona, 2-metilheptano, 3-metilheptano, 6-metil-2-hepteno, 6-metil-3-hepteno, 2-metil-3-hepteno, 2-metil-2-hepteno, 5-metil-2-hepteno, 5-metil-3-hepteno, 3-metil-3-hepteno, 2-metil-3-heptanol, 2-metil-4-heptanol, 6-metil-3-heptanol, 5-metil-3-heptanol, 3-metil-4-heptanol, 2-metil-3-heptanona, 2-metil-4-heptanona, 6-metil-3-heptanona, 5-metil-3-heptanona, 3-metil-4-heptanona, 2-metil-3,4-heptanodiol, 2-metil-3,4-heptanodiona, 6-metil-3,4-heptanodiol, 6-metil-3,4-heptanodiona, 5-metil-3,4-heptanodiol, 5-metil-3,4-heptanodiona, 2-metil-3-hidroxi-4-heptanona, 2-metil-4-hidroxi-3-heptanona, 6-metil-3-hidroxi-4-heptanona, 6-metil-4-hidroxi-3-heptanona, 5-metil-3-hidroxi-4-heptanona, 5-metil-4-hidroxi-3-heptanona, 2,6-dimetilheptano, 2,5-dimetilheptano, 2,6-dimetil-2-hepteno, 2,6-dimetil-3-hepteno, 2,5-dimetil-2-hepteno, 2,5-dimetil-3-hepteno, 3,6-dimetil-3-hepteno, 2,6-dimetil-3-heptanol, 2,6-dimetil-4-heptanol, 2,5-dimetil-3-heptanol, 2,5-dimetil-4-heptanol, 2,6-dimetil-3,4-heptanodiol, 2,6-dimetil-3,4-heptanodiona, 2,5-dimetil-3,4-heptanodiol, 2,5-dimetil-3,4-heptanodiona, 2,6-dimetil-3-hidroxi-4-heptanona, 2,6-dimetil-4-hidroxi-3-heptanona, 2,5-dimetil-3-hidroxi-4-heptanona, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3-heptanona, n-octano, 1-octeno, 2-octeno, 1-octanol, octanal, octanoato, 3-octeno, 4-octeno, 4-octanol, 4-octanona, 4,5-octanodiol, 4,5-octanodiona, 4-hidroxi-5-octanona, 2-metiloctano, 2-metil-3-octeno, 2-metil-4-octeno, 7-metil-3-octeno, 3-metil-3-octeno, 3-metil-4-octeno, 6-metil-3-octeno, 2-metil-4-octanol, 7-metil-4-octanol, 3-metil-4-octanol, 6-metil-4-octanol, 2-metil-4-octanona, 7-metil-4-octanona, 3-metil-4-octanona, 6-metil-4-octanona, 2-metil-4,5-octanodiol, 2-metil-4,5-octanodiona, 3-metil-4,5-octanodiol, 3-metil-4,5-octanodiona, 2-metil-4-hidroxi-5-octanona, 2-metil-5-hidroxi-4-octanona, 3-metil-4-hidroxi-5-octanona, 3-metil-5-hidroxi-4-octanona, 2,7-dimetiloctano, 2,7-dimetil-3-octeno, 2,7-dimetil-4-octeno, 2,7-dimetil-4-octanol, 2,7-dimetil-4-octanona, 2,7-dimetil-4,5-octanodiol, 2,7-dimetil-4,5-octanodiona, 2,7-

000030

dimetil-4-hidroxi-5-octanona, 2,6-dimetiloctano, 2,6-dimetil-3-octeno, 2,6-dimetil-4-octeno, 3,7-dimetil-3-octeno, 2,6-dimetil-4-octanol, 3,7-dimetil-4-octanol, 2,6-dimetil-4-octanona, 3,7-dimetil-4-octanona, 2,6-dimetil-4,5-octanodiol, 2,6-dimetil-4,5-octanodiona, 2,6-dimetil-4-hidroxi-5-octanona, 2,6-dimetil-5-hidroxi-4-octanona, 3,6-dimetiloctano, 3,6-dimetil-3-octeno, 3,6-dimetil-4-octeno, 3,6-dimetil-4-octanol, 3,6-dimetil-4-octanona, 3,6-dimetil-4,5-octanodiol, 3,6-dimetil-4,5-octanodiona, 3,6-dimetil-4-hidroxi-5-octanona, n-nonano, 1-noneno, 1-nonanol, nonanal, nonanoato, 2-metilnonano, 2-metil-4-noneno, 2-metil-5-noneno, 8-metil-4-noneno, 2-metil-5-nonanol, 8-metil-4-nonanol, 2-metil-5-nonanona, 8-metil-4-nonanona, 8-metil-4,5-nonanodiol, 8-metil-4,5-nonanodiona, 8-metil-4-hidroxi-5-nonanona, 8-metil-5-hidroxi-4-nonanona, 2,8-dimetilnonano, 2,8-dimetil-3-noneno, 2,8-dimetil-4-noneno, 2,8-dimetil-5-noneno, 2,8-dimetil-4-nonanol, 2,8-dimetil-5-nonanol, 2,8-dimetil-4-nonanona, 2,8-dimetil-5-nonanona, 2,8-dimetil-4,5-nonanodiol, 2,8-dimetil-4,5-nonanodiona, 2,8-dimetil-4-hidroxi-5-nonanona, 2,8-dimetil-5-hidroxi-4-nonanona, 2,7-dimetilnonano, 3,8-dimetil-3-noneno, 3,8-dimetil-4-noneno, 3,8-dimetil-5-noneno, 3,8-dimetil-4-nonanol, 3,8-dimetil-5-nonanol, 3,8-dimetil-4-nonanona, 3,8-dimetil-5-nonanona, 3,8-dimetil-4,5-nonanodiol, 3,8-dimetil-4,5-nonanodiona, 3,8-dimetil-4-hidroxi-5-nonanona, 3,8-dimetil-5-hidroxi-4-nonanona, n-decano, 1-deceno, 1-decanol, decanoato, 2,9-dimetildecano, 2,9-dimetil-3-deceno, 2,9-dimetil-4-deceno, 2,9-dimetil-5-decanol, 2,9-dimetil-5-decanona, 2,9-dimetil-5,6-decanodiol, 2,9-dimetil-6-hidroxi-5-decanona, 2,9-dimetil-5,6-decanedionen-undecano, 1-undeceno, 1-undecanol, undecanal, undecanoato, n-dodecano, 1-dodeceno, 1-dodecanol, dodecanal, dodecanoato, n-dodecano, 1-decadeceno, 1-dodecanol, ddodecanal, dodecanoato, n-tridecano, 1-trideceno, 1-tridecanol, tridecanal, tridecanoato, n-tetradecano, 1-tetradeceno, 1-tetradecanol, tetradecanal, tetradecanoato, n-pentadecano, 1-pentadeceno, 1-pentadecanol, pentadecanal, pentadecanoato, n-hexadecano, 1-hexadeceno, 1-hexadecanol, hexadecanal, hexadecanoato, n-heptadecano, 1-heptadeceno, 1-heptadecanol, heptadecanal, heptadecanoato, n-octadecano, 1-octadeceno, 1-octadecanol,

000031

octadecanal, octadecanoato, n-nonadecano, 1-nonadeceno, 1-nonadecanol, nonadecanal, nonadecanoato, eicosano, 1-eicoseno, 1-eicosanol, eicosanal, eicosanoato, 3-hidroxi propanal, 1,3-propanodiol, 4-hidroxi butanal, 1,4-butanodiol, 3-hidroxi-2-butanona, 2,3-butanodiol, 1,5-pentane diol, homocitrato, homoisocitorato, b-hidroxi adipato, glutarato, glutarsemialdehído, glutaraldehído, 2-hidroxi-1-ciclopentanona, 1,2-ciclopentanodiol, ciclopentanona, ciclopentanol, (S)-2-acetolactato, (R)-2,3-Dihidroxi-isovalerato, 2-oxoisovalerato, isobutiril-CoA, isobutirato, isobutiraldehído, 5-amino pentaldehído, 1,10-diaminodecano, 1,10-diamino-5-deceno, 1,10-diamino-5-hidroxidecano, 1,10-diamino-5-decanona, 1,10-diamino-5,6-decanodiol, 1,10-diamino-6-hidroxi-5-decanona, fenilacetoaldehído, 1,4-difenilbutano, 1,4-difenil-1-buteno, 1,4-difenil-2-buteno, 1,4-difenil-2-butanol, 1,4-difenil-2-butanona, 1,4-difenil-2,3-butanodiol, 1,4-difenil-3-hidroxi-2-butanona, 1-(4-hidroxifenil)-4-fenilbutano, 1-(4-hidroxifenil)-4-fenil-1-buteno, 1-(4-hidroxifenil)-4-fenil-2-buteno, 1-(4-hidroxifenil)-4-fenil-2-butanol, 1-(4-hidroxifenil)-4-fenil-2-butanona, 1-(4-hidroxifenil)-4-fenil-2,3-butanodiol, 1-(4-hidroxifenil)-4-fenil-3-hidroxi-2-butanona, 1-(indol-3)-4-fenilbutano, 1-(indol-3)-4-fenil-1-buteno, 1-(indol-3)-4-fenil-2-buteno, 1-(indol-3)-4-fenil-2-butanol, 1-(indol-3)-4-fenil-2-butanona, 1-(indol-3)-4-fenil-2,3-butanodiol, 1-(indol-3)-4-fenil-3-hidroxi-2-butanona, 4-hidroxifenilacetoaldehído, 1,4-di(4-hidroxifenil)butano, 1,4-di(4-hidroxifenil)-1-buteno, 1,4-di(4-hidroxifenil)-2-buteno, 1,4-di(4-hidroxifenil)-2-butanol, 1,4-di(4-hidroxifenil)-2-butanona, 1,4-di(4-hidroxifenil)-2,3-butanodiol, 1,4-di(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-butanona, 1-(4-hidroxifenil)-4-(indol-3-)butano, 1-(4-hidroxifenil)-4-(indol-3)-1-buteno, 1-di(4-hidroxifenil)-4-(indol-3)-2-buteno, 1-(4-hidroxifenil)-4-(indol-3)-2-butanol, 1-(4-hidroxifenil)-4-(indol-3)-2-butanona, 1-(4-hidroxifenil)-4-(indol-3)-2,3-butanodiol, 1-(4-hidroxifenil)-4-(indol-3)-3-hidroxi-2-butanona, indol-3-acetoaldehído, 1,4-di(indol-3-)butano, 1,4-di(indol-3)-1-buteno, 1,4-di(indol-3)-2-buteno, 1,4-di(indol-3)-2-butanol, 1,4-di(indol-3)-2-butanona, 1,4-di(indol-3)-2,3-butanodiol, 1,4-di(indol-3)-3-hidroxi-2-

000032

butanona, succinato semialdehído, ácido hexano-1,8-dicarboxílico, ácido 3-hexeno-1,8-dicarboxílico, ácido 3-hidroxi-hexano-1,8-dicarboxílico, ácido 3-hexanona-1,8-dicarboxílico, ácido 3,4-hexanodiol-1,8-dicarboxílico, ácido 4-hidroxi-3-hexanona-1,8-dicarboxílico, fucoidan, yodo, clorofila, carotenoide, calcio, magnesio, hierro, sodio, potasio, fosfato, ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, isoprenoides, o poliisoprenos, que incluyen goma. Además, tales productos pueden incluir ácido succínico, ácido pirúvico enzimas tales como celulasas, polisacararas, lipasas, proteasas, ligninasas, y hemicelulasas y pueden estar presentes como un compuesto puro, una mezcla, o una forma impura o diluida.

[0087] El término "material que comprende ácido graso" como se usa en la presente tiene su significado habitual conocido por los expertos en la técnica y pueden comprender uno o más compuestos químicos que incluyen uno o más restos de ácido graso así como derivados de estos compuestos y materiales que comprenden uno o más de estos compuestos. Los ejemplos comunes de los compuestos que incluyen uno o más restos de ácido graso incluyen triacilglicéridos, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, fosfolípidos, lisofosfolípidos, ácidos grasos libres, sales de ácidos grasos, sopas, ácidos grasos que comprende amidas, ésteres de ácidos grasos y alcoholes monohídricos, ésteres de ácidos grasos y alcoholes polihídricos que incluyen glicoles (por ejemplo etilenglicol, propilenglicol, etc.), ésteres de ácidos grasos y polietilenglicol, ésteres de ácidos grasos y poliéteres, ésteres de ácidos grasos y poliglicol, ésteres de ácidos grasos y sacáridos, ésteres de ácidos grasos con otros compuestos que contienen hidroxilo, etc. Un material que comprende ácido graso puede ser uno o más de estos compuestos de una forma aislada o purificada. Puede ser un material que incluye uno o más de estos compuestos que se combina o mezcla con otros materiales similares o diferentes. Puede ser un material donde aparece el material que comprende ácido graso o se proporciona con otros materiales similares o diferentes, tales como aceites vegetales y animales; mezclas de aceites vegetales y animales; subproductos de aceite vegetal y animal; mezclas de subproductos de aceite vegetal y

000033

animal; ésteres de cera vegetal y animal; mezclas, derivados y subproductos de ésteres de cera vegetal y animal; semillas; semillas procesadas; subproductos de semilla; nueces; nueces procesadas; subproductos de nueces; materia animal; materia animal procesada; subproductos de materia animal; maíz; maíz procesado; subproductos de maíz; granos de destilería; porotos; porotos procesados; subproductos de poroto; productos de soja; planta que contiene lípidos, material de pescado o animal; material de planta o animal que contiene lípido procesado; subproductos de materia de planta, pescado o animal que contiene lípidos; material microbiano que contiene lípidos; material microbiano que contiene lípidos procesados; y subproductos material microbiano que contiene lípidos. Tales materiales se pueden utilizar en formas líquidas o sólidas. Las formas sólidas incluyen formas completas, tales como células, porotos, y semillas; molidos, cortados, suspendidos, extraídos, desmenuzados, triturados, etc. La porción del compuesto que contiene ácidos grasos puede ser un ácido graso simple, tal como uno que incluye un grupo carboxilo unido a un grupo alquilo sustituido o no sustituido. El grupo alquilo sustituido o no sustituido puede ser lineal o ramificado, saturado o insaturado. Las sustituciones en el grupo alquilo pueden incluir grupos hidroxilos, fosfatos, halógenos, alcoxi, o arilo. El grupo alquilo sustituido o no sustituido puede tener 7 a 29 carbonos y con preferencia 11 a 23 carbonos (por ejemplo, 8 a 30 carbonos y con preferencia 12 a 24 carbonos contando el grupo carboxilo) dispuesto en una cadena lineal con o sin cadenas laterales y/o substituciones. La adición del compuesto que comprende ácido graso puede ser por medio de añadir un material que comprende el compuesto que comprende el ácido graso.

[0088] El término "modificador de pH" como se usa en la presente tiene su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica y puede incluir cualquier material que tenderá aumentar, disminuir o mantener estable el pH del caldo o medio. Un modificador de pH puede ser un ácido, una base, un buffer, o un material que reacciona con otros materiales presentes para servir para aumentar, disminuir o mantener estable el pH. En algunas

000034

formas de realización, se puede usar más de un modificador de pH, tal como más de un ácido, más de una base, uno o más ácidos con uno o más basas, uno o más ácidos con uno o más buffers, uno o más bases con uno o más buffers, o uno o más ácidos con uno o más bases con uno o más buffers. En algunas formas de realización, un buffer se puede producir en el caldo o medio o por separado y se usa como un ingrediente por al menos reaccionar parcialmente en ácido o base con una base o un ácido, respectivamente. Cuando se utilizan más de un modificador de pH, estos se pueden añadir en el mismo momento o en momentos diferentes. En algunas formas de realización, se pueden combinar uno o más ácidos y uno o más bases, originando un buffer. En algunas formas de realización, los componentes del medio, tales como una fuente de carbono o una fuente de nitrógeno también pueden actuar como un modificador de pH; los componentes del medio adecuados incluyen aquellos con pH alto o bajo con capacidad buffer. Los ejemplos de componentes del medio incluyen polisacáridos de planta hidrolizados con ácido o base que tienen ácido o base residual, material de planta tratado con explosión de fibra de amoníaco (AFEX) con amoníaco residual, ácido láctico, sólidos o licor de maceración de maíz.

[0089] El término "fermentación" como se usa en la presente tiene su significado habitual conocido por los expertos en la técnica y pueden incluir el cultivo de un microorganismo o grupo de microorganismos en o sobre un medio adecuado para los microorganismos. Los microorganismos pueden ser aerobios, anaerobios, anaerobios facultativos, heterótrofos, autótrofos, fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos, y/o quimioheterótrofos. Los microorganismos pueden crecer en forma aeróbica o anaeróbica. Pueden estar en fase de crecimiento, que incluye reposo (o conducción), exponencial, transición, estacionario, muerte, latente, vegetativo, esporulante.

[0090] "Fase de crecimiento" se usa en la presente para describir el tipo de crecimiento celular que se produce después de la "Fase de iniciación" y antes de la "Fase estacionaria" y la "Fase de muerte". La fase de crecimiento algunas veces se denomina como la fase exponencial o fase log o fase logarítmica.

000035

[0091] El término "polisacárido de planta" como se usa en la presente tiene su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica y pueden comprender uno o más polímeros de azúcares y derivados de azúcar así como derivados de polímeros de azúcar y/u otros materiales poliméricos que se producen en la materia vegetal. Los ejemplos de polisacáridos vegetales incluyen lignina, celulosa, almidón, pectina, y hemicelulosa. Otros son quitina, polisacáridos sulfonados tales como ácido algínico, agarosa, carragenano, porfirano, furcellerano y funorano. En general, el polisacárido puede tener dos o más unidades de azúcar o derivados de unidades de azúcar. Las unidades de azúcar y/o derivados de unidades de azúcar se pueden repetir en un patrón regular, o de otro modo. Las unidades de azúcar pueden ser unidades de hexosa o unidades de pentosa, o combinaciones de estos. Los derivados de unidades de azúcar pueden ser azúcares de alcohol, ácidos de azúcares, aminoazúcares, etc. Los polisacáridos pueden ser lineales, ramificados, entrecruzados o una de sus mezclas. Un tipo o clase de polisacárido puede estar entrecruzado con otro tipo o clase de polisacárido.

[0092] El término "azúcares fermentables" como se usa en la presente tiene su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica y puede incluir uno o más azúcares y/o derivados de azúcar que se pueden utilizar como fuente de carbono por el microorganismo, que incluye monómeros, dímeros, y polímeros de estos compuestos que incluyen dos más de estos compuestos. En algunos casos, el organismo puede degradar estos polímeros, tal como por hidrólisis, antes de incorporar el material degradado. Los ejemplos de azúcares fermentables incluyen, pero sin limitación glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, ramnosa, celobiosa, lactosa, sucrosa, maltosa, y fructosa.

[0093] El término "sacarificación" como se usa en la presente tiene su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica y puede incluir la conversión de polisacáridos vegetales a especies moleculares de peso molecular menor que pueden ser utilizados por el organismo disponible. Para algunos organismos, esto puede incluir la conversión a monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, y oligosacáridos de hasta aproximadamente siete

000036

unidades de monómeros, así como cadenas de tamaño similar de derivados de azúcar y combinaciones de azúcares y derivados de azúcar. En algunos organismos, la longitud de cadena permisible puede ser más larga y para algunos organismos la longitud de cadena permisible puede ser más corta

[0094] El término "biomasa" como se usa en la presente tiene su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica y puede incluir uno o más materiales biológicos que se pueden convertir en un biocombustible, producto químico u otro. Un ejemplo de fuente de biomasa es el material de planta. El material de planta puede ser, por ejemplo, materia de planta leñosa, materia de planta no leñosa, material celulósico, material lignocelulósico, material hemicelulósico, carbohidratos, pectina, almidón, inulina, fructanos, glucanos, maíz, caña de azúcar, pastos, pasto varilla, bambú, y material derivado de estos. El material de planta también se puede describir con referencia a las especies químicas presentes tales como proteínas, polisacáridos y aceites. Los polisacáridos incluyen polímeros de varios monosacáridos y derivados de monosacáridos que incluyen glucosa, fructosa, lactosa, ácido galacturónico, ramnosa, etc. El material de planta también incluye subproductos residuales agrícolas o corrientes secundarias tales como pulpa, licor de maceración de maíz, sólidos de la de maceración de maíz, granos de destilería, cáscaras, carozos, residuos de la fermentación, virutas, madera, aguas residuales, basura y sobras de alimentos. Estos materiales pueden provenir de granjas, silvicultura, fuentes industriales, domésticos, etc. Otro ejemplo no limitante de biomasa es la materia animal, que incluye, por ejemplo leche, carne, grasa, harina de hueso, residuos de procesamiento de animales, y residuos animales. "Materia prima" se usa con frecuencia para referirse a la biomasa usada para un proceso, tal como los que se describen en la presente.

[0095] "Caldo" se usa en la presente para referirse al medio inoculado en cualquier etapa de crecimiento, que incluye el punto inmediatamente después de la inoculación y el período después de que ha cesado algo o toda la actividad celular y puede incluir el material posterior al procesamiento pos-fermentación. Incluye los

000037

contenidos completos de la combinación de materia soluble e insoluble, materia suspendida, células y medio, según corresponda.

[0096] El término "productividad" como se usa en la presente tiene su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica y puede incluir la masa de un material de interés producido en un tiempo dado en un volumen dado. Las unidades pueden ser, por ejemplo, gramos por litro-hora, o alguna otra combinación de masa, volumen, y tiempo. En la fermentación, la productividad se usa con frecuencia para caracterizar con qué rapidez se puede obtener un producto en un volumen de fermentación determinado. El volumen se puede referir al volumen total del vaso de fermentación, el volumen de trabajo del vaso de fermentación, o el volumen real del caldo fermentado. El contexto de la frase indicará el significado deseado por los expertos en la técnica. La productividad es diferente del "título" ya que la productividad incluye un término de tiempo, y el título es análogo a la concentración. Título y Productividad se pueden medir generalmente en cualquier momento durante la fermentación, tal como en el comienzo, el final, o en algún tiempo intermedio, el título se relaciona con la cantidad de un material particular presente o producido en el punto de tiempo de interés y la productividad se relaciona con la cantidad de un material particular producido por litro en una cantidad determinada de tiempo. La cantidad de tiempo usado en la determinación de productividad puede ser desde el inicio de la fermentación o desde algún otro momento, y llegar hasta el fin fermentación, tal como cuando no se produce material adicional o cuando ocurre la recolección o en algún otro momento, indicado por el contexto de uso del término. "Productividad total" se refiere a la productividad determinada por la utilización del título final y el tiempo de fermentación total. "Productividad para el título máximo" se refiere a la productividad determinada por la utilización del título máximo y el tiempo para obtener el título máximo. "Productividad instantánea" se refiere a la productividad en un momento y se puede determinar a partir de la pendiente de la curva de título versus tiempo para el compuesto de interés, o

000038

por otro medio apropiado determinado por las circunstancias de la operación y el contexto de la frase. "Productividad incremental" se refiere a la productividad respecto de una porción del tiempo de fermentación, tal como varios minutos, una hora, o varias horas. Con frecuencia, una productividad creciente se usa para implicar o aproximarse a la productividad instantánea. Otros tipos se pueden usar también, el contexto indica que valor se debe determinar.

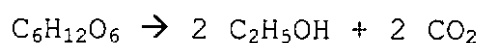
[0097] "Título" se refiere a la cantidad de un material particular presente en un caldo de fermentación. Es similar a la concentración y puede referirse a la cantidad de material obtenido por el organismo en el caldo proveniente de todos los ciclos de fermentación, o la cantidad de material obtenido en el ciclo de fermentación actual o durante un período de tiempo dado, o la cantidad de material presente de cualquier fuente, tal como producido por el organismo o añadido al caldo. Con frecuencia, el título de las especies solubles hará referencia a la porción líquida del caldo, con las insolubles eliminadas, y el título de las especies insolubles se referirá a la cantidad total de caldo con las especies insolubles presentes, sin embargo, el título especies solubles puede hacer referencia al volumen de caldo total y el título de las especies insolubles puede hacer referencia a la porción líquida, el contexto indica cuál sistema se usan en ambos sistemas de referencias deseados en algunos casos. Con frecuencia, el valor determinado hace referencia a un sistema que será el mismo o una aproximación suficiente del valor con referencia al otro. "Concentración" cuando se refiere al material del caldo generalmente se refiere a la cantidad de un material presente de todas las fuentes, sea fabricado por el organismo o agregado al caldo. La concentración puede referirse a las especies solubles o especies insolubles y hace referencia a la porción líquida del caldo o el volumen total del caldo, como en el "título."

[0098] El término "biocatalizador" como se usa en la presente tiene su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica y puede incluir una o más enzimas y microorganismos, que incluyen soluciones, suspensiones, y mezclas de enzimas y

000039

microorganismos. En algunos contextos esta palabra se referirá al posible uso de las enzimas o los microorganismos para cumplir una función particular, en otros contextos la palabra se referirá al uso combinado de los dos y en otros contextos la palabra se referirá solo uno de los dos. El contexto de la frase indicará el significado deseado por los expertos en la técnica.

[0099] Los términos "eficiencia de la conversión" o "rendimiento" como se usan en la presente tienen su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica y pueden incluir la masa del producto obtenida de una masa del sustrato. El término se puede expresar como un porcentaje de rendimiento del producto de una masa inicial del sustrato. Para la producción de etanol a partir de glucosa, la reacción neta generalmente aceptada es:



y la eficiencia o rendimiento de la conversión máximos teóricos es 51% (peso). Con frecuencia, la eficiencia de la conversión se referirá a un máximo teórico, por ejemplo, "80% del máximo teórico". En el caso de la conversión de glucosa a etanol, esta afirmación puede indicar una eficiencia de la conversión de 41% (peso). El contexto de la frase indicará el sustrato y producto deseados por los expertos en la técnica.

[00100] "Pretratamiento" o "pretratado" se usa en la presente para referirse a cualquier proceso mecánico, químico, térmico, bioquímico o combinación de estos procesos sea en una etapa combinada o realizada sucesivamente, que logra la alteración o expansión de la biomasa de modo de volver la biomasa más sensible al ataque con enzimas y/o microbios. En algunas formas de realización, el pretratamiento puede incluir eliminación o alteración de la lignina de modo de obtener los polímeros de celulosa y hemicelulosa de la biomasa de planta más disponibles para las enzimas y/o microbios celulolíticos, por ejemplo, por el tratamiento con un ácido o una base. En algunas formas de realización, el pretratamiento puede incluir el uso de un microorganismo de un tipo que vuelva los polisacáridos vegetales más accesibles a los microorganismos de otro tipo, por ejemplo, por tratamiento con ácido o base. En algunas formas de realización, el pretratamiento también puede incluir la

000040

alteración o expansión del material celulósico y/o hemicelulósico. La explosión de vapor, y expansión de fibra de amoníaco (o explosión) (AFEX) son técnicas térmicas/químicas bien conocidas. Se puede usar hidrólisis, que incluye métodos que utilizan ácidos y/o enzimas. También se pueden usar otras técnicas térmicas, químicas, bioquímicas o enzimáticas.

[00101] El término "discontinuo alimentado" o "fermentación discontinua" como se usa en la presente tiene su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica y puede incluir un método de cultivar microorganismos donde los nutrientes, otros componentes del medio o biocatalizadores (que incluyen, por ejemplo, enzimas, organismos frescos, caldo extracelular, etc.) se suministran al fermentador durante el cultivo, pero el caldo del cultivo no se recolecta del fermentador hasta el final de la fermentación, aunque también puede incluir técnicas de "autosiembra" o "recolección parcial" donde se recolecta una porción del volumen del fermentador luego se añade medio fresco al caldo restante en el fermentador, con al menos una porción del inóculo que es el caldo que se dejó en el fermentador. Durante una fermentación discontinua alimentada, el volumen del caldo puede aumentar, al menos durante un período, por la adición de medio o nutrientes al caldo mientras que los organismos de la fermentación están presentes. En algunas fermentaciones discontinuas alimentadas, el volumen del caldo puede ser insensible a la adición de nutrientes y en algunos casos no cambian desde la adición de los nutrientes. Los nutrientes adecuados que se pueden utilizar incluyen los que son solubles, insolubles, y parcialmente solubles, que incluyen gases, líquidos y sólidos. En algunas formas de realización, un proceso discontinuo se refiere a una frase tal como, "alimentado por lote con aumento de células". Esta frase puede incluir una operación donde se añaden los nutrientes y células microbianas o uno donde se añaden las células microbianas sin cantidad sustancial de nutrientes. La frase más general "alimentado por lote" abarca también estas operaciones. El contexto en que se usa cualquiera de estas frases indicará a los expertos en la materia las técnicas que se están considerando.

000041

[00102] Un término "fitato" como se usa en la presente tiene su significado ordinario conocido por los expertos en la técnica puede incluir ácido fítico, sus sales, y sus formas combinadas así como las combinaciones de estas.

[00103] "Compuestos de azúcar" como se usa en la presente incluyen azúcares de monosacárido, que incluyen pero sin limitación hexosas y pentosas; alcoholes de azúcar; ácidos de azúcar; amino azúcares; compuestos que contienen dos o más de estos unidos entre sí en forma directa o indirecta a través de enlaces covalentes o iónicos; y sus mezclas. Se incluyen en esta descripción disacáridos; trisacáridos; oligosacáridos; polisacáridos; y cadenas de azúcar, ramificadas y/o lineales, de cualquier longitud.

[00104] "Peso seco celular" se usa en la presente para referirse a un método de determinación del contenido celular de un caldo o inóculo, y el calor así determinado. En general, el método incluye enjuagar o lavar un volumen de caldo seguido por el secado o pesado del residuo, pero no es necesario. En algunos casos, una muestra de caldo se centrifuga simplemente y la capa que contiene las células se recolecta, seca y pesa. Con frecuencia, el caldo se centrifuga, luego se resuspende en agua o una mezcla de agua y otros ingredientes, tales como a buffer, ingredientes para crear una condición isotónica, ingredientes para controlar cualquier cambio de presión osmótica, etc. Las etapas de centrifugado-resuspensión se pueden repetir, si se desea y se pueden usar diferentes soluciones de resuspensión antes del centrifugado y secado final. Cuando un componente insoluble del medio está presente, la presencia del componente insoluble se puede ignorar, el valor se determina como antes. Los métodos preferidos cuando están presentes los componentes insolubles del medio incluyen aquellos en donde el componente insoluble reacciona con una forma soluble, se disuelve o extrae en un solvente diferente que puede incluir agua, o separarse por un método apropiado, tal como por centrifugación, centrifugación en gradiente, flotación, filtración, u otra técnica o combinación de técnicas adecuadas.

Descripción

000042

[00105] La descripción y ejemplos siguientes ilustran algunos ejemplos de forma de realización de la invención descrita en detalle. Los expertos en la técnica reconocerán que existen numerosas variaciones y modificaciones de esta invención que están abarcadas por su alcance. Por consiguiente, la descripción de un cierto ejemplo de forma de realización no se considera una limitación del alcance de la presente invención.

[00106] *C. phytofermentans* ("microbio Q") incluye American Type Culture Collection 700394^T, y en algunas formas de realización se puede definir sobre la base de las características fenotípicas y genotípicas de una cepa cultivada, ISDg^T (Warnick et al., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52:1155-60, 2002). Los aspectos de la invención generalmente incluyen sistemas, métodos y composiciones para producir combustibles, tales como etanol, y/u otros productos orgánicos útiles que involucran, por ejemplo, la cepa ISDg^T y/o cualquier otra cepa de las especies *Clostridium phytofermentans*, que incluyen a las se pueden derivar de la cepa ISDg^T, que incluyen las cepas genéticamente modificadas, o cepas aisladas por separado. Algunos ejemplos de especies se pueden definir usando consideraciones taxonómicas (Stackebrandt y Goebel, International Journal of Systematic Bacteriology, 44:846-9, 1994), cepas con valores de homología de secuencia de ARNr 16S de 97% y más altos en comparación con cepa tipo (ISDg^T), y las cepas con valores de reasociación de ADN de al menos aproximadamente 70% se pueden considerar *Clostridium phytofermentans*. Existe considerable evidencia que indica que muchos microbios que tienen valores de reasociación de ADN de 70% o más también tienen al menos 96% de identidad de secuencia de ADN y comparten rasgos fenotípicos que definen una especie. Los análisis de la secuencia del genoma de la cepa de *Clostridium phytofermentans* ISDg^T indican la presencia de grandes cantidades de genes y locus genéticos que están probablemente involucrados en los mecanismos y las vías para la fermentación de polisacáridos de plantas, que da origen a inusuales propiedades fermentación de este microbio que se pueden hallar en todas o casi todas las cepas de las especies de *Clostridium phytofermentans*. Las cepas de *Clostridium*

000043

phytofermentans puede ser cepas naturales o cepas modificadas genéticamente.

Atributos de *C. phytofermentans*

[00107] El microbio "Q" proporciona ventajas útiles para la conversión de la biomasa en etanol y otros productos. Una ventaja del microbio Q es su capacidad de producir enzimas capaces de hidrolizar polisacáridos y sacáridos de peso molecular superior a sacáridos de peso molecular menor, tales como oligosacáridos, disacáridos, y monosacáridos. El microbio Q puede producir un amplio espectro de enzimas hidrolíticas, que pueden facilitar la fermentación de varios materiales de biomasa, que incluyen materiales celulósico, hemicelulósico, lignocelulósicos; pectinas; almidones; madera; papel; productos agrícolas; residuos forestales; residuos de árboles; corteza de árbol; hojas; pastos; junco de agua; materia de planta leñosa; materia de planta no leñosa; carbohidratos; pectina; almidón; inulina; fructanos; glucanos; maíz; caña de azúcar; pastos; bambú, algas, y material derivado de estos materiales. El organismo usualmente puede producir estas enzimas según sea necesario, con frecuencia sin excesiva producción de enzimas hidrolíticas innecesarias, o en algunas formas de realización, se pueden añadir una o más enzimas para mejorar adicionalmente la capacidad de producción del organismo. Esta capacidad para producir una variedad muy amplia de enzimas hidrolíticas proporciona al microbio Q y la tecnología asociada distintas ventajas en la fermentación de la biomasa, en especial las fermentaciones que no utilizan azúcares simples como la materia prima. Varias condiciones de fermentación pueden aumentar las actividades del organismo, lo que origina mayores rendimientos, productividad más alta, mayor selectividad de producto, y/o mayor eficiencia de la conversión. En algunas formas de realización, las condiciones de fermentación pueden incluir la operación discontinua alimentada y operación discontinua alimentada con aumento celular; adición de fuentes de nitrógeno complejas tales como polvo de maceración de maíz o extracto de levadura; adición de aminoácidos específicos que incluyen prolina, glicina, isoleucina, y/o histidina; adición de un material complejo que contiene uno o más de estos aminoácidos.

000044

adición de otros nutrientes u otros compuestos tales como fitato, enzimas proteasas, o enzimas polisacararas. En una forma de realización, las condiciones de fermentación pueden incluir la suplementación de un medio con una fuente orgánica de nitrógeno. En otra forma de realización, las condiciones de fermentación pueden incluir la suplementación de medio de una fuente inorgánica de nitrógeno. En algunas formas de realización, la adición de un material puede proporcionar suplementos que integran más de una categoría, tal como proporcionar aminoácidos y fitato.

[00108] En algunas formas de realización, el organismo microbio Q se puede usar para hidrolizar varios sacáridos superiores (peso molecular más alto) presente en la biomasa a sacáridos inferiores (peso molecular más bajo), tales como en la preparación para la fermentación para producir etanol, hidrógeno, u otros agentes químicos tales como ácidos orgánicos que incluyen ácido fórmico, ácido acético, y ácido láctico. Otra ventaja del microbio Q es su capacidad para hidrolizar polisacáridos y sacáridos superiores que contienen unidades de azúcar de hexosa o que contienen unidades de azúcar de pentosa, y que contienen ambos, en sacáridos inferiores y en algunos casos monosacáridos. Estas enzimas y/o el hidrolizado se pueden usar en las fermentaciones para producir varios productos que incluyen combustibles, y otros agentes químicos. Otra ventaja del microbio Q es su capacidad para producir etanol, hidrógeno, y otros combustibles o compuestos tales como ácidos orgánicos que incluyen ácido acético, ácido fórmico, y ácido láctico provenientes de azúcares inferiores (peso molecular más bajo) tales como monosacáridos. Otra ventaja del microbio Q es su capacidad para realizar las etapas combinadas de hidrolizar una biomasa de peso molecular más alto que contiene azúcares y/o sacáridos o polisacáridos superiores a azúcares inferiores y fermentar estos azúcares inferiores en productos deseables que incluyen etanol, hidrógeno, y otros compuestos tales como ácidos orgánicos que incluyen ácido fórmico, ácido acético, y ácido láctico.

[00109] Otra ventaja del microbio Q es su capacidad para crecer en condiciones que incluyen concentración elevada de etanol,

000045

concentración de azúcar alta, concentración de azúcar baja, utilizar fuentes de carbono insolubles y/u operar en condiciones anaeróbicas. Estas características, en varias combinaciones, se pueden usar para lograr la operación con ciclos de fermentación largos y se pueden usar en combinación con fermentaciones discontinuas, fermentaciones discontinuas alimentadas, fermentaciones de auto-siembra/recolección parcial, y el reciclado de las células de la fermentación finan como inóculo.

[00110] En general, las técnicas tales como fermentación con reciclado celular y recolección parcial no se usan con frecuencia en las operaciones de producción en escala, debido a varios problemas inherentes a estas técnicas. Por ejemplo, el "agotamiento del cultivo" cuando las células simplemente no proporcionan fermentaciones posteriores con rendimientos y/o productividad adecuados o similares que la fermentación original o previa es usual. Además, la operación con el cultivo único durante tiempos extendidos, en especial cuando se recolecta el caldo y hay riesgo de ruptura de la esterilidad, puede llevar a problemas significativos con contaminación del cultivo y las fermentaciones para las que se usan. Como resultado, en general no se espera la adecuación de un organismo para la fermentación con reciclado celular y recolección parcial.

[00111] En algunos casos, un proceso para convertir material de biomasa en etanol incluye el pretratamiento del material de biomasa (por ejemplo, "materia prima"), hidrólisis de la biomasa pretratada para convertir polisacáridos en oligosacáridos, posterior hidrólisis de los oligosacáridos a monosacáridos, y convertir los monosacáridos en etanol. En algunos casos, la biomasa se puede hidrolizar directamente a monosacáridos u otros sacáridos que pueden ser utilizados por el organismo de fermentación para producir etanol u otros productos. Si se desea un producto final diferente, tal como hidrocarburos, hidrógeno, metano, compuestos hidroxí tales como alcoholes (por ejemplo butanol, propanol, metanol, etc.), compuestos carbonilo tales como aldehídos y cetonas (por ejemplo acetona, formaldehído, 1-propanal, etc.), ácidos orgánicos, derivados de ácidos orgánicos tales como ésteres (por ejemplo ésteres de cera, glicéridos,

000046

etc.) y otros compuestos funcionales que incluyen, pero sin limitación, 1, 2-propanodiol, 1, 3-propanodiol, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido succínico, ácido pirúvico, enzimas tales como celulasas, polisacaridasas, lipasas, proteasas, ligninasas, y hemicelulasas, los monosacáridos se pueden en la biosíntesis de este compuesto particular. El material de biomasa que se puede utilizar incluye materia de planta leñosa, materia de planta no leñosa, material celulósico, material lignocelulósico, material hemicelulósico, carbohidratos, pectina, almidón, inulina, fructanos, glucanos, maíz, caña de azúcar, pastos, pasto varilla, bambú, y material derivado de estos. El producto final se puede separar y/o purificar, de acuerdo con lo indicado por las propiedades para el producto final deseado. En algunos casos, también se pueden usar compuestos relacionados con los azúcares tales como alcoholes de azúcar o ácidos de azúcar.

[00112] En esta forma de realización, más de una de estas etapas puede ocurrir en cualquier tiempo determinado. Por ejemplo, la hidrólisis de la materia prima pretratada y la hidrólisis de los oligosacáridos se puede producir en forma simultánea, y uno o más de estas pueden ocurrir en forma simultánea para la conversión de los monosacáridos en etanol.

[00113] En algunos casos, una enzima puede convertir directamente el polisacárido en monosacáridos. En algunos casos, una enzima puede hidrolizar el polisacárido a oligosacáridos y la enzima u otra enzima puede hidrolizar los oligosacáridos a monosacáridos.

[00114] En una forma de realización, las enzimas presentes en la fermentación se pueden producir por separado y luego añadir a la fermentación o se pueden producir con los microorganismos presentes en la fermentación. En otras formas de realización, los microorganismos presentes en la fermentación pueden producir algunas enzimas y algunas enzimas se pueden producir por separado y añadir a la fermentación.

[00115] Para que la conversión total de la biomasa pretratada al producto final se produzca en tasas altas, es necesario que cada una de las enzimas necesarias en cada etapa de conversión esté presente con actividad suficientemente alta. Si una de estas enzimas falta o está presente en cantidades insuficientes, se

000047

reducirá la tasa de producción de etanol, u otro producto deseado. La tasa de producción también se puede reducir si los microorganismos responsables para la conversión de monosacáridos al producto solo captan lentamente monosacáridos y/o tienen solo capacidad limitada para la translocación de los monosacáridos e intermediarios producidos durante la conversión a etanol.

[00116] En una forma de realización, las enzimas del método se producen con el microbio Q mismo, que incluyen una variedad de enzimas hidrolíticas adecuadas para los materiales de biomasa usados en los métodos de fermentación. En una forma de realización, el microbio Q crece en condiciones apropiadas para inducir y/o promover la producción de las enzimas necesarias para la sacarificación del polisacárido presente. La producción de estas enzimas puede ocurrir en un recipiente separado, tal como un recipiente de fermentación de siembra u otro recipiente de fermentación, o producir en el recipiente de fermentación donde ocurre la producción de etanol. Cuando las enzimas se producen en un recipiente separado, por ejemplo, se pueden transferir al recipiente de fermentación de producción junto con las células, o como un líquido en solución relativamente libre de células que contiene el medio intercelular con las enzimas. Cuando las enzimas se producen en un recipiente separado, también se pueden secar y/o purificar antes de añadirlas al recipiente de fermentación de producción. Las condiciones apropiadas para la producción de las enzimas con frecuencia se manejan para el crecimiento de las células en un medio que incluye la biomasa que se esperará que las células hidrolicen en etapas de fermentación posteriores. Los componentes del medio adicionales, tales como suplementos de sales, factores de crecimiento y cofactores que incluyen, pero sin limitación fitato, aminoácidos, y péptidos también pueden asistir en la producción de las enzimas utilizadas por el microorganismo en la producción de los productos deseados.

Materia prima y pretratamiento de la materia prima

[00117] La materia prima que puede contener material celulósico, hemicelulósico, y/o lignocelulósico se puede derivar de cultivos agrícolas, residuos de cultivo, árboles, astillas de madera, aserrín, papel, cartón, pastos y otras fuentes.

000048

[00118] La celulosa es un polímero lineal de glucosa donde las unidades de glucosa se conectan por medio de ligaduras β (1-4). La hemicelulosa es un polímero ramificado de numerosos monómeros de azúcar que incluyen glucosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, y puede tener también ácidos de azúcar tales como ácido manurónico y galacturónico. La lignina es una macromolécula racémica, entrecruzada de principalmente alcohol *p*-cumarílico y alcohol sinapílico. Estos tres polímeros se producen juntos en los materiales lignocelulósicos en la biomasa de planta. Las características diferentes de los tres polímeros pueden dificultar la hidrólisis de la combinación ya que cada polímero tiende a proteger a los otros del ataque enzimático.

[00119] En un aspecto de la invención, los métodos se proporcionan para el pretratamiento de la materia prima usada en la fermentación y producción de los biocombustibles y etanol. Las etapas de pretratamiento pueden incluir pruebas mecánicas, térmicas, presión, químicas, termoquímicas, y/o bioquímicas antes de usar en un bioprocesos para la producción de combustibles y agentes químicos, pero el material de biomasa se puede usar también en el proceso. Los procesos mecánicos pueden reducir el tamaño de partícula del material de biomasa de modo que se pueda manejar de forma más conveniente en el bioprocesos y puede aumentar el área superficial de la materia prima para facilitar el contacto con los agentes químicos/bioquímicos/biocatalizadores. Los procesos mecánicos también se pueden separar un tipo de material de biomasa de otro. El material de biomasa también se puede someter a pretratamientos térmicos y/o químicos para producir polímeros de planta más accesibles. También se pueden usar múltiples etapas de tratamiento.

[00120] Los procesos mecánicos incluyen, sin limitación, procesos de lavado, remojado, molienda, reducción de tamaño, filtrado, cizallamiento, clasificación por tamaño y clasificación por densidad. Los procesos químicos incluyen, pero sin limitación, blanqueado, oxidación, reducción, tratamiento ácido, tratamiento básico, tratamiento con sulfito, tratamiento con sulfito ácido, tratamiento con sulfito básico, tratamiento con amoníaco, e

000049

hidrólisis. Los procesos térmicos incluyen, pero sin limitación, esterilización, expansión o explosión de fibra de amoníaco ("AFEX"), explosión con vapor, mantenimiento a temperaturas elevadas, presurizado o no presurizado, en presencia o ausencia de agua y congelado. Los procesos bioquímicos incluyen, pero sin limitación, tratamiento con enzimas y tratamiento con microorganismos. Varias enzimas que se pueden utilizar incluyen celulasa, amilasa, β -glucosidasa, xilanasa, gluconasa, y otros polisacaridas; lisozima; laccasa, y otras enzimas modificadoras de lignina; lipoxigenasa, peroxidasa, y otras enzimas oxidativas; proteasas; y lipasas. Uno o más de los procesos mecánicos, químicos, térmicos, termoquímicos y bioquímicos se pueden combinar o usar por separado. Tales procesos combinados también pueden incluir los usados en la producción de papel, productos de celulosa, celulosa microcristalina, y materiales celulósicos y pueden incluir elaboración de pulpa, elaboración de pulpa kraft, procesamiento con sulfito ácido. La materia prima puede ser una corriente secundaria o corriente residual de una instalación que utiliza uno o más de estos procesos sobre un material de biomasa, tal como material celulósico, hemicelulósico o lignocelulósico. Los ejemplos incluyen plantas de papel, plantas de procesamiento de algodón de plantas celulósicas, y plantas de celulosa microcristalina. La materia prima también puede incluir materiales de residuo que contienen celulosa o que contienen material celulósico. La materia prima también puede ser materiales de biomasa, tales como madera, pastos, cereal, almidón, o azúcar, producido o cosechado como materia prima deseada para la producción de etanol u otros productos tales como por *Clostridium phytofermentans*.

[00121] En formas de realización adicionales, los métodos de la invención pueden utilizar procesos de pretratamiento descritos en las Patentes U.S. y las solicitudes de patente US20040152881, US20040171136, US20040168960, US20080121359, US20060069244, US20060188980, US20080176301, 5693296, 6262313, US20060024801, 5969189, 6043392, US20020038058, US5865898, US5865898, US6478965, 5986133, US20080280338, cada una de las cuales se incorpora por referencia en la presente en su totalidad.

000050

[00122] En otra forma de realización, el proceso AFEX se puede usar para el pretratamiento de la biomasa. En una forma de realización preferida, el proceso AFEX se usa en la preparación del material celulósico, hemicelulósico o lignocelulósicos para la fermentación a etanol u otros productos. El proceso en general incluye la combinación de la materia prima con amoníaco, calentamiento bajo presión y liberación súbita de la presión. El agua puede estar presente en varias cantidades. El proceso AFEX ha sido sujeto de numerosas patentes y publicaciones.

[00123] En otra forma de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende la adición de hidróxido de calcio a una biomasa para producir la biomasa sensible a la degradación. El pretratamiento comprende la adición de hidróxido de calcio y agua a la biomasa para formar una mezcla, y mantener la mezcla a una temperatura relativamente alta. De modo alternativo, se puede añadir un agente oxidante, seleccionado del grupo que consiste en oxígeno y gases que contiene oxígeno, bajo la presión en la mezcla. Los ejemplos de tratamientos con hidróxido de carbono se describen en la Patente U.S. No. 5865898 a Holtzapple y S. Kim y M. T. Holzapple, Bioresource Technology, 96, (2005) 1994, se incorporan en la presente en su totalidad.

[00124] En otras formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende la hidrólisis ácida diluida. Los ejemplos de tratamientos por hidrólisis ácida diluida se describen en T. A. Lloyd y C. E Wyman, Bioresource Technology, (2005) 96, 1967), se incorporan por referencia en la presente en su totalidad.

[00125] En otras formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende el tratamiento de agua caliente líquida controlada por pH. Los ejemplos de tratamientos de agua caliente líquida controlada por pH se describen en N. Mosier et al., Bioresource Technology, (2005) 96, 1986, se incorporan por referencia en la presente en su totalidad.

[00126] En otras formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende el proceso de reciclado del amoníaco acuoso (ARP). Los ejemplos de proceso de reciclado del amoníaco acuoso se describen en T. H. Kim y Y. Y. Lee, Bioresource Technology,

000051

(2005)96, 2007, se incorporan por referencia en la presente en su totalidad.

[00127] En algunas formas de realización, los métodos mencionados antes tienen dos etapas: una etapa de pretratamiento que lleva a una corriente de lavado, y una etapa de hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada que produce una corriente de hidrolizado. En los métodos anteriores, el pH al que se lleva a cabo la etapa de pretratamiento incluye la hidrólisis ácida, pretratamiento con agua caliente, o métodos basados en reactivos alcalinos (AFEX, ARP, y pretratamientos con cal). Los métodos de tratamiento con ácido diluido y agua caliente solubilizan principalmente la hemicelulosa, mientras que los métodos que emplean reactivos alcalino extraen la mayor parte de la lignina durante la etapa del pretratamiento. Como resultado, la corriente de lavado de la etapa de pretratamiento en los primeros métodos contiene la mayor parte de azúcares basado en hemicelulosa, mientras que esta corriente tiene principalmente lignina para los métodos de pH alto. La posterior hidrólisis enzimática de la biomasa residual produce azúcares mixtos (C5 y C6) en los métodos de pretratamiento basados en reactivos alcalinos, mientras que la glucosa es el producto principal en el hidrolizado proveniente de los métodos con pH bajo y neutro. La digestibilidad enzimática de la biomasa residual es algo mejor para los métodos de pH alto debido a la eliminación de la lignina que puede interferir en la accesibilidad de la enzima celulasa a la celulosa.

[00128] En algunas formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende pretratamiento líquido iónico. La biomasa se puede pretratar por la incubación con un líquido iónico, seguido por la extracción IL con un solvente acuoso tal como alcohol o agua. La biomasa tratada luego se puede separar de la solución del líquido iónico/solvente de lavado por centrifugación o filtración, y enviada al reactor o recipiente de sacarificación. Los ejemplos de pretratamiento con líquido iónico se describen en la Publicación US No. 2008/0227162, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[00129] Los ejemplos de métodos de pretratamiento se describen en la Patente U.S. No. 4600590 en Dale, Patente U.S. No. 4644060 en

000052

Chou, Patente U.S. No. 5037663 en Dale. Patente U.S. No. 5171592 en Holtzapple, et al., et al., Patente U.S. No. 5939544 en Karstens, et al., Patente U.S. No. 5473061 en Bredereck, et al., Patente U.S. No. 6416621 en Karstens., Patente U.S. No. 6106888 en Dale, et al., Patente U.S. No. 6176176 en Dale, et al., Publicación PCT WO2008/020901 en Dale, et al., Felix, A., et al., Anim. Prod. 51, 47-61 (1990)., Wais, A.C., Jr., et al., Journal of Animal Science, 35, No. 1,109-112 (1972), que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[00130] En algunas formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende la hidrólisis enzimática. En una forma de realización una biomasa se puede pretratar con una enzima o mezcla de enzimas, por ejemplo, endonucleasas, exonucleasas, celobiohidrolasas, celulasa, beta-glucosidasas, glicósido hidrolasas, glicosiltransferasas, liasas, esterasas y proteínas que contienen módulos de unión a carbohidratos. En algunas formas de realización, la enzima o mezcla de enzimas puede ser enzimas individuales con actividades distintas. En algunas formas de realización, la enzima o mezcla de enzimas pueden ser dominios enzimáticos con una actividad catalítica particular. Por ejemplo, una enzima con actividades múltiples puede tener múltiples dominios enzimáticos, que incluyen por ejemplo dominios catalíticos de glicósido hidrolasas, glicosiltransferasas, liasas y/o esterasas.

[00131] En algunas formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende la hidrólisis enzimática con una o más enzimas del *C. phytofermentans*. En algunas formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende hidrólisis enzimática con una o más enzimas del *C. phytofermentans*, donde una o más enzimas se selecciona del grupo que consiste en endonucleasas, exonucleasas, celobiohidrolasas, beta-glucosidasas, glicósido hidrolasas, glicosiltransferasas, liasas, esterasas y proteínas que contienen módulos de unión a los carbohidratos. En algunas formas de realización, la biomasa se puede pretratar con una hidrolasa identificada en *C. phytofermentans*. Los ejemplos de hidrolasas identificados en *C. phytofermentans* incluyen pero sin

000053

limitación Cphy3367, Cphy3368, Cphy0430, Cphy3854, Cphy0857, Cphy0694, y Cphy1929 (www.genome.jp/).

[00132] En algunas formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende la hidrólisis enzimática con uno o más de enzimas listadas en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3, o Tabla 4. Las Tablas 1-4 muestran los ejemplos de actividades conocidas de algunas glicósido hidrolasas, liasas, esterasas, y miembros de la familia de proteínas que contienen módulos de unión a los carbohidratos que se predice que están presentes en *C. phytofermentans*, respectivamente. Las actividades conocidas se listan por actividad y el correspondiente número de PC determinado por la International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

000054

[00133]

TABLA 1: Actividades conocidas de los miembros de glicósido hidrolasa

Familia de glicósido hidrolasa	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en <i>C. phytofermentans</i>
1	beta-glucosidasa (EC 3,2,1,21); beta-galactosidasa (EC 3,2,1,23); beta-manosidasa (EC 3,2,1,25); beta-glucuronidasa (EC 3,2,1,31); beta-D-fucosidasa (EC 3,2,1,38); florizin hidrolasa (EC 3,2,1,62); 6-fosfo--galactosidasa (EC 3,2,1,85); 6-fosfo-beta-glucosidasa (EC 3,2,1,86); estrictosidinabeta-glucosidasa (EC 3,2,1,105); lactasa (EC 3,2,1,108); amigdalina-beta-glucosidasa (EC 3,2,1,117); prunasin beta-glucosidasa (EC 3,2,1,118); raucaifricina beta-glucosidasa (EC 3,2,1,125); tioglucosidasa (EC 3,2,1,147); beta-primeverosidasa (EC 3,2,1,149); isoflavonoide 7-O-beta-apiosil-glucosidasa (EC 3,2,1,161); hidroxiiisourato hidrolasa (EC 3.-.-.-);_beta-glicosidasa_(EC_3,2,1.-)	1
2	beta-galactosidasa (EC 3,2,1,23); beta-manosidasa (EC 3,2,1,25); beta-glucuronidasa (EC 3,2,1,31); manosilglicoproteína 5 endo-beta-mannosidasa (EC 3,2,1,152); exo-beta glucosaminidasa_(E 3,2,1.-)	5
3	beta-glucosidasa (EC 3,2,1,21); xilan 1,4-beta-xilosidasa (EC 3,2,1,37); beta -N-acetilhexosaminidasa (EC	8

000055

Familia de glicósido hidrolasa	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en <i>C. phytofermentans</i>
	3,2,1,52); glucan 1,3- beta-glucosiclase (EC 3,2,1,58); glucan 1,4-beta-glucosidase (EC 3,2,1,74); exo-1,3-1,4-glucanase (EC 3,2,1,-); alfa-L arabinofuranosidase (EC 3,2,1,55).	
4	maltosa-6-fosfato glucosidase (EC 3,2,1,122); alfa glucosidase (EC 3,2,1,20); alfa-galactosidase (EC 3,2,1,22); 6-fosfo-beta-glucosidase (EC 3,2,1,86); alfa-glucuronidase (EC 3,2,1,139).	3
5	Quitosanase (EC 3,2,1,132); beta-manosidase (EC 3,2,1,25); Celulase (EC 3,2,1,4); glucano 1,3-beta-glucosidase (EC 3,2,1,58); licheninase (EC 3,2,1,73); glucan endo-1,6-beta-glucosidase (EC 3,2,1,75); manan endo-1,4-beta-manosidase (EC 3,2,1,78); 3 Endo-1,4-beta-xilanase (EC 3,2,1,8); celulosa 1,4-beta-celobiosidase (EC 3,2,1,91); endo-1,6-beta-galactanase (EC 3,2,1,-); beta -1,3-mananase (EC 3,2,1,-); endo-beta-1,4-glucanase específica de xiloglucano (EC 3,2,1,151)	3
8	chitosanase (EC 3,2,1,132); celulase (EC 3,2,1,4); licheninase (EC 3,2,1,73); endo-1,4-beta-xilanase (EC 3,2,1,8); exo-oligoxilanase liberadora de xilosa final reductora (EC 3,2,1,156)	1
9	endoglucanase (EC 3,2,1,4);	1

000056

Familia de glicósido hidrolasa	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en <i>C. phytofermentans</i>
	celobiohidrolasa (EC 3,2,1,91); beta-glucosidasa (EC 3,2,1,21)	
10	xilanasa (EC 3,2,1,8); endo-1,3-beta-xilanasa (EC 3,2,1,32)	6
11	xilanasa (EC 3,2,1,8).	1
12	endoglucanasa (EC 3,2,1,4); xiloglucan hidrolasa (EC 3,2,1,151); beta-1,3-1,4-glucanasa (EC 3,2,1,73); xiloglucano endotransglicosilasa (EC 2,4,1,207)	1
13	alfa-amilasa (EC 3,2,1,1); pululanasa (EC 3,2,1,41); ciclomaltodextrina glucanotransferasa (EC 2,4,1,19); ciclomaltodextrinasa (EC 3,2,1,54); trehalosa-6-fosfato hidrolasa (EC 3,2,1,93); oligo-alfa-glucosidasa (EC 3,2,1,10); amilasa maltogénica (EC 3,2,1,133); neopululanasa (EC 3,2,1,135); alfa-glucosidasa (EC 3,2,1,20); 3-amilasa formadora de maltotetraosa (EC 3,2,1,60); isoamilasa (EC 3,2,1,68); glucodextranasa (EC 12,170); alfa-amilasa formadora de maltohexaosa (EC 3,2,1,98); enzima ramificadora (EC 2,4,1,18); trehalosa sintasa (EC 5,4,99,16); 4--glucanotransferasa (EC 2,4,1,25); amilasa formadora de maltopentaosa (EC 3,2,1,-); amilosucrasa (EC 2,4,1,4); sacarosa fosforilasa (EC 2,4,1,7); malto-oligosiltrehalosa trehalohidrolasa (EC 3,2,1,141); isomaltulosa sintasa (EC	7

000057

Familia de glicósido hidrolasa	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en <i>C. phytofermentans</i>
	5,4,99,11).	
16	xiloglucan:xiloglucosiltransferasa (EC 2,4,1,207); sulfato de querato endo-1,4-beta-galactosidasa (EC 3,2,1,103); endo-1,3-beta-D-glucosidasa glucano (EC 3,2,1,39); endo-1,3(4)-beta-glucanasa (EC 3,2,1,6); Licheninasa (EC 3,2,1,73); agarasa (EC 3,2,1,81); betacarrageenasa (EC 3,2,1,83); xiloglucanasa (EC 3,2,1,151)	1
18	quitinasa (EC 3,2,1,14); endo-beta-N-acetilglucosaminidasa (EC 3,2,1,96); proteínas no catalíticas: inhibidores de xilanasa; concanavalina B; narbonina	6
19	quitinasa (EC 3,2,1,14).	2
20	beta-hexosaminidasa (EC 3,2,1,52); lacto-N-biosidasa (EC 3,2,1,140); -1,6-N-acetilglucosaminidasa (EC 3,2,1.-)	3
25	lisozima (EC 3,2,1,17)	1
26	beta-mannanasa (EC 3,2,1,78); beta-1,3-xilanasa (EC 3,2,1,32)	3
28	poligalacturonasa (EC 3,2,1,15); exo-poligalacturonasa (EC 3,2,1,67); exo-poligalacturonosidasa (EC 3,2,1,82); ramnogalacturonasa (EC 3,2,1.-); endo-xilogalacturonano hidrolasa (EC 3,2,1.-); ramnogalacturonan alfa-L-ramnopirano hidrolasa (EC 3,2,1,40)	5
29	alfa-L-fucosidasa (EC 3,2,1,51)	3
30	glucosilceramidasa (EC 3,2,1,45); beta-1,6-glucanasa (EC 3,2,1,75);	2

000055

Familia de glicósido hidrolasa	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en <i>C. phytofermentans</i>
	beta-xilosidasa (EC 3,2,1,37)	
31	alfa-glucosidasa (EC 3,2,1,20); alfa-1,3-glucosidasa (EC 3,2,1,84); sacarasa-isomaltasa (EC 3,2,1,48) (EC 3,2,1,10); alfa-xilosidasa (EC 3,2,1.-); alfa-glucan liasa (EC 4,2,2,13); isomaltosiltransferasa-(EC 2,4,1.-).	3
36	alfa-galactosidasa (EC 3,2,1,22); alfa-N-acetilgalactosaminidasa (EC 3,2,1,49); estaquiosa sintasa (EC 2,4,1,67); rafinosa sintasa (EC 2,4,1,82)	2
38	alfa-manosidasa (EC 3,2,1,24); alfa-manosidasa (EC 3,2,1,114)	1
43	beta-xilosidasa (EC 3,2,1,37); beta-1,3-xilosidasa (EC 3,2,1.-); alfa-L-arabinofuranosidasa (EC 3,2,1,55); arabinanasa (EC 3,2,1,99); xilanasa (EC 3,2,1,8); galactan 1,3-beta-galactosidasa (EC 3,2,1,145)	8
48	endoglucanasa (EC 3,2,1,4); quitinasa (EC 3,2,1,14); se ha informado que algunas celobiohidrolasas de esta familia actúan desde los extremos reductores de la celulosa (EC 3,2,1.-), mientras que se ha informado que otras operan desde los extremos no reductores para liberar celobiosa o celotriosa o celotetraosa (EC 3,2,1.-). Esta familia también contiene celulasas endo-procesivas (EC 3,2,1), cuya actividad es difícil de distinguir de las de las	1

Familia de glicósido hidrolasa	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en <i>C. phytofermentans</i>
	celobiohidrolasas.	
51	alfa-L-arabinofuranosidasa (EC 3,2,1,55); endoglucanasa (EC 3,2,1,4)	1
65	trehalasa (EC 3,2,1,28); maltosa fosforilasa (EC 2,4,1,8); trehalosa fosforilasa (EC 2,4,1,64); kojibiosa fosforilasa (EC 2,4,1,230)	4
67	alfa-glucuronidasa (EC 3,2,1,139); xilan alfa-1,2-glucuronosidasa (EC 3,2,1,131)	1
73	peptidoglicano hidrolasas con especificidad para endo-beta-N-acetilglucosaminidasa (EC 3,2,1.-), existe solo un informe no confirmado de actividad de beta-1,4-N-acetilmuramoidhidrolasa (EC 3,2,1,17)	1
77	amilomaltasa o 4-alfa-glucanotransferasa (EC 2,4,1,25)	1
85	endo-beta-N-acetilglucosaminidasa (EC 3,2,1,96)	1
87	micodextranasa (EC 3,2,1,61); alfa-1,3-glucanasa (EC 3,2,1,59)	3
88	beta-glucuronil hidrolasa d-4,5 insaturada (EC 3,2,1.-)	4
94	celobiosa fosforilasa (EC 2,4,1,20); celodextrina fosforilasa (EC 2,4,1,49); chitobiosa fosforilasa (EC 2,4,1.-); beta-1,2-glucano cíclico sintasa (EC 2,4,1.-)	5
95	alfa-1,2-L-fucosidasa (EC 3,2,1,63); alfa-L-fucosidasa (EC 3,2,1,51)	2
105	ramnogalacturonil hidrolasa insaturada (EC 3,2,1.-)	3

Familia de glicósido hidrolasa	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en <i>C. phytofermentans</i>
106	alfa-L-ramnosidasa (EC 3,2,1,40)	1
112	lacto-N-biosa fosforilasa o galacto-N-biosa fosforilasa (EC 2,4,1,211)	3

TABLA 2: Actividades conocidas de miembros de la familia de polisacárido liasa

Familia de polisacárido liasa	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en <i>C. phytofermentans</i>
1	pectato liasa (EC 4,2,2,2); exo-pectato liasa (EC 4,2,2,9); pectina liasa (EC 4,2,2,10).	1
7	alginato liasa (EC 4,2,2,3); -L-guluronato liasa (EC 4,2,2,11)	1
9	pectato liasa (EC 4,2,2,2); exopoligalacturonato liasa (EC 4,2,2,9).	4
11	pectato liasa (EC 4,2,2,2); exopoligalacturonato liasa (EC 4,2,2,9).	1
12	Heparin-sulfato liasa (EC 4,2,2,8)	1
15	oligo-alginato liasa (EC 4,2,2,-)	1
17	alginato liasa (EC 4,2,2,3).	1

000001

TABLA 3: Actividades conocidas de miembros de la familia de carbohidrato esterasa

Familia de carbohidrato esterasa	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en C. phytofermentans
2	acetil xilan esterasa (EC 3,1,1,72).	2
4	acetil xilan esterasa (EC 3,1,1,72); chitin desacetilasa (EC 3,5,1,41); chitooligosacárido desacetilasa (EC 3,5,1.-); peptidoglicano GICNAc desacetilasa (EC 3,5,1.-); ácido peptidoglican N-acetilmurámico desacetilasa (EC 3,5,1.-).	8
8	pectin metilesterasa (EC 3,1,1,11).	1
9	N-acetilglucosamina 6-fosfate desacetilasa (EC 3,5,1,25); N-acetilgalactosamina-6-fosfato desacetilasa (EC 3,5,1,80).	2
12	pectin acetilesterasa (EC 3,1,1.-); ramnogalacturonan acetilesterasa (EC 3,1,1.-); acetil xilan esterasa (EC 3,1,1,72)	1
15	4-O-metil-glucuronil esterasa (3,1,1.-)	1

000062

TABLA 4: Actividades conocidas de miembros de la familia del módulo de unión a carbohidratos

Familia CBM	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en C. phytoferme ntans
2	Módulos de aprox. 100 residuos hallados en muchas enzimas bacterianas con actividades putativas de unión de celulosa, chum y/o xilano.	1
3	Módulos de aprox. 50 residuos hallados en enzimas bacterianas. La función de unión a celulosa se ha demostrado en muchos casos. En un caso se ha informado la unión a quitina.	5
4	Módulos de aprox. 50 residuos hallados en enzimas bacterianas. Se ha demostrado la unión de estos módulos con xilano, -1,3-glucano, -1,3-1,4-glucano, -1,6-glucano y celulosa amorfa pero no con celulosa cristalina.	4
5	Módulos de aprox. 60 residuos hallados en enzimas bacterianas. Relacionados remotamente con la familia CBM12.	1
6	Módulos de aprox. 120 residuos. La función de unión a celulosa se ha demostrado yb caso con celulosa amorfa y xilano. Algunos de estos módulos también se unen a -1,3-glucano.	1
12	Módulos de aprox. 40-60 residuos. La mayoría de estos módulos se halla en tres las quitinasas donde la función es de unión a quitina. Relacionados remotamente con la familia CBM5.	2
13	Módulos de aprox. 50 residuos que a	1

000063

Familia CBM	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en C. <i>phytoferme ntans</i>
	menudo aparecen como una repetición interna tres veces, una excepción incluye, xilanasas II de <i>Actinomyces</i> sp. FC7 (GenBank U08894). Estos módulos se identificaron primero en varias lectinas de planta tales como ricina o aglutinina de <i>Ricinus communis</i> que se unen a los residuos de galactosa. Se ha determinado la estructura tridimensional de una lectina de planta y exhibe una simetría pseudo-triple de acuerdo con la repetición secuencia de tres veces observada. Estos módulos se han hallado en numerosas proteínas de varias funciones que incluyen glicosidohidrolasas y glicosiltransferasas. Si bien en las lectinas vegetales este módulo se une a manosa, la unión a xilano se ha demostrado en <i>Streptomyces lividans</i> xilanasas A y arabinofuranosidasas B. Se ha demostrado la unión a GalNAc para el correspondiente módulo de GalNAc transferasa 4. Para las otras proteínas, no se ha establecido la especificidad de unión de estos módulos. La simetría pseudo-triple del módulo CBM13 se ha confirmado actualmente en la estructura 3-D de la xilanasas intactas de dos dominios de <i>Streptomyces olivaceoviridis</i>.	
22	Se ha demostrado una función de unión a xilano en varios casos y afinidad con -	1

000064

Familia CBM	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en C. <i>phytoferme</i> <i>ntans</i>
	1,3/-1,4-glucanos mixtos en un caso. En varios casos, también se ha observado un efecto termoestabilizante.	
32	Se ha demostrado la unión a galactosa y lactosa para el módulo de <i>Micromonospora viridifaciens</i> sialidasa (PM ID: 16239725); se ha mostrado unión al ácido poligalacturónico para un miembro de <i>Yersinia</i> (PMID: 17292916); se ha mostrado unión a LacNAc (-D-galactosil-1,4-D-N-acetilglucosamina) para una N-acetilglucosaminidasa del <i>Clostridium perfringens</i> (PM ID: 16990278).	5
35	Módulos de aprox. 130 residuos. Un módulo que está conservado en tres enzimas degradadoras de xilano en <i>Cellvibrio</i> se une a xilano y la interacción es dependiente del calcio, mientras que un módulo de mananasa de <i>Cellvibrio</i> se une a mananos solubles decorados y mannooligosacáridos. Un módulo de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> galactan 1,3-galactosidasa se une a -galactano.	4
36	Módulos de aprox. 130 residuos. Un módulo que está conservado en tres enzimas degradadoras de xilano en <i>Cellvibrio</i> se une a xilano y la interacción es dependiente del calcio, mientras que un módulo de mananasa de <i>Cellvibrio</i> se une a mananos solubles decorados y mannooligosacáridos. Un módulo de	1

000085

Familia CBM	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en C. <i>phytoferme ntans</i>
	Phanerochaete chrysosporium galactan 1,3-galactosidasa se une a -galactano.	
41	Módulos de aprox. 100 residuos hallados en principalmente pululanasa bacterianas. Se ha demostrado que el módulo N-terminal de <i>Thermotoga maritima</i> Pull3 se une a -glucanos amilosa, amilopectina, pululano, y fragmentos de oligosacáridos derivados de estos polisacáridos.	I1
46	Módulos de aprox. 100 residuos, hallados en el extremo C-terminal de varias GH5 celulasas. La función de unión a celulosa se demuestra en un caso.	1
48	Módulos de aprox. 100 residuos con función de unión a glicógeno, anexo a los módulos GH13. También se hallan en la subunidad beta (unión a glicógeno) de proteína quinasas activadas por AMP (AMPK)	2
50	Módulos de aprox. 50 residuos que se hallan unidos a varias enzimas de las familias GH18, GH19, GH23, GH24, GH25 y GH73, es decir, enzimas que se escinden en quitina o peptidoglicano. La unión a chitopentaosa se demostró en el caso de quitinasa A de <i>Pteris ryukyuensis</i> [Ohnuma T et al.; PMID: 18083709]. Los módulos de CBM50 también se hallan en una multitud de otras enzimas que se dirigen a los peptidoglicanos tales como peptidasas y	4

000066

Familia CBM	Actividades conocidas	Número de dominios predichos en C. <i>phytoferme ntans</i>
	amidasas.	

[00134] En algunas formas de realización, las enzimas que degradan los polisacáridos se usan para el pretratamiento de la biomasa y pueden incluir las enzimas que degradan celulosa, a saber, celulasas. Los ejemplos de algunas celulasas incluyen endocelulasas (EC 3,2,1,4) y exo-celulasas (EC 3,2,1,91), e hidrolizan enlaces beta-1,4-glucosídicos.

[00135] Los ejemplos de endo-celulasas predichas en *C. phytofermentans* que se pueden usar en el pretratamiento de la biomasa incluyen genes de la familia GH5, tales como, Cphy3368; Cfill163, y Cphy2058; la familia GH8, tales como Cphy3207; y la familia GH9, tales como Cphy3367. Los ejemplos de exocelulasas en *C. phytofermentans* que se pueden usar en el pretratamiento de la biomasa incluyen genes de la familia GH48, tales como Cphy3368. Algunas exo-celulasas hidrolizan polisacáridos para producir 2 a 4 unidades de oligosacáridos de glucosa, que producen disacáridos de celodextrinas (celobiosa), trisacáridos (celotriosa), o tetrasacáridos (celotetraosa). Los miembros de las familias GH5, GH9 y GH48 pueden tener actividades de exo- y endo-celulasa.

[00136] En algunas formas de realización, las enzimas que degradan polisacáridos se usan para el pretratamiento de la biomasa y pueden incluir enzimas que tienen la capacidad de degradar hemicelulosa, a saber, hemicelulasas (Leschina, S. B. en Handbook on Clostridia (ed Durre, P.) (CRC Press, Boca Raton, 2005)). La hemicelulosa puede ser un componente principal de la biomasa de planta y puede contener una mezcla de pentosas y hexosas, por ejemplo, D-xilopiranosas, L-arabinofuranosas, D-manopiranosas, D-glucopiranosas, D-galactopiranosas, ácido D-glucopiranosilurónico y otros azúcares (Aspinall, G. O. The Biochemistry of Plants 473, 1980; Han, J. S. & Rowell, J. S. en

000067

Paper and composites from agro-based resources 83, 1997). En ciertas formas de realización, las hemicelulasas predichas identificadas en el *C. phytofermentans* que se pueden usar en el pretratamiento de la biomasa incluyen enzimas activas en el esqueleto lineal de la hemicelulosa, por ejemplo, endo-beta-1,4-D-xilanasas (EC 3,2,1,8), tales como los miembros de la familia GH5, GH10, GH11, y GH43; 1,4-beta-D-xilósido xilohidrolasa (EC 3,2,1,37), tales como los miembros de la familia GH30, GH43, y GH3; y beta-mananasa (EC 3,2,1,78), tales como los miembros de la familia GH26.

[00137] En otras formas de realización, las hemicelulasas predichas identificadas en el *C. phytofermentans* que se pueden usar en el pretratamiento de la biomasa incluyen enzimas activas en los grupos laterales y sustituyentes de hemicelulosa, por ejemplo, alfa-L-arabinofuranosidasa (EC 3,2,1,55), tales como los miembros de la familia GH3, GH43, y GH51; alfa-xilosidasa, tales como los miembros de la familia GH31; alfafucosidasa (EC 3,2,1,51), tales como los miembros de la familia GH95 y GH29; galactosidasa, tales como los miembros de la familia GH1, GH2, GH4, GH36, GH43; y acetil-xilano esterasa (EC 3,1,1,72), tales como CE2 y CE4.

[00138] En algunas formas de realización, las enzimas que degradan polisacáridos se usan para el pretratamiento de la biomasa y pueden incluir enzimas que tienen la capacidad de degradar pectina, a saber, pectinasas. En las paredes celulares de la planta, la red de celulosa entrecruzada se puede incrustar en una matriz de péctinas que se pueden unir de modo covalente a los xiloglucanos y ciertas proteínas estructurales. La pectina puede comprender homogalacturonano (HG) o ramnogalacturonano (RH).

[00139] En otras formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende pectinasas identificadas en *C. phytofermentans* que pueden hidrolizar HG. La HG puede estar compuesta de unidades de ácido D-galacturónico (D-galA) que se pueden acetilar y metilar. Las enzimas que hidrolizan HG pueden incluir, por ejemplo, 1,4-alfa-D galacturonan liasa (EC 4,2,2,2), tales como los miembros de la familia PL1, PL9, y PL11; glucuronil

000066

hidrolasa, tales como miembros de la familia GH88 y GH105; pectina acetilesterasa tales como los miembros de la familia CE12; y pectina metilesterasa, tales como los miembros de la familia CE8.

[00140] En aun más formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende pectinasas identificadas en *C. phytofermentans* que pueden hidrolizar RH. RH puede ser un esqueleto compuesto de residuos alternados de 1,2-alfa-L-ramnosa e (L-Rha) y ácido 1,4-alfa-D-galacturónico (Lau, J. M., McNeil M., Darvill A. G. & Albersheim P. Structure of the backbone of ramnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate research* 137, 111(1985)). Los residuos de ramnosa del esqueleto pueden tener galactano, arabinano o arabinogalactano unido a C4 como cadenas laterales. Las enzimas que hidrolizan HG pueden incluir, por ejemplo, endoramnogalacturonasa, tales como los miembros de la familia GH28; y ramnogalacturonano liasa, tales como los miembros de la familia PL1 1.

[00141] En algunas formas de realización, el pretratamiento de la biomasa incluye las enzimas que pueden hidrolizar almidón. *C. phytofermentans* puede degradar almidón y quitina (Warnick, T. A., Methe, B. A. & Leschina, S. B. *Clostridium phytofermentans* sp. nov., un mesófilo celulolítico del suelo forestal. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1155-1160 (2002); Leschina, S. B. en *Handbook on Clostridia* (ed Dürre, P.) (CRC Press, Boca Raton, 2005); Reguera, G. & Leschina, S. B. Chitin degradation by cellulolytic anaerobes and facultative aerobes from soils y sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 367-374 (2001)). Las enzimas que hidrolizan almidón incluyen alfa-amilasa, glucoamilasa, beta-amilasa, exo-alfa-1,4-glucanasa, y pululanasa. Los ejemplos de enzimas predichas identificadas en *C. phytofermentans* involucradas en la hidrólisis del almidón incluyen los miembros de la familia GH13.

[00142] En más formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende hidrolasas que pueden incluir las enzimas que hidrolizan la quitina. Los ejemplos de enzimas que pueden

000069

hidrolizar quitina incluyen los miembros de la familia GH18 y GH19. En aun más formas de realización, las hidrolasas pueden incluir enzimas que hidrolizan liquen, a saber, liquenasa, por ejemplo, los miembros de la familia GH16, tales como Cphy3388.

[00143] En algunas formas de realización, el pretratamiento de la biomasa comprende hidrolasas que son proteínas que contienen los miembros de la familia módulos de unión a carbohidratos (CBM). Sin estar ligados por teoría alguna, los dominios CBM pueden actuar para localizar complejos enzimáticos en sustratos particulares. Los ejemplos de familias de CBM predichas identificadas en *C. phytofermentans* que pueden unir celulosa incluyen los miembros de la familia CBM2, CBM3, CBM4, CBM6 y CBM46. Los ejemplos de familias de CBM predichas identificadas en *C. phytofermentans* que pueden unir xilano incluyen los miembros de la familia CBM2, CBM4, CBM6, CBM13, CBM22, CBM35, y CBM36. En más formas de realización, los miembros de la familia del dominio CBM pueden actuar para estabilizar un complejo enzimático.

[00144] En algunas formas de realización, después del pretratamiento por alguno de los métodos anteriores la materia prima contiene celulosa, hemicelulosa, oligómeros solubles, azúcares simples, ligninas, sustancias volátiles y cenizas. Los parámetros del pretratamiento se pueden cambiar para variar la concentración de los componentes de la materia prima pretratada. Por ejemplo, en algunas formas de realización se elige un pretratamiento de modo que la concentración de los oligómeros solubles sea alta y la concentración de las ligninas baja después del pretratamiento. Los ejemplos de parámetros del pretratamiento incluyen temperatura, presión, tiempo, y pH.

[00145] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian para variar la concentración de los componentes de materia prima pretratada de modo que la concentración de los componentes de la materia prima pretratada es óptima para la fermentación con un microbio tal como a microbio Q.

[00146] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de celulosa accesible en la materia prima pretratada es 1%, 5%, 10%,

000070

12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 19%, 20%, 30%, 40% o 50%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de celulosa accesible en la materia prima pretratada sea 5% a 30%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de celulosa accesible en la materia prima pretratada sea 10% a 20%.

[00147] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de hemicelulosa en materia prima pretratada sea 1%, 5%, 10%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 40% o 50%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de hemicelulosa en materia prima pretratada sea 5% a 40%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de hemicelulosa en materia prima pretratada sea 10% a 30%.

[00148] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de oligómeros solubles en materia prima pretratada sea 1%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%. Los ejemplos de oligómeros solubles incluyen, pero sin limitación, celobiosa y xilobiosa. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de oligómeros solubles en materia prima pretratada sea 30% a 90%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de oligómeros solubles en materia prima pretratada sea 45% a 80%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de oligómeros solubles en materia prima pretratada sea 45% a 80% y los oligómeros solubles son principalmente celobiosa y xilobiosa.

[00149] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de azúcares simples en materia prima pretratada sea 1%, 5%, 10%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 19%, 20%, 30%, 40% o 50%. En

000071

algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de azúcares simples en materia prima pretratada sea 0% a 20%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de azúcares simples en materia prima pretratada sea 0% a 5%. Los ejemplos de azúcares simples incluyen, pero sin limitación, monómeros y dímeros de C5 y C6.

[00150] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de ligninas en materia prima pretratada sea 1%, 5%, 10%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 19%, 20%, 30%, 40% o 50%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de ligninas en materia prima pretratada sea 0% a 20%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de ligninas en materia prima pretratada sea 0% a 5%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de se cambian de modo que la concentración de lignina en materia prima pretratada sea menor de 1% a 2%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo de minimizar la concentración de fenólicos.

[00151] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de furfural y ligninas de peso molecular bajo en materia prima pretratada sea menor de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1%. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de furfural y ligninas de peso molecular bajo en materia prima pretratada sea menor de 1% a 2%.

[00152] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian de modo que la concentración de celulosa accesible sea 10% a 20%, la concentración de hemicelulosa sea 10% a 30%, la concentración de oligómeros solubles sea 45% a 80%, la concentración de azúcares simples sea 0% a 5%, y la concentración de ligninas sea 0% a 5% y la

000072

concentración de furfural y ligninas de peso molecular bajo en materia prima pretratada sea menor de 1% a 2%.

[00153] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian para obtener una concentración alta de hemicelulosa y una concentración baja de ligninas. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian para obtener una concentración alta de hemicelulosa y una concentración baja de ligninas de modo que la concentración de los componentes de la materia prima pretratada sea óptima para la fermentación con un microbio tal como un microbio Q.

[00154] En algunas formas de realización, una materia prima se pretrata a un pH de 8 a 12 para obtener una concentración alta de hemicelulosa y una concentración baja de ligninas en la materia prima pretratada. En algunas formas de realización, a materia prima se pretrata a un pH de 8 a 12 para obtener una concentración alta de hemicelulosa y una concentración baja de ligninas de modo que la concentración de los componentes de la materia prima pretratada sea óptima para la fermentación con un microbio tal como a microbio Q. Otros parámetros tales como temperatura y tiempo se pueden cambiar para obtener los resultados deseados. Por ejemplo, en algunas formas de realización una materia prima se pretrata a un pH de 8 a 12 at a temperatura baja durante un tiempo largo para obtener una concentración alta de hemicelulosa y una concentración baja de ligninas en la materia prima pretratada.

[00155] En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian para obtener la cantidad máxima de carbohidratos constituyentes C5. En algunas formas de realización, los parámetros del pretratamiento se cambian para que la cristalinidad de los componentes en la materia prima no sea mayor de las cantidades naturales.

[00156] En algunas formas de realización, la materia prima se trata con compuestos alcalinos tales como NaOH, KOH, y Ca(OH)_2 en condiciones variadas para obtener la concentración deseada de los componentes en la materia prima pretratada. Por ejemplo, en algunas formas de realización la materia prima se trata con compuestos alcalinos tales como NaOH, KOH, y Ca(OH)_2 en

000073

condiciones variadas de modo que la concentración de hemicelulosa sea alta y la concentración de ligninas sea baja después del tratamiento. Los tratamientos alcalinos se pueden realizar en combinación con agentes tales como peróxido de hidrógeno o urea.

[00157] En algunas formas de realización, la materia prima se trata con compuestos alcalinos tales como NaOH, KOH, y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bajo variación de modo que la concentración de los componentes de la materia prima pretratada sea óptima para fermentación con un microbio tal como a microbio Q. Los tratamientos alcalinos se pueden realizar en combinación con agentes tales como peróxido de hidrógeno o urea.

[00158] En algunas formas de realización, la materia prima se trata con NaOH modo que la concentración de los componentes de la materia prima pretratada sea óptima para la fermentación con el microbio Q. El pretratamiento con NaOH se puede realizar en combinación con agentes tales como peróxido de hidrógeno o urea. El pretratamiento con NaOH, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar a 60 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C, 120 °C, 140 °C, 160 °C o 180 °C. El pretratamiento con NaOH, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar durante 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50 minutos o 1, 5, 7, 9, 10, 11, 15, 20, 25, 30, 35 o 36 horas.

[00159] En algunas formas de realización, la materia prima se trata con KOH modo que la concentración de los componentes de la materia prima pretratada sea óptima para la fermentación con el microbio Q. En una forma de realización un pretratamiento con KOH se puede realizar en combinación con agentes tales como peróxido de hidrógeno o urea. En otra forma de realización un pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar a aproximadamente 60 °C a 180 °C. En otra forma de realización un pretratamiento con KOH, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar a aproximadamente 60 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C, 120 °C, 140 °C, 160 °C o 180 °C. En una forma de realización un pretratamiento con KOH, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar durante aproximadamente 1-60 minutos. En otra forma de realización un pretratamiento con KOH,

000074

solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar durante aproximadamente 1-96 horas. En otra forma de realización un pretratamiento con KOH, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar durante aproximadamente 10, 15, 20, 30, 35, 40, o 50 minutos o aproximadamente 1, 5, 7, 9, 10, 11, 15, 20, 25, 30, 35, 36, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 96 horas.

[00160] En una forma de realización, la materia prima se trata con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ modo que la concentración de los componentes de la materia prima pretratada sea óptima para la fermentación con el microbio Q. En otra forma de realización el pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se puede realizar en combinación con agentes tales como peróxido de hidrógeno o urea. En otra forma de realización el pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar a aproximadamente 60 °C a 180 °C. En otra forma de realización, el pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar a aproximadamente 60 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C, 120 °C, 140 °C, 160 °C o 180 °C. En una forma de realización a $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pretratamiento, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar durante aproximadamente 1- 60 minutos. En otra forma de realización un pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar durante aproximadamente 1-96 horas. En otra forma de realización un pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o urea, se puede realizar durante aproximadamente 10, 15, 20, 30, 35, 40, o 50 minutos o aproximadamente 1, 5, 7, 9, 10, 11, 15, 20, 25, 30, 35, 36, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 96 horas.

Recuperación de etanol u otros productos finales fermentativos

[00161] En otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para la recuperación de los productos finales fermentativos, tales como un alcohol (por ejemplo etanol, propanol, metanol, butanol, etc.) otro biocombustible o producto químico. En una forma de realización, el caldo se recolectará en algún momento durante la fermentación, y se recuperarán el producto o los productos finales fermentativos. El caldo con etanol recuperado

000075

incluirla tanto etanol como impurezas. Las impurezas incluyen materiales tales como agua, cuerpos celulares, desechos celulares, sustrato de carbón en exceso, sustrato de nitrógeno en exceso, otros nutrientes restantes, metabolitos no etanol, y otros componentes del medio o componentes del medio digeridos. Durante el curso de procesamiento del caldo, el caldo se puede calentar y/o hacer reaccionar con varios reactivos, que producen impurezas adicionales en el caldo.

[00162] En una forma de realización, las etapas de procesamiento para recuperar etanol con frecuencia incluye varias etapas de separación, que incluyen, por ejemplo, destilación de un material de alta concentración de etanol a partir de un material que contiene etanol menos puro. En otras formas de realización, el material de alta concentración de etanol se puede concentrar adicionalmente para obtener una concentración de etanol muy alta, tal como 98% o 99% o 99,5% (peso) o aun mayor. Otras etapas de separación, tales como filtración, centrifugación, extracción, adsorción, etc. también puede ser parte de algunos procesos de recuperación para etanol como producto o biocombustible, u otros biocombustibles o productos químicos.

[00163] En una forma de realización un proceso se puede llevar a escala para producir biocombustibles comercialmente útiles. En otra forma de realización el microbio Q se usa para producir un alcohol, por ejemplo, etanol, butanol, propanol, metanol, o un combustible tal como hidrocarburos, compuestos de hidrógeno, metano, e hidroxil. En otra forma de realización el microbio Q se usa para producir un compuesto carbonilo tal como un aldehído o cetona (por ejemplo acetona, formaldehído, 1-propanal, etc.), un ácido orgánico, un derivado de un ácido orgánico tal como un éster (por ejemplo, éster de cera, glicérido, etc.), 1, 2-propanodiol, 1, 3-propanodiol, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido succínico, ácido pirúvico, o una enzima tal como una celulasa, polisacarasa, lipasas, proteasa, ligninasa, y hemicelulasa.

[00164] En una forma de realización, se describe una fermentación discontinua alimentada para la producción del producto final fermentativo. En otra forma de realización, se describe una

000076

fermentación discontinua alimentada para la producción de etanol. El cultivo discontinuo alimentado es una clase de proceso microbiano en que los componentes del medio, tales como sustrato de carbono, sustrato de nitrógeno, vitaminas, minerales, factores de crecimiento, cofactores, etc. o biocatalizadores (que incluyen, por ejemplo, organismos frescos, enzimas preparadas por el microbio Q en una fermentación separada, enzimas preparadas por otros organismos, o una combinación de estos) se suministran al fermentador durante el cultivo, pero no se recolecta el caldo del cultivo en el mismo tiempo y volumen. Para aumentar la bioconversión a partir de sustratos soluble e insolubles, tales como los que se pueden usar en la producción de biocombustibles, se puede utilizar varias estrategias de alimentación para mejorar los rendimientos y/o la productividad. Esta técnica se puede usar para obtener una densidad celular alta dentro de un tiempo dado. También se puede usar para mantener un buen aporte de nutrientes y sustratos para el proceso de bioconversión. También se puede usar para obtener título y productividad mayores de los productos deseables que de otro se pueden obtener más lentamente o no obtener.

[00165] En otra forma de realización, la estrategia de alimentación equilibra la tasa de producción celular y la tasa de hidrólisis de la biomasa materia prima con la producción de etanol. Se añaden componentes del medio en cantidades suficientes para obtener producción celular sostenida y la hidrólisis de la biomasa materia prima con producción de etanol. En algunas formas de realización, se añaden sustrato carbono y nitrógeno en cantidades suficientes para obtener la producción sostenida de células frescas y enzimas hidrolíticas para la conversión de los polisacáridos en azúcares inferiores así como la conversión sostenida de los azúcares inferiores en células frescas y etanol.

[00166] En otra forma de realización, el nivel de un componente del medio se mantiene en un nivel deseado por la adición de medio adicional a medida que el componente se consume o es captado por el organismo. Los ejemplos de componentes del medio incluyeron, pero sin limitación, sustrato de carbono, sustrato de nitrógeno, vitaminas, minerales, factores de crecimiento, cofactores, y

000077

biocatalizadores. El componente del medio se puede añadir en forma continua o en intervalos regulares o irregulares. En algunas formas de realización, el componente del medio adicional se añade antes de la reducción completa del componente del medio en el medio. En algunas formas de realización, la reducción completa se puede usar efectivamente, por ejemplo para iniciar vías metabólicas diferentes, simplificar operaciones corrientes abajo, o también por otras razones. En algunas formas de realización, el nivel del componente del medio se deja variar en aproximadamente 10% alrededor de un punto medio, en algunas formas de realización, se deja variar en aproximadamente 30% alrededor de un punto medio, y en algunas formas de realización, se deja variar en aproximadamente 60% alrededor de un punto medio. La operación en algunas formas de realización mantendrá el nivel del componente del medio al dejar que el componente del medio se reduzca a un nivel apropiado, seguido por el aumento del nivel del componente del medio a otro nivel apropiado. En una forma de realización, un componente del medio, tal como vitamina, se añade en dos puntos de tiempo diferentes durante el proceso de fermentación. Por ejemplo, una mitad de la cantidad total de vitamina se añade en el comienzo de la fermentación y la otra mitad en el punto medio de la fermentación.

[00167] En otra forma de realización, el nivel de nitrógeno se mantiene en un nivel deseado por la adición de materiales adicionales que contienen nitrógeno a medida que el nitrógeno se consume o es captado por el organismo. Los materiales que contienen nitrógeno se pueden añadir en forma continua o en intervalos regulares o irregulares. En algunas formas de realización, los materiales adicionales que contienen nitrógeno se añaden antes de la reducción completa del nitrógeno disponible en el medio. En algunas formas de realización, la reducción completa se puede usar efectivamente, por ejemplo para iniciar vías metabólicas diferentes, simplificar operaciones corrientes abajo, o también por otras razones. En algunas formas de realización, el nivel de nitrógeno (medido por los gramos de nitrógeno real en los materiales que contienen nitrógeno por litro de caldo) se deja variar en aproximadamente 10% alrededor

000078

de un punto medio, en algunas formas de realización, se deja variar en aproximadamente 30% alrededor de un punto medio, y en algunas formas de realización, se deja variar en 60% o más alrededor de un punto medio. La operación en algunas formas de realización mantendrá el nivel de nitrógeno al dejar que el nitrógeno se reduzca a un nivel apropiado, seguido por el aumento del nivel de nitrógeno a otro nivel apropiado. Los niveles de nitrógeno útiles incluyen niveles de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 g/L. En una forma de realización, también se pueden emplear en forma útil niveles de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 g/L. En otra forma de realización se usan niveles, tales como aproximadamente 0,5, 0,1 g/L o aun menores, y niveles superiores, tales como aproximadamente 20, 30 g/L o incluso más altos. En otra forma de realización un nivel de nitrógeno útil es aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 g/L. tales niveles de nitrógeno pueden facilitar la producción de células frescas y de enzimas hidrolíticas. El aumento del nivel de nitrógeno puede producir niveles de enzimas más altos y/o mayor producción de células y originar productividad superior de los productos deseados. El nitrógeno se puede suministrar como materiales simples que contienen nitrógeno, tales como compuestos de amonio (por ejemplo sulfato de amonio, hidróxido de amonio, amoníaco, nitrato de amonio, o cualquier otro compuesto o mezcla que contiene un resto de amonio), compuestos de nitrato o nitrito (por ejemplo potasio, sodio, amonio, calcio, u otro compuesto o mezcla que contiene un resto nitrato o nitrito), o como materiales más complejos que contienen nitrógeno, tales como aminoácidos, proteínas, proteína hidrolizada, extracto de levadura, levadura de cerveza seca, hidrolizados de levadura, proteína de soja, proteína de soja hidrolizada, productos de fermentación, y procesados y polvo de maceración de maíz o materia vegetal rica en proteína no procesada o animal, que incluye los derivados de porotos, semillas, soja, legumbres, nueces, leche, cerdo, ganado de vacuno, mamífero, pescado, así como otras partes de plantas y

000079

otros tipos de animales. Los materiales que contienen nitrógeno útiles en varias formas de realización también incluyen materiales que contiene un material que contiene nitrógeno, que incluyen, pero sin limitación mezclas de materiales simples o más complejos que contiene nitrógeno mezclado con una fuente de carbono, otros materiales que contienen nitrógeno, u otros nutrientes o no nutrientes, y material de planta tratado con AFEX.

En otra forma de realización, el nivel de carbón se mantiene en un nivel deseado por la adición de los compuestos de azúcar o material que contiene compuestos de azúcar ("Material que contiene azúcar") a medida que se consume azúcar o es captado por el organismo. El material que contiene azúcar se puede añadir en forma continua o en intervalos regulares o irregulares. En algunas formas de realización, el material que contiene azúcar adicional se añade antes de la reducción completa de los compuestos de azúcar disponibles en el medio. En algunas formas de realización, la reducción completa se puede usar efectivamente, por ejemplo para iniciar vías metabólicas diferentes, simplificar operaciones corrientes abajo, o también por otras razones. En algunas formas de realización, el nivel de carbono (medido por los gramos de azúcar presentes en el material que contiene azúcar por litro de caldo) se deja variar en aproximadamente 10% alrededor de un punto medio, en algunas formas de realización, se deja variar en aproximadamente 30% alrededor de un punto medio, y en algunas formas de realización, se deja variar en 60% o más alrededor de un punto medio. La operación en algunas formas de realización mantendrá el nivel de carbono al dejar que el carbono se reduzca a un nivel apropiado, seguido por el aumento del nivel de carbono a otro nivel apropiado. En algunas formas de realización, el nivel de carbono se puede mantener a un nivel de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 g/L. Sin embargo, los niveles de aproximadamente 30 a aproximadamente 100 g/L también se pueden emplear útilmente así como los niveles de aproximadamente 60 a aproximadamente 80 g/L. En una forma de realización, el nivel de carbono se mantiene at mayor de 25 g/L para una porción del

000080

cultivo. En otra forma de realización, el nivel de carbono se mantiene a aproximadamente 5 g/L, 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L, 10 g/L, 11 g/L, 12 g/L, 13 g/L, 14 g/L, 15 g/L, 16 g/L, 17 g/L, 18 g/L, 19 g/L, 20 g/L, 21 g/L, 22 g/L, 23 g/L, 24 g/L, 25 g/L, 26 g/L, 27 g/L, 28 g/L, 29 g/L, 30 g/L, 31 g/L, 32 g/L, 33 g/L, 34 g/L, 35 g/L, 36 g/L, 37 g/L, 38 g/L, 39 g/L, 40 g/L, 41 g/L, 42 g/L, 43 g/L, 44 g/L, 45 g/L, 46 g/L, 47 g/L, 48 g/L, 49 g/L, 50 g/L, 51 g/L, 52 g/L, 53 g/L, 54 g/L, 55 g/L, 56 g/L, 57 g/L, 58 g/L, 59 g/L, 60 g/L, 61 g/L, 62 g/L, 63 g/L, 64 g/L, 65 g/L, 66 g/L, 67 g/L, 68 g/L, 69 g/L, 70 g/L, 71 g/L, 72 g/L, 73 g/L, 74 g/L, 75 g/L, 76 g/L, 77 g/L, 78 g/L, 79 g/L, 80 g/L, 81 g/L, 82 g/L, 83 g/L, 84 g/L, 85 g/L, 86 g/L, 87 g/L, 88 g/L, 89 g/L, 90 g/L, 91 g/L, 92 g/L, 93 g/L, 94 g/L, 95 g/L, 96 g/L, 97 g/L, 98 g/L, 99 g/L, 100 g/L, 101 g/L, 102 g/L, 103 g/L, 104 g/L, 105 g/L, 106 g/L, 107 g/L, 108 g/L, 109 g/L, 110 g/L, 111 g/L, 112 g/L, 113 g/L, 114 g/L, 115 g/L, 116 g/L, 117 g/L, 118 g/L, 119 g/L, 120 g/L, 121 g/L, 122 g/L, 123 g/L, 124 g/L, 125 g/L, 126 g/L, 127 g/L, 128 g/L, 129 g/L, 130 g/L, 131 g/L, 132 g/L, 133 g/L, 134 g/L, 135 g/L, 136 g/L, 137 g/L, 138 g/L, 139 g/L, 140 g/L, 141 g/L, 142 g/L, 143 g/L, 144 g/L, 145 g/L, 146 g/L, 147 g/L, 148 g/L, 149 g/L, o 150 g/L.

[00168] El sustrato de carbono, como el sustrato de nitrógeno, es necesarios para la producción celular y la producción de enzima, pero a diferencia del sustrato de nitrógeno, actúa como la materia prima para el etanol. Con frecuencia, más sustrato de carbono puede llevar a mayor producción de etanol.

En otra forma de realización, puede ser ventajoso operar con el nivel de carbono y el nivel de nitrógeno relacionados entre sí durante al menos una porción del tiempo de fermentación. En una forma de realización, la relación de carbono a nitrógeno se mantiene dentro de un rango de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 10:1. En otra forma de realización, la relación de carbono a nitrógeno se mantiene de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 10:1 o con más preferencia de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 10:1. En otra forma de realización la relación de carbono a nitrógeno aproximadamente 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1,

000081

16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, o 1:1.

[00169] El mantenimiento de la relación de carbono y relación de nitrógeno dentro de rangos particulares puede producir beneficios a la operación tal como la tasa de hidrólisis del sustrato de carbono, que depende de la cantidad de sustrato de carbono y la cantidad y actividad de las enzimas presentes, que se equilibran con la tasa de producción de etanol. Tal equilibrio puede ser importante, por ejemplo, debido a la posibilidad de inhibición de la actividad celular debido a la presencia de una concentración alta de sacáridos de peso molecular bajo, y la necesidad de mantener la actividad hidrolítica enzimática a lo largo del período en que están presentes los sacáridos de cadena más larga y disponibles para la hidrólisis. El equilibrio de la relación de carbono o nitrógeno puede facilitar, por ejemplo, la producción sostenida de estas enzimas tal como para reemplazar las que han perdido actividad.

[00170] En otra forma de realización, la cantidad y/o tiempo de adición de carbono, nitrógeno, u otro componente del medio se pueden relacionar con las mediciones tomadas durante la fermentación. Por ejemplo, se puede medir la cantidad de monosacáridos presentes, la cantidad de polisacárido insolubles presentes, la actividad de polisacarasa, la cantidad de etanol presente, la cantidad de material celular (por ejemplo, volumen celular empaquetado, peso seco celular, etc.) y/o la cantidad de nitrógeno (por ejemplo, nitrato, nitrito, amoníaco, urea, proteínas, aminoácidos, etc.) presentes. Se puede considerar la concentración de la especie particular, la cantidad total de la especie presente en el fermentador, la cantidad de horas que ha estado corriendo la fermentación y el volumen del fermentador. En varias formas de realización, estas mediciones se pueden comparar entre sí y/o se pueden comparar con mediciones previas del mismo parámetro previamente tomado de la misma fermentación u otra fermentación. Los ajustes a la cantidad de un componente del medio se pueden obtener tal como por el cambio de la velocidad de flujo de una corriente que contiene este componente o por el cambio de la frecuencia de las adiciones para este componente. En

000082

una forma de realización, la cantidad de polisacárido se puede reducir cuando el nivel de monosacáridos aumenta más rápidamente que los aumentos del nivel de etanol. En otra forma de realización, la cantidad de polisacárido puede aumentar cuando la cantidad o el nivel de monosacáridos disminuye mientras que la producción de etanol permanece aproximadamente constante. En otra forma de realización, la cantidad de nitrógeno puede aumentar cuando el nivel de monosacáridos de monosacáridos aumenta más rápido que el nivel de células viables. La cantidad de polisacárido también puede aumentar cuando la producción celular aumenta más rápido que la producción de etanol. En otra forma de realización la cantidad de nitrógeno puede aumentar cuando disminuye el nivel de actividad enzimática.

[00171] En otra forma de realización, se pueden usar efectivamente niveles diferentes o la reducción completa de un componente del medio, por ejemplo para iniciar diferentes vías metabólicas o cambiar el rendimiento de los diferentes productos del proceso de fermentación. Por ejemplo, se pueden usar efectivamente niveles diferentes o la reducción completa de un componente del medio para aumentar el rendimiento y la productividad del etanol, para mejorar la utilización de carbono (por ejemplo, g de etanol/g de azúcar fermentado) y reducir la producción de ácido (por ejemplo, g de ácido/g de etanol y g de ácido/g de azúcar fermentado). En algunas formas de realización, se pueden usar efectivamente niveles diferentes o la reducción completa de un componente del medio para aumentar el rendimiento y la productividad del etanol, mejorar la utilización de carbono (por ejemplo, g etanol/g de azúcar fermentado) y reducir la producción de ácido (por ejemplo, g de ácido/g etanol y g de ácido/g de azúcar fermentado). En algunas formas de realización, se pueden usar efectivamente niveles diferentes o la reducción completa de carbono para aumentar el rendimiento y la productividad del etanol, mejorar la utilización de carbono (por ejemplo, g etanol/g de azúcar fermentado) y reducir la producción de ácido (por ejemplo, g de ácido/g etanol y g de ácido/g de azúcar fermentado). En algunas formas de realización, la relación del nivel de carbono al nivel de nitrógeno durante al menos una

000083

porción del tiempo de fermentación se puede usar efectivamente para aumentar el rendimiento y la productividad del etanol, mejorar la utilización de carbono (*por ejemplo, g etanol/g de azúcar fermentado*) y reducir la producción de ácido (*por ejemplo, g de ácido/g etanol y g de ácido/g de azúcar fermentado*).

[00172] En otra forma de realización, se puede emplear una operación discontinua alimentada, donde los componentes del medio y/o las células frescas se añaden durante la fermentación sin extraer una porción del caldo para la recolección antes del fin de la fermentación. En una forma de realización un proceso discontinuo alimentado se base en la alimentación de un medio de nutrientes limitantes del crecimiento a un cultivo de microorganismos. En una forma de realización el medio de alimentación está muy concentrado para evitar la dilución del biorreactor. En otra forma de realización la adición controlada del nutriente afecta directamente la tasa de crecimiento del cultivo y evita el metabolismo excesivo tal como la formación de metabolitos secundarios. En una forma de realización el nutriente limitante del crecimiento es una fuente de nitrógeno o una fuente de sacáridos.

[00173] En otra forma de realización, una operación discontinua alimentada modificada se puede emplear cuando se recolecta una porción del caldo en tiempos diferenciados. Tal operación discontinua alimentada modificada se puede emplear ventajosamente cuando. Por ejemplo, se emplean ciclos de fermentación muy largos. En condiciones de fermentación muy largas, aumenta el volumen de líquido dentro del fermentador. A fin de operar durante periodos muy largos, puede ser ventajoso vaciar parcialmente el fermentador, por ejemplo, cuando el volumen casi completo. Una recolección parcial del caldo seguida por la suplementación con ingredientes del medio fresco, tal como con una operación discontinua alimentada, puede mejorar la utilización del fermentador y puede facilitar los rendimientos más altos de la planta debido a una reducción en el tiempo de tareas tales como limpieza y esterilización del equipamiento. Cuando se emplea el tipo de operación "recolección parcial", la fermentación se puede sembrar con el caldo que permanece en el

000084

fermentador, o con inóculo fresco, o con una mezcla de los dos. Además, el caldo se puede reciclar para usar como inóculo fresco solo o en combinación con otro inóculo fresco.

[00174] En algunas formas de realización, se puede emplear una operación discontinua alimentada, donde los componentes del medio y/o las células frescas se añaden durante la fermentación cuando la actividad hidrolítica del caldo ha disminuido. En algunas formas de realización, los componentes del medio y/o las células frescas se añaden durante la fermentación cuando la actividad hidrolítica del caldo ha disminuido aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%.

[00175] Si bien el microbio Q se puede usar en ciclos de fermentación largos o cortos, es particularmente bien adecuado para los ciclos de fermentación largos y para usar en las fermentaciones con operaciones de recolección parcial, auto-siembra, y reciclado del caldo debido a las condiciones anaeróbicas de la fermentación, la presencia de alcohol, la velocidad de crecimiento rápido del organismo, y, en algunas formas de realización, el uso de un sustrato de carbono sólido, que produzca o no concentraciones de azúcar bajas en el caldo.

[00176] En otra forma de realización, se realiza una fermentación para producir etanol por el cultivo de una cepa del microbio Q en un medio que tiene una concentración alta de una o más fuentes de carbono y/o aumentar el cultivo con la adición de células frescas del microbio Q durante el curso de la fermentación. La producción de etanol resultante puede ser hasta 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, y en algunos casos hasta 10 veces y más en productividad volumétrica que un proceso discontinuo y obtener una eficiencia de conversión de carbono que se aproxima al máximo teórico. El máximo teórico puede variar con el sustrato y producto. Por ejemplo, la eficiencia de máxima generalmente aceptada para la conversión de glucosa a etanol es 0,51 g etanol/g de glucosa. En una forma de realización el microbio Q puede producir aproximadamente 40-100% de un rendimiento máximo teórico de etanol. En otra forma de realización, el microbio Q puede producir hasta aproximadamente

000085

40% del rendimiento máximo teórico de etanol. En otra forma de realización, el microbio Q puede producir hasta aproximadamente 50% del rendimiento máximo teórico de etanol. En otra forma de realización, el microbio Q puede producir aproximadamente 70% del rendimiento máximo teórico de etanol. En otra forma de realización, el microbio Q puede producir aproximadamente 90% del rendimiento máximo teórico de etanol. En otra forma de realización, el microbio Q puede producir aproximadamente 95% del rendimiento máximo teórico de etanol. En otra forma de realización, el microbio Q puede producir aproximadamente 95% del rendimiento máximo teórico de etanol. En otra forma de realización, el microbio Q puede producir aproximadamente 99% del rendimiento máximo teórico de etanol. En otra forma de realización, el microbio Q puede producir aproximadamente 100% del rendimiento máximo teórico de etanol. En una forma de realización a microbio Q puede producir hasta aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,99 %, o 100% de un rendimiento máximo teórico de etanol.

[00177] Las células del microbio Q usadas para el inóculo de siembra o para el aumento celular se pueden preparar o tratar de maneras relacionadas con su capacidad para producir enzimas útiles para hidrolizar los componentes del medio de producción. Por ejemplo, en una forma de realización, las células del microbio Q pueden producir enzimas útiles después de transferirse al medio de producción o fermentador de producción. En otra forma de realización, las células del microbio Q ya pueden haber producido enzimas útiles antes de transferirse al medio de producción o el fermentador de producción. En otra forma de realización, las células del microbio Q pueden estar listas para

000086

producir enzimas útiles una vez transferidas al medio de producción o el fermentador de producción, o las células del microbio Q pueden tener alguna combinación de estas características de producción de la enzima. En una forma de realización, la siembra se puede cultivar inicialmente en un medio que contiene una fuente de azúcar simple, tal como jarabe de maíz, y luego se pasan a la fuente de carbono del medio de producción antes de transferirse al medio de producción. En otra forma de realización, la siembra se cultiva en una combinación de azúcares simples y fuente de carbono del medio de producción antes de transferirse al medio de producción. En otra forma de realización, la siembra se cultiva en la fuente de carbono del medio de producción desde el comienzo. En otra forma de realización, la siembra se cultiva en una fuente de carbono del medio de producción y luego se pasa a otra fuente de carbono del medio de producción antes de transferirse al medio de producción. En otra forma de realización, la siembra se cultiva una combinación de la fuente de carbono del medio de producción antes de transferirse al medio de producción. En otra forma de realización, la siembra se cultiva en una fuente de carbono que favorece la producción de enzimas hidrolíticas con actividad hacia los componentes de los medio de producción.

[00178] En otra forma de realización, una fermentación para producir etanol se realizar por el cultivo de una cepa del microorganismo Q y añadir componentes del medio fresco y células frescas del microbio Q mientras que las células están creciendo en el fermentador. Los componentes del medio, tales como carbono, nitrógeno, y combinaciones de estos, se pueden añadir como se describe en la presente, así como otros nutrientes, que incluyen vitaminas, factores, cofactores, enzimas, minerales, sales, y tales, suficientes para mantener un nivel efectivo de estos nutrientes en el medio. El medio y las células del microbio Q se pueden añadir simultáneamente, o una a la vez. En otra forma de realización, las células frescas del microbio Q se puede añadir cuando la actividad enzimática hidrolítica disminuye, en especial cuando disminuye la actividad de estas enzimas hidrolíticas que son más sensibles a la presencia de alcohol. Después de la

000087

adición de células frescas del microbio Q, se puede incorporar una alimentación de nitrógeno o una combinación de alimentación de nitrógeno y carbono y/u otros componentes del medio, prolongar la producción enzimática u otra actividad de las células. En otra forma de realización, las células se pueden añadir con suficiente carbono y nitrógeno para prolongar la producción enzimática u otra actividad de las células suficientemente hasta la próxima adición de las células frescas. En otra forma de realización, las células frescas del microbio Q se pueden añadir cuando tanto el nivel de nitrógeno como el nivel de carbono presentes en el fermentador aumenten. En otra forma de realización, las células frescas del microbio Q se pueden añadir cuando disminuye el recuento celular viable, en especial cuando el nivel de nitrógeno es relativamente estable o en aumento. En otra forma de realización, las células frescas se pueden añadir cuando una porción significativa de las células viables están en el proceso de esporulación, o han esporulado. Los tiempos apropiados para añadir células frescas del microbio Q pueden ser cuando la porción de células en el proceso de esporulación o han esporulado es aproximadamente 2% a aproximadamente 100%, aproximadamente 10% a aproximadamente 75%, aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 25% a aproximadamente 30% de las células están en el proceso de esporulación o han esporulado.

[00179] En otras formas de realización, se realiza una fermentación para producir etanol por cultivar células recicladas como inóculo. Una densidad de población más alta se puede usar para aumentar la producción de etanol. Los niveles apropiados de inóculo incluyen utilizar menos de aproximadamente 0,01% (v/v) o aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1% (v/v), aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% (v/v), aproximadamente 1% a aproximadamente 3% (v/v), aproximadamente 3% a aproximadamente 5% (v/v) o aún tan alto como 10% (v/v) o aun más alto. El Contenido de células del inóculo se puede medir de varias maneras, tales como por densidad óptica, análisis microscópico, volumen celular empaquetado, peso celular seco, análisis de ADN, etc. Los niveles adecuados de células del inóculo puede ser aproximadamente 0,01 g/mL a aproximadamente

000088

0,05 g/mL de peso celular seco (DCW), aproximadamente 0,05 g/mL a aproximadamente 0,1 g/mL de peso celular seco (DCW), o aproximadamente 0,1 g/mL a aproximadamente 0,3 g/mL de peso celular seco (DCW). La cantidad total de células inoculadas en un medio de fermentación se puede determinar por la relación del nivel de las células, tales como determinado por el peso celular seco u otros medios apropiados, y el nivel del inóculo. Las cantidades totales de células preferidas incluyen utilizar aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,001 g de células secas por ml de caldo, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,01 g células secas por ml de caldo, o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,03 g células secas por ml de caldo, sin embargo, en algunos casos se pueden usar cantidades totales mayores o menores. Los títulos de etanos más altos se pueden obtener por técnicas tales como variar la cantidad de células recicladas; variar el número de veces que se reciclan las células; variar un nivel del componente del medio (por ejemplo niveles de carbono y nitrógeno, por separado o de modo coordinado), tal como por los medios descritos en la presente; y variar una fuente de un componente del medio (por ejemplo fuente de carbono y/o nitrógeno), tales como se describe en la presente. Mediante las técnicas que incluyen las anteriores, se pueden obtener concentraciones de etanol. En una forma de realización se puede obtener una concentración de etanol por los métodos descritos en la presente que es aproximadamente 20 g/L, 21 g/L, 22 g/L, 23 g/L, 24 g/L, 25 g/L, 26 g/L, 27 g/L, 28 g/L, 29 g/L, 30 g/L, 31 g/L, 32 g/L, 33 g/L, 34 g/L, 35 g/L, 36 g/L, 37 g/L, 38 g/L, 39 g/L, 40 g/L, 41 g/L, 42 g/L, 43 g/L, 44 g/L, 45 g/L, 46 g/L, 47 g/L, 48 g/L, 49 g/L, 50 g/L, 51 g/L, 52 g/L, 53 g/L, 54 g/L, 55 g/L, 56 g/L, 57 g/L, 58 g/L, 59 g/L, 60 g/L, 61 g/L, 62 g/L, 63 g/L, 64 g/L, 65 g/L, 66 g/L, 67 g/L, 68 g/L, 69 g/L, 70 g/L, 71 g/L, 72 g/L, 73 g/L, 74 g/L, 75 g/L, 76 g/L, 77 g/L, 78 g/L, 79 g/L, 80 g/L, 81 g/L, 82 g/L, 83 g/L, 84 g/L, 85 g/L, 86 g/L, 87 g/L, 88 g/L, 89 g/L, 90 g/L, 91 g/L, 92 g/L, 93 g/L, 94 g/L, 95 g/L, 96 g/L, 97 g/L, 98 g/L, 99 g/L, 100 g/L, 101 g/L, 102 g/L, 103 g/L, 104 g/L, 105 g/L, 106 g/L, 107 g/L, 108 g/L, 109 g/L, 110 g/L, 111 g/L, 112 g/L, 113 g/L, 114 g/L, 115 g/L,

000089

116 g/L, 117 g/L, 118 g/L, 119 g/L, 120 g/L, 121 g/L, 122 g/L, 123 g/L, 124 g/L, 125 g/L, 126 g/L, 127 g/L, 128 g/L, 129 g/L, 130 g/L, 131 g/L, 132 g/L, 133 g/L, 134 g/L, 135 g/L, 136 g/L, 137 g/L, 138 g/L, 139 g/L, 140 g/L, 141 g/L, 142 g/L, 143 g/L, 144 g/L, 145 g/L, 146 g/L, 147 g/L, 148 g/L, 149 g/L, 150 g/L, 151 g/L, 152 g/L, 153 g/L, 154 g/L, 155 g/L, 156 g/L, 157 g/L, 158 g/L, 159 g/L, 160 g/L, 161 g/L, 162 g/L, 163 g/L, 164 g/L, 165 g/L, 166 g/L, 167 g/L, 168 g/L, 169 g/L, 170 g/L, 171 g/L, 172 g/L, 173 g/L, 174 g/L, 175 g/L, 176 g/L, 177 g/L, 178 g/L, 179 g/L, 180 g/L, o 181 g/L.

[00180] En otra forma de realización, se realiza una fermentación para producir etanol por el cultivo de una cepa del microorganismo Q y añadir células del microbio Q recicladas mientras que las células en el fermentador están en la etapa de expansión celular (por ejemplo etapa de siembra) y/o la etapa de fermentación final de una fermentación. Sin estar limitado por teoría alguna los resultados descritos en la presente indican que las células recicladas tienen una tolerancia de concentraciones de etanol más altas y la capacidad de crecer en tal ambiente. En consecuencia, tal tolerancia y capacidad pueden ser útiles para situaciones tales como la etapa de expansión celular (por ejemplo etapa de siembra) y/o la etapa de fermentación final de una fermentación donde están presentes estas concentraciones de etanol, que incluyen fermentaciones para la producción de etanol, o para la producción de otros productos en presencia de estas concentraciones de etanol.

Composiciones del medio

[00181] En varias formas de realización, los componentes del medio particulares pueden tener efectos beneficiosos sobre el desempeño de la fermentación, tales como aumentar el título de los productos deseados, o aumentar la velocidad a la que se producen los productos deseados. Los compuestos específicos se pueden suministrar como un ingrediente puro, específico, tal como un aminoácido particular, o se puede suministrar como un componente de un ingrediente más complejo, tal como usar un producto microbiano, planta o animal como un ingrediente del medio para proporcionar un aminoácido, promotor, cofactor, 000090

otros compuestos beneficiosos particulares. En algunos casos, el compuesto particular en el ingrediente del medio se puede combinar con otros compuestos por el organismo, lo produce un compuesto beneficioso para la fermentación. Un ejemplo de esta situación puede ser cuando un ingrediente del medio proporciona un aminoácido específico que el organismo usa para obtener una enzima beneficiosa para la fermentación. Otros ejemplos pueden incluir los componentes del medio que se usan para generar promotores de crecimiento o producto, etc. En tales casos, puede ser posible obtener un resultado beneficioso para la fermentación por la suplementación de la enzima, promotor, factor de crecimiento etc. o por la adición del precursor. En algunas situaciones, el mecanismo específico por el cual el componente del medio beneficia la fermentación no es conocido, solo que se obtiene un resultado beneficioso.

[00182] En una forma de realización, los resultados de la fermentación beneficiosos se pueden obtener por la adición del extracto de levadura. Una composición típica para el extracto de levadura se muestra en la Tabla 8. La adición del extracto de levadura puede producir el aumento del título de etanol en la fermentación discontinua, mejor productividad y reducción de la producción de productos secundarios tales como ácidos orgánicos. En una forma de realización los resultados beneficiosos con extracto de levadura se pueden obtener en los métodos de las formas de realización en los niveles de uso de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 g/L, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 g/L, o aproximadamente 10 a aproximadamente 30 g/L. En otra forma de realización el extracto de levadura se usa en el nivel de aproximadamente 0,5 g/L, 0,6 g/L, 0,7 g/L, 0,8 g/L, 0,9 g/L, 1 g/L, 1,1 g/L, 1,2 g/L, 1,3 g/L, 1,4 g/L, 1,5 g/L, 1,6 g/L, 1,7 g/L, 1,8 g/L, 1,9 g/L, 2 g/L, 2,1 g/L, 2,2 g/L, 2,3 g/L, 2,4 g/L, 2,5 g/L, 2,6 g/L, 2,7 g/L, 2,8 g/L, 2,9 g/L, 3 g/L, 3,1 g/L, 3,2 g/L, 3,3 g/L, 3,4 g/L, 3,5 g/L, 3,6 g/L, 3,7 g/L, 3,8 g/L, 3,9 g/L, 4 g/L, 4,1 g/L, 4,2 g/L, 4,3 g/L, 4,4 g/L, 4,5 g/L, 4,6 g/L, 4,7 g/L, 4,8 g/L, 4,9 g/L, 5 g/L, 5,1 g/L, 5,2 g/L, 5,3 g/L, 5,4 g/L, 5,5 g/L, 5,6 g/L, 5,7 g/L, 5,8 g/L, 5,9 g/L, 6 g/L, 6,1 g/L, 6,2 g/L, 6,3 g/L, 6,4 g/L, 6,5 g/L, 6,6 g/L, 6,7 g/L, 6,8 g/L, 6,9 g/L, 7 g/L, 7,1 g/L, 7,2 g/L, 7,3 g/L, 7,4 g/L, 7,5 g/L, 7,6 g/L, 7,7 g/L, 7,8 g/L, 7,9 g/L, 8 g/L, 8,1 g/L, 8,2 g/L, 8,3 g/L, 8,4 g/L, 8,5 g/L, 8,6 g/L, 8,7 g/L, 8,8 g/L, 8,9 g/L, 9 g/L, 9,1 g/L, 9,2 g/L, 9,3 g/L, 9,4 g/L, 9,5 g/L, 9,6 g/L, 9,7 g/L, 9,8 g/L, 9,9 g/L, 10 g/L, 10,1 g/L, 10,2 g/L, 10,3 g/L, 10,4 g/L, 10,5 g/L, 10,6 g/L, 10,7 g/L, 10,8 g/L, 10,9 g/L, 11 g/L, 11,1 g/L, 11,2 g/L, 11,3 g/L, 11,4 g/L, 11,5 g/L, 11,6 g/L, 11,7 g/L, 11,8 g/L, 11,9 g/L, 12 g/L, 12,1 g/L, 12,2 g/L, 12,3 g/L, 12,4 g/L, 12,5 g/L, 12,6 g/L, 12,7 g/L, 12,8 g/L, 12,9 g/L, 13 g/L, 13,1 g/L, 13,2 g/L, 13,3 g/L, 13,4 g/L, 13,5 g/L, 13,6 g/L, 13,7 g/L, 13,8 g/L, 13,9 g/L, 14 g/L, 14,1 g/L, 14,2 g/L, 14,3 g/L, 14,4 g/L, 14,5 g/L, 14,6 g/L, 14,7 g/L, 14,8 g/L, 14,9 g/L, 15 g/L, 15,1 g/L, 15,2 g/L, 15,3 g/L, 15,4 g/L, 15,5 g/L, 15,6 g/L, 15,7 g/L, 15,8 g/L, 15,9 g/L, 16 g/L, 16,1 g/L, 16,2 g/L, 16,3 g/L, 16,4 g/L, 16,5 g/L, 16,6 g/L, 16,7 g/L, 16,8 g/L, 16,9 g/L, 17 g/L, 17,1 g/L, 17,2 g/L, 17,3 g/L, 17,4 g/L, 17,5 g/L, 17,6 g/L, 17,7 g/L, 17,8 g/L, 17,9 g/L, 18 g/L, 18,1 g/L, 18,2 g/L, 18,3 g/L, 18,4 g/L, 18,5 g/L, 18,6 g/L, 18,7 g/L, 18,8 g/L, 18,9 g/L, 19 g/L, 19,1 g/L, 19,2 g/L, 19,3 g/L, 19,4 g/L, 19,5 g/L, 19,6 g/L, 19,7 g/L, 19,8 g/L, 19,9 g/L, 20 g/L, 20,1 g/L, 20,2 g/L, 20,3 g/L, 20,4 g/L, 20,5 g/L, 20,6 g/L, 20,7 g/L, 20,8 g/L, 20,9 g/L, 21 g/L, 21,1 g/L, 21,2 g/L, 21,3 g/L, 21,4 g/L, 21,5 g/L, 21,6 g/L, 21,7 g/L, 21,8 g/L, 21,9 g/L, 22 g/L, 22,1 g/L, 22,2 g/L, 22,3 g/L, 22,4 g/L, 22,5 g/L, 22,6 g/L, 22,7 g/L, 22,8 g/L, 22,9 g/L, 23 g/L, 23,1 g/L, 23,2 g/L, 23,3 g/L, 23,4 g/L, 23,5 g/L, 23,6 g/L, 23,7 g/L, 23,8 g/L, 23,9 g/L, 24 g/L, 24,1 g/L, 24,2 g/L, 24,3 g/L, 24,4 g/L, 24,5 g/L, 24,6 g/L, 24,7 g/L, 24,8 g/L, 24,9 g/L, 25 g/L, 25,1 g/L, 25,2 g/L, 25,3 g/L, 25,4 g/L, 25,5 g/L, 25,6 g/L, 25,7 g/L, 25,8 g/L, 25,9 g/L, 26 g/L, 26,1 g/L, 26,2 g/L, 26,3 g/L, 26,4 g/L, 26,5 g/L, 26,6 g/L, 26,7 g/L, 26,8 g/L, 26,9 g/L, 27 g/L, 27,1 g/L, 27,2 g/L, 27,3 g/L, 27,4 g/L, 27,5 g/L, 27,6 g/L, 27,7 g/L, 27,8 g/L, 27,9 g/L, 28 g/L, 28,1 g/L, 28,2 g/L, 28,3 g/L, 28,4 g/L, 28,5 g/L, 28,6 g/L, 28,7 g/L, 28,8 g/L, 28,9 g/L, 29 g/L, 29,1 g/L, 29,2 g/L, 29,3 g/L, 29,4 g/L, 29,5 g/L, 29,6 g/L, 29,7 g/L, 29,8 g/L, 29,9 g/L, 30 g/L, 30,1 g/L, 30,2 g/L, 30,3 g/L, 30,4 g/L, 30,5 g/L, 30,6 g/L, 30,7 g/L, 30,8 g/L, 30,9 g/L, 31 g/L, 31,1 g/L, 31,2 g/L, 31,3 g/L, 31,4 g/L, 31,5 g/L, 31,6 g/L, 31,7 g/L, 31,8 g/L, 31,9 g/L, 32 g/L, 32,1 g/L, 32,2 g/L, 32,3 g/L, 32,4 g/L, 32,5 g/L, 32,6 g/L, 32,7 g/L, 32,8 g/L, 32,9 g/L, 33 g/L, 33,1 g/L, 33,2 g/L, 33,3 g/L, 33,4 g/L, 33,5 g/L, 33,6 g/L, 33,7 g/L, 33,8 g/L, 33,9 g/L, 34 g/L, 34,1 g/L, 34,2 g/L, 34,3 g/L, 34,4 g/L, 34,5 g/L, 34,6 g/L, 34,7 g/L, 34,8 g/L, 34,9 g/L, 35 g/L, 35,1 g/L, 35,2 g/L, 35,3 g/L, 35,4 g/L, 35,5 g/L, 35,6 g/L, 35,7 g/L, 35,8 g/L, 35,9 g/L, 36 g/L, 36,1 g/L, 36,2 g/L, 36,3 g/L, 36,4 g/L, 36,5 g/L, 36,6 g/L, 36,7 g/L, 36,8 g/L, 36,9 g/L, 37 g/L, 37,1 g/L, 37,2 g/L, 37,3 g/L, 37,4 g/L, 37,5 g/L, 37,6 g/L, 37,7 g/L, 37,8 g/L, 37,9 g/L, 38 g/L, 38,1 g/L, 38,2 g/L, 38,3 g/L, 38,4 g/L, 38,5 g/L, 38,6 g/L, 38,7 g/L, 38,8 g/L, 38,9 g/L, 39 g/L, 39,1 g/L, 39,2 g/L, 39,3 g/L, 39,4 g/L, 39,5 g/L, 39,6 g/L, 39,7 g/L, 39,8 g/L, 39,9 g/L, 40 g/L, 40,1 g/L, 40,2 g/L, 40,3 g/L, 40,4 g/L, 40,5 g/L, 40,6 g/L, 40,7 g/L, 40,8 g/L, 40,9 g/L, 41 g/L, 41,1 g/L, 41,2 g/L, 41,3 g/L, 41,4 g/L, 41,5 g/L, 41,6 g/L, 41,7 g/L, 41,8 g/L, 41,9 g/L, 42 g/L, 42,1 g/L, 42,2 g/L, 42,3 g/L, 42,4 g/L, 42,5 g/L, 42,6 g/L, 42,7 g/L, 42,8 g/L, 42,9 g/L, 43 g/L, 43,1 g/L, 43,2 g/L, 43,3 g/L, 43,4 g/L, 43,5 g/L, 43,6 g/L, 43,7 g/L, 43,8 g/L, 43,9 g/L, 44 g/L, 44,1 g/L, 44,2 g/L, 44,3 g/L, 44,4 g/L, 44,5 g/L, 44,6 g/L, 44,7 g/L, 44,8 g/L, 44,9 g/L, 45 g/L, 45,1 g/L, 45,2 g/L, 45,3 g/L, 45,4 g/L, 45,5 g/L, 45,6 g/L, 45,7 g/L, 45,8 g/L, 45,9 g/L, 46 g/L, 46,1 g/L, 46,2 g/L, 46,3 g/L, 46,4 g/L, 46,5 g/L, 46,6 g/L, 46,7 g/L, 46,8 g/L, 46,9 g/L, 47 g/L, 47,1 g/L, 47,2 g/L, 47,3 g/L, 47,4 g/L, 47,5 g/L, 47,6 g/L, 47,7 g/L, 47,8 g/L, 47,9 g/L, 48 g/L, 48,1 g/L, 48,2 g/L, 48,3 g/L, 48,4 g/L, 48,5 g/L, 48,6 g/L, 48,7 g/L, 48,8 g/L, 48,9 g/L, 49 g/L, 49,1 g/L, 49,2 g/L, 49,3 g/L, 49,4 g/L, 49,5 g/L, 49,6 g/L, 49,7 g/L, 49,8 g/L, 49,9 g/L, 50 g/L.

6,9 g/L, 7 g/L, 7,1 g/L, 7,2 g/L, 7,3 g/L, 7,4 g/L, 7,5 g/L, 7,6
 g/L, 7,7 g/L, 7,8 g/L, 7,9 g/L, 8 g/L, 8,1 g/L, 8,2 g/L, 8,3 g/L,
 8,4 g/L, 8,5 g/L, 8,6 g/L, 8,7 g/L, 8,8 g/L, 8,9 g/L, 9 g/L, 9,1
 g/L, 9,2 g/L, 9,3 g/L, 9,4 g/L, 9,5 g/L, 9,6 g/L, 9,7 g/L, 9,8
 g/L, 9,9 g/L, 10 g/L, 10,1 g/L, 10,2 g/L, 10,3 g/L, 10,4 g/L,
 10,5 g/L, 10,6 g/L, 10,7 g/L, 10,8 g/L, 10,9 g/L, 11 g/L, 11,1
 g/L, 11,2 g/L, 11,3 g/L, 11,4 g/L, 11,5 g/L, 11,6 g/L, 11,7 g/L,
 11,8 g/L, 11,9 g/L, 12 g/L, 12,1 g/L, 12,2 g/L, 12,3 g/L, 12,4
 g/L, 12,5 g/L, 12,6 g/L, 12,7 g/L, 12,8 g/L, 12,9 g/L, 13 g/L,
 13,1 g/L, 13,2 g/L, 13,3 g/L, 13,4 g/L, 13,5 g/L, 13,6 g/L, 13,7
 g/L, 13,8 g/L, 13,9 g/L, 14 g/L, 14,1 g/L, 14,2 g/L, 14,3 g/L,
 14,4 g/L, 14,5 g/L, 14,6 g/L, 14,7 g/L, 14,8 g/L, 14,9 g/L, 15
 g/L, 15,1 g/L, 15,2 g/L, 15,3 g/L, 15,4 g/L, 15,5 g/L, 15,6 g/L,
 15,7 g/L, 15,8 g/L, 15,9 g/L, 16 g/L, 16,1 g/L, 16,2 g/L, 16,3
 g/L, 16,4 g/L, 16,5 g/L, 16,6 g/L, 16,7 g/L, 16,8 g/L, 16,9 g/L,
 17 g/L, 17,1 g/L, 17,2 g/L, 17,3 g/L, 17,4 g/L, 17,5 g/L, 17,6
 g/L, 17,7 g/L, 17,8 g/L, 17,9 g/L, 18 g/L, 18,1 g/L, 18,2 g/L,
 18,3 g/L, 18,4 g/L, 18,5 g/L, 18,6 g/L, 18,7 g/L, 18,8 g/L, 18,9
 g/L, 19 g/L, 19,1 g/L, 19,2 g/L, 19,3 g/L, 19,4 g/L, 19,5 g/L,
 19,6 g/L, 19,7 g/L, 19,8 g/L, 19,9 g/L, 20 g/L, 20,1 g/L, 20,2
 g/L, 20,3 g/L, 20,4 g/L, 20,5 g/L, 20,6 g/L, 20,7 g/L, 20,8 g/L,
 20,9 g/L, 21 g/L, 21,1 g/L, 21,2 g/L, 21,3 g/L, 21,4 g/L, 21,5
 g/L, 21,6 g/L, 21,7 g/L, 21,8 g/L, 21,9 g/L, 22 g/L, 22,1 g/L,
 22,2 g/L, 22,3 g/L, 22,4 g/L, 22,5 g/L, 22,6 g/L, 22,7 g/L, 22,8
 g/L, 22,9 g/L, 23 g/L, 23,1 g/L, 23,2 g/L, 23,3 g/L, 23,4 g/L,
 23,5 g/L, 23,6 g/L, 23,7 g/L, 23,8 g/L, 23,9 g/L, 24 g/L, 24,1
 g/L, 24,2 g/L, 24,3 g/L, 24,4 g/L, 24,5 g/L, 24,6 g/L, 24,7 g/L,
 24,8 g/L, 24,9 g/L, 25 g/L, 25,1 g/L, 25,2 g/L, 25,3 g/L, 25,4
 g/L, 25,5 g/L, 25,6 g/L, 25,7 g/L, 25,8 g/L, 25,9 g/L, 26 g/L,
 26,1 g/L, 26,2 g/L, 26,3 g/L, 26,4 g/L, 26,5 g/L, 26,6 g/L, 26,7
 g/L, 26,8 g/L, 26,9 g/L, 27 g/L, 27,1 g/L, 27,2 g/L, 27,3 g/L,
 27,4 g/L, 27,5 g/L, 27,6 g/L, 27,7 g/L, 27,8 g/L, 27,9 g/L, 28
 g/L, 28,1 g/L, 28,2 g/L, 28,3 g/L, 28,4 g/L, 28,5 g/L, 28,6 g/L,
 28,7 g/L, 28,8 g/L, 28,9 g/L, 29 g/L, 29,1 g/L, 29,2 g/L, 29,3
 g/L, 29,4 g/L, 29,5 g/L, 29,6 g/L, 29,7 g/L, 29,8 g/L, 29,9 g/L,
 30 g/L, 30,1 g/L, 30,2 g/L, 30,3 g/L, 30,4 g/L, 30,5 g/L, 30,6
 g/L, 30,7 g/L, 30,8 g/L, 30,9 g/L, 31 g/L, 31,1 g/L, 31,2 000092

31,3 g/L, 31,4 g/L, 31,5 g/L, 31,6 g/L, 31,7 g/L, 31,8 g/L, 31,9 g/L, 32 g/L, 32,1 g/L, 32,2 g/L, 32,3 g/L, 32,4 g/L, 32,5 g/L, 32,6 g/L, 32,7 g/L, 32,8 g/L, 32,9 g/L, 33 g/L, 33,1 g/L, 33,2 g/L, 33,3 g/L, 33,4 g/L, 33,5 g/L, 33,6 g/L, 33,7 g/L, 33,8 g/L, 33,9 g/L, 34 g/L, 34,1 g/L, 34,2 g/L, 34,3 g/L, 34,4 g/L, 34,5 g/L, 34,6 g/L, 34,7 g/L, 34,8 g/L, 34,9 g/L, 35 g/L, 35,1 g/L, 35,2 g/L, 35,3 g/L, 35,4 g/L, 35,5 g/L, 35,6 g/L, 35,7 g/L, 35,8 g/L, 35,9 g/L, 36 g/L, 36,1 g/L, 36,2 g/L, 36,3 g/L, 36,4 g/L, 36,5 g/L, 36,6 g/L, 36,7 g/L, 36,8 g/L, 36,9 g/L, 37 g/L, 37,1 g/L, 37,2 g/L, 37,3 g/L, 37,4 g/L, 37,5 g/L, 37,6 g/L, 37,7 g/L, 37,8 g/L, 37,9 g/L, 38 g/L, 38,1 g/L, 38,2 g/L, 38,3 g/L, 38,4 g/L, 38,5 g/L, 38,6 g/L, 38,7 g/L, 38,8 g/L, 38,9 g/L, 39 g/L, 39,1 g/L, 39,2 g/L, 39,3 g/L, 39,4 g/L, 39,5 g/L, 39,6 g/L, 39,7 g/L, 39,8 g/L, 39,9 g/L, 40 g/L, 40,1 g/L, 40,2 g/L, 40,3 g/L, 40,4 g/L, 40,5 g/L, 40,6 g/L, 40,7 g/L, 40,8 g/L, 40,9 g/L, 41 g/L, 41,1 g/L, 41,2 g/L, 41,3 g/L, 41,4 g/L, 41,5 g/L, 41,6 g/L, 41,7 g/L, 41,8 g/L, 41,9 g/L, 42 g/L, 42,1 g/L, 42,2 g/L, 42,3 g/L, 42,4 g/L, 42,5 g/L, 42,6 g/L, 42,7 g/L, 42,8 g/L, 42,9 g/L, 43 g/L, 43,1 g/L, 43,2 g/L, 43,3 g/L, 43,4 g/L, 43,5 g/L, 43,6 g/L, 43,7 g/L, 43,8 g/L, 43,9 g/L, 44 g/L, 44,1 g/L, 44,2 g/L, 44,3 g/L, 44,4 g/L, 44,5 g/L, 44,6 g/L, 44,7 g/L, 44,8 g/L, 44,9 g/L, 45 g/L, 45,1 g/L, 45,2 g/L, 45,3 g/L, 45,4 g/L, 45,5 g/L, 45,6 g/L, 45,7 g/L, 45,8 g/L, 45,9 g/L, 46 g/L, 46,1 g/L, 46,2 g/L, 46,3 g/L, 46,4 g/L, 46,5 g/L, 46,6 g/L, 46,7 g/L, 46,8 g/L, 46,9 g/L, 47 g/L, 47,1 g/L, 47,2 g/L, 47,3 g/L, 47,4 g/L, 47,5 g/L, 47,6 g/L, 47,7 g/L, 47,8 g/L, 47,9 g/L, 48 g/L, 48,1 g/L, 48,2 g/L, 48,3 g/L, 48,4 g/L, 48,5 g/L, 48,6 g/L, 48,7 g/L, 48,8 g/L, 48,9 g/L, 49 g/L, 49,1 g/L, 49,2 g/L, 49,3 g/L, 49,4 g/L, 49,5 g/L, 49,6 g/L, 49,7 g/L, 49,8 g/L, 49,9 g/L o 50 g/L.

[00183] El extracto de levadura también se puede incorporar a lo largo del curso de la fermentación completa o una porción de la fermentación, en forma continua o administrada en intervalos. En una forma de realización los niveles de uso incluyen mantener una concentración de nitrógeno de aproximadamente 0,05 g/L a aproximadamente 3 g/L (como nitrógeno), donde al menos una porción del nitrógeno se suministra del polvo de maceración de maíz; o aproximadamente 0,3 g/L a 1,3 g/L; o 0,4 g/L a

000093

aproximadamente 0,9 g/L. En otra forma de realización la concentración de nitrógeno es aproximadamente 0,05 g/L, 0,06 g/L, 0,07 g/L, 0,08 g/L, 0,09 g/L, 0,1 g/L, 0,11 g/L, 0,12 g/L, 0,13 g/L, 0,14 g/L, 0,15 g/L, 0,16 g/L, 0,17 g/L, 0,18 g/L, 0,19 g/L, 0,2 g/L, 0,21 g/L, 0,22 g/L, 0,23 g/L, 0,24 g/L, 0,25 g/L, 0,26 g/L, 0,27 g/L, 0,28 g/L, 0,29 g/L, 0,3 g/L, 0,31 g/L, 0,32 g/L, 0,33 g/L, 0,34 g/L, 0,35 g/L, 0,36 g/L, 0,37 g/L, 0,38 g/L, 0,39 g/L, 0,4 g/L, 0,41 g/L, 0,42 g/L, 0,43 g/L, 0,44 g/L, 0,45 g/L, 0,46 g/L, 0,47 g/L, 0,48 g/L, 0,49 g/L, 0,5 g/L, 0,51 g/L, 0,52 g/L, 0,53 g/L, 0,54 g/L, 0,55 g/L, 0,56 g/L, 0,57 g/L, 0,58 g/L, 0,59 g/L, 0,6 g/L, 0,61 g/L, 0,62 g/L, 0,63 g/L, 0,64 g/L, 0,65 g/L, 0,66 g/L, 0,67 g/L, 0,68 g/L, 0,69 g/L, 0,7 g/L, 0,71 g/L, 0,72 g/L, 0,73 g/L, 0,74 g/L, 0,75 g/L, 0,76 g/L, 0,77 g/L, 0,78 g/L, 0,79 g/L, 0,8 g/L, 0,81 g/L, 0,82 g/L, 0,83 g/L, 0,84 g/L, 0,85 g/L, 0,86 g/L, 0,87 g/L, 0,88 g/L, 0,89 g/L, 0,9 g/L, 0,91 g/L, 0,92 g/L, 0,93 g/L, 0,94 g/L, 0,95 g/L, 0,96 g/L, 0,97 g/L, 0,98 g/L, 0,99 g/L, 1 g/L, 1,01 g/L, 1,02 g/L, 1,03 g/L, 1,04 g/L, 1,05 g/L, 1,06 g/L, 1,07 g/L, 1,08 g/L, 1,09 g/L, 1,1 g/L, 1,11 g/L, 1,12 g/L, 1,13 g/L, 1,14 g/L, 1,15 g/L, 1,16 g/L, 1,17 g/L, 1,18 g/L, 1,19 g/L, 1,2 g/L, 1,21 g/L, 1,22 g/L, 1,23 g/L, 1,24 g/L, 1,25 g/L, 1,26 g/L, 1,27 g/L, 1,28 g/L, 1,29 g/L, 1,3 g/L, 1,31 g/L, 1,32 g/L, 1,33 g/L, 1,34 g/L, 1,35 g/L, 1,36 g/L, 1,37 g/L, 1,38 g/L, 1,39 g/L, 1,4 g/L, 1,41 g/L, 1,42 g/L, 1,43 g/L, 1,44 g/L, 1,45 g/L, 1,46 g/L, 1,47 g/L, 1,48 g/L, 1,49 g/L, 1,5 g/L, 1,51 g/L, 1,52 g/L, 1,53 g/L, 1,54 g/L, 1,55 g/L, 1,56 g/L, 1,57 g/L, 1,58 g/L, 1,59 g/L, 1,6 g/L, 1,61 g/L, 1,62 g/L, 1,63 g/L, 1,64 g/L, 1,65 g/L, 1,66 g/L, 1,67 g/L, 1,68 g/L, 1,69 g/L, 1,7 g/L, 1,71 g/L, 1,72 g/L, 1,73 g/L, 1,74 g/L, 1,75 g/L, 1,76 g/L, 1,77 g/L, 1,78 g/L, 1,79 g/L, 1,8 g/L, 1,81 g/L, 1,82 g/L, 1,83 g/L, 1,84 g/L, 1,85 g/L, 1,86 g/L, 1,87 g/L, 1,88 g/L, 1,89 g/L, 1,9 g/L, 1,91 g/L, 1,92 g/L, 1,93 g/L, 1,94 g/L, 1,95 g/L, 1,96 g/L, 1,97 g/L, 1,98 g/L, 1,99 g/L, 2 g/L, 2,01 g/L, 2,02 g/L, 2,03 g/L, 2,04 g/L, 2,05 g/L, 2,06 g/L, 2,07 g/L, 2,08 g/L, 2,09 g/L, 2,1 g/L, 2,11 g/L, 2,12 g/L, 2,13 g/L, 2,14 g/L, 2,15 g/L, 2,16 g/L, 2,17 g/L, 2,18 g/L, 2,19 g/L, 2,2 g/L, 2,21 g/L, 2,22 g/L, 2,23 g/L, 2,24 g/L, 2,25 g/L, 2,26 g/L, 2,27 g/L, 2,28 g/L, 2,29 g/L, 2,3 g/L, 2,31 g/L, 2,32 g/L, 2,33 g/L, 2,34

000094

g/L, 2,35 g/L, 2,36 g/L, 2,37 g/L, 2,38 g/L, 2,39 g/L, 2,4 g/L, 2,41 g/L, 2,42 g/L, 2,43 g/L, 2,44 g/L, 2,45 g/L, 2,46 g/L, 2,47 g/L, 2,48 g/L, 2,49 g/L, 2,5 g/L, 2,51 g/L, 2,52 g/L, 2,53 g/L, 2,54 g/L, 2,55 g/L, 2,56 g/L, 2,57 g/L, 2,58 g/L, 2,59 g/L, 2,6 g/L, 2,61 g/L, 2,62 g/L, 2,63 g/L, 2,64 g/L, 2,65 g/L, 2,66 g/L, 2,67 g/L, 2,68 g/L, 2,69 g/L, 2,7 g/L, 2,71 g/L, 2,72 g/L, 2,73 g/L, 2,74 g/L, 2,75 g/L, 2,76 g/L, 2,77 g/L, 2,78 g/L, 2,79 g/L, 2,8 g/L, 2,81 g/L, 2,82 g/L, 2,83 g/L, 2,84 g/L, 2,85 g/L, 2,86 g/L, 2,87 g/L, 2,88 g/L, 2,89 g/L, 2,9 g/L, 2,91 g/L, 2,92 g/L, 2,93 g/L, 2,94 g/L, 2,95 g/L, 2,96 g/L, 2,97 g/L, 2,98 g/L, 2,99 g/L, o 3 g/L.

[00184] En una forma de realización, resultados beneficiosos de la fermentación se pueden obtener por la adición del polvo de maceración de maíz a la fermentación. En otra forma de realización una composición típica para el polvo de maceración de maíz se muestra en las Tablas 1-2. La adición del polvo de maceración de maíz puede producir aumento del título de etanol en la fermentación discontinua, mejor productividad y reducción de la producción de productos secundarios tales como ácidos orgánicos. En otra forma de realización los resultados beneficiosos con polvo de maceración de maíz se pueden obtener en los métodos de las formas de realización en niveles de uso de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 g/L, aproximadamente 5 a aproximadamente 15 g/L, o aproximadamente 8 a aproximadamente 12 g/L. En otra forma de realización los resultados beneficiosos con polvo de maceración se puede obtener en un nivel de aproximadamente 3 g/L, 3,1 g/L, 3,2 g/L, 3,3 g/L, 3,4 g/L, 3,5 g/L, 3,6 g/L, 3,7 g/L, 3,8 g/L, 3,9 g/L, 4 g/L, 4,1 g/L, 4,2 g/L, 4,3 g/L, 4,4 g/L, 4,5 g/L, 4,6 g/L, 4,7 g/L, 4,8 g/L, 4,9 g/L, 5 g/L, 5,1 g/L, 5,2 g/L, 5,3 g/L, 5,4 g/L, 5,5 g/L, 5,6 g/L, 5,7 g/L, 5,8 g/L, 5,9 g/L, 6 g/L, 6,1 g/L, 6,2 g/L, 6,3 g/L, 6,4 g/L, 6,5 g/L, 6,6 g/L, 6,7 g/L, 6,8 g/L, 6,9 g/L, 7 g/L, 7,1 g/L, 7,2 g/L, 7,3 g/L, 7,4 g/L, 7,5 g/L, 7,6 g/L, 7,7 g/L, 7,8 g/L, 7,9 g/L, 8 g/L, 8,1 g/L, 8,2 g/L, 8,3 g/L, 8,4 g/L, 8,5 g/L, 8,6 g/L, 8,7 g/L, 8,8 g/L, 8,9 g/L, 9 g/L, 9,1 g/L, 9,2 g/L, 9,3 g/L, 9,4 g/L, 9,5 g/L, 9,6 g/L, 9,7 g/L, 9,8 g/L, 9,9 g/L, 10 g/L, 10,1 g/L, 10,2 g/L, 10,3 g/L, 10,4 g/L, 10,5 g/L, 10,6 g/L, 10,7 g/L,

000095

10,8 g/L, 10,9 g/L, 11 g/L, 11,1 g/L, 11,2 g/L, 11,3 g/L, 11,4 g/L, 11,5 g/L, 11,6 g/L, 11,7 g/L, 11,8 g/L, 11,9 g/L, 12 g/L, 12,1 g/L, 12,2 g/L, 12,3 g/L, 12,4 g/L, 12,5 g/L, 12,6 g/L, 12,7 g/L, 12,8 g/L, 12,9 g/L, 13 g/L, 13,1 g/L, 13,2 g/L, 13,3 g/L, 13,4 g/L, 13,5 g/L, 13,6 g/L, 13,7 g/L, 13,8 g/L, 13,9 g/L, 14 g/L, 14,1 g/L, 14,2 g/L, 14,3 g/L, 14,4 g/L, 14,5 g/L, 14,6 g/L, 14,7 g/L, 14,8 g/L, 14,9 g/L, 15 g/L, 15,1 g/L, 15,2 g/L, 15,3 g/L, 15,4 g/L, 15,5 g/L, 15,6 g/L, 15,7 g/L, 15,8 g/L, 15,9 g/L, 16 g/L, 16,1 g/L, 16,2 g/L, 16,3 g/L, 16,4 g/L, 16,5 g/L, 16,6 g/L, 16,7 g/L, 16,8 g/L, 16,9 g/L, 17 g/L, 17,1 g/L, 17,2 g/L, 17,3 g/L, 17,4 g/L, 17,5 g/L, 17,6 g/L, 17,7 g/L, 17,8 g/L, 17,9 g/L, 18 g/L, 18,1 g/L, 18,2 g/L, 18,3 g/L, 18,4 g/L, 18,5 g/L, 18,6 g/L, 18,7 g/L, 18,8 g/L, 18,9 g/L, 19 g/L, 19,1 g/L, 19,2 g/L, 19,3 g/L, 19,4 g/L, 19,5 g/L, 19,6 g/L, 19,7 g/L, 19,8 g/L, 19,9 g/L, o 20 g/L.

[00185] En una forma de realización el polvo de maceración de maíz también se puede incorporar a lo largo del curso de la fermentación completa o a porción de la fermentación, en forma continua o administrada en intervalos. En otra forma de realización los niveles de uso incluyen mantener una concentración de nitrógeno de aproximadamente 0,05 g/L a aproximadamente 3 g/L (as nitrógeno), donde al menos una porción del nitrógeno se suministra a partir del polvo de maceración de maíz; aproximadamente 0,3 g/L a 1,3 g/L; o aproximadamente 0,4 g/L a aproximadamente 0,9 g/L. En otra forma de realización el nivel de nitrógeno es aproximadamente 0,05 g/L, 0,06 g/L, 0,07 g/L, 0,08 g/L, 0,09 g/L, 0,1 g/L, 0,11 g/L, 0,12 g/L, 0,13 g/L, 0,14 g/L, 0,15 g/L, 0,16 g/L, 0,17 g/L, 0,18 g/L, 0,19 g/L, 0,2 g/L, 0,21 g/L, 0,22 g/L, 0,23 g/L, 0,24 g/L, 0,25 g/L, 0,26 g/L, 0,27 g/L, 0,28 g/L, 0,29 g/L, 0,3 g/L, 0,31 g/L, 0,32 g/L, 0,33 g/L, 0,34 g/L, 0,35 g/L, 0,36 g/L, 0,37 g/L, 0,38 g/L, 0,39 g/L, 0,4 g/L, 0,41 g/L, 0,42 g/L, 0,43 g/L, 0,44 g/L, 0,45 g/L, 0,46 g/L, 0,47 g/L, 0,48 g/L, 0,49 g/L, 0,5 g/L, 0,51 g/L, 0,52 g/L, 0,53 g/L, 0,54 g/L, 0,55 g/L, 0,56 g/L, 0,57 g/L, 0,58 g/L, 0,59 g/L, 0,6 g/L, 0,61 g/L, 0,62 g/L, 0,63 g/L, 0,64 g/L, 0,65 g/L, 0,66 g/L, 0,67 g/L, 0,68 g/L, 0,69 g/L, 0,7 g/L, 0,71 g/L, 0,72 g/L, 0,73 g/L, 0,74 g/L, 0,75 g/L, 0,76 g/L, 0,77 g/L, 0,78 g/L,

000096

0,79 g/L, 0,8 g/L, 0,81 g/L, 0,82 g/L, 0,83 g/L, 0,84 g/L, 0,85 g/L, 0,86 g/L, 0,87 g/L, 0,88 g/L, 0,89 g/L, 0,9 g/L, 0,91 g/L, 0,92 g/L, 0,93 g/L, 0,94 g/L, 0,95 g/L, 0,96 g/L, 0,97 g/L, 0,98 g/L, 0,99 g/L, 1 g/L, 1,01 g/L, 1,02 g/L, 1,03 g/L, 1,04 g/L, 1,05 g/L, 1,06 g/L, 1,07 g/L, 1,08 g/L, 1,09 g/L, 1,1 g/L, 1,11 g/L, 1,12 g/L, 1,13 g/L, 1,14 g/L, 1,15 g/L, 1,16 g/L, 1,17 g/L, 1,18 g/L, 1,19 g/L, 1,2 g/L, 1,21 g/L, 1,22 g/L, 1,23 g/L, 1,24 g/L, 1,25 g/L, 1,26 g/L, 1,27 g/L, 1,28 g/L, 1,29 g/L, 1,3 g/L, 1,31 g/L, 1,32 g/L, 1,33 g/L, 1,34 g/L, 1,35 g/L, 1,36 g/L, 1,37 g/L, 1,38 g/L, 1,39 g/L, 1,4 g/L, 1,41 g/L, 1,42 g/L, 1,43 g/L, 1,44 g/L, 1,45 g/L, 1,46 g/L, 1,47 g/L, 1,48 g/L, 1,49 g/L, 1,5 g/L, 1,51 g/L, 1,52 g/L, 1,53 g/L, 1,54 g/L, 1,55 g/L, 1,56 g/L, 1,57 g/L, 1,58 g/L, 1,59 g/L, 1,6 g/L, 1,61 g/L, 1,62 g/L, 1,63 g/L, 1,64 g/L, 1,65 g/L, 1,66 g/L, 1,67 g/L, 1,68 g/L, 1,69 g/L, 1,7 g/L, 1,71 g/L, 1,72 g/L, 1,73 g/L, 1,74 g/L, 1,75 g/L, 1,76 g/L, 1,77 g/L, 1,78 g/L, 1,79 g/L, 1,8 g/L, 1,81 g/L, 1,82 g/L, 1,83 g/L, 1,84 g/L, 1,85 g/L, 1,86 g/L, 1,87 g/L, 1,88 g/L, 1,89 g/L, 1,9 g/L, 1,91 g/L, 1,92 g/L, 1,93 g/L, 1,94 g/L, 1,95 g/L, 1,96 g/L, 1,97 g/L, 1,98 g/L, 1,99 g/L, 2 g/L, 2,01 g/L, 2,02 g/L, 2,03 g/L, 2,04 g/L, 2,05 g/L, 2,06 g/L, 2,07 g/L, 2,08 g/L, 2,09 g/L, 2,1 g/L, 2,11 g/L, 2,12 g/L, 2,13 g/L, 2,14 g/L, 2,15 g/L, 2,16 g/L, 2,17 g/L, 2,18 g/L, 2,19 g/L, 2,2 g/L, 2,21 g/L, 2,22 g/L, 2,23 g/L, 2,24 g/L, 2,25 g/L, 2,26 g/L, 2,27 g/L, 2,28 g/L, 2,29 g/L, 2,3 g/L, 2,31 g/L, 2,32 g/L, 2,33 g/L, 2,34 g/L, 2,35 g/L, 2,36 g/L, 2,37 g/L, 2,38 g/L, 2,39 g/L, 2,4 g/L, 2,41 g/L, 2,42 g/L, 2,43 g/L, 2,44 g/L, 2,45 g/L, 2,46 g/L, 2,47 g/L, 2,48 g/L, 2,49 g/L, 2,5 g/L, 2,51 g/L, 2,52 g/L, 2,53 g/L, 2,54 g/L, 2,55 g/L, 2,56 g/L, 2,57 g/L, 2,58 g/L, 2,59 g/L, 2,6 g/L, 2,61 g/L, 2,62 g/L, 2,63 g/L, 2,64 g/L, 2,65 g/L, 2,66 g/L, 2,67 g/L, 2,68 g/L, 2,69 g/L, 2,7 g/L, 2,71 g/L, 2,72 g/L, 2,73 g/L, 2,74 g/L, 2,75 g/L, 2,76 g/L, 2,77 g/L, 2,78 g/L, 2,79 g/L, 2,8 g/L, 2,81 g/L, 2,82 g/L, 2,83 g/L, 2,84 g/L, 2,85 g/L, 2,86 g/L, 2,87 g/L, 2,88 g/L, 2,89 g/L, 2,9 g/L, 2,91 g/L, 2,92 g/L, 2,93 g/L, 2,94 g/L, 2,95 g/L, 2,96 g/L, 2,97 g/L, 2,98 g/L, 2,99 g/L, o 3 g/L.

[00186] En otra forma de realización, se pueden otros productos relacionados, tales como licor de maceración de maíz o sólidos de

000097

maceración de maíz. Cuando se usa licor de maceración de maíz, la tasa de uso debe ser aproximadamente la misma que para los sólidos de maceración de maíz sobre la base de los sólidos. En otra forma de realización, se añade el polvo de maceración de maíz (o sólidos o licor) en relación con la cantidad de sustrato de carbono que está presente o que se añadirá. Cuando se añade esta manera, las cantidades beneficiosas del polvo de maceración de maíz (o licor o sólidos) pueden incluir aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:6 g/g de carbono, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:5 g/g de carbono, o aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:4 g/g de carbono. En otra forma de realización se usan relaciones tan altas como aproximadamente 1,5:1 g/g de carbono o aproximadamente 3:1 g/g de carbono o tan bajas como aproximadamente 1: 8 g/g de carbono o aproximadamente 1:10 g/g de carbono. En otra forma de realización la relación es 2:1 g/g de carbono, 1,9:1 g/g de carbono, 1,8:1 g/g de carbono, 1,7:1 g/g de carbono, 1,6:1 g/g de carbono, 1,5:1 g/g de carbono, 1,4:1 g/g de carbono, 1,3:1 g/g de carbono, 1,2:1 g/g de carbono, 1,1:1 g/g de carbono, 1:1 g/g de carbono, 1:1,1 g/g de carbono, 1:1,2 g/g de carbono, 1:1,3 g/g de carbono, 1:1,4 g/g de carbono, 1:1,5 g/g de carbono, 1:1,6 g/g de carbono, 1:1,7 g/g de carbono, 1:1,8 g/g de carbono, 1:1,9 g/g de carbono, 1:2 g/g de carbono, 1:2,1 g/g de carbono, 1:2,2 g/g de carbono, 1:2,3 g/g de carbono, 1:2,4 g/g de carbono, 1:2,5 g/g de carbono, 1:2,6 g/g de carbono, 1:2,7 g/g de carbono, 1:2,8 g/g de carbono, 1:2,9 g/g de carbono, 1:3 g/g de carbono, 1:3,1 g/g de carbono, 1:3,2 g/g de carbono, 1:3,3 g/g de carbono, 1:3,4 g/g de carbono, 1:3,5 g/g de carbono, 1:3,6 g/g de carbono, 1:3,7 g/g de carbono, 1:3,8 g/g de carbono, 1:3,9 g/g de carbono, 1:4 g/g de carbono, 1:4,1 g/g de carbono, 1:4,2 g/g de carbono, 1:4,3 g/g de carbono, 1:4,4 g/g de carbono, 1:4,5 g/g de carbono, 1:4,6 g/g de carbono, 1:4,7 g/g de carbono, 1:4,8 g/g de carbono, 1:4,9 g/g de carbono, 1:5 g/g de carbono, 1:5,1 g/g de carbono, 1:5,2 g/g de carbono, 1:5,3 g/g de carbono, 1:5,4 g/g de carbono, 1:5,5 g/g de carbono, 1:5,6 g/g de carbono, 1:5,7 g/g de carbono, 1:5,8 g/g de carbono, 1:5,9 g/g de carbono, 1:6 g/g de carbono, 1:6,1 g/g de carbono, 1:6,2 g/g de carbono, 1:6,3 g/g de carbono, 1:6,4 g/g de carbono, 1:6,5 g/g de carbono, 1:6,6 g/g de

000099

carbano, 1:6,7 g/g de carbano, 1:6,8 g/g de carbano, 1:6,9 g/g de carbano, 1:7 g/g de carbano, 1:7,1 g/g de carbano, 1:7,2 g/g de carbano, 1:7,3 g/g de carbano, 1:7,4 g/g de carbano, 1:7,5 g/g de carbano, 1:7,6 g/g de carbano, 1:7,7 g/g de carbano, 1:7,8 g/g de carbano, 1:7,9 g/g de carbano, 1:8 g/g de carbano, 1:8,1 g/g de carbano, 1:8,2 g/g de carbano, 1:8,3 g/g de carbano, 1:8,4 g/g de carbano, 1:8,5 g/g de carbano, 1:8,6 g/g de carbano, 1:8,7 g/g de carbano, 1:8,8 g/g de carbano, 1:8,9 g/g de carbano, 1:9 g/g de carbano, 1:9,1 g/g de carbano, 1:9,2 g/g de carbano, 1:9,3 g/g de carbano, 1:9,4 g/g de carbano, 1:9,5 g/g de carbano, 1:9,6 g/g de carbano, 1:9,7 g/g de carbano, 1:9,8 g/g de carbano, 1:9,9 g/g de carbano, o 1:10 g/g de carbano.

Tabla 5. Características de la composición del polvo de maceración de maíz (fuente (excepto como se indica): planilla de datos del producto para el licor de maceración de maíz secado por aspersión, Roquette, Solulys 095E).

Parámetro	Valor
Pérdida en el secado	5,5% de máximo
pH en solución	3,9-4,5
acidez total (como ácido láctico)	14-20%
azúcares reductores	1,5% de máximo
nitrógeno de amino	1,5-3,5%
Nitrógeno total	7,0-8,5%
Cenizas	13,5-17,5%
Fósforo (como P)	2,4-3,2%
Contenido de proteína (N x 6,25)	48% (aproximadamente)
Ácido fítico (base peso seco)	8% (fuente: W01997035489 19971002; A Process for Obtaining Phytic Acid and Lactic Acid)

000099

Tabla 6. Contenido de aminoácidos típicos en el licor de maceración de maíz (fuente: J. Nielsen, "Physiological Engineering Aspects of *Penicillium Chrysogenum*," Tabla 8,3, p. 243 (World Scientific 1997)).

Aminoácido	Libre g/kg de peso seco	Total g/kg de peso seco
Alanina	40,7	54,5
Arginina	2,4	20,3
Aspartato	2,2	19,9
Cisteína	0	1,3
Glutamato	7,7	40,2
Glicina	6,6	26,8
Histidina	0	31,8
Isoleucina	11,2	17,3
Leucina	35,5	39,3
Lisina	0	14,8
Metionina	6,5	6,9
Fenilalanina	26,2	27,4
Prolina	27,7	48,2
Serina	10,7	19,0
Treonina	9,3	20,7
Tirosina	1,3	6,5
Valina	20,1	30,5

[00187] En una forma de realización, los resultados beneficiosos de la fermentación se pueden obtener por la adición del polvo de maceración de maíz en combinación con el extracto de levadura a la fermentación. Se pueden obtener resultados beneficiosos con el polvo de maceración de maíz en combinación con el extracto de levadura en los métodos de las formas de realización en los niveles de uso del polvo de maceración de maíz de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 g/L, aproximadamente 5 a aproximadamente 15 g/L, o aproximadamente 8 a aproximadamente 12 g/L y los niveles de uso del extracto de levadura de aproximadamente 3 a 50 g/L, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 g/L, o aproximadamente 10 a aproximadamente 30 g/L. El polvo de maceración de maíz y el extracto de levadura también se pueden

000100

incorporar a lo largo del curso de la fermentación completa o una porción de la fermentación, en forma continua o administrada en intervalos.

[00188] En otras formas de realización, los compuestos beneficiosos del polvo de maceración de maíz y/o extracto de levadura, tales como glicina, histidina, isoleucina, prolina, o fitato así como las combinaciones de estos compuestos se pueden añadir al medio o caldo para obtener un efecto beneficioso.

[00189] Varias formas de realización de la invención ofrecen beneficios relacionados con el aumento del título y/o productividad de la producción de alcohol por *Clostridium phytofermentans* por el cultivo del organismo en un medio que comprende uno o más compuestos que comprenden restos de ácido grasos particulares y/o cultivo del organismo en las condiciones de pH controlado.

[00190] La producción de niveles altos de alcohol requiere la capacidad del organismo para crecer generalmente en presencia de niveles elevados de alcohol y la capacidad para continuar produciendo alcohol sin inhibición o supresión indebida por el alcohol y/u otros componentes presentes. Con frecuencia, diferentes vías metabólicas estarán implicadas para cada una de estas. Por ejemplo, las vías relacionadas con el crecimiento celular en general incluyen las relacionadas con la producción de proteína, producción de membrana así como la producción de todos los subsistemas celulares necesarios para que la célula sobreviva. Las vías relacionadas con la producción de alcohol con frecuencia serán más específicas, tales como las vías relacionadas con el metabolismo de azúcares que llevan a la producción del alcohol y las enzimas que son necesarias para la producción del alcohol e intermediarios. La vía para un alcohol, por ejemplo, etanol, pueden compartir algunas enzimas similares, etc., pero también tendrán enzimas y sustratos únicos para esta vía. Si bien existe alguna superposición entre estos conjuntos de vías, no se espera que el aumento de una producirá automáticamente el aumento de la otra.

[00191] En algunos casos, la intolerancia al alcohol o toxicidad inducida por alcohol puede estar relacionada con la

000101

permeabilización de la membrana celular por niveles elevados de alcohol, que llevan a la pérdida de enzimas y nutrientes intracelulares. En algunos otros casos, la tolerancia al alcohol y la capacidad para producir títulos altos de alcohol se relacionada con la capacidad de las enzimas intracelulares de resistir la desnaturalización por el alcohol presente, por ejemplo, dentro de la célula, sea debido a la producción por la célula misma o del transporte a través de la membrana celular. En algunos casos, una membrana más robusta permitirá que un gradiente de alcohol mayor esté presente a través de la membrana, de este modo permite que las células crezcan y/o continúen produciendo alcohol a mayores concentraciones de alcohol externas. Se ha demostrado con *Clostridium phytofermentans* que en algunos procesos de fermentación una concentración de etanol alcanza una meseta de aproximadamente 15 g/L después de aproximadamente 36 - 48 horas de fermentación discontinua, el sustrato de carbono permanece en el caldo. En una forma de realización, reducir el pH de la fermentación a aproximadamente 6,5 y/o añadir ácidos grasos insaturados produce un aumento significativo de la cantidad de etanol producida por el organismo, aproximadamente 35 g/L de etanol se observan en el caldo después de una fermentación de 72 horas. En otra forma de realización se observó que la productividad del organismo fue más alta (a aproximadamente 0 g/L-d) cuando el título de etanol fue bajo y menor (a aproximadamente 2 g/L-d) cuando la concentración de etanol fue más alta. La fermentación con pH reducido y/o con la adición de ácido grasos produjo aproximadamente un aumento de cinco veces en la tasa de producción de etanol.

[00192] En una forma de realización, el microbio Q fermenta con un sustrato a aproximadamente pH 5-8,5 En una forma de realización un microbio Q fermenta a pH de aproximadamente 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, o 8,5.

Componente del medio de ácido graso

000102

[00193] En un aspecto, la invención proporciona composiciones para producir alcohol, *por ejemplo*, etanol, que comprende un cultivo de *Clostridium phytofermentans* en un medio que comprende un ácido graso que comprende compuesto. El medio también puede incluir una fuente de carbono de biomasa tales como cultivos agrícolas, residuos de cultivo, árboles, astillas de madera, aserrín, papel, cartón u otros materiales que contienen celulosa, hemicelulosa, lignocelulosa, pectina, poliglucosa, polifruetosa, y/o formas hidrolizadas de estos (en forma colectiva, "Materia prima"). Pueden estar presentes nutrientes adicionales que incluyen compuestos que contienen azufre y nitrógeno tales como aminoácidos, proteínas, proteínas hidrolizadas, amoníaco, urea, nitrato, nitrito, soja, derivados de soja, caseína, derivados de caseína, polvo de leche, derivados de leche, suero, extracto de levadura, levadura hidrolizada, levadura autolizada, licor de maceración de maíz, sólidos de maceración de maíz, glutamato monosódico y/o otras fuentes de fermentación de nitrógeno, vitaminas, cofactores y/o suplementos minerales. La materia prima se puede pretratar o no, tal como se describe en la Solicitud de patente provisional U.S. No. 61/032048, presentada el 27 de febrero de 2008 o Solicitud provisional U.S. presentada en forma concurrente con esta solicitud el 9 de marzo de 2009 como Solicitud de patente provisional U.S. No. 61/158-581, que se incorporan por referencia en su totalidad. Los procedimientos y las técnicas para cultivar el organismo para producir un combustible u otro agente químico tal como se describe en la Solicitud U.S. de patente provisional incorporada Nos. 61/032048 o Solicitud provisional U.S. presentada en forma concurrente con esta solicitud el 9 de marzo de 2009 como Solicitud de patente provisional U.S. No. 61/158,581, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[00194] En una forma de realización un compuesto que comprende ácido graso de la composición puede ser un ácido graso libre, sal o jabón de ácido graso, triacilglicérido, diacilglicérido, monoacilglicérido, fosfolípido, lisofosfolípido, éster de ácido graso, o amida de ácido graso. El éster de ácido graso puede comprender un alcohol de cadena larga, alcohol de cadena corta,

000103

alcohol de cadena media, alcohol monohidrato, alcohol dihidrico, alcohol trihidrico, alcohol polihidrico, alcohol ramificado u otro compuesto que comprende un grupo hidroxilo. Los ésteres preferidos incluyen los de metanol (metil ésteres de ácido graso), etanol (etil ésteres de ácido graso), n-propanol (o propil ésteres de ácido graso) e isopropanol (isopropil ésteres de ácido graso), pero también se pueden utilizar otros alcoholes tal como los que tienen 4 a 20 carbonos. En algunos casos, también se pueden usar los alcoholes de cadena más larga y alcoholes polihidricos. Los alcoholes de cadena más larga y alcoholes polihidricos incluyen glicoles (por ejemplo etilenglicol, propilenglicol, etc.), glicerol, xilitol, manitol, sorbitol, arabitol, o compuestos tales como poliéteres que contienen uno o más grupos hidroxilo y polietilenglicoles. Cuando más de un grupo hidroxilo está presente, uno o más de estos grupos puede unirse a otro resto químico (por ejemplo, como un éster, una amida, un éter, etc.) o puede ser grupos hidroxilo libres.

[00195] En otra forma de realización un ácido graso puede comprender cadenas de carbonos de 8 a 40 carbonos, y con preferencia 12 a 24 carbonos. Formas de realización particulares pueden utilizar un ácido graso única o una mezcla de ácidos grasos. Cuando se usa un alcohol polihidrico, el ácido graso se puede unir a solo un grupo hidroxilo o a más de un grupo hidroxilo. En algunas formas de realización, más de una especie de ácido graso se puede unir a un solo alcohol polihidrico. Los ejemplos de ácidos grasos múltiples unidos a un solo alcohol polihidrico incluyen grasas y aceites tales como los derivados de animales y vegetales, que incluyen maíz, canola, cártamo, colza, girasol, soja, oliva, maní, palma, nuez de palmera, pescado, semilla de ricino, sebo, grasa de cerdo, así como glicéridos y fosfolípidos parciales.

[00196] Si bien se puede usar cualquier ácido graso C8-C30, los ácidos grasos preferidos incluyen ácidos grasos insaturados, tales como los con 1, 2, 3, o más dobles enlaces carbono-carbono. Se prefieren particularmente los que tienen una insaturación en la posición omega-9 (medida desde el extremo no carboxilo) o la

000104

posición delta-9 (medida desde el extremo carboxilo). Una instauración en una o ambas posiciones también se puede acompañar con instauraciones en otras posiciones. Asimismo, si bien se pueden usar ácidos grasos con cadenas de carbonos de 8 a 30 carbonos, se prefieren los que tienen cadenas de carbonos de 8 a 28 o 12 a 24, o 16 a 18 carbonos. Los ejemplos de tales ácido grasos incluyen oleico, esteárico, palmítico, palmitoleico, linoleico, linolénico, láurico, mirístico, araquídico, behénico, gadoleico, erúcico, moróctico, o araquidónico. En algunos casos, un enlace doble carbono-carbono puede estar en una configuración cis, y en algunos casos un enlace doble carbono-carbono puede estar en una configuración trans. En algunos casos, puede estar más de un enlace doble carbono-carbono. Algunos ácidos grasos adecuados pueden tener uno o más enlaces dobles carbono-carbono cis y uno o más trans, tales como los con ácido linolénico conjugado y algunos otros ácidos grasos, mientras que algunos ácidos grasos adecuados pueden tener todos los enlaces doble carbono-carbono en una configuración cis o en una configuración trans.

[00197] En una forma de realización un compuesto que comprende uno o más ácido grasos ("ácido grasos") se pueden añadir al medio en forma previa, intermedia, o tardía en un proceso de fermentación de *Clostridium phytofermentans*. En una forma de realización, el compuesto de ácido graso se puede añadir durante una o más de las etapas de siembra de la fermentación. En varias formas de realización, un compuesto de ácido graso se pueden añadir antes de la inoculación del medio con *Clostridium phytofermentans*, o después de la inoculación, o en simultáneo con la inoculación. En otra forma de realización, los ácido grasos se pueden añadir a un medio de fermentación final, y se pueden añadir antes de la inoculación, después de la inoculación, o en simultáneo con la inoculación del medio con *Clostridium phytofermentans*. En algunas formas de realización, los ácidos grasos se pueden añadir en varias dosis o continuamente durante al menos una porción de la fermentación. Con máxima preferencia, los ácidos grasos se pueden añadir después de que el alcohol, por ejemplo, etanol, comienza a acumularse en la fermentación. En una

000105

forma de realización, los ácidos grasos se añaden cuando la concentración de alcohol alcanza entre aproximadamente 2 g/L a 50 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se añaden cuando la concentración de alcohol alcanza entre aproximadamente 2 g/L a 10 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se añaden cuando la concentración de alcohol alcanza entre aproximadamente 5 g/L a 40 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se añaden cuando la concentración de alcohol alcanza entre aproximadamente 10 g/L a 30 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se añaden cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 2 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 5 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 10 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 15 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 20 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 25 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 30 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 35 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 40 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 45 g/L. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir cuando la concentración de alcohol alcanza aproximadamente 50 g/L. En algunas formas de realización, el ácido graso se puede añadir con uno o más componentes del medio o cerca del comienzo de la fermentación, así como se puede suplementar durante la fermentación. En una forma de realización los ácidos grasos se añaden cuando la concentración de alcohol es 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L, 10 g/L, 11 g/L, 12 g/L, 13

g/L, 14 g/L, 15 g/L, 16 g/L, 17 g/L, 18 g/L, 19 g/L, 20 g/L, 21 g/L, 22 g/L, 23 g/L, 24 g/L, 25 g/L, 26 g/L, 27 g/L, 28 g/L, 29 g/L, 30 g/L, 31 g/L, 32 g/L, 33 g/L, 34 g/L, 35 g/L, 36 g/L, 37 g/L, 38 g/L, 39 g/L, 40 g/L, 41 g/L, 42 g/L, 43 g/L, 44 g/L, 45 g/L, 46 g/L, 47 g/L, 48 g/L, 49 g/L, o 50 g/L

[00198] En una forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir en forma de una solución en un alcohol; *por ejemplo*, etanol. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir como un coloide. En otra forma de realización, los ácidos grasos se pueden añadir con un tensioactivo.

[00199] Si bien la cantidad de compuesto de ácido graso para añadir puede variar con la forma del compuesto de ácido graso (por ejemplo un triacilglicérido o un fosfolípido), y el ácido graso específico o combinación de los ácidos grasos añadidos (por ejemplo, ácido oleico o palmitoleico), una cantidad adecuada del compuesto de ácido graso puede ser de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 3 g/L, informado como ácido graso libre. En algunas formas de realización, que incluyen las corridas de duración extendida o aquellas con producción intensiva de alcohol o crecimiento celular, el nivel de ácido graso se puede mantener dentro del rango de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 3 g/L o ciclar mediante el rango de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 3 g/L, informado como ácido graso presente en el sobrenadante se adsorbe en la superficie de las células o superficies sólidas tales como sustrato o equipamiento. Las técnicas adecuadas para medir el nivel de ácido graso incluye separar al menos una porción del sobrenadante del caldo, con o sin la adición de un auxiliar de solvatación, para asistir en la desorción o solubilización del compuesto que comprende ácidos grasos, y analizar el contenido de ácido graso con, por ejemplo un cromatógrafo de gases. Cuando la fermentación opera como discontinua alimentada, el compuesto de ácido graso se puede añadir todas de una vez, o se puede añadir en porciones o continuamente, tal como en relación con los componentes del medio incorporados al fermentador.

[00200] En algunas formas de realización, la velocidad a la que el ácido graso es captado por el organismo se modifica por la

provisión del ácido graso en una forma que solo tiene interacción limitada con el organismo, y luego la adición de un compuesto que permite aumento de la interacción con el organismo. Una forma que está presente en una fase separada o una fase que no puede ser consumida por el organismo son los ejemplos de las formas que tienen interacción limitada con el organismo. Los compuestos que aumentan la interacción son los que pueden hidrolizar la forma del ácido graso que está presente, tales como los que tienen actividad de lipasa, actividad de fosfolipasa, ácidos, bases, etc., o pueden solvatar los ácidos grasos.

Condiciones de cultivo ácido

[00201] En otro aspecto, la invención proporciona métodos de producir alcohol; por ejemplo, etanol, que comprende cultivar *Clostridium phytofermentans* en un medio en condiciones de pH controlado. En una forma de realización, un cultivo de *Clostridium phytofermentans* se puede cultivar a un pH ácido. El medio en que crecer el cultivo pueden incluir una fuente de carbono tal como cultivos agrícolas, residuos de cultivo, árboles, astillas de madera, aserrín, papel, cartón u otros materiales que contienen celulosa, hemicelulosa, lignocelulosa, pectina, poliglucosa, polifruktosa, y/o formas hidrolizadas de estos (en forma colectiva, "Materia prima"). Pueden estar presentes nutrientes adicionales que incluyen compuestos que contienen azufre y nitrógeno tales como aminoácidos, proteínas, proteínas hidrolizadas, amoníaco, urea, nitrato, nitrito, soja, derivados de soja, caseína, derivados de caseína, polvo de leche, derivados de leche, suero, extracto de levadura, levadura hidrolizada, levadura autolizada, licor de maceración de maíz, sólidos de maceración de maíz, glutamato monosódico y/o otras fuentes de fermentación de nitrógeno, vitaminas, cofactores y/o suplementos minerales. La materia prima se puede pretratar o no, tal como se describe en la Solicitud de patente provisional U.S. No. 61/032048, presentada el 27 de febrero de 2008 Solicitud provisional U.S. No. 61/158,581, presentada el 9 de marzo de 2009, que se incorporan por referencia en su totalidad. Los

000108

procedimientos y las técnicas para cultivar el organismo para producir un combustible u otro agente químico tal como se describe en la Solicitud U.S. de patente provisional incorporada Nos. 61/032048 o Solicitud provisional U.S. presentada en forma concurrente con esta solicitud el 9 de marzo de 2009 como Solicitud de patente provisional U.S. No. 61/158.581, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[00202] En una forma de realización, el pH del medio está controlado a menos de aproximadamente pH 7,2 para al menos una porción de la fermentación. En formas de realización preferidas, el pH se controla dentro de un rango de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente 7,1 o aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente 7,1, o aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente 6,3, o aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente 6,3, o aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente 6,5, o aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente 6,9 o aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente 6,7. El pH se puede controlar por la adición de un modificador de pH. En estas formas de realización, un modificador de pH puede ser un ácido, una base, un buffer, o un material que reacciona con otros materiales presentes para servir para elevar o reducir el pH. En algunas formas de realización, se puede usar más de un modificador de pH, tal como más de un ácido, más de una base, uno o más ácidos con una o más bases, uno o más ácidos con uno o más buffer, una o más bases con uno o más buffer, o uno o más ácidos con una o más bases con uno o más buffer. Cuando se utilizan más de un modificador de pH, estos se pueden añadir en el mismo momento o en momentos diferentes. En algunas formas de realización, uno o más ácidos y una o más bases se pueden combinar, lo que da origen a un buffer. En algunas formas de realización, los componentes del medio, tales como una fuente de carbono o una fuente de nitrógeno también puede servir como un modificador de pH; los componentes del medio adecuados incluyen los que tienen pH alto o bajo o aquellos con capacidad buffer. Los ejemplos de componentes del medio incluyen polisacáridos vegetales hidrolizados con ácido o base que tienen ácido o base residual, material de planta tratado por AFEX con amoníaco, ácido láctico, sólidos de o licor maceración de maíz residuales.

000109

[00203] En algunas formas de realización, el modificador de pH se puede añadir como una parte de los componentes del medio antes de la inoculación con el *Clostridium phytofermentans*. En otras formas de realización, el modificador de pH también se puede añadir después de la inoculación con el *Clostridium phytofermentans*. En algunas formas de realización, se puede añadir capacidad buffer suficiente a la fermentación de semilla por medio de varios modificadores de pH y/u otros componentes del medio y/o metabolitos para proporcionar adecuado control de pH durante la etapa de fermentación final. En otros casos, el modificador de pH se puede añadir solo en la etapa de fermentación final. En aún otros casos, el modificador de pH se puede añadir tanto en la etapa de siembra como la etapa final. En una forma de realización, el pH se controla a lo largo de la fermentación y se ajusta en respuesta a los cambios en la fermentación. En una forma de realización, el modificador de pH se añade siempre que el pH de la fermentación cambie por un valor de pH de aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 o más en cualquier etapa de la fermentación. En otras formas de realización, el modificador de pH se añade siempre que el contenido de alcohol de la fermentación sea aproximadamente 0,5 g/L, 1,0 g/L, 2,0 g/L, o 5,0 g/L o más. En algunos casos se puede utilizar diferentes tipos de modificadores de pH en diferentes etapas o puntos de la fermentación, tales como un buffer que se usa en la etapa de siembra, y base y/o ácido añadido en el fermentador final, o un ácido que se usa en un momento y una base en otro momento.

[00204] En algunas formas de realización, se puede utilizar un pH constante en toda la fermentación. En algunas formas de realización, puede ser ventajoso comenzar la fermentación a un pH, y luego reducir el pH durante el curso de la fermentación. En formas de realización en que se reduce el pH, el pH se puede reducir de modo escalonado o un modo más gradual. Los tiempos adecuados para reducir el pH incluyen durante una fase de reposo de crecimiento celular, durante una fase exponencial de crecimiento celular, durante una fase estacionaria del crecimiento celular, durante una fase de muerte del crecimiento

000110

celular, o antes o durante los períodos de proliferación celular. En algunas formas de realización el pH se puede reducir durante más de un fase de crecimiento. Si bien en algunas formas de realización, el pH se puede reducir de modo escalonado, tales como en el cambio que se produce durante un período de aproximadamente 10 minutos o menos, se puede obtener el crecimiento ventajoso en algunas formas de realización por la reducción del pH más gradualmente, tal como un período de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente seis horas o más. En algunas formas de realización, el tiempo y/o la cantidad de reducción del pH se puede relacionar con las condiciones de crecimiento de las células, tales como en relación con el recuento celular, el alcohol producido, el alcohol presente, o la velocidad de producción de alcohol. En algunas formas de realización, la reducción de pH se puede realizar en relación con las propiedades físicas o químicas de la fermentación, tales como viscosidad, composición del medio, producción del gas, composición de gases residuales, etc.

[00205] Los ejemplos no limitantes de buffer adecuados incluyen sales de ácido fosfórico, que incluyen sales monobásicas, dibásicas, y tribásicas, mezclas de estas sales y mezclas con el ácido; sales de ácido cítrico, que incluyen las diversas formas básicas, mezclas y mezclas con el ácido; y sales de carbonato.

[00206] Los ácidos y bases adecuados que se pueden usar como modificadores de pH incluyen cualquier ácido o base líquido o gaseoso que es compatible con el organismo. Los ejemplos incluyen amoníaco, hidróxido de amonio, ácido sulfúrico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fosfórico, hidróxido de sodio, y HCl. En algunos casos, la selección del ácido o base pueden ser influidas por la compatibilidad del ácido o base con equipamiento usado para la fermentación. En algunos casos, se pueden usar tanto la adición de un ácido, para reducir el pH o consumir base y una adición de base, para elevar el pH o consumir ácido, en la misma fermentación.

[00207] Se pueden determinar el tiempo y la cantidad del modificador de pH para añadir a partir de una medición del pH de los contenidos del fermentador, tales como por tomar una muestra

000111

o por sumergir una sonda de pH, o se puede determinar sobre la base de otros parámetros tales como el tiempo de la fermentación, generación de gas, viscosidad, producción de alcohol, titulación, etc. En algunas formas de realización, se puede usar una combinación de estas técnicas.

[00208] En una forma de realización, el pH de la fermentación comienza a un pH neutro y luego se reduce a un pH ácido cuando se detecta la producción de alcohol. En otra forma de realización, el pH de la fermentación comienza con un pH ácido y se mantiene en un pH ácido hasta que la fermentación alcanza una fase de crecimiento estacionario.

Componente del medio de ácido graso y condiciones del cultivo

[00209] En otra forma de realización, se puede usar una combinación de la adición de un compuesto que comprende ácido graso al medio y la fermentación a pH reducido. En algunas formas de realización, la adición de un ácido graso, tal como un ácido graso libre cumple ambas técnicas: añadir un compuesto de ácido graso y reducir el pH de la fermentación. En otras formas de realización, se pueden añadir diferentes compuestos para obtener cada técnica. Por ejemplo, se puede añadir un aceite vegetal al medio para aportar el ácido graso y luego se puede añadir un ácido mineral o un ácido orgánico durante la fermentación para reducir el pH a un nivel adecuado, como se describió antes. Cuando la fermentación incluye ambas operaciones de pH reducido y adición de compuesto que comprende ácido grasos, los métodos y técnicas descriptos en la presente para cada tipo de operación por separado se pueden usar juntas. En algunas formas de realización, la operación a pH bajo y la presencia del compuesto que comprende ácido grasos será al mismo tiempo. En algunas formas de realización, la presencia de compuesto que comprende ácido grasos precederá la operación a pH bajo, y en algunas formas de realización operación a pH bajo precederá la adición de compuesto que comprende ácido grasos. En algunas formas de realización, la operación a pH bajo y la presencia del ácido graso serán antes de la inoculación con el *Clostridium phytofermentans*. En algunas formas de realización, la operación a pH bajo serán antes de la inoculación con el *Clostridium*

phytofermentans y la presencia del ácido graso ocurrirá después o durante la inoculación con el *Clostridium phytofermentans*. En algunas formas de realización, la presencia de ácido graso será antes de la inoculación con el *Clostridium phytofermentans* y la operación a pH bajo ocurrirá después o durante la inoculación con el *Clostridium phytofermentans*. En otras formas de realización, la operación a pH bajo y la presencia del ácido graso será después de la inoculación con el *Clostridium phytofermentans*. En algunas formas de realización, la operación a pH bajo y la presencia del ácido graso será en otras etapas de la fermentación.

Modificación genética del *Clostridium phytofermentans*

[00210] En otro aspecto, la invención proporciona composiciones y métodos para producir un combustible tal como uno o más alcoholes, por ejemplo, etanol, por la creación y uso de *Clostridium phytofermentans* modificado genéticamente. Esta invención contempla, en particular, la regulación de las vías bioquímicas fermentativas, la expresión de enzimas sacarolíticas, o aumento de tolerancia de las condiciones ambientales durante la fermentación del *Clostridium phytofermentans*. En una forma de realización, *Clostridium phytofermentans* se transforma con polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más genes para la vía, enzima, o proteínas de interés. En otra forma de realización, *Clostridium phytofermentans* se transforma para producir múltiples copias de uno o más genes para la vía, enzima, o proteínas de interés. En una forma de realización, *Clostridium phytofermentans* se transforma con polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más genes que codifican enzimas para la hidrólisis y/o fermentación de una hexosa, donde dichos genes se expresan en niveles suficientes para conferir a dicho transformante de *Clostridium phytofermentans* la capacidad de producir etanol a concentraciones aumentadas, niveles de productividad o rendimientos aumentados en comparación con el *Clostridium phytofermentans* que no está transformado. De tal modo, se puede obtener un aumento de la tasa de producción de etanol.

000113

[00211] En otra forma de realización, el *Clostridium phytofermentans* se transforma con polinucleótidos heterólogos que codifica uno o más genes que codifican enzimas sacarolíticas para la sacarificación de un polisacárido, donde dichos genes se expresan en niveles suficientes para conferir a dicho transformante de *Clostridium phytofermentans* la capacidad de sacarificar un polisacárido a mono-, di- o oligosacáridos en concentraciones aumentadas, tasas de sacarificación o rendimientos de mono-, di- o oligosacáridos en comparación con *Clostridium phytofermentans* que no está transformado. La producción de una enzima sacarolítica por el huésped, y la posterior liberación de esta enzima sacarolítica en el medio, reduce la cantidad de enzima comercial necesaria para degradar la biomasa o polisacáridos en monosacáridos y oligosacáridos fermentables. El ADN sacarolítico puede ser nativo para el huésped, aunque mas frecuentemente el ADN será extraño, es decir, heterólogo. Los genes sacarolíticos ventajosos incluyen enzimas celulolíticas, xilanolíticas, y degradadoras de almidón tales como celulasas, xilanasas, glucanasas y amilasas. Las enzimas sacarolíticas puede ser secretadas al menos parcialmente por el huésped, o se pueden acumular en forma sustancialmente intracelular para la posterior liberación. En forma ventajosa, las enzimas acumuladas en forma intracelular que son termoestables se pueden liberar cuando sea deseado por lisis inducida por calor. Las combinaciones de enzimas pueden ser codificadas por ADN heterólogo, alguna de los cuales se secretan y algunos de los cuales se acumulan.

[00212] Se pueden realizar otras modificaciones para mejorar la producción de etanol de las bacterias recombinantes de la presente invención. Por ejemplo, el huésped también puede comprender un segmento de ADN heterólogo adicional, cuyo producto de expresión está involucrado en el transporte de mono- y/u oligosacáridos en el huésped recombinante. Asimismo, los genes adicionales de la vía glicolítica se pueden incorporar en el huésped. De tal manera, se puede obtener un aumento de la tasa de producción de etanol.

. 000114

[00213] A fin de aumentar la producción de biocombustibles (por ejemplo etanol), se pueden realizar modificaciones en los reguladores de la transcripción, genes para la formación de ácidos orgánicos, genes transportadores de carbohidratos, genes de la esporulación, genes que influyen en la formación/regeneración de los cofactores enzimáticos, genes que influyen en la tolerancia a etanol, genes que influyen en la tolerancia a la sal, genes que influyen en la velocidad de crecimiento, genes que influyen en la tolerancia al oxígeno, genes que influyen en la represión de catabolitos, genes que influyen en la producción de hidrógeno, genes que influyen en la producción de metano, genes que influyen en la resistencia a los metales pesados, genes que influyen en la resistencia a ácidos o genes que influyen en la resistencia a los aldehídos

[00214] Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar numerosas modificaciones a los métodos ejemplificados en la presente. Por ejemplo, se puede utilizar una variedad de promotores para dirigir la expresión de los genes heterólogos en un microorganismo huésped *Clostridium phytofermentans*. El profesional experto, que obtiene un beneficio de la presente descripción, podrá elegir y utilizar fácilmente cualquiera de los diversos promotores disponibles para este fin. De modo similar, los profesionales expertos, debido a la preferencia habitual, pueden utilizar un número de copias de plásmidos superior. En otra forma de realización, los constructos se pueden preparar por la integración cromosómica de los genes deseados. La integración cromosómica de los genes extraños puede ofrecer varias ventajas respecto de las construcciones basadas en plásmidos, esta última tiene ciertas limitaciones para los procesos comerciales. Los genes etanologénicos se han integrado en forma cromosómica en *E. coli* B; ver Ohta et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57:893-900. En general esto se logra por la purificación de un fragmento de ADN que contiene (1) los genes deseados corriente arriba de un gen resistencia a antibiótico y (2) un fragmente de ADN homólogo del organismo blanco. Este ADN se puede ligar para formar círculos sin replicones y usar para la transformación. En consecuencia, el gen de interés se puede introducir en un huésped

heterólogo tal como *E. coli*, y se pueden aislar fragmentos aleatorios cortos y ligar en el *Clostridium phytofermentans* para promover la recombinación homóloga.

Planta de biocombustible y proceso de producir biocombustible:

[00215] Producción en gran escala de etanol de la biomasa

[00216] En general, existen dos estrategias básicas para producir etanol de grado combustible a partir de la biomasa en gran escala utilizando células microbianas, en especial células de *C. phytofermentans*. En el primer método, un primer microorganismo hidroliza un material de biomasa que incluye carbohidratos de peso molecular más alto a carbohidratos de peso molecular más bajo, y luego fermenta los carbohidratos de peso molecular más bajo utilizando células microbianas para producir etanol. En el segundo método, se fermenta el material de biomasa mismo sin pretratamiento químico y/o enzimático. En el primer método, la hidrólisis se puede lograr por medio de ácidos, por ejemplo, ácidos Bronsted (por ejemplo, ácido sulfúrico o clorhídrico), bases, por ejemplo, hidróxido de sodio, proceso hidrotérmicos, explosión de vapor, procesos de expansión con fibra de amoníaco ("AFEX"), procesos de cal, enzimas, o combinación de estas. El hidrógeno, y otros productos de la fermentación se pueden capturar y purificar, si se desea, o se descarta, por ejemplo, por combustión. Por ejemplo, el gas hidrógeno se puede quemar, o usar como fuente de energía en el proceso, por ejemplo, para hacer funcionar una caldera, por ejemplo, por combustión. La hidrólisis y/o el tratamiento de vapor de la biomasa, por ejemplo, puede aumentar la porosidad y/o área de superficie de la biomasa, a menudo dejando los materiales celulósicos más expuestos a las células microbianas, que pueden aumentar la tasa y rendimiento de la fermentación. La extracción de la lignina, por ejemplo, puede proporcionar un combustible para hacer funcionar la caldera y también puede, por ejemplo, aumentar la porosidad y/o área de superficie de la biomasa, a menudo aumentando la tasa y rendimiento de la fermentación. En general, en cualquiera de las formas de realización que se describen más adelante, la concentración inicial de los carbohidratos en el medio es mayor de 20 mM, por ejemplo, mayor

000116

de 30 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, o even mayor de 500 mM.

[00217] Planta de procesamiento de biomasa y proceso de producir productos de la biomasa

[00218] En un aspecto, la invención describe una planta de combustible que incluye una unidad de hidrólisis configurada para hidrolizar un material de biomasa que incluye un carbohidrato de peso molecular alto, y un fermentador configurado para alojar un medio con células de *Clostridium phytofermentans* u otro organismo hidrolizador C5/C6 disperso en este, y uno o más sistemas de recuperación del producto para aislar un producto final o productos finales y subproductos y coproductos asociados.

[00219] En otro aspecto, la invención describe métodos de de obtener un producto o productos que incluyen combinar células de *Clostridium phytofermentans* u otro organismo hidrolizador C5/C6 y una alimentación de biomasa en un medio, y fermentar el material de biomasa en las condiciones y durante un tiempo suficiente para producir un biocombustible, producto químico o productos finales fermentativos, por ejemplo, etanol, propanol, hidrógeno, lignina, terpenoides, y similares como se describe en el párrafo 0063.

[00220] En otro aspecto, la invención describe productos obtenidos por los procesos descriptos en la presente.

Producción en gran escala de productos químicos de la biomasa

[00221] En general, existen dos estrategias básicas para producir productos químicos a partir de la biomasa en gran escala utilizando microorganismos tales como *Clostridium phytofermentans* u otros organismos que hidrolizan C5/C6. En todos los métodos, de acuerdo con el tipo de biomasa y su manifestación física, uno de los procesos puede comprender una molienda del material carbonáceo, por medio de molienda húmeda o seca, para reducir el tamaño del material y aumentar la relación de superficie a volumen (modificación física).

[00222] En un primer método, primero se hidroliza un material de biomasa que incluye carbohidratos de peso molecular más alto a carbohidratos de peso molecular más bajo, se hidroliza para deslignificarlo o separar los compuestos de carbohidrato de los

000117

compuestos no carbohidrato. Usando una combinación de tratamiento térmico, químico, y/o enzimático, el material hidrolizado se puede separar para formar líquido y deshidratar las corrientes, que se pueden tratar por separado y mantener separadas o recombinadas, y luego fermenta los carbohidratos de peso molecular más bajo utilizando células de *Clostridium phytofermentans* u otro organismo hidrolizador C5/C6 para producir uno o más productos químicos. En el segundo método, se fermenta el material de biomasa mismo sin pretratamiento térmico, químico, y/o enzimático. En el primer método, la hidrólisis se puede lograr usando ácidos (por ejemplo, ácidos sulfúrico o clorhídrico), bases (por ejemplo hidróxido de sodio), procesos hidrotérmicos, procesos de explosión de fibra de amoníaco ("AFEX"), procesos de cal, enzimas, o combinación de estos. La hidrólisis y/o tratamiento de vapor de la biomasa, por ejemplo, pueden aumentar la porosidad y/o área de superficie de la biomasa, a menudo dejando los materiales celulósicos más expuestos a cualquier organismo hidrolizante de C5/C6, tal como, *Clostridium phytofermentans*, que puede aumentar la tasa y rendimiento de la fermentación. La hidrólisis y/o tratamiento de vapor de la biomasa, por ejemplo, puede producir subproductos o coproductos que se pueden separar o tratar para aumentar la tasa y el rendimiento de la fermentación, o usar para producir energía para correr el proceso, o usar como productos con o sin procesamiento adicional. La extracción de la lignina, por ejemplo, puede proporcionar combustible para hacer funcionar la caldera. Los productos gaseosos (por ejemplo, metano, hidrógeno o CO₂), líquido (por ejemplo etanol y ácido orgánicos), o sólido (por ejemplo lignina), de la fermentación se pueden capturar y purificar o se desechan si se desea, por ejemplo, por combustión. Por ejemplo, el gas hidrógeno se puede encender, o usar como fuente de energía del proceso, por ejemplo, para hacer funcionar una caldera, por ejemplo, por combustión. Los productos que salen del fermentador se pueden procesar adicionalmente, por ejemplo el etanol se puede transferir a la destilación y rectificación, produciendo una mezcla concentrada de etanol o sólidos que se puede separar para usar para proporcionar energía o como

productos químicos. Se considera que otros métodos de producir productos finales fermentativos o biocombustibles puede incorporar alguno y todos los procesos descritos así como procesos adicionales o sustitutos que se pueden desarrollar para hacer más eficiente desde el punto de vista económico o mecánico estos métodos, los cuales se consideran incorporados en su totalidad dentro del alcance de esta invención.

[00223] La Fig 8 es un ejemplo de un método para producir productos químicos de la biomasa por tratamiento primero de la biomasa con un ácido a temperatura y presión elevada en una unidad de hidrólisis. Primero la biomasa se puede calentar por la adición de agua caliente o vapor. La biomasa se puede acidificar por burbujeo de dióxido de azufre gaseoso a través de la biomasa que se suspende en agua, o por la adición de un ácido fuerte, *por ejemplo*, ácido sulfúrico, clorhídrico, o nítrico con o sin precalentamiento/pretratamiento con vapor/adición de agua. Durante la acidificación, el pH se mantiene a un nivel bajo, *por ejemplo*, por debajo de aproximadamente 5. La temperatura y presión se pueden elevar después de la adición del ácido. Además del ácido que ya está en la unidad de acidificación, opcionalmente se puede añadir una sal metálica tal como sulfato ferroso, sulfato férrico, cloruro férrico, sulfato de aluminio, cloruro de aluminio, sulfato de magnesio, o mezclas de estos para ayudar a la hidrólisis de la biomasa. La biomasa impregnada con ácido se incorpora en la sección de hidrólisis de la unidad de pretratamiento. El vapor se inyecta en la porción de hidrólisis de la unidad de pretratamiento para ponerse en contacto directo y calentar la biomasa a la temperatura deseada. La temperatura de la biomasa después de la adición de vapor es, *por ejemplo*, entre aproximadamente 130° C y 220° C. El hidrolizado luego se descarga en la porción del tanque de evaporación instantánea de la unidad de pretratamiento, y se mantiene en el tanque durante un período de tiempo para hidrolizar adicionalmente la biomasa, *por ejemplo*, en oligosacáridos y azúcares monoméricos. La explosión de vapor también se puede usar para degradar adicionalmente la biomasa. En forma alternativa, la biomasa se puede someter a la descarga a través de un cierre a presión con cualquier proceso de

pretratamiento a alta presión. El hidrolizado luego se descarga del reactor de pretratamiento, con o sin adición de agua, *por ejemplo*, con concentraciones de sólidos entre aproximadamente 15% y 60%..

[00224] Después del pretratamiento, la biomasa se puede deshidratar y/o lavar con una cantidad de agua, *por ejemplo* por compresión o por centrifugación, o por filtración usando, *por ejemplo* un extractor a contracorriente, prensa de lavado, prensa de filtro, filtro de presión, un extractor de tornillo, o un extractor por vacío para eliminar el fluido acidificado. El fluido acidificado, con o sin tratamiento adicional, *por ejemplo* adición de álcali (*por ejemplo* cal) y/o amoníaco (*por ejemplo*, fosfato de amonio), se puede reusar, *por ejemplo*, en la porción de acidificación de la unidad de pretratamiento, o añadir a la fermentación, o recolectar para otro uso/tratamiento. Los productos se pueden derivar del tratamiento del fluido acidificado, *por ejemplo*, yeso o fosfato de amonio. Las enzimas o una mezcla de enzimas se pueden añadir durante el pretratamiento para ayudar, *por ejemplo* endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas (CBH), beta-glucosidasas, glicósido hidrolasas, glicosiltransferasas, liasas, y esterases activas contra los componentes de celulosa, hemicelulosas, pectina, y almidón, en la hidrólisis de los componentes de peso molecular alto.

[00225] El fermentador se alimenta con la biomasa hidrolizada, cualquier fracción líquida del pretratamiento de la biomasa, un cultivo de siembra activo de células de *Clostridium phytofermentans*, si se desea un microbio de co-fermentación, *por ejemplo*, levadura o *E. coli*, y, si se requiere, nutrientes para promover el crecimiento del *Clostridium phytofermentans* u otros microbios. En forma alternativa, la biomasa o fracción líquida pretratada se puede dividir en múltiples fermentadores, cada uno que contiene una cepa diferente de *Clostridium phytofermentans* y/u otros microbios y cada uno que opera en condiciones físicas específicas. La fermentación se deja proceder durante un período de tiempo, *por ejemplo*, entre aproximadamente 15 y 150 horas, mientras que se mantiene una temperatura de, *por ejemplo*, entre aproximadamente 25° C y 50° C. El gas producido durante la

fermentación se extrae del fermentador y se descarga, recolecta o enciende con o sin procesamiento adicional, por ejemplo el gas hidrógeno se puede recolectar y usar como fuente de energía o purificar como coproducto.

[00226] Después de la fermentación, los contenidos del fermentador se transfieren para la recuperación del producto. Los productos se extraen, por ejemplo, el etanol se recupera a través de la destilación y rectificación.

[00227] Producción química de la biomasa sin pretratamiento La Fig. 9 ilustra un método para producir agentes químicos de la biomasa por el cargado de biomasa en un vaso de fermentación. La biomasa se puede dejar remojar durante un período de tiempo, con o sin adición calor, agua, enzimas, o ácido/álcali. La presión en el recipiente de procesamiento se puede mantener en o por encima de la presión atmosférica. Se puede añadir ácido o álcali en el fin del periodo de pretratamiento para la neutralización. Al final del periodo de pretratamiento, o en el mismo momento que comienza el pretratamiento, se añaden un cultivo de siembra activo de células de *Clostridium phytofermentans* u otro organismo hidrolizante de C5/C6 y, si se desea, un microbio de co-fermentación, por ejemplo, levaduras o *E. coli*, y, si requiere, se añaden nutrientes para promover el crecimiento de *Clostridium phytofermentans* u otros microbios. La fermentación se deja proceder como se describió anteriormente. Después de la fermentación, los contenidos del fermentador se transfieren a la recuperación del producto como se describió anteriormente

[00228] Cualquier combinación de los métodos y/o características de producción de agentes químicos se pueden utilizar para obtener un método de producción híbrido. En cualquiera de los métodos descritos en la presente, los productos se pueden extraer, añadir o combinar en cualquier etapa. El *Clostridium phytofermentans* se puede usar solo o sinérgicamente en combinación con uno o más microbios diferentes (por ejemplo levaduras, hongos, u otras bacterias). En algunas formas de realización, se pueden usar métodos diferentes en una planta individual para producir diferentes productos finales,

000121

[00229] En otro aspecto, la invención describe una planta de combustible que incluye una unidad de hidrólisis configurada para hidrolizar un material de biomasa que incluye un carbohidrato de peso molecular alto, y un fermentador configurado para alojar un medio y contiene células de *Clostridium phytofermentans* dispersas en este.

[00230] En otro aspecto, la invención describe métodos de obtener un combustible o combustibles que incluyen combinar células de *Clostridium phytofermentans* y un material lignocelulósico (y/u otro material de biomasa) en un medio, y fermentar el material lignocelulósico en las condiciones y durante un tiempo suficiente para producir un combustible o combustibles, por ejemplo, etanol, propanol y/o hidrógeno u otro compuesto químico.

[00231] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un proceso para producir etanol e hidrógeno de la biomasa usando el pretratamiento con hidrólisis ácida. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un proceso para producir etanol e hidrógeno de la biomasa usando pretratamiento con hidrólisis enzimática. Otras formas de realización proporcionan un proceso para producir etanol y hidrógeno de la biomasa usando la biomasa que no se ha pretratado enzimáticamente. Aún otras formas de realización describen un proceso para producir etanol y hidrógeno de la biomasa usando biomasa que no se ha pretratado en forma química o enzimática, pero opcionalmente se trata con vapor.

[00232] En otro aspecto, la invención describe productos obtenidos por cualquiera de los procesos descritos en la presente.

EJEMPLOS

[00233] Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar ciertas formas de realización y aspectos preferidos y no se interpretan como una limitación de su alcance.

Ejemplo 1. Comparación de fermentación discontinua y discontinua alimentada de microbio Q - componentes del medio de alimentación solos

Condiciones experimentales:

000122

[00234] Tres reactores de tanque agitado (STR), o fermentadores, se operaron en modo discontinuo alimentado para estudiar la fermentación de celobiosa usando microbios Q. Un cuarto STR se operó como control en modo discontinuo. Todos los STR sea operados en modo discontinuo alimentado o discontinuo contenían 30 g/L de sustrato de celobiosa a tiempo cero. Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, y fueron de grado reactivo o mejor.

Preparación de inóculo:

[00235] El cultivo congelado (almacenado a -80°C) se usó para crear un inóculo que se propagó en forma anaeróbico a 35°C durante 48 horas en tubos de 10 mL que contienen 0,3% de celobiosa junto con 4 g/L de KH_2PO_4 , 8 g/L de K_2HPO_4 , 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g/L de cisteína-HCl, 6 g/L Ambrex 695 extracto de levadura (Sensient, Juneau, WI) en agua DI (volumen de líquido aproximadamente 10 ml). A partir de este momento, el inóculo se cultivó a 35°C durante 48 horas en 100 mL de suero usando 2% de (v/v) tamaño de siembra. Los viales de suero contenían 20 g/L de celobiosa, 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 2,9 g/L de K_2HPO_4 , 2,1 g/L de urea, 2 g/L de cisteína-HCl, 10 g/L de buffer MOPS, 3 g/L de citrato de sodio, 1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua DI. Se examinaron alícuotas de inóculos cultivados bajo un microscopio para determinar contaminación bacteriana y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para concentrar la biomasa (a aproximadamente 2-4 g/L de sólidos suspendidos totales) para la inoculación del fermentador. Se usó el mismo procedimiento de preparación de inóculos para las fermentaciones discontinuas así como discontinuas alimentadas.

Fermentación discontinua (control):

[00236] Se preparó medio que contiene 50 g/L de celobiosa, 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 2,9 g/L de K_2HPO_4 , 2,1 g/L de urea, 2 g/L de cisteína-HCl, 10 g/L buffer MOPS, 3 g/L de citrato de sodio, 1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua DI. El pH del medio se ajustó a 7,5 con NaOH 2 N, y se transfirieron 300 ml de medio a cada fermentador de 500 mL. Después de desgasificar el recipiente (600 mbar de vacío durante al menos 5 minutos con el medio a aproximadamente 3

temperatura ambiente, seguido por la purga de nitrógeno del espacio frontal para elevar la presión del recipiente de nuevo a atmosférica), el recipiente se esterilizó por autoclavado a una temperatura de 121°C y 15 psi durante 30 minutos. Una vez que el recipiente autoclavado se enfrió a temperatura ambiente, se inoculó con 10% (v/v) de inóculo (volumen de siembra concentrado/volumen de fermentación final) usando una jeringa estéril de 60 mL. El caldo se cultivó durante 151 horas a 35°C, agitación a 125 rpm.

[00237] El fermentador se muestreó cada día, y se analizó para determinar celobiosa, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, y etanol usando HPLC equipado con la columna de exclusión Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) y detector RI. Se usó H_2SO_4 0,005 N como fase móvil a 0,6 mL/minuto, y la columna se mantuvo a 55°C.

Fermentación discontinua alimentada:

[00238] Se preparó medio que contiene 30 g/L de celobiosa, 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 2,9 g/L de K_2HPO_4 , 2,1 g/L de urea, 2 g/L de cisteína-HCl, 10 g/L de buffer MOPS, 3 g/L de citrato de sodio, 1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua DI. El pH del medio se ajustó a 7,5 con NaOH 2 N. Se añadió medio (300 mL) a cada uno de los tres recipientes de fermentación de 500 mL. Los fermentadores se desgasificaron de la misma manera que en la fermentación discontinua, seguido por autoclavado a 121°C y 15 psi durante 30 minutos. Una vez que los recipientes auto clavados se enfriaron a temperatura ambiente, se inocularon con 10% (v/v) de inóculos volumen de siembra concentrado/volumen de fermentación final) usando una jeringa estéril de 60 mL. El caldo se cultivó durante 184 horas a 35°C, agitación a 125 rpm. El caldo se suplementó con 25 mL de medio fresco con 250 g/L de celobiosa junto con 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 2,9 g/L de K_2HPO_4 , 2,1 g/L de urea, 2 g/L de cisteína-HCl, 10 g/L de buffer MOPS, 3 g/L de citrato de sodio, 1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua DI se añadió a los fermentadores a 24, 48, 72, 96, 120, 144, y 168 horas después de la inoculación del fermentador. El medio suplementario se ha esterilizado.

000124

Control del fermentador

[00239] Los fermentadores se muestrearon cada día, y se analizaron para determinar celobiosa, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, y etanol usando un HPLC equipado con columna de exclusión Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA) y detector RI. Se usó H_2SO_4 0,005 N como fase móvil a 0,6 mL/minuto, y la columna se mantuvo a 55°C.

Resultados:

[00240] La Figura 1 muestra la concentración del sustrato (celobiosa) y producto (etanol) a lo largo de la corrida de fermentación para el fermentador control, que se operó en modo discontinuo. Es evidente a partir de la figura que la concentración de etanol en el caldo alcanzó una meseta después de aproximadamente 30 horas. Si bien el fermentador control se mantuvo funcionando durante seis días, no hubo aumento considerable en la concentración de etanol.

[00241] La Figura 2 muestra el perfil de sustrato (celobiosa) y producto (etanol) para los fermentadores operados en modo discontinuo alimentado. Los valores mostrados son el promedio de las tres fermentaciones. Como se muestra en la figura la concentración de etanol continuó aumentando con la alimentación de nutrientes y sustrato fresco. La concentración de etanol máxima obtuvo a través de la operación discontinua alimentada fue aproximadamente 12 g/L, que es más del doble del título obtenido en el fermentador control operado de modo discontinuo.

[00242] Además del título de etanol más alto, el proceso discontinuo alimentado (sustrato de carbono concentración a aproximadamente 20-30 g/L) también dio como resultado de mayor productividad y menor producción de ácidos tanto sobre la base de g/g de azúcar fermentado basis como producido sobre la base de g/g de etanol, como se muestra en la Tabla 7. También es significativo que el medio y las condiciones de fermentación particulares usadas produjeron mayor productividad temprana (aproximadamente 4 g/L-día durante la primera parte de la fermentación) que ha sido informado para este organismo.

000125

Tabla 7. Comparación de parámetros de fermentación importante para los experimentos discontinuo y discontinuo alimentado.

Parámetros	Discontinuo	Discontinuo alimentado
Azúcar cargado, g	9,00	38,75
Azúcar fermentado, g	3,22	19,63
Concentración de etanol, g/L	4,93	12,29
Rendimiento de etanol, g/g de azúcar fermentado	0,46	0,27
Rendimiento de ácidos, g/g de azúcar fermentado	0,19	0,02
Productividad de etanol, g/L-d	0,78	1,83

Ejemplo 2. Operación discontinua alimentada con fuente de carbono insoluble

[00243] Las fermentaciones discontinuas y discontinuas alimentadas se realizan usando una fuente de carbono insoluble, tal como celulosa microcristalina. El medio de fermentación está compuesto como en el Ejemplo 1, excepto que la celulosa microcristalina se sustituye con celobiosa en el medio de producción final. (La microcelulosa cristalina se sustituye con celobiosa en una o más de las otras etapas de fermentación o siembra en vez de o además del medio de fermentación final.) Los resultados para usar celulosa microcristalina a modo de tendencia son similares a los que usan celobiosa, con mayor rendimiento y productividad de etanol en la operación discontinua alimentada cuando se la compara con la discontinua. De modo similar, la mayor conversión de azúcar a etanol (g de etanol/g de azúcar fermentado) y menor conversión de azúcar a ácidos (g de ácido/g de azúcar fermentado y g de ácido/g etanol) se produce en la operación discontinua alimentada cuando se compara con la operación discontinua. Se obtienen resultados similares, a modo de tendencia, con fuentes de carbono insolubles más complicadas

000126

tales como madera molida, materia de planta molida, o madera molida pretratada o materia de planta molida pretratada y con materiales celulósico, lignocelulósico, o hemicelulósicos o corrientes de desecho. Sin embargo, las tasas absolutas de producción de etanol u otros productos específicos varía de más alta o más baja que los resultados de celobiosa al menos en parte por la presencia de nutrientes o agentes inhibitorios adicionales en el sustrato más complejo

[00244] Ejemplo 3. Operación discontinua alimentada con aumento celular.

[00245] Se realiza una fermentación discontinua alimentada con la adición de células frescas al caldo durante el curso de la fermentación. Un medio de fermentación se prepara e inocular como en el Ejemplo 1. En intervalos de 24 horas, se añade inóculo fresco (2-3% v/v) la fermentación y se analizan las muestras de caldo como en el Ejemplo 1. Después de aproximadamente 2-4 días, se recolecta el caldo. En la recolección, el contenido de etanol del caldo es mayor de aproximadamente 6 g/l, lo que demuestra un aumento sustancial respecto de la operación discontinua, lo que también demuestra el aumento de la productividad.

[00246] Se pueden observar resultados similares con el medio basado en fuente de carbono insoluble y más complejo del Ejemplo 2. El aumento del caldo de fermentación con células frescas también se usa en situaciones en que están presentes mayores concentraciones de sustrato de carbono, tales como hasta aproximadamente 100 g/L o, en algunos casos, más alta.

Ejemplo 4. Operación discontinua alimentada con aumento celular y adición de medio combinados.

[00247] También se realiza una fermentación discontinua alimentada con la adición de células frescas y componentes del medio frescos a caldo durante el curso de la fermentación. Se puede preparar un medio de fermentación e inocular como se describe en el Ejemplo 1. En intervalos de 24 horas, se añade inóculo fresco (2-3% v/v) a la fermentación así como en el medio del Ejemplo 1. Las muestras de caldo se analizan como en el Ejemplo 1. Después de aproximadamente 2-4 días, se recolecta el caldo. En la recolección, el rendimiento y la productividad del

000127

etanol son mayores para la fermentación discontinua alimentada sin aumento celular. De modo similar, se demuestra el aumento la utilización de carbono (g de etanol/g de azúcar fermentado) y la reducción de la producción de ácido (g de ácido/g etanol y g de ácido/g de azúcar fermentado) en comparación con el modo discontinuo alimentado sin aumento celular.

[00248] Se observan resultados similares con los medios basados en fuente de carbono insoluble y más complejo del Ejemplo 2.

Ejemplo 5. Fermentación discontinua alimentada con extracto de levadura presente

[00249] Se usaron cuatro reactores de tanque agitado (STR), cada uno que tiene 300 mL de medio que contiene 25 g/L de celobiosa, 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 2,9 g/L de K_2HPO_4 , 4,6 g/L de sulfato de amonio, 2 g/L de cisteína-HCl, 3 g/L de citrato de sodio, 1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y niveles de extracto de levadura (Bacto,[™] Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) (10, 15, 20 y 30 g/L). El análisis del extracto de levadura Bacto se proporciona en la Tabla 8. Todos los STR se incubaron a 35°C, 125 rpm y se operaron como discontinuo alimentado, con celobiosa adicional añadida (25 ml de 200 g/l de solución) cada 24 hr. La producción de etanol se controló en todo el curso de la fermentación. La Tabla 9 muestra las concentraciones de etanol a partir de estos experimentos.

Tabla 8. Composición típica del extracto de levadura Bacto (fuente: planilla de datos de Bacto, Becton Dickinson).

Nitrógeno total	10,9%	
Nitrógeno amino	6,0%	
cenizas	11,2%	
pérdida en el secado	3,1%	
Análisis de aminoácido	Libre (%)	Total (%)
Alanina	4,4	5,6
Ácido aspártico	1,6	5,3
Histidina	0,6	1,3
Leucina	3,0	4,1
Metionina	0,6	0,8

000128

Prolina	0,8	2,0
Treonina	1,1	1,6
Tirosina	0,8	1,2
Arginina	1,4	2,6
Cistina	0,2	(destruido por hidrólisis)
Glicina	1,0	3,0
Isoleucina	1,8	3,0
Lisina	1,9	4,6
Fenilalanina	2,0	2,6
Serina	2,6	1,6
Triptofano	0,5	(destruido por hidrólisis)
Valina	2,2	3,5

Tabla 9. Concentración de etanol en g/L en tiempos diferentes y para cada formulación de medio.

Tiempo, horas	10g/L YE	15g/L YE	20g/L YE	30g/L YE
0	0,1234	0,1651	0,1353	0,1389
18	5,1174	6,8853	6,3372	8,1321
45	7,6586	9,2264	9,0582	9,438
76	9,7681	11,654	11,6886	11,4085
100	11,2567	13,0663	13,4312	12,756
124	11,485	11,9113	11,9634	12,1095
148	11,8731	12,4778	11,865	12,0946

[00250] La productividad volumétrica a 18 horas para las diferentes composiciones del medio fue 2,00, 2,69, 2,48, 3,20 g/L día para medio de 10, 15, 20, y 30 g/L de extracto de levadura, respectivamente.

[00251] Estos resultados muestran un aumento del título de y. productividad total de etanol con cantidades crecientes de extracto de levadura y demuestran la producción de etanol hasta aproximadamente 15 g/L, y una productividad instantánea de más de aproximadamente 10 g/L-día.

000129

Ejemplo 6. Producción de etanol por *C. phytofermentans* con diferentes suplementos de aceite vegetal

[0051] Se evaluó el efecto de la suplementación con ácido graso durante la fermentación sobre la producción de etanol por el crecimiento de los cultivos de *Clostridium phytofermentans* sobre el medio de celobiosa bajo agitación hasta que se detuvo la producción de etanol. El medio fresco que comprende 10 mL de inóculo recién cultivado se combinó con 2 g/L de un aceite vegetal. La producción de etanol se controló durante 100 horas adicionales.

Reactivos usados:

[0052] Todos los productos químicos excepto los aceites vegetales, fueron al menos de grado reactivo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los aceites vegetales fueron aceites de marca Great Value, comercializado por Wal-Mart (Bentonville, AR).

Procedimiento de desgasificación y esterilización:

[0053] Todos los rectores y viales de suero usados para la propagación del inóculo propagación se desgasificaron al vacío bajo purga de nitrógeno. Se realizó un mínimo de tres ciclos de desgasificación. El recipiente se esterilizó por autoclavado a la temperatura de 121°C y 15 PSI de presión durante 30 minutos.

Preparación del inóculo:

[0054] El cultivo congelado (almacenado a -80°C) se propagó a 35°C durante 48 horas en tubos de 10 mL que contienen 0,3% de celobiosa junto con 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 2,9 g/L de K_2HPO_4 , 4,6 g/L de sulfato de amonio, 2 g/L de cisteína-HCl, 1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua DI. El pH del medio se ajustó a 7,5 con NaOH 2 N. Después del autoclavado, los inóculos se cultivaron a 35°C durante 24 horas en 100 mL de suero usando 2% (v/v) de tamaño de siembra. Los viales de suero contenían 20 g/L de celobiosa, 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 2,9 g/L de K_2HPO_4 , 4,6 g/L de sulfato de amonio, 2 g/L de cisteína-HCl, 3 g/L de citrato de sodio, 1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua DI. Los inóculos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos para concentrar las células (2-4 g/L de sólidos suspendidos totales) antes del uso como inóculo para los fermentadores.

000130

Fermentación final - Experimento de selección con diferentes aceites:

[0055] Cinco reactores de tanque agitado se cargaron con 50 mL de medio que contiene 20 g/L de celobiosa, 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 2,9 g/L de K_2HPO_4 , 4,6 g/L de sulfato de amonio, 2 g/L de cisteína-HCl, 3 g/L de citrato de sodio, 1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 g/L de extracto de levadura (Bacto). Cada reactor se inoculó con células concentradas de un vial de suero. Los fermentadores se operaron en modo discontinuo hasta que se detuvo la producción de etanol. La concentración de etanol de cada reactor se muestra en la Tabla 10. La celobiosa residual del medio en este momento fue aproximadamente 15-20 g/L. Cada reactor luego se suplementó con aproximadamente 10 mL de inóculo recién cultivado y 2 g/L de un aceite vegetal como se muestra en la Tabla 10. La fermentación continuó durante otras 100 horas. Las concentraciones finales de etanol se muestran en la Tabla 10. Las concentraciones de etanol a lo largo del período después de la suplementación se muestran en la Figura 4 y Tabla 11.

Tabla 10. Concentración de etanol de los diferentes reactores antes de la suplementación del medio.

Reactor	1	2	3	4	5
Etanol	Maíz	Coco	Soja	Canola	Oliva
Concentración antes de la suplementación del medio	15,4	14,8	13,7	16,6	14,4
Aceite añadido	2 g/L	2 g/L	2 g/L	2 g/L	2 g/L
Concentración final de etanol	20,0	15,1	15,5	19,8	18,8

Tabla 11. Concentración de etanol versus tiempo.
Concentración de etanol (g/L de)

000131

Tiempo de corrida (hr)	ST 16A, Aceite de maíz	ST 16B, Aceite de coco	ST 16C, Aceite de soja	ST 16D, Aceite de canola	ST 16E, Aceite de oliva
0	15,4	14,8	13,7	16,6	14,4
20	17,8	15,7	15,5	17,5	16,0
45	17,7	15,6	15,9	18,7	16,3
58	18,0	15,7	15,5	17,7	16,2
84	18,8	15,5	15,7	18,3	16,6
104,5	20,0	15,1	15,5	19,8	18,8

Resultados

[0056] La adición de aceite de maíz, soja, canola, coco y aceite de oliva a las fermentaciones dio como resultado la producción adicional de etanol. Además, el aumento más grande de etanol provino de la suplementación con aceites ricos en ácido oleico (aceite de oliva, canola, soja y maíz, como se muestra en la Tabla 14), el contenido de ácido linoleico también contribuye a un aumento del rendimiento.

Ejemplo 7. Producción de etanol por *Clostridium phytofermentans* a pH reducido.

[0057] Los biorreactores contenían 300 mL de medio que contiene 20 g/L de celobiosa, 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 2,9 g/L de K_2HPO_4 , 4,6 g/L de sulfato de amonio, 2 g/L de cisteína-HCl, 3 g/L de citrato de sodio, 1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 g/L de extracto de levadura (Bacto). Los fermentadores operaron en modo discontinuo alimentado con alimentación continua de medio concentrado que contiene 200 g/L de celobiosa a 1,4 mL/h. Los biorreactores operaron a pH controlado de 7,5, 7 y 6,5, respectivamente.

[0058] Los fermentadores se controlaron por la concentración de etanol a lo largo de la fermentación. Los resultados se muestran en la Tabla 12 y Figura 5. Los resultados muestran que la fermentación a pH menor de 7,5 produce un aumento de la concentración de etanol y un aumento de la productividad de etanol.

000132

Tabla 12. Concentración de etanol para la fermentación a pH diferentes

	BR1	BR2	BR3
Tiempo, h	pH 7,5	pH 7	pH 6,5
0	0,04	0,00	0,17
20,5	2,68	4,19	4,22
48,5	6,15	9,80	10,7
68,5	9,00	13,0	13,5
92,5	11,9	15,3	15,3
116,5	11,6	15,4	15,3
144,5	11,5	13,5	16,1
175,5	11,8	15,6	16,4

Ejemplo 8. pH reducido en presencia de aceite de canola.

[0059] Los reactores contenían 300 mL de medio que contiene 50 g/L de celobiosa, 3 g/L de K_2HPO_4 , 1,6 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de Citrato trisódico $\cdot 2H_2O$, 1,2 g/L de ácido cítrico H_2O , 0,5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L de NaCl, 0,8 g/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,1 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,00125 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L de Cisteína HCl, 10 g/L de extracto de levadura (Bacto), junto con 5 g/L de polvo de maceración de maíz disuelto en agua DI. Los fermentadores operaron en modo discontinuo.

[0060] Los fermentadores se controlaron por la concentración de etanol. Los resultados se muestran en la Tabla 13. Una mayor concentración y producción de etanol resultó de la operación a pH bajo en presencia de aceite de canola, así como mejor título y productividad para la operación a pH 6,5 en comparación con la operación a 7,0 (Figura 6).

Tabla 13 Fermentación a pH variable con aceite de canola presente.

000133

Tiempo, h	pH =6,5	pH =6,5, Aceite de canola	tiempo, h	pH=7
0	0,18	0,03	0	0,00
20,5	6,07	6,26	20	4,05
48,5	18,67	20,02	44	14,22
70,5	23,08	24,51	68	15,20

Tabla 14. Perfil de ácidos grasos de varias grasas y aceites comestibles; Valores como porcentaje de ácidos grasos totales.

Aceite o grasa	Relaci on insat/ sat	Saturado					Mono insatu rado	Poli insaturado	
		Ácido capri cho C10:0	Ácid o Láur ico C12: 0	Ácido Miríst ico C14:0	Ácido Palmit ico C16:0	Ácido esteár ico C18:0		Ácido Linole ico (ω6) C18:2	Ácido Alfa Linolé nico (ω3) C18:3
Aceite de almendr as	9,7	-	-	-	7	2	69	17	-
Sebo vacuno	0,9	-	-	3	24	19	43	3	1
Grasa de manteca (vaca)	0,5	3	3	11	27	12	29	2	1
Grasa de manteca (cabra)	0,5	7	3	9	25	12	27	3	1
Grasa de manteca	1	2	5	8	25	8	35	9	1

000134

(humana)									
Aceite de canola	15,7	-	-	-	4	2	62	22	10
Mantec a de cacao	0,6	-	-	-	25	38	32	3	-
Aceite de hígado de bacalao	2,9	-	-	8	17	-	22	5	-
Aceite de coco	0,1	6	47	18	9	3	6	2	-
Aceite de maíz (a ceite de maíz)	6,7	-	-	-	11	2	28	58	1
Aceite de semilla de algodón	2,8	-	-	1	22	3	19	54	1
Aceite de semilla de lino	9	-	-	-	3	7	21	16	53
Aceite de pepita de uva	7,3	-	-	-	8	4	15	73	-
Mantec a (grasa de cerdo)	1,2	-	-	2	26	14	44	10	-
Aceite de oliva	4,6	-	-	-	13	3	71	10	1
Aceite de	1	-	-	1	45	4	40	10	-

palma									
Oleína de palma	1,3	-	-	1	37	4	46	11	-
Aceite de nuez de palma	0,2	4	48	16	8	3	15	2	-
Aceite de maní	4	-	-	-	11	2	48	32	-
Aceite de cártamo *	10,1	-	-	-	7	2	13	78	-
Aceite de sésamo	6,6	-	-	-	9	4	41	45	-
Aceite de soja	5,7	-	-	-	11	4	24	54	7
Aceite de girasol *	7,3	-	-	-	7	5	19	68	1
Aceite de nuez	5,3	-	-	-	11	5	28	51	5

Ejemplo 10: Modificación genética de *Clostridium phytofermentans* para aumentar la producción de etanol, otros biocombustibles y productos químicos.

[00252] Se construyeron plásmidos adecuados para usar en *C. phytofermentans* usando porciones de plásmidos obtenidos de recolecciones de cultivos bacterianos. El plásmido pimpl es un plásmido no conyugal que puede replicar en *E. coli* así también como una variedad de especies bacterianas gram positivas y codifica para la resistencia a eritromicina. El *C. phytofermentans* es altamente sensible a la eritromicina. El *C. phytofermentans* no puede crecer en concentraciones de 0,5 microgramos de eritromicina por ml de medio de cultivo de microbiano. El plásmido RK2 conyugal de amplio espectro de huésped contiene todos los genes necesarios para un sistema de conjugación bacteriano que incluye: un origen de replicación

000136

específico para la ADN polimerasa del sistema de conjugación, genes de replicación de ADN conyugal, y genes que codifican para la síntesis de pili para permitir el reconocimiento de potenciales células bacterianas receptoras y actuar como el conducto a través del cual el ADN del plásmido de cadena simple se transfiere por contacto célula-célula de las células dadoras a receptoras. El origen de transferencia para el sistema conyugal RK2 se obtuvo del plásmido Prk290 que se obtuvo de la German Collection of Microorganisms y Cell Cultures (DSMZ) como DSM 3928, y las otras funciones de conjugación de RK2 se obtuvieron de Prk22013 que se obtuvo de DSMZ como DSM 5599. La reacción en cadena de polimerasa se usó para amplificar la región de transferencia del origen del par de bases 112 (oriT) de Prk2290 usando cebadores que se añadieron a los sitios de restricción ClaI flanqueantes de la región oriT. Este fragmento de ADN se insertó en el sitio ClaI de pIMPl para producir el plásmido Pimpt. Se demostró que Pimpt se puede transferir de una cepa de *E. coli* a otra cuando Prk2013 también estaba presente para suministrar otras funciones de conjugación. Sin embargo, no se pudo demostrar que Pimpt se transfiere en forma conyugal - desde *E. coli* a *C. phytofermentans*. Debido a que el promotor que dirige la expresión del gen de resistencia a eritromicina en Pimpt no pudo funcionar en *C. phytofermentans* se usó la PCR para amplificar el promotor del gen de alcohol deshidrogenasa de *C. phytofermentans* 1029 desde el cromosoma de *C. phytofermentans* y se usó para reemplazar el promotor del gen de eritromicina en Pimpt para crear Pimpt1029. Cuando pRK2013 también estaba presente para suministrar otras funciones de conjugación, Pimpt1029 se pudo transferir en forma conyugal desde *E. coli* a *C. phytofermentans*. La transferencia exitosa del ADN del plásmido en *C. phytofermentans* se demostró en virtud de la capacidad del derivado de *C. phytofermentans* que contiene el Pimpt1029 para crecer en el medio que contiene hasta 10 microgramos por ml de eritromicina y por el uso de cebadores de PCR para amplificar específicamente dos regiones genéticas específicas para Pimpt1029 del derivado de *C. phytofermentans* pero no de un cultivo control de *C. phytofermentans* que no contenía el plásmido. 000137

[00253] La transferencia conyugal del Pimpt1029 de *E. coli* a *C. phytofermentans* se logra por la construcción inicial de una cepa de *E. coli* (DH5alfa) que contiene Pimpt1029 y Prk2013. Luego las células frescas de este cultivo de *E. coli* y las n células frescas del cultivo receptor de *C. phytofermentans* se obtienen por el cultivo en fase semilogarítmica usando medio de cultivo apropiado (caldo L y medio QM1, respectivamente). Los dos cultivos bacterianos luego se centrifugaron para producir pellets celulares y los pellets se resuspendieron en el mismo medio para obtener suspensiones celulares que se concentraron aproximadamente diez veces y presentaron densidades celulares de aproximadamente 10^{10} células por ml. Estas suspensiones celulares concentradas luego se mezclaron para obtener una relación dador a receptor de cinco a uno. Después de esto, la suspensión celular se sembró en placas de agar QM1 y se incubó en forma anaeróbica a 30 grados centígrados durante 24 horas. Luego la mezcla celular se retiró de la placa QM1 y se colocó en un medio sólido o QM1 líquido que contiene antibióticos elegidos para permitir la supervivencia de únicamente las células receptoras de *C. phytofermentans* que expresan la resistencia a eritromicina. Esto se obtuvo por el uso de una combinación de antibióticos que consistió en trimetoprima a 20 microgramos por ml, cicloserina a 250 microgramos por ml, y eritromicina a 10 microgramos por ml. La *E. coli* dadora fue incapaz de sobrevivir a la exposición a estas concentraciones de trimetoprima y cicloserina, mientras que el receptor de *C. phytofermentans* tipo salvaje fue incapaz de sobrevivir a la exposición a esta concentración de eritromicina (pero pudo tolerar trimetoprima y cicloserina a estas concentraciones). Por consiguiente, después de la incubación de estas placas que contienen antibiótico o medio líquido durante 5 a 7 días a 30 grados centígrados en condiciones anaeróbicas, se obtuvieron los derivados de *C. phytofermentans* que fueron resistentes a eritromicina y se mostró posteriormente que estos derivados de *C. phytofermentans* contienen Pimpt1029 demostrado por análisis de PCR.

[00254] El resultado sorprendente fue que solo un derivado construido especialmente del gen de resistencia a eritromicina

000138

que contenía el promotor de *C. phytofermentans* del gen de alcohol deshidrogenasa podía expresarse funcionalmente en *C. phytofermentans*.

[00255] Otros genes de interés, de *C. phytofermentans* o de fuentes heterólogas se introducirán en el constructo de Pimpt y se usan para transformar *C. phytofermentans*, y en consecuencia estos productos génicos útiles para aumentar la producción de enzimas sacarolíticas, proteínas de transporte de hexosa, y metabolismo de hexosa y enzimas usadas en la conversión de los intermediarios de los intermediarios en productos finales de alcohol y otros biocombustibles de *C. phytofermentans*. Un mapa del plásmido se muestra en la Figura 7.

[00256] Todas las referencias citadas en la presente, que incluyen pero sin limitación las solicitudes publicadas y no publicadas, patentes, y bibliografía de referencia, y que también se incluyen pero sin limitación en las referencias listadas en el Apéndice, se incorporan en la presente por referencia en su totalidad y por la presente forman parte de esta memoria descriptiva. En la medida que las publicaciones y patentes o solicitudes de patente incorporadas por referencia contradigan la descripción contenida en la memoria descriptiva, la memoria descriptiva está destinada a suplantar y/o tener prioridad sobre cualquier material contradictorio.

[00257] El término "que comprende" como se usa en la presente es sinónimo con "que incluyen" "que contiene", o "caracterizado por" y es inclusive o abierto y no excluye elementos no mencionados, adicionales o etapas del método.

[00258] Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, y demás usados en la memoria descriptiva se consideran modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la presente son aproximaciones que pueden variar de acuerdo con las propiedades deseadas que se desea obtener. Como mínimo, y no como un intento de limitar la solicitud de la doctrina de equivalentes del alcance de cualquiera de las reivindicaciones en cualquier solicitud que reivindica la prioridad en la presente solicitud,

000139

cada parámetro numérico se debe interpretar a la luz de la cantidad de dígitos significativos y métodos de redondeo habituales.

[00259] Si bien las formas de realización preferidas de la presente invención se han mostrado y descripto en la presente, será obvio para los expertos en la técnica que tales formas de realización solo se proporcionan a modo de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones se les ocurrirán a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Se debe entender que las diversas alternativas a las formas de realización de la invención descriptas en la presente se pueden emplear en la práctica de la invención. Se considera que las siguientes reivindicaciones definen el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes están cubiertas de este modo.

REIVINDICACIONES:

1. Un método para producir un producto final fermentativo que comprende:

cultivar un medio que comprende *Clostridium* durante un primer período de tiempo en condiciones adecuadas para la producción de un producto final fermentativo por dicho;

añadir uno o más nutrientes al medio que comprende *Clostridium* antes de recolectar el producto final fermentativo;

cultivar un medio que comprende *Clostridium* durante un segundo período de tiempo; y

recolectar un producto final fermentativo del medio.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cepa de *Clostridium* es *Clostridium phytofermentans*.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el producto final fermentativo es etanol.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el medio comprende un material celulósico y/o lignocelulósico.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde el material celulósico o lignocelulósico no se trata enzimáticamente con una cantidad suficiente de enzimas para convertir más de 15% del material celulósico o lignocelulósico en azúcares simples dentro de 24 horas.

6. Un método e producir un producto final fermentativo que comprende las etapas de:

cultivar una cepa de *Clostridium phytofermentans* en n medio;

mantener la concentración total de compuestos de azúcar en el medio al menos aproximadamente 18 g/L de; y.

recolectar un producto final fermentativo del medio.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde mantener la concentración total de compuestos de azúcar comprende añadir uno o más componentes del medio, al menos uno de los cuales comprende uno o más compuestos de azúcar al medio al menos una vez durante el cultivo, donde los componentes del medio se añaden a un recipiente que contiene el cultivo.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde la concentración total de compuestos de azúcar en el medio se

mantiene dentro del rango de de aproximadamente 1 g/L de a aproximadamente 100 g/L de para una porción del cultivo.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde la concentración total de compuestos de azúcar en el medio varía en menos de aproximadamente 25% durante el período de producción del producto final fermentativo.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el producto final fermentativo es etanol.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende añadir un componente del medio que comprende uno o más materiales que contienen nitrógeno al medio al menos una vez durante la fermentación, y donde el componente del medio se añade a un recipiente que contiene el cultivo.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde uno o más de los componentes del medio comprende uno o más materiales que contienen nitrógeno.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el medio comprende un material celulósico o lignocelulósico.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde el material celulósico o lignocelulósico no se trata enzimáticamente con una cantidad suficiente de enzimas para convertir más de 15% del material celulósico o lignocelulósico en azúcares simples dentro de 24 horas.

15. Un método de producir un producto final fermentativo, el método que comprende las etapas de:

cultivar una cepa de *Clostridium* en un medio; y

añadir uno o más componentes del medio al medio durante el cultivo del *Clostridium* donde uno o más de los componentes del medio comprende uno o más compuestos de azúcar, y el uno o más compuestos de azúcar se añaden en relación con una cantidad de azúcar convertida por el *Clostridium* a otros compuestos.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, donde uno o más de los componentes del medio comprende una fuente de nitrógeno.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, donde la fuente de nitrógeno incluye prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina.

000142

18. El método de acuerdo con la reivindicación 15, donde uno o más de los componentes del medio comprende un material celulósico o lignocelulósico.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, donde el material celulósico o lignocelulósico no se trata enzimáticamente con una cantidad suficiente de enzimas para convertir más de 15% del material celulósico o lignocelulósico en azúcares simples dentro de 24 horas.

20. Un método de producir un producto final fermentativo, el método que comprende:

añadir un primer inóculo de una cepa de *Clostridium* al medio;

cultivar el *Clostridium* en condiciones adecuadas para la producción de etanol;

añadir células viables adicionales de *Clostridium* sp. al medio más de cinco horas después de añadir el primer inóculo de *Clostridium* al medio; y

recolectar el producto final fermentativo del medio.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, que además comprende añadir uno o más componentes del medio al medio después de añadir el primer inóculo de *Clostridium*.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 20, donde una adición de los componentes del medio y una adición de las células viables se produce en forma sucesiva o simultánea.

23. Un método de producir etanol, el método que comprende las etapas de:

eliminar una impureza de un material de etanol impuro para producir un material de etanol purificado, donde el material de etanol purificado es más de aproximadamente 90% (peso) de etanol, y el material de etanol impuro se deriva de un medio de fermentación obtenido por el cultivo de las células de *Clostridium phytofermentans* en un cultivo discontinuo alimentado, y donde la concentración de etanol en el medio de fermentación es mayor de aproximadamente 7 g/L de.

24. Un método de producir a producto final fermentativo, el método que comprende las etapas de: cultivar un medio que comprende una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde el

producto final fermentativo se produce con una productividad instantánea de al menos aproximadamente 3 g/L-día.

25. Un método de producir a producto final fermentativo, que comprende:

proveer un material celulósico, donde dicho material celulósico no ha sido tratado productos químicos o enzimas suministradas en forma exógena; combinar el material celulósico con un microbio en un medio, donde el medio no comprende enzimas suministradas en forma exógena; y fermentar el material celulósico en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir un producto final fermentativo.

26. Un método de producir un producto final fermentativo, el método que comprende: fermentar las células de *Clostridium phytofermentans* en presencia de un modificador de pH, donde se produce un producto final fermentativo.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, donde el producto final fermentativo es etanol.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 26, donde la fermentación de las células se produce a un pH, entre aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,2.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, donde el pH es aproximadamente 6,5.

30. Un método de producir un producto final fermentativo, el método que comprende: fermentar las células de una cepa de *Clostridium* en presencia de un material de ácido graso añadido, donde se produce un producto final fermentativo.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, donde el material que comprende ácido graso comprende uno o más de aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de canola, aceite de soja, o aceite de colza oleaginosa.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 30, donde el material que comprende ácido graso comprende un fosfolípido o a lisofosfolípido.

33. Un medio de fermentación, el medio que comprende células de *Clostridium phytofermentans* y un modificador de pH, donde un produce un producto final fermentativo.

34. Un medio de fermentación, el medio que comprende células de una cepa de *Clostridium* y un compuesto que contiene ácido grado agregado, donde se produce un producto final fermentativo.

35. Un medio de fermentación que comprende una cepa de *Clostridium phytofermentans*, una fuente de nitrógeno que comprende prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina, y a material celulósico o lignocelulósico.

36. Un método de producir alcohol, el método que comprende: fermentar la células de una cepa de *Clostridium* y la presencia de un modificador de pH y un material de ácido graso, donde se produce un producto final fermentativo.

37. Una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho fermentador está configurado para mantener una cantidad de compuestos de azúcar en un nivel que varía en menos de aproximadamente 25% durante la fermentación.

38. Una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho fermentador está configurado para suplementar periódicamente dicho medio con componentes del medio adicionales o células viables adicionales de *Clostridium phytofermentans*.

39. Una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho medio comprende un modificador de pH y un material celulósico o lignocelulósico.

40. La planta de combustible de acuerdo con la reivindicación 39, donde dicho medio también comprende un material de ácido graso.

41. Una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho medio comprende una fuente de nitrógeno que comprende prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina, y un material celulósico o lignocelulósico.

42. Una planta de combustible que comprende un fermentador configurado para alojar un medio y una cepa de *Clostridium phytofermentans*, donde dicho medio comprende un material de ácido graso y un material celulósico o lignocelulósico.

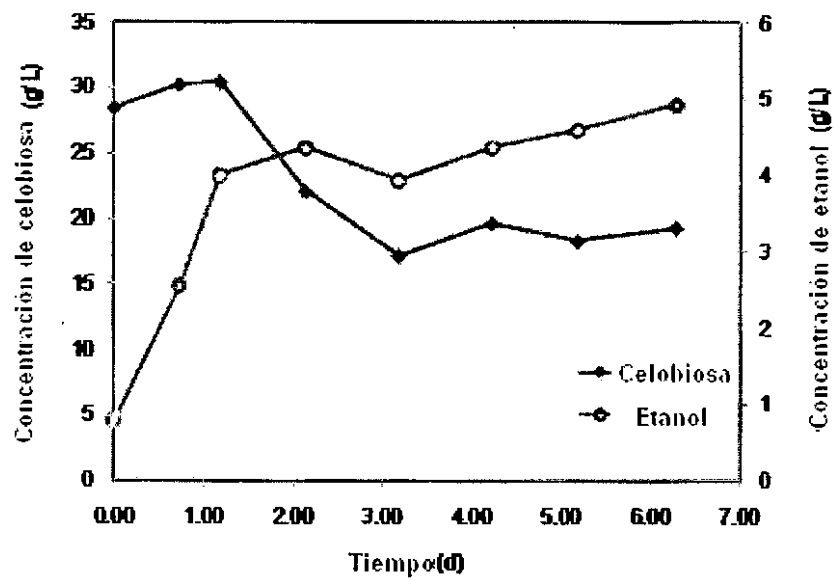
43. Un producto final fermentativo producido por la fermentación de un material celulósico o lignocelulósico con una cepa de *Clostridium phytofermentans*, en un medio que comprende una cantidad de compuestos de azúcar en un nivel que varía en menos de aproximadamente 25% durante la fermentación.

44. Un producto final fermentativo producido por la fermentación de un material celulósico o lignocelulósico con una cepa de *Clostridium phytofermentans*, en un medio que comprende un modificador de pH.

45. Un producto final fermentativo producido por la fermentación de un material celulósico o lignocelulósico con una cepa de *Clostridium phytofermentans*, en un medio que comprende un ácido graso.

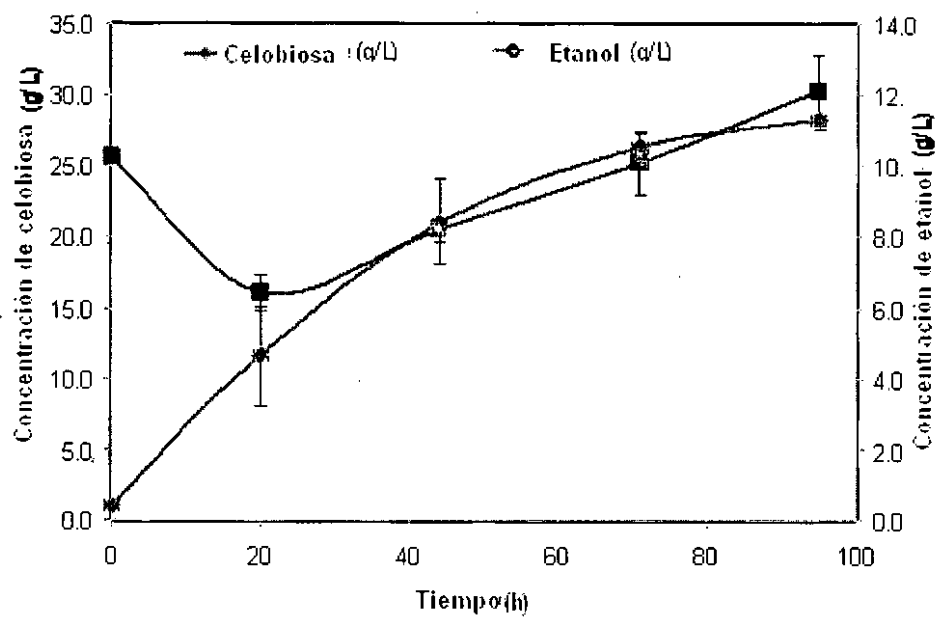
46. Un producto final fermentativo producido por la fermentación de un material celulósico o lignocelulósico con una cepa de *Clostridium phytofermentans*, en un medio que comprende una fuente de nitrógeno que comprende prolina, glicina, histidina, y/o isoleucina.

47. El producto final fermentativo de acuerdo con las reivindicaciones 43-46, donde dicho producto final fermentativo es etanol.



Concentración de sustrato y producto con tiempo en el fermentador control (lote)

FIGURA 1



Concentración de sustrato y producto con tiempo en el fermentador discontinuo alimentado.

FIGURA 2

000148

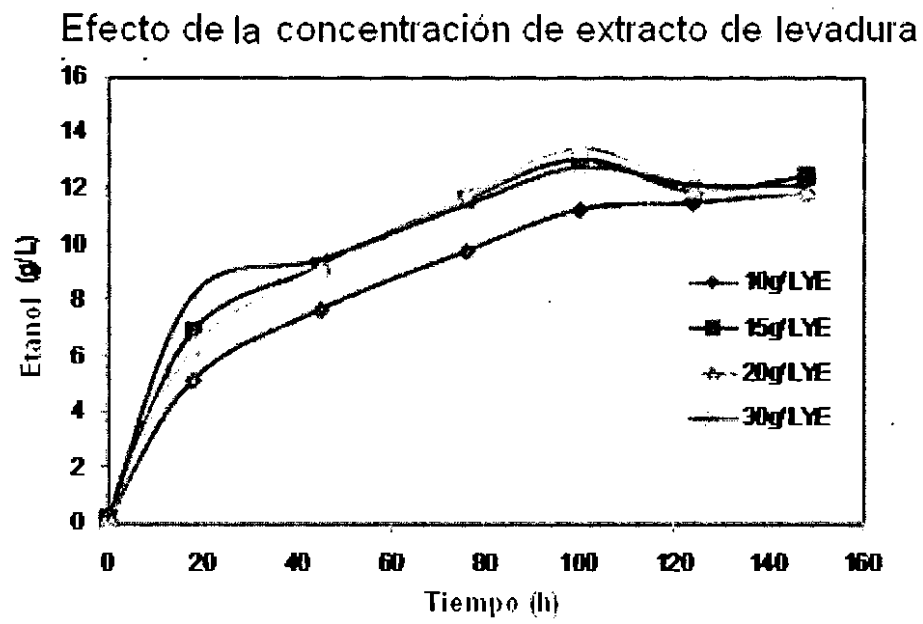


FIGURA 3

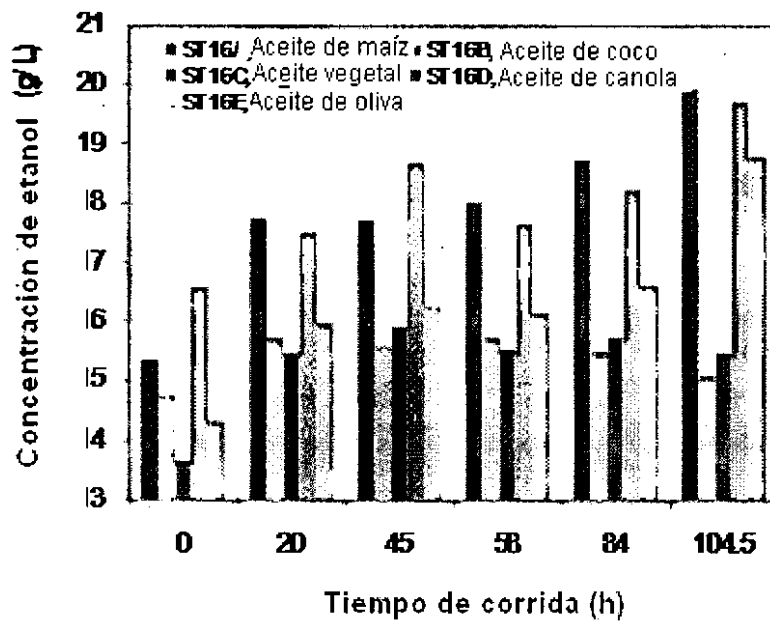


FIGURA 4

000150

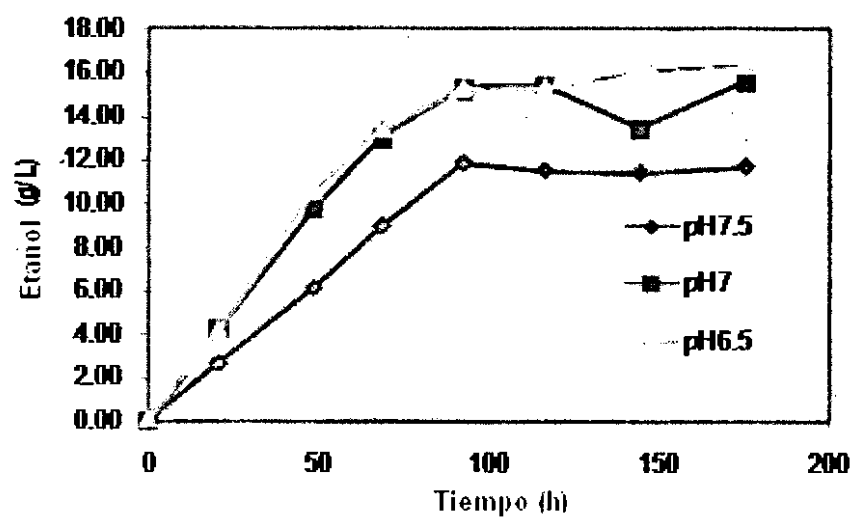


FIGURA 5

000151

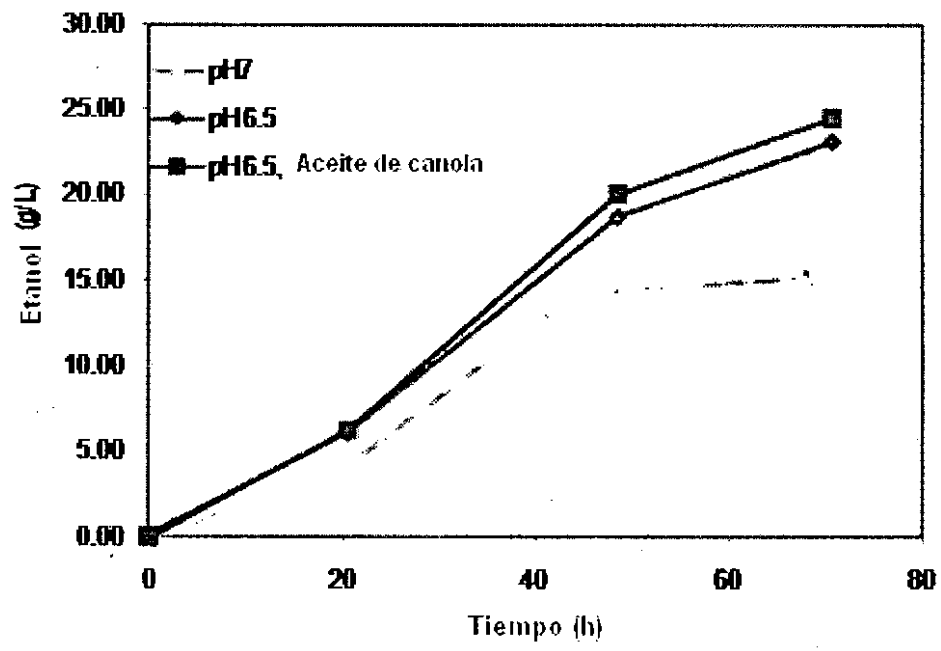


FIGURA 6

000152

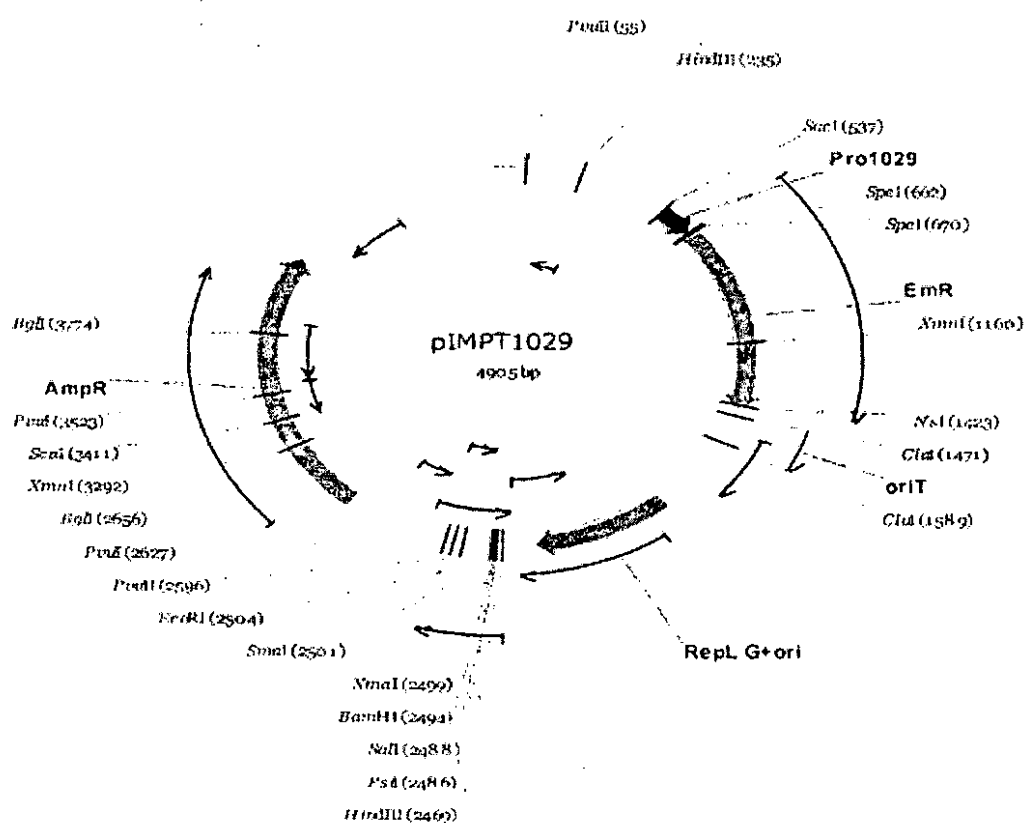


FIGURA 7

000153

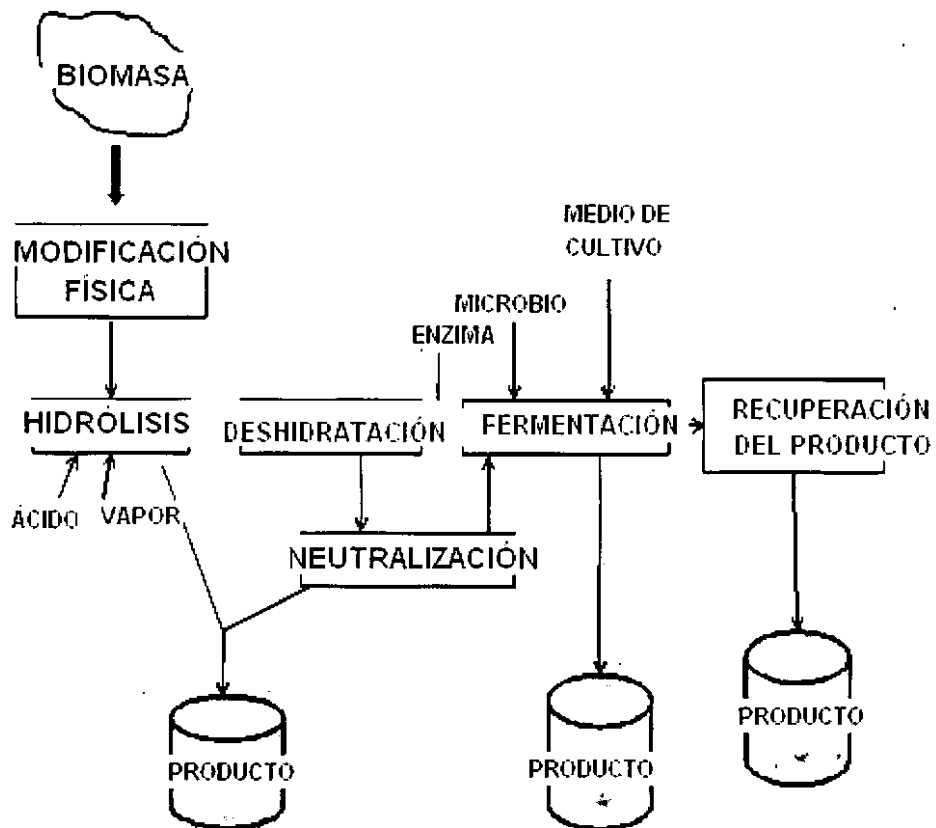


FIGURA 8

000154

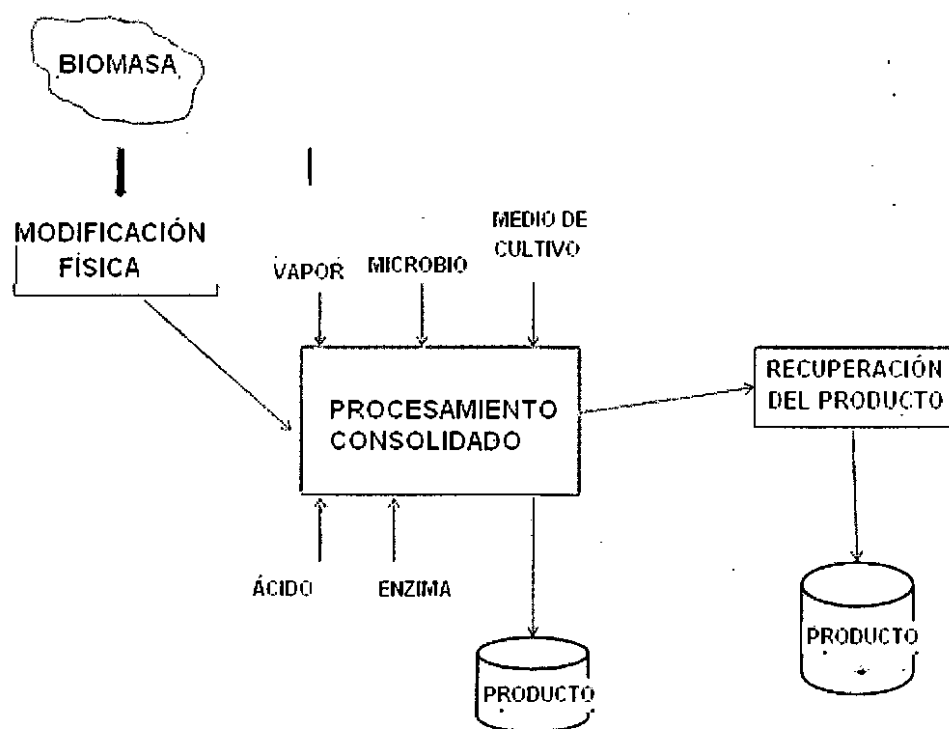


FIGURA 9

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 September 2010 (16.09.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/104896 A9

(51) International Patent Classification:
C12P 1/04 (2006.01) C12N 1/22 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)

MA 01002 (US). KILBANE, John [US/US]; 4 Shrewsbury Green Drive, Unit 1, Shrewsbury, MA 01545 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2010/026730

(74) Agents: BRESNAHAN, Matthew, John et al.; Wilson Sonsini Goodrich & Rosati, 650 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304-1050 (US).

(22) International Filing Date:
9 March 2010 (09.03.2010)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/158,581 9 March 2009 (09.03.2009) US
61/158,600 9 March 2009 (09.03.2009) US
61/171,077 20 April 2009 (20.04.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
QTEROS, INC. [US/US]; 100 Venture Way, Hadley, MA 01035 (US).

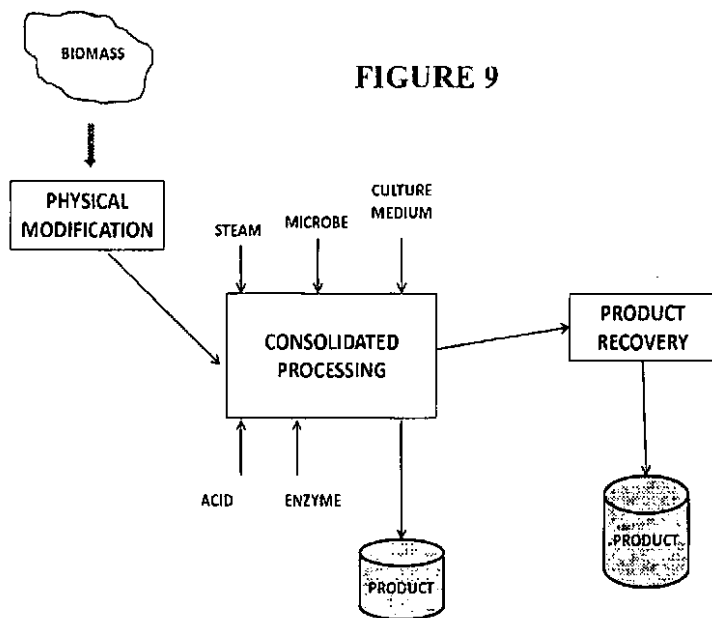
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): PAREKH, Sarad [US/US]; 4 Morgan Drive, Grafton, MA 01536 (US).
KARIM, Khursheed [US/US]; 4 Autum Lane, Amherst,

[Continued on next page]

(54) Title: PRODUCTION OF FERMENTIVE END PRODUCTS FROM CLOSTRIDIUM SP.



(57) Abstract: In one aspect, methods to enhance the production of ethanol and other fermentive end products from a wide variety of feedstocks by Clostridium microorganisms, such as Clostridium phytofermentans are disclosed. A method of improving fermentation performance of Clostridium microorganisms, such as Clostridium phytofermentans through the use of a fed-batch strategy is described, as well as methods of producing fermentive end products, such as alcohols and/or chemicals by fermenting Clostridium microorganisms, such as Clostridium phytofermentans in the presence of fatty acid-containing compounds and/or at reduced pH.



TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, (48) Date of publication of this corrected version:
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

14 April 2011

Published:

(15) **Information about Correction:**
see Notice of 14 April 2011

- *with international search report (Art. 21(3))*
- *with information concerning authorization of rectification of an obvious mistake under Rule 91.3 (b) (Rule 48.2(i))*

000157

**PATENT COOPERATION TREATY
In the International Bureau of WIPO**

International Application No.: PCT/US2010/026730
International Filing Date: 09 March 2010
Priority Date: 09 March 2009
Applicant: QTEROS, INC.
Title: PRODUCTION OF FERMENTIVE END PRODUCTS
FROM *CLOSTRIDIUM* sp.
Attorney Docket No.: 37836-707.601

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

ATTENTION: Yolaine Cussac, E-mail: pt05.pct@wipo.int
FILED VIA: PCT online Service Center

REQUEST TO RECORD A CHANGE
Under PCT Rule 92bis

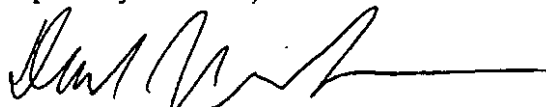
Please record change of address for Applicant Qteros, Inc. The new Address is:

QTEROS, Inc.
100 Campus Drive, 6th Floor
Marlborough, MA 01752
US

We look forward to receipt of Form PCT/IB/306 confirming the recording of this change.

Date: 06 September 2011

Respectfully submitted,



David W. Van Goor
Patent Agent
Registration No. 67,263

Wilson Sonsini Goodrich & Rosati
650 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304-1050, US

DVG/dm

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UT

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒
☒
☒
☒

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐