

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogada
ALICIA LLOREDA RICAURTE

ASUNTO	Radicación	08 88402
	Trámite	011
	Evento	378
	Actuación	519
	Oficio	
	Folios	10

0 9 4 6 5

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (Fase Nacional)	☒	Cap. I	☒
		Cap. II	☐

No. Solicitud Internacional PCT/US2007/002334
Fecha de Presentación Internacional 26/Enero/2007

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 08 a 45	25/Agosto/2008
Reivindicaciones:	Folios 46 a 51	25/Agosto/2008
Dibujos:	Folios 52 a 58	25/Agosto/2008
Prioridad:	60/762,813	27/Enero/2006

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de Prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Sistemas y métodos para producir biocombustibles y materiales relacionados".

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de suministrar métodos y una planta para la producción de combustibles por fermentación a partir de biomasa.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona métodos y una planta que emplean la hidrólisis de polisacáridos para la obtención de
Expediente 08 88402 1er Art 45

carbohidratos que sirvan para la fermentación en co-cultivo de *Clostridium phytofermentas* con otro microorganismo y obtener así combustibles.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) C12N 1/20 y C12P 7/06.

4. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Las reivindicaciones 1 y 8 contienen errores de digitación en los términos "*tiepo*" y "*comrende*". Se sugiere digitar correctamente estos términos.

Las reivindicaciones 1, 13, 19 y 36 no son claras porque la expresión "*bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir combustible*" es un resultado a alcanzar, lo que no es permitido, no definen el método o planta porque la invención no queda definida por el resultado a alcanzar, puesto que la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se sugiere remplazarlo por las características esenciales estructurales que contribuyen a la obtención de ese efecto.

Las reivindicaciones 1 a 39 no son claras porque el término "*microbio*" es un término poco reconocido en el campo técnico. Se sugiere definirlo correctamente por microorganismo.

Las reivindicaciones 16, 17 y 18 no son claras porque el término "*aproximadamente*" es impreciso, por lo cual no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirlo por un término preciso o un rango concreto.

Descripción (Art 28 D 486)

La Descripción aunque es clara y permite establecer el problema técnico y su solución presenta algunas inconsistencias porque las siguientes expresiones:

Fl. 10, Párr. 1, Línea 7 "*suministrao*"; Fl. 11, Párr. 2, Línea 4 "*célulcas*"; Fl. 14, Párr. 4, Línea 6 "*disperses*"; Fl. 15, Párr. 1, Línea 2 "*ceparadamente*". Fl. 15, Párr. 1, Línea 9 "*mayors*"; Fl. 16, Línea 1 "*enzyme*"; Fl. 17, Párr. 1, Línea 8 "*perso*"; Fl. 17, Párr. 1, Línea 12 "*mayore*"; Fl. 26, Párr. 3, Línea 6 "*rencimiento*"; Fl. 26, Párr. 3, Línea 6 "*mremoverla*"; Fl. 27, Párr. 1, Línea 1 "*ceparado*". Fl. 28, Párr. 4, Línea 1 "*realizaicones*"; Fl. 29, Párr. 2, Línea 2 "*menso*"; Fl. 31, Párr. 2, Línea 9 "*realizacones*"; Fl. 33, Párr. 3, Línea 4 "*contacterla*"; Fl. 33, Párr. 3, Línea 10 "*aprocimadamente*"; Fl. 34, Párr. 1, Línea 2 "*extractos*"; Fl. 3, Párr. 1, Línea 5 "*encimas*"; Fl. 35, Párr. 2, Línea 3 "*opcionoamente*"; Fl. 36, Párr. 3, Línea 6 "*re-destiladno*"; Fl. 37, Párr. 1, Línea 6 "*hidrñolisis*"; Fl. 46, Párr. 2, Línea 6 "*hidrólsis*" y Fl. 43, Párr. 2, Línea 9 "*formiato*" presentan errores de digitación y/u ortografía. Se sugiere realizar las correcciones respectivas.

El símbolo del Fl. 17, Párr. 2, Línea 14 "*amu*" no es el aceptado en el campo técnico de ingeniería, química, biotecnología al cual pertenece la invención. Se sugiere definirlo correctamente por u.m.a (unidad de masa atómica).

5. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: 27 de enero de 2006 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Item	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	US 5837506	Continuous process for making ethanol	17/Noviembre/1998
D2	Art 1 ¹	<i>Clostridium phytofermentas</i> sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil	01/Julio/2002

¹ Warnick T.A., Méthe B.A. y Lechine S.B. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2002, Vol 52. Págs. 1155 a 1157 y 1159. Fls. 86 a 89.

D1http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=19981117&CC=US&NR=5837506A&KC=A divulga un procedimiento y una planta para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico mediante co-cultivo y pretratamiento de biomasa por hidrólisis (Col 1, Líneas 8 a 18; Col. 4, Líneas 34 a 42; Col. 5, Líneas 6 a 31)

D2 divulga la caracterización microbiológica de una cepa de *Clostridium phytofermentas* (Pág. 1155, abstract).

6. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel inventivo (Art 18 D486)

La reivindicación 1 consiste en un método para hacer un combustible a partir de material de biomasa, el método comprende:

proveer un material de biomasa que comprende un carbohidrato de alto peso molecular;

hidrolizar el material de biomasa para proveer un material de biomasa hidrolizado

combinar el material de biomasa liofilizado con células de *Clostridium phytofermentas* en un medio; en donde una concentración de carbohidratos es mayor a 20 mM; y

fermentar el material de biomasa hidrolizado bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir combustible.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Método para hacer combustible a partir de biomasa	Método para hacer etanol a partir de material celulósico (Col 1, Líneas 8 a 11)	Fermentación con una bacteria que produce etanol (Pág. 1155, abstract)
La biomasa comprende un carbohidrato de alto peso molecular	Método para hacer etanol a partir de material celulósico (Col 1, Líneas 8 a 11)	Se emplea celulosa, almidón, xilano como sustrato para la bacteria (Pág. 1157, Col 1, Párr. 2, Líneas 1 a 4)
La biomasa es hidrolizada	La biomasa es hidrolizada (Col 1, Líneas 12 a 15)	No se menciona

Se combina la biomasa hidrolizada con una bacteria y ocurre la fermentación	Se combina la biomasa hidrolizada con una bacteria y ocurre la fermentación (Col.1, Líneas 16 a 18)	No se menciona
La bacteria es <i>Clostridium phytofermentas</i>	No se menciona	La bacteria es <i>Clostridium phytofermentas</i> (Pág. 1155, abstract)
La concentración de carbohidratos es mayor a 20mM	Se tiene en el medio glucosa a una concentración de 2,7 mM a 110 mM o 0,5 g/L a 20 g/L (Col. 7, Línea 12; Fig. 4).	Se tiene en el medio celobiosa 3 g/L, 8 mM (Pág. 1155, Col. 2, Párr. 2 , Línea 11)

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulgan un procedimiento para producir etanol a partir de biomasa hidrolizada y una bacteria *Clostridium phytofermentas* que produce etanol.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el procedimiento de D1 consiste en la presencia de *Clostridium phytofermentas*.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el procedimiento de D2 consiste en la biomasa hidrolizada.

El efecto que logra el incluir la bacteria *Clostridium phytofermentas* en la producción de combustibles es que se aprovecha el material celulósico hidrolizado presente para la formación de etanol por lo que es más eficiente.

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo modificar el procedimiento de la producción de etanol en D1 para que se forme etanol con una bacteria a partir de material celulósico hidrolizado y sea mas eficiente”.

Sin embargo, la bacteria *Clostridium phytofermentas* que produce etanol a partir de celulosa, o celobiosa que es uno de los productos de la hidrólisis de celulosa ya esta divulgada en el documento D2 que se refiere a un microorganismo que degrada diversos polisacáridos, disacáridos y monosacáridos y produce etanol (Pág. 1155, abstract)

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la bacteria *Clostridium phytofermentas* de D2 en el procedimiento de D1 para la formación de etanol que es un combustible para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 2 a 7 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas, ya que D1 divulga La hidrólisis de biomasa por ácido, la hidrólisis por enzimas, la combinación de hidrólisis ácido y enzimática, la reducción de tamaño antes de hidrolizar y la separación del material sólido hidrolizable del líquido que contiene carbohidratos después de la hidrolisis ácida (Col.4 Línea 45 a Col. 5, Línea 5; Col 8, Líneas 28 a 34).

Conclusión: Las reivindicaciones 1 a 7 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 8 consiste en una planta de combustible que comprende:
Expediente 08 88402 1er Art 45

una unidad de hidrólisis configurada para hidrolizar un material de biomasa que comprende un carbohidrato de alto peso molecular, y un fermentador configurado para albergar un medio y que comprende células *Clostridium phytofermentas* dispersas allí.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Planta de combustible	Planta de etanol (Col. 3, Línea 50 a Col. 4, Línea 51)	No se menciona
Con una unidad para hidrolizar biomasa que comprende un carbohidrato de alto peso molecular	Posee una unidad para hidrolizar la celulosa (Col. 4, Líneas 24 a 31).	No se menciona
Con un fermentador para albergar un medio y <i>C. phytofermentas</i> .	No se menciona	Se emplea un medio para crecer <i>C. phytofermentas</i> . (Pág. 1156, Col 1, Párr. 3 y Párr. 4)

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 8 porque divulgan una planta para producir etanol a partir de biomasa hidrolizada y una bacteria *Clostridium phytofermentas* que produce etanol.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 8 y la planta de D1 consiste en la presencia de *Clostridium phytofermentas*.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 8 y el procedimiento de D2 consiste en la unidad para hidrolizar biomasa.

El efecto que logra el incluir la bacteria *Clostridium phytofermentas* en la producción de combustibles es que se aprovecha el material celulósico hidrolizado presente para la formación de etanol por lo que es más eficiente.

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo modificar el procedimiento de la producción de etanol en D1 para que se forme etanol con una bacteria a partir de material celulósico hidrolizado y sea mas eficiente”.

Sin embargo, la bacteria *Clostridium phytofermentas* que produce etanol a partir de celulosa, o celobiosa que es uno de los productos de la hidrólisis de celulosa ya esta divulgada en el documento D2 que se refiere a un microorganismo que degrada diversos polisacáridos y produce etanol (Pág. 1155, abstract)

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la bacteria *Clostridium phytofermentas* de D2 en el procedimiento de D1 para la formación de etanol que es un combustible para llegar así al objeto de la reivindicación 8 de la solicitud.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 9 a 12 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas, ya que D1 divulga cocultivo con uno o mas microorganismos diferentes a Clostridios que degradan material celulósico en conjunto con levaduras o bacterias como *Zymomonas mobilis*

(Col. 5, Líneas 6 a 31).

Conclusión: La reivindicaciones 8 a 12 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 13 consiste en un método para hacer un combustible, el método comprende:

Combinar células de *Clostridium phytofermentans* y un material lignocelulósico en el medio; y fermentar el material lignocelulósico bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir un combustible.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Combinar <i>C. phytofermentans</i>	No se menciona	Se tiene la bacteria <i>C. phytofermentans</i> que degrada celulosa (Pág. 1155, abstract).
y material lignocelulósico para fermentar.	Se emplea material lignocelulósico para fermentar (Col. 4, Líneas 34 a 42).	No se menciona

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 13 porque divulgan un método para producir etanol a partir de biomasa y una bacteria *Clostridium phytofermentans* que produce etanol.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 13 y el procedimiento de D1 consiste en la presencia de *Clostridium phytofermentans*.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 13 y el procedimiento de D2 consiste en la biomasa como material lignocelulósico.

El efecto que logra el incluir la bacteria *Clostridium phytofermentans* en la producción de combustibles es que se aprovecha el material lignocelulósico presente para la formación de etanol por lo que es más eficiente.

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo modificar el procedimiento de la producción de etanol en D1 para que se forme etanol con una bacteria a partir de material lignocelulósico y sea mas eficiente”.

Sin embargo, la bacteria *Clostridium phytofermentans* que produce etanol a partir de celulosa presente en material vegetal ya esta divulgada en el documento D2 que se refiere a un microorganismo que degrada diversos polisacáridos y produce etanol (Pág. 1155, abstract)

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la bacteria *Clostridium phytofermentans* de D2 en el procedimiento de D1 para la formación de etanol que es un combustible para llegar así al objeto de la reivindicación 13 de la solicitud.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 14 a 18 no mencionan características

inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas, ya que D1 divulga materiales lignocelulósicos que sirven para la fermentación donde se produce etanol por debajo de 1M (máximo 16 g/L o 0,35 M) y D2 divulga que el medio de cultivo posee factores de crecimiento, minerales, agentes quelantes y que la *Clostridium phytofermentas* crece a temperaturas por debajo de 45°C y pH por debajo de 9.5 (D1: Col. 4, Líneas 34 a 42, Fig. 4 y D2: Pág. 1155, Col. 2, Párr. 2 a Pág. 1156, Col 1, Párr. 1; Pág. 1157, Col. 2, Párr. 2).

Conclusión: La reivindicaciones 13 a 18 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 19 consiste en un método para hacer un combustible, el método comprende:

Combinar células de *Clostridium phytofermentans* y un material que comprende un carbohidrato en un medio, en donde una concentración del carbohidrato en el medio es mayor de 40 mM; y fermentar el material que comprende el carbohidrato bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir un combustible.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Combinar <i>C. phytofermentans</i> y un carbohidrato en un medio	No se menciona	Se emplea un medio para crecer <i>C. phytofermentans</i> . (Pág. 1156, Col 1, Párr. 3 y Párr. 4)
La concentración del carbohidrato es mayor a 40 mM	Se tiene en el medio glucosa a una concentración de 2,7 mM a 110 mM o 0,5 g/L a 20 g/L (Col. 7, Línea 12; Fig. 4).	No se menciona
Fermentar el carbohidrato	Fermentar el carbohidrato (Fig. 4)	Fermentar el carbohidrato (Pág. 1159, Tabla 1)

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 19 porque divulgan un procedimiento para producir etanol a partir de biomasa y una bacteria *Clostridium phytofermentans* que produce etanol.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 19 y el procedimiento de D1 consiste en la presencia de *Clostridium phytofermentans*.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 19 y el procedimiento de D2 consiste en la concentración de carbohidrato inicial en el medio.

El efecto que logra el incluir la bacteria *Clostridium phytofermentans* en la producción de combustibles es que se aprovechan los carbohidratos presentes para la formación de etanol por lo que es más eficiente.

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo modificar el procedimiento de la producción de etanol en D1 para que se forme etanol con una bacteria a partir de la concentración de carbohidratos presente y sea mas eficiente”.

Sin embargo, la bacteria *Clostridium phytofermentans* que produce etanol a partir de diversos carbohidratos ya esta divulgada en el documento D2 que se

refiere a un microorganismo que degrada diversos polisacáridos, disacáridos y monosacáridos y produce etanol (Pág. 1155, abstract)

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la bacteria *Clostridium phytofermentas* de D2 en el procedimiento de D1 para la formación de etanol que es un combustible para llegar así al objeto de la reivindicación 19 de la solicitud.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 20 a 34 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas, ya que D1 divulga concentraciones de carbohidratos mayores a 50 mM y mayores a 100 mM, menores a 2000 mM, tamaño de partícula de biomasa de 5 a 50 micras, las cuales son deseadas para tener mayor área superficial y que sea más eficiente la hidrólisis, algo que D1 también menciona y adicionalmente D1 muestra que se genera una mezcla de dos o mas carbohidratos cuando por hidrolisis de material celulósico y/o lignocelulósico, por hidrolisis enzimática o ácida se producen diversos carbohidratos de bajo peso molecular a partir de mayor peso molecular, donde se tienen diversas de enzimas y diversos sustratos lignocelulósicos, y D2 divulga como sustrato celulosa libre de lignina, y carbohidratos y polisacáridos que puede degradar *Clostridium phytofermentas* (D1:Fig. 4, Col.1, Líneas 12 a 15, Col. 4, Líneas 34 a 44, Col. 4, Líneas 45 a 51; Col. 4 Línea 65 a Col. 5, Línea 2; y D2: Pág. 1159, tabla 1; Pág.1155, abstract).

Conclusión: Las reivindicaciones 19 a 34 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 35 consiste en un método que comprende:

combinar células de *Clostridium phytofermentans*, un segundo microbio y un material que comprende un carbohidrato en un medio; y fermentar el material que comprende el carbohidrato.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Tener <i>C. phytofermentas</i> ,	No se menciona	<i>C. phytofermentas</i> (Pág. 1155, abstract)
Y combinar un segundo microorganismo	combinar un segundo microorganismo (Col. 5, Líneas 6 a 31)	No se menciona
Y combinar con un carbohidrato en un medio	Se tiene en el medio glucosa a una concentración de 2,7 mM a 110 mM o 0,5 g/L a 20 g/L (Col. 7, Línea 12; Fig. 4).	combinar con un carbohidrato en un medio (Pág. 1156, Col 1, Párr. 3 y Párr. 4)
Fermentar el carbohidrato	Fermentar el carbohidrato (Fig. 4)	Fermentar el carbohidrato (Pág. 1159, Tabla 1)

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 35 porque divulgan un procedimiento para producir etanol a partir de biomasa y una bacteria *Clostridium phytofermentas* que produce etanol.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 35 y el procedimiento de D1 consiste en la presencia de *Clostridium phytofermentas*.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 35 y el procedimiento de D2 consiste en la combinación con un segundo microorganismo.

El efecto que logra el incluir la bacteria *Clostridium phytofermentas* en la producción de combustibles es que se aprovechan los diversos carbohidratos presentes para la formación de etanol por lo que es más eficiente.

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: "cómo modificar el procedimiento de la producción de etanol en D1 para que se forme etanol con una bacteria a partir de los diversos carbohidratos presentes y sea mas eficiente".

Sin embargo, la bacteria *Clostridium phytofermentas* que produce etanol a partir de diversos carbohidratos ya esta divulgada en el documento D2 que se refiere a un microorganismo que degrada diversos polisacáridos, disacáridos y monosacáridos y produce etanol (Pág. 1155, abstract)

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la bacteria *Clostridium phytofermentas* de D2 en el procedimiento de D1 para la formación de etanol que es un combustible para llegar así al objeto de la reivindicación 35 de la solicitud.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 37 y 38 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas, ya que D1 divulga un segundo microorganismo que es una levadura en co-cultivo con clostridios y una bacteria en co-cultivo con *C. phytofermentans* como lo es *Z. mobilis* (Col. 5, Líneas 6 a 31).

Conclusión: Las reivindicaciones 35, 37 y 38 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 39 consiste en una composición que comprende *Clostridium phytofermentans* y un segundo microbio.

Esta reivindicación contiene el mismo objeto de la reivindicación 35, por lo tanto cumple el requisito de novedad el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

7. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US 5901777	1 a 35 y 37 a 39	Nivel inventivo
D2	Art 1	1 a 35 y 37 a 39	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de

no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante para sesenta (60) días y presentarla por escrito.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha
05 JUN. 2012

Elaborado por: Jorge Eduardo Cortázar Gómez JEC
Revisado por: Rosa Patricia Tellez Chavarro

Clostridium phytofermentans sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil

Department of
Microbiology, University of
Massachusetts, Amherst,
MA 01003, USA

Thomas A. Warnick, Barbara A. Methé and Susan B. Leschine

Author for correspondence: Susan B. Leschine. Tel: +1 413 545 0673. Fax: +1 413 545 1578.
e-mail: suel@microbio.umass.edu

An obligately anaerobic, mesophilic, cellulolytic bacterium, strain ISDg^T, was isolated from forest soil. Cells of this isolate stained Gram-negative, despite possessing a Gram-positive cell-wall ultrastructure, and were motile, straight rods that formed spherical terminal spores that swelled the sporangium. Cellulose, pectin, polygalacturonic acid, starch, xylan, arabinose, cellobiose, fructose, galactose, gentiobiose, glucose, lactose, maltose, mannose, ribose and xylose supported growth. The major end products of fermentation were ethanol, acetate, CO₂ and H₂; formate and lactate were minor products. The optimum temperature for growth was 35–37 °C. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA sequence comparisons showed that strain ISDg^T was related to a group of anaerobes that included *Clostridium herbivorans*, *Clostridium polysaccharolyticum* and *Clostridium populeti*. The G+C content of this strain was 35.9 mol%. On the basis of numerous genotypic and phenotypic differences between strain ISDg^T and its close relatives, strain ISDg^T is proposed as a novel species in the genus *Clostridium*, for which the name *Clostridium phytofermentans* sp. nov. is proposed. The type strain is ISDg^T (= ATCC 700394^T).

Keywords: *Clostridium phytofermentans*, cellulolytic, cellulose fermentation, ethanol production, forest soil

INTRODUCTION

Since cellulose is the most abundant organic material on Earth, the microbes involved in its breakdown are of interest both in ecological terms, for their importance in the global carbon cycle, and in economic terms, for their role in processes involving the conversion of cellulosic wastes to valuable products such as ethanol and organic acids (Ljungdahl & Eriksson, 1985; Leschine, 1995). Although most of the cellulose produced globally each year is broken down aerobically, there are many anaerobic environments in which cellulose decomposition occurs. Anaerobic cellulolytic bacteria have been isolated from such diverse habitats as soils, sediments and estuarine muds (Madden *et al.*, 1982; Murray *et al.*, 1986; He *et al.*, 1991; Monserrate *et al.*, 2001), anaerobic digestors and the rumens or intestines of various mammals. As part of a study of the diversity of cellulolytic microbes from soils and sediments, we isolated several anaerobic

strains from a wide range of locations. One isolate was sufficiently different from previously described species to warrant a detailed characterization. In this report, the isolation and characterization of a novel cellulolytic species of *Clostridium* from forest soil is described. The name *Clostridium phytofermentans* sp. nov. is proposed for this isolate, with strain ISDg^T as the type strain.

METHODS

Media and culture conditions. The anaerobic techniques of Hungate (1969) were used, unless specified otherwise. Medium GS-2C, used for enrichment, isolation and routine cultivation of strain ISDg^T, was derived from GS-2 of Johnson *et al.* (1981) and contained the following (g l⁻¹): ball-milled cellulose (Leschine & Canale-Parola, 1983), 6.0; yeast extract, 6.0; urea, 2.1; K₂HPO₄, 2.9; KH₂PO₄, 1.5; MOPS, 10.0; trisodium citrate dihydrate, 3.0; cysteine hydrochloride, 2.0; resazurin, 0.001; and the pH was adjusted to 7.0. In medium GS-2CB, cellulose was replaced with 3.0 g cellobiose l⁻¹, added as a filter-sterilized solution to the sterile medium. GS-2 agar media were supplemented with 15 g agar l⁻¹ and soft-agar media contained 7.5 g agar l⁻¹.

The GenBank/EMBL/DDBI accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain ISDg^T is AF020431.

Medium MI, which was used in growth and characterization studies, was a modified version of GS-2 that contained no yeast extract or urea but was supplemented with the following (g l⁻¹) as growth factors: tryptone (Difco), 2.0; adenine, 0.02; cytosine, 0.05; guanosine, 0.02; thymine, 0.05; uracil, 0.04. After autoclaving, 10 ml sterile vitamin solution (Wolin *et al.*, 1964) was added per litre medium.

Broth cultures were incubated in an atmosphere of O₂-free N₂ at 30 °C. Cultures on plates of agar media were incubated at room temperature in an atmosphere of N₂/CO₂/H₂ (83:10:7) in an anaerobic chamber (Coy Laboratory Products).

Isolation procedure. Strain ISDg^T was isolated from damp silt in the bed of an intermittent stream in a forested site near Quabbin Reservoir in Massachusetts (USA). A soil sample was inoculated into GS-2C medium and incubated at 30 °C for 2 weeks. Following two transfers into fresh medium, the culture was diluted and inoculated into tubes containing 4 ml melted GS-2C soft-agar medium, which was poured onto plates of GS-2 basal agar medium. Strain ISDg^T was isolated by following the procedure of Warshaw *et al.* (1985). Colonies that produced clear zones in cellulose overlays were streaked and restreaked several times on plates of GS-2CB agar medium and finally transferred back into tubes of GS-2C broth to determine whether the isolate was cellulolytic.

Substrate utilization and temperature- and pH-optima studies. The ability of strain ISDg^T to utilize various soluble compounds as fermentable substrates was determined by measuring the turbidity of cultures in medium MI containing the potential substrate, as described previously (Leschine & Canale-Parola, 1983; Monserrate *et al.*, 2001). Soluble substrates were added to tubes of MI medium as filter-sterilized solutions, to a final concentration of 2 g l⁻¹, and pebble-milled cellulose (Leschine & Canale-Parola, 1983) was added, before autoclaving, to a final concentration of 6 g l⁻¹.

The optimum temperature and pH for growth were determined in MI medium. For determination of the optimum pH, MOPS in MI was replaced with an equimolar quantity of MES, TAPS or CHES, and the proportions of K₂HPO₄ and KH₂PO₄ were altered to obtain a range of pH values outside the range of MOPS buffer.

Biochemical characterization and antibiotic sensitivity. Biochemical tests were performed by following the procedures outlined by Smibert & Krieg (1994). Antibiotic sensitivity was tested using antibiotic discs on plates of GS-2CB agar medium, as described previously (Monserrate *et al.*, 2001). The antibiotics tested included ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, kanamycin, neomycin, penicillin, rifampicin, streptomycin, tetracycline and vancomycin. Liquid fermentation products were determined by HPLC using an Aminex HPLC 87H column at 4 °C with 0.0025 M H₂SO₄ as the running buffer, an ISCO model 2300 HPLC pump and a Spectra Physics SP8430 refractive index detector. Ethanol was also determined by means of an enzymic assay (Sigma kit no. 332-A). Production of CO₂ and H₂ was measured by GC with a Shimadzu GC-8A apparatus fitted with a silica gel 60/80 column (Alltech) and a thermal conductivity detector. The carrier gas was helium at a flow rate of 12 ml s⁻¹ and the column temperature was 60 °C. H₂ production was also analysed using an RGD2 reduction gas analyser (Trace Analytical) equipped with a Carbosieve S-II column (Supelco) and a type 50 rotary sampling valve (Rheodyne) with a 0.1 ml sampling loop. N₂ was the carrier gas, at a flow rate of 20–30 ml min⁻¹.

Morphology. Cells were examined by phase-contrast and electron microscopy. Cells were prepared for electron microscopy using methods similar to those described previously (Paster & Canale-Parola, 1982; Monserrate *et al.*, 2001). Cells from liquid cultures were negatively stained with 1% uranyl acetate. Cells from plates of GS-2CB agar medium were used for preparation of thin sections. Negatively stained preparations and thin sections were examined using a Philips CM10 transmission electron microscope.

Comparative analyses of 16S rRNA sequences. The 16S rRNA from strain ISDg^T was isolated and sequenced using methods essentially as described by Paster & Dewhirst (1988). The RNA was extracted and partially purified by the method of Pace *et al.* (1982). Nucleotide sequences of the rRNA were determined by using the dideoxynucleotide technique (Lane *et al.*, 1985), as modified by Paster & Dewhirst (1988). A nearly complete sequence was determined using DNA primers (primers 3–9; Dewhirst *et al.*, 1992) that were complementary to conserved regions of the rRNA molecule. A putative secondary structure for the strain ISDg^T sequence was examined for anomalies by comparison with a previously deduced secondary structure for a 16S rRNA sequence from the related Gram-positive bacterium *Clostridium innocuum*. The percentage similarity of the strain ISDg^T sequence to each of its closest neighbours was calculated manually.

Closely related sequences of 16S rRNA were identified in the GenBank database using BLAST (Altschul *et al.*, 1997; Benson *et al.*, 1993) and in the Ribosomal Database Project, version 8.0, using SEQUENCE_MATCH and SEQUENCE_ALIGN (Maidak *et al.*, 2000). The most closely related sequences derived from type strains of recognized species, as well as representative sequences from less closely related organisms, were obtained from GenBank and aligned with the PILEUP algorithm available in the Wisconsin Package (version 10) with graphical user interface (SEQLAB) (Genetics Computer Group). The alignment was verified and further refined manually. Only those nucleotide positions that could be aligned unambiguously (1298 nt) were used for further analysis. Phylogenetic trees, including rate-corrected versions, were constructed using distance, parsimony and maximum-likelihood methods available in version 4.0b2 of PAUP* (Swofford, 1998). Bootstrap analyses were used to evaluate the robustness of the inferred tree topologies recovered.

DNA base composition. DNA was isolated and purified by the method of Marmur (1961), as modified by Johnson (1994), from cells grown for 48 h in GS-2CB. The G+C content was determined by HPLC using the method of Mesbah *et al.* (1989).

RESULTS AND DISCUSSION

Colony and cellular morphology

Strain ISDg^T, cultured for 1 week on plates of GS-2CB agar medium, formed round, glossy, translucent colonies (2–5 mm in diameter) with slightly raised centres. The colony margins became somewhat undulate in older colonies.

Under phase-contrast microscopy, cells of strain ISDg^T appeared as long, thin, straight, motile rods (0.5–0.8 × 3.0–15.0 µm, occasional cells reaching 33 µm in length) and formed round, terminal spores (0.9–



Fig. 1. Morphology of strain ISDg^T. (a) Phase-contrast micrographs of cells from a 1-day-old culture in GS-2CB broth, showing a sporulating cell, several cells in which the sporangium has begun to swell but spores have not yet formed and an exceptionally long cell. Bar, 10 µm. (b) Transmission electron micrograph of a negatively stained cell from a 2-day-old culture in MICB medium (MI medium plus cellobiose), showing attachment of single flagellum (arrow). Bar, 1 µm. (c) Transmission electron micrograph of thin sections of cells cultured for 1 week on plates of GS-2CB agar medium. The cell membrane (CM) is surrounded by a relatively thin, densely staining layer, presumably peptidoglycan (P), which, in turn, is surrounded by additional layers, including a densely staining layer (DL) and a more diffuse surface layer (SL). Bar, 0.1 µm.

1.5 µm in diameter) that caused swelling of the cells (Fig. 1a). Cells were usually single and only rarely occurred in pairs. Electron micrographs of negatively stained cells revealed that cells had one or two usually subterminal flagella. A flagellated cell is shown in Fig. 1(b). Electron micrographs of thin sections of cells showed that the cytoplasmic membrane was surrounded by a multilayered cell envelope composed of a relatively thin electron-dense (peptidoglycan) layer and at least two additional exterior layers (Fig. 1c). Cells from logarithmic- and stationary-phase cultures of strain ISDg^T stained Gram-negative, although cell walls were not surrounded by outer membranes typical of Gram-negative cells (Fig. 1c).

Physiological and metabolic characteristics

Growth of strain ISDg^T was supported by arabinose, cellobiose, cellulose, fructose, galactose, gentiobiose, glucose, lactose, maltose, mannose, pectin, polygalacturonic acid, ribose, starch, xylan and xylose. Strain ISDg^T did not grow with glycerol, pyruvate, sucrose, trehalose or tryptone as substrate. Very poor growth occurred in MI medium without purines and pyrimidines, without vitamins or without tryptone. Apparently, strain ISDg^T required amino acids and/or peptides as a source of nitrogen, inasmuch as addition of either NH₄Cl or urea did not stimulate growth. Strain ISDg^T was negative in tests for urease, aesculin hydrolysis, nitrate reduction and H₂S production.

When cultured with either cellulose or cellobiose as substrate, strain ISDg^T produced acetate, ethanol,

CO₂ and H₂ as major products and formate and lactate as minor products. Growth in MI medium containing 0.3% cellobiose resulted in the production of the following (mmol product per 100 mmol cellobiose, mean of nine determinations): ethanol (265), acetate (109), lactate (49), formate (15).

Anaerobic conditions were required for growth of strain ISDg^T. The optimum temperature for growth was 37 °C. Cells grew slowly but to a relatively high density at 15 °C. Growth was poor at 42 °C and no growth occurred at 5 or 45 °C. Growth was observed at pH 6.0–9.0 but was very poor at pH 9.5. Cells did not grow at pH 5.5. The maximum growth rate occurred when the initial pH was 8.0 and the maximum growth yield was achieved when the initial pH was 8.5. Strain ISDg^T was resistant to kanamycin and streptomycin.

Phylogeny

Phylogenetic analysis using distance, parsimony and maximum-likelihood methods produced highly congruent inferred tree topologies. Each analysis clearly placed strain ISDg^T in cluster XIVa of the genus *Clostridium* (Collins *et al.*, 1994), with *Eubacterium xylanophilum* and *Clostridium populeti* as the nearest neighbours (Fig. 2). The sequence similarities between strain ISDg^T and *E. xylanophilum* and *C. populeti* were respectively 93 and 92% over 1392 nt. However, the terminal branching between strain ISDg^T and *E. xylanophilum* was not well resolved, as revealed by the low bootstrap support at this node (Fig. 2), indicating that the order of speciation events cannot be de-

Table 1. Characteristics that differentiate strain ISDg^T from phylogenetically related cellulolytic bacteria

Strains: 1, strain ISDg^T (= ATCC 700394^T); 2, *C. celerecrescens* CECT 954^T; 3, *C. herbivorans* ATCC 49925^T; 4, *C. lentocellum* NCIB 11756^T; 5, *C. polysaccharolyticum* ATCC 33142^T; 6, *C. populeti* ATCC 35295^T; 7, *E. cellulosolvens* ATCC 43171^T. All species are members of *Clostridium* clusters XIVa and XIVb as defined by Collins *et al.* (1994). All are motile and all ferment cellulose, cellobiose and maltose. Abbreviations: A, acetate; B, butyrate; C, caproate; E, ethanol; F, formate; I, isobutyrate; L, lactate; M, 3-methylbutanoate; S, succinate; V, *n*-valerate; +, positive; −, negative; +/−, weak, or some strains are positive while others are negative; NR, not reported. Data for species other than ISDg^T are from Palop *et al.* (1989), Varel *et al.* (1995), Murray *et al.* (1986), van Gylswyk (1980), van Gylswyk *et al.* (1980), Sleat & Mah (1985) and van Gylswyk & van der Toorn (1986).

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Gram stain	−	+	+	−	−	−	+ to −
G + C content (mol%)	36	38	38	36	42	28	50
End products	A, E, F, L	A, B, C, E, F, I, L, M, S	B, E, F	A, E, L	B, E, F	A, B, L	B, F, L, V
Optimum temperature	37	30–37	39–42	40	30–38	35	37–39
Fermentation of:							
Arabinose	+ / −	+	−	+	+	+	−
Fructose	+ / −	+	−	+	+ / −	+	+ / −
Galactose	+	+	−	+	−	+	+
Glucose	+	+	−	+	−	+	+
Lactose	+	+ / −	−	+	−	−	+
Mannose	+	+	−	−	−	−	−
Pectin	+ / −	NR	−	NR	+ / −	+	+
Ribose	+	+	−	−	NR	NR	NR
Starch	+	−	+	+	−	−	−
Sucrose	−	+ / −	−	+	−	+	+
Trehalose	−	+	−	+	−	−	−
Xylan	+	NR	−	+	+	+	−
Xylose	+	+	−	+	+	+	−

ferring to the wide range of plant polysaccharides that this organism is capable of utilizing as growth substrate).

Cells are straight rods (0.5–0.8 × 3–15 µm), usually single or in pairs. Cells are motile, with one or two (usually subterminal) flagella per cell. Round, terminal spores (0.9–1.5 µm in diameter) are produced that make the sporangium swell. Cells stain Gram-negative and have a multilayered cell wall. Surface colonies (in GS-2CB agar medium) are round, glossy and translucent with slightly raised centres measuring 2–5 mm in diameter; margins become somewhat undulate in older colonies. Obligate anaerobe. Fermentable compounds include cellulose, pectin, polygalacturonic acid, starch, xylan, arabinose, cellobiose, fructose, galactose, gentiobiose, glucose, lactose, maltose, mannose, ribose and xylose. The following compounds do not support growth: glycerol, pyruvate, sucrose, trehalose and tryptone. Nitrate and sulfate are not reduced. Aesculin is not hydrolysed. Urease-negative or very weakly positive. The optimum temperature for growth is 37 °C; growth occurs at pH values ranging from 6.0 to 9.0. The major end products of cellulose fermentation are ethanol, acetate, CO₂ and H₂; the minor end products are formate and lactate. Phylogenetically, a member of cluster XIVa of the low-G+C-content Gram-positive bacteria. The G+C content of the DNA is 35.9 ± 0.2 mol%. Isolated

from forest soil. The type strain is strain ISDg^T (= ATCC 700394^T).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Lucy Yin for assistance with electron microscopy, Robert Seward for 16S rRNA sequence determinations and William B. Whitman for determination of G+C contents. This research was supported by the US Department of Energy grant DE-FG02-88ER13898.

REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402.
- Benson, D., Lipman, D. J. & Ostell, J. (1993). GenBank. *Nucleic Acids Res* 21, 2963–2965.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cal, J., Hippe, H. & Farrow, J. A. E. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 44, 812–826.
- Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Olsen, I. & Fraser, G. J. (1992). Phylogeny of 54 representative strains of species in the family Pasteurellaceae as determined by comparison of 16S rRNA sequences. *J Bacteriol* 174, 2002–2013.
- Hardman, J. K. & Stadtman, T. C. (1960). Metabolism of ω -amino acids. II. Fermentation of Δ -aminovaleric acid by *Clostridium aminovalericum*. *J Bacteriol* 79, 549–552.