

1

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-088402- -00006-0000

Fecha: 2012-10-16 16:16:39

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 45

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: PI.-UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "SISTEMAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR BIOCOMBUSTIBLES Y MATERIALES RELACIONADOS".-Clase C12P 7/06.-Expediente número 08-088.402-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 6 de Junio de 2012, y a mi memorial solicitando plazo de Septiembre 5 de 2012.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio No. **09465**, con respecto a la Claridad y el Nivel Inventivo de la presente solicitud, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales no sólo se superan completamente dichas objeciones sino que además se establece de manera incontrovertible la patentabilidad de la solicitud en estudio.

3. **CLARIDAD DE LA SOLICITUD.**

3.1. **Capítulo Descriptivo.**

En primer lugar, con respecto con la descripción de la solicitud, el Señor Examinador señala que a lo largo del texto existen expresiones que corresponden a errores de digitación o de ortografía que restan claridad a la divulgación de la invención.

Así mismo, el Señor Examinador señala que la expresión "amu" no es correcta dentro del campo técnico de la invención.

Sobre este particular me permito señalar que el solicitante ha acatado la sugerencia del Señor Examinador y ha hecho una revisión del texto completo de la descripción, corrigiendo todas aquellas palabras que se encontraban mal digitadas o con errores ortográficos. Sumado a lo anterior se ha reemplazado la expresión "amu" por su correcta traducción "u.m.a".

En vista de lo anterior me permito resaltar que en virtud de las modificaciones realizadas la descripción de la solicitud es totalmente clara al revelar las composiciones de la presente invención y por lo tanto dicha descripción se ajusta completamente a lo estipulado por el Artículo 28 de la Decisión 486 de 2000.

3.2. **Capítulo Reivindicatorio.**

De otra parte, con respecto al capítulo reivindicatorio actualmente presentado, el Señor Examinador señala que dentro de sus reivindicaciones también existen errores de ortografía o digitación y que el término "*microbio*" allí empleado no sería adecuado dentro del campo técnico de la invención.

Sumado a lo anterior, el Señor Examinador indica que algunas de las reivindicaciones estarían caracterizando el método o la planta reivindicada por resultados a alcanzar, e incluyen términos imprecisos como "*aproximadamente*".

Tomando en consideración estas objeciones me permito manifestar que es deseo del presentar **un nuevo capítulo reivindicatorio**, que reemplaza al anterior, el cual se refiere de forma clara y concisa las realizaciones preferidas de la invención en concordancia con las revelaciones de la descripción de la solicitud.

En conexión con el mencionado nuevo capítulo reivindicatorio me permito resaltar que este no se constituyen de ninguna manera en una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que define de forma más precisa el método, la planta y la composición que son objeto de la presente invención de acuerdo con las enseñanzas de la descripción, tal como se expone a continuación:

- **Reivindicaciones 1.** Esta reivindicación tiene como base la reivindicación 1 actualmente presentada en la cual se ha hecho la clarificación con respecto a que la biomasa involucrada en el método de la invención comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico, y que el proceso de hidrólisis y fermentación son llevados a cabo por medio de la bacteria *Clostridium phytofermentans*, resaltando que esta bacteria emplea la biomasa para producir un combustible, de acuerdo con las revelaciones de las páginas 4, 8, 13, 14, 24 y 29 de la descripción de la solicitud (esta numeración corresponde al texto de la descripción modificado adjunto a este memorial).
- **Reivindicación 2.** Esta reivindicación tiene como base la reivindicación 6 actualmente presentada, modificada en concordancia con la nueva reivindicación 1.
- **Reivindicación 3.** Tiene como base la reivindicación 13 actualmente presentada modificada para clarificar el tipo de biomasa empleada y el proceso de hidrólisis de acuerdo con la nueva reivindicación 1.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

- **Reivindicaciones 4 a 8.** Estas reivindicaciones se basan respectivamente en las reivindicaciones 24, 26, 27, 29 y 31 actualmente presentadas, las cuales han sido modificadas en concordancia con la nueva reivindicación 1.
- **Reivindicación 9.** Tiene como base las reivindicaciones 13 y 18 actualmente presentadas, donde se ha definido la biomasa y el proceso de hidrólisis de acuerdo con la nueva reivindicación 1.
- **Reivindicación 10.** Se basa en las reivindicaciones 16 y 17 actualmente presentadas modificadas en concordancia con el resto del nuevo capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 11.** Esta reivindicación tiene como base la reivindicación 18 actualmente presentada modificada de acuerdo con la nueva reivindicación 1.
- **Reivindicaciones 12 a 14.** Se basan respectivamente en las reivindicaciones 35, 38 y 39 actualmente presentadas modificadas en concordancia con el resto del nuevo capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 15.** Tiene como base las reivindicaciones 8 y 9 actualmente presentadas donde se ha definido la biomasa y el proceso de hidrólisis en concordancia con la nueva reivindicación 1.
- **Reivindicaciones 16 y 17.** Estas reivindicaciones tienen como base las reivindicaciones 10 y 12 actualmente presentadas modificadas en congruencia con el resto del nuevo capítulo reivindicatorio.

De esta forma, el nuevo capítulo reivindicatorio está constituido por **17 reivindicaciones** que se refieren de manera clara y concisa a las realizaciones preferidas de la presente solicitud.

En conexión con lo anterior me permito señalar que el mencionado nuevo capítulo reivindicatorio supera completamente las objeciones presentadas por el Señor Examinador a este respecto, dado que este no se refiere a resultados a alcanzar y no contiene términos imprecisos, y por lo tanto dicho capítulo se enmarca completamente dentro de lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

4. **NIVEL INVENTIVO.**

Finalmente, el Señor Examinador señala que la solicitud en estudio sería evidente a la luz de las enseñanzas de los documentos: **US5837506 (D1)** y **Warnich, T. International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology, 2002, Vol 52. 1155-1159 (D2).**

En conexión con estos documentos, el Señor Examinador asegura que para la persona versada en la materia sería evidente tomar la bacteria empleada en D2 e incluirla dentro del proceso revelado en D1 con el fin de obtener la materia reclamada por la presente solicitud.

Sobre este particular me permito resaltar que la persona versada en la materia no encontraría ninguna motivación dentro de las enseñanzas de los documentos citados que la llevara específicamente al método, la planta y la composición que son objeto de la presente solicitud, lo cual es aún más evidente a la luz del nuevo capítulo reivindicatorio presentado junto con este memorial, tal como se discutirá a continuación.

De esta forma, si bien el documento D1 se refiere a un proceso continuo para producir etanol a partir de materiales celulósicos, dicho documento no revela o sugiere que células de *Clostridium* sean capaces de hidrolizar y fermentar hemicelulosa o un material lignocelulósico, como ocurre en el método de la presente invención definido en la nueva reivindicación 1, y mucho menos indica que específicamente *Clostridium phytofermentans* pueda ser empleado en la producción de un combustible o etanol a partir de material que contiene hemicelulosa o es lignocelulósico.

Es así como ninguna revelación de D1 podría conducir a que la persona versada en la materia supusiera que *Clostridium phytofermentans* efectivamente pudiera hidrolizar y fermentar hemicelulosa o un material lignocelulósico y por lo tanto dicha persona versada en la materia no tendría ninguna motivación para emplear esta bacteria particular.

En conexión con lo anterior me permito resaltar que incluso uno de los autores del señalado documento D1 publicó posteriormente a la publicación de dicho documento un artículo científico en el que discute el bioprocesamiento de biomasa celulósica, Lynd, et al. 2005, *Curr. Opin. Biotech.* 16:577-583, en el cual se señala claramente que "microorganismos con la combinación de propiedades de utilización-substrato y formación de producto para CBP no están actualmente disponibles" (página 578, columna 2, último párrafo, para su pronta referencia una copia del mencionado documento se anexa al presente memorial).

En este sentido me permito señalar que el "CBP" revelado en este documento de Lynd, corresponde a un bioproceso consolidado, el cual se caracteriza por la producción de celulasa, la hidrólisis de celulosa, y la fermentación en un solo paso (Lynd, página 577, columna 1, resumen).

Por lo tanto, **si se toma en consideración el señalamiento hecho por uno de los inventores de D1, de que en el tiempo en el cual dicho artículo fue publicado (2005), no existían microorganismos adecuados para este tipo de procesamiento, es evidente que en la época en la que se publicaron los documentos D1 y D2 de ninguna manera se tenía conocimiento de que una bacteria como *Clostridium phytofermentans* pudiera efectivamente brindar una**

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

hidrólisis y fermentación de hemicelulosa o materiales lignocelulósicos para producir un combustible o etanol, como fue, de manera sorprendente, encontrado por el solicitante de la presente invención.

Sumado a lo anterior, me permito resaltar que D2 no revela de ninguna manera que *Clostridium phytofermentans* sea capaz de dicha hidrólisis y fermentación de hemicelulosa o materiales lignocelulósicos, toda vez que D2 únicamente señala que *Clostridium phytofermentans* pudo fermentar unos ciertos componentes purificados de una biomasa de planta, como son celulosa y celobiosa.

A este respecto es pertinente resaltar que **para la persona versada en la materia sería evidente que las revelaciones de D2 respecto a este tipo de fermentación particular no podrían de ninguna manera ser extrapolados a materiales con hemicelulosa o lignocelulósicos, toda vez que estos poseen características fisicoquímicas más complejas.**

De esta forma, el documento D2 sólo se dedica a explorar ciertas características de *Clostridium phytofermentans* que lo diferencian del resto de especies del género, pero de ninguna manera sugieren que esta bacteria sea realmente capaz de procesar hemicelulosa o materiales lignocelulósicos para convertirlos en un combustible o en etanol.

Por lo tanto, aún cuando la persona versada en la materia decidiera tomar las enseñanzas de D1 y probar la bacteria empleada en D2 en el proceso allí revelado, no podría tener certeza absoluta que esta combinación sería útil para producir un combustible o etanol a partir de hemicelulosa o materiales lignocelulósicos.

En conexión con lo discutido anteriormente, me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente*:

"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

* Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."

Dentro de este marco de ideas y a la luz de los argumentos expuestos en el presente memorial, me permito resaltar que al no "saltar a la vista de manera clara y directa" a partir de los documentos citados el empleo de *Clostridium phytofermentans* para obtener un combustible o etanol a partir de hemicelulosa o materiales lignocelulósicos, y al no tenerse "certeza clara y manifiesta" a partir de las enseñanzas de dichos documentos que esta bacteria sería realmente efectiva para la obtención de un combustible, es claro el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio con respecto al arte previo más cercano.

5. **CONCLUSIÓN.**

Para finalizar me permito resaltar que las modificaciones realizadas sobre el capítulo descriptivo hacen que este sea completamente claro al revelar el método, la planta y la composición de la invención.

Así mismo, es pertinente señalar que en virtud del nuevo capítulo reivindicatorio adjunto al presente memorial, la reclamación de la invención es totalmente clara y concisa, cumpliendo así con lo exigido por la Decisión Andina 486 de 2000.

Por otro lado, en virtud de los argumentos discutidos con respecto a los documentos citados, se estableció de manera incontrovertible que la persona versada en la materia no podría obtener de manera evidente el método de la solicitud en estudio a partir de las enseñanzas de dichos documentos.

6. Anexo me permito presentar:

(i) Recibos números 12-0085567 y 12-0092757, expedidos por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de la tasa que causan las reivindicaciones **11 a 17** presentadas junto con este memorial;

(ii) Copia de las páginas **1 a 31** de la descripción de la solicitud, las cuales fueron modificadas como se expuso en el presente memorial;

(iii) Copia de las páginas **32 a 34** que corresponde al **nuevo capítulo reivindicatorio**, constituido por **17** reivindicaciones; y

(iv) Copia del documento *Lynd, et al. 2005, Curr. Opin. Biotech. 16:577-583*, referenciado en el texto.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,



ALICIA LLORED A RICAURTE

T. P. 53.215

Dirección para Notificaciones: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

ALICIA LLORED A RICAURTE

C.C. No. 39.690.713 de Usaquén



República de Colombia

Papel de seguridad para diligencias notariales



Ba000189280

5



NOTARÍA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fé de
que compareció personalmente: _____

Alicia Noreda Ricaurte identificada(o) con: _____

cc número: 39690713 y Tarjeta

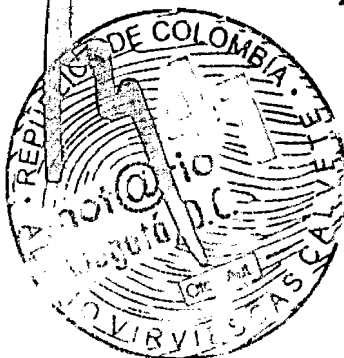
Profesional número: _____ del Consejo Superior de la

Judicatura, quién autenticó la firma puesta por ella (él) misma(o)

en el documento al que se le anexa la presente diligencia.

Autorizada en Bogotá el(os): 08 OCT. 2012

El (La) Notario (a): _____



Blanca Azuero
Cecilia Montano
C.C. 39.781.030



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



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0085567

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2012 - 08:15:43

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455230635	21/08/2012	18.671.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				\$30.000.00
=====				

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

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

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

, Agosto 22 de 2012 - 08:16:03

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



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0092757

Bogotá D.C., Septiembre 10 de 2012 - 17:26:18

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	452432411	10/09/2012	25.537.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
6	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	180.000.00
				\$180.000.00

SON: **CIENTO OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

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 10 de 2012 - 17:26:31

University of Massachusetts

Exp. 08-088.402

SISTEMAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR BIOCOMBUSTIBLES Y**MATERIALES RELACIONADOS****RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION**

Células De *Clostridium phytofermentans* (Colección de Cultivos Tipo Americana 700394') y todas las otras cepas de la especie pueden fermentar materiales tales como biomasa en productos y coproductos útiles, tales como etanol, hidrógeno y ácidos orgánicos. También se revelan composiciones que incluyen *Clostridium phytofermentans*.

SISTEMAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR BIOCOMBUSTIBLES Y MATERIALES RELACIONADOS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional Americana No. 60/762,813, presentada el 27 de Enero de 2006, cuyos contenidos están incorporados aquí por referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN EN CUANTO A INVESTIGACIÓN PATROCINADA FEDERALMENTE

Esta invención se hizo con el apoyo del Gobierno Bajo la asignación No. DE-FG02-02ER15330, otorgada por el Departamento de Energía de Los Estados Unidos (DOE). El Gobierno tiene, por ende, ciertos derechos en la invención.

CAMPO TÉCNICO

Esta invención se relaciona con composiciones, y con sistemas y métodos para producir biocombustibles tales como etanol, y materiales relacionados.

ANTECEDENTES

Existe un interés de desarrollar métodos para producir energía que se puede usar a partir de recursos de biomasa, renovables y sostenibles. La energía en forma de carbohidratos se puede encontrar en biomasa de desperdicio, y en cosechas de energía dedicadas, tales como granos (p.e., maíz o trigo) o pastos (p.e., pasto varilla). Los materiales celulósicos y lignocelulósicos, son producidos, procesados, y usados en grandes cantidades en muchas aplicaciones.

Un desafío actual es desarrollar estrategias viables y económicas para la conversión de carbohidratos a formas de energía usables. Las estrategias para derivar energía útil a partir de carbohidratos incluyen la producción de etanol ("etanol celulósico") y otros alcoholes (p.e., butanol), conversión de carbohidratos a hidrógeno, y la conversión directa de carbohidratos a energía eléctrica a través de celdas de combustible. Por ejemplo, las estrategias de etanol de biomasa son descritas por DiPardo, *Journal of Outlook for Biomass Ethanol Production and*

Demand (EIA Forecasts), 2002; Sheehan, *Biotechnology Progress*, 15:8179, 1999; Martin, *Enzyme Microbes Technology*, 31:274, 2002; Greer, *BioCycle*, 61-65, April 2005; Lynd, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:3, 506-577, 2002; y Lynd et al. en "Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: An Update," *Current Opinion in Biotechnology*, 16:577-583, 2005.

RESUMEN

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de nuevas características de una bacteria anaeróbica, *Clostridium phytofermentans*. Por ejemplo, una cepa aislada de *Clostridium phytofermentans* (ISDg^T, Colección de Cultivos Tipo Americana 700394^T) ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso a los cultivos estará disponible durante la duración de la solicitud de patente a una determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales facultado a esto bajo 37 C.F.R. 1.14 y 35 U.S.C. 122. Los depósitos están disponibles según lo requieran las leyes de patentes extranjeras en países en donde contrapartes de la solicitud sujeto, o su progenie, son presentadas. Sin embargo, se entenderá que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención sujeto en menoscabo de los derechos de patente otorgados por la acción gubernamental. Adicionalmente, los depósitos de cultivo sujeto serán almacenados y estarán disponibles al público de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, p.e., serán almacenados con todo el cuidado necesario para mantenerlos viables y no contaminados por un período de por lo menos cinco años después de la solicitud más reciente para el suministro de una muestra del depósito, y en cualquier caso, por un período de al menos 30 (treinta) años después de la fecha del depósito o por la vida ejecutable de cualquier patente que pueda emitirse revelando los cultivos más cinco años después de la última solicitud de una muestra del depósito. El depositante reconoce el deber de reemplazar los depósitos, si el depositante no puede suministrar una muestra cuando se solicita, debido a la condición de los depósitos. Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público de los depósitos de cultivo sujetos serán removidas irrevocablemente al otorgamiento de una patente que los revele.

Hemos encontrado que *Clostridium phytofermentans*, tal como la cepa ISDg^T, sola o en combinación con uno o más microbios (p.e., levaduras u otras bacterias) puede fermentar un material que es o incluye un carbohidrato, o una

mezcla de carbohidratos, en un combustible inflamable, p.e., etanol, propanol y/o hidrógeno, en una gran escala. Por ejemplo, *Clostridium phytofermentans* puede fermentar la biomasa de desperdicio, tal como aserrín, harina de madera, pulpa de madera, pulpa de papel, tallos de desperdicio de la pulpa de papel, pastos (p.e., pasto varilla), plantas y cosechas de biomasa (p.e., Crambe), algas, cascotes de arroz, bagazo, yute, hojas, recortes de pasto, leña de maíz, mazorcas de maíz, molido de maíz, granos destiladores, y solutos de destiladores, en etanol, propanol e hidrógeno. Adicionalmente, también se pueden producir otros productos orgánicos útiles, tales como ácidos orgánicos (p.e., ácido fórmico, ácido láctico y ácido acético), o sus bases conjugadas (p.e., formiato, lactato o acetato).

En un aspecto, la invención caracteriza métodos para hacer un combustible o combustibles a partir de uno o más materiales de biomasa que proporcionan un material de biomasa que incluye un carbohidrato de alto peso molecular; hidrolizar el material de biomasa para proveer un material de biomasa hidrolizado; combinar el material de biomasa hidrolizado con células de *Clostridium phytofermentans* en un medio; y fermentar el material de biomasa hidrolizado bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir un combustible o una mezcla de combustibles, p.e., etanol, propanol, y/o hidrógeno. Además de combustibles, se pueden producir otros productos y/o coproductos (p.e., ácidos orgánicos y/o sus bases conjugadas). En algunas realizaciones, una concentración de carbohidratos en el medio es mayor de aproximadamente 20 mM. En otras realizaciones, la concentración es mayor de aproximadamente 1 mM, p.e., mayor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, o mayor de aproximadamente 18 mM.

En otro aspecto, la invención caracteriza una planta de combustible que incluye una unidad de hidrólisis configurada para hidrolizar un material de biomasa que incluye un carbohidrato de alto peso molecular, y un fermentador configurado para albergar un medio y contiene células de *Clostridium phytofermentans* dispersas allí.

En otro aspecto, la invención caracteriza métodos para hacer un combustible o combustibles que incluye combinar células de *Clostridium phytofermentans* y un material lignocelulósico (y/u otro material de biomasa) en un medio, y fermentar el material lignocelulósico bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir un combustible o combustibles, p.e., etanol, propanol y/o hidrógeno.

En otro aspecto, la invención caracteriza métodos para hacer un combustible o combustibles que incluye combinar células de *Clostridium phytofermentans* y un material que incluye un carbohidrato en un medio, y fermentar el material que incluye el carbohidrato bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir un combustible. Una concentración del carbohidrato en el medio es mayor de 20 mM, p.e., mayor de 30 mM, 40 mM, 50 mM, 75 mM, o incluso 100 mM o mayor.

En cualquiera de los métodos descritos aquí, las células de *Clostridium phytofermentans* se pueden utilizar solas o en combinación con uno o más microbios diferentes (p.e., levaduras u otras bacterias) para producir un combustible u otro producto útil, tales como ácidos orgánicos o sus bases conjugadas, que pueden ser aisladas como sales (p.e., sales de sodio o potasio). Un ejemplo de otra bacteria es cualquier cepa de *Zymomonas mobilis*.

En otro aspecto, la invención caracteriza métodos para hacer un combustible o combustibles a partir de uno o más materiales de biomasa con *Clostridium phytofermentans* solo o en cocultivo con uno o más microbios diferentes, tales como una cepa de levadura o una cepa de *Zymomonas mobilis*. Además de preparar combustibles, el cocultivo se puede usar para hacer cualquier coproducto descrito aquí, tal como un ácido orgánico, o una base conjugada o sal del mismo.

En otro aspecto, la invención caracteriza métodos para emplear *Clostridium phytofermentans* para producir un ácido orgánico, o una base conjugada o sal del mismo, a partir de uno o más materiales de biomasa, tal como cualquiera de los materiales descritos aquí. Por ejemplo, los otros productos o coproductos útiles pueden usarse como materiales de alimentación para las industrias química o farmacéutica. Ejemplos de ácidos (bases conjugadas) que se pueden producir incluyen ácido láctico (lactato) y ácido acético (acetato).

En otro aspecto, la invención caracteriza cocultivos que incluyen *Clostridium phytofermentans* y uno o más microbios diferentes, p.e., levaduras u otras bacterias (p.e., *Zymomonas mobilis*).

En otro aspecto, la invención caracteriza composiciones que incluyen *Clostridium phytofermentans* y uno o más microbios diferentes, p.e., levaduras u otras bacterias (p.e., *Zymomonas mobilis*). La composición puede estar, p.e., en la forma de una mezcla sólida (p.e., una mezcla secada por congelación), o una dispersión líquida de los microbios, p.e., un cocultivo.

En otro aspecto, la invención caracteriza métodos para hacer un producto útil, tal como un biocombustible, que incluyen seleccionar una biomasa o una mezcla de materiales de biomasa; combinar la biomasa con un medio que incluye *Clostridium phytofermentans*; fermentar la biomasa por un primer período de tiempo para proporcionar un segundo material de biomasa; combinar el segundo material de biomasa (con o sin el *Clostridium phytofermentans*) con otro microbio o una mezcla de microbios diferentes de *Clostridium phytofermentans*; y luego fermentar la segunda biomasa por un segundo período de tiempo para producir un material útil, tal como un combustible o un ácido orgánico.

En otro aspecto, la invención caracteriza fermentadores que incluyen un medio que incluye *Clostridium phytofermentans* disperso allí. Junto con *Clostridium phytofermentans*, el medio puede incluir uno o más de cualquiera de los otros microbios descritos aquí.

En otro aspecto, la invención caracteriza fermentadores que incluyen *Clostridium phytofermentans* en cocultivo con uno o más de cualquiera de los otros microbios descritos aquí.

En otro aspecto, la invención caracteriza fermentadores que incluyen un medio que incluye *Clostridium phytofermentans* disperso allí. Los fermentadores están configurados para remover continuamente un producto de fermentación, tal como etanol. En algunas realizaciones, la concentración del producto permanece sustancialmente constante, o dentro de aproximadamente veinticinco por ciento de una concentración promedio. En algunas realizaciones, cualquier biomasa descrita aquí es alimentada continuamente al fermentador.

En otro aspecto, la invención caracteriza productos preparados mediante cualquiera de los procesos descritos aquí.

En otro aspecto, la invención caracteriza kits, p.e., para sembrar un fermentador, que incluye *Clostridium phytofermentans*. Los kits pueden además incluir uno cualquiera o más de cualquiera de los otros microbios descritos aquí. Por ejemplo, los microbios en los kits pueden estar combinados en un solo contenedor o contenedores múltiples. Los microbios en los kits pueden estar dispersos en un medio, o pueden ser secados por congelación. Los kits pueden además incluir materiales de partida, tales como nutrientes.

Clostridium phytofermentans (Colección de Cultivos Tipo Americana 700394T) se define con base en 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). La invención se relaciona generalmente con sistemas, y métodos y composiciones para producir combustibles y/u otros productos orgánicos útiles que involucran la cepa **ISDg^T** y/o cualquier otra cepa de la especie *Clostridium phytofermentans*, que puede ser derivada de la cepa **ISDg^T** o aislada separadamente. La especie se define usando consideraciones taxonómicas estándar (Stackebrandt y Goebel, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:846-9, 1994): Cepas con valores de homología de secuencia de rARN 16S del 97% y mayor comparada con la cepa tipo (**ISDg^T**) con consideradas cepas de *Clostridium phytofermentans*, a menos que se muestre que tienen valores de re-asociación de ADN de menos del 70%. Existe evidencia considerable para indicar que los microbios que tienen 70% o mayores valores de re-asociación de ADN también tienen al menos 96% de identidad de secuencia de ADN y comparten rasgos fenotípicos que definen una especie. Los análisis de la secuencia de genoma de la cepa **ISDg^T** de *Clostridium phytofermentans* indican la presencia de un gran número de genes y puntos genéticos que probablemente están involucrados en mecanismos y rutas para la fermentación de polisacárido en plantas, dando lugar a las propiedades de fermentación inusuales de este microbio. Con base en las consideraciones taxonómicas mencionadas anteriormente, todas las cepas de la especie *Clostridium phytofermentans* también poseerían todas, o casi todas, estas propiedades de fermentación. Las cepas de *Clostridium phytofermentans* pueden ser aisladas naturales, o cepas modificadas genéticamente.

Las ventajas de los nuevos sistemas y métodos incluyen uno cualquiera, o combinaciones de los siguientes. *Clostridium phytofermentans* puede fermentar un amplio espectro de materiales en combustibles con alta eficiencia.

Convenientemente, los productos de desperdicio, p.e., lactosa, papel de desperdicio, hojas, recortes de pasto, y/o aserrín, se pueden usar para hacer combustibles. *Clostridium phytofermentans* permanece activo incluso a altas concentraciones de carbohidratos. Usualmente los materiales que incluyen carbohidratos se pueden usar crudos, sin pretratamiento. Por ejemplo, en algunos casos, no es necesario pretratar el material celulósico con un ácido, una base, o una enzima para liberar los azúcares de bajo peso molecular que hacen parte del material celulósico antes de la fermentación. En su lugar, *Clostridium phytofermentans* puede fermentar el material celulósico crudo en un combustible directamente. En algunos casos, los materiales lignocelulósicos, p.e., aserrín o pasto varilla, se pueden usar sin remover la lignina, y/o hemicelulosas. Las células de *Clostridium phytofermentans* crecen y se fermentan bajo una amplia gama de temperaturas y rangos de pH. El pH del medio de fermentación puede no requerir ser ajustado durante la fermentación. En algunos casos, las células de *Clostridium phytofermentans* se pueden usar en combinación con uno o más microbios diferentes para aumentar el rendimiento de un producto deseado, p.e., etanol. Adicionalmente, *Clostridium phytofermentans* puede fermentar altas concentraciones de azúcares de 5 carbonos, o polímeros que incluyen unidades de repetición de azúcar de 5 carbonos, a combustibles inflamables. Los azúcares de cinco carbonos, tales como xilosa, o polímeros que incluyen unidades de repetición de azúcar de 5 carbonos, tales como xilano y otros componentes de la fracción "hemicelulosa" de las paredes celulares de planta, son hidrolizadas y fermentadas por *Clostridium phytofermentans* concomitantemente con otros componentes poliméricos de materiales lignocelulósicos produciendo productos tales como etanol e hidrógeno. Los azúcares de 5 carbonos, o polímeros que incluyen unidades de repetición de azúcar de 5 carbonos, no parecen desviar recursos metabólicos de *Clostridium phytofermentans*. Adicionalmente, *Clostridium phytofermentans* fermenta concentraciones de celulosa mayores, p.e., mayores de 40 mM (equivalentes de glucosa), con aumento del rendimiento de etanol. Otros microbios que fermentan celulosa generalmente no fermentan concentraciones mayores de celulosa, por encima de aproximadamente 20 mM (equivalentes de glucosa), y la producción de etanol disminuye a concentraciones mayores de celulosa (Desvaux et al., *Appl. Environ. Microbiology*, 66, 2461-2470, 2000).

Los carbohidratos pueden ser poliméricos, oligoméricos, diméricos, triméricos, o monoméricos. Cuando los carbohidratos se forman a partir de más de una sola unidad de repetición, cada unidad de repetición puede ser igual o

diferente. Ejemplos de carbohidratos poliméricos incluyen celulosa, xilano, pectina, y almidón, mientras que la celobiosa y lactosa son ejemplos de carbohidratos diméricos. Ejemplos de carbohidratos monoméricos incluyen glucosa y xilosa. El término "carbohidrato de bajo peso molecular" como se usa aquí, es cualquier carbohidrato con un peso de formula, o un peso molecular promedio número de menos de aproximadamente 1,000, determinado usando una curva de calibración universal. Generalmente, el término "carbohidrato de alto peso molecular" es cualquier carbohidrato que tiene un peso molecular de más de 1,000, p.e., mayor de 5,000, mayor de 10,000, mayor de 25,000, mayor de 50,000, mayor de 100,000, mayor de 150,000, o mayor de 250,000.

Para carbohidratos que tiene una sola estructura definida con un peso por formula definido y calculable, p.e., carbohidratos monoméricos o diméricos (p.e., arabinosa y celobiosa, respectivamente), las concentraciones se calculan usando el peso por formula del carbohidrato. Para carbohidratos que no tienen una sola estructura definida, p.e., carbohidratos poliméricos (p.e., celulosa), las concentraciones se calculan asumiendo que la masa entera del carbohidrato polimérico puede ser hidrolizada a la unidad del carbohidrato monomérico del cual se forma el carbohidrato polimérico. El peso por formula de la unidad del carbohidrato monomérico es entonces aplicado para calcular la concentración en unidades equivalentes de monómero. Por ejemplo, la celulosa pura está hecha enteramente de unidades de repetición de glucosa. 10 gramos de celulosa darían 10 gramos de glucosa, asumiendo que la masa entera de la celulosa es hidrolizada a glucosa. La glucosa ($C_6H_{12}O_6$) tiene un peso por formula de 180.16 u.m.a. 10 gramos de glucosa son 0.056 moles de glucosa. Si esta cantidad de glucosa está en 1 L de solución, la concentración sería 0.056 M o 56 mM. Si el polímero tiene más de una unidad de repetición, la concentración se calcularía como una concentración de carbohidrato promedio total asumiendo que la masa entera del carbohidrato polimérico puede ser hidrolizada a las unidades de carbohidrato monoméricas a partir de las cuales se forma el carbohidrato polimérico. Por ejemplo, Si el carbohidrato polimérico está hecho totalmente de dos unidades de repetición, la hidrólisis de X gramos de carbohidrato polimérico dan X gramos de carbohidratos monoméricos. Un peso por formula compuesto es la suma del producto de la fracción mol del primer carbohidrato monomérico y su peso por formula, y el producto de la fracción mol del segundo carbohidrato monomérico y su peso por formula. El número promedio de moles de carbohidratos es entonces X gramos dividido por el peso por formula compuesto. La

concentración de carbohidrato promedio se encuentra dividiendo el número promedio de moles por la cantidad de solución en la cual residen.

Un "material fermentable" es uno que *Clostridium phytofermentans* (p.e., ISDg^T) puede, al menos en parte, convertir en un combustible, p.e., etanol, propanol o hidrógeno y/u otro producto útil, p.e., un ácido orgánico.

La biomasa es un material orgánico, no fosilizado que es, o se deriva de organismos biológicos (p.e., plantas o animales), muertos o vivos. La biomasa excluye masa que ha sido transformada por procesos geológicos en sustancias tales como carbón o petróleo, pero incluye materiales que se derivan de organismos vivos o muertos, p.e., mediante tratamiento químico de tales organismos o retazos de tales organismos. Ejemplos de biomasa incluyen madera, materiales relacionados con la madera (p.e., tablero de aglomerado), papel, pastos (p.e., pasto varilla, *Miscanthus*), vainas de arroz, bagazo, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, hojas, recortes de pasto, leña de maíz, mazorcas de maíz, granos de destiladores, plantas legumbres, sorgo, y cosechas de biomasa (p.e., *Crambe*).

A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado al comúnmente entendido por el experto en la técnica al cual esta invención pertenece. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí, en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas aquí están incorporadas por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente descripción, incluyendo definiciones, regirán. Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán obvias a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG 1 es una vista transversal esquemática de un recipiente de fermentación que alberga un medio que tiene células de *Clostridium phytofermentans* dispersas allí.

La FIG. 2 es una vista transversal esquemática de un cortador de navaja rotatorio usado para fibrilar la biomasa.

La FIG 3 A es una fotografía de material celulósico cortado en el cortador de navaja rotatorio de la de la FIG 2.

La FIG 3 B es la fotomicrografía altamente agrandada del material mostrado en la FIG. 3 A.

La FIG 4 es un diagrama de bloques que muestra un proceso para producir etanol e hidrógeno a partir de biomasa usando pretratamiento de hidrólisis de ácido.

La FIG. 5A es un diagrama en bloques que muestra un proceso para producir etanol e hidrógeno a partir de biomasa usando pretratamiento de hidrólisis enzimática.

La FIG. 5B es un diagrama en bloques que muestra un proceso para producir etanol e hidrógeno a partir de biomasa que no ha sido pretratada enzimáticamente.

La FIG. 5C es un diagrama en bloques que muestra un proceso para producir etanol e hidrógeno a partir de biomasa usando biomasa que no ha sido pretratada químicamente o enzimáticamente, pero está opcionalmente tratada con vapor.

La FIG. 6 es un diagrama de barras que muestra los productos y concentraciones más importantes de los productos obtenidos de la fermentación de varias concentraciones iniciales de celulosa (en equivalentes de glucosa) junto con *Clostridium phytofermentans*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La FIG 1 muestra un recipiente de fermentación 10 que alberga un medio 12 que tiene un material fermentable disuelto o disperso allí. El material fermentable es o incluye un carbohidrato, p.e., glucosa, celobiosa, o celulosa. El medio 12 también tiene una pluralidad de células de *Clostridium phytofermentans* 14 dispersas allí, tales como células **ISDg^T**. Las células *Clostridium phytofermentans* 14 fermentan el material fermentable para producir combustible inflamable, p.e., etanol y/o hidrógeno. También se pueden producir otros productos y coproductos útiles. Otros productos pueden incluir ácidos orgánicos (p.e., ácido fórmico, ácido láctico y ácido acético), o su base conjugada (p.e., iones formiato, lactato o acetato).

Las células de *Clostridium phytofermentans* 14 (Colección de cultivos Tipo Americana 700394T) fueron aisladas de cieno húmedo en el lecho de una corriente intermitente en un sitio forestado cerca del Embalse Quabbin en el estado de Massachusetts (USA). Generalmente, las células **ISDg^T** 14 son barras largas, delgadas, rectas, y móviles (0.5 a 0.8 por 3.0 a 15.0 μm) que forman esporas redondas, terminales (0.9 a 1.5 μm de diámetro). Características adicionales de las células de *Clostridium phytofermentans* se describen en Warnick et al., *Int. J. Systematic and Evol. Microbiology*, 52, 1155-1160 (2002).

Las células de *Clostridium phytofermentans* 14 se cultivan en un ambiente anaeróbico, que se logra y/o mantiene burbujeando un gas sustancialmente libre de oxígeno a través de un burbujeador 16 que incluye salidas de gas 18 que están inmersas por debajo de una superficie 19 del medio 12. El gas en exceso y efluente de las reacciones en el medio 12 llenan el espacio de cabeza 22, y son eventualmente venteados a través de una abertura de salida de gas 21 formada en la pared del recipiente 30. Los gases que se pueden usar para mantener las condiciones anaeróbicas incluyen N_2 , N_2/CO_2 (80:20), $\text{N}_2/\text{CO}_2/\text{H}_2$ (83:10:7), y gases Nobles, p.e., helio y argón. En algunas implementaciones, para lograr y/o mantener homogeneidad, el medio 12 es agitado (como lo indica la flecha 40). La homogeneidad también puede ser mantenida sacudiendo o haciendo vibrar el recipiente 10.

En algunos casos, la concentración de células de *Clostridium phytofermentans* 14 suspendidas en el medio 12 es de aproximadamente 10^6 a

aproximadamente 10^9 células/mL, p.e., de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 células/mL. En algunas implementaciones, la concentración al inicio de la fermentación es de aproximadamente 10^7 células/mL.

Hemos encontrado que las células de *Clostridium phytofermentans* 14 pueden fermentar concentraciones bajas, p.e., 0.01 mM a aproximadamente 5 mM, y altas de carbohidratos, y no son generalmente inhibidas en su acción a concentraciones relativamente altas de carbohidratos, que tendrían efectos adversos sobre otros organismos. Por ejemplo, la concentración del carbohidrato en el medio puede ser mayor de 20 mM, p.e., mayor de 25 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, o incluso mayor de 500 mM o más. En cualquiera de estas realizaciones, la concentración del carbohidrato es generalmente de menos de 2,000 mM.

El material fermentable puede ser, o puede incluir, uno o más carbohidratos de bajo peso molecular. El carbohidrato de bajo peso molecular puede ser, p.e., un monosacárido, un disacárido, un oligosacárido, o mezclas de estos. El monosacárido puede ser, p.e., una triosa, un tetrosa, una pentosa, una hexosa, una heptosa, una nonosa, o mezclas de estos. Por ejemplo, el monosacárido puede ser arabinosa, gliceraldehído, dihidroxiacetona, eritrosa, ribosa, ribulosa, xilosa, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, fructosa, sedoheptulosa, ácido neuramínico, o mezclas de estos. El disacárido puede ser, p.e., sacarosa, lactosa, maltosa, gentiobiosa, o mezclas de estos.

En algunas realizaciones, el carbohidrato de bajo peso molecular es generado por rompimiento de polisacáridos de alto peso molecular (p.e., celulosa, xilano u otros componentes de hemicelulosa, pectina, y/o almidón). Esta técnica puede ser convenientemente y directamente aplicada a corrientes de desperdicio, p.e., papel de desperdicio (p.e., papel de prensa de desperdicio y cartones de desperdicio). En algunos casos, el rompimiento se hace como un proceso separado, y luego se utiliza el carbohidrato de bajo peso molecular. En otros casos, el carbohidrato de alto peso molecular se agrega directamente al medio, y se rompe en el carbohidrato de bajo peso molecular *in-situ*. En algunas implementaciones, esto se hace químicamente, p.e., mediante oxidación, hidrólisis de base, y/o hidrólisis de ácido. La hidrólisis química ha sido descrita por Bjerre, *Biotechnol. Bioeng.*, 49:568, 1996, y Kim et al., *Biotechnol. Prog.*, 18:489, 2002.

En algunas implementaciones, el carbohidrato de bajo peso molecular se genera por rompimiento de un polisacárido usando una enzima o enzimas, p.e., endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH). Estas enzimas pueden ser agregadas a la fuente de polisacárido como preparaciones de enzima, o pueden ser hechas *in-situ* por un organismo, p.e., *Aspergillus niger* BKM 1305, y *Trichoderma reesei* RUT C30. El rompimiento enzimático ha sido discutido por T. Juhasz, *Food Tech. Biotechnol.* (2003), 41, 49.

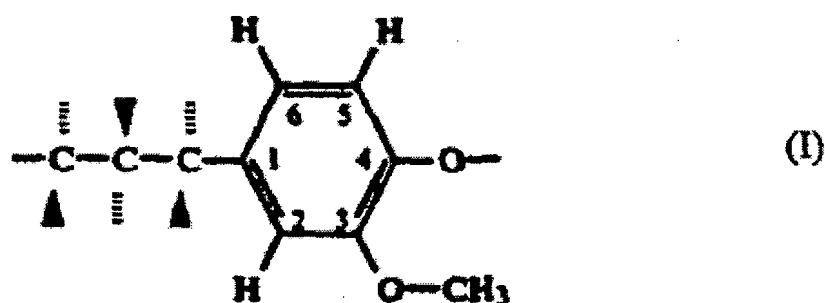
En una implementación específica, se usa lactosa como el carbohidrato. La lactosa se produce en grandes cantidades por la industria del queso. Por ejemplo, ha sido estimado por Elliott, *Proceedings of the 38th Annual Marschall Cheese Seminar (2001)*, que aproximadamente 470 millones de libras de lactosa por año son producidas por la industria del queso en los Estados Unidos, y otros 726 millones de libras se producen en Europa. La lactosa puede ser usada en un fermentador, p.e., un fermentador de siembra que alimenta un fermentador principal, como un sustrato de crecimiento para las células de *Clostridium phytofermentans* solas, o junto con otros sustratos de crecimiento. La lactosa puede ser agregada a los recipientes de fermentación para aumentar la fermentación de los carbohidratos de bajo peso molecular y/o la velocidad de descomposición y fermentación de la celulosa, u otros carbohidratos de alto peso molecular.

El material fermentable también puede ser, o puede incluir uno o más carbohidratos de alto peso molecular. Los carbohidratos de alto peso molecular incluyen, p.e., ácido poligalacturónico, celulosa, celulosa microcristalina, pectina, almidón, xilano, otros polímeros hemicelulósicos, o mezclas de estos. La celulosa microcristalina y las celulosas microcristalinas modificadas están disponibles comercialmente en FMC Biopolymer bajo el nombre comercial AVICEL®.

El material fermentable también puede ser, o puede incluir, uno o más materiales de biomasa, p.e., materiales celulósicos o lignocelulósicos. Los materiales celulósicos son aquellos materiales que incluyen celulosa, pero sustancialmente no lignina, p.e., menos de 0.5 por ciento en peso. Los materiales celulósicos pueden ser naturales, semi-sintéticos, o totalmente sintéticos. Por ejemplo, el algodón es un material celulósico natural. Los materiales celulósicos semisintéticos incluyen, p.e., rayón (celulosa regenerada) y textiles que pueden incluir fibras de algodón, p.e., obtenidas de materiales textiles de desecho virgen

(p.e., retazos), o desperdicio después del consumidor, p.e., harapos. Otros materiales celulósicos semi-sintéticos incluyen granos de destiladores (p.e., de la industria del etanol de maíz), papel y productos tales como papel polirecubierto y papel Kraft. El papel o productos del papel pueden ser materiales virgen, o pueden ser materiales de desperdicio después del consumidor.

Los materiales lignocelulósicos incluyen celulosa y un porcentaje de lignina, p.e., al menos aproximadamente 0.5 por ciento en peso a aproximadamente 60 por ciento en peso o más de lignina. La lignina puede ser considerada como un material polifenólico. Algunas ligninas pueden estar representadas por la Estructura (I) siguiente:



Las ligninas pueden ser altamente ramificadas, y pueden también estar parcialmente reticuladas. Las ligninas pueden tener variación estructural significativa que depende, al menos en parte, de su fuente, p.e., si se deriva de una madera blanda, o una madera noble.

Los materiales lignocelulósicos incluyen, p.e., lodos de la preparación del papel; madera, y materiales relacionados con la madera, p.e., aserrín, tablero de aglomerado u hojas; y fuentes de fibras naturales, p.e., árboles tales como árboles de álamo, pastos tales como pasto varilla, hojas, recortes de pasto, vainas de arroz, bagazo, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, leña de maíz, paja de trigo, vainas de arroz, y pelos de coco.

En implementaciones particulares, el material lignocelulósico se obtiene a partir de árboles, tales como árboles coníferos, p.e., Falso abeto del Canadá (*Tsuga canadensis*), árbol de Maidenhair (*Ginkgo bilboa*), Cedro rojo (*Juniperus virginiana*), Pino de montaña (*Pinus mugo*), Cedro del Himalaya (*Cedrus deodara*), Cedro Rojo Occidental (*Thuja plicata*), Tejo Común (*Taxus baccata*), Picea Azul (*Picea pungens*); o árboles caducifolios, p.e., Serbal (*Sorbus*), Goma (*Eucalyptus gunnii*), abedul (*Betula platyphylla*), o Arce de Noruega (*Acer*

platanoides), se pueden utilizar. También se pueden usar árboles de álamo, haya, arce de azúcar y roble.

En algunos casos, las células de *Clostridium phytofermentans* pueden fermentar materiales lignocelulósicos directamente sin la necesidad de remover la lignina.

Sin embargo, en ciertas realizaciones, es útil remover al menos algo de la lignina de los materiales lignocelulósicos antes de la fermentación. Por ejemplo, la remoción de la lignina de los materiales lignocelulósicos puede hacer al material celulósico remanente más poroso y con mayor área superficial, que puede, p.e., aumentar la velocidad de fermentación y el rendimiento de etanol. La lignina puede ser removida de los materiales lignocelulósicos, p.e., mediante procesos de sulfito, procesos alcalinos, o mediante procesos Kraft. Tal proceso y otros se describen en Meister, Patente Americana No. 5,138,007, y Knauf et al., *International Sugar Journal*, 106:1263, 147-150 (2004). El contenido de lignina del pasto varilla es de aproximadamente 17.6% (por ciento en peso seco), que es aproximadamente el mismo que el de la leña de maíz. El contenido de lignina del papel de carta varía de aproximadamente cero por ciento de lignina a aproximadamente 12 por ciento de lignina. Algunos papeles de oficina tienen un contenido de lignina que está en el rango de aproximadamente 11-12 por ciento de lignina. Mosier et al., *Bioresource Technology* 96:673, 2005, discute el contenido de lignina de algunos materiales, y también algunas estrategias de pretratamiento para removerla. Si se remueve la lignina, se puede usar como una fuente de energía en los procesos, p.e., para calentar una caldera quemando la lignina.

Los materiales celulósicos se pueden obtener a partir de materiales lignocelulósicos tratando químicamente el material lignocelulósico para solubilizar la lignina a un grado que permite que el material celulósico sea separado de la lignina, p.e., en la forma de fibras. Cuando el material lignocelulósico es de árboles, la lignina disuelta constituye generalmente entre aproximadamente 25 a 45% del material.

A los materiales se les puede reducir el tamaño, p.e., mediante esfuerzo de corte del material en una cortadora de navaja rotatoria, o pulverizando el material en un molino de bolas. Cuando se usa una cortadora de navaja rotatoria para

reducir el tamaño del material, p.e., un material celulósico o lignocelulósico, típicamente el material resultante es de naturaleza fibrosa, que tiene una relación de longitud a diámetro sustancial, p.e., mayor de 5/1, mayor de 10/1, mayor de 15/1, mayor de 20/1, o incluso mayor de 25/1. Cuando se usa un molino de bolas, el material resultante está típicamente en la forma de harina, que tiene típicamente partículas sustancialmente esféricas, p.e., que tiene un diámetro de menos de 5 micras, p.e., menos de 4, menos de 2.5, menos de 1 micra.

La FIG 2 muestra una cortadora de navaja rotatoria 100 que incluye una tolva 101 que puede ser cargada con un material celulósico o lignocelulósico 102, p.e., en la forma de astillas. El material celulósico o lignocelulósico es sacado en una zona de corte 103, y se somete a esfuerzo cortante entre navajas estacionarias 104 y navajas rotatorias 106. Una rejilla 105 evita que el material celulósico o lignocelulósico se salga de la zona de corte 103 hasta que el material tenga un tamaño suficientemente pequeño para pasar a través de aberturas definidas en la rejilla. Una vez el material celulósico o lignocelulósico ha pasado a través de las aberturas en la rejilla, este es capturado en cubeta 110. Para ayudar a la recolección del material celulósico o lignocelulósico fibroso sometido a esfuerzo cortante, la cubeta 110 puede ser mantenida a una presión por debajo de la presión atmosférica nominal. El material celulósico o lignocelulósico fibroso recolectado en la cubeta tiene una densidad volumétrica relativamente baja, p.e., menos de 0.5 gramos por centímetro cúbico, p.e., menos de 0.3 gramos por centímetro cúbico, o incluso menos de 0.2 gramos por centímetro cúbico, y tiene una apariencia "suave y esponjosa", como se muestra en las FIGS. 3A y 3B.

En algunas implementaciones, puede ser deseable usar un material fibroso que tiene un área superficial relativamente alta y/o una porosidad relativamente alta. Por ejemplo, un material fibroso deseable puede tener un área superficial de más de 0.5 m²/g, p.e., mayor de 1.0 m²/g, 1.5 m²/g, 1.75 m²/g, 5 m²/g, o incluso mayor de 10 m²/g, medida usando medidas de área superficial de BET Brunauer Emmett Teller); y/o una porosidad mayor de 70 por ciento, p.e., mayor de 80 por ciento, 87.5 por ciento, 90 por ciento, o incluso mayor de 95 por ciento, determinada por porosimetría de mercurio. Mayores áreas superficiales y/o altas porosidades pueden aumentar la velocidad de hidrólisis y/o velocidad de fermentación.

Se pueden usar mezclas de cualquiera de los materiales anteriores, p.e., mezclas de materiales obtenidos a partir de fuentes del papel, y materiales obtenidos a partir de algodón.

En algunas realizaciones, los fermentadores que incluyen un medio que incluye *Clostridium phytofermentans* disperso allí, están configurados para remover continuamente un producto de fermentación, tal como etanol. En algunas realizaciones, la concentración del producto deseado permanece sustancialmente constante, o dentro de aproximadamente veinticinco por ciento de una concentración promedio, p.e., medida después de 2, 3, 4, 5, 6, o 10 horas de la fermentación a una concentración inicial de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM. En algunas realizaciones, cualquier material de biomasa o mezcla descrita aquí se alimenta continuamente a los fermentadores.

El medio para *Clostridium phytofermentans* puede incluir constituyentes adicionales, tales como amortiguadores, p.e., NaHCO_3 , NH_4Cl , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , y KH_2PO_4 ; electrolitos, p.e., KCl , y NaCl ; factores de crecimiento; surfactantes; y agentes quelantes. Factores de crecimiento incluyen, p.e., biotina, ácido fólico, piridoxina-HCl, riboflavina, úrea, extractos de levadura, timina, triptona, adenina, citosina, guanosina, uracilo, ácido nicotínico, ácido pantoténico, B 12 (Cianocobalamina), ácido p-aminobenzóico, y ácido tioctico. Minerales incluyen, p.e., MgSO_4 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , Na_2MoO_4 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y $\text{NaWO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Agentes quelantes incluyen, p.e., ácido nitriltriácético. Surfactantes incluyen, p.e., polietilen glicol (PEG), polipropilen glicol (PPG), copolímeros de PEG y PPG y polivinilalcohol.

En algunas implementaciones, las condiciones de fermentación incluyen el medio a una temperatura de menos de aproximadamente 45°C , p.e., menos de aproximadamente 42°C (p.e., entre aproximadamente 34°C y 38°C , o aproximadamente 37°C). En cualquiera de estas implementaciones, generalmente, el medio se mantiene a una temperatura por encima de aproximadamente 5°C , p.e., por encima de aproximadamente 15°C .

En algunas implementaciones, las condiciones de fermentación incluyen mantener el medio a un pH por debajo de aproximadamente 9.5, p.e., entre aproximadamente 6.0 y 9.0, o entre aproximadamente 8 y 8.5. Generalmente,

durante la fermentación, el pH del medio típicamente no cambia en más de 1.5 unidades de pH. Por ejemplo, si la fermentación inicia a un pH de aproximadamente 7.5, típicamente no va más allá de pH 6.0 al final de la fermentación, que está dentro del rango de crecimiento de las células.

Las células de *Clostridium phytofermentans* se adaptan a concentraciones relativamente altas de etanol, p.e., 7 por ciento en peso o mayor, p.e., 12.5 por ciento en peso. Las células de *Clostridium phytofermentans* pueden ser cultivadas en un ambiente rico en etanol antes de la fermentación, p.e., 7 por ciento de etanol, para adaptar las células a incluso concentraciones mayores de etanol, p.e., 20 por ciento. En algunas realizaciones, *Clostridium phytofermentans* se adapta en concentraciones sucesivamente mayores de etanol, p.e., partiendo con 2 por ciento de etanol, luego 5 por ciento de etanol, y luego 10 por ciento de etanol.

Se pueden producir productos adicionales a o diferentes de etanol. Más generalmente, los productos de fermentación incluyen combustibles, tales como alcoholes (p.e., etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, o mezclas de estos) e hidrógeno. Otros productos incluyen ácidos orgánicos (p.e., ácido fórmico, ácido láctico, ácido acético o mezclas de estos), o sus bases conjugadas (p.e., iones formiato, lactato o acetato) o sales de los mismos.

Clostridium phytofermentans, tal como la cepa **ISDg^T**, se puede usar solo o en combinación con uno o más microbios, tales como levaduras u hongos (p.e., *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Trichoderma species*, *Aspergillus species*) u otras bacterias (p.e., *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium papyrosolvens*, *Clostridium cellulofyticum*, *Clostridium josui*, *Clostridium termitidis*, *Clostridium cellulosi*, *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium populeti*, *Clostridium cellulovorans*). Por ejemplo, cuando un *Clostridium* celulolítico (cepa C7) se cultivó en cocultivo con *Zymomonas mobilis* en un medio que contiene celulosa como el sustrato de crecimiento, los rendimientos de etanol fueron 2.5 veces mayores que en cultivos con *Clostridium* solo (Leschine y Canale-Parola, *Current Microbiology*, 11:129-136, 1984). Las mezclas de microbios se pueden proporcionar como mezclas sólidas (p.e., mezclas secadas por congelación), o como dispersiones líquidas de los microbios, y cultivadas en cocultivo con *Clostridium phytofermentans*, o se pueden adicionar los microbios

secuencialmente al medio de cultivo, por ejemplo, agregando otro microbio antes o después de la adición de *Clostridium phytofermentans*.

Adicionalmente, cualquiera de los materiales de biomasa descritos aquí o mezclas de cualquiera de los materiales de biomasa descritos aquí, pueden ser tratados con uno o más microbios descritos aquí en una manera secuencial o concurrente. Por ejemplo, la biomasa (o mezcla de biomasa) puede ser tratada concurrentemente con una mezcla de microbios, p.e., un cocultivo, o la biomasa (o mezcla de biomasa) puede ser inicialmente tratada con un primer microbio o una primera mezcla de microbios (p.e., una o más levaduras, hongos u otras bacterias) y entonces, la biomasa resultante puede ser tratada con una o más cepas de *Clostridium phytofermentans*. En otras realizaciones, el material de biomasa (o mezcla de biomasa) es inicialmente tratado con una o más cepas de *Clostridium phytofermentans* y luego la biomasa resultante es tratada con uno o más microbios diferentes (uno cualquiera de, o mezclas de microbios descritos aquí).

PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASA

Generalmente, existen dos enfoques básicos para producir etanol de grado combustible a partir de biomasa a gran escala utilizando células de *Clostridium phytofermentans*. En el primer método, primero se hidroliza un material de biomasa que incluye carbohidratos de alto peso molecular a carbohidratos de peso molecular menor, y luego fermentar los carbohidratos de peso molecular menor utilizando células de *Clostridium phytofermentans* para producir etanol. En el segundo método, se fermenta el material de biomasa en sí son pretratamiento químico y/o enzimático. En el primer método, la hidrólisis se puede realizar usando ácidos, p.e., ácidos Brønsted (p.e., ácido sulfúrico o clorhídrico), bases, p.e., hidróxido de sodio, procesos hidrotérmicos, procesos de explosión de fibra con amoníaco ("EFEX"), procesos de cal, enzimas, o combinaciones de estos. Hidrógeno, y otros productos de la fermentación pueden ser capturados y purificados si se desea, o desechados, p.e., por quemado. Por ejemplo, el gas hidrógeno puede ser quemado, o usado como una fuente de energía en el proceso, p.e., para impulsar una caldera de vapor, p.e., mediante quemado. La hidrólisis y/o tratamiento con vapor de la biomasa puede, p.e., aumentar la porosidad y/o área superficial de la biomasa, usualmente dejando los materiales celulósicos más expuestos a las células de *Clostridium phytofermentans*, lo cual puede aumentar la velocidad de fermentación y el rendimiento. La remoción de

lignina puede, p.e., proporcionar un combustible inflamable para impulsar una caldera, y también puede, p.e., aumentar la porosidad y/o área superficial de la biomasa, usualmente aumentando la velocidad de fermentación y el rendimiento. Generalmente, en cualquiera de las realizaciones descritas a continuación, la concentración inicial de los carbohidratos en el medio es mayor de 20 mM, p.e., mayor de 30 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, o incluso mayor de 500 mM.

Producción de Etanol a partir de Biomasa usando Pretratamiento de Hidrólisis de Ácido

La FIG. 4 ilustra un proceso 158 para producir etanol a partir de biomasa tratando primero la biomasa (p.e., entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 por ciento en peso) suspendida en agua con un ácido en una unidad de acidificación 160. La biomasa puede ser, p.e., astillas de madera, aserrín, residuos agrícolas molidos o cosechas de biomasa (p.e., leña de maíz o pasto varilla), residuos de refinación del maíz, productos de papel sometidos a corte como los mostrados en las FIGS. 3A y 3B, o mezclas de otros materiales celulósicos y/o lignocelulósicos. La biomasa puede ser acidificada burbujeando dióxido de azufre gaseoso a través de la biomasa que está suspendida en el agua, o agregando un ácido fuerte, p.e., ácido sulfúrico, clorhídrico, o nítrico. Durante la acidificación, el pH es mantenido por debajo de aproximadamente 3, p.e., por debajo de aproximadamente 2.5 o por debajo de aproximadamente 1.5. Además del ácido ya en la unidad de acidificación, opcionalmente, se puede agregar una sal de metal tal como sulfato ferroso, sulfato férrico, cloruro férrico, sulfato de aluminio, cloruro de aluminio, sulfato de magnesio, o mezclas de estos para ayudar en la hidrólisis de la biomasa. La biomasa es mantenida en la unidad de acidificación 160, p.e., entre aproximadamente 1 y 6 horas, a una temperatura, p.e., entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 80°C.

Después de acidificación en la unidad de acidificación 160, la biomasa es deshidratada en la unidad de deshidratación 164, p.e., mediante exprimido o mediante centrifugación, para remover la mayoría del agua acidificada. Si se desea, el agua acidificada puede ser re-usada en la unidad de acidificación 160.

La biomasa impregnada con ácido es alimentada a una unidad de hidrólisis 166, p.e., mediante un alimentador por gravedad o un alimentador de válvula

rotatoria que, en algunos casos, no densifica sustancialmente la biomasa. Se inyecta vapor a la unidad de hidrólisis 166 para contactarla directamente y calentar la biomasa a la temperatura deseada. La temperatura del vapor está, p.e., entre aproximadamente 130 °C y aproximadamente 220 °C, y la inyección de vapor continua por un tiempo, p.e., de entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 120 minutos. El hidrolizado es entonces descargado a un tanque de evaporación instantánea 170 que opera a una temperatura de, p.e., entre aproximadamente 100 °C y aproximadamente 190 °C, y es mantenido en el tanque 170 por un período de tiempo, p.e., entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 6 horas, para hidrolizar adicionalmente la biomasa, p.e., en oligosacáridos solubles y azúcares monoméricos.

El hidrolizado es entonces alimentado al extractor 172, p.e., un extractor a contracorriente, un extractor de transportador de tornillo, o un extractor de banda al vacío. En el extractor 172, el hidrolizado es lavado con agua caliente a una temperatura de, p.e., entre aproximadamente 40 °C a aproximadamente 90 °C. Por ejemplo, el hidrolizado es lavado con una cantidad de agua mayor que su propio peso, p.e., mayor de dos veces su propio peso, p.e., tres veces, cuatro veces, ocho veces, o incluso más de diez veces su propio peso.

Se agrega álcali, p.e., en la forma de cal o amoníaco, al extracto en la unidad de ajuste de pH y filtración 180 para ajustar el pH del extracto hasta entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8. Cualquier precipitado durante la adición del álcali es removido y el filtrado es reenviado a un fermentador 182, que retiene un medio que tiene células de *Clostridium phytofermentans* dispersas allí. La concentración inicial de los carbohidratos en el medio está entre 20 mM y aproximadamente 100 mM. La concentración de células de *Clostridium phytofermentans* suspendidas en el medio es, p.e., de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 células/mL. En una implementación, el medio (referido como GS-2) contiene (cada uno expresado en g/L) extracto de levadura, 6.0; úrea, 2.1; K_2HPO_4 , 2.9; KH_2PO_4 , 1.5; MOPS; 10.0; citrato trisódico dihidratado, 3.0; clorhidrato de cisteína, 2.0. En otras implementaciones, los componentes pueden ser agregados a, o sustituidos por los componentes en el medio GS-2, que incluyen: Triptona, 2.0; adenina, 0.02; citosina, 0.05; guanosina, 0.02; timina, 0.05; uracilo, 0.04; y una cantidad de una solución de vitamina, p.e., 10 g/mL, preparada como se describe en Wolin et al. *Bacteriology*, 87:993, 1964. El extracto de la

unidad de pH y filtración 180 es ajustado de forma que la concentración inicial de carbohidratos en el medio es, p.e., entre aproximadamente pH 7,0 y pH 7.5.

Si se desea, al inicio de la fermentación, además del hidrolizado, se puede agregar un carbohidrato de bajo peso molecular, p.e., lactosa, a una concentración inicial de, p.e., entre aproximadamente 1.0 g/L y 5 g/L. Esto puede ayudar a aumentar rápidamente el número de células de *Clostridium phytofermentans* y construir enzimas dentro del fermentador. Se deja proceder la fermentación mientras se burbujea gas nitrógeno a través del medio por un período de tiempo, p.e., entre aproximadamente 8 horas y 72 horas, mientras se mantiene una temperatura de, p.e., entre aproximadamente 15°C y 40 °C. El gas hidrógeno producido durante la fermentación es arrastrado del fermentador 182 por el gas nitrógeno, y es recolectado o quemado.

Los sólidos extraídos del extractor 172 son deshidratados, y luego alimentados a una segunda unidad de acidificación 190. Los sólidos del extractor son remojados en una solución acuosa de un ácido, y opcionalmente, una sal de metal. Durante la acidificación, el pH es mantenido por debajo de aproximadamente 3, p.e., por debajo de aproximadamente 2.5 o debajo de aproximadamente 1.5. La biomasa es mantenida en la segunda unidad de acidificación 190, p.e., entre aproximadamente 1 y 6 horas, a una temperatura, p.e., entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C.

Después de la acidificación en la unidad de acidificación 190, la biomasa es deshidratada en la unidad de deshidratación 200, p.e., mediante exprimido o mediante centrifugación, para remover la mayoría del agua acidificada. Si se desea, el agua acidificada puede ser re-usada en la unidad de acidificación 160 y/o unidad de acidificación 190.

La biomasa impregnada con ácido es alimentada en la segunda unidad de hidrólisis 202. Se inyecta vapor a la segunda unidad de hidrólisis 202 para contactarla directamente y calentar la biomasa hasta una temperatura deseada. La temperatura del vapor y el tiempo del tratamiento es generalmente el mismo usado en la primera unidad de hidrólisis 166. El hidrolizado es entonces descargado en un tanque de evaporación instantánea 204 que opera a una temperatura de, p.e., entre aproximadamente 140 °C y aproximadamente 190 °C, y es mantenido en el

tanque 204 por un período de tiempo, p.e., entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 12 horas para hidrolizar adicionalmente la biomasa.

Se agrega álcali al extracto en la unidad de ajuste de pH y filtración 210 para ajustar el pH del extracto hasta entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8. Cualquier precipitado durante la adición de álcali es removido, y el filtrado es combinado con los contenidos del fermentador 182, y luego reenviados al fermentador 212. Se deja proceder la fermentación mientras se burbujea gas nitrógeno a través del medio por un período de tiempo, p.e., entre aproximadamente 15 horas y 100 horas, mientras se mantiene a una temperatura de, p.e., entre aproximadamente 25 °C y 35°C. El gas hidrógeno producido durante la fermentación es arrastrado del fermentador 212 por el gas nitrógeno, y es recolectado o quemado.

Después de la fermentación, los contenidos totales del fermentador 212 son transferidos a la unidad de destilación 220, y se destila y recolecta 96 por ciento de etanol/4 por ciento de agua (en volumen). El etanol de grado combustible (99 - 100 por ciento de etanol) puede ser obtenido mediante destilación azeotrópica del etanol al 96 por ciento, p.e., mediante la adición de benceno y luego re-destilando la mezcla, o pasando el etanol al 96 por ciento a través de tamices moleculares para remover el agua.

Producción de Etanol A Partir de Biomasa Usando Pretratamiento de Hidrólisis de Enzima

La FIG. 5A ilustra un proceso 228 para producir etanol a partir de biomasa primero tratando la biomasa (entre 10 y 60 por ciento en peso), p.e., suspendida en agua, con una enzima o mezcla de enzimas, p.e., endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas (CBH), beta-glucosidasas, glicosido hidrolasas, glicosiltransferasas, liasas, y esterasas activas contra componentes de hemicelulosa, pectina y almidón, en una unidad de hidrólisis 230. Durante la hidrólisis, el pH es mantenido entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 7.5 agregando hidróxido de sodio. La biomasa es mantenida en la unidad de hidrólisis 230, p.e., entre aproximadamente 6 y 120 horas, a una temperatura de, p.e., entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40 °C, y bajo nitrógeno.

Después de la hidrólisis, se agrega álcali, p.e., en la forma de cal o amoníaco, y/o ácido, p.e., en la forma de una solución acuosa de ácido sulfúrico, a los contenidos de la unidad de hidrólisis 230 por medio de la unidad de ajuste de pH 234 para ajustar el pH de los contenidos hasta entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8. Después de ajustar el pH, los contenidos totales de la unidad de hidrólisis 230 son transferidos al fermentador 240, que retiene un medio que tiene células de *Clostridium phytofermentans* dispersas allí. La concentración inicial de los carbohidratos en el medio está entre 20 mM y aproximadamente 100 mM. La concentración de células de *Clostridium phytofermentans* suspendidas en el medio es, p.e., de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 células/mL. En una implementación, el medio contiene (cada uno expresado en g/L) de extracto de levadura, 6.0, úrea, 2.1, K_2HPO_4 , 2.9; KH_2PO_4 , 1.5; MOPS; 10.0; citrato trisódico dihidratado, 3.0; clorhidrato de cisteína. El efluente de la unidad de hidrólisis 230 es ajustado de forma que la concentración inicial de carbohidratos en el medio de, p.e., entre aproximadamente 50 y 200 mM. Si se desea, al inicio de la fermentación, se puede agregar celobiosa a una concentración inicial de, p.e., entre aproximadamente 1.0 g/L y 5 g/L, o se puede agregar lactosa para agilizar la fermentación o hidrólisis. Se deja proceder la fermentación mientras se burbujea gas nitrógeno a través del medio por un período de tiempo, p.e., entre aproximadamente 8 horas y 72 horas, mientras se mantiene una temperatura de, p.e., entre aproximadamente 15 °C y 40 °C. El gas hidrógeno producido durante la fermentación es arrastrado del fermentador 240 por el gas nitrógeno, y es recolectado o quemado.

Después de la fermentación, los contenidos totales del fermentador 240 son transferidos a la unidad de destilación 242, y se puede obtener etanol de grado combustible como se discutió anteriormente.

Producción de Etanol a Partir de Biomasa Sin Pretratamiento de Ácido o Enzima

La FIG. 5B ilustra un proceso 250 para producir etanol a partir de biomasa primero cargando un recipiente de retención 252 con biomasa, p.e., entre 10 y 60 por ciento en peso, suspendida en agua. La biomasa se puede dejar remojar por un tiempo, p.e., de entre aproximadamente 1 hora y 36 horas a una temperatura de, p.e., entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 90 °C si se hace bajo presión atmosférica normal, o entre aproximadamente 100 a aproximadamente 175 si se hace bajo presiones mayores que la presión atmosférica normal, p.e.,

entre aproximadamente 1.5 atmósferas y aproximadamente 10 atmósferas. Se agrega álcali, p.e., en la forma de cal o amoníaco, y/o ácido, p.e., en la forma de una solución acuosa de ácido sulfúrico, a los contenidos del recipiente de retención 252 después del tiempo de mojado mediante la unidad de ajuste de pH 260 para ajustar el pH de los contenidos hasta entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8. Después de ajustar el pH, los contenidos totales del recipiente de retención 252 son transferidos al fermentador 262, que alberga un medio que tiene células de *Clostridium phytofermentans* dispersas allí. La concentración inicial de los carbohidratos en el medio está entre 20 mM y aproximadamente 100 mM. La fermentación ocurre en el recipiente de fermentación 262 bajo condiciones que han sido descritas anteriormente. El etanol de grado combustible se destila en la unidad de destilación 270, también como se describió anteriormente.

La FIG. 5C ilustra un proceso 300 para producir etanol a partir de biomasa. La biomasa (con o sin lignina removida), y, opcionalmente, vapor es cargado a un fermentador 302. Si se remueve la lignina, se puede usar en cualquier proceso intensivo de energía tal como energía para impulsar una unidad de destilación. El vapor puede ser conveniente para esterilizar la biomasa, y también para aflojar la biomasa y hacerla más reactiva. La biomasa es cargada al fermentador 302 y se agrega agua (si es necesario) de forma que, p.e., entre aproximadamente 10 y 60 por ciento en peso de la masa total es biomasa suspendida. La biomasa se puede dejar remojar por un tiempo, p.e., entre aproximadamente 1 hora y 36 horas, a una temperatura de, p.e., entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 90°C si está bajo presión atmosférica, o entre aproximadamente 100 °C a aproximadamente 175°C si está bajo presiones mayores que la presión atmosférica normal, p.e., entre aproximadamente 1.5 atmósferas y aproximadamente 10 atmósferas. Se agrega álcali, p.e., en la forma de cal o amoníaco, y/o ácido, p.e., en la forma de una solución acuosa de ácido sulfúrico, a los contenidos del fermentador 302 después del tiempo de remojo por medio de la unidad de ajuste de pH 306 para ajustar el pH de los contenidos hasta entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8.

El fermentador de siembra 304, que alberga un medio que tiene células de *Clostridium phytofermentans* dispersas allí, se usa para cultivar las células de *Clostridium phytofermentans*. La concentración de células de *Clostridium phytofermentans* suspendidas en el medio es de, p.e., aproximadamente 10^7 al

inicio del crecimiento, y aproximadamente 10^8 células/mL cuando la mezcla siembra está lista para uso para fermentar los carbohidratos. La concentración inicial de los carbohidratos en el medio está entre 20 mM y aproximadamente 100 mM. En una implementación, el medio contiene (cada uno expresado en g/L) de extracto de levadura, 6.0, urea, 2.1, K_2HPO_4 , 2.9; KH_2PO_4 , 1.5; MOPS; 10.0; citrato trisódico dihidratado, 3.0; y clorhidrato de cisteína. Los contenidos totales del fermentador de siembra 304 son transferidos al fermentador 302 mantenidos a temperatura ambiente, y se dejan fermentar bajo condiciones que han sido descritas anteriormente. El etanol de grado combustible es destilado en la unidad de destilación 270, también como se describió anteriormente.

Producción de Etanol a Partir de Biomasa Usando una Combinación de Pretratamiento de Hidrólisis de Ácido, y Pretratamiento de Hidrólisis de Enzima

El etanol a partir de biomasa también se puede producir usando una combinación de pretratamiento de hidrólisis de ácido y pretratamiento de hidrólisis de enzima. Por ejemplo, una hidrólisis inicial puede tener lugar usando un ácido, p.e., mediante el tratamiento de la biomasa en una unidad de acidificación, seguida por inyección de vapor (como se muestra en la FIG. 4), y luego se puede aplicar una hidrólisis final a la biomasa hidrolizada inicialmente usando hidrólisis de enzima (como se muestra en la FIG. 5A).

Se puede utilizar cualquier combinación de los métodos y/o características de producción de etanol para hacer un método de producción híbrido. En cualquiera de los métodos descritos aquí, la lignina puede ser removida antes de la fermentación. Adicionalmente, se pueden producir productos adicionales o diferentes de etanol mediante cualquiera de los métodos descritos aquí. Más generalmente, los productos de fermentación incluyen combustibles, tales como alcoholes e hidrógeno, y otros productos, tales como ácidos orgánicos. *Clostridium phytofermentans*, tal como la cepa **ISDg^T**, se puede usar solo, o sinérgicamente en combinación con uno o más de cualquiera de los otros microbios (p.e., levaduras u otras bacterias) descritas aquí.

EJEMPLOS

La revelación se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

En un experimento, *Clostridium phytofermentans* fue cultivado en tubos de cultivo en medio de celulosa GS-2 a un pH inicial de 7.5 bajo una atmósfera de N₂. La concentración inicial de *Clostridium phytofermentans* era de aproximadamente $0.8 - 1.1 \times 10^7$ células/mL y la temperatura de incubación era de 30 °C.

La FIG. 6 muestra la concentración de etanol (E), acetato (A), formiato (F), y lactato (L) a la terminación de descomposición de la celulosa como una función de la concentración inicial de celulosa (en equivalentes de glucosa). A una concentración inicial de celulosa de 37 mM, las concentraciones de lactato (L), acetato (A), y etanol (E), eran 4 mM, 20 mM, y 59 mM, respectivamente. El formiato (F) no era detectable a esta concentración inicial. A una concentración inicial de celulosa 74 mM, las concentraciones de lactato (L), formiato (F), acetato (A), y etanol (E), eran 7 mM, 10 mM, 20 mM, y 123 mM, respectivamente; y a una concentración de 148 mM, las concentraciones de lactato (L), formiato (F), acetato (A), y etanol (E), eran 10 mM, 17 mM, 20 mM, y 160 mM, respectivamente. La FIG. 6 muestra que altas concentraciones de celulosa no inhiben la acción de *Clostridium phytofermentans*, porque la concentración de etanol (E) aumenta con el aumento de la concentración inicial de celulosa.

Este resultado contrasta con los resultados obtenidos usando otros microbios que fermentan celulosa que no fermentan a mayores concentraciones de celulosa, p.e., por encima de aproximadamente 40 mM (en equivalentes de glucosa), y producen cantidades disminuidas de etanol a mayores concentraciones de celulosa (ver Desvaux et al., *Appl. Environ. Microbiology*, 66, 2461-2470, 2000). También es notable que cuando se usa *Clostridium phytofermentans*, los niveles de acetato no aumentan significativamente con el aumento de la concentración inicial de celulosa, lo cual puede ser ventajoso porque más celulosa va para preparar el etanol valioso más económico. Generalmente, otras bacterias celulolíticas producen menos etanol que acetato (sobre una base molar) y las relaciones etanol-a-acetato disminuyen con el aumento de las concentraciones iniciales de celulosa (por ejemplo, ver Desvaux et al. anterior).

En un segundo experimento, *Clostridium phytofermentans* se cultivó en tubos de cultivo en medio GS-2 que contiene celulosa a 25 o 50 mM (equivalentes de glucosa), o xilano a 25 o 50 mM (equivalentes de xilosa), o celulosa más xilano,

cada uno a 25 o 50 mM, para una concentración total de carbohidrato de 50 o 100 mM (equivalentes de monosacárido). El pH inicial del medio era de 7.5 y la concentración inicial de *Clostridium phytofermentans* era de $0.8 - 1.1 \times 10^7$ células/mL. Los cultivos fueron incubados bajo una atmósfera de N_2 a 30 °C. La degradación de carbohidrato se monitoreó visualmente.

En cultivos que contienen ambos carbohidratos, la celulosa y el xilano se degradaron simultáneamente. La velocidad de descomposición de celulosa o xilano en cultivos que contienen ambos carbohidratos era igual o mayor a la velocidad de descomposición en cultivos que contienen un solo carbohidrato. Este experimento demuestra que la fermentación de celulosa por cultivos de *Clostridium phytofermentans* no es inhibida por el xilano, un polímero de azúcar de cinco carbonos, y un componente importante de hemicelulosa. Adicionalmente, este experimento muestra que la celulosa y el xilano son fermentados simultáneamente por cultivos de *Clostridium phytofermentans*, los cuales pueden ser ventajosos dado que la mayoría de las fuentes naturales de biomasa contienen mezclas de carbohidratos, con celulosa como el componente más abundante y hemicelulosas, tales como xilano, segundo en abundancia solamente a celulosa. En contraste, parece que otros microbios no pueden fermentar los azúcares de 5 carbonos, o polímeros que incluyen unidades de repetición de azúcar de 5 carbonos. Además, con otros microbios, los azúcares de 5 carbonos, o polímeros de los mismos, pueden realmente interferir con los procesos metabólicos de los microbios para reducir la velocidad de fermentación y rendimiento del etanol.

En un tercer experimento, *Clostridium phytofermentans* se cultivó en tubos de cultivo en medio de GS-2 que contiene almidón (almidón soluble Difco) a 10, 20, o 40 g/L. El pH inicial del medio era de 7.5 y la concentración inicial de *Clostridium phytofermentans* fue de $0.8 - 1.1 \times 10^7$ células/mL. Los cultivos fueron incubados bajo una atmósfera de N_2 a 30 °C. La fermentación de almidón fue indicada por la producción de gas y un aumento de la turbidez del cultivo. A la terminación de la fermentación, se determinaron las concentraciones de los productos de fermentación. A una concentración de almidón inicial de 10 g/L, las concentraciones de lactato, formiato, acetato, y etanol, eran 1 mM, 2 mM, 4 mM, y 69 mM, respectivamente. A una concentración inicial de almidón de 20 g/L, las concentraciones de lactato, formiato, acetato, y etanol, eran 3 mM, 4 mM, 5 mM, y 127 mM, respectivamente. A una concentración inicial de almidón de 40 g/L, las concentraciones de lactato, acetato, y etanol, eran 11 mM, 4 mM, y 132 mM,

respectivamente. El formiato no se detectó en éste último experimento. Estos experimentos indican que mayores concentraciones de almidón no inhiben la acción de *Clostridium phytofermentans*, a medida que la concentración de etanol aumenta con concentración inicial en aumento de almidón, un resultado análogo al descrito anteriormente cuando las células se cultivaron con concentraciones en aumento de celulosa.

En un cuarto experimento, *Clostridium phytofermentans* se cultivó en tubos de cultivo en medio GS-2 que contiene maíz molido a 27 g/L, o granos destiladores húmedos a 10.5 g/L, o leña de maíz en tiras a 20 g/L, o pasto varilla en tiras a 20 g/L. El pH inicial del medio fue de 7.5 y la concentración inicial de *Clostridium phytofermentans* era de $0.8 - 1.1 \times 10^7$ células/mL. Los cultivos fueron incubados bajo una atmósfera de N₂ a 30 °C. Todos los sustratos fueron fermentados, como lo indica la producción de gas, y el producto de fermentación primario en todos los cultivos fue etanol. Este experimento indica que *Clostridium phytofermentans* fermenta estos materiales de alimentación celulósicos a etanol sin pretratamiento químico del material de alimentación celulósico y sin la adición de celulasas u otras enzimas.

En un ejemplo final, los análisis de la secuencia de genoma de *Clostridium phytofermentans* soporta la conclusión que este microbio posee propiedades de fermentación inusuales, y es particularmente adecuado para descomponer componentes múltiples de biomasa de planta y fermentar estos componentes a etanol. El genoma del *Clostridium phytofermentans* ha sido secuenciado por el Joint Genome Institute of the US Department of Energy (Instituto Conjunto del Genoma del Departamento de Energía Americano). Un ensamble de secuencia borrador fue primero disponible el 8 de Noviembre de 2005 y fue liberado al público el 20 de Mayo de 2006 (<http://genome.ornl.gov/microbial/cphy/>). Este ensamble borrador contenía 4.5 MB de secuencia de nucleótido dividida en 169 regiones contiguas, de las cuales se derivaron 3671 proteínas putativas. En Diciembre de 2006, los espacios en la secuencia fueron cerrados y se espera que la secuencia sea terminada a principios del 2007.

Como una indicación de las propiedades de fermentación inusuales de *Clostridium phytofermentans* y su habilidad para descomponer múltiples componentes de biomasa de planta, examinamos la secuencia de genoma para evidencia de mecanismos de captación de carbohidrato. El genoma del

Clostridium phytofermentans contiene más de 100 sistemas de transporte del tipo ABC y 52 de estos parecen estar dedicados a transportar carbohidratos a las células. Aunque algunos de estos sistemas de transporte son específicos para monosacáridos como glucosa, fucosa, o xilosa, otros están indudablemente involucrados en el transporte de disacáridos (p.e., celobiosa), trisacáridos, y tetrasacáridos. Esta excepcionalmente amplia diversidad de sistemas de transporte de carbohidrato es impropcedente entre microbios, e indica que *Clostridium phytofermentans* es particularmente adecuado para descomponer biomasa celulósica.

OTRAS REALIZACIONES

Se entenderá que aunque la invención ha sido descrita en conjunto con la descripción detallada de la misma, la anterior descripción pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un método para hacer un combustible, el método comprende:

proveer una biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico;

combinar la biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico con células de *Clostridium phytofermentans* en un medio, en donde una concentración de hemicelulosa o lignocelulosa en el medio es mayor de 20 mM; e

hidrolizar y fermentar la biomasa que comprende hemicelulosa o el material lignocelulósico de manera que las células de *Clostridium phytofermentans* empleen este material para producir un combustible .

2. El método de la reivindicación 1, en donde la biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico se le reduce en tamaño antes de hidrolizar.

3. Un método para hacer un combustible, el método comprende:

combinar células de *Clostridium phytofermentans* y una biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico en un medio; e

hidrolizar y fermentar la biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico para que las células de *Clostridium phytofermentans* empleen este material para producir el combustible.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la biomasa comprende además un carbohidrato seleccionado del grupo que consiste de arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, manosa, ribosa, xilosa, y mezclas de los mismos.

5. El método de la reivindicación 3, en donde la biomasa además comprende un carbohidrato seleccionado del grupo que consiste de celulosa,

celulosa microcristalina, ácido poligalacturónico, pectina, almidón, xilano, y mezclas de los mismos.

6. El método de la reivindicación 3, en donde la biomasa que comprende hemicelulosa o el material lignocelulósico es pulverizado de forma que tiene un tamaño de partícula entre 5 micras y 50 micras.

7. El método de la reivindicación 3, en donde la biomasa que comprende hemicelulosa además comprende un material celulósico o lignocelulósico.

8. El método de la reivindicación 3, en donde la biomasa que comprende hemicelulosa o el material lignocelulósico comprende un carbohidrato de bajo peso molecular formado por rompimiento de un carbohidrato de alto peso molecular.

9. Un método para hacer etanol, el método comprende:

combinar células de *Clostridium phytofermentans* y una biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico en un medio; e

hidrolizar y fermentar la biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico para que las células de *Clostridium phytofermentans* empleen este material para producir etanol.

10. El método de la reivindicación 9, en donde las condiciones del método incluyen mantener el medio a una temperatura de menos de 45°C. o mantener el pH del medio por debajo de 9.5, o los dos.

11. El método de la reivindicación 9, en donde las condiciones del método incluyen mantener una concentración del etanol menor de 1 M.

12. Un método que comprende:

combinar células de *Clostridium phytofermentans*, un segundo microorganismo y una biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico en un medio; e

hidrolizar y fermentar una biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico para que las células de *Clostridium phytofermentans* empleen este material.

13. El método de la reivindicación 12, en donde el segundo microorganismo comprende una levadura y/o bacteria diferente a *Clostridium phytofermentans*.

14. Una composición que comprende:
una biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico;
Clostridium phytofermentans; y
un segundo microorganismo.

15. Una planta de combustible que comprende:
una unidad de hidrólisis configurada para hidrolizar una biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico;
un fermentador configurado para albergar un medio y una biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico; y
células de *Clostridium phytofermentans* dispersadas en el fermentador, donde el fermentador proporciona condiciones para la hidrólisis y fermentación de la biomasa que comprende hemicelulosa o un material lignocelulósico por el empleo de células de *Clostridium phytofermentans*; y
opcionalmente comprende uno o más de otros microorganismos diferentes de *Clostridium phytofermentans*.

16. La planta de combustible de la reivindicación 15, en donde el uno o más de otros microorganismos diferentes comprenden una o más levaduras y/o bacterias.

17. La planta de combustible de la reivindicación 15, en donde la una o más bacterias comprenden una o más cepas de *Zymomonas mobilis*.



ELSEVIER

Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update

Lee R Lynd^{1,2}, Willem H van Zyl², John E McBride¹ and Mark Laser¹

Biologically mediated processes seem promising for energy conversion, in particular for the conversion of lignocellulosic biomass into fuels. Although processes featuring a step dedicated to the production of cellulase enzymes have been the focus of most research efforts to date, consolidated bioprocessing (CBP) – featuring cellulase production, cellulose hydrolysis and fermentation in one step – is an alternative approach with outstanding potential. Progress in developing CBP-enabling microorganisms is being made through two strategies: engineering naturally occurring cellulolytic microorganisms to improve product-related properties, such as yield and titer, and engineering non-cellulolytic organisms that exhibit high product yields and titers to express a heterologous cellulase system enabling cellulose utilization. Recent studies of the fundamental principles of microbial cellulose utilization support the feasibility of CBP.

Addresses

¹Thayer School of Engineering, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire 03755, USA

²Department of Microbiology, University of Stellenbosch, Private Bag XI, Stellenbosch, Matieland 7602, South Africa

Corresponding author: Lynd, Lee R (lee.lynd@dartmouth.edu)

Current Opinion in Biotechnology 2005, 16:577–583

This review comes from a themed issue on
Biochemical engineering
Edited by Govind Rao

Available online 8th September 2005

0958-1669/\$ – see front matter

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

DOI 10.1016/j.copbio.2005.08.009

Introduction

Energy conversion, utilization and access underlie many of the great challenges of our time, including those associated with sustainability, environmental quality, security and poverty. New applications of emerging technologies will be required to respond to these challenges [1,2]. As one of the most powerful of these technologies, biotechnology could give rise to important new energy conversion processes. Resources for the biological conversion of energy to forms useful to humanity include plant biomass and derivatives thereof (e.g. synthesis gas and animal wastes), sunlight [3,4], inorganic compounds [5], and fossil resources (e.g. oil, coal and natural gas) [6]. Energy carriers that can be made from these resources include organic fuels, electricity [4,5] and hydrogen [3].

Among forms of plant biomass, lignocellulosic biomass ('biomass') is particularly well-suited for energy applications because of its large-scale availability, low cost and environmentally benign production [7]. In particular, many energy production and utilization cycles based on cellulosic biomass have near-zero greenhouse gas emissions on a life-cycle basis [8–10]. The primary obstacle impeding the more widespread production of energy from biomass feedstocks is the general absence of low-cost technology for overcoming the recalcitrance of these materials [7].

Biomass processing schemes involving enzymatic or microbial hydrolysis commonly involve four biologically mediated transformations: the production of saccharolytic enzymes (cellulases and hemicellulases); the hydrolysis of carbohydrate components present in pretreated biomass to sugars; the fermentation of hexose sugars (glucose, mannose and galactose); and the fermentation of pentose sugars (xylose and arabinose). These four transformations occur in a single step in a process configuration called consolidated bioprocessing (CBP), which is distinguished from other less highly integrated configurations in that it does not involve a dedicated process step for cellulase production. Thermochemical processing options appear more promising than biological options for the conversion of the lignin fraction of cellulosic biomass, which can have a detrimental effect on enzymatic hydrolysis but also serves as a source of process energy and potential coproducts that have important benefits in a life-cycle context [7,11].

Fundamental and applied topics relevant to CBP were comprehensively reviewed in 2002 [12]. Here, we provide an updated perspective focusing on recent developments. Ethanol production is emphasized, as this has been the focus of most work pursuant to CBP to date. In principle, however, the CBP strategy is applicable to any fermentation product.

The motivation for consolidated bioprocessing

As addressed in more detail elsewhere [12], CBP offers the potential for lower cost and higher efficiency than processes featuring dedicated cellulase production. This results from avoided costs for capital, substrate and other raw materials, and utilities associated with cellulase production. In addition, several factors support the possibility of realizing higher hydrolysis rates, and hence reduced reactor volume and capital investment, using CBP. These include enzyme–microbe synergy (discussed below), as well as the use of thermophilic organisms and/or complexed cellulase systems. Moreover,

cellulose-adherent cellulolytic microorganisms are likely to successfully compete for products of cellulose hydrolysis with non-adhered microbes, including contaminants, which could increase the stability of industrial processes based on microbial cellulose utilization.

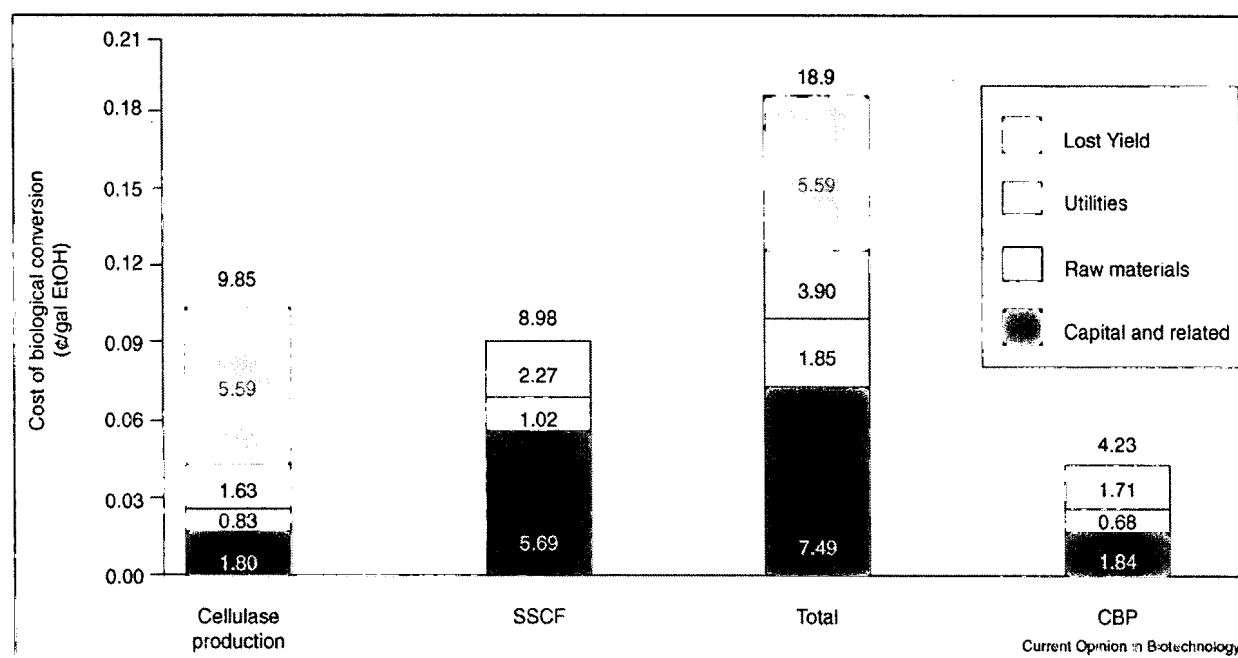
Over the past few years, much effort has been devoted to reducing the cost of producing cellulase enzymes [13]. Following greater than tenfold cost reductions, cellulase production costs have recently been reported in the range of 10 to 20 cents per gallon (¢/gal) of ethanol produced [14*]. These exciting developments could well enable a variety of formerly infeasible industrial processes, but do not diminish the potential of CBP to offer significantly lower costs than other configurations. Figure 1 compares the projected costs for biological processing associated with ethanol production for a CBP process and for an advanced process featuring at-site dedicated cellulase production in combination with simultaneous saccharification with co-fermentation of hexose and pentose sugars (SSCF). Adding together the 9.90 ¢/gal ethanol for dedicated cellulase production and 9 ¢/gal for SSCF gives a total cost for biological processing of 18.9 ¢/gal, which is more than fourfold larger than the 4.2 ¢/gal projected for

CBP. For the advanced process scenarios analyzed here, identical in every respect except for the configuration assumed for biological processing and consequences thereof, the projected wholesale selling price of ethanol from a cellulosic feedstock costing \$40/dry ton is 77 ¢/gal (\$1.08/gal gasoline equivalent) for the dedicated cellulase production/SSCF scenario and 63 ¢/gal (\$0.88/gal gasoline equivalent) for CBP. The difference between these projected prices, 20 ¢/gal gasoline equivalent, is particularly important for fuel production with its low manufacturing margins and price-driven competitive markets. For comparison, the average wholesale price of gasoline was \$0.98/gal for the period 2001 to 2004 and \$1.32/gal for the first quarter of 2005 [15].

Organism development strategies

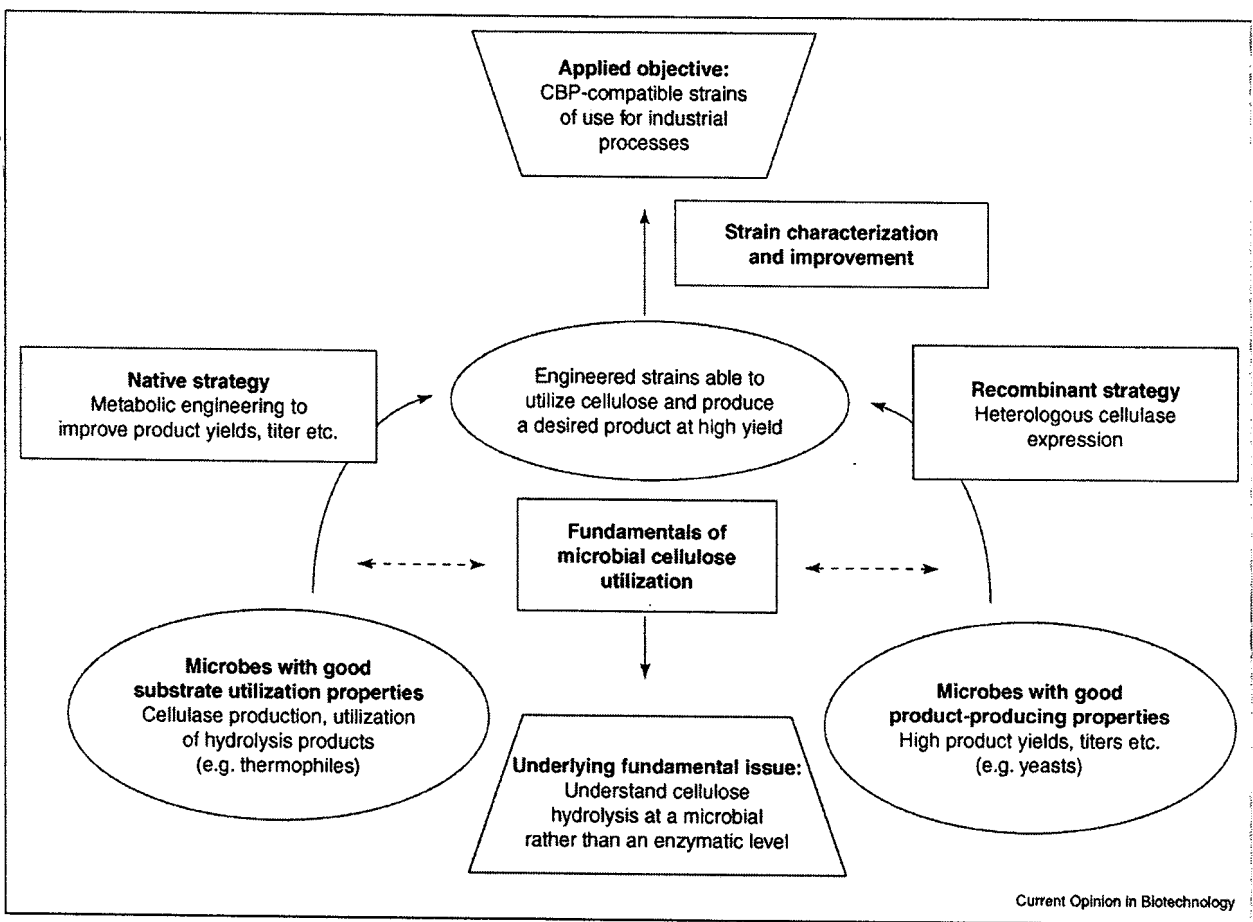
Microorganisms with the combination of substrate-utilization and product formation properties required for CBP are not currently available, but could probably be developed given sufficient effort. Such developments can be pursued by two strategies (Figure 2). The native cellulolytic strategy involves engineering naturally occurring cellulolytic microorganisms to improve product-related properties, such as yield and titer. The recombinant

Figure 1



The comparative cost of ethanol production by consolidated bioprocessing (CBP) and by simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) featuring dedicated cellulase production. Processes are simulated assuming aggressive performance parameters intended to be representative of mature technology. Cellulase production: yield, 400 FPU (filter paper unit)/g carbohydrate; productivity, 400 FPU/L/h. Hydrolysis and fermentation yields are set at 95% of the theoretical value for both CBP and SSCF. The SSCF reaction time is 7 days. Savings in the SSCF reactor accompanying reaction times less than 7 days are completely offset by the increased enzyme costs associated with higher cellulase loadings required to achieve shorter reaction times. The CBP reaction time is set at 1.5 days, consistent with the expectation of higher hydrolysis rates (see text). If the reaction time were increased to 3 days, the cost of CBP increases from 4.4 ¢/gallon to 5.5 ¢/gal. (Simulations were carried out using ASPEN-based models based on the modeling framework developed at the National Renewable Energy Laboratory [55,56], with modifications for mature technology as described elsewhere [2].)

Figure 2



Organism development strategies and related fundamentals.

cellulolytic strategy involves engineering non-cellulolytic organisms that exhibit high product yields and titers so that they express a heterologous cellulase system that enables cellulose utilization. Each strategy involves considerable uncertainty, and different strategies could prove advantageous for different products. In light of this and other considerations [12**], we believe that both the native and recombinant strategies for CBP organism development merit investigation.

The utilization of cellulose by microorganisms involves a substantial set of fundamental phenomena beyond those associated with enzymatic hydrolysis of cellulose [12**], many of which are incompletely understood. Advances in understanding the fundamentals of microbial cellulose utilization will both enable and draw from advances in organism development for CBP.

Native cellulolytic strategy

Naturally occurring cellulolytic microorganisms are starting points for CBP organism development via the native

strategy, with anaerobes being of particular interest [12**]. The primary objective of such developments is to engineer product yields and titers to satisfy the requirements of an industrial process. Metabolic engineering of mixed-acid fermentations in relation to these objectives has been successful in the case of mesophilic, non-cellulolytic, enteric bacteria [16]. Far more limited work of this type has been undertaken with cellulolytic bacteria, primarily because of the absence of suitable gene-transfer techniques. Recent developments, however, appear to be removing this limitation for some organisms.

Among cellulolytic anaerobes, gene-transfer systems have been described for *Clostridium cellulolyticum* [17,18] and for *Clostridium thermocellum* [19*]. Electrotransformation (ET) protocols for these organisms, first described in 2000 for *C. cellulolyticum* and in 2004 for *C. thermocellum*, involve rather specialized conditions and, in the case of *C. thermocellum*, apparatus. ET-mediated transfer and expression of foreign genes has also been reported for *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* [20] and *Thermoanaerobacter-*

ium saccharolyticum [21,22], non-cellulolytic pentose-utilizing anaerobic thermophiles with substrate-utilizing capabilities that compliment those of *C. thermocellum* (which does not ferment pentoses). Efforts to engineer the end-product metabolism of cellulose-utilizing anaerobes are limited to the 2002 report of Guedon *et al.* [23], in which expression of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase resulted in increased growth, decreased production of lactate, and increased production of acetate and ethanol. In *T. saccharolyticum*, production of lactic acid has been completely eliminated by targeted gene knockout [24*] and elimination of acetic acid production has also recently been achieved (J Shaw, unpublished). ET efficiencies for *C. thermocellum* ($\sim 10^5$ transformants per experiment using replicative plasmids [19*]) appear high enough to allow similar targeted gene knockouts to be obtained in this organism.

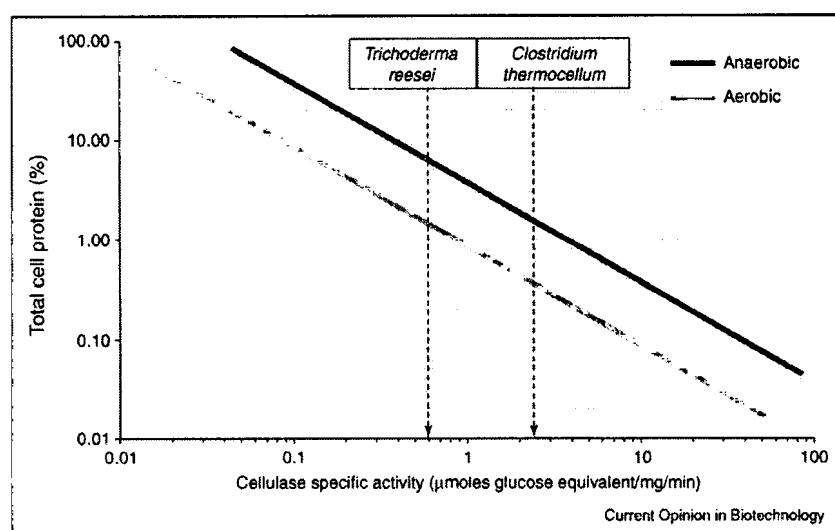
Product tolerance is a key property impacting the feasibility of CBP through the native cellulolytic strategy. Recent studies have been carried out to select and characterize ethanol-tolerant strains of *C. thermocellum* [25*]. Growth of a selected strain was found to occur at ethanol concentrations exceeding 60 g/L, a titer sufficient not to put thermophiles at a disadvantage relative to more conventional ethanol producers in the context of lignocellulose conversion [26]. Reported ethanol titers produced by *C. thermocellum*, as well as other thermophiles, are limited however to ≤ 26 g/L [12**]. We think it likely that the discrepancy between tolerance to added ethanol and the maximum titers produced can be resolved in the course of metabolic engineering to maximize ethanol

yields. Organic acids and their salts are more inhibitory than ethanol for both thermophiles (*T. thermosaccharolyticum* [27]) and *E. coli* [28], and elimination of organic acids has been shown to allow substantially higher neutral product titers in several instances [28] (J Pierce, personal communication) (P Soucaille, personal communication). In addition, titers have been brought to levels consistent with tolerance to added products through a sustained effort in the case of production of both ethanol [28] and 1,3-propanediol (J Pierce, personal communication) by *E. coli*.

Recombinant cellulolytic strategy

Non-cellulolytic microorganisms with desired product formation properties (e.g. high yield and titer) are starting points for CBP organism development by the recombinant cellulolytic strategy. The primary objective of such developments is to engineer a heterologous cellulase system that enables growth and fermentation on pre-treated lignocellulose. Given the complexity and effort required to achieve this objective, it is appropriate to examine its feasibility. On the basis of the sufficiency of expression of growth-enabling heterologous enzymes [29*], the level of enzyme expression required to achieve a specified growth rate may be calculated as a function of enzyme specific activity. For growth enabled by cellulase with specific activities in the range available, required expression levels are well within the range reported in the literature (1–10% of cellular protein; Figure 3) [30,31]. Protein expression at this level has been reported in both *Saccharomyces cerevisiae* [30] and *E. coli* [32], although not to date for active cellulases. The feasibility of CBP

Figure 3



Required protein expression to achieve growth on cellulose in relation to cellulase specific activity. Cellulase requirements are calculated using the following expression: percentage cell protein = $\{(\mu/Y_{X/S})/[(U/mg \text{ cellulase}) \times (0.00018 \text{ g}/\mu\text{mol}) \times (60 \text{ min/h})]\} \times (1 \text{ g cells}/0.5 \text{ g cell protein})$, where μ = specific growth rate on the substrate (0.02 h^{-1}) and $Y_{X/S}$ = cell yield on glucose ($0.45 \text{ g cells/g substrate}$ for aerobic growth and $0.1 \text{ g cells/g substrate}$ for anaerobic growth). Data for *T. reesei* were obtained from [57] and for *C. thermocellum* from [58].

through the recombinant approach is further supported by models that combine fermentation bioenergetics and the kinetics of pretreated substrate hydrolysis with declining reactivity over the course of the reaction [33]. It is likely that evolutionary approaches will be valuable in augmenting the rational design of heterologous cellulase expression systems [34*].

To date, the heterologous production of cellulases has been pursued primarily with bacterial hosts producing ethanol at high yield (engineered strains of *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* and *Zymomonas mobilis*) and the yeast *S. cerevisiae*. Cellulase expression in strains of *K. oxytoca* resulted in increased hydrolysis yields (but not growth without added cellulase) for microcrystalline cellulose (Avicel, FMC, Philadelphia), and anaerobic growth on amorphous cellulose [35,36]. Although dozens of saccharolytic enzymes have been functionally expressed in *S. cerevisiae* [12**], anaerobic growth on cellulose as the result of such expression has not been definitively demonstrated. Recently, Kondo and coworkers expressed cellulases [37**], xylanases [38], and amylases [39] on the cell surface of different *S. cerevisiae* strains. High cell density suspensions of the recombinant strains fermented amorphous cellulose, raw starch, and birchwood xylan to ethanol with yields of 0.45, 0.44 and 0.3 g ethanol/g substrate, respectively. Several cellobiohydrolases have been functionally expressed in *S. cerevisiae* [40–44]. The specific activity of recombinant cellobiohydrolase was shown to be comparable to that of the native enzyme [43] (R den Haan *et al.*, unpublished), suggesting that increased expression levels should be a target for further research.

As might be expected, conferring the ability to grow on non-native substrates as a result of heterologous enzyme expression is more advanced for soluble substrates than for cellulose. Strains of *E. coli* [18,28], *S. cerevisiae* [45], and *Z. mobilis* [46] able to ferment xylose to ethanol were developed in the 1990s. More recently, several strains of *S. cerevisiae* with expanded substrate utilization capability have been developed: a xylose-isomerase-expressing strain that grows well (maximum specific growth rate $\mu_{\max} = 0.09 \text{ h}^{-1}$) on xylose [47*]; a strain expressing the genes of the bacterial L-arabinose utilization pathway and overexpressing the yeast galactose permease allowing the fermentation of arabinose [48]; and a β -glucosidase-expressing strain able to grow anaerobically on cellobiose at rates comparable to glucose [29]. Strains of *S. cerevisiae* able to ferment starch were developed in earlier work and achieve impressive yields and titers without added amylase [49].

Selected fundamentals impacting the feasibility of CBP

Experimental evidence supporting the feasibility of CBP comes from a recent study of cellulose utilization by *C. thermocellum* [50**]. It was shown in this study that the average degree of polymerization of cellulose hydrolysis

products taken up by *C. thermocellum* is about four glucose units; thus, the mechanism of cellulose hydrolysis differs from that of fungal cellulase systems for which cellobiose is the primary hydrolysis product. Both physiological studies and experiments with ^{14}C -cellulose indicate that bioenergetic benefits specific to growth on cellulose are realized as a result of the efficiency of oligosaccharide uptake combined with intracellular phosphorolytic cleavage of β -glucosidic bonds [51], and that these benefits exceed the bioenergetic cost of cellulase synthesis [52]. This work provides insight into how naturally occurring cellulolytic microorganisms are able to achieve rapid growth on cellulose (e.g. $\mu_{\max} = 0.16 \text{ h}^{-1}$ on crystalline cellulose [12**]) in spite of the modest ATP available from anaerobic fermentation.

A further phenomenon impacting the potential feasibility and performance of CBP is enzyme–microbe synergy — that is, the possibility that the effectiveness of the cellulase is enhanced when it is present as cellulose–enzyme–microbe (CEM) complexes as compared with cellulose–enzyme (CE) complexes. CEM complexes have a central role in microbial cellulose hydrolysis by anaerobic microbes [12**], whereas cellulose hydrolysis in envisioned industrial processes featuring dedicated cellulase production is carried out exclusively by CE complexes that do not involve the presence of a living, cellulolytic microorganism. In observations dating back to 1956, cellulase pioneers Reese and Mandels [53,54] observed that rates of hydrolysis are substantially higher when mediated by growing cellulolytic cultures as compared to enzymatic preparations, even under optimized conditions. Preliminary work underway in the Lynd laboratory indicates that cellulase-specific hydrolysis rates are several fold higher for *C. thermocellum* cultures than for cell-free cellulase preparations (Y Lu *et al.*, unpublished). Definitive quantitative evaluation of enzyme–microbe synergy is an important objective for future research, and could provide further evidence supporting the desirability of CBP.

Although studies aimed at understanding the fundamentals of microbial cellulose utilization have necessarily focused on naturally occurring cellulolytic bacteria, insights from such studies are of importance to both the native and recombinant organism development strategies. In particular, it may be highly desirable, and perhaps necessary, to incorporate features of naturally occurring cellulolytic microbes (e.g. high specific activity complexed cellulase systems, uptake and phosphorolytic cleavage of oligosaccharides, and adherence of cells to cellulose) when developing recombinant cellulolytic microbes for use in CBP.

Conclusions

CBP has the potential to provide the lowest cost route for biological conversion of cellulosic biomass to fuels and

other products in processes featuring hydrolysis by enzymes and/or microorganisms. To realize this potential, microorganisms must be developed that utilize cellulose and other fermentable compounds available from pre-treated biomass with high rate and high conversion, and which produce a desired product at high yield and titer. Both of these capabilities are possessed by known microorganisms, but to date have not been combined in a single microorganism or microbial system. Several lines of evidence support the feasibility of such combinations using biotechnology, which could proceed through two distinct strategies each with several potential host organisms. Success in this endeavor could provide a leap forward with respect to the low-cost conversion of renewable biomass into fuels as well as a variety of industrial chemicals, thereby realizing societal benefits.

Acknowledgements

This work was partially supported by grant DE-FG02ER15350 from the Department of Energy, grant 60NANB1D0064 from the National Institute of Standards and Technology, and agreement XCO-3-33033-01 from the Department of Energy.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Hoffert MI, Caldeira K, Benford G, Criswell DR, Green C, Herzog H, Jain AK, Khesghi HS, Lackner KS, Lewis JS *et al.*: **Advanced technology paths to global climate stability: energy for a greenhouse planet.** *Science* 2002, **298**:981-987.
 2. Greene N, Celik FE, Dale B, Jackson M, Jayawardhana K, Jin H, Larson ED, Laser M, Lynd L, MacKenzie D *et al.*: **Growing energy: how biofuels can help end America's oil dependence.** Natural Resources Defense Council, New York NY; 2004. URL: <http://www.nrdc.org/air/energy/biofuels/contents.asp>.
 - A broad perspective on the rationale and possibilities of energy production from biomass.
 3. Ghirardi ML, King PW, Posewitz MC, Ching Maness P, Federov A, Kim K, Cohen J, Schulten K, Seibert M: **Approaches to developing biological H₂-photoproducing organisms and processes.** *Biochem Soc Trans* 2005, **33**:70-72.
 4. O'Neill HM, Greenbaum E: **Spectroscopy and photochemistry of spinach photosystem 1 entrapped and stabilized in hybrid borosilicate glass.** *Chem Mater*: in press.
 5. Bond DR, Lovley DR: **Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:1548-1555.
 - Following an early paper in *Science*, a pioneering contribution melding microbiology and electrochemistry.
 6. Held M, Schmid A, van Beilan JB, Witholt B: **Biocatalysis: biological systems for the production of chemicals.** *Pure Appl Chem* 2000, **72**:1337-1343.
 7. Lynd LR, Gerngross TU, Wyman CE: **Biocommodity engineering.** *Biotechnol Prog* 1999, **15**:777-793.
 8. Delucchi MA: **Emissions of greenhouse gases from the use of transportation fuels and electricity. Vol. 1.** Argonne National Laboratory, Argonne, IL; 1991.
 9. Lynd LR, Cushman JH, Nichols RJ, Wyman CE: **Fuel ethanol from cellulosic biomass.** *Science* 1991, **251**:1318-1323.
 10. Wang MQ: **The greenhouse gases, regulated emissions, and energy use in transportation (GREET) model.** Argonne National Laboratory, Argonne, IL; 2002. URL: <http://greet.anl.gov>.
 11. Lynd LR, Wang MQ: **A product-nonspecific framework for evaluating the potential of biomass-based products to displace fossil fuels.** *J Ind Ecol* 2004, **7**:17-32.
 - Definitively demonstrates the potential of some (although not all) biomass-based processes to achieve large fossil fuel displacements and indicates important feedstock and process features impacting such displacement.
 12. Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS: **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**:506-577.
 - Comprehensive review of fundamental and applied work related to CBP before 2002; distinguishes microbial and enzymatic paradigms.
 13. National Renewable Energy Laboratory: **National Renewable Energy Laboratory 2003 Research Review.** 2004. NREL/BR-840-36178, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
 14. Greer D: **Creating cellulosic ethanol. Spinning straw into fuel.** *Biocycle* 2005, **46**:61-65.
 - Recent summary of activities and opportunities related to cellulosic ethanol, including reductions in the cost of cellulase production.
 15. Energy Information Administration: **US Petroleum Prices.** Energy Information Administration, United States Department of Energy, Washington DC; 2005. URL: <http://www.eia.doe.gov/>.
 16. Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, Causey TB, Martinez A, Morales F, Saleh A, Underwood SA, Yomano LP, York SW *et al.*: **Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production.** *Biotechnol Prog* 1999, **15**:855-866.
 17. Jennert KCB, Tardiff C, Young DI, Young M: **Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319.** *Microbiol* 2000, **146**:3071-3080.
 18. Tardiff C, Maamar H, Balfin M, Belaich JP: **Electrotransformation studies in *Clostridium cellulolyticum*.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001, **16**:1-4.
 19. Tyurin M, Desai SG, Lynd LR: **Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:883-890.
 - First report of electrotransformation of this actively cellulolytic microbe, a potentially attractive starting point for organism development for CBP.
 20. Klapatch TR, Guerinot ML, Lynd LR: **Electrotransformation of *Clostridium thermosaccharolyticum*.** *J Ind Microbiol* 1996, **16**:342-347.
 21. Mai V, Lorenz WW, Wiegel J: **Transformation of *Thermanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485 with plasmid pK1M1 conferring kanamycin resistance.** *FEMS Microbiol Lett* 1997, **148**:163-167.
 22. Mai V, Wiegel J: **Advances in development of a genetic system for *Thermanaerobacterium* spp.: expression of genes encoding hydrolytic enzymes, development of a second shuttle vector, and integration of genes into the chromosome.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:4817-4821.
 23. Guedon E, Desvaux M, Petitdemange H: **Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:53-58.
 24. Desai SG, Guerinot ML, Lynd LR: **Cloning of the L-lactate dehydrogenase gene and elimination of lactic acid production via gene knockout in *Thermanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, **65**:600-605.
 - The first example of engineering end product metabolism in a thermophilic anaerobe.
 25. Strobel HP, Lynn B: **Proteomic analysis of ethanol sensitivity in *Clostridium thermocellum*.** In *Proceeding of the National Meeting of the American Society of Microbiology May 23-27th 2004*. New Orleans, LA. Abstract number 0-094.
 - High tolerance of adapted strains to added ethanol is demonstrated.
 26. Lynd LR: **Overview and evaluation of fuel ethanol production from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy.** *Annu Rev Energy Environ* 1996, **21**:403-465.
 27. Lynd LR, Baskaran S, Casten S: **Salt accumulation associated with KOH added for pH control, and not ethanol, limits growth of *Thermanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8 at**

- elevated feed xylose concentrations in continuous culture.** *Biotechnol Prog* 2001, **17**:118-125.
28. Ingram LO, Gomez PF, Lai Z, Moniruzzaman M, Wood BE, Yomano LP, York SW: **Metabolic engineering of bacteria for ethanol production.** *Biotechnol Bioeng* 1998, **58**:204-234.
 29. McBride JE, Zeitsman JJ, Van Zyl WH, Lynd LR: **Utilization of cellobiose by recombinant β -glucosidase-expressing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evaluation of the sufficiency of expression.** *Enzyme Microb Technol* 2005, **37**:93-101.
- Demonstrated anaerobic growth on a non-native substrate at rates comparable to native substrates.
30. Park EH, Shin YM, Lim YY, Kwon TH, Kim DH, Yang MS: **Expression of glucose oxidase by using recombinant yeast.** *J Biotechnol* 2000, **81**:35-44.
 31. Romanos MA, Makoff AJ, Fairweather NF, Beesley KM, Slater DE, Rayment FB, Payne MM, Clare JJ: **Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**:1461-1467.
 32. Hasenwinkle D, Jervis E, Kops O, Liu C, Lesnicki G, Haynes CA, Kilburn DG: **Very high-level production and export in *Escherichia coli* of a cellulose binding domain for use in a generic secretion-affinity fusion system.** *Biotechnol Bioeng* 1997, **55**:854-863.
 33. van Walsum P, Lynd LR: **Allocation of ATP to synthesis of cells and hydrolytic enzymes in cellulolytic fermentative microorganisms: bioenergetics, kinetics, and bioprocessing.** *Biotechnol Bioeng* 1998, **58**:316-320.
 34. Fan Z, McBride JE, van Zyl WH, Lynd LR: **A theoretical analysis of selection-based strain improvement for microorganisms with growth dependent upon extracytoplasmic enzymes.** *Biotechnol Bioeng*: in press.
- Analysis supports the feasibility of selection-based improvement of strains producing extracellular enzymes.
35. Zhou SF, Davis C, Ingram LO: **Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CelY (celY) and CelZ (celZ) in ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:6-14.
 36. Zhou SF, Ingram LO: **Simultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant *Klebsiella oxytoca* SZ21 without supplemental cellulase.** *Biotechnol Lett* 2001, **23**:1455-1462.
 37. Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H, Kondo A: **Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:1207-1212.
- Together with two other studies [38,39], this work demonstrates that enzymes expressed by *S. cerevisiae* can achieve significant hydrolysis of a variety of biomass-derived insoluble substrates.
38. Katahira S, Fujita Y, Mizuike A, Fukuda H, Kondo A: **Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:5407-5414.
 39. Shigechi H, Koh J, Fujita Y, Matsumoto T, Bito Y, Ueda M, Satoh E, Fukuda H, Kondo A: **Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:5037-5040.
 40. Penttilä ME, André L, Lehtovaara P, Bialek M, Teeri TT, Knowles JKC: **Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Gene* 1988, **63**:103-112.
 41. Zurbriggen B, Bailey MJ, Penttilä ME, Poutanen K, Linko M: **Pilot scale production of a heterologous *Trichoderma reesei* cellulase by *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biotechnol* 1990, **13**:267-278.
 42. Bailey MJ, Siika-aho M, Valkeajärvi A, Penttilä ME: **Hydrolytic properties of two cellulases of *Trichoderma reesei* expressed in yeast.** *Biotechnol Appl Biochem* 1993, **17**:65-76.
 43. Takada G, Kawaguchi T, Sumitani J, Arai M: **Expression of *Aspergillus aculeatus* no. F-50 cellobiohydrolase I (cbhl) and β -glucosidase 1 (bgl1) genes by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biosci Biotechnol Biochem* 1998, **62**:1615-1618.
 44. Hong J, Tamaki H, Yamamoto K, Kumagai H: **Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **63**:42-50.
 45. Ho NWY, Chen Z, Brainard A, Sedlak M: **Successful design and development of genetically-engineered *Saccharomyces* yeasts for effective cofermentation of glucose and xylose from cellulosic biomass to fuel ethanol.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1999, **65**:164-192.
 46. Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelstein M, Picataggio S: **Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*.** *Science* 1995, **267**:240-243.
 47. Kuyper M, Hartog MMP, Toirkens MJ, Almering MJH, Winkler AA, Van Dijken JP, Pronk JT: **Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation.** *FEMS Yeast Res* 2005, **5**:399-409.
- Definitive demonstration of anaerobic growth on xylose without the formation of xylitol.
48. Becker J, Boles E: **A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:4144-4150.
 49. Birol G, Onsan ZI, Kirdar B, Oliver SG: **Ethanol production and fermentation characteristics of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains grown on starch.** *Enzyme Microb Technol* 1998, **22**:672-677.
 50. Zhang Y-HP, Lynd LR: **Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:7321-7325.
- Drawing on earlier work [51,52,58], this study shows that bioenergetic benefits specific to cellulose utilization are larger than the cost of cellulase synthesis, and that cellooligosaccharides are the primary hydrolysis products.
51. Zhang Y-HP, Lynd LR: **Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellooligosaccharides and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thermocellum*.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:1563-1569.
 52. Zhang Y-HP, Lynd LR: **Regulation of cellulase synthesis in batch and continuous cultures of *Clostridium thermocellum*.** *J Bacteriol* 2005, **187**:99-106.
 53. Reese E: **A microbiological process report: enzymatic hydrolysis of cellulose.** *Appl Microbiol* 1956, **4**:39-45.
 54. Reese ET, Mandels M: **Enzymatic degradation.** In *Cellulose and Cellulose Derivatives*. Edited by Bikales NM, Segal L. New York, USA: Wiley Interscience; 1971:1079-1094.
 55. Wooley R, Ruth M, Sheehan J, Ibsen K, Majdeski H, Galvez A: **Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis: current and futuristic scenarios.** NREL/TP-580-26157, 1999, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
 56. Aden A, Ruth M, Ibsen K, Jechura J, Neeves K, Sheehan J, Wallace B, Montague L, Slayton A, Lukas J: **Lignocellulosic ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis.** NREL TP-510-32438. 2002, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
 57. Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, Hermann A, Hayn M: **Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale.** *Bioresour Technol* 1991, **36**:51-65.
 58. Zhang YH, Lynd LR: **Quantification of cell and cellulase mass concentrations during anaerobic cellulose fermentation: development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based method with application to *Clostridium thermocellum* batch cultures.** *Anal Chem* 2003, **75**:219-227.