



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



Organización y
Digitalización CSA Ltda

DYN
OK



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-88402

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "SISTEMAS Y METODOS PARA PRODUCIR BIOCOMBUSTIBLES Y MATERIALES
RELACIONADOS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12P 7/06

71. SOLICITANTE UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS

DOMICILIO BOSTON, ESTADO DE MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P.53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 25 AGO. 2008

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-088402- -00000-0000

Fecha: 2008-08-25 16:30:41 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 58

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

24 Agosto 2008

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS

Dirección: 225 Franklin Street, 12th Floor,
Boston, MA 02110, Estados Unidos de
América.

Nacionalidad o Domicilio: Boston, Estado
de Massachusetts, Estados Unidos de
América.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: LESCHINE, Susan y WARNICK, Thomas, A.

Dirección: 60 Juggler Meadow Road, Leverett, MA 01054 y 226 Hadley Road,
Sunderland, MA 01375.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/002334

Fecha: 26/01/07

Publicación Internacional No. WO 2007/089677 A2

Fecha: 09/08/07

⑥

Título (54) "SISTEMAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR BIOCOMBUSTIBLES Y MATERIALES RELACIONADOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12P 7/06

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

27/01/06

(31) Número de Solicitud

60/762,813

⑨

Comprobante de Pago No. 08-65,885

Fecha: Agosto 19 de 2008

mfr

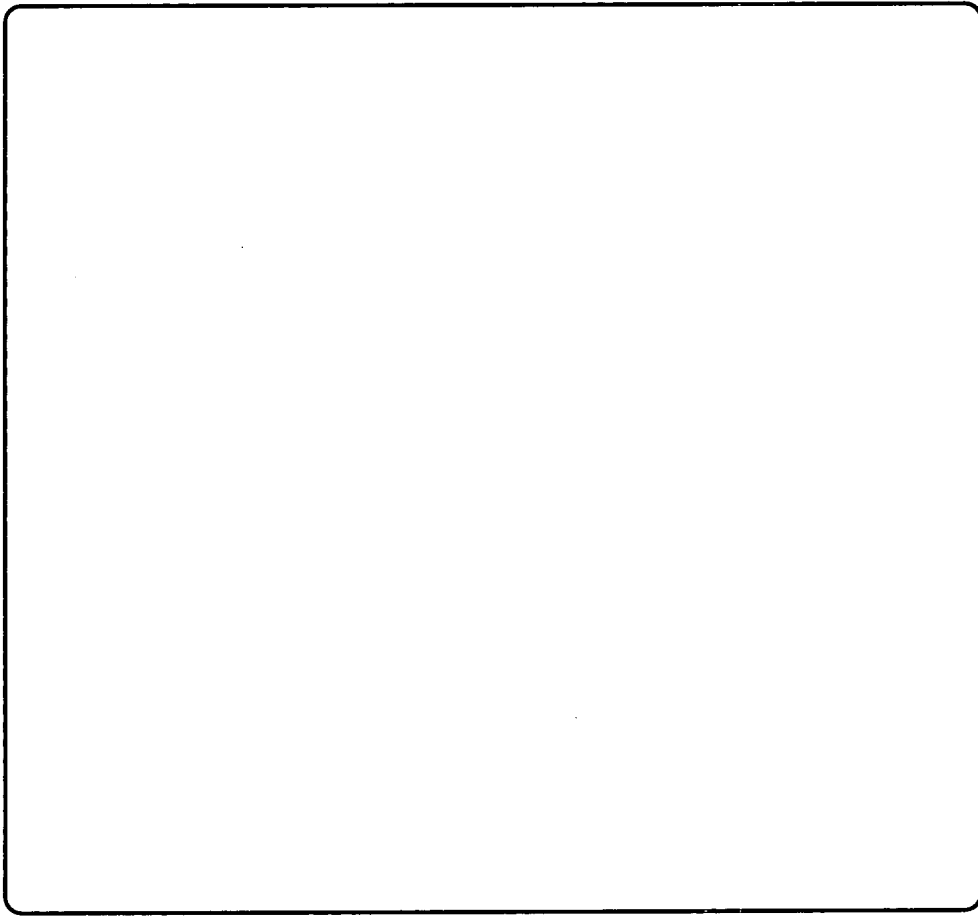
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, Dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Publicación.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA: 

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 65,885
FECHA : AGOSTO 19 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-088402- -00000-0000

Fecha: 2008-08-25 16:30:41 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios. 58

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORERA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	4891725	19/08/2008	11,400,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12P 7/06	
(22) Fecha de solicitud: 25-08-08		(71) Solicitante(s) UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 60/762,813	(32) Fecha 27-01-06	(33) País US
		(72) Inventor(es) LESCHINE, Susan y WARNICK, Thomas, A.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 27-08-08		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 09/08/07	
Fecha de presentación de la solicitud: 26/01/07		N° publicación: WO 2007/089677 A2	
No. de solicitud PCT/US2007/002334			
(54) Título: "SISTEMAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR BIOCOMBUSTIBLES Y MATERIALES RELACIONADOS"			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un método para hacer un combustible a partir de material de biomasa, el método comprende:

- proveer un material de biomasa que comprende un carbohidrato de alto peso molecular;
- hidrolizar el material de biomasa para proveer un material de biomasa hidrolizado;
- combinar el material de biomasa liofilizado con células de *Clostridium phytofermentans* en un medio, en donde una concentración de carbohidratos en el medio es mayor de 20 mM; y
- fermentar el material de biomasa hidrolizado bajo condiciones y por un tiepo suficiente para producir un combustible.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 25-08-08

(51) Clasificación Internacional : C12P 7/06

(71) Solicitante(s) **UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS**

(72) Inventor(es) **LESCHINE, Susan y WARNICK, Thomas, A.**

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**
60/762,813

(32) **Fecha**
27-01-06

(33) **País**
US

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 27-08-08

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **26-01-07**

No. De solicitud **PCT/US2007/002334**

(87) Publicación internacional

Fecha: **09-08-07**

N° publicación: **WO 2007/089677 A2**

(54) Titulo: **"SISTEMAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR BIOCOMBUSTIBLES Y MATERIALES RELACIONADOS"**

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO****DIVISION DE NUEVAS CREACIONES****Industria y Comercio****TARJETA ARCHIVO TEMATICO**

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION

PCT X

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 25-08-08

(51) Clasificación Internacional: C12P 7/06

(71) Solicitante(s) **UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS**(72) Inventor(es) **LESCHINE, Susan y WARNICK, Thomas, A.**(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/762,813	27-01-06	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-08-08

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 26-01-07

No. de solicitud **PCT/US2007/002334**

(87) Publicación internacional:

Fecha: 09-08-07

No. Publicación: **WO 2007/089677 A2****FIGURA CARACTERISTICA****6 x 6 cm**(54) Título: **"SISTEMAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR BIOCOMBUSTIBLES Y MATERIALES RELACIONADOS"**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

Un método para hacer un combustible a partir de material de biomasa, el método comprende:

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

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

combinar el material de biomasa liofilizado con células de *Clostridium phytofermentans* en un medio, en donde una concentración de carbohidratos en el

medio es mayor de 20 mM; y

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 August 2007 (09.08.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/089677 A2

- (51) International Patent Classification:
C12P 7/06 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2007/002334
- (22) International Filing Date: 26 January 2007 (26.01.2007)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/762,813 27 January 2006 (27.01.2006) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS** [US/US]; 225 Franklin Street, 12th Floor, Boston, MA 02110 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **LESCHINE, Susan** [US/US]; 60 Juggler Meadow Road, Leverett, MA 01054 (US). **WARNICK, Thomas, A.** [US/US]; 226 Hadley Road, Sunderland, MA 01375 (US).
- (74) Agent: **GARCIA, Todd, E.**; Fish & Richardson P.C., P.O. Box 1022, Minneapolis, MN 55440-1022 (US).

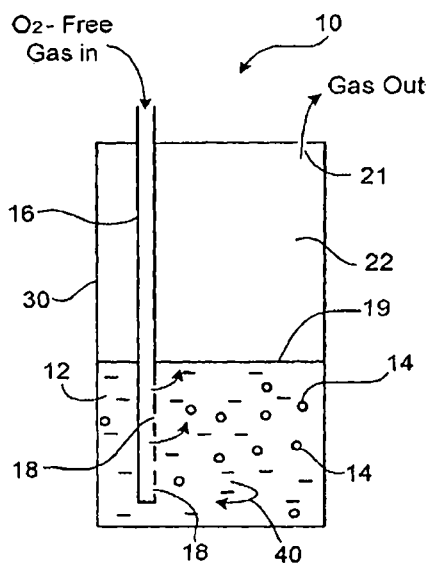
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SYSTEMS AND METHODS FOR PRODUCING BIOFUELS AND RELATED MATERIALS



(57) Abstract: *Clostridium phytofermentans* cells (American Type Culture Collection 700394^T) and all other strains of the species can ferment materials such as biomass into useful products and coproducts, such as ethanol, hydrogen and organic acids. Compositions that include *Clostridium phytofermentans* are also disclosed.

WO 2007/089677 A2

**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 700394¹) 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 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 dilación 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, cascos de arroz, bagaso, 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 ser disperses en un medio, 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 las especies *Clostridium phytofermentans*, que pueden ser derivadas de la cepa **ISDg^T** o aisladas ceparadamente. 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 poseería todas, o casi todas, de estas propiedades de fermentación. Las cepas de *Clostridium phytofermentans* pueden ser aislados 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 amu. 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, bagaso, 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 pretratado 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 baje 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 convenientemente y directamente 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* BKMFI 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

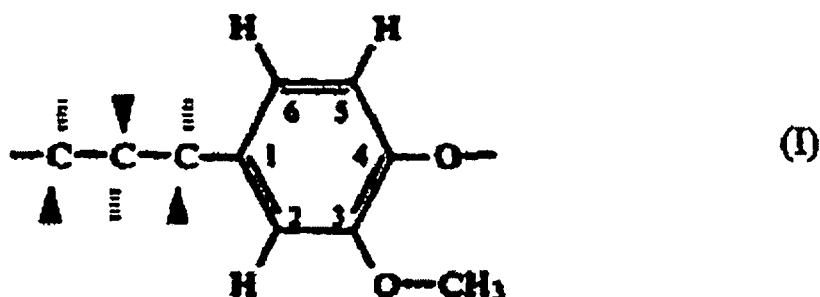
la velocidad de descomposición y fermentación de la celulosa, u otros carbohidratos de alto peso molecular.

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 codiciadas 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 vírgen, 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, bagaso, 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-aminobenzoico, 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 genralmente, 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 fórmic, 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).

PRODUCCION 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 Brönsted (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 extractos de banda cinta 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 encimas dentro del fermentador. Se deja proceder la fermentación mientras se busbuja 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-destiladno 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, urea, 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 cargada 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 remojar 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, 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 especios en la secuencia fueorn 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 improcedente 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 a partir de material de biomasa, el método comprende:

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

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

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

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

2. El método de la reivindicación 1, en donde el combustible comprende un alcohol seleccionado del grupo que consiste de etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, y mezclas de los mismos.

3. El método de la reivindicación 1, en donde el material de biomasa es hidrolizado mediante el tratamiento con un ácido.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el material de biomasa es hidrolizado mediante el tratamiento con una enzima o una mezcla de enzimas.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el material de biomasa es hidrolizado mediante tratamiento con un ácido, seguido por el tratamiento con una enzima.

6. El método de la reivindicación 1, en donde al material de biomasa se le reduce el tamaño antes de hidrolizar.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el paso de hidrólisis incluye pretratamiento con ácido en una unidad de acidificación, seguida por deshidratación.

8. Una planta de combustible que comprende:

una unidad de hidrólisis configurada para hidrolizar un material de biomasa que comprende un carbohidrato de alto peso molecular; y

un fermentador configurado para albergar un medio y que comprende células de *Clostridium phytofermentans* dispersas allí.

9. La planta de combustible de la reivindicación 8, en donde el fermentador configurado para albergar el medio y que comprende *Clostridium phytofermentans*, comprende además uno o más microbios diferentes de *Clostridium phytofermentans*.

10. La planta de combustible de la reivindicación 9, en donde el uno o más microbios diferentes comprenden una o más levaduras.

11. La planta de combustible de la reivindicación 9, en donde el uno o más microbios diferentes comprenden una o más bacterias.

12. La planta de combustible de la reivindicación 11, en donde la una o más bacterias comprenden una cualquiera o más cepas de *Zymomonas mobilis*.

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

combinar células de *Clostridium phytofermentans* y un material lignocelulósico en un medio; y

fermentar el material lignocelulósico bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir un combustible.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el material lignocelulósico se selecciona del grupo que consiste de madera, pulpa de madera, lodos de preparación del papel, corrientes de desperdicio de la pulpa del papel, tablero de aglomerado, pastos, vainas de arroz, bagaso, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, leña de maíz, granos destiladores, hojas, paja de trigo, pelos de coco, algas, pasto varilla, *Miscanthus*, plantas legumbres, sorgo, cosechas de biomasa (*Crambe*), y mezclas de los mismos.

15. El método de la reivindicación 13, en donde el medio tiene disuelto en él, constituyentes seleccionados del grupo que consiste de factores de crecimiento, minerales, surfactantes, agentes quelantes, y mezclas de los mismos.

16. El método de la reivindicación 13, en donde las condiciones incluyen mantener el medio a una temperatura de menos de aproximadamente 45°C.

17. El método de la reivindicación 13, en donde las condiciones incluyen mantener el pH del medio por debajo de aproximadamente 9.5.

18. El método de la reivindicación 13, en donde el combustible es etanol, y en donde las condiciones incluyen mantener una concentración del etanol menor de aproximadamente 1 M.

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

combinar células de *Clostridium phytofermentans* y un material que comprende un carbohidrato en un medio, en donde una concentración del carbohidrato en el medio es mayor de 40 mM; y

fermentar el material que comprende el carbohidrato bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir un combustible.

20. El método de la reivindicación 19, en donde la concentración es mayor de 50 mM.

21. El método de la reivindicación 20, en donde la concentración es mayor de 100 mM.

22. El método de la reivindicación 21, en donde la concentración es menor de 2000 mM.

23. El método de la reivindicación 19, en donde el material comprende un carbohidrato de bajo peso molecular que tiene un peso molecular de menos de 1,000.

24. El método de la reivindicación 23, en donde el carbohidrato de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste de arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, manosa, ribosa, xilosa, y mezclas de los mismos.

25. El método de la reivindicación 19, en donde el material comprende un carbohidrato de alto peso molecular que tiene un peso molecular mayor de 1,000.

26. El método de la reivindicación 25, en donde el carbohidrato de alto peso molecular se selecciona del grupo que consiste de celulosa, celulosa microcristalina, ácido poligalacturónico, pectina, almidón, xilano, y mezclas de los mismos.
27. El método de la reivindicación 19, en donde el material es pulverizado de forma que tiene un tamaño de partícula entre aproximadamente 5 micras y 50 micras.
28. El método de la reivindicación 19, en donde el material comprende una mezcla de dos o más carbohidratos.
29. El método de la reivindicación 19, en donde el material comprende un material celulósico o lignocelulósico.
30. El método de la reivindicación 29, en donde el material celulósico o lignocelulósico se selecciona del grupo que consiste de papel polirecubierto, papel Kraft, lodo de preparación del papel, madera, pulpa de madera, granos destiladores, tablero de aglomerado, hojas, pastos, recortes de pasto, vainas de arroz hulls, bagaso, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, leña de maíz, paja de trigo, pelos de coco, algas, pasto varilla, crambe, cosechas de biomasa, y mezclas de las mismas.
31. El método de la reivindicación 19, en donde el material comprende un carbohidrato de bajo peso molecular formado por rompimiento de un carbohidrato de alto peso molecular.
32. El método de la reivindicación 31, en donde el rompimiento incluye usar una enzima.

33. El método de la reivindicación 32, en donde la enzima se selecciona del grupo que consiste de endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas (CBH), β -glucosidasa, glicosido hidrolasas, glicosiltransferasas, liasas, y esterases activas contra componentes de hemicelulosa, pectina, y almidón, y mezclas de las mismas.

34. El método de la reivindicación 19, en donde el material es sustancialmente libre de lignina.

35. Un método que comprende:

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

36. El método de la reivindicación 35, en donde la fermentación se realiza bajo condiciones y por un tiempo suficiente para producir un combustible.

37. El método de la reivindicación 35, en donde el segundo microbio comprende una levadura.

38. El método de la reivindicación 35, en donde el segundo microbio comprende una bacteria diferente a *Clostridium phytofermentans*.

39. Una composición que comprende *Clostridium phytofermentans* y un segundo microbio.

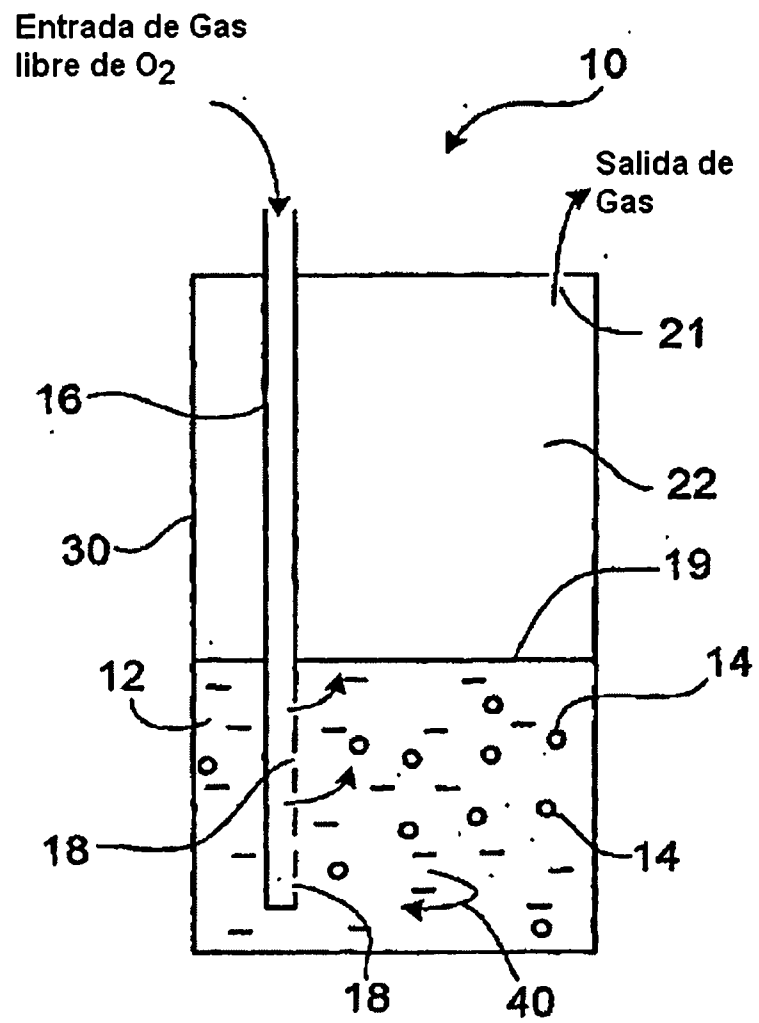


FIG. 1

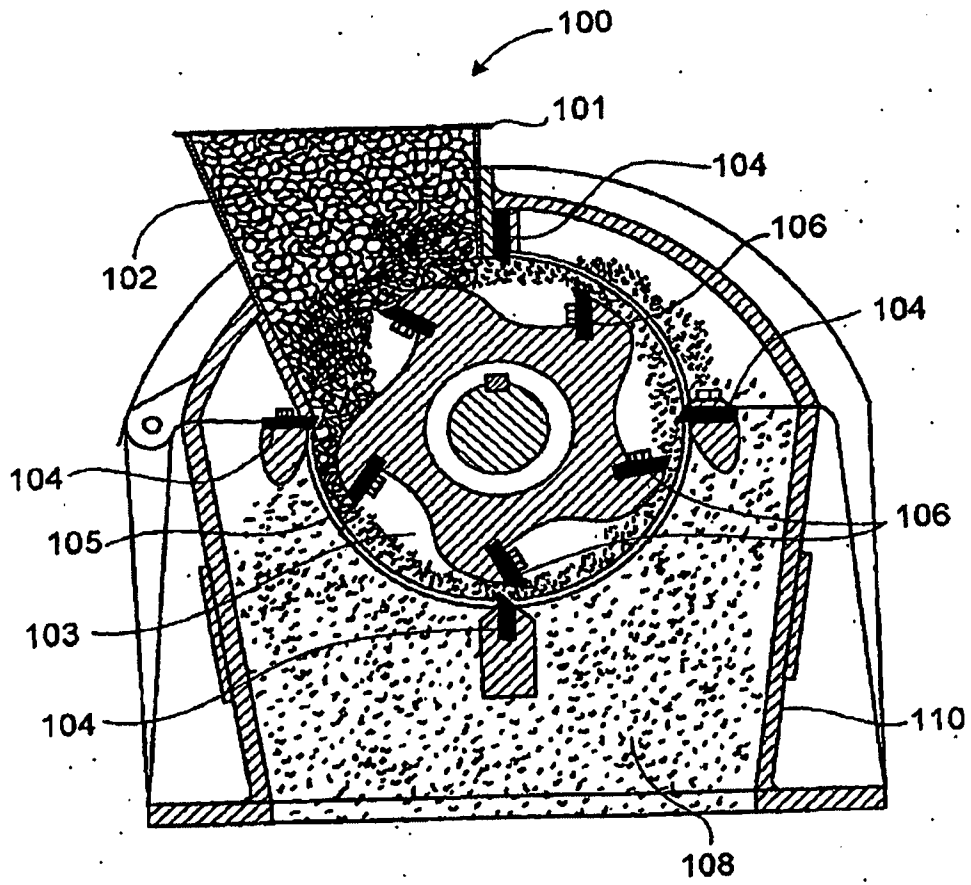


FIG. 2

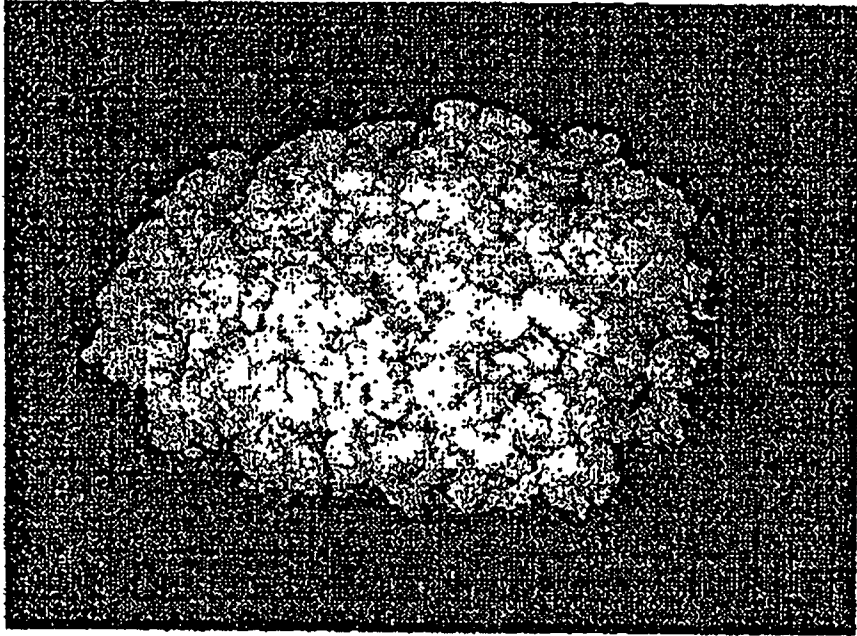


FIG. 3A



FIG. 3B

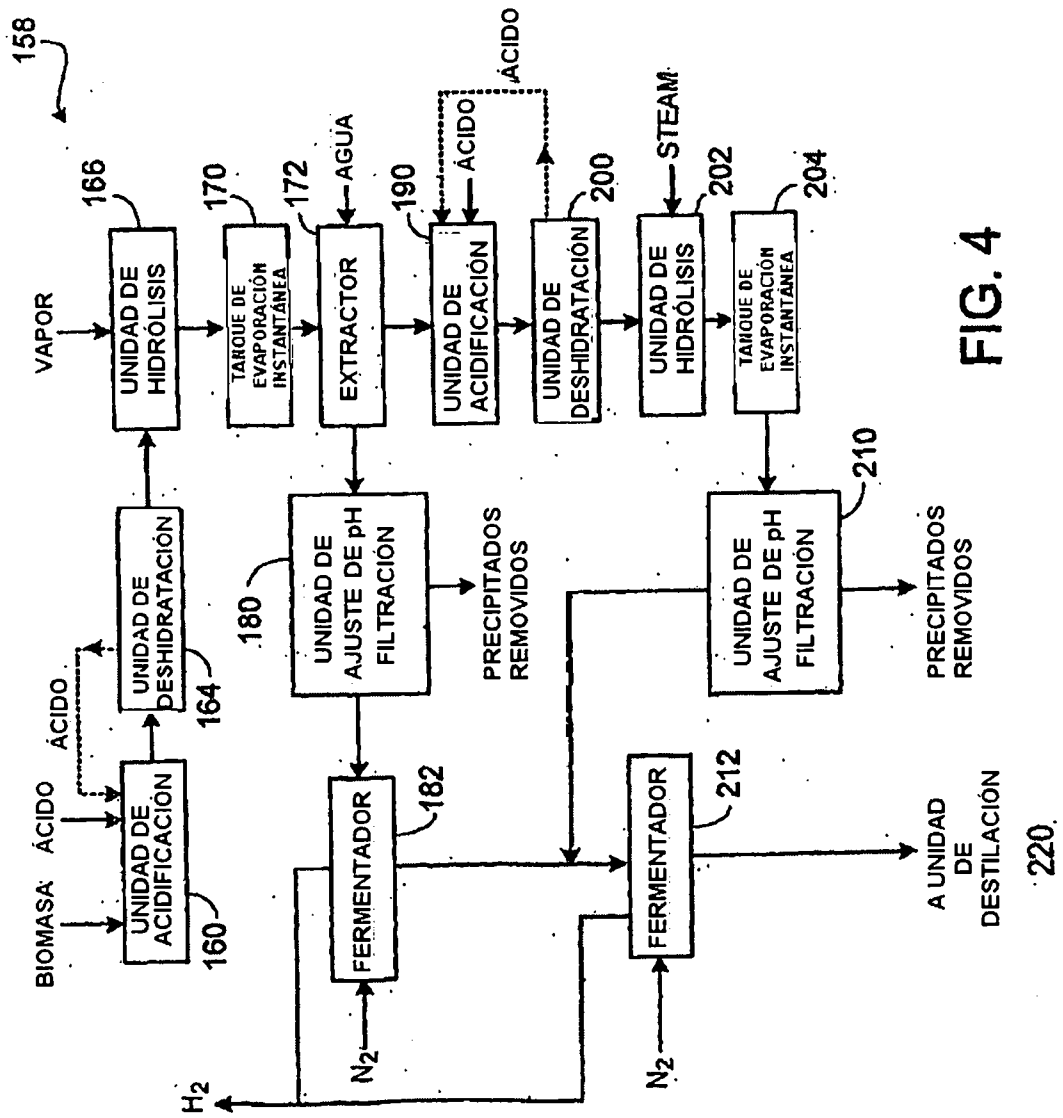


FIG. 4

58

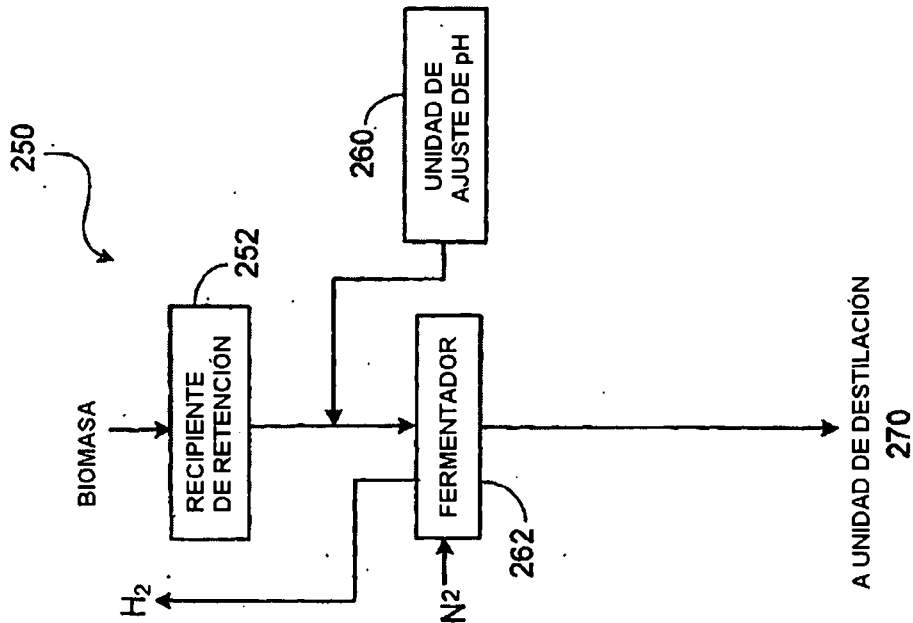


FIG. 5B

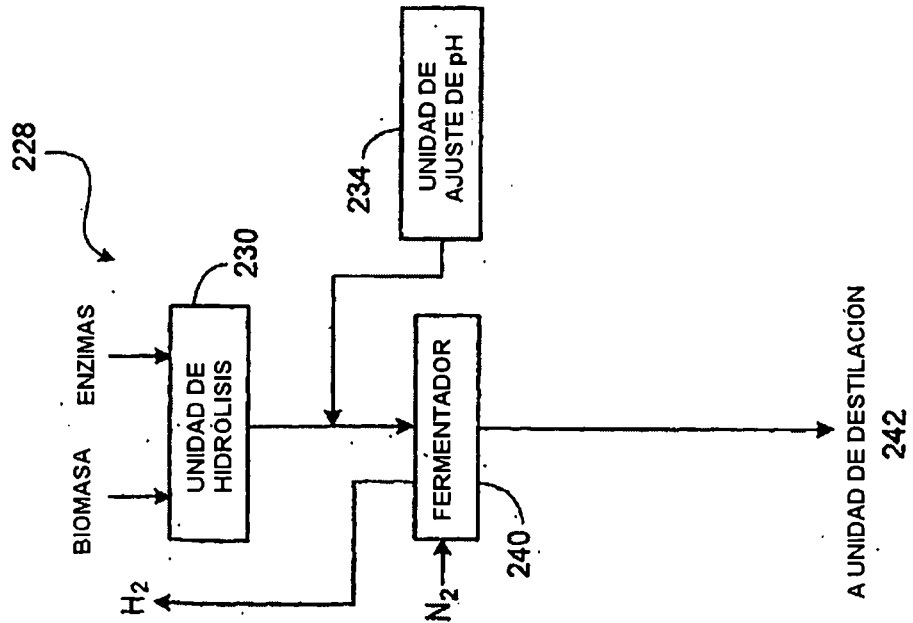


FIG. 5A

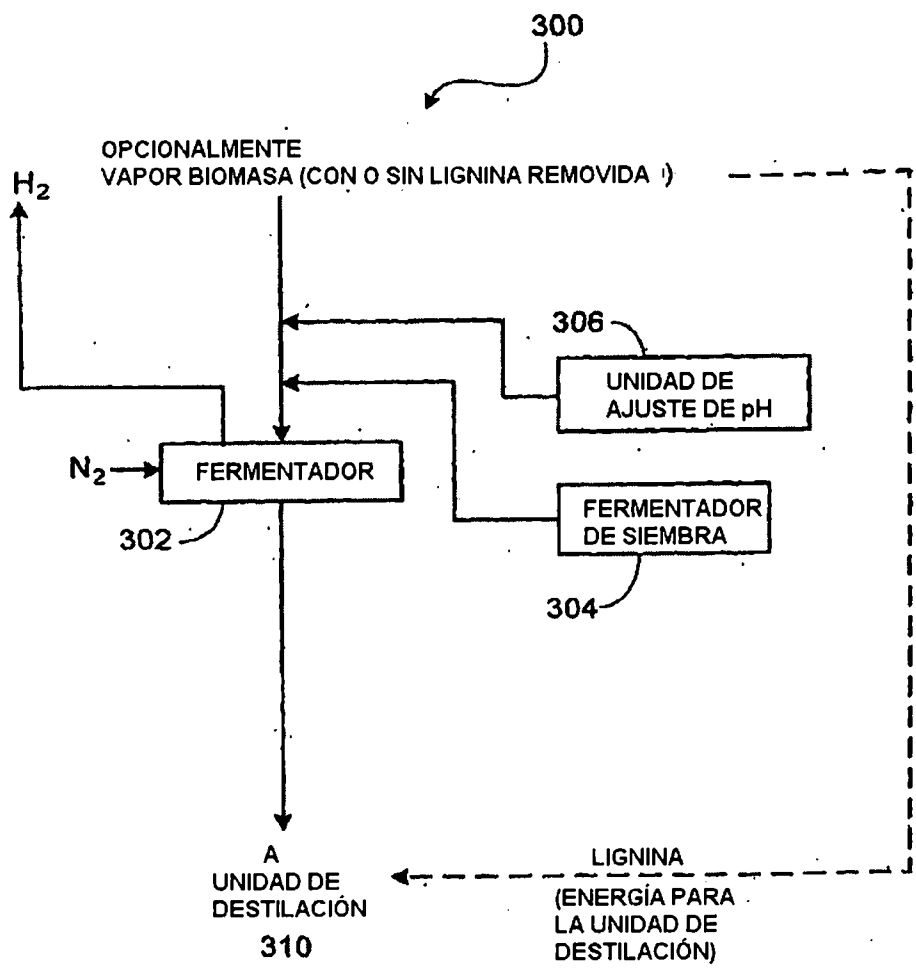


FIG. 5C

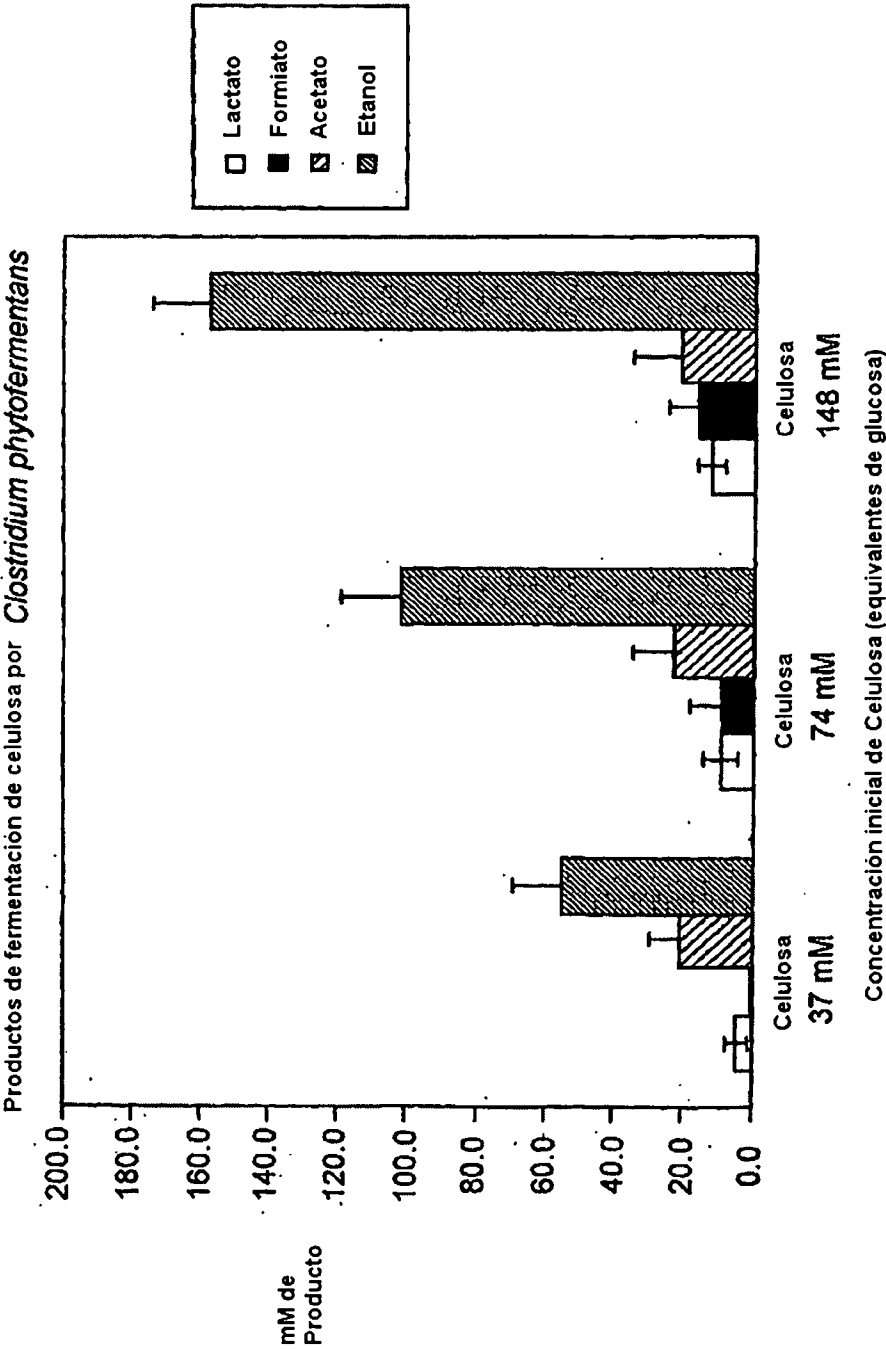
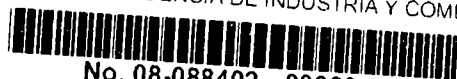


FIG. 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-088402- -00000-0000

Fecha: 2008-08-25 16:30:41

Tra: 11 PATENTE IYII

Act: 411 PRESENTACION

Dep: 2020 NUECREACION

Eve: 378 FASE NACIONAL I

Folios: 58

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**PATENTE DE INVENCION ☒ [x]MODELO DE UTILIDAD ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ [x] 1
- ◆ Descripción de la invención ☒ [x] 7
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒ [X] 52
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒ [x] 2

COMPLETA ☒ [x]INCOMPLETA ☐ []DISEÑO INDUSTRIAL ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ []INCOMPLETA ☐ []ESQUEMA DE TRAZADO ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ []INCOMPLETA ☐ []

Moller Bz
Firma Responsable

Fecha

25 AGO/08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
 Conmutador: 3 82 08 40
 Fax: 350 52 20
 E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia