



(11) **MX 2014003304 A**

(12)

## SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **21/09/2015** (51) Int. Cl: **C12P 7/06** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)  
(22) Fecha de presentación: **19/03/2014**  
(21) Número de solicitud: **2014003304**

(71) Solicitante:  
**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.  
Camino a la Presa San Jose No. 2055 78216 SAN LUIS  
POTOSI San Luis Potosí MX**

(72) Inventor(es):  
**Antonio De Leon RODRIGUEZ  
C. Cañada del Parque 109 SAN LUIS POTOSI San Luis  
Potosí 78215 MX  
Zazil Donaxi ALVARADO CUEVAS  
Jose Tomas ORNELAS SALAS  
Angel Mario LOPEZ HIDALGO  
Leandro Gabriel ORDOÑEZ ACEVEDO**

(74) Representante:  
**NORMA ISABEL GARCIA CALDERON  
Camino a la Presa San José No 2055 San Luis Potosí  
San Luis Potosí 78216 MX**

(54) Título: **PROCESO PARA PRODUCCION SIMULTANEA DE BIOHIDROGENO Y BIOETANOL UTILIZANDO  
HIDROLIZADOS LIGNOCELULOSICOS COMO SUSTRATO.**

(54) Title: **PROCESS FOR THE SIMULTANEOUS PRODUCTION OF BIO-HYDROGEN AND BIOETHANOL USING  
LIGNOCELLULOSE HYDROLYZATES AS A SUBSTRATE.**

(57) Resumen

**La presente invención describe un proceso de producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol por una cepa de Escherichia coli que comprende al menos una deleción completa del gen hycA utilizando un sustrato que comprende residuos agroindustriales.**

(57) Abstract

**The present invention describes a process for the simultaneous production of bio-hydrogen and bioethanol by an Escherichia coli strain that comprises at least a complete deletion of the hycA gene using a substrate that comprises agro industrial residues.**

## **PROCESO PARA PRODUCCIÓN SIMULTÁNEA DE BIOHIDRÓGENO Y BIOETANOL UTILIZANDO HIDROLIZADOS LIGNOCELULÓSICOS COMO SUSTRATO**

### **CAMPO DE LA INVENCION**

5

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología, especialmente a la obtención de biocombustibles a partir de recursos renovables.

### **10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Debido a la crisis energética y la creciente preocupación por el cambio climático, el desarrollo de fuentes de energía alternativa es de gran interés. En la actualidad el suministro de energía depende en gran medida de los combustibles fósiles, a pesar de los grandes esfuerzos que se están realizando en todo el mundo para utilizar combustibles producidos a partir de materias primas renovables, ya que éstos tienen un menor número de emisiones de gases de efecto invernadero durante su producción y uso (Cheng C.L., Lo Y.C., Lee K.S., Lee D.J., Lin C.Y. and Chang J.S. 2011. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. Bioresource technology. 102: 8514-8523).

La energía de biomasa es una prominente fuente de energía renovable, pero la materia prima usada para la producción debe provenir de cultivos que no sean alimentarios o desechos agrícolas (materia prima de segunda generación), para evitar la competencia con las fuentes de alimentos y tierras cultivables. Los biocombustibles de segunda generación mayormente utilizan materiales lignocelulósicos para la producción de combustibles líquidos o gaseosos, ya que pueden ser degradados a carbohidratos monoméricos como glucosa, arabinosa y xilosa. La paja de trigo es uno de los más abundantes componentes de desechos agrícolas y tiene potencial para la producción de biocombustibles, incluyendo el hidrógeno (Cheng C.L., Lo Y.C., Lee K.S., Lee D.J., Lin C.Y. and Chang J.S. 2011. Biohydrogen production

- from lignocellulosic feedstock. *Bioresource technology*. 102: 8514-8523; Kongjan P., O-Thong S., Kotay M., Min B. and Angelidaki I. 2010. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and bioengineering*. 105: 899-908;
- 5 Lo Y.-C., Su Y.-C., Cheng C.-L. and Chang J.-S. 2011. Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36: 13955-13963).
- 10 El biohidrógeno es definido como hidrógeno producido biológicamente (mayormente por bacterias) a partir de materiales orgánicos de desecho, su producción requiere el uso mínimo o nulo de hidrocarburos; y es una alternativa a los combustibles fósiles (Demirbas, A. 2009. *Biohydrogen For Future Engine Fuel Demands*. London New York: Springer). Los métodos de
- 15 producción de biohidrógeno generalmente comprenden: producción fotosintética y fermentación oscura (Fangkum A. and Reungsang A. 2011. Biohydrogen production from mixed xylose/arabinose at thermophilic temperature by anaerobic mixed cultures in elephant dung. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36: 13928-13938). La fermentación oscura es un
- 20 fenómeno que ocurre bajo condiciones anóxicas y como sustratos es posible usar una variedad amplia de fuentes de carbono; además de producir metabolitos valiosos, tales como ácidos butírico, láctico y acético (Das D. and Veziroglu T. 2008. *Advances in biological hydrogen production processes*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33: 6046-6057). Los microorganismos
- 25 usados en la fermentación generan hidrógeno molecular durante la descomposición de sustratos de carbohidratos. La producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura a partir de hidrolizados celulósicos ha sido probada con éxito (de Vrije T., Bakker R.R., Budde M.A., Lai M.H., Mars A.E. and Claassen P.A. 2009. Efficient hydrogen production from the
- 30 lignocellulosic energy crop *Miscanthus* by the extreme thermophilic bacteria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnology for biofuels*. 2: 12; Rai P.K., Singh S.P. and Asthana R.K. 2012.

Biohydrogen production from cheese whey wastewater in a two-step anaerobic process. *Applied biochemistry and biotechnology*. 167: 1540-1549). Recientemente, la coproducción de bioetanol con otros biocombustibles, como el biogás, a partir de cultivos energéticos (por ejemplo: centeno, canola y habas) fue reportada (Petersson A., Thomsen M., Hauggaardnielsen H. and Thomsen A. 2007. Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. *Biomass and Bioenergy*. 31: 812-819). Sin embargo, todavía existe la necesidad de estudios sobre multibiocombustibles (bioetanol, biohidrógeno y biogás) que podrían ayudar a la evaluación de nuevos conceptos, tales como, biorrefinería; es decir, producción de biocombustibles a partir de residuos agrícolas (Kaparaju P., Serrano M., Thomsen A.B., Kongjan P. and Angelidaki I. 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource technology*. 100: 2562-2568).

15

Existen muy pocos reportes donde se documenten la coproducción de biohidrógeno y bioetanol, entre los que se encuentran:

Dos artículos en el que usan cepas modificadas genéticamente de *Escherichia coli* para la producción de biohidrógeno y bioetanol usando glicerol como sustrato. El primero, un documento en el que Hu H., Wood T.K. 2010. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochem Biophys Res Commun*. 391(1): 1033-1038, reporta que una cepa de *Escherichia coli* que carecía del gen *frdC*, denominada BW25113frdC, fue sometida a mutagénesis química y adaptación evolutiva combinada con un método de selección de crecimiento en glicerol, y logró obtener la cepa mutante HW2. Esta cepa mutante produjo 20 veces más hidrógeno que la cepa BW25113frdC en un medio con glicerol (0.68mmol/L h). La producción de etanol también se incrementó 5 veces más en la cepa evolucionada HW2. En el segundo documento, se construyeron dos cepas de *Escherichia coli* para la coproducción de etanol-hidrógeno y etanol-formiato, usando glicerol como fuente de carbono, a partir de las cepas MG1655 de

*Escherichia coli* K12 que carecían del gen *frdA* o de los genes *fdhF frdA*. Para esto se les eliminó a las dos cepas el gen *pta*, que codifica para el fosfato acetil transferasa, y las cepas resultantes se denominaron SY03 y SY04, respectivamente. (Shams Y. S., Gonzalez R. 2008. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metab Eng.* 10(6):340-351).

Asimismo, la solicitud WO/2013/038435 A1 que se refiere a la invención de un proceso de fermentación anaerobio del glicerol, derivado de los subproductos de la producción del biodiesel, con la finalidad de producir etanol e hidrógeno usando lodos enriquecidos como inóculos, que fueron climatizados sobre el desecho del biodiesel. Bajo condiciones optimizadas del proceso en 44h fue posible obtener 8 g/L de etanol (rendimiento de 1 mol de etanol/mol de glicerol) a partir de 15g/L de glicerol y casi 2.2 L/L d de hidrógeno (0.95 mol H<sub>2</sub>/mol de glicerol) con una cantidad de H<sub>2</sub> en biogás de 50%. Asimismo, la solicitud internacional WO/2013/017710 se refiere a la producción de etanol e hidrógeno a partir de glicerol usando *Escherichia coli* MG1655. El medio de cultivo incrementa el crecimiento del microorganismo para obtener una alta concentración de biomasa permitiendo así una producción más alta de etanol.

Nuestra invención difiere en que proponemos el uso de una cepa de *Escherichia coli* que comprende al menos una delección completa del gen *hycA* que usa como sustrato hidrolizados lignocelulósicos, y no glicerol, para la producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol. El uso de hidrolizados lignocelulósicos tiene como ventaja competitiva que son de fácil acceso, ya que hay una amplia variedad de materiales que pudieran servir de sustrato para el proceso de la presente invención.

Cuatro documentos en los que se utilizaron bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas en la producción simultánea de hidrógeno y etanol. En el primero de ellos Ramachandran U., Wrana N., Cicek N., Sparling R., Levin

D.B. 2011. Isolation and characterization of a hydrogen- and ethanol-producing *Clostridium* sp. strain URNW. Can J Microbiol. 57(3):236-243, evaluaron diferentes fuentes de carbono usando *Clostridium* sp URNW. Por otro lado Koskinen P. E., Beck S.R., Orlygsson J., Puhakka J.A. 2008. Ethanol and Hydrogen Production by Two Thermophilic, Anaerobic Bacteria Isolated From Icelandic Geothermal Areas. Biotechnology and Bioengineering. 101(4):679-690 mostraron la coproducción de etanol e hidrógeno por *Clostridium uzonii* y *Thermoanaerobacterium aciditolerans* usando glucosa. Otro documento en el que se reporta que la cepa HE1 de *Klebsiella* sp a partir de un medio de cultivo con sacarosa, a una concentración de 26.7g/L, obtuvo una velocidad de producción para hidrógeno de 3.26 mmol/h, etanol de 6.75 mmol/h y de 2,3-butanediol de 7.14 mmol/h (Wu K.J., Saratale G.D., Lo Y. C., Chen W.M. Tseng Z.J., Chang M.C., Tsai B.C., Su A., Chang J.S. 2008. Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. Bioresour Technol. 99(17):7966-70). Y finalmente, Ito T., Nakashimada Y., Senba K. 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. Journal of Bioscience and Bioengineering. 100(3): 260-265, reportaron el uso de glicerol de desechos de biodiesel como sustrato por *Enterobacter aerogenes* HU-101 aislada de lodos metanogénicos.

Nuestra invención difiere en el uso de una cepa de *Escherichia coli*, microorganismo facultativo, que comprende al menos una delección completa del gen *hycA* que usa como sustrato hidrolizados agroindustriales para la producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol. El utilizar un microorganismo facultativo da como ventaja competitiva una flexibilidad en las condiciones del proceso, ya que se puede llevar a cabo en condiciones aerobias o anaerobias dependiendo de la necesidad y condiciones para la producción de biohidrógeno y bioetanol sin afectar el rendimiento en la producción de los mismos. Más aún, el rendimiento del proceso de la presente invención es mayor al reportado en dichos documentos. Adicionalmente, el uso de residuos agroindustriales es más económico que el

uso de reactivos puros tales como la sacarosa o la glucosa, puesto que contaminantes o cambios en los sustratos puros pueden afectar el rendimiento del proceso.

- 5 El documento de Han W., Wang Z., Chen H., Yao X., Li Y., 2011 Simultaneous biohydrogen and bioethanol production from anaerobic fermentation with immobilized sludge. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Doi: 10.1155/2011/343791 donde explica el uso de un reactor de tanque agitado continuo para la producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol con  
10 lodos immobilizados usando melazas como sustratos.

Nuestra invención difiere en el uso de una cepa de *Escherichia coli* que comprende al menos una delección completa del gen *hycA* que usa como sustrato hidrolizados lignocelulósicos para la producción simultánea de  
15 biohidrógeno y bioetanol, y no comunidades bacterianas y melazas como sustrato. La ventaja competitiva de utilizar un solo microorganismo radica en que existe un mejor control sobre la población microbiana con respecto al uso de consorcios, donde cualquier desequilibrio en la población y tipo de microorganismo afecta la producción de los combustibles.

20

Dos reportes en los que se evaluaron la producción de bioetanol y biohidrógeno en procesos que constan de dos etapas. En el primero de ellos, Kaparaju P., Serrano M., Thomsen A.B., Angelidaki I. 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 100(9): 2562-2568, se utiliza paja de trigo  
25 pretratada térmicamente para la producción de ambos biocombustibles. Con la hidrólisis enzimática y subsecuente fermentación de la celulosa por *Saccharomyces cerevisiae* obtuvieron 0.41 g etanol/g glucosa, mientras que la fermentación oscura del hidrolizado se produjo 178 ml de H<sub>2</sub>/g azúcares con una mezcla de microorganismos termófilos extremos. En el segundo, Pan C., Zhang M., Fan Y., Xing Y., Hou H. 2009. Production of cellulosic ethanol and hydrogen from solid-state enzymatic treated cornstalk: a two-stage process. *J*  
30

Agric Food Chem. 57:2732-2738, se combina la producción de etanol a partir de la celulosa y la producción de hidrógeno a partir de caña de maíz tratada enzimáticamente usando la levadura *Pachysolen tannophilus* As2-1585.

- 5 Nuestra invención difiere en el uso de una cepa de *Escherichia coli* que comprende al menos una delección completa del gen *hycA* que usa como sustrato hidrolizados agroindustriales para la producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol en un proceso de una sola etapa, y no en dos etapas como los procesos mencionados anteriormente. Esto abarata costos y
- 10 condiciones del proceso, siendo una ventaja económica con respecto a procesos de dos etapas. Adicionalmente, mediante el proceso de la presente invención se obtuvieron mejores rendimientos que los reportados en estos documentos.
- 15 Un documento en el que se evaluó la producción combinada de biohidrógeno y bioetanol a partir de monoazúcares, carbohidratos poliméricos e hidrolizados de varias biomásas lignocelulósicas con la cepa AK<sub>54</sub> de la bacteria termofílica *Thermoanaerobacterium aciditolerans*, aislada de una fuente termal de Islandia en fermentaciones realizadas a 65°C.
- 20 (Sigurbjornsdottir M.A., Orlygsson J. 2011. Combined hydrogen and ethanol production from sugars and lignocellulosic biomass by *Thermoanaerobacterium* AK<sub>54</sub> aislada de fuentes termales. Applied Energy. doi:10.1016/j.apenergy.2011.11.035).
- 25 Nuestra invención difiere en el uso de una cepa de *Escherichia coli* que comprende al menos una delección completa del gen *hycA* que usa como sustrato hidrolizados lignocelulósicos para la producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol en un proceso a temperaturas iguales y/o menores a 37°C, y no usa cepas termofílicas en fermentaciones a 65°C del documento
- 30 anterior. Esto confiere un ahorro energético en el proceso, puesto que el proceso de la presente invención puede llevarse a cabo prácticamente a temperatura ambiente y no se necesita la aplicación de calor. Asimismo, el



manejo de *E. coli* es mucho más sencillo que el manejo y control de una bacteria termofílica aislada de fuentes termales, ya que se abate el riesgo de perder la cepa.

- 5 Asimismo, existen cuatro documentos en los que se evalúa la producción de biohidrógeno y en tres de ellos se determinan los metabolitos de la fermentación con una cepa de *Escherichia coli* WDHL. En el primero de ellos, Rosales-Colunga L.M., Razo-Flores E., Ordoñez L.G., Alatríste-Mondragón F. and De León-Rodríguez A. 2010. Hydrogen production by *Escherichia coli*  $\Delta hycA$   
10  $\Delta lacI$  using cheese whey as substrate. International Journal of Hydrogen Energy. 35: 491-499, se explica que utilizando suero de leche como sustrato se obtiene una producción de 2488 mL de biohidrógeno, la fermentación favorece la producción de ácido láctico sobre otros metabolitos, incluyendo el etanol. El medio utilizado para la fermentación es llamado HP y sus  
15 componentes son: 0.08% NaCl, 0.02% KCl, 0.143%  $Na_2HPO_4$ , 0.02%  $KH_2PO_4$ . La lactosa y sus azúcares (glucosa y galactosa) constituyentes se consumen en su totalidad. Otro documento reporta el uso de lactosa, glucosa, galactosa y una mezcla equivalente de glucosa y galactosa como sustratos, obteniendo una producción de biohidrógeno de 2092 mL de  $H_2$ , 1037 mL de  $H_2$ , 2080 de  
20 mL  $H_2$  y 1467 mL de  $H_2$ , respectivamente. A su vez, se cuantificó la producción de metabolitos de la fermentación siendo el mayoritario el ácido láctico en la mayoría de los casos, con concentraciones de hasta 10.1 g/L, excepto al utilizar galactosa como sustrato con el cual se favorece la producción de etanol (5.1 g/L). El medio utilizado para la fermentación es también HP  
25 (Rosales-Colunga L.M., Razo-Flores E. and De León-Rodríguez A. 2012. Fermentation of lactose and its constituent sugars by *Escherichia coli* WDHL: Impact on hydrogen production. Bioresource Technology. 111: 180-184). En el tercer documento, Alvarado-Cuevas Z., Sánchez A., Ordoñez L.G., Ornelas-Salas J.T. and De León-Rodríguez A. 2012. Bio-hydrogen production by  
30 *Escherichia coli* WDHL and *Bacillus* sp. using wheat straw hydrolysate as substrate. Environmental Engineering and Management Journal. 11, se reporta el uso de hidrolizado de paja de trigo como sustrato y el medio HP para la

producción de biohidrógeno, con un consumo del 50% del total de los carbohidratos contenidos en el sustrato. Y finalmente, en el cuarto documento se reporta el uso de suero de leche como sustrato con una producción de 2402 mL de H<sub>2</sub>, también se determinan los metabolitos productos de la fermentación, siendo el mayoritario el ácido láctico. Dentro de los metabolitos se reporta una máxima concentración de etanol de 3.3 g/L. El medio de cultivo utilizado en estas fermentaciones fue el medio HP.

Nuestra invención difiere en el uso de una cepa de *Escherichia coli* que comprende al menos una delección completa del gen *hycA* que usa como sustrato hidrolizados lignocelulósicos para la producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol en un proceso en el que se utiliza un medio de cultivo mejorado, diferente al HP, que permite el consumo total de las pentosas y hexosas contenidas en el sustrato, con producciones de biohidrógeno superiores a las antes mencionadas, favoreciendo la producción simultánea de bioetanol con concentraciones por encima de los 8 g/L. Por lo tanto, al proveer un sustrato totalmente metabolizable se optimiza el rendimiento, ya que la desventaja de los documentos citados radica en que la producción de bioetanol es muy baja, por lo que el proceso de la presente invención permite la producción simultánea en una sola etapa tanto de bioetanol como de biohidrógeno.

A la luz del estado de la técnica, cabe resaltar que la finalidad de esta invención radica en un proceso para la producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol, utilizando hidrolizados lignocelulósicos, tal como, pero no limitado a hidrolizado de paja de trigo. La novedad de la invención está centrada en la optimización tanto de los parámetros del proceso así como en el sustrato a metabolizar, para así obtener dichos productos de manera consistente, controlable y repetible en condiciones controladas.

30

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención describe y reclama un proceso para producir biohidrógeno y bioetanol, caracterizado porque comprende los pasos de:

- 5 a) preparar un sustrato que comprende de 0.66% a 2.34% de un sustrato lignocelulósico más un medio de cultivo que permite el consumo total de azúcares (pentosas y hexosas) del sustrato a un pH en un rango de 4.8 a 8.2;
- b) poner en contacto dicho sustrato del paso a) con una cepa de *Escherichia coli* que comprende al menos una delección completa del gen *hycA*;
- 10 c) fermentar la mezcla del paso b) en condiciones de anaerobiosis en un proceso de una sola etapa, en un rango de temperatura de 28 a 37 °C.

15 En una modalidad preferida, dicho sustrato lignocelulósico es hidrolizado de paja de trigo.

Adicionalmente, en una modalidad preferente dicho medio de cultivo comprende: 0.00125%  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0015%  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0003%  $\text{CoCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , 0.0075%  $\text{ZnCl}_2$ , 0.45%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 1.1867%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.0125%  $\text{KHPO}_4$ ,  
 20 0.01%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.0025%  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.0005%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Preferentemente, dicho medio de cultivo comprende adicionalmente 0.001 %  $\text{MgSO}_4$ , 0.275 % de extracto de levadura y 1 mL/L de una solución que comprende: 0.0015%  $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.000036 %  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.000024 %  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.00007 %  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.00002 %  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.00002 %  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,  
 25 0.005 % resazurina.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Consumo de carbohidratos contenidos en el hidrolizado lignocelulósico utilizando dos medios de cultivo diferentes. En el eje de las abscisas se gráfica el tiempo (h) y en el de las ordenadas la concentración  
 30 (g/L) de los azúcares durante la fermentación. La línea continua se refiere al consumo de carbohidratos en la fermentación utilizando el medio de cultivo

de esta invención, mientras que la discontinua es para el consumo de carbohidratos utilizando medio de cultivo HP.

Figura 2. Cinéticas de producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol por la cepa de *Escherichia coli* que comprende al menos una delección completa del gen *hycA* utilizando hidrolizado de paja de trigo como sustrato. En el eje de las abscisas se gráfica el tiempo (h), en el eje primario de las ordenadas la producción de biohidrógeno (mL de H<sub>2</sub>) y en el eje secundario de las ordenadas la producción de bioetanol (g/L). La línea continua se refiere a la producción de biohidrógeno, mientras que la discontinua es para la producción de bioetanol.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 15 En virtud de la necesidad en el estado de la técnica de contar con un proceso óptimo para la producción simultanea de bioetanol y biohidrógeno, que sea controlable, económico y fácil de implementar, a continuación se describe un proceso ad hoc para la solución del problema técnico.
- 20 Por un lado, parte del problema técnico a resolver radica en obtener una cepa microbiana capaz de coproducir bioetanol y biohidrógeno. Para efectos de la invención se utilizó una cepa de *Escherichia coli*, derivada de la cepa W3110, que comprende al menos una delección completa del gen *hycA*. El tener una cepa con dicha mutación, permite la desregulación del
- 25 operón de producción de hidrógeno, de tal manera que se favorece la sobreproducción de este producto. Sorprendentemente, esta mutación permite una producción simultánea de bioetanol, tal vez debido a los metabolitos secundarios derivados de la producción de biohidrógeno. Dicha delección puede obtenerse mediante cualquier técnica estándar de
- 30 genética, tal como recombinación homóloga de fragmentos de ADN adyacentes al gen *hycA*.

De manera general, los pasos para llevar a cabo el proceso de la presente invención comprenden:

- 5 a) Preparar un sustrato que comprende entre 0.66% a 2.34% de un material lignocelulósico, el cual se mezcla con un medio de cultivo que permite el consumo total de azúcares (pentosas y hexosas) presentes en dicho material lignocelulósico.
- b) Poner en contacto dicho sustrato preparado en el paso a) con una cepa de *Escherichia coli* que comprende al menos una deleción completa del gen *hycA*.
- 10 c) Fermentar la mezcla del paso b) en condiciones de anaerobiosis en un proceso de una sola etapa.

A continuación, en los ejemplos se da a conocer la mejor manera de llevar a cabo la presente invención, a fin de destacar las ventajas competitivas del proceso, proveyendo una solución al problema existente en el campo de la técnica. Cabe hacer mención que estos ejemplos son meramente ilustrativos y no se pretende limitar el alcance de la presente invención.

### EJEMPLOS

20

Ejemplo 1. Procedimiento para producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol.

Con el objeto de producir bioetanol y biohidrógeno de manera simultánea, se llevó a cabo el siguiente proceso de conformidad con lo descrito en la sección anterior.

En una primera etapa, se preparó un sustrato de la siguiente manera:  
Se prepara el material lignocelulósico, en este caso paja de trigo, mediante una hidrólisis ácida con 0.72% de ácido sulfúrico a 121°C durante 1 hora. Una vez que dicho material conforma un sustrato líquido, éste es mezclado con un medio de cultivo que comprende: 0.00125%  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0015%  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0003%  $\text{CoCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , 0.0075%  $\text{ZnCl}_2$ , 0.45%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 1.1867%

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0125% KHPO<sub>4</sub>, 0.01% MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0025% FeSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0005% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O. Dicho medio de cultivo comprende adicionalmente 0.001 % MgSO<sub>4</sub>, 0.275 % de extracto de levadura y 1 mL/L de una solución que comprende: 0.0015% FeCl<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.000036 % Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.000024 % NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.00007 % CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.00002 % CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.00002 % Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.005 % resazurina.

En una segunda etapa, se resuspende una pastilla proveniente de un cultivo en medio rico de la cepa de *E. coli* ΔhycA en el medio de cultivo descrito en la primera etapa del proceso. Los cultivos se ajustaron a una OD<sub>600nm</sub> de 1.5.

10

En una tercera etapa, se fermenta el sustrato adicionado con la cepa de *E. coli* ΔhycA a un pH de entre 4.8 a 8.2 y una temperatura de entre 22 a 52°C, y fueron agitados a 175 rpm durante un tiempo tal que agote las fuentes de carbono y se detenga la producción de bioetanol y biohidrógeno.

15

Ejemplo 2. Optimización de las condiciones de fermentación.

A fin de obtener un rendimiento óptimo de biohidrógeno y bioetanol, se determinaron los mejores parámetros para llevar a cabo la tercera etapa que corresponde a la fermentación de la cepa de *E. coli* en el sustrato preparado. En la Tabla 1 se observa el uso de diferentes rangos de temperatura, pH y concentración del sustrato utilizado en esta invención.

20

Se obtiene coproducción de biohidrógeno y bioetanol trabajando con temperaturas que van desde 28°C hasta 37°C, en cuanto al pH en un intervalo comprendido entre 4.8 y 8.2, y para la concentración de sustrato lignocelulósico desde 0.66 % hasta 2.34 %. Pero se recomienda trabajar usando temperaturas superiores a 28 pero menores a 32°C, utilizar valores de pH que se encuentren entre 7.5 y 8.2, y manejar concentraciones superiores a 2.0 % pero menores a 3.0 %.

30

Tabla 1. Resultados de experimentos realizados para optimizar el proceso de producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol

Sustrato (%)	Temperatura (°C)	pH	Biohidrógeno (mL H <sub>2</sub> )	Bioetanol (g/L)
1.5	37	6.5	304.0	6.669
1.0	28	7.5	252.2	5.105
1.5	37	8.2	326.5	6.429
0.66	37	6.5	98.2	3.063
2.34	37	6.5	459.9	8.042
1.5	37	4.8	320.2	6.478

Ejemplo 3 Comparación del consumo de carbohidratos del material lignocelulósico en medios de cultivo diferentes.

Dado que uno de los problemas del estado de la técnica era la baja utilización de los sustratos para la obtención de biocombustibles, se determinó el consumo de carbohidratos en el sustrato preparado en el proceso de la presente invención, tal y como se describe en el ejemplo 1, y se comparó con un sustrato ya existente en el estado de la técnica.

En la Figura 1 se compara el consumo de los carbohidratos del hidrolizado lignocelulósico utilizado en fermentaciones con cepas de *Escherichia coli* que comprenden al menos una deleción completa del gen *hycA* con dos medios de cultivo diferentes. La línea punteada hace referencia al medio HP (0.08% NaCl, 0.02% KCl, 0.143% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), mientras que la línea continua se refiere al medio de cultivo preparado en la etapa 1 del procedimiento de la presente invención (ver ejemplo 1) Se observa que el consumo de carbohidratos con el medio de cultivo mejorado es completo, mientras que con el medio HP el consumo de azúcares es únicamente del 50% aproximadamente.

20

Ejemplo 4. Cuantificación de biohidrógeno y bioetanol mediante el proceso de la presente invención.

- La producción de biohidrógeno se determinó mediante desplazamiento de NaOH 1 N y cromatografía de gases (Agilent Technologies 6890N Network GC Systems). La concentración de etanol producida se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo
- 5 Agilent equipado con un detector de índice de refracción (Agilent Technologies 1220 Infinity LC). Utilizando una columna para análisis de ácidos orgánicos Phenomenex Rezex ROA operada a 60°C con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.0025 M como fase móvil a 0.55 mL/min.
- 10 Las condiciones óptimas obtenidas para maximizar la producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol se probaron para su confirmación, obteniendo 498 ± 14.5 mL de biohidrógeno y 9.9 g/L de bioetanol. Las condiciones óptimas se probaron en un ensayo en biorreactor y los resultados se muestran en la Figura 2. A 200 horas de fermentación la producción fue de 3,177 mL H<sub>2</sub>,
- 15 también se detectaron 8.86 g/L de bioetanol.

Con el objeto de destacar la ventaja competitiva del proceso de la presente invención, se comparó la coproducción de bioetanol y biohidrógeno entre diversos procesos y sustratos. A manera ilustrativa, la siguiente tabla describe

20 los rendimientos de un proceso que utiliza lactosuero, contra un proceso que utiliza paja de trigo en el sustrato de HP (ver ejemplo 3) y el proceso de la presente invención.

Tabla 2. Comparación de rendimientos de biohidrógeno y bioetanol, y

25 consumo de azúcares con diferentes sustratos y medios de cultivo

Sustrato	Medio de cultivo	<sup>e</sup> Y <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL H <sub>2</sub> /g azúcar)	<sup>f</sup> Y <sub>EtOH</sub> (g EtOH/g azúcar)	Consumo de azúcares (%)
<sup>a</sup> SL	HP	162.27	0.02	88
<sup>b</sup> HPT	HP	20.58 ± 1.39	<sup>g</sup> N/D	50
<sup>c</sup> HLC	<sup>d</sup> MC	271.96 ± 7.80	0.68 ± 0.05	100



<sup>a</sup>SL: suero de leche

<sup>b</sup>HPT: hidrolizado de paja de trigo

<sup>c</sup>HLC: hidrolizado lignocelulósico utilizado en esta invención

<sup>d</sup>MC: medio de cultivo utilizado en esta invención

5 <sup>e</sup>Y<sub>H<sub>2</sub></sub>: rendimiento de biohidrógeno

<sup>f</sup>Y<sub>EtOH</sub>: rendimiento de bioetanol

<sup>g</sup>N/D: no determinado

10 A partir de estos resultados, se aprecia que la producción simultánea de biohidrógeno y bioetanol de la presente invención supera ampliamente los resultados obtenidos mediante otros procesos, lo cual confiere una ventaja competitiva desde el punto de vista de rendimiento (218.64 mL H<sub>2</sub>/g azúcar y 0.64 g EtOH/g azúcar). Ventajas adicionales son que el proceso de la presente invención se lleva a cabo a temperatura ambiente, y la utilización  
15 del sustrato en su totalidad, con lo que el residuo agroindustrial es completamente reutilizado y útil.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un proceso para producir biohidrógeno y bioetanol, caracterizado porque comprende los pasos de:
- 5 a. preparar un sustrato que comprende de 0.66% a 2.34% de un sustrato lignocelulósico más un medio de cultivo que permite el consumo total de azúcares (pentosas y hexosas) del sustrato;
- b. poner en contacto dicho sustrato del paso a) con una cepa de *Escherichia coli* que comprende al menos una delección completa del gen
- 10 *hycA*;
- c. fermentar la mezcla del paso b) en condiciones de anaerobiosis en un proceso de una sola etapa.
- 2.- El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el paso a) se lleva a cabo en un rango de pH
- 15 de 4.8 a 8.2.
- 3.- El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el paso c) se lleva a cabo en un rango de temperatura de 28 a 37 °C.
- 4.- El proceso de conformidad con la reivindicación 1,
- 20 caracterizado además porque dicho sustrato lignocelulósico es hidrolizado de paja de trigo.
- 5.- El proceso de conformidad con reivindicación 1, caracterizado además porque dicho medio de cultivo comprende: 0.00125%  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0015%  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0003%  $\text{CoCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , 0.0075%  $\text{ZnCl}_2$ ,
- 25 0.45%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 1.1867%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.0125%  $\text{KHPO}_4$ , 0.01%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.0025%  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.0005%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- 6.- El proceso de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque dicho medio de cultivo comprende adicionalmente 0.001 %  $\text{MgSO}_4$ , 0.275 % de extracto de levadura y 1 mL/L de una solución que comprende: 0.0015%  $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.000036 %  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,
- 30 0.000024 %  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.00007 %  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.00002 %  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.00002 %  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 0.005 % resazurina.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención describe un proceso de producción simultánea de  
5 biohidrógeno y bioetanol por una cepa de *Escherichia coli* que comprende  
al menos una delección completa del gen *hycA* utilizando un sustrato que  
comprende residuos agroindustriales.

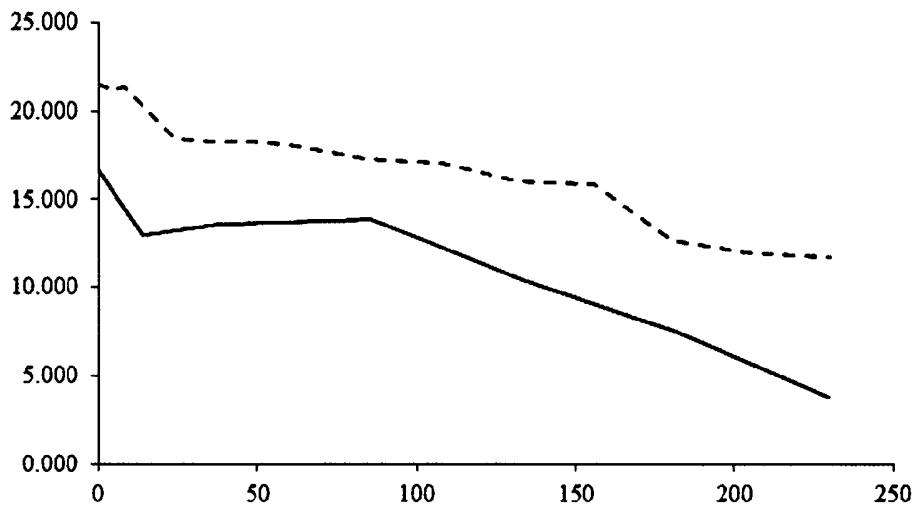


Figura 1

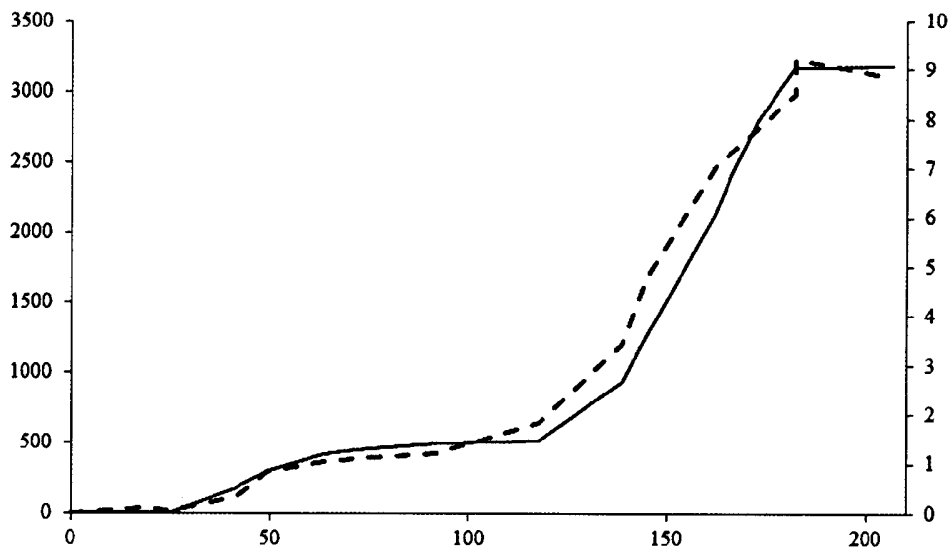


Figura 2