

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 799**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/16** (2006.01)  
**C12P 7/28** (2006.01)  
**C12P 7/36** (2006.01)  
**C12P 7/34** (2006.01)  
**C12F 3/10** (2006.01)  
**C10L 1/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2011 PCT/GB2011/051237**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12001416**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2011 E 11738779 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2588620**

54 Título: **Proceso para la elaboración de butanol o acetona**

30 Prioridad:

**01.07.2010 GB 201011079**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.04.2017**

73 Titular/es:

**CELTIC RENEWABLES LIMITED (100.0%)  
5th Floor, 125 Princes Street  
Edinburgh, Scotland EH2 4AD, GB**

72 Inventor/es:

**WHITE, SAMANTHA JANE;  
LEIPER, KENNETH ALEXANDER;  
TANGNEY, MARTIN y  
MESSENGER, SANDRA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 607 799 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proceso para la elaboración de butanol o acetona

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la elaboración de biocombustibles y productos químicos renovables. Más particularmente, la invención se refiere a un proceso para la fabricación de butanol. La invención se refiere además a un proceso para la fabricación de acetona.

### Antecedentes de la invención

10 En los últimos años, los mayores precios del petróleo, el agotamiento de las fuentes de combustibles y los problemas ambientales han llevado a un interés renovado en la producción de combustibles a partir de biomasa ("biocombustibles"). El biobutanol es producido por fermentación de biomasa usando bacterias, típicamente del género *Clostridium*. Además de butanol, estos organismos también producen acetona, que es un solvente importante y etanol, de modo que el proceso es denominado frecuentemente "proceso ABE" (proceso de Acetona/Butanol/Etanol). Las cargas de alimentación o sustratos usados actualmente incluyen cultivos energéticos, tales como remolacha azucarera, caña de azúcar, maíz y trigo, así como también subproductos agrícolas, tales como paja y tallos de maíz. El uso de biobutanol como un combustible tiene diversas ventajas con respecto al uso de etanol. Sin embargo, como la producción de biobutanol es actualmente más costosa que la producción de etanol, no ha sido comercializada en gran escala.

20 El whisky de malta se refiere al whisky que ha sido producido solamente a partir de grano de cebada malteada. La producción de whisky de malta comienza con el malteado de la cebada empapando la cebada en agua. El malteado libera enzimas que degradan los almidones en el grano y los convierten en azúcares. Cuando se alcanza el estado de germinación deseado, la cebada malteada se seca. La cebada malteada secada se macera en una cuba de maceración. Al macerar, las enzimas que se desarrollaron durante el proceso de malteado convierten o hidrolizan el almidón de la cebada en azúcar. El líquido resultante que contiene los azúcares es denominado mosto. Éste es transferido a un recipiente grande denominado cuba de fermentación, en donde es enfriado y se deja fermentar para formar el mosto fermentado. El residuo remanente después de la extracción de los azúcares solubles o del mosto es conocido como bagazo. Esto comprende los sólidos de cebada agotados o los granos agotados.

25 El mosto fermentado es destilado en un recipiente de destilación de cobre o alambique, aún conocido como mosto fermentado para producir un destilado líquido que contiene alcohol, conocido como alcoholes bajos. El residuo de destilación o licor remanente en el alambique después de la primera destilación de alcohol es conocido como mosto claro" o mosto oscuro. Los alcoholes bajos son destilados una segunda vez y algunas veces una tercera vez en alambiques de alcohol para producir alcohol bruto, que es madurado en vasijas de roble para producir whisky de malta. El licor remanente en la segunda y subsiguientes destilaciones es denominado posos agotados.

30 Los subproductos de la elaboración del whisky de malta comprenden por lo tanto el bagazo, el mosto claro y los posos agotados. El bagazo contiene los componentes que no son almidón de la cebada original y generalmente representa aproximadamente veinticinco por ciento de la cebada malteada total agregada a la cuba de maceración. Es rico en fibras digeribles y también contiene proteína concentrada y aceite de la cebada malteada. Es agradable al paladar para todos los tipos de ganado rumiante. El residuo de la primera destilación tiene un bajo contenido de sólidos totales y contiene células de levadura muertas, residuo de levadura, proteína soluble, nutrientes solubles, carbohidratos y otro material de los pasos de fermentación y maceración. También puede contener una cantidad significativa de cobre de los alambiques propiamente dichos. El residuo de la primera destilación es rico en nutrientes y puede ser usado como un alimento para la mayoría del ganado rumiante. Sin embargo, debido a su alto contenido de cobre, no es adecuado para las ovejas. El bagazo y los residuos de la primera destilación son categorizados actualmente como siendo de bajo valor económico.

### Síntesis de la invención

45 Los inventores de la presente solicitud han desarrollado un proceso para la elaboración de butanol, acetona y/u otros productos químicos renovables que utiliza los subproductos de bajo valor económico de la elaboración del whisky de malta, tales como el bagazo, los residuos de la primera destilación y/o los posos agotados.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un proceso para la elaboración de butanol y/o acetona, que comprende al menos las etapas de:

50 - tratar un sustrato que comprende el bagazo y los residuos de la primera destilación para hidrolizar el sustrato para proporcionar un sustrato tratado, dicho bagazo comprenden grano agotado que consiste esencialmente en cebada malteada; y

55 - fermentar el sustrato tratado en presencia de un cultivo de microorganismos que forman butanol y/o acetona a un pH inicial en el intervalo de 5,0 a 6,0 y a una concentración de iones de cobre libres de menos de 20 µM para proporcionar un producto fermentado que contiene butanol y/o acetona.

### Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que es posible llevar a cabo la fermentación en presencia de los residuos de la primera destilación. Se esperaba que el alto contenido de cobre en los residuos de la primera destilación de los alambiques de cobre inhibiera a los microorganismos que forman butanol y/o acetona, tales como las bacterias del género *Clostridium*. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que cuando el sustrato es diluido para bajar la concentración de iones de cobre libres a menos de 20  $\mu\text{M}$ , no hay un efecto inhibitor.

El uso de residuos de la primera destilación en la elaboración de butanol, acetona y/u otros productos químicos renovables tiene varias ventajas asociadas. Los residuos de la primera destilación están categorizados actualmente como de bajo valor económico. El uso de residuos de la primera destilación en la presente invención permite aumentar el valor económico de los residuos de la primera destilación. Además, los residuos de la primera destilación actúan como un solvente para disolver el sustrato. Así, la cantidad de agua o de otro diluyente requerido es reducida cuando se usan los residuos de la primera destilación. Además, los residuos de la primera destilación proporcionan nutrientes esenciales para los microorganismos mejorando la fermentación y la conversión total del sustrato en productos.

El uso de bagazo, posos agotados y/u otros sustratos de biomasa en la elaboración de butanol, acetona y/u otros productos químicos renovables también es ventajoso ya que proporciona una solución para la eliminación de estas sustancias. El bagazo, en particular, está categorizado actualmente como de bajo valor económico.

El bagazo, los residuos de la primera destilación y/o los posos agotados son subproductos de la elaboración del whisky de malta. El uso de estos subproductos en la presente invención permite por lo tanto reciclar los subproductos de bajo valor económico y ofrece una solución única para la eliminación de estos subproductos de la producción del whisky de malta.

El sustrato tiene que ser tratado para hidrolizarlo, degradando así el sustrato en una forma adecuada para la fermentación. Por consiguiente, en algunas formas de realización, el sustrato es sometido a una o más etapas de tratamiento para hidrolizarlo, por ejemplo, maceración, calentamiento, adición de ácido o álcali, adición de enzimas o una combinación de éstas. En algunas formas de realización, el tratamiento del sustrato para hidrolizarlo comprende la etapa de hidrolizar el sustrato en presencia de agua e iones de hidrógeno o agua e iones de hidróxido. En algunas formas de realización, el tratamiento del sustrato para hidrolizarlo es llevado a cabo en presencia de cualquier ácido adecuado que es capaz de hidrolizar el sustrato. Ejemplos de ácidos adecuados incluyen ácido sulfúrico y ácido nítrico. El ácido sulfúrico es un ejemplo preferido de un ácido para el uso en la presente invención. En algunas formas de realización, el tratamiento del sustrato para hidrolizarlo comprende la adición de una o más enzimas, tales como celulasa y hemicelulasa. En algunas formas de realización, se puede utilizar una combinación de tratamientos, por ejemplo, la adición de ambos, ácido y enzimas, para proporcionar un sustrato tratado en una forma adecuada para la fermentación. La combinación de tratamientos puede ser aplicada simultáneamente o secuencialmente.

En algunas formas de realización en donde el sustrato es bagazo y el diluyente son residuos de la primera destilación, el tratamiento puede comprender la adición de ácido y enzimas.

La fermentación del sustrato tratado es llevada a cabo a un pH inicial en el intervalo de 5,0 a 6,0, preferentemente en el intervalo de 5,3 a 5,7 y más preferentemente a 5,5. El uso de este intervalo de pH ha demostrado proporcionar altos rendimientos de butanol y/o acetona. Además, este intervalo de pH permite llevar a cabo la fermentación sin la necesidad de remover los sólidos de allí, reduciendo así los costos y evitando cualesquiera problemas técnicos causados por el requerimiento de remover los sólidos. Este intervalo de pH evita cualquier toxicidad potencial del sustrato tratado mientras maximiza la producción de butanol y/o acetona.

La fermentación es llevada a cabo en presencia de un cultivo de microorganismos que forman butanol y/o acetona. Los microorganismos que forman butanol y/o acetona pueden ser seleccionados de cualesquiera microorganismos que producen solvente que son capaces de fermentar el sustrato para formar butanol y/o acetona. Los microorganismos adecuados incluyen microorganismos creados por ingeniería genética para producir solventes. Ejemplos de microorganismos adecuados incluyen aquellos usados actualmente en la elaboración de ABE (Acetona/Butanol/Etanol), y, en particular, bacterias del género *Clostridium* tales como *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* y *C. saccharobutylicum*. En formas de realización particulares, los microorganismos que forman butanol y/o acetona comprenden *C. acetobutylicum*.

La fermentación es llevada a cabo a una concentración de iones de cobre libres de menos de 20  $\mu\text{M}$ . Esto asegura que la presencia de los iones de cobre no tenga efecto o sólo un efecto negativo mínimo. En algunas formas de realización, se puede agregar agua u otra solución acuosa para bajar la concentración de los iones de cobre libres a menos de 20  $\mu\text{M}$  de iones de cobre libres. En algunas formas de realización, la concentración de iones de cobre libres es menor de 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 ó 5  $\mu\text{M}$  de iones de cobre libres durante al menos la etapa de fermentación. En algunas formas de realización, la concentración de iones de cobre libres es menor de 15  $\mu\text{M}$ . En algunas formas de realización, la concentración de iones de cobre libres es menor de 10  $\mu\text{M}$ .

En algunas formas de realización, las etapas de tratamiento y fermentación son llevadas a cabo simultáneamente. Esto reduce la cantidad de tiempo requerida, el número de pasos involucrados y el costo de elaboración asociado.

En formas de realización alternativas, las etapas de tratamiento y fermentación son llevadas a cabo secuencialmente. Por ejemplo, el bagazo puede ser pretratado en dos etapas, primero con ácido y luego con enzimas, antes de la fermentación.

5 En algunas formas de realización, el producto fermentado comprende además uno o más de los compuestos seleccionados del grupo que comprende etanol, dióxido de carbono, hidrógeno, acetato y butirato. El butanol y/o la acetona pueden ser separados del producto fermentado usando técnicas de separación convencionales. Alternativamente, el producto fermentado puede ser usado como combustible o de otro modo sin purificación ulterior.

En algunas formas de realización en donde se utiliza el bagazo, el grano agotado consiste en 100% cebada malteada.

10 En algunas formas de realización en donde el sustrato comprende un subproducto de la elaboración del whisky de malta, el whisky de malta es un whisky de malta escocés.

El término "biobutanol", como se usa en la presente se refiere a butanol hecho a partir de biomasa.

El término "bagazo", como se usa en la presente se refiere a la composición de sólidos de cebada agotados y grano agotado que queda en un recipiente de maceración después de que el licor (mosto) ha sido retirado en la elaboración del whisky de malta.

15 El término "residuos de la primera destilación", como se usa en la presente se refiere al licor que queda en el mosto fermentado (alambique de cobre) después de la primera destilación en la elaboración de whisky de malta. Es el residuo del mosto fermentado después de la extracción por destilación de los alcoholes bajos.

20 El término "posos agotados", como se usa en la presente se refiere al licor que queda en el recipiente de destilación después de la segunda y las subsiguientes destilaciones en la elaboración del whisky de malta. Es el residuo de los *low wines* después de la extracción por destilación del alcohol bruto.

El término "que consiste esencialmente en cebada malteada" se entiende en la presente que se refiere a sustratos que no contienen, o sólo contienen mínimamente tipos de granos distintos de la cebada malteada. Por lo tanto comprende los subproductos de la elaboración del whisky de malta. Pretende abarcar granos de cebada malteados que contienen una cantidad mínima de impurezas distintas de otros tipos de grano.

25 El término "concentración de iones de cobre libres" se refiere a la concentración de iones de cobre que no está ligada a sólidos, es decir, la concentración de iones de cobre en el sobrenadante. La concentración total de cobre en los residuos de la primera destilación será mayor que la concentración de iones de cobre libres, ya que un poco de cobre queda ligado a sólidos, tales como las células de levadura muertas.

30 El término "whisky escocés", como se usa en la presente se refiere a whisky hecho en Escocia. En formas de realización alternativas, el whisky de malta es un whisky de malta elaborado en otros países, tales como Irlanda o India, en donde el proceso para la elaboración del whisky de malta en ese país es similar o idéntico al proceso usado en Escocia para la elaboración del whisky de malta escocés.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan con el propósito de ilustración y no pretenden ser interpretados como limitando la presente invención.

### 35 **Breve descripción de las Figuras**

40 La Figura 1 muestra la influencia del pH inicial sobre la fermentación el bagazo pretratado con ácido y enzimas en residuos de la primera destilación por *C. acetobutylicum* ATCC 824. El bagazo fue pretratado con 0,08 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el pH se ajustó a entre pH 5,0 - 6,0 antes de la adición de la enzima. Después de la hidrólisis enzimática, el pH fue ajustado a 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5 para fermentación. La Figura 1 (a) muestra azúcares resultantes del tratamiento con ácido y enzimas, la Figura 1 (b) muestra azúcares residuales después de la fermentación, la Figura 1 (c) muestra los productos ABE de la fermentación y la Figura 1 (d) muestra el rendimiento de butanol y ABE del bagazo;

la Figura 2 compara la producción de ABE por *C. acetobutylicum* ATCC 824 de bagazo pretratado con ácido o bien en agua o residuos de la primera destilación. Después del tratamiento con ácido, el pH fue ajustado a pH 5,5 y se agregaron enzimas y microorganismos;

45 la Figura 3 muestra la producción de ABE por *C. acetobutylicum* ATCC 824 y *C. beijerinckii* NCIMB 8052 del bagazo a una escala de 1 L; y

la Figura 4 muestra la producción de ABE por *C. saccharoperbutylacetonicum* NCIMB 12606 de (a) papel de oficina blanco y (b) papel de periódico disuelto o bien en agua o 50% de residuos de la primera destilación.

### **EJEMPLOS**

50 **Métodos generales**

Se usaron los siguientes organismos: *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. beijerinckii* NCIMB 8052 y *C. saccharoperbutylacetonicum* NCIMB 12606. Los clostridios se mantuvieron como suspensiones de esporas a 4 °C. Las esporas fueron sometidas a shock térmico a 80 °C durante 10 minutos e inoculadas en medio de clostridios reforzado (RCM, Oxoid Ltd, Cambridge, RU). Los cultivos fueron incubados durante 24 horas y luego subcultivados en medio de triptona-extracto de levadura- acetato de amonio (TYA) conteniendo glucosa antes de ser usados como un cultivo de partida (a 5% v/v) para todos los experimentos. TYA consistía en (g/l) triptona, 6; extracto de levadura, 2; acetato de amonio, 3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,3; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 suplementado con 5% de glucosa. Todos los cultivos de clostridios fueron incubados en una estación de trabajo anaeróbica bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80:10:10) a 33 °C. Para una escala de 1 L, las fermentaciones se realizaron en fermentadores (Biostat A Plus, Sartorius Stedim Ltd, Surrey, RU). Se lograron condiciones libres de oxígeno rociando el medio en los fermentadores con N<sub>2</sub> libre de oxígeno durante 1 hora antes de la inoculación con clostridios. Para todas las fermentaciones de 1 L, la agitación se fijó a 200 rpm y la temperatura a 33 °C.

El bagazo húmedas, como se recibieron de las destilerías, tenían un contenido de humedad de entre 75 y 80%. En donde se indica, el bagazo se secaron a 80 °C a un contenido de humedad de aproximadamente 4% y se molieron antes del procesamiento ulterior.

Los solventes (etanol, acetona y butanol) fueron analizados usando un cromatógrafo de gas Chrompack 9001 equipado con un detector de ionización de llama y una columna CP SIL 5CB de 10 m de longitud y 0,32 mm de diámetro (todos de Chrompack, Middelburg, Países Bajos). Todas las muestras fueron filtradas a través de filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,2 µm antes del análisis y se determinaron las concentraciones por referencia con estándares de etanol, acetona y butanol.

Para el análisis del ácido (acético y butírico) y los monosacáridos (glucosa, xilosa y arabinosa), se filtraron las muestras a través de filtros de jeringa de 0,2 µm y se acidificaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las muestras fueron analizadas por HPLC usando un Varian 920 LC equipado con detectores de índice refractario y longitud de onda UV-VIS integrados (Varian Ltd., Oxford, RU). Los componentes fueron separados a temperatura ambiente en una columna Rezex ROA ácido orgánico H<sup>+</sup> 8% de 300 x 7,8 mm (Phenomenex, Cheshire, RU) con 0,005 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como la fase móvil a un caudal de 0,5 ml/min. Los ácidos fueron detectados a 210 nm mientras que los azúcares fueron detectados con el detector RI y se determinaron las concentraciones por referencia con respecto a los estándares correspondientes.

#### Ejemplo 1 - Composición del bagazo

Se recogieron el bagazo de tres diferentes destilerías de malta en Escocia. La composición de monosacáridos del bagazo fue analizada de acuerdo con el Procedimiento Analítico de Laboratorio desarrollado por el laboratorio National Renewable Energy Lab para el análisis de los carbohidratos estructurales (Sluiter *et al*, 2008. NREL. *Laboratory analytical procedure for the determination of structural carbohydrates and lignin in biomass*. NREL/TP-510-42618).

Los resultados de los análisis se presentan en la Tabla 1. Glucosa, xilosa y arabinosa eran los azúcares predominantes, con niveles muy bajos de galactosa (menos de 2%) y no se detectó manosa. Hubo una pequeña variación en la composición de azúcares del bagazo de diferentes destilerías. En base a estos valores, la hidrólisis completa del bagazo (10,5% de bagazo seco (p/v) como se usó en los experimentos detallados más abajo) deberían rendir aproximadamente 50 g/l de monosacárido.

Tabla 1. Composición de monosacáridos del bagazo

Fuente	Azúcar (g/100 g bagazo)			Total
	Glucose	Xilosa	Arabinosa	
Destilería 1	20,9 ± 0,2	21,3 ± 0,1	9,0 ± 0,2	51,2 ± 0,2
Destilería 2	18,4 ± 0,2	21,3 ± 0,2	9,2 ± 0,0	48,8 ± 0,4
Destilería 3	20,5 ± 0,0	21,6 ± 0,3	9,3 ± 0,0	51,3 ± 0,3

#### Ejemplo 2 - Efecto del control del pH sobre la producción de solventes por clostridios

Se investigó el efecto del pH sobre la fermentación de glucosa en medio TYA por *C. acetobutylicum* ATCC 824. Las fermentaciones se realizaron a una escala de 1 L y el pH fue controlado a un intervalo de puntos fijados entre pH 4,5-6,5 con la adición automatizada de o bien álcali o ácido. A pH 4,5, no se detectó utilización de glucosa, producción de ácido o ABE. Para todas las otras fermentaciones, la glucosa se consumió completamente dentro de las 48 horas y se produjeron ácidos (butírico y acético) y solvente (acetona, butanol y etanol) (Tabla 2). La producción de ABE fue más alta a pH 4,8 y 5,0, correspondiendo a rendimientos de 0,34 y 0,30 g de ABE/g de azúcar, respectivamente.

La producción de ácido aumentó entre pH 5,5 y 6,5, con una disminución correspondiente en la conversión de azúcar a ABE. A pH 6,5, los ácidos sólo fueron producidos con concentraciones finales de 7,8 y 12,8 g/l de ácido acético y butírico, respectivamente.

5 Tabla 2. Conversión de 5% de glucosa a ácido y ABE por *C. acetobutylicum* ATCC 824 en medio TYA controlado o bien a pH 4,8, 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5. Las concentraciones de ácido (butírico y acético) y ABE fueron determinadas después de 68 horas con el rendimiento de ABE expresado como g de ABE producido por g de azúcar consumida.

pH	Ácido (g/l)	ABE (g/l)	Rendimiento (g de ABE/g azúcar)
4,8	0,7	15,2	0,34
5,0	0,9	14,3	0,30
5,5	7,9	12,3	0,25
6,0	13,6	6,7	0,13
6,5	20,5	0,6	0,01

#### Ejemplo 3 - Residuos de la primera destilación como medio de cultivo

10 Los residuos de la primera destilación fueron recogidos de una destilería de malta escocesa y analizados con respecto al contenido de cobre. Los residuos de la primera destilación tenían 71,8 µM del Cu total de los cuales se determinó que 21,1 µM estaban disponibles como Cu "libre" en el sobrenadante con el resto unido a los sólidos. Para evaluar si esta concentración de Cu era tóxica para *C. acetobutylicum* ATCC 824, se comparó la fermentación de glucosa al 5% en 100 ml de medio TYA suplementado con diferentes concentraciones de Cu (Tabla 3). El Cu no tuvo efecto sobre la producción de ABE a 5 y 10 µM siendo las concentraciones de ABE de aproximadamente 12 g/l similares a las del control sin Cu. A la concentración más alta de Cu, la concentración de ABE se redujo a 8,6 g/l, indicando que a esta

15 concentración Cu era inhibidor para los clostridios. Como los residuos de la primera destilación tenían un contenido de Cu "libre" de 21,1 µM, se decidió testear la fermentación de clostridios en residuos de la primera destilación a mitad de la concentración para reducir la concentración de Cu por debajo de los niveles inhibidores. Los residuos de la primera destilación de mitad de la concentración suplementados con glucosa proporcionaron suficientes nutrientes para el cultivo de 824 con una producción de ABE similar a la del TYA control (Tabla 3).

20 Tabla 3. Conversión de glucosa al 5% a ABE por *C. acetobutylicum* ATCC 824 en o bien TYA, TYA que contenía 5, 10 o 20 µM de Cu o 50% de residuos de la primera destilación.

Medio	ABE (g/l)
TYA	12,4±0,3
TYA, 5 µM Cu	12,3±0,3
TYA, 10 µM Cu	11,6±0,1
TYA 20 µM Cu	8,6±2,0
50% residuos de la primera destilación	12,0±1,7

#### Ejemplo 4 - Influencia del pH inicial sobre la fermentación de bagazo hidrolizado

25 Se investigó el efecto del pH inicial sobre la fermentación de bagazo pretratado. Bagazo secado, molido, fue pretratado agregando 10,5% (p/v) a frascos Duran de 250 ml con 0,08 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 50% de residuos de la primera destilación y se esterilizaron a 121 °C durante 15 min. Después de enfriar, se ajustó el pH a entre pH 5,0 y -6,0 por adición de 10 M de NaOH y se incubaron con enzimas celulasa y hemicelulasa a 33 °C durante 24 horas. Para la fermentación, el pH

de las soluciones se ajustó a o bien 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5 antes de la inoculación con *C. acetobutylicum* ATCC 824. La concentración inicial de azúcar fue monitoreada antes de la fermentación y el azúcar residual, la concentración de ABE y el rendimiento de ABE fueron calculados después de la fermentación (Fig. 1). La concentración inicial de azúcares era similar para todas las muestras, con aproximadamente 9,6, 11,2 y 9,9 g/l de glucosa, xilosa y arabinosa.

- 5 No se observó crecimiento o producción de gas a pH 5,0 o más bajo y no se utilizaron azúcares. La producción de ABE fue mayor a pH 5,5 (14,2 g/l) con un rendimiento de 13,2 g/100 g de bagazo. Esto se redujo a pH 6,0, con 9,3 g de ABE/100 g de bagazo. A pH 6,5, aproximadamente la mitad del azúcar se utilizó pero hubo poca conversión a ABE con una concentración final de 2,3 g/l.

Ejemplo 5 - Fermentación de bagazo pretratado con ácido en residuos de la primera destilación o agua

- 10 Bagazo seco, molido (10,5% p/v) fueron pretratadas con 0,08 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en o bien agua o residuos de la primera destilación en 250 ml frascos de Duran por esterilización a 121 °C durante 15 minutos. Después de enfriar, se ajustó el pH a 5,5 por la adición de 10 M de NaOH. Se agregaron enzimas celulasa y hemicelulasa y se agregó un inóculo de *C. acetobutylicum* ATCC 824 y los frascos se incubaron a 33 °C. La concentración de ABE fue determinada después de la fermentación (Fig 2). Para el bagazo en agua, el rendimiento de ABE fue de 14,0 g de ABE/100 g de bagazo mientras
- 15 que en los residuos de la primera destilación, se obtuvo un rendimiento de 14,9 g de ABE/100 g de bagazo.

Ejemplo 6 - Conversión de bagazo a butanol y acetona a una escala de 1 L

El bagazo (10,5% p/v) fueron pretratadas con 0,08 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 50% de residuos de la primera destilación en fermentadores de 1 L por esterilización a 121 °C durante 15 minutos. En este caso el bagazo se usó húmedo, como se recibieron de la destilería, sin procesamiento ulterior. Después de enfriar a 33 °C, se ajustó el pH a pH 5,5 por la

- 20 adición de 10 M de NaOH y los fermentadores fueron rociados con N<sub>2</sub>. Después de la desgasificación, se agregaron las enzimas y o bien 824 o 8052 y se analizaron los solventes al final de la fermentación. La fermentación por *C. acetobutylicum* ATCC 824 y *C. beijerinckii* NCIMB 8052 dio por resultado niveles de ABE de 11,3 y 12,8 g/l, respectivamente (Fig 3). Esto correspondió a tasas de conversión de 10,6 y 12,1 g de ABE por 100 g de bagazo, respectivamente.

- 25 Ejemplo 7 - Proceso para la conversión de papel de desecho a butanol y acetona

Papel de oficina blanco y papel de periódico fueron cortados en tiras de 5 mm de ancho y 6,7% (p/v) se mezcló con o bien agua o 50% de residuos de la primera destilación en frascos de Duran de 250 ml y se ajustó el pH a pH 5,5. Después de la esterilización, los frascos se enfriaron y se agregaron celulasa y *C. saccharoperbutylacetonicum* NCIMB 12606. Después de la fermentación, se determinaron las concentraciones de ABE (Fig. 4). Hubo una pobre conversión

- 30 de papel as ABE en agua en comparación con los residuos de la primera destilación, demostrando que se requerían los residuos de la primera destilación para proporcionar nutrientes adicionales. En los residuos de la primera destilación, los rendimientos de ABE después de la fermentación con *C. saccharoperbutylacetonicum* eran 24,8 g de ABE por 100 g de papel de oficina y 16,8 g de ABE por 100 g de papel de periódico.

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la elaboración de butanol y/o acetona, que comprende al menos las etapas de:
  - tratar un sustrato que comprende bagazo, que es un subproducto de la elaboración de whisky de malta, y los residuos de la primera destilación, que son un subproducto de la elaboración del whisky de malta de un recipiente de destilación de cobre, para hidrolizar el sustrato para proporcionar un sustrato tratado, dicho bagazo comprende grano agotado que consiste esencialmente en cebada malteada; y
  - fermentar el sustrato tratado en presencia de un cultivo de microorganismos que forman butanol y/o acetona a un pH inicial en el intervalo de 5,0 a 6,0 y a una concentración de iones de cobre libres de menos de 20  $\mu\text{M}$  para proporcionar un producto fermentado que contiene butanol y/o acetona.
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde el pH inicial se encuentra en el intervalo de 5,3 a 5,7.
3. El proceso según la reivindicación 1 ó 2, en donde la fermentación es llevada a cabo sin la remoción de sólidos de allí.
4. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el grano agotado consiste en 100% de cebada malteada.
5. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual las etapas de tratamiento y fermentación son llevadas a cabo simultáneamente.
6. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual las etapas de tratamiento y fermentación son llevadas a cabo secuencialmente.
7. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el sustrato es diluido para bajar la concentración de iones de cobre libres a menos de 15  $\mu\text{M}$  durante al menos la etapa de fermentación.
8. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el bagazo son proporcionadas por las etapas adicionales de:
  - moler la cebada malteada que comprende almidón para proporcionar cebada malteada molida;
  - mezclar la cebada malteada molida con agua para proporcionar una masa macerada que comprende agua y cebada malteada molida;
  - hidrolizar al menos una parte del almidón en la cebada malteada molida de la masa macerada para proporcionar bagazo que comprenden los sólidos de cebada agotados y mosto que comprende agua y uno o más carbohidratos seleccionados del grupo que comprende glucosa y oligosacáridos de glucosa; y
  - separar el bagazo del mosto.
9. El proceso según la reivindicación 8, en donde los residuos de la primera destilación son proporcionados por las etapas adicionales de:
  - agregar levadura al mosto;
  - fermentar el mosto para proporcionar un mosto fermentado que comprende agua y uno o más alcoholes; y
  - destilar el mosto fermentado en un recipiente de destilación de cobre para proporcionar un destilado de flemas que comprende uno o más alcoholes y un residuo de destilación de residuos de la primera destilación.
10. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tratamiento del sustrato para hidrolizarlo comprende la etapa de:
  - hidrolizar el sustrato en presencia de agua e iones de hidrógeno o agua e iones de hidróxido.
11. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el tratamiento del sustrato para hidrolizarlo comprende la etapa de:
  - hidrolizar el sustrato en presencia de una solución acuosa de ácido sulfúrico.
12. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el tratamiento del sustrato para hidrolizarlo comprende la etapa de:
  - tratar el sustrato con una o más enzimas.



13. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el cultivo de los microorganismos que forman butanol y/o acetona comprende bacterias del género *Clostridium*.

5 14. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el producto fermentado comprende además uno o más de los compuestos seleccionados del grupo que comprende etanol, dióxido de carbono, hidrógeno, acetato y butirato.

15. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el whisky de malta es whisky de malta escocés.

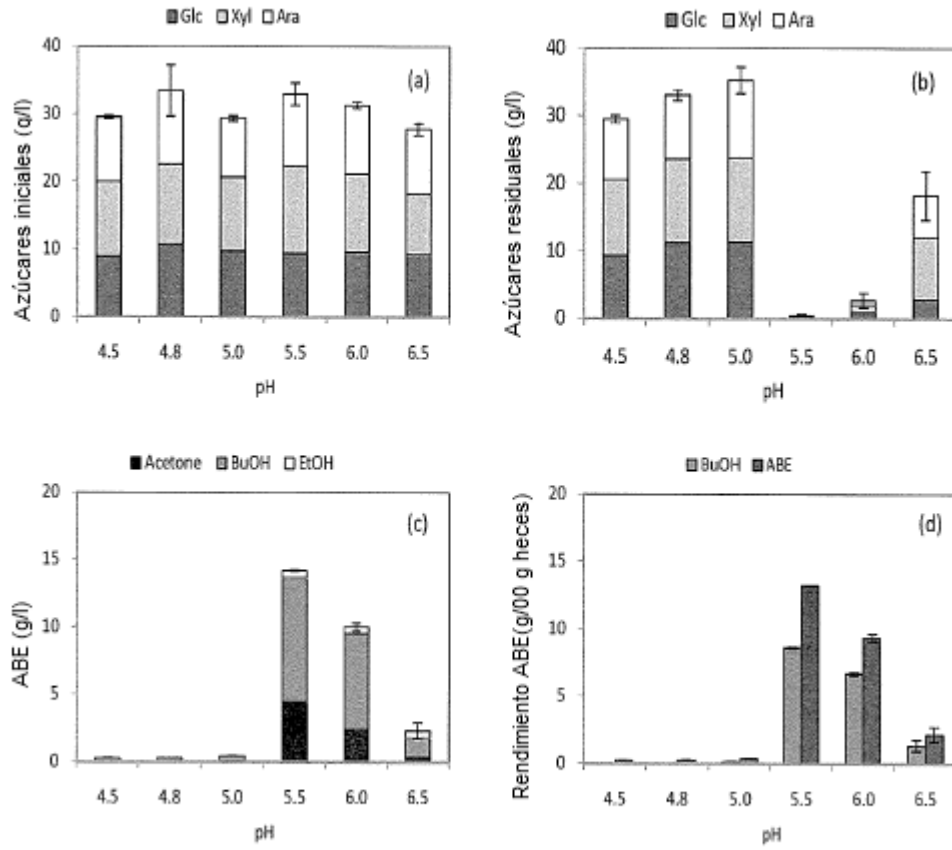


Figura 1

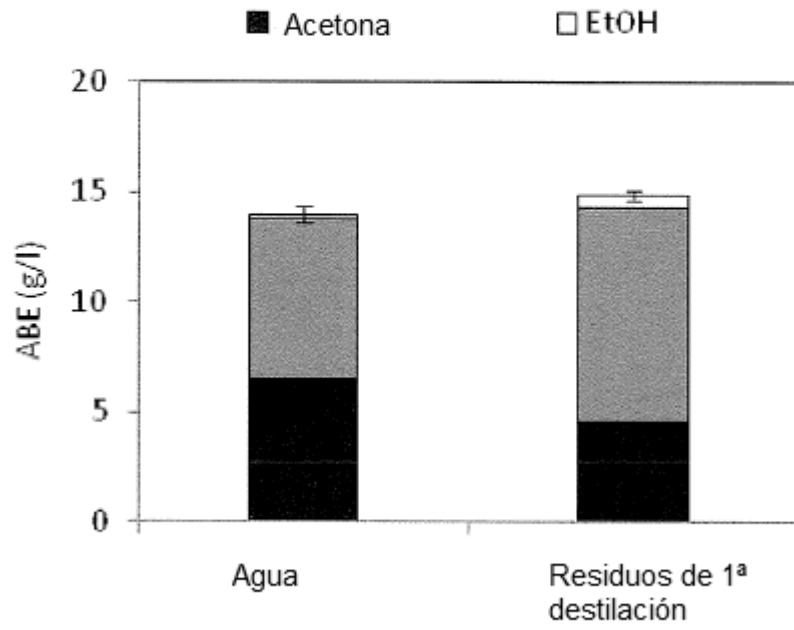


Figura 2

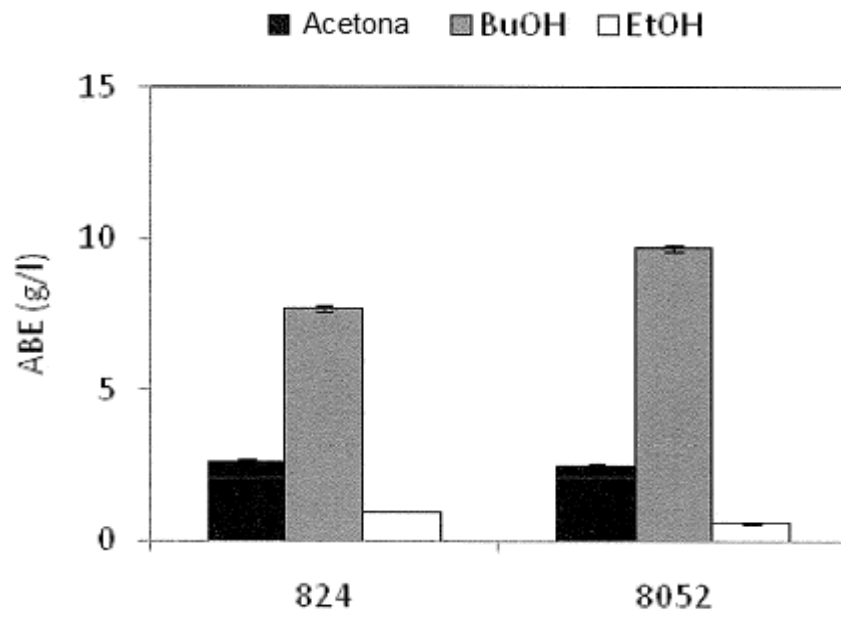


Figura 3

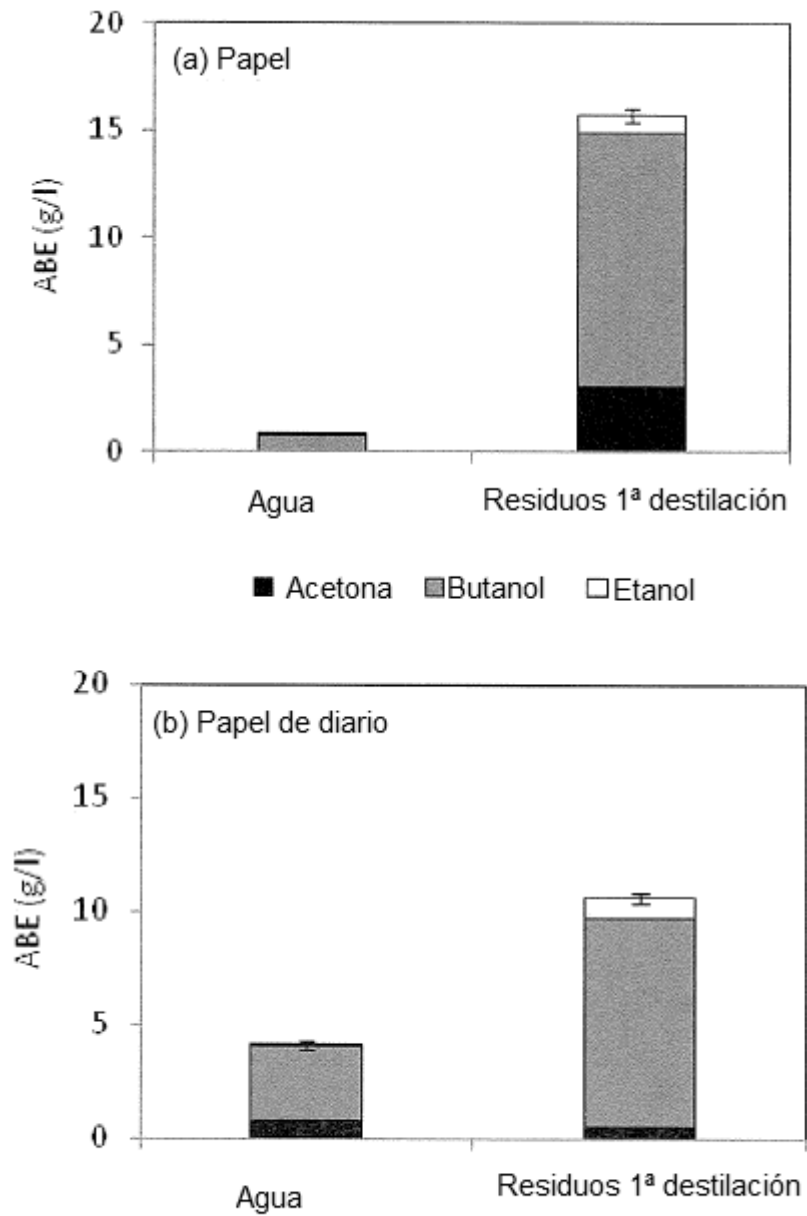


Figura 4