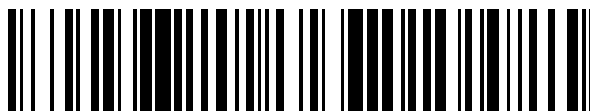


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 719**

51 Int. Cl.:

C12P 7/16 (2006.01)

C12P 7/36 (2006.01)

C12P 7/34 (2006.01)

C12F 3/06 (2006.01)

C12F 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2011** **PCT/GB2011/051238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012** **WO12001417**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2011** **E 11738780 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018** **EP 2588621**

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:

16.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 663 719 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. Tal reacción de fermentación se denomina frecuentemente como el "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
15 paja y tallos de maíz. Tales sustratos proporcionan un equilibrio de nutrientes necesario para favorecer el crecimiento del organismo durante la fermentación. 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 Muchos sustratos actuales para la fabricación de butanol y/o acetona por fermentación utilizan los cultivos energéticos discutidos anteriormente, que ya son muy demandados como ingredientes para alimentos en lugar de como sustratos para biocombustibles. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un proceso para la fabricación de butanol y/o acetona utilizando sustratos alternativos.

25 Además de los cultivos energéticos y los subproductos agrícolas, otros materiales orgánicos, como los productos orgánicos de desecho y/o los subproductos orgánicos de procesos de fabricación, pueden ser componentes potenciales del sustrato. Sin embargo, muchos demuestran ser inadecuados. Por ejemplo, algunos desechos orgánicos o subproductos pueden no contener el equilibrio de nutrientes adecuados para promover el crecimiento del organismo, pueden ser dañinos para el organismo y/o pueden no contener suficientes nutrientes esenciales en una forma accesible para el organismo. Por esta razón, muchos desechos orgánicos o subproductos tienen una utilidad limitada como sustratos y, por consiguiente, tienen poco valor económico.

30 La presente invención proporciona un proceso para la fabricación de butanol y/o acetona utilizando un sustrato que comprende mosto claro, un subproducto orgánico de bajo valor producido como parte de la fabricación de whisky, particularmente whisky de malta.

35 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
40 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.

45 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.

50 Los subproductos de la elaboración del whisky de malta comprenden por lo tanto el bagazo, el mosto claro y los posos agotados. El mosto claro 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 mosto claro tiene un contenido bajo en nutrientes y puede tener un contenido de cobre elevado, lo que hace difícil que se pueda utilizar en la industria. Se desechan en el mar cantidades significativas con un coste para la industria. El documento GB02591 (solicitud de patente británica publicada en el año 1908) describe un método para fermentar el
55 mosto claro o una mezcla de mosto claro y melazas en alcohol usando cepas de levadura encontradas en bayas silvestres.

La publicación de la solicitud de patente JP2005328801 describe la producción de butanol mediante fermentación de una disolución de cultivo que comprende residuos alimentarios y posos agotados de la producción shochu.

El artículo de Schenkman L, Science, vol. 329, página 999, publicado el 27.08.2010, es una divulgación intermedia publicada después de la fecha de prioridad más temprana, pero antes de la fecha de presentación internacional de la presente solicitud de patentes. Describe un proceso para producir butanol mediante fermentación de una mezcla de bagazo y mosto claro usando Clostridia

Síntesis de la invención

Los inventores de la presente solicitud han desarrollado un proceso para la elaboración de butanol y/o acetona que utiliza mosto claro, un subproducto de valor económico bajo o negativo de la primera destilación de alcohol de un recipiente de destilación de cobre en la elaboración del whisky de malta, y un sustrato de biomasa distinto del bagazo, tal como el obtenido a partir de un producto orgánico agotado y/o un subproducto orgánico.

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

- tratar el mosto claro y un sustrato de biomasa distinto del bagazo, siendo el mosto claro un subproducto de la primera destilación del alcohol de un recipiente de destilación de cobre en la elaboración del whisky de malta, solubilizar al menos una parte del sustrato de biomasa para proporcionar un sustrato tratado; y

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

En una realización, el mosto claro es el subproducto de la elaboración de whisky de malta escocés.

En una realización adicional, el sustrato de biomasa se selecciona de uno o más del grupo que comprende papel, lodo de la fabricación del papel, residuos de fruta y verduras, residuos de la industria de repostería, algas marinas y extractos de algas marinas, derivados de silvicultura, residuos de cultivos alimentarios, grano y cultivos, chocolate, algas (macro y micro algas), cultivos no comestibles (y residuos) y cultivos energéticos tales como pasto aguja. Un sustrato particularmente preferido es papel, tal como papel de deshecho. Alternativamente el sustrato puede ser deshecho alimentario y/o sustrato de trigo o derivados de trigo tales como pan.

En una realización adicional, el producto fermentado puede comprender además uno o más de los compuestos seleccionados del grupo que comprende etanol, dióxido de carbono, hidrógeno, acetato y butirato. Opcionalmente, el sustrato puede comprender un diluyente, que se puede seleccionar de uno o más del grupo que comprende agua, posos agotados y líquido agotado de otras fermentaciones. En particular, el diluyente puede ser agua.

En una realización aún adicional la etapa de tratar el sustrato puede comprender además:

- Diluir el sustrato para proporcionar una concentración de iones cobre libres de menos de 20 μM .

En una realización, la etapa de tratar el sustrato puede comprender:

- Hidrolizar el sustrato de biomasa en presencia de agua e iones de hidrógeno o agua e iones hidróxido.

En otra realización, la etapa de tratar el sustrato puede comprender:

- Hidrolizar el sustrato de biomasa en presencia de una disolución acuosa de ácido sulfúrico.

Opcionalmente, la etapa de tratamiento del sustrato no comprende calentar el sustrato a temperatura elevada (es decir, por encima de 120°C, preferiblemente por encima de 100 °C, y lo más preferiblemente por encima de 80°C) y/o tratar el sustrato con u ácido, tal como ácido sulfúrico. Esta opción particular es particularmente adecuada para el tratamiento de papel o productor derivados de papel como sustratos.

Aún en otra realización, la etapa de tratamiento del sustrato comprende:

- Tratar el sustrato de biomasa con una o más enzimas.

En una realización, la etapa de fermentación del sustrato tratado se puede realizar a un pH de 5,1 o superior. Típicamente, el pH está en un intervalo de desde 5,3 a 5,7, incluso más típicamente a un pH de aproximadamente 5,5. El pH se puede ajustar durante la etapa de fermentación del sustrato tratado con un tampón. Alternativamente, no se requiere ajuste del pH, en particular cuando el sustrato es tiene como origen madera o papel.

En otra realización, la concentración de iones de cobre libres en la etapa de fermentación puede ser menor que 15 μM . La concentración de iones de cobre libres se puede reducir mediante la adición de un diluyente al sustrato tratado, tal como un diluyente como se describe anteriormente.

Todavía en una realización adicional, el cultivo de microorganismos formadores de butanol- y/o acetona puede comprender bacterias del género *Clostridium*. Ejemplos son *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. saccharolyticum* NCP 262, *C. beijerinckii* NCIMB 8052 y *C. saccharoperbutylacetonicum* NCIMB 12606 (N1-4).

En otra realización, la etapa de fermentación se puede realizar sin la eliminación de los sólidos que hay allí.

- 5 En realizaciones adicionales, las etapas de tratamiento y fermentación se pueden realizar simultáneamente o se pueden realizar secuencialmente.

En una realización, el mosto claro puede proporcionarse mediante las etapas de:

- añadir levadura a un mosto que comprende agua y uno o más hidratos de carbono seleccionados del grupo que comprende glucosa y oligosacáridos de glucosa;
- 10• 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 alcoholes bajos que comprende uno o más alcoholes y un residuo de destilación de mosto claro.

En una realización adicional, el mosto se puede proporcionar mediante las etapas de:

- moler cebada malteada que comprende almidón para proporcionar cebada malteada molida;
- 15• mezclar la cebada malteada molida con agua para proporcionar una masa macerada que comprende agua y la cebada malteada molida;
- hidrolizar al menos una parte del almidón en la cebada malteada molida de la masa macerada para proporcionar bagazo que comprende sólidos de cebada agotados y mosto que comprende agua y uno o más hidratos de carbono seleccionados del grupo que comprende glucosa y oligosacáridos de glucosa; y
- 20• separar el bagazo del mosto.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención utiliza mosto claro y un sustrato de biomasa distinto del bagazo como un sustrato en la elaboración de butanol y/o acetona mediante un proceso de fermentación. En particular, 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 tiene una concentración de iones de cobre libres a menos de 20 μ M, no hay un efecto inhibidor.

30 El mosto claro proporcionado directo del primer residuo de destilación del recipiente de cobre tiene generalmente una concentración de iones cobre libres a niveles que son perjudiciales para los microorganismos que forman butanol y/o acetona, tales como concentraciones de cobre que exceden 20 μ M. Consecuentemente, el mosto claro sin modificar puede ser un medio no adecuado para formar el sustrato de biomasa. Sin embargo, se pueden alcanzar concentraciones de cobre libres que no son inhibitorias para los microorganismos formadores de butanol y/o acetona reduciendo la concentración de ión cobre libre, por ejemplo, diluyendo el mosto claro bien antes de que se combine con el sustrato de biomasa para proporcionar el sustrato, bien después de combinarse con el sustrato de biomasa para proporcionar el sustrato, o después del tratamiento del sustrato para proporcionar el sustrato tratado. Sin embargo, será aparente que siempre que se lleve a cabo la reducción de la concentración de ion cobre libre, esta debería ser preferiblemente antes de la combinación del sustrato tratado que comprende el mosto claro con los microorganismos formadores de butanol y/o acetona para evitar que se dañen los microorganismos.

40 El uso de mosto claro en la elaboración de butanol, acetona y/u otros productos químicos renovables tiene varias ventajas asociadas. El mosto claro está categorizado actualmente como de valor económico bajo o negativo. El uso de mosto claro en la presente invención permite aumentar el valor económico del mosto claro. Además, el mosto claro actúa como un diluyente para hidratar el sustrato de biomasa. Así, la cantidad de agua o de otro diluyente requerido es reducida cuando se usa mosto claro. Además, el mosto claro proporciona nutrientes esenciales para los microorganismos, proporcionando particularmente una fuente de nitrógeno que mejora de ese modo la fermentación y la conversión total del sustrato en productos.

El uso de desechos orgánicos o subproductos como el sustrato de biomasa en el sustrato para la elaboración de butanol y/o acetona y opcionalmente otros productos químicos también es ventajoso ya que proporciona una solución para la eliminación de estas sustancias.

50 En ciertos aspectos, la presente invención utiliza papel, y en particular papel de desecho como un sustrato de biomasa. La presente invención proporciona además por lo tanto una solución para la eliminación del papel de desecho, por

ejemplo, viejos periódicos o papel de fotocopidora usado. Debería señalarse que se ha encontrado necesario el uso de mosto claro para crear un medio adecuado de fermentación para la producción de butanol y/o acetona a partir de sustratos basados en papel.

El sustrato tiene que ser tratado para solubilizar al menos una parte del sustrato de biomasa. La solubilización puede tomar la forma de hidrólisis, rompiendo de ese modo el sustrato de biomasa 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 solubilizar, y particularmente hidrolizar el sustrato de biomasa, por ejemplo, por 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 solubilizar el sustrato de biomasa comprende la etapa de hidrolizar el sustrato de biomasa en presencia de agua e iones de hidrógeno o agua e iones de hidróxido. En algunas formas de realización, el tratamiento del sustrato de biomasa para solubilizarlo es llevado a cabo en presencia de cualquier ácido adecuado que es capaz de hidrolizar el sustrato de biomasa. Ejemplos de ácidos adecuados incluyen ácido sulfúrico y ácido nítrico. El ácido sulfúrico es un ejemplo preferido de un ácido para el uso en el proceso descrito en la presente memoria. Cuando el sustrato está basado en papel o derivado de papel, no se requiere el tratamiento térmico o con ácido.

En algunas formas de realización, el tratamiento del sustrato para hidrolizar el sustrato de biomasa 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. Cuando el sustrato comprende al menos uno de papel, desecho de papel trigo y productos basados en trigo tales como pan, el tratamiento puede comprender la adición de enzimas. Este tratamiento enzimático ocurre a una temperatura inferior a la que es óptima para la actividad enzimática (i.e. aproximadamente 50°C). Más específicamente, la temperatura puede ser la misma que la temperatura de fermentación (por ejemplo 33°C), permitiendo que ambos procesos ocurran simultáneamente. Los intervalos de temperatura adecuados pueden ser 25 a 40 °C, preferiblemente 30 a 35°C, y más preferiblemente 32 a 34°C. Se puede requerir tratamiento enzimático solo debido a que las etapas anteriores de la elaboración de productos tales como desechos de pan y/o papel pueden concentrar el contenido de hidratos de carbono y eliminar materiales inhibidores (por ejemplo lignina de productos basados en papel).

La fermentación del sustrato tratado es llevada a cabo a un pH en el intervalo de 5,1 o superior, más preferiblemente en el intervalo de desde 5,2 a 6, incluso más preferiblemente en el intervalo de 5,2 a 5,7 e incluso más preferiblemente a aproximadamente 5,5. El uso del intervalo de pH de 5,3 a 5,7 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*. De acuerdo con una opción, los microorganismos que forman butanol y/o acetona comprenden *C. acetobutylicum*. De acuerdo con otra opción, los microorganismos comprenden *C. Saccharoperbutylacetonicum*. Esta cepa particular es particularmente efectiva en sustratos basados en papel.

La fermentación es llevada a cabo a una concentración de iones de cobre libres de menos de 20 µM. Esto asegura que la presencia de los iones de cobre no tenga efecto o sólo un efecto negativo mínimo. Se puede agregar agua u otra solución acuosa para bajar la concentración de los iones de cobre libres a menos de 20 µM de iones de cobre libres. Después la concentración de iones de cobre libres puede ser menor que 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 ó 5 µM de iones de cobre libres durante al menos la etapa de fermentación. La concentración de iones de cobre libres puede ser menor que 15 µM. La concentración de iones de cobre libres puede ser menor que 10 µM.

Las etapas de tratamiento y fermentación pueden llevarse a cabo simultáneamente. Esto reduce la cantidad de tiempo requerida, el número de pasos involucrados y el costo de elaboración asociado.

Alternativamente, las etapas de tratamiento y fermentación se pueden llevar a cabo secuencialmente. Por ejemplo, el sustrato puede ser pretratado en dos etapas, primero con ácido y luego con enzimas, antes de la fermentación.

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.

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

El término “mosto claro”, 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.

- 5 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 alcoholes bajos después de la extracción por destilación del alcohol bruto.

- 10 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.

- 15 El término “whisky escocés”, como se usa en la presente se refiere a whisky hecho en Escocia. Alternativamente, 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.

Breve descripción de las Figuras

- 20 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 H₂SO₄ 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 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 mosto claro al 50%.

- 25 La figura 3 muestra la producción de acetona, butanol y etanol a partir de fermentaciones (150 ml) llevadas a cabo con papel blanco solubilizada con agua, acetato de amonio o mosto claro al 50%.

Las figuras 4a a 4c muestran la producción de acetona, butanol y etanol a partir de fermentaciones (150 ml) llevadas a cabo con cuatro cepas de clostridia en a) papel blanco, b) papel de periódico y c) papel de folios. Los sustratos se diluyeron en mosto claro al 50%, tamponados a pH 5,5 y tratados con enzimas industriales.

- 30 La figura 5 muestra la producción de acetona, butanol y etanol a partir de fermentaciones (150 ml) llevadas a cabo con cuatro cepas de clostridia en pan en mosto claro.

La figura 6 muestra la producción de acetona, butanol y etanol a partir de fermentaciones (150 ml) llevadas a cabo con cuatro cepas de clostridia en trigo en mosto claro.

- 35 La figura 7 muestra la producción de acetona, butanol y etanol a partir de fermentaciones (150 ml) llevadas a cabo con dos cepas de clostridia en desechos de comida en mosto claro.

La figura 8 muestra la producción de acetona, butanol y etanol a partir de fermentaciones (150 ml) llevadas a cabo con cuatro cepas de clostridia en mosto claro con trigo que se ha sometido a tratamiento ácido.

La figura 9 muestra la producción de acetona, butanol y etanol a partir de fermentaciones (150 ml) llevadas a cabo con papel de periódico, papel blanco y folios sin tamponado.

40 EJEMPLOS

El ejemplo de referencia 1 y el ejemplo 2 y 3 muestran el efecto del pH e iones cobre libre del sustrato después del proceso de fermentación. Tanto en el ejemplo de referencia 1 y el ejemplo 3, se usó glucosa. El ejemplo de referencia 1 se designa como ensayo de referencia porque no estaba presente mosto claro en el sustrato.

- 45 El ejemplo de referencia 1 muestra que se puede producir ABE a partir de la fermentación de glucosa en un intervalo de pH por encima de 4,5 a 6,5. A un pH de 4,5 no se consumió glucosa o se produjo ABE. A un pH de 6,5, solo se produjeron ácidos, sin ABE. El ejemplo 2 muestra un intervalo inicial preferido de pH de aproximadamente 5,5 para la fermentación de un sustrato que comprende mosto claro y un sustrato (bagazo).

- 50 El ejemplo 3 muestra que el mosto claro sin diluir tiene una concentración de iones cobre libre que es perjudicial para la fermentación, dando como resultado una reducción del rendimiento de ABE en comparación con un sustrato sin iones cobre libre añadidos. Además como la concentración de iones cobre libre se redujo de 20 µM a 5 µM, el rendimiento de ABE aumentó al obtenido a partir de un sustrato sin iones cobre libre añadidos.

El ejemplo 4 muestra que la adición de mosto claro a un sustrato da como resultado un aumento del rendimiento de ABE, en comparación a la adición de un diluyente tal como agua.

El ejemplo 5 muestra que la adición de mosto claro a un sustrato tiene el mismo efecto que la adición de sulfato de amonio, indicando que el mosto claro actúa como fuente de nitrógeno.

- 5 El ejemplo 5 muestra que se puede producir ABE usando mosto claro en combinación con diversos sustratos y microorganismos. Los sustratos ejemplificados son diversos tipos de material de papel, trigo y desechos de comida.

El ejemplo 7 muestra que ciertos sustratos no requieren tratamiento ácido. De hecho, el tratamiento ácido del trigo produce menores rendimientos de ABE que el trigo sin tratar.

- 10 El ejemplo 8 muestra que el tamponado antes de la fermentación no siempre se requiere en sustratos basados en papel.

Métodos generales

Se usaron los siguientes organismos: *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. saccharolyticum* NCP 262, *C. beijerinckii* NCIMB 8052 y *C. saccharoperbutylacetonicum* NCIMB 12606 (N1-4). 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).

- 20 En los ejemplos 1 a 3, 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; KH₂PO₄, 0,5; MgSO₄·7H₂O, 0,3; FeSO₄·7H₂O, 0,01 suplementado con 5% de glucosa. Todos los cultivos de clostridios fueron incubados en una estación de trabajo anaeróbica bajo una atmósfera de N₂-H₂-CO₂ (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 N₂ 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. En los ejemplos 4 a 8 se incubaron cultivos iniciadores durante 24 h y después se subcultivaron en mosto claro al 50% tamponado a pH 5,5. Todos los cultivos de clostridia se incubaron en una estación de trabajo anaeróbica bajo una atmósfera de N₂-H₂-CO₂ (80:10:10) a 33°C. Se llevó a cabo la fermentación a pequeña escala (150 ml) e botellas de vidrio en la estación de trabajo anaeróbica.

- 30 Para una escala de 1 L, las fermentaciones se realizaron en fermentadores (Biostat A Plus, Sartorius Stedim Ltd, Surrey, UK). Las condiciones sin oxígeno se consiguieron rociando con agua el medio en los fermentadores con N₂ sin oxígeno durante 1 hora antes de la inoculación con clostridia. Para todas las fermentaciones de 1 L, la agitación se fijó a 200 rpm y la temperatura a 33°C.

El mosto claro se obtuvo de destilerías y se diluyó en una proporción 1:1 en volumen con agua. Esto fue suficiente para reducir la concentración de iones libres de cobre por debajo de 20 µM.

- 35 El bagazo húmedo, como se recibió de las destilerías, tenían un contenido de humedad de entre 75 y 80%. En donde se indica, el bagazo se secó a 80°C a un contenido de humedad de aproximadamente 4% y se molió antes del procesamiento ulterior.

- 40 Los solventes (etanol, acetona y butanol) fueron medidos 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.

- 45 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 H₂SO₄. 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⁺ 8% de 300 x 7,8 mm (Phenomenex, Cheshire, RU) con 0,005 N de H₂SO₄ 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 de referencia 1 - Efecto del control del pH sobre la producción de ABE por clostridia

- 50 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 1. 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 2 – Influencia del pH inicial sobre la producción de ABE por clostridia

- 10 Se investigó el efecto del pH inicial sobre la fermentación de un sustrato pretratado que comprende bagazo y mosto claro. El bagazo seco, molido, se pretrató adicionando 10,5% (p/v) a botellas duran de 250 ml con H₂SO₄ 0,08 M en mosto claro al 50% y esterilizado a 121°C durante 15 min. Después de enfriar, el pH se ajustó a entre pH 5,0 – 6,0 por adición de NaOH 10 M y se incubó con enzimas celulasa a 33°C durante 24 horas. Para la fermentación, se ajustó el pH inicial de las disoluciones a bien 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5 antes de la inoculación con *C. acetobutylicum* ATCC 824.
- 15 Se monitorizó la concentración inicial de azúcar antes de la fermentación y el azúcar residual, la concentración de ABE y el rendimiento de ABE se calcularon 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. No hubo crecimiento o producción de gas aparente a pH 5,0 o menos y no se utilizaron azúcares. La producción de ABE fue la 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 ABE/100 g de bagazo. A pH 6,5, se utilizó aproximadamente la mitad del azúcar pero la conversión a ABE era deficiente con una concentración final de 2,3 g/l.

Ejemplo 3 – Mosto claro como medio de cultivo para la producción de ABE por clostridia

- 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
- 30 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).
- 35 Tabla 2. 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 - Proceso para la conversión de papel de desecho a butanol y acetona

5 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. 2). Hubo una pobre conversión 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.

Ejemplo 5 – Efecto del mosto claro como una fuente de nitrógeno sobre la producción de ABE por clostridia

15 Algunas sustancias que han aumentado su contenido de hidratos de carbono por procesado pueden ser deficientes en nitrógeno. Un sustrato que comprende papel como un sustrato de biomasa y mosto claro al 50% se comparó con un sustrato que comprende papel y agua y un sustrato que comprende papel y acetato de amonio acuoso. El modus operandi usado fu el mismo que el usado para el ejemplo previo.

20 Como se muestra en la figura 3, la fermentación del sustrato que comprende papel y agua producía poca ABE. El suplemento con un sustrato que comprende papel y agua con acetato de amonio producía buenos resultados, indicando que un sustrato de biomasa de papel era deficiente en nitrógeno. El sustrato que comprende papel y mosto claro producía incluso mejores resultados que el sustrato suplementado con acetat ode amonio. La figura 3 muestra que las fermentaciones usando bien sulfato de amonio o mosto claro producían más ABE que las que usaban agua. La cepa usada era N1-4.

Ejemplo 6 – Producción de ABE a partir de una variedad de sustratosque comprenden mosto claro

25 Se seleccionaron una variedad de sustratos que comprenden un sustrato de biomasa del grupo que comprende papel blanco, papel de periódico, papel de folletos, pan (blanco de Kingsmill), trigo y desechos de alimentos. Los primeros cinco sustratos de biomasa representan materiales de desechos fácilmente disponibles, mientras que el trigo representa cultivos agrícolas alternativos. Los sustratos de biomasa se prepararon como se indica a continuación: las muestras de papel se trituraron usando una trituradora de papel comercial, el pan, el trigo y las muestras de desechos de alimentos se trituraron en un procesador de alimentos doméstico. Los sustratos de biomasa se solubilizaron en mosto claro al 50%, tamponado a pH 5,5 con hidróxido de sodio, se trataron con enzimas industriales (C-Tech y H-Tech, celulasa y hemicelulasa de Novozymes comercialmente disponibles) y se fermentaron con lascuatro cepas de bacteria clostridia previamente mencionadas. Todas las fermentaciones produjeron ABE (mostrado en la figuras 4-7). La cepa N1-4 era particularmente eficaz con respecto a los sustratos basados en papel ya que la concentración de ABE producida estaba consistentemente por encima de 7 g/l e incluso por encima de 12 g/l.

35 Ejemplo 7 - Pre-tratamiento de diferentes sustratos de biomasa

40 El bagazo de whisky de malta requiere tratamiento con ácido a temperatura elevada para hacer que su estructura sea accesible a las enzimas usadas para liberar azúcares para la fermentación. En contraste, los sustratos de biomasa tales como pan y desechos de papel no requieren tratamiento ya que los procesos llevados a cabo anteriormente en el proceso de elaboración han eliminado los materiales inhibidores tales como lignina y han concentrado el contenido de hidratos de carbono. De ese modo, tales sustratos de biomasa requieren solo el tratamiento con enzimas a baja temperatura antes de la fermentación.

La figura 8 muestra la concentración de ABE obtenida después de que el trigo es sometido a un tratamiento ácido. Como puede verse cuando se compara con los resultados mostrado en la figura 6, cuando se usa sobre el trigo, el

tratamiento no conduce a ninguna mejora e incluso puede mostrar efectos perjudiciales severos con respecto a cepas particulares de clostridia (es decir, P262 y N1-4).

Ejemplo 8 – Tamponado pre-fermentación

- 5 Aquellos sustratos que no han sido sometidos a tratamiento ácido tienen valores de pH más elevados que los que han sido sometidos a tratamiento ácido. Así, el tamponado del pH de la fermentación en aquellos sustratos que no han sido sometidos a tratamiento ácido puede ser menos intensivo y en algunos casos no se requiere. Como se muestra en la figura 9, cuando se usa papel como un sustrato de biomasa, no se requiere tamponado porque la cepa óptima, N1-4, puede fermentar a un pH más elevado que de forma que se consiguió el comportamiento satisfactorio sin tamponado antes de la inoculación.

10

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la elaboración de butanol y/o acetona, que comprende al menos las etapas de:
 - tratar mosto claro y un sustrato de biomasa distinto del bagazo, siendo el mosto claro un subproducto de la primera destilación de alcohol de un recipiente de destilación de cobre en la elaboración de whisky de malta para solubilizar al menos una parte del sustrato de biomasa para proporcionar un sustrato tratado; y
 - fermentar el sustrato tratado en presencia de un cultivo de microorganismos que forman butanol y/o acetona a una concentración de iones de cobre libres de menos de 20 μM para proporcionar un producto fermentado que contiene butanol y/o acetona.
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde la etapa de tratamiento del sustrato comprende:
 - hidrolizar el sustrato de biomasa en presencia de agua y de iones hidrógeno o agua e iones hidroxilo. el pH inicial se encuentra en el intervalo de 5,3 a 5,7.
3. El proceso según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en donde la etapa de tratamiento del sustrato comprende:
 - hidrolizar el sustrato de biomasa en presencia de una disolución acuosa de ácido sulfúrico.
4. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa de tratamiento del sustrato comprende:
 - tratar el sustrato de biomasa con una o más enzimas.
5. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa de tratamiento del sustrato además comprende:
 - diluir el sustrato para proporcionar una concentración de iones de cobre libres de menos de 20 μM .
6. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa de fermentación del sustrato tratado se lleva a cabo a un pH de 5,1 o superior.
7. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la concentración de iones de cobre libres en la etapa de fermentación es menor que 15 μM .
8. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el cultivo de microorganismo que forman butanol y/o acetona comprende bacteria del género *Clostridium*.
9. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa de fermentación se llevan a cabo sin la eliminación de sólidos de la misma.
10. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las etapas de tratamiento y fermentación se llevan a cabo simultáneamente.
11. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las etapas de tratamiento y fermentación se llevan a cabo secuencialmente.
12. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el mosto claro se proporciona mediante las etapas de:
 - agregar levadura a un mosto que comprende agua y uno o más hidratos de carbono seleccionados del grupo que comprende glucosa y oligosacáridos de glucosa;
 - 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 alcoholes bajos que comprende uno o más alcoholes y un residuo de destilación de mosto claro.
13. El proceso según la reivindicación 12, en donde el mosto se proporciona mediante 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.

14. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en donde el mosto claro es el subproducto de la elaboración de whisky de malta escocés.

5 15. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el sustrato de biomasa se selecciona de uno o más del grupo que comprende papel, lodo de la fabricación del papel, residuos de fruta y verduras, residuos de la industria de repostería, algas marinas y extractos de algas marinas, derivados de silvicultura, residuos de cultivos alimentarios, de grano y cultivos, grano agotados, chocolate, algas (macro y micro algas), cultivos no comestibles y sus residuos y cultivos energéticos.

10 16. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, 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.

Figura 1

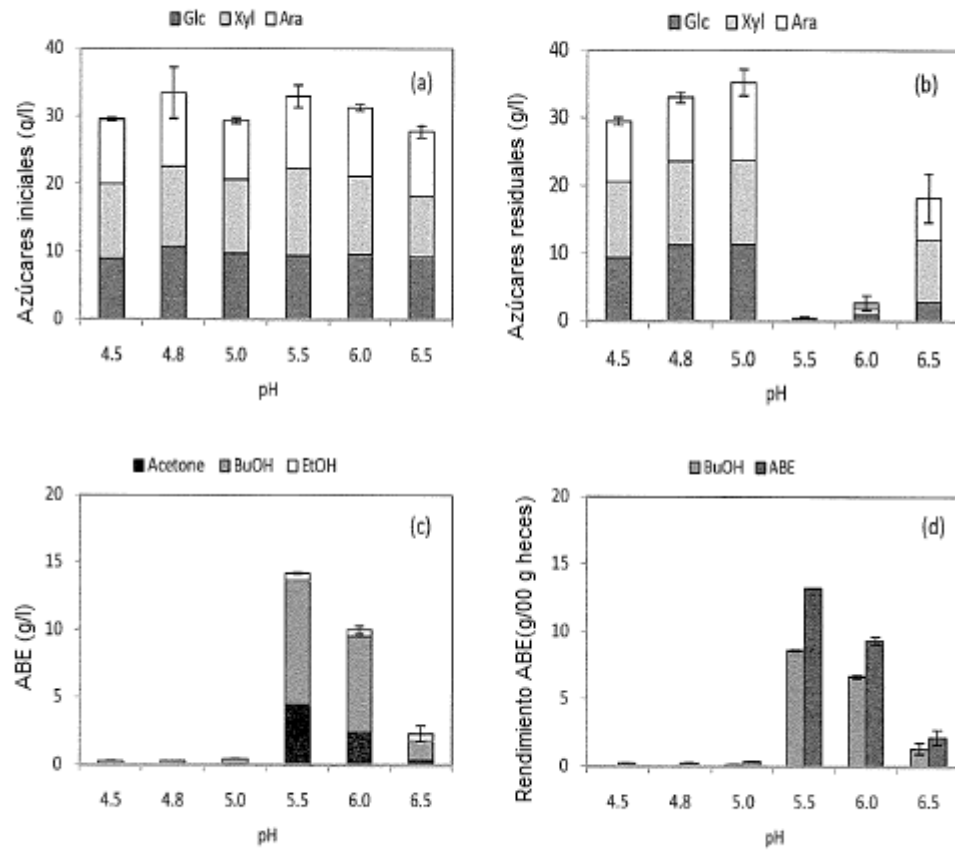


Figura 2

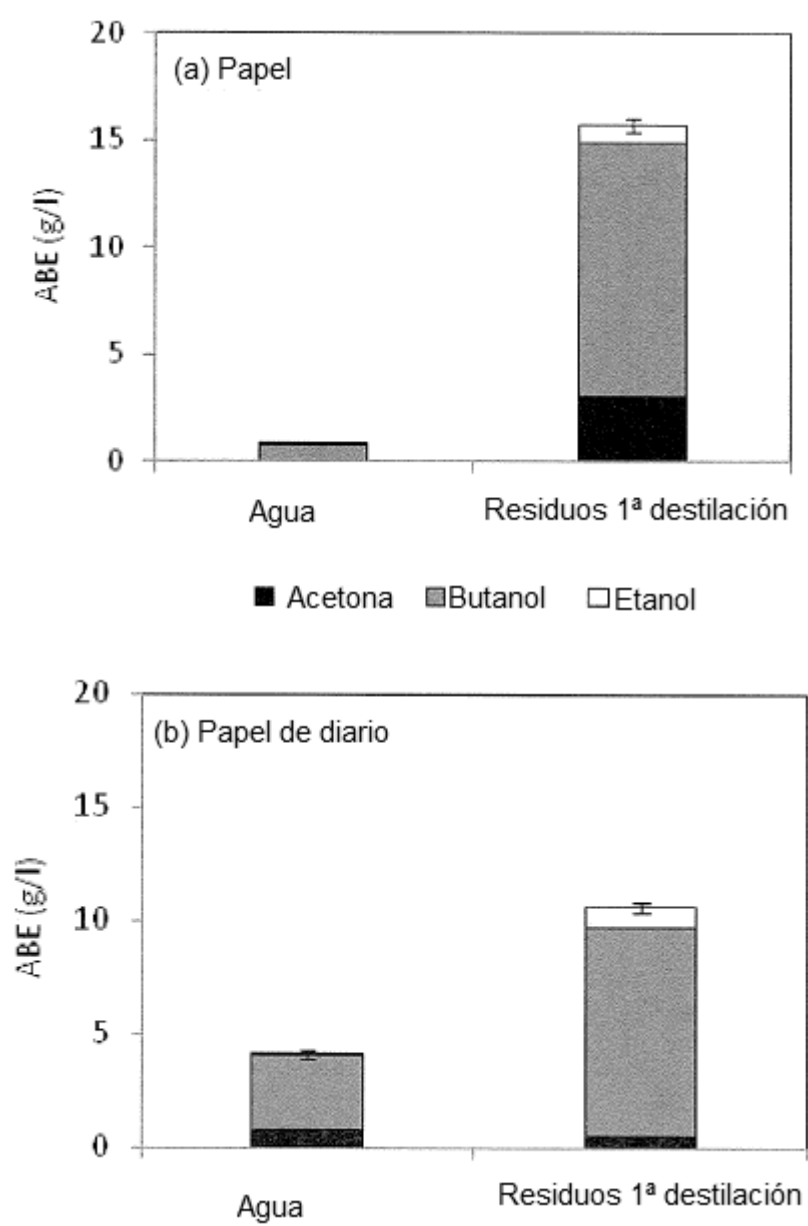


Figura 3

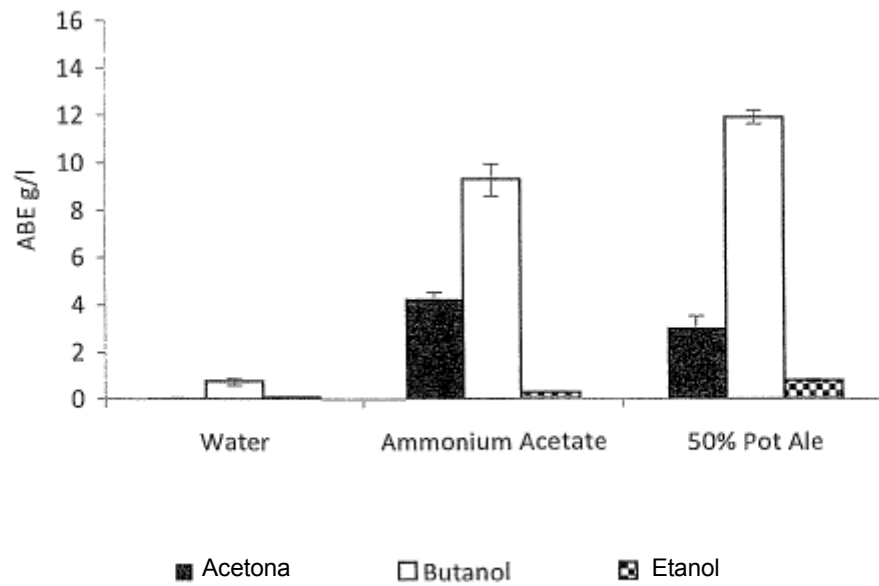


Figura 4

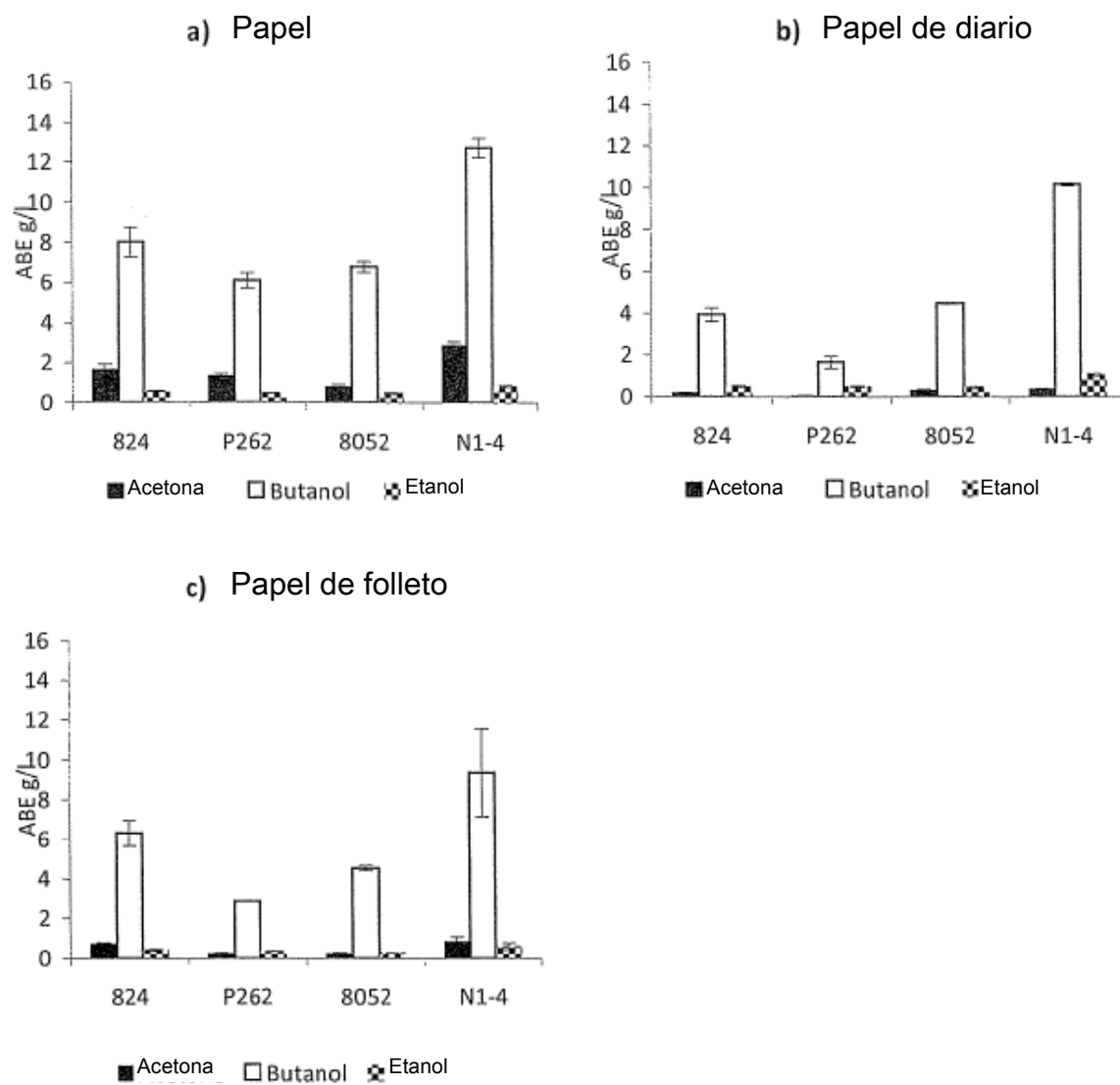


Figura 5

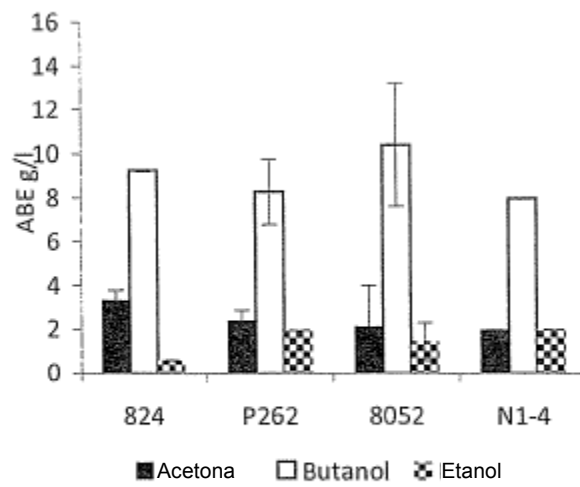


Figura 6

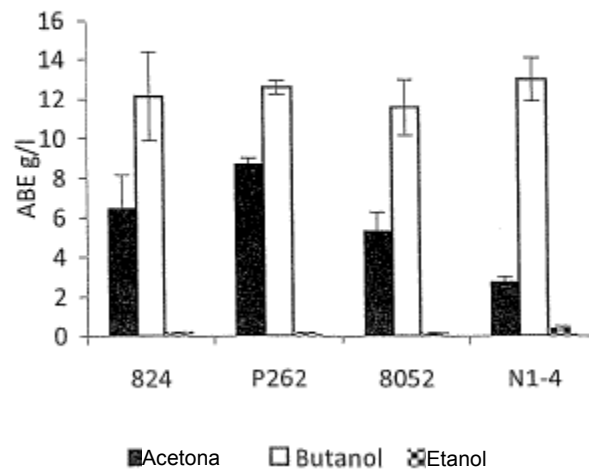


Figura 7

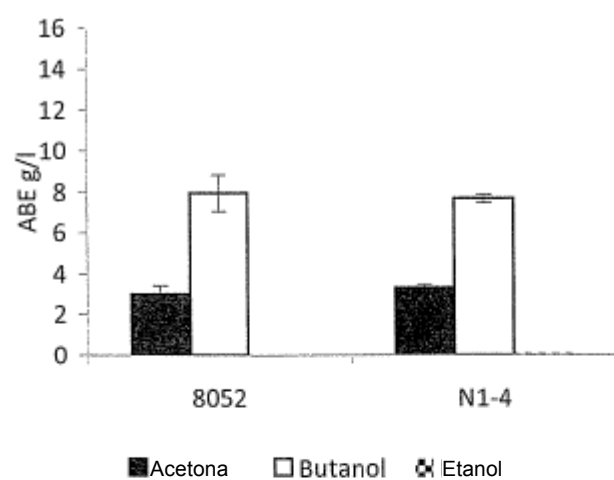


Figura 8

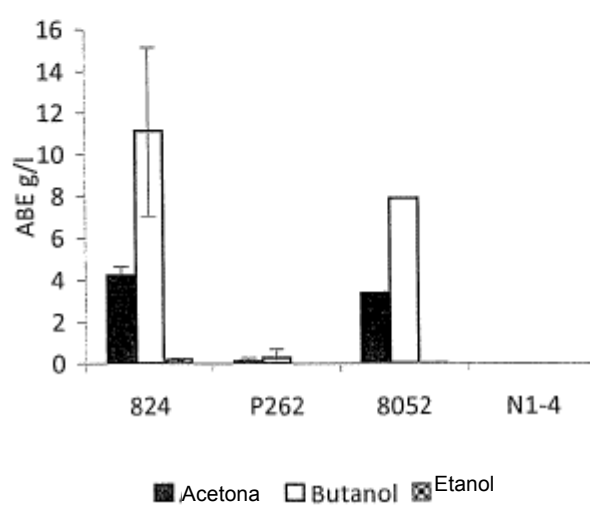


Figura 9

