

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 114**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2015 PCT/US2015/065416**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016 WO16140721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2015 E 15819998 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 3140411**

54 Título: **Métodos de fermentación de cultivos ricos en carbohidratos**

30 Prioridad:

**03.03.2015 US 201562127637 P**

**30.03.2015 US 201562139881 P**

**13.11.2015 US 201514940390**

**11.12.2015 US 201514966650**

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

**18.09.2018**

73 Titular/es:

**HAMRICK, EDWARD BRIAN (100.0%)**

**16850 Collins Avenue Ste. 112-711**

**Sunny Isles Beach, Florida 33160, US**

72 Inventor/es:

**HAMRICK, EDWARD BRIAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 682 114 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

Métodos de fermentación de cultivos ricos en carbohidratos

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a métodos de fermentación de cultivos ricos en carbohidratos.

Antecedentes de la invención

10 Muchos organismos de fermentación convierten carbohidratos en etanol. Los organismos de fermentación más ampliamente usados, la levadura de cerveza y la levadura de panadería, son cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. El etanol tiene un valor económico significativo como bebidas, combustibles para el transporte y precursores para otros compuestos orgánicos.

15 Los organismos de fermentación pueden convertir directamente glucosa, fructosa, maltosa (dímero de glucosa) y sacarosa (dímero de glucosa fructosa) en etanol. En este documento, los monómeros y dímeros de glucosa y fructosa se denominarán azúcares simples y los organismos de fermentación que convierten azúcares simples en etanol se denominarán levaduras.

20 Las levaduras fermentan azúcares simples a etanol en un entorno anaeróbico (sin oxígeno). Una mol de glucosa o fructosa (o 0.5 mol de sacarosa) se fermenta a 2 moles de etanol y 2 moles de dióxido de carbono y emite 118 kJ de calor. Esto significa que la fermentación de una solución de azúcar al 18% dará como resultado un aumento de la temperatura de 34 °C, lo que significa que se requiere el enfriamiento del medio de fermentación. La fermentación de 1 litro de una solución de azúcar al 18% (1 mol de glucosa) también producirá 2 moles de dióxido de carbono, que tiene un volumen desde aproximadamente 48 litros a 20 °C y presión atmosférica. Una levadura típica fermenta más eficientemente entre 20-40 °C, pero tiene una actividad de fermentación significativa hasta 5 °C (el vino blanco se fermenta entre 7-15 °C). Las células de levadura mueren gradualmente a temperaturas superiores a 42 °C. *Saccharomyces cerevisiae* es relativamente insensible al pH y fermentará en un intervalo de pH de 2.9 a 7.2. Esto se describe con más detalle en Arroyo-López, "Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid," International journal of food microbiology 131.2 (2009): 120-127.

35 La mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tienen un diámetro de aproximadamente 10 micras. Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con un tamaño de célula de aproximadamente 5 micras es Thermosacc® Dry, disponible de Lallemand Biofuels & Distilled Spirits, Duluth, Georgia, EE. UU. Produce concentraciones de etanol de hasta 20% en volumen (16% en peso), por lo que los cultivos ricos en carbohidratos con hasta 32% de carbohidratos en peso se pueden fermentar con esta levadura. Esto significa que un cultivo se puede deshidratar antes de la fermentación para que la concentración de etanol resultante sea mayor.

40 Las células de levadura se adhieren a superficies (tales como células de parénquima) en presencia de azúcares simples. Esto se describe en Verstrepn and Klis, "Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts," Molecular microbiology 60.1 (2006): 5-15.

45 La *Saccharomyces cerevisiae* se vende en forma liofilizada y es fácil de manipular. Se clasifica como GRAS (generalmente reconocido como seguro) y se consume comúnmente en la dieta promedio, por ejemplo, el pan se hace con levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

50 El almidón es un polímero de glucosa e inulina es un polímero de fructosa principalmente con glucosa en un extremo. Antes de que el almidón y la inulina se puedan convertir por levadura en etanol, primero deben convertirse en azúcares simples por amilasas e inulinasas, respectivamente, o por ácidos. El almidón es insoluble en agua en el intervalo de temperatura para el cual la levadura está activa, y solo aproximadamente el 5% de la inulina es soluble en este mismo intervalo de temperatura.

55 Hay amilasas disponibles que convierten el almidón en glucosa de manera eficiente en el intervalo de temperatura en que la levadura funciona de manera eficiente. Un ejemplo es la formulación enzimática STARGEN® 002 de DuPont Industrial Biosciences, EE. UU. Este contiene una alfa-amilasa de *Aspergillus kawachi* expresada en *Trichoderma reesei* y una glucoamilasa de *Trichoderma reesei* que trabajan sinérgicamente para hidrolizar el sustrato de almidón granular a glucosa. La endoactividad, la alfaamilasa y la exoactividad, la glucoamilasa, catalizan la hidrólisis completa del almidón granular en una variedad de condiciones de fermentación del etanol.

60 Existen inulinasas disponibles que convierten la inulina en fructosa de manera eficiente en el intervalo de temperatura en que la levadura funciona de manera eficiente. Un ejemplo es la formulación de enzima Fructozyme L disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

65

El documento WO2004/081185 describe métodos de hidrólisis de lignocelulosa, que comprenden poner en contacto la lignocelulosa con al menos un tratamiento químico y opcionalmente un tratamiento a presión. También se describen métodos de pretratamiento de un material lignocelulósico que comprende poner en contacto el material con al menos un producto químico, y métodos de liberación de una sustancia tal como una enzima, un producto farmacéutico o un producto nutracéutico a partir de material vegetal.

Muchos cultivos contienen carbohidratos dentro de las células de parénquima de almacenamiento. Estas células de parénquima ricas en carbohidratos generalmente tienen 10 a 20% de carbohidratos en una sola vacuola grande con 80 a 90% de agua. Estos carbohidratos generalmente comprenden azúcares simples y polisacáridos. En este documento, las partes de estos cultivos ricos en carbohidratos que contienen una masa significativa de células de parénquima ricas en carbohidratos se denominarán tejido de parénquima rico en carbohidratos. Todos los cultivos con tejido de parénquima rico en carbohidratos contienen cierta cantidad de azúcares simples en las células del parénquima y algunos contienen una cantidad significativa de polisacáridos.

Hay dos tipos de cultivos con tejido de parénquima rico en carbohidratos, monocotiledóneas (monocots) en la familia de las gramíneas (Poaceae y Dioscorea) y dicotiledóneas (dicots). Se diferencian en la forma en que las células del parénquima se adhieren entre sí. Las monocots se adhieren a través de la pectina y la hemicelulosa en la laminilla media y las dicots se adhieren a través de la pectina en la laminilla media.

Los cultivos más ampliamente cultivados con tejido de parénquima rico en carbohidratos en los tallos son caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) e híbrido de maíz tropical (*Zea mays*). Estas son todas monocots en la familia de las gramíneas (Poaceae). La caña de azúcar y el híbrido de maíz tropical contienen azúcares simples en las células de parénquima de almacenamiento y el sorgo dulce contiene 90% de azúcares simples y 10% de almidón en las células de parénquima de almacenamiento.

Los cultivos más ampliamente cultivados con tejido de parénquima rico en carbohidratos en tubérculos son patata (*Solanum tuberosum*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), ñame (género *Dioscorea*) y alcachofa de Jerusalén

(*Helianthus tuberosus*). La patata, la batata, la yuca y la alcachofa de Jerusalén son dicots, mientras que el ñame es una monocot. La patata, la batata, la yuca y el ñame contienen almidón en las células del parénquima de almacenamiento y la alcachofa de Jerusalén contiene inulina en las células del parénquima de almacenamiento.

Los cultivos más ampliamente cultivados con tejido de parénquima rico en carbohidratos en frutas son manzanas, uvas y naranjas. Todas estas son dicots y contienen glucosa y fructosa en las células del parénquima de almacenamiento.

Existen técnicas bien conocidas de fermentación de cultivos con tejido de parénquima rico en carbohidratos. Los tallos generalmente se trituran entre una serie de rodillos para extraer el jugo rompiendo las células del parénquima, y luego el jugo se separa de los sólidos residuales y se fermenta. Por lo general, las remolachas se cortan en rebanadas pequeñas de aproximadamente 4 mm de espesor (cossettes) y el azúcar se extrae con agua caliente y luego se fermenta. Las frutas generalmente se exprimen para extraer jugo rico en azúcar que luego se fermenta. Los cultivos de almidón generalmente se convierten en etanol calentando el tubérculo por encima de la temperatura de gelatinización y usando amilasas con el almidón gelatinizado, seguido de la fermentación de la glucosa. Los cultivos ricos en inulina generalmente se fermentan por calentamiento hasta que la inulina se solubiliza, extrayendo el jugo, usando hidrólisis ácida para convertirla en fructosa y luego fermentando la fructosa. Todas estas técnicas son bastante costosas intensivas en capital.

Las células de parénquima de almacenamiento en tejido de parénquima rico en carbohidratos son células poliédricas de paredes delgadas. Las células de parénquima de remolacha azucarera tienen un diámetro de aproximadamente 100 micras con un espesor de pared desde aproximadamente 2 micras. Las células del parénquima en los tallos tienen aproximadamente 360 micras de largo y 60 micras de diámetro con un espesor de pared desde aproximadamente 2 micras. Las características del tejido del parénquima de almacenamiento se describen con más detalle en Gibson, "The hierarchical structure and mechanics of plant materials," *Journal of The Royal Society Interface* 9.76 (2012): 2749-2766.

Las células del parénquima se empaquetan juntas, pero existen pequeñas brechas entre ellas debido a que el empaque es imperfecto. Estas brechas se conocen como el apoplasto o espacio intercelular. Estas brechas están interconectadas, y el agua puede fluir a través del tejido del parénquima a través de estas brechas. Hay más detalles sobre el flujo de agua a través del apoplasto en Steudle, "Water transport in plants: role of the apoplast," *Plant and Soil* 187.1 (1996): 67-79.

El agua fluye a través del apoplasto en el tejido del parénquima de remolacha azucarera en la dirección axial (arriba/abajo) pero está limitada en la dirección radial (entrada/salida) por las bandas casparianas en las raíces. Esto se describe con más detalle en Amodeo, "Radial and axial water transport in the sugar beet storage root," *Journal of Experimental Botany* 50.333 (1999): 509-516.

De manera similar, el agua fluye a través del apoplasto en el tejido del parénquima de los tallos ricos en carbohidratos en la dirección axial, pero está limitada por la longitud del entrenudo (las secciones continuas del tallo). El agua no fluye en la dirección radial porque la parte externa del tallo es impenetrable para el agua. El entrenudo de la mayoría de los tallos ricos en carbohidratos tiene entre 100 mm y 300 mm de longitud.

El apoplasto (espacio intercelular) de la caña de azúcar es suficientemente grande para ser colonizado por una variedad de bacterias. Esto se describe con más detalle en Dong, "A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast)," *Plant Physiology* 105.4 (1994): 1139-1147 y en Tejera, "Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes," *Journal of plant physiology* 163.1 (2006): 80-85. De manera similar, el apoplasto de otras especies de tejido de parénquima rico en carbohidratos es lo suficientemente grande como para ser colonizado por bacterias.

Es posible llenar el apoplasto de tejido de parénquima rico en carbohidratos usando infusión a vacío (también llamada impregnación al vacío). Esto implica rodear el tejido del parénquima con un líquido, aplicar un vacío, esperar que el líquido y el gas sean expulsados del tejido del parénquima, liberando el vacío y esperando que el líquido llene el apoplasto. Esto se describe con más detalle en Gras, "The response of some vegetables to vacuum impregnation," *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3.3 (2002): 263-269.

El tejido de parénquima rico en carbohidratos a menudo contiene hasta 20% (en masa) de carbohidratos. La pared celular del parénquima proporciona resistencia a la célula del parénquima y la membrana celular impide que el contenido de la célula se filtre fuera de la célula. La pared celular es permeable a la sacarosa y otros azúcares simples. La membrana celular se puede desnaturalizar por calor, generalmente por encima de 70 °C, lo que aumenta el coeficiente de difusión de los azúcares simples a través de la membrana celular. Esta es la técnica que normalmente se usa para extraer sacarosa de la remolacha azucarera: la membrana celular se desnaturaliza por calor y luego la sacarosa se difunde desde la remolacha azucarera hasta el agua caliente. El coeficiente de difusión de sacarosa a través del tejido desnaturalizado de remolacha azucarera es aproximadamente cinco veces mayor que a través del tejido de remolacha azucarera no desnaturalizada, que se describe con más detalle en Bessadok-Jemaiet al., "Modeling the kinetic of solute diffusion from sugarbeet particles based on electric conductivity measurements," *International Journal of Physical Sciences* 6.28 (2011): 6464-6468

Las células de parénquima se pueden macerar (separar de cada una) mediante calor o enzimas. Cuando las células del parénquima se maceran, la membrana celular también se rompe, tanto por acción mecánica como por enzimas que se liberan de la pared celular. Esto hace que los contenidos de las vacuolas se filtren fuera de las células del parénquima y hace que las enzimas se difundan más fácilmente en las vacuolas. Esto también proporciona una acción de retroceso, donde el agua en las células del parénquima se puede eliminar más fácilmente mediante exprimido o evaporación. Cualquier combinación de pectina liasa, pectato liasa y poligalacturanasa maceran células de parénquima en dicots, mientras que pectina liasa y xilanasa maceran las células de parénquima en monocotiledóneas.

Esto se describe en Ishii, "Enzymes for the isolation of protoplasts," *Plant Protoplasts and Genetic Engineering I*. Springer Berlin Heidelberg, 1989, 23-33.

La pectato liasa y la poligalacturanasa, cuando degradan la pectina, también producen metanol, que a menudo es un producto indeseable cuando se produce etanol. La pectina liasa degrada la pectina sin producir metanol como subproducto y la xilanasa no produce ningún alcohol. Hay pectina liasas disponibles que operan en el mismo intervalo de pH y temperatura que la levadura, en particular la pectina liasa de *Aspergillus niger*, con un pH óptimo de 5.5 y una temperatura óptima de 35 °C. Esta se describe en Yadav et al., "Pectin lyase: a review," *Process Biochemistry* 44.1 (2009): 1-10. Un ejemplo de pectina liasa que opera en el mismo intervalo de pH y temperatura de levadura es la formulación enzimática "Pectinex® Ultra Color" disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

Cuando se fermenta, la levadura produce grandes cantidades de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El ácido carbónico se forma por la disolución de CO<sub>2</sub> en el agua. Durante la fermentación, la presión parcial de CO<sub>2</sub> es de 100 kPa (1 atm) y el pH de esta solución es aproximadamente 3.92. La levadura fermenta bien a este pH, las enzimas pectina liasa de *Aspergillus niger* (tal como Pectinex Ultra Color) tienen actividad significativa a este pH, las enzimas hidrolizantes de almidón granular (tal como STARGEN) tienen actividad significativa a este pH y las enzimas inulina (tal como Fructozyme L) tienen una actividad significativa a este pH. Del mismo modo, todas estas enzimas tienen una actividad significativa en el intervalo de temperatura de la levadura (25 °C a 40 °C).

La temperatura de cosecha de la remolacha azucarera puede ser bastante fría, a menudo por debajo de 10 °C y la temperatura de cosecha de caña de azúcar, sorgo dulce y de híbridos de maíz tropical puede ser inferior a 20 °C. Sin embargo, el calor liberado por la fermentación de azúcares simples en el apoplasto de tejido de parénquima rico en carbohidratos aumentará rápidamente la temperatura de este tejido al intervalo de temperatura donde las enzimas tienen una actividad significativa.

La velocidad de fermentación está fuertemente influenciada por la concentración de células de levadura. La fermentación de la caña de azúcar en fábricas típicas en Brasil puede tomar entre 6 y 10 horas, pero esto requiere

altas concentraciones (10% p/p) de levadura y reciclaje de células de levadura. Esto se describe con más detalle en Basso, "Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation," INTECH Open Access Publisher, 2011. La fermentación de vino o cerveza, con concentraciones menores de levadura, puede tomar hasta una semana.

5 Un problema significativo con las técnicas actuales de fermentación de azúcares en etanol es la contaminación bacteriana, en particular la contaminación por *Lactobacillus*. Sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que la mezcla turbulenta propaga las bacterias a lo largo del medio de fermentación, y dado que las bacterias contaminantes pueden superar a las levaduras, existe una contaminación significativa. Sin mezclar, y sin  
10 un gradiente en la concentración de azúcar (causada por la distribución uniforme de la levadura en el tejido del parénquima rico en carbohidratos), cualquier posible contaminación bacteriana permanece localizada y es incapaz de competir con la levadura en todo el volumen de biomasa. Esto se describe en Kundiyana et al., "Influence of temperature, pH and yeast on in-field production of ethanol from unsterilized sweet sorghum juice," biomass and bioenergy 34.10 (2010): 1481-1486.

15 Debido a que las células del parénquima son tan pequeñas, se necesita mucha energía para aplastarlas o extraer el azúcar de ellas con agua caliente. Casi el 35% del capital y los costos operativos de producir azúcar a partir de los tallos se debe al costo de la trituración. Del mismo modo, gran parte del costo de producir azúcar a partir de remolacha azucarera se debe al costo de la extracción de agua caliente. La economía de la trituración de la caña de  
20 azúcar se describe con más detalle en Gbabo, "Comparative study on cane cutter/juice expeller and roller model Sugarcane juice extraction systems," INT J CURR SCI 2013, 7: E 55-60. Reduciría los costos de extracción de azúcares si se pudiera eliminar la necesidad de trituración o extracción con agua caliente.

25 La densidad aparente de las remolachas azucareras es aproximadamente 769 kg/m<sup>3</sup> y la densidad aparente de los tochos (secciones cortadas) de caña de azúcar, sorgo dulce e híbridos de maíz tropical (esto es, tallos) es aproximadamente 350 kg/m<sup>3</sup>. Si el contenido de azúcar es aproximadamente 18%, esto da como resultado una densidad de azúcar de 138 kg de azúcar por metro cúbico de remolacha azucarera y 63 kg de azúcar por metro cúbico de caña de azúcar, sorgo dulce e híbridos de maíz tropical. Dado que los costos de transporte son principalmente una función del volumen (y no del peso), y dado que los cultivos a menudo se cosechan a distancias considerables de donde se procesan, es bastante costoso transportar azúcares a densidades tan bajas ya que solo  
30 del 5% al 10% del volumen de un camión es absorbido por el azúcar. Se desea reducir el costo de producción de etanol a partir de cultivos ricos en carbohidratos produciendo etanol en (o cerca de) el sitio de cosecha de estos cultivos, reduciendo los costes de transporte.

35 Las células de parénquima en tejido de parénquima rico en carbohidratos son tejido vivo y, por lo tanto, respiran (respiran) después de la cosecha. La respiración implica la conversión de oxígeno y azúcar en las células del parénquima a dióxido de carbono y energía para mantener la célula. Después de cosechar remolacha azucarera, la respiración consume aproximadamente 200 g de azúcar por día por tonelada métrica de remolacha azucarera, y en los primeros 5 días después de la cosecha se consumen entre 600 y 1500 g de azúcar por día por tonelada métrica  
40 de remolacha azucarera por respiración. Si las remolachas azucareras tienen aproximadamente 18% de azúcar en peso, hay aproximadamente 180 kg de azúcar en una tonelada métrica de remolacha azucarera, lo que resulta en una pérdida de entre 0.3% y 0.8% de azúcar por día en los primeros 5 días y 0.1% de azúcar por día en días posteriores.

45 Dado que las remolachas azucareras se pueden almacenar durante 100 días antes de ser procesadas, pueden perder hasta un 10% de su contenido de azúcar debido a la respiración. La caña de azúcar, el sorgo dulce y el maíz tropical pierden cantidades similares de azúcar cuando se almacenan. Existe una necesidad en la técnica de reducir el azúcar perdido en la respiración mediante la conversión más rápida de carbohidratos en etanol que los métodos actuales. Una vez que los carbohidratos en los cultivos se convierten en etanol, pueden almacenarse durante largos  
50 períodos, lo que permite la eliminación continua del etanol durante todo el año. Se desea utilizar de manera más eficiente el capital invertido en la extracción con rodillos, la extracción de etanol y la destilación usando este equipo durante todo el año, no solo durante la temporada de cosecha.

55 Si las remolachas azucareras se almacenan en condiciones anaeróbicas (sin oxígeno), los microorganismos colonizarán las remolachas y después de 21 días fermentarán completamente todo el azúcar en las remolachas, principalmente a ácido láctico y ácido acético. Dado que la capa exterior de la remolacha azucarera a menudo se raspa y daña mediante la recolección, los microorganismos pueden penetrar más fácilmente las capas externas de la remolacha azucarera, lo que lleva a pérdidas de azúcar debido a la fermentación del ácido láctico y el ácido acético. Del mismo modo, la caña de azúcar, el sorgo dulce y el híbrido de maíz tropical son más susceptibles a los  
60 microorganismos que penetran en la médula porque la caña se ha cortado en tochos durante la cosecha.

Mucho del costo de capital y el costo operativo de producir etanol a partir de cultivos ricos en carbohidratos es el costo de calentar la materia prima. Estos costos podrían reducirse (o eliminarse) usando el autocalentamiento de la energía liberada por la fermentación.

65

Algunas técnicas de producción de etanol a partir de cultivos ricos en carbohidratos requieren pretratamiento o fermentación dentro de un recipiente a presión. Debido a que los recipientes a presión tienen el peligro de explotar y requieren más fuerza que un recipiente sin presión, sería beneficioso no requerir un recipiente a presión.

- 5 Otro coste de capital significativo y el costo operativo de producir etanol a partir de cultivos ricos en carbohidratos es el costo de enfriar el reactor de fermentación. Sería deseable usar enfriamiento pasivo de bajo costo, tal como soplar aire sobre tanques con paredes de metal o hacer circular gas frío de dióxido de carbono a través del cultivo.

Resumen de la invención

- 10 La invención proporciona un procedimiento de producción de etanol y dióxido de carbono a partir de tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 15 (a) proporcionar el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos que contiene un apoplasto a una temperatura de cultivo de 5-40 °C;

(b) combinar el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos con una solución de reactivo acuosa a una temperatura del reactivo de 20-40 °C que contiene una levadura *Saccharomyces cerevisiae*;

- 20 (c) exponer el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos a una presión de preparación en fase gaseosa durante un tiempo de preparación, ya sea antes de la etapa (b) o después de la etapa (b), en el que la presión de la preparación en fase gaseosa es menor que la presión atmosférica;

- 25 (d) exponer el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos a una presión de infusión en fase gaseosa durante un tiempo de infusión, donde dicha levadura infunde en dicho apoplasto en el que la presión de infusión en fase gaseosa es mayor que la presión de preparación en fase gaseosa; y

- 30 (e) mantener una presión de fermentación en fase gaseosa durante un tiempo de fermentación para producir etanol y dióxido de carbono dentro del tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos, en la que la presión de fermentación en fase gaseosa es mayor que la presión de preparación en fase gaseosa y en la que al menos 25 % de la masa de los productos de fermentación es etanol.

- 35 En realizaciones preferidas, el tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos se selecciona del grupo que consiste en tallos de caña de azúcar, tallos de sorgo dulce, tallos de híbridos de maíz tropical, tubérculos de remolacha azucarera, manzanas, uvas y naranjas. En algunas realizaciones, el tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos se selecciona del grupo que consiste en tubérculos de patata, tubérculos de batata, tubérculos de yuca, tubérculos de ñame y tubérculos de alcachofa de Jerusalén.

- 40 En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas pectinasas. En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas xilanasas. En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas amilasas. En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas inulinasas.

- 45 En realizaciones preferidas, la presión de preparación en fase gaseosa es desde aproximadamente 105% a aproximadamente 200% de la presión de equilibrio de agua a mayor temperatura de cultivo y temperatura del reactivo.

En realizaciones preferidas, el tiempo de preparación es desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora.

- 50 En realizaciones preferidas, la solución de reactivo acuosa se homogeneiza. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además mezclar la solución acuosa de reactivo usando energía turbulenta en el intervalo de aproximadamente 0.15 W/kg a aproximadamente 50 W/kg.

En realizaciones preferidas, el tiempo de infusión es desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora.

- 55 En realizaciones preferidas, el tiempo de fermentación es desde aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 días.

En realizaciones preferidas, la presión de fermentación es la presión atmosférica.

- 60 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además mantener el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos en un entorno anaeróbico para un tiempo de conservación del cultivo posterior a la finalización del tiempo de fermentación.

- 65 En realizaciones preferidas, el procedimiento comprende adicionalmente recuperar los productos de fermentación mediante extracción al vacío. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente recuperar los

productos de fermentación mediante trituración. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente drenar la solución acuosa de reactivo, ya sea antes de la etapa (e) o después de la etapa (e).

Breve descripción del dibujo

5 La figura 1 es un dibujo esquemático de un aparato experimental usado en realizaciones y ejemplos de la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

10 Los métodos, procedimientos y sistemas de la presente invención se describirán en detalle por referencia a diversas realizaciones y figura (s).

15 Esta descripción permitirá a un experto en el arte hacer y usar la invención, y describe varias realizaciones, adaptaciones, variaciones, alternativas y usos de la invención. Estas y otras realizaciones, características y ventajas de la presente invención serán más evidentes para los expertos en el arte cuando se tomen con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos adjuntos.

20 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en el arte a la que pertenece esta invención.

25 A menos que se indique lo contrario, se debe entender que todos los números que expresan parámetros, condiciones, resultados, etc. usados en la memoria descriptiva están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con lo anterior, a menos que se indique lo contrario, los números establecidos en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de algoritmos y cálculos específicos.

30 El término "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por" es inclusivo o abierto y no excluye elementos adicionales no enumerados o etapas del método. "Que comprende" es un término de la técnica usado en el lenguaje de reivindicaciones, que significa que los elementos de reivindicación mencionados son esenciales, pero se pueden agregar otros elementos de reivindicación y seguir formando una construcción dentro del alcance de la reivindicación.

35 Como se usa en este documento, la fase "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. Cuando la frase "consiste en" (o variaciones de la misma) aparece en una cláusula del cuerpo de una reivindicación, en lugar de seguir inmediatamente el preámbulo, limita solo el elemento establecido en esa cláusula; otros elementos no están excluidos de la reivindicación como un todo. Como se usa en este documento, la fase "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los elementos o etapas de método especificados, más aquellos que no afectan materialmente la base y características novedosas de la materia reivindicada.

45 Con respecto a los términos "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en", donde uno de estos tres términos se usa en este documento, el tema actualmente descrito y reivindicado puede incluir el uso de cualquiera de los otros dos términos. De este modo, en algunas realizaciones que no se mencionan explícitamente de otra manera, cualquier instancia de "que comprende" se puede reemplazar por "que consiste en" o, alternativamente, por "que consiste esencialmente en".

50 La presente invención se basa en una solución técnica al problema de que producir productos de fermentación a partir de tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos es costoso debido a la gran cantidad de energía y capital requeridos para triturar o extraer eficazmente con difusión en agua caliente. Esta invención usa un enfoque alternativo de infundir reactivos de fermentación al vacío en el apoplasto de tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos, permitiendo fermentar y luego separar la solución de etanol resultante usando técnicas de bajo costo tales como extracción al vacío. Los principios de la invención se demuestran en los ejemplos de este documento.

55 La presente invención también se basa en una solución técnica al problema de la degradación de cultivos ricos en almidón y ricos en inulina después de la cosecha y antes del procesamiento o el consumo. Esta invención usa un enfoque de infusión de organismos de fermentación al vacío en el apoplasto del tejido del parénquima de fermentación de los azúcares simples en etanol, privando de este modo a otros organismos de los azúcares simples necesarios para colonizar y consumir el almidón o la inulina. Esto da como resultado una pérdida típica del 0.1% de la masa del tejido rico en carbohidratos y el beneficio de proteger el almidón o la inulina contra la degradación. Una vez fermentados los azúcares simples, los únicos organismos que pueden degradar estos tejidos del parénquima son los hongos que crecen en la pectina, los organismos que crecen en etanol y los organismos que crecen en almidón o inulina.

- La mayoría de los hongos que crecen en la pectina son aeróbicos, por lo que mantener el entorno anaeróbico evita que estos hongos colonicen el tejido del parénquima. Los hongos anaeróbicos que crecen en la pectina, especialmente *Rhizopus oryzae*, también requieren que la glucosa crezca en la pectina, por lo que mantener el entorno libre de glucosa y anaeróbicos evita que estos hongos colonicen el tejido del parénquima.
- 5 Los organismos que crecen en etanol, especialmente *Acetobacter*, también son aeróbicos, por lo que mantener el entorno anaeróbico evita que estos organismos conviertan el etanol en ácido acético.
- 10 Los organismos que crecen en almidón, especialmente *Bacillus subtilis*, necesitan tener acceso a los gránulos de almidón dentro del tejido del parénquima. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, se cree que la eliminación de glucosa en el apoplasto y dentro de las células del parénquima hace que organismos como *Bacillus subtilis* no tengan energía suficiente para ser móviles dentro del tejido del parénquima.
- 15 La levadura produce grandes cantidades de dióxido de carbono mientras fermenta, y la infusión de levadura en tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos forma una espuma en el exterior de este tejido durante la fermentación y expulsa líquido de este tejido mediante la acción de formación de burbujas dentro del tejido. Sorprendentemente, las burbujas no expulsan la levadura, y la levadura puede continuar la fermentación hasta que se fermenten todos los azúcares simples.
- 20 Sin desear estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que la adhesión de células de levadura a células de parénquima en presencia de glucosa es más fuerte que las fuerzas de las burbujas de dióxido de carbono que actúan para expulsar la levadura del tejido de parénquima.
- 25 Esta invención también se basa en el hecho de que la velocidad de difusión de azúcares simples a través de la membrana celular en células de parénquima de cultivos ricos en carbohidratos es suficiente para permitir que los organismos de fermentación en el apoplasto fermenten los azúcares simples dentro de las células de parénquima en una alta tasa. El etanol luego se difunde en las células del parénquima. En algunas variaciones, las paredes de las células del parénquima no se degradan, manteniendo la resistencia estructural del cultivo, lo que permite el uso de extracción al vacío de bajo costo. En otras variaciones, las pectinasas degradan las paredes de las células del parénquima, lo que aumenta la velocidad de fermentación y reduce la energía necesaria para deshidratar el tejido después de la eliminación del etanol.
- 30
- 35 En algunas variaciones, la invención proporciona un procedimiento de producción de etanol y dióxido de carbono a partir de tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) proporcionar tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos que contiene un apoplasto a una temperatura de cultivo de 5-40 °C;
- 40 (b) combinar el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos con una solución de reactivo acuosa a una temperatura del reactivo de 20-40 °C que contiene una levadura *Saccharomyces cerevisiae*;
- (c) exponer el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos a una presión de preparación en fase gaseosa durante un tiempo de preparación, ya sea antes de la etapa (b) o después de la etapa (b), en el que la presión de la preparación en fase gaseosa es menor que la presión atmosférica;
- 45 (d) exponer el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos a una presión de infusión en fase gaseosa durante un tiempo de infusión, en la que dicha levadura infunde en dicho apoplasto en la que la presión de infusión en fase gaseosa es mayor que la presión de preparación en fase gaseosa; y
- 50 e) mantener una presión de fermentación en fase gaseosa durante un tiempo de fermentación para producir etanol y dióxido de carbono dentro del tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos, en la que la presión de fermentación en fase gaseosa es mayor que la presión de preparación en fase gaseosa y en la que al menos 25 % de la masa de los productos de fermentación es etanol.
- 55 Los expertos en el arte reconocerán que la presión de preparación en fase gaseosa se puede aplicar antes o después de combinar el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos con una solución acuosa de reactivo. Gras describe la combinación antes de aplicar un vacío, y los ejemplos a continuación describen la combinación después de aplicar un vacío. La combinación antes de aplicar un vacío, como lo describe Gras, tiene la ventaja de un tiempo de bombeo más rápido, ya que se necesita evacuar menos volumen. Sin embargo, tiene la desventaja de tener una presión hidrostática más alta en el fondo de un recipiente más grande. Para un recipiente de solo 1 m de profundidad, esta desventaja no es significativa, pero para recipientes más profundos, esta desventaja puede ser significativa.
- 60
- 65 Los expertos en el arte reconocerán que hay una amplia gama de organismos de fermentación que producen etanol, y estos organismos de fermentación se adhieren a las superficies en presencia de glucosa.

La infusión al vacío puede realizarse con un recipiente de fuerza modesta rellena en la parte superior con tubérculos o tallos y con una cámara de caucho en la parte superior; cuando se aplica un vacío, la resistencia del propio cultivo es la que soporta la presión atmosférica de 100 kPa en el exterior del recipiente. Esto da como resultado un recipiente de infusión al vacío de muy bajo costo, y el costo de energía de bombear el aire fuera de este recipiente de infusión al vacío también es bastante bajo. En algunas realizaciones, este recipiente de infusión al vacío puede ser el camión que trae el cultivo del campo, con una cámara de caucho insertada en la parte superior, por ejemplo.

Una vez que se infunde la solución acuosa de reactivo, el cultivo se puede transferir a un recipiente de fermentación de costo aún más bajo. Este recipiente de fermentación de menor costo no necesita ser hermético al aire, lo suficientemente apretado como para contener el dióxido de carbono producido por la fermentación para mantener la fermentación anaeróbica, evitando de este modo la degradación del etanol por la bacteria *Acetobacter*.

En realizaciones preferidas, el tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos se selecciona del grupo que consiste en tallos de caña de azúcar, tallos de sorgo dulce, tallos de híbridos de maíz tropical, tubérculos de remolacha azucarera, manzanas, uvas y naranjas. Todos estos contienen principalmente azúcares simples en el tejido del parénquima y se pueden fermentar con levadura, sin necesidad de infusión de pectinasa. Opcionalmente, la pectinasa acelera la fermentación, aunque a costa de la complejidad y el costo adicional de las enzimas.

En algunas realizaciones, el tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos se selecciona del grupo que consiste en tubérculos de patata, tubérculos de batata, tubérculos de yuca, tubérculos de ñame y tubérculos de alcachofa de Jerusalén. Estos cultivos contienen una pequeña cantidad de azúcares simples, entre 0.01% y 2% en peso, y el resto de los carbohidratos como polisacáridos. Para preservar estos cultivos, la infusión de levadura convertirá las pequeñas cantidades de azúcares simples en etanol. Para convertir los polisacáridos en estos cultivos en etanol, se requiere una infusión adicional de una pectinasa y una amilasa o inulinasa.

En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas pectinasas. En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas xilanasas. En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas amilasas. En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas inulinasas. La enzima pectinasa preferida es la pectinasa lisa en realizaciones que requieren una producción mínima de metanol como subproducto. Se necesita una combinación de pectinasa y xilanasas para descomponer las paredes celulares del parénquima en dicots.

Se necesita una temperatura de cultivo desde aproximadamente 5 °C a aproximadamente 40 °C porque los organismos de fermentación están activos en este intervalo.

En realizaciones preferidas, la presión de preparación en fase gaseosa es desde aproximadamente 105% a aproximadamente 200% de la presión de equilibrio de agua a mayor temperatura de cultivo y temperatura del reactivo. La presión debe ser lo más baja posible mientras se evita que el cultivo o el reactivo hierva.

En realizaciones preferidas, el tiempo de preparación es desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora. Algunos cultivos tardan más que otros en evacuar el gas del apoplasto, en particular la caña de azúcar y el sorgo dulce.

El organismo de fermentación es *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo tiene la mayor tolerancia al etanol de cualquier organismo de fermentación y muchos híbridos están disponibles.

La temperatura del reactivo es desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C. Los organismos de fermentación prosperan en este intervalo de temperatura.

La temperatura del reactivo debería ser lo suficientemente baja para que el agua en la solución de reactivo acuosa no hierva a la presión de preparación, donde la ebullición implica la liberación rápida de vapor en forma de burbujas grandes. Dado que el agua es normalmente el constituyente principal de la solución acuosa de reactivo, los datos de equilibrio de agua se pueden usar para determinar la temperatura del reactivo a una presión de preparación dada y viceversa. Por ejemplo, si la temperatura del reactivo es aproximadamente 38 °C, la presión de preparación debería ser mayor de aproximadamente 7 kPa.

En realizaciones preferidas, la solución de reactivo acuosa se homogeneiza. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además mezclar la solución acuosa de reactivo usando energía turbulenta en el intervalo de aproximadamente 0.15 W/kg a aproximadamente 50 W/kg.

Se usa suficiente energía turbulenta para que la escala de longitud de Kolmogorov sea del orden de menos de la longitud libre del apoplasto (por ejemplo, aproximadamente 10 micras). Usando la escala de longitud de Kolmogorov, y sabiendo que la viscosidad cinemática del agua a 20 °C es desde aproximadamente  $10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s, la energía requerida para mezclar los reactivos y el agua de procedimiento a una escala de 10 micras es aproximadamente 50 W/kg. Del mismo modo, mezclar a una escala de 20 micras requiere aproximadamente 5 W/kg, y mezclar a una escala de 50 micras requiere aproximadamente 0.15 W/kg.

- Una persona con experiencia normal en el arte reconocerá que existen muchos dispositivos de mezcla simples que pueden mezclarse con este tipo de energía. Un dispositivo de mezcla simple es un tubo de plástico de 25 mm de diámetro de 8 metros de largo con una rugosidad de tubo de 0.0014, infusión de presión atmosférica (100 kPa) a un vacío de 20 kPa con una bomba de vacío de 2.8 litros/s (6 CFM) que mantiene el vacío durante la infusión. La potencia disipada en la tubería debido a la caída de presión es de 226.4 W. La cantidad total de líquido en la tubería es 4.05 kg, por lo que la potencia disipada por kg es aproximadamente 56 W/kg, que es adecuada para mezclar en una escala de 10 micras (la velocidad de flujo de ejemplo es suficiente para infundir 18 m<sup>3</sup> en 1.8 horas).
- En realizaciones preferidas, el tiempo de infusión es desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora. Los experimentos han demostrado que la eficacia de la conversión de azúcares es relativamente insensible al tiempo de infusión.
- En realizaciones preferidas, el tiempo de fermentación es desde aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 días. Los experimentos han demostrado que el tiempo de fermentación con una concentración de levadura de aproximadamente 2 células por célula de parénquima da como resultado un tiempo de fermentación de aproximadamente 6 horas a 20 horas, dependiendo del tipo de parénquima vegetal rico en carbohidratos.
- En realizaciones preferidas, la presión de fermentación es la presión atmosférica. Dado que el CO<sub>2</sub> se produce continuamente, y dado que los recipientes a presión son caros y peligrosos, la ventilación del CO<sub>2</sub> a la presión atmosférica es menos costosa.
- En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además mantener el tejido del parénquima vegetal rico en carbohidratos en un entorno anaeróbico para un tiempo de conservación del cultivo posterior a la finalización del tiempo de fermentación. Cuando el entorno es anaeróbico y no hay azúcares simples en el apoplasto o las células del parénquima, los hongos y las bacterias no pueden crecer en la pectina o el etanol.
- En realizaciones preferidas, el procedimiento comprende adicionalmente recuperar los productos de fermentación mediante extracción al vacío. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente recuperar los productos de fermentación mediante trituración. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente drenar la solución acuosa de reactivo, ya sea antes de la etapa (e) o después de la etapa (e).
- Se prefiere la extracción al vacío porque es una técnica eficiente y rentable para recuperar productos de fermentación. La extracción al vacío de etanol se puede hacer con un recipiente similar a la infusión al vacío, pero con la capacidad adicional de calentar el cultivo. El drenaje de la solución acuosa de reactivo da como resultado un mayor porcentaje de etanol en el vapor depurado.
- Una persona con una experiencia normal en el arte reconocerá que el aumento de temperatura durante la fermentación se puede limitar a aproximadamente 38 °C con una variedad de técnicas de bajo costo, especialmente si la fermentación tiene lugar durante aproximadamente 20 horas.
- Una persona con experiencia normal en el arte reconocerá que el aparato conocido se puede emplear para los procedimientos, sistemas y métodos descritos en este documento. Los procedimientos en este documento pueden ser discontinuos, continuos, semicontinuos o pseudocontinuos. Cualquier referencia a "recipiente" o "reactor" en este documento se debe considerar que significa uno o una pluralidad de tales aparatos (tal como en serie o en paralelo). Se pueden desear u observar diversos patrones de flujo. Con reacciones químicas y procedimientos simultáneos de transferencia de masa que involucran múltiples fases, la dinámica de fluidos puede ser bastante compleja. Dependiendo del diseño específico, los patrones de flujo pueden aproximarse al flujo pistón o al flujo bien mezclado.
- El rendimiento, o la capacidad del procedimiento, puede variar ampliamente desde pequeñas unidades a escala de laboratorio hasta biorrefinerías completas a escala comercial, incluyendo cualquier escala piloto, de demostración o semicomercial. En diversas realizaciones, la capacidad del procedimiento es de al menos aproximadamente 1 kg/día, 10 kg/día, 100 kg/día, 1 tonelada/día (todas las toneladas son toneladas métricas), 10 toneladas/día, 100 toneladas/día, 500 toneladas/día, 1000 toneladas/día, 2000 toneladas/día o más.
- El sistema global puede estar en una ubicación fija, o puede hacerse portátil. El sistema se puede construir usando módulos que pueden duplicarse simplemente para una ampliación práctica.
- Diversas sondas pueden permitir una supervisión y control del procedimiento preciso a lo largo de diversas etapas del procedimiento, hasta y potencialmente incluyendo todas las etapas del procedimiento. Se espera que la supervisión precisa del procedimiento dé como resultado mejoras en el rendimiento y la eficiencia, tanto de forma dinámica, así como a lo largo de un período de tiempo en el que el historial operativo puede utilizarse para ajustar las condiciones del procedimiento (incluidos los programas de ciclos de presión). En algunas realizaciones, una sonda de reacción está dispuesta en comunicación operable con una zona de procedimiento. Dicha sonda de reacción puede ser útil para extraer muestras líquidas y analizarlas, a fin de determinar el grado de hidrólisis o perfil de azúcar, etc. Los ajustes del procedimiento se pueden basar en mediciones, si se considera necesario o deseable,

usando principios de control del procedimiento bien conocidos (retroalimentación, redirección, lógica proporcional-derivada integral, etc.).

5 Las corrientes sólidas, líquidas y gaseosas producidas o existentes dentro del procedimiento se pueden reciclar independientemente, pasar a etapas posteriores o eliminar/purgar del procedimiento en cualquier punto.

### Ejemplos

10 Los siguientes ejemplos demuestran los principios de esta invención. La infusión al vacío de levaduras y enzimas descrita anteriormente ha demostrado, mediante evidencia experimental, que es útil para la fermentación de cultivos ricos en carbohidratos.

15 El aparato experimental de la figura 1 está diseñado para reproducir la funcionalidad del procedimiento industrial en cuanto a temperatura, presión y control de flujo de una unidad industrial. Difiere de una unidad industrial en la carga y descarga del cultivo (la muestra). El aparato experimental se usa en todos los ejemplos a continuación.

20 Con referencia a la figura 1, el aparato 100 experimental consiste en un recipiente 102 de infusión principal, que bajo operación se mantiene sumergido casi por completo dentro de un baño 101 termostático que puede operar en un amplio intervalo de temperatura y cuyo control preciso de temperatura está asegurado por un controlador 114 de temperatura. El recipiente 102 de infusión está cerrado con una tapa 118 extraíble y sellada. El recipiente 102 de infusión y la tapa 118 hermética están diseñados para ser capaces de mantener y sostener las condiciones de vacío requeridas por las condiciones del procedimiento. La cantidad deseada de material de muestra 117 puede colocarse dentro del recipiente 102 de infusión. El recipiente 102 de infusión puede suministrarse con CO<sub>2</sub> a través de un cilindro 106 de CO<sub>2</sub> y una línea 107 de CO<sub>2</sub>. En la línea 107 de CO<sub>2</sub>, se usa un regulador 108 de flujo/presión para establecer la presión a la que se suministra el CO<sub>2</sub> al recipiente 102 de infusión. Se usa una bomba 103 de vacío para evacuar y mantener el vacío dentro del recipiente 102 de infusión. Un indicador 116 de presión y un indicador 119 de temperatura están instalados en el recipiente 102 de infusión. El recipiente 102 de infusión está conectado a través de una válvula 109 de abertura a un envase 105 con una solución de reactivo acuosa preparada. La bomba 103 de vacío está conectada al recipiente 102 de infusión a través de una línea donde está instalado un regulador 110 de presión. El regulador 110 de presión permite que la presión del recipiente 102 de infusión se regule en un amplio intervalo de niveles de vacío, mientras que la bomba 103 de vacío funciona a velocidad constante. Un respiradero 112 en el regulador 110 de presión está conectado a un contador de gas. Una válvula 104 de cuatro vías en la salida de gas del recipiente 102 de infusión permite retirar muestras del puerto 111 de muestra, aislar el recipiente 102 de infusión, ciclar la presión 116 y reciclar parte de la muestra de vuelta al recipiente 102 de infusión sin alterar la presión y la composición de la tapa del gas dentro de esta.

40 El procedimiento experimental para los ejemplos a continuación es el siguiente. La solución de reactivo acuoso premezclado se prepara por separado de acuerdo con las necesidades específicas del experimento; opcionalmente, la solución acuosa de reactivo puede precalentarse a una temperatura de interés. La muestra de cultivo se coloca dentro del recipiente 102 de infusión. No está presente líquido en el recipiente 102 de infusión. El recipiente 102 de infusión se coloca en el baño 101 termostático, que está funcionando a la temperatura establecida para el experimento. Una vez que la tapa 118 se coloca encima del recipiente 102 de infusión, usando la bomba 103 de vacío y CO<sub>2</sub> de la línea 107, se descarga cualquier aire y se forma una atmósfera de CO<sub>2</sub> en la parte superior de la muestra. Una vez asegurado el enjuague de cualquier aire residual, se interrumpe el flujo de CO<sub>2</sub> fresco desde la línea 107 operando en el controlador 115 de flujo. Se permite que la presión en el recipiente 102 de infusión caiga al nivel definido en el experimento al controlarlo a través del regulador 110 de presión.

50 Una vez que la presión y la temperatura se estabilizan en el nivel deseado, el líquido libre que se expulsó del cultivo cuando la presión disminuida se drena opcionalmente del recipiente usando el puerto 111 de muestra y se guarda para un análisis posterior. A continuación, se abre la válvula 109 de abertura y se permite que la solución de reactivo acuoso premezclada entre en el recipiente 102 de infusión donde tiene lugar la infusión. La cantidad de material de muestra se establece de tal manera que, dependiendo de la densidad aparente del material, la muestra se sumerge por completo una vez que se interrumpe la alimentación del líquido. Mediante la temperatura y la presión seleccionadas con precisión, se puede evitar la ebullición del líquido (la ebullición provoca una gran liberación de burbujas de gas). Después de que se completa la infusión y se cierra la válvula 109 de abertura, se establece una presión parcial de 1.0 atm de CO<sub>2</sub> abriendo y regulando el controlador 108 de flujo y presión.

60 Una vez que el líquido se ha infundido en el cultivo a una presión de 1.0 atm durante el tiempo deseado, el líquido libre se drena opcionalmente del recipiente usando el puerto 111 de muestra.

El experimento puede continuar durante el tiempo deseado. Si se necesita una muestra líquida durante el experimento, se puede conectar una jeringa al puerto 111 de muestra de la válvula 104 de cuatro vías que se ajusta para permitir que la jeringa se llene con líquido. Cualquier líquido residual fluye de regreso al recipiente a través del colector de válvula de cuatro vías una vez que se retira la jeringa y se cierra el puerto 111 de muestra.

65

El progreso de la fermentación se mide mediante gas producido en el respiradero 112 con un contador MilliGasm, tipo MGC-1, de Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG en Bochum, Alemania. La cantidad de gas producido se mide a la resolución de mililitros durante el período de fermentación. La fermentación de 3.35 g de azúcar (normalmente sacarosa) genera 1 L de gas (CO<sub>2</sub>), por lo que la cantidad de azúcar fermentada, la tasa de fermentación y la cantidad total de azúcar fermentada pueden inferirse del gráfico del gas producido a lo largo del tiempo.

Los siguientes ejemplos usan remolacha azucarera del norte de Minnesota, caña de azúcar de Florida y sorgo dulce de Tennessee. El jugo de cada uno fue exprimido y el contenido de azúcar en Brix se midió con un refractómetro digital. Las muestras de cada una se secaron con hueso para determinar el porcentaje de sólidos secos. Estos se combinaron para calcular el porcentaje (p/p) de azúcares en estos cultivos.

Obsérvese que la medición de Brix del jugo de sorgo dulce se ajustó multiplicando aproximadamente 0.8 para obtener el porcentaje en peso de azúcares totales. Esto se debe a que el jugo de sorgo dulce tiene más glucosa y fructosa que la remolacha azucarera o el jugo de caña de azúcar, y el índice de refracción de la glucosa y la fructosa difiere del de la sacarosa. Esto se describe en Liu et al., "Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation," *Renewable Energy* 33.5 (2008): 1130-1135.

Se calculó que la remolacha azucarera tenía un 18% de azúcar en peso, la caña de azúcar tenía un 14% de azúcar en peso y el sorgo dulce tenía un 10% de azúcar en peso.

Ejemplo 1: Infusión de agua en tejido de parénquima de remolacha azucarera

Se cortaron rodajas de remolacha radialmente de tres grosores diferentes, 6 mm, 12 mm y 18 mm. Estas rodajas se cortaron luego en rodajas cuadradas de 25 mm y todas las rodajas cuadradas de 25 mm para cada uno de los tres espesores se pesaron y se colocaron en tres de los aparatos descritos anteriormente (figura 1). La tapa de gas era aire para este ejemplo.

En la fase 1, se aplicó un vacío de 13 kPa durante 30 minutos, se eliminó el agua libre, se restableció la presión a 100 kPa y se pesó cada cubo.

En la fase 2, se aplicó un vacío de 13 kPa durante 30 minutos, se infundió agua al vacío hasta que se cubrió el cubo, se restableció la presión a 100 kPa, se infundió agua en el tejido del parénquima durante 30 minutos y se eliminó el agua libre y luego cada cubo fue pesado.

En la fase 3, se aplicó un vacío de 13 kPa durante 30 minutos, se eliminó el agua libre, se restableció la presión a 100 kPa y se pesó cada cubo.

El resultado de esta prueba se muestra en la tabla 1 a continuación y este resultado muestra que aproximadamente el 10% de la masa del tejido del parénquima exudaba del tejido cuando se aplicó un vacío durante 30 minutos. También muestra que aproximadamente el 6% de la masa del tejido del parénquima se podía infundir con agua al vacío y que aproximadamente la mitad de este exudaba del tejido cuando se aplicaba nuevamente el vacío. Más significativamente, este ejemplo muestra que la infusión fue casi idéntica en el tejido de 6 mm de espesor y el tejido de 18 mm de tejido.

Tabla 1: Masa de rodajas de remolacha azucarera

Espesor	Masa inicial	Masa de fase 1	Masa de fase 2	Masa de fase 3
6 mm	5.985 g	5.389 g	5.695 g	5.604 g
12 mm	8.987 g	8.358 g	8.761 g	8.312 g
18 mm	14.782 g	13.194 g	14.32 g	13.557 g

Ejemplo 2: fermentación de la caña de azúcar

La caña de azúcar picada se infundió con una solución de levadura ligeramente ácida enriquecida con nutrientes ricos en nitrógeno (Fermax de BSG Corporation). Se probaron dos soluciones diferentes por duplicado, una con levadura Thermosacc y otra con levadura Distillamax. Ambas levaduras están disponibles comercialmente de Lallemand Biofuels & Distilled Spirits y difieren en el tamaño promedio de los cuerpos celulares. La levadura Thermosacc tiene un diámetro celular promedio de 5 micras y el Distillamax tiene un diámetro celular promedio de 10 micras. Una vez completada la infusión, se controló la producción de dióxido de carbono a través de los contadores de gas para estimar el progreso de la fermentación. Se utilizó el siguiente procedimiento:

1. Se inicia el calentamiento del baño termostático a 38 °C.

2. Se pesa aproximadamente 50 g de caña de azúcar, luego se pica en trozos de aproximadamente una pulgada, pesando la cantidad total de caña nuevamente después de cortar.

5 3. Se preparan dos soluciones de levadura, una con 5 g/L de levadura Distillamax, 1 g/L de nutrientes Fermax y una con 5 g/L de levadura Thermosacc (C6), 1 g/L de nutrientes Fermax, regulando ambas a un pH de 3.5 con ácido fosfórico.

10 4. Se coloca la caña de azúcar en vasos sellados en el baño termostático y se aplica el vacío durante 30 minutos para garantizar la evacuación completa del gas de la biomasa.

5. Se infunden aproximadamente 200 g de la solución en cada vaso de precipitados.

15 6. Se restaura lentamente la presión atmosférica creando un tapón de gas inerte sobre el contenido del vaso de precipitados.

7. Se abre la válvula de ventilación de gas para permitir que el gas fluya a través de los medidores de flujo de gas.

8. Se deja que la fermentación se complete hasta que se registre el flujo de gas.

20 Las muestras con levadura Thermosacc y levadura Distillamax se analizaron por duplicado, y los resultados con el mayor rendimiento de gas se presentan en la tabla 2. Ambas fermentaciones tardaron un poco menos de 8 horas en completarse.

25 En ambos casos, la infusión permite que la fermentación se produzca dentro del cuerpo de la caña de azúcar con un preprocesamiento mínimo del sustrato además de una reducción de tamaño grueso. Sorprendentemente, las células de levadura más pequeñas parecen más efectivas asegurando una mayor conversión de azúcar como lo demuestra la mayor producción de gas. Este resultado es consistente con la levadura más pequeña que es capaz de difundirse más profundamente dentro del apoplasto de la caña de azúcar. En ambos casos, la infusión al vacío permite la fermentación in situ activa como se muestra en la tabla 2.

30

Tabla 2: Eficiencia de la fermentación de la caña de azúcar

Muestra	Peso de muestra(g)	Contenido de azúcar (g)	Producción teórica de CO <sub>2</sub> (L)	Producción real de CO <sub>2</sub> (L)	Rendimiento
Thermosacc	44.10	6.17	1.84	1.80	97.8%
Distillamax	43.10	6.03	1.80	1.20	66.6%

Ejemplo 3: fermentación de remolacha azucarera

35 Se infundieron piezas de remolacha azucarera cortadas en trozos gruesos con una solución de levadura ligeramente ácida preparada con levadura Distillamax de Lallemand Biofuels & Distilled Spirits. Se usaron diferentes tiempos de infusión para cada muestra. Después de que se completó la infusión, la producción de dióxido de carbono se controló por los contadores de gas para estimar el progreso de la fermentación. Se utilizó el siguiente procedimiento:

40 1. Se asegura de que el baño termostático esté a 38 °C.

2. Se pesan aproximadamente 100 g de remolacha azucarera, luego se cortan en trozos de cubos de aproximadamente una pulgada, pesando la remolacha total nuevamente después de cortar.

45 3. Se prepara la solución de levadura con 5 g/L de levadura Distillamax, regulando a un pH de 3.5 con ácido fosfórico.

50 4. En la solución de las muestras 2 y 4, se añade una enzima con actividad de pectinasa a una carga de aproximadamente 5 g por kg de biomasa seca.

5. Se coloca la muestra de remolacha azucarera en vasos de precipitados sellados en el baño termostático y se aplica el vacío durante 30 minutos.

55 6. Se infunde suficiente solución para sumergir todos los trozos de remolacha.

7. Se libera la presión instantáneamente para las muestras 1 y 2 y lentamente (aproximadamente 5 minutos) para las muestras 3 y 4.

8. Se conecta a los contadores de gas.

60

9. Se deja que la fermentación se complete.

El tamaño de muestra y la cantidad de gas producido por la fermentación de cada una de estas 4 muestras de remolacha azucarera se presentan en la tabla 3. Todas las fermentaciones tardaron entre 13 y 15 horas en completarse. El tiempo de infusión no tiene un impacto significativo en el rendimiento global de conversión de azúcar, ya que este rendimiento es superior a aproximadamente 90% para los casos de infusión rápida (muestras 1 y 2). La infusión lenta parece ser levemente perjudicial. La adición de la enzima pectinasa, que descompone la pared celular, mejora la fermentación e ilustra aún más la capacidad de infusión al vacío para proporcionar actividad enzimática y microbiológica in situ sin mezcla mecánica y un preprocesamiento mínimo de la biomasa.

Tabla 3: Eficiencia de la fermentación de la remolacha azucarera

Muestra	Peso de muestra(g)	Contenido de azúcar (g)	Producción teórica de CO <sub>2</sub> (L)	Producción real de CO <sub>2</sub> (L)	Rendimiento
1	92.623	16.67	4.98	4.50	90.4%
2	91.826	16.53	4.93	4.75	96.2%
3	92.269	16.61	4.96	4.40	88.7%
4	90.944	16.37	4.89	4.48	91.6%

## Ejemplo 4: fermentación de sorgo dulce

Se usó el mismo procedimiento de fermentación de sorgo dulce como en el ejemplo 2 anterior. En lugar de variar el tipo de levadura, se usó la levadura Thermosacc para ambas muestras. Una muestra drenó el líquido de los tallos después de la infusión y la otra no drenó el líquido.

Los resultados de estas fermentaciones se presentan en la tabla 4. Ambas fermentaciones tardaron un poco menos de 20 horas en completarse.

Sorprendentemente, la eficacia de la fermentación con el líquido drenado de los tallos es mayor que la eficacia de dejar el líquido alrededor de los tallos. En ambos casos, sin embargo, la infusión al vacío permite la fermentación in situ activa.

Tabla 4: Eficiencia de la fermentación de sorgo dulce

Muestra	Peso de muestra(g)	Contenido de azúcar (g)	Producción teórica de CO <sub>2</sub> (L)	Producción real de CO <sub>2</sub> (L)	Rendimiento
Drenado	51.1	5.11	1.53	1.52	99.3%
No Drenado	52.0	5.20	1.55	1.33	85.8%

## Ejemplo 5: fermentación de la patata

Se infundieron trozos de patata cortada en trozos gruesos con una solución de levadura ligeramente ácida hecha de levadura Thermosacc de Lallemand Biofuels & Distilled Spirits. Una muestra adicional se infundió con enzimas  $\alpha$ -amilasa de BSG Handcraft en Shakopee, MN, EE. UU. Esta  $\alpha$ -amilasa tiene una actividad máxima a 66 °C y aproximadamente 20% de actividad a 38 °C. Después de la infusión completa, la producción de dióxido de carbono se controló por los contadores de gas para estimar el progreso de la fermentación. Se utilizó el siguiente procedimiento:

1. Se asegura de que el baño termostático esté a 38 °C.
2. Se pesan aproximadamente 70 g de patata, luego se cortan en trozos de cubos de aproximadamente una pulgada, se pesa la patata total después de cortar.
3. Se prepara la solución de levadura con levadura Thermosacc a 5 g/L, regulando a un pH de 3.5 con ácido fosfórico.
4. En la solución para la muestra 2, se añade una enzima con actividad  $\alpha$ -amilasa a una carga de 5 g por kg de materia seca.
5. Se coloca la muestra de patata en vasos de precipitados sellados en el baño termostático y se aplica el vacío durante 30 minutos.
6. Se infunde suficiente solución para sumergir todos los trozos de patata.
7. Se libera la presión instantáneamente.

8. Se conecta a los contadores de gas.

9. Se deja que la fermentación funcione durante aproximadamente 120 horas.

5 El tamaño de muestra y la cantidad de gas producido fermentando cada una de estas 2 muestras de patata se presentan en la tabla 5. Los expertos en el arte reconocerán que hay aproximadamente un 0.5% a un 2% de azúcares simples (sacarosa + glucosa) en las células del parénquima y aproximadamente 18% de almidón en la patata, de las cuales aproximadamente el 80% del almidón se puede descomponer en glucosa, maltosa y maltotriosa mediante  $\alpha$ -amilasa. La fermentación de ambas muestras tomó 14.5 horas antes de que se produjera gas mensurable.

10 Sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que este largo tiempo de inducción fue causado en parte por la absorción de la producción inicial de CO<sub>2</sub> en el agua de la patata, y la producción de gas comenzó cuando el agua en la patata era saturada con CO<sub>2</sub>. Los expertos en el arte reconocerán que la solubilidad del CO<sub>2</sub> en agua a 38 °C es aproximadamente 1.6 g/L, que 0.076 L de tejido de patata contienen aproximadamente 0.608 L de agua, y que aproximadamente 0.042 L de CO<sub>2</sub> se disolverán en 0.076 L de patata antes de que aparezca la primera burbuja.

15 Después de 120 horas de fermentación, la muestra 1 produjo 0.155 L de gas y la muestra 2 produjo 1.27 L de gas. La muestra 1 no produjo gas medible entre 72 horas y 120 horas, lo que demuestra que todos los azúcares simples en el apoplasto y las células del parénquima se fermentaron y que no se liberaron azúcares simples adicionales de los gránulos de almidón. Esto muestra que la infusión de levadura preservará el tejido del parénquima rico en almidón.

20 La producción de gas significativamente más alta en la muestra 2 muestra que la  $\alpha$ -amilasa se difundió en las células de parénquima e hidrolizó aproximadamente 40% de los gránulos de almidón a azúcares que la levadura podría fermentar. La producción de gas fue continua a través de la fermentación de 120 horas, con una disminución lenta. Este ejemplo demuestra que esta técnica puede fermentar gránulos de almidón dentro de las células del parénquima simplemente infundiendo levadura y amilasa, sin infundir pectinasa. También muestra que la membrana celular del parénquima es permeable a las enzimas amilasa.

Tabla 5: Eficiencia de la fermentación de la patata

Muestra	Peso de muestra(g)	Sacarosa + Glucosa + Maltosa (g)	Producción teórica de CO <sub>2</sub> (L)	Producción real de CO <sub>2</sub> (L)	Rendimiento
Levadura sola	76	0.76	0.227	0.155+0.042	87%
Levadura + amilasa	74	10.65	3.18	1.27	40%

35 En esta descripción detallada, se ha hecho referencia a múltiples realizaciones y a los dibujos adjuntos en los que se muestran a modo de ilustración realizaciones de ejemplo específicas de la invención. Estas realizaciones se describen para permitir a los expertos en el arte practicar la invención, y se debe entender que un experto en el arte puede realizar modificaciones en las diversas realizaciones descritas.

40 Cuando los métodos y etapas descritos anteriormente indican ciertos eventos que ocurren en cierto orden, los expertos en el arte reconocerán que el orden de ciertas etapas puede modificarse y que tales modificaciones están de acuerdo con las variaciones de la invención. Además, ciertas etapas pueden realizarse al mismo tiempo en un procedimiento paralelo cuando sea posible, así como también realizarse de forma secuencial.

45 Las realizaciones, variaciones y figuras descritas anteriormente deberían proporcionar una indicación de la utilidad y versatilidad de la presente invención. También se pueden utilizar otras variaciones que no proporcionan todas las características y ventajas establecidas en este documento. En el caso de conflicto en las definiciones entre la presente divulgación y un diccionario u otra referencia, la presente divulgación controlará.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de etanol y dióxido de carbono a partir de tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos, dicho procedimiento comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos que contiene un apoplasto a una temperatura de cultivo de 5-40 °C;
- 10 (b) combinar dicho tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos con una solución de reactivo acuosa a una temperatura del reactivo de 20-40 °C que contiene una levadura *Sacchomyces cerevisiae*;
- 15 (c) exponer dicho tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos a una presión de preparación de fase gaseosa durante un tiempo de preparación, ya sea antes de la etapa (b) o después de la etapa (b), donde dicha presión de preparación de fase gaseosa es menor que la presión atmosférica;
- 20 (d) exponer dicho tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos a una presión de infusión en fase gaseosa durante un tiempo de infusión, donde dicha levadura infunde en dicho apoplasto en la que dicha presión de infusión en fase gaseosa es mayor que dicha presión de preparación en fase gaseosa; y
- 25 (e) mantener una presión de fermentación en fase gaseosa durante un tiempo de fermentación para producir etanol y dióxido de carbono dentro de dicho tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos, en la que dicha presión de fermentación en fase gaseosa es mayor que dicha presión de preparación en fase gaseosa y en la que al menos 25 % de la masa de los productos de fermentación es etanol.
- 30 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos se selecciona del grupo que consiste en tallos de caña de azúcar, tallos de sorgo dulce, tallos de híbridos de maíz tropical, tubérculos de remolacha azucarera, manzanas, uvas, naranjas y combinaciones de los mismos. preferiblemente en el que dicho tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos se selecciona del grupo que consiste en tubérculos de patata, tubérculos de batata, tubérculos de yuca, tubérculos de ñame, tubérculos de alcachofa de Jerusalén y combinaciones de los mismos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha solución acuosa de reactivo contiene enzimas pectinasas, enzimas xilanasas o enzimas amilasas o enzimas inulinasas.
- 35 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha presión de preparación en fase gaseosa es desde aproximadamente 105% a aproximadamente 200% de la presión de equilibrio de agua a la mayor de dicha temperatura de cultivo y dicha temperatura de reactivo.
- 40 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho tiempo de preparación es desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora, o dicho tiempo de infusión es desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora o en el que dicho tiempo de fermentación es desde aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 días.
- 45 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha solución acuosa de reactivo se homogeniza mezclando con energía turbulenta en el intervalo de 0.15 W/kg a 50 W/kg.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha presión de fermentación es la presión atmosférica.
- 50 8. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo además dicho procedimiento mantener dicho tejido de parénquima vegetal rico en carbohidratos en un entorno anaeróbico durante un tiempo de conservación del cultivo posterior a la finalización de dicho tiempo de fermentación.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende además recuperar dichos productos de fermentación mediante extracción al vacío, o mediante trituración.
- 55 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende además el drenaje de dicha solución acuosa de reactivo, ya sea antes de la etapa (e) o después de la etapa (e).

FIG. 1

