

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 944**

51 Int. Cl.:

C12P 5/02 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

A23K 10/30 (2006.01)

A23K 30/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2017 E 17708007 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3277825**

54 Título: **Método para fermentar tallos de la familia Poaceae**

30 Prioridad:

14.06.2016 US 201661349674 P

04.02.2017 US 201715424843

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

16.11.2018

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 2 689 944 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

Método para fermentar tallos de la familia *Poaceae*

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procesos de fermentación para sintetizar un compuesto químico deseado. Más específicamente, la invención se refiere a la preparación de compuestos orgánicos que contienen oxígeno con múltiples tipos de microorganismos.

10

Antecedentes de la invención

Los cultivos más ampliamente cultivados de la familia *Poaceae* son caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), sorgo (*Sorghum bicolor*) and maíz (*Zea mays*). La palabra *Poaceae* deriva del griego antiguo πῶα (póa), que significa "forraje". Los tallos de cultivos de la familia *Poaceae* se han usado en forraje animal durante milenios. Estos tallos los comen los rumiantes, incluyendo el ganado vacuno, las ovejas y las cabras, porque los rumiantes pueden digerir la celulosa y la hemicelulosa. Estos tallos también contienen azúcares en las células del parénquima de almacenamiento y algunas veces contienen cantidades menores de gránulos de almidón en las células del parénquima de almacenamiento.

20

Los azúcares en estos tallos se han usado desde hace tiempo para producir azúcar de mesa y melazas, y se han fermentado desde hace tiempo en etanol para general etanol bebible (por ejemplo, ron) y etanol combustible. Estos tallos también se ensilan a menudo rociándolos con bacterias acidolácticas, un proceso que conserva los tallos hasta un año como pienso animal y que hace que los tallos sean más digeribles para los rumiantes.

25

El ensilado se ha practicado durante aproximadamente 200 años desde que se descubrió (en Alemania) que cuando uno trocea gramíneas y comprime las gramíneas troceadas de modo que se mantiene el aire fuera, esas gramíneas troceadas (ensiladas) no se "echan a perder" (es decir, huelen como el vinagre). Incluso hoy en día, el ensilado de gramíneas y otros cultivos de la familia *Poaceae* implica trocear primero los tallos en pequeños trozos de aproximadamente 12 a 25 mm de longitud, después rociar con microorganismos (principalmente bacterias acidolácticas), después comprimir los tallos troceados para mantener el aire fuera.

30

Esto funciona únicamente porque los azúcares pueden difundir a las superficies del corte de los tallos troceados de modo que las bacterias acidolácticas puedan consumir los azúcares. La mayoría de las levaduras y la mayoría de las bacterias acidolácticas no son móviles (no pueden moverse por sí mismas), de modo que el azúcar debe difundir hasta ellas (estos microorganismos no pueden nadar hasta donde están los azúcares). Como no son móviles, y como los tallos de la familia *Poaceae* no se penetran fácilmente por los microorganismos, los tallos deben trocearse o triturarse para permitir que los azúcares difundan a los microorganismos.

35

Rociar microorganismos y enzimas en los tallos troceados o triturados solamente depositan microorganismos y enzimas en la superficie exterior de los tallos. Las grietas que se forman cuando los tallos se trocean o Trituran contienen burbujas de aire que permanecen fijas en las grietas, evitando que los microorganismos y las enzimas se depositen dentro de las grietas cuando se rocían en los tallos. Como las levaduras y las bacterias acidolácticas no son móviles, y como la difusión de las enzimas y los microorganismos es extremadamente lenta, la penetración de los tallos por levaduras, bacterias acidolácticas y enzimas es mala.

45

Existe la necesidad en la técnica de una solución a este problema de penetración incompleta de los tallos por levaduras, bacterias acidolácticas y especialmente enzimas.

50 Sumario de la invención

La invención proporciona un método para fermentar tallos de la familia *Poaceae*, comprendiendo el método las etapas de:

- 55 (a) proporcionar tallos de la familia *Poaceae*, en el que los tallos tienen una longitud promedio de más de 100 mm, y en el que los tallos tienen un contenido de humedad inicial promedio entre un 25 % y un 80 %;
- (b) comprimir los tallos entre rodillos mientras los tallos se sumergen en una solución acuosa de reactivo, en el que los rodillos comprimen el diámetro promedio de los tallos entre un 20 % y un 90 %, y en el que la solución acuosa de reactivo contiene uno o más organismos de fermentación seleccionados del grupo que consiste en
- 60 levaduras, bacterias acidolácticas, bacterias acidoacéticas y combinaciones de las mismas;
- (c) retirar los tallos de la solución acuosa de reactivo, en el que los tallos retienen al menos una parte del uno o más organismos de fermentación; y
- (d) fermentar los tallos durante un tiempo de fermentación para producir productos de fermentación dentro de los tallos.

65

- En realizaciones preferidas, los tallos se seleccionan del grupo que consiste en tallos de caña de azúcar, tallos de sorgo y tallos de maíz.
- 5 En algunas realizaciones, los tallos tienen hojas adheridas a los tallos.
- En algunas realizaciones, los tallos están presentes como una planta completa.
- En realizaciones preferidas, los rodillos tienen una velocidad tangencial entre 0,1 m/s y 10 m/s.
- 10 En realizaciones preferidas, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas seleccionadas del grupo que consiste en pectina liasa, amilasa, celulasa, glucosa oxidasa, hexosa oxidasa, xilanasas y combinaciones de las mismas.
- En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico y combinaciones de los mismos.
- 15 En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene iones ferrosos, peróxido de hidrógeno o una combinación de los mismos.
- En realizaciones preferidas, el tiempo de fermentación es entre 1 día y 7 días.
- 20 En realizaciones preferidas la levadura es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- En algunas realizaciones, los tallos se deshidratan durante el tiempo de retardo de fermentación de la etapa (d).
- 25 En algunas realizaciones las bacterias acidolácticas se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Propionibacterium freudenreichii* y combinaciones de las mismas.
- En realizaciones preferidas, el método comprende además mezclar la solución acuosa de reactivo usando energía turbulenta de 0,15 W/kg a 5 W/kg.
- 30 En algunas realizaciones el método comprende además mantener los tallos en un entorno anaeróbico durante un tiempo de ensilado posterior a completarse el tiempo de fermentación.
- 35 En algunas realizaciones, el tiempo de ensilado es entre un día y un año.
- En realizaciones preferidas, el método comprende además recuperar los productos de fermentación por trituración de los tallos.
- 40 En algunas realizaciones, el método comprende además recuperar los productos de fermentación por evaporación de los productos de fermentación de los tallos.
- En algunas realizaciones, el método comprende además suministrar los tallos a rumiantes posteriormente a la etapa (d).
- 45 En algunas realizaciones, el método comprende además usar los tallos con digestión anaeróbica para producir metano posteriormente a la etapa (d).
- En algunas realizaciones, el método comprende además usar los tallos con hidrólisis enzimática para producir etanol a partir de celulosa posteriormente a la etapa (d)
- 50 Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 es un dibujo esquemático de un aparato experimental usado en realizaciones y ejemplos de la presente invención.
- 55 Descripción detallada de realizaciones de la invención
- Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una" y "el", "la" incluyen referencias en plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.
- 60 Salvo que se indique de otro modo, todos los números que expresan parámetros, condiciones, resultados y similares usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tienen que entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, salvo que se indique lo contrario, los números expuestos en la
- 65

siguiente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiente de algoritmos y cálculos específicos.

5 La expresión "que comprende", que es sinónima de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por" es incluyente o indefinida y no excluye elementos o etapas del método adicionales no indicadas. "Que comprende" es una expresión de la técnica usada en el lenguaje de reivindicaciones que significa que los elementos de la reivindicación nombrada son esenciales, pero pueden añadirse otros elementos de la reivindicación y aún formar una construcción dentro del alcance de la reivindicación.

10 Como se usa en este documento, la expresión "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. Cuando aparece la expresión "consiste en" (o variaciones de la misma) en una oración del cuerpo de una reivindicación, en lugar de inmediatamente después del preámbulo, limita únicamente el elemento expuesto en esa oración; no se excluyen otros elementos de la reivindicación como un conjunto. Como se usa en este documento, la expresión "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los
15 elementos o etapas del método especificados, mas aquellos no afectan de forma material a la base y característica o características novedosas de la materia objeto reivindicada.

20 Con respecto a las expresiones "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en", cuando una de estas tres expresiones se usa en este documento, la materia objeto actualmente divulgada y reivindicada puede incluir el uso de cualquiera de las otras dos expresiones. Por tanto, en algunas realizaciones no indicadas de forma explícita de otro modo, cualquier circunstancia de "que comprende" puede remplazarse por "que consiste en" o, como alternativa, por "que consiste esencialmente en".

25 La presente invención se basa en una solución técnica al problema de que producir los productos de fermentación a partir de tejido de parénquima vegetal rico en azúcar es caro a causa de la gran cantidad de energía y capital necesario para triturar de forma eficaz los tallos de la familia *Poaceae* para extraer los azúcares. La presente invención también se basa en una solución técnica al problema de degradación de los tallos de la familia *Poaceae* después de recogerlos y antes del procesamiento o el consumo.

30 El término "comprimir", "comprimido", "comprimiendo" y "compresión" se usan en este documento para indicar que el diámetro promedio de los tallos se reduce en un 20 % a un 90 %. Los términos "triturar", "triturado" y "trituración" se usan en este documento para indicar que el diámetro promedio de los tallos se reduce en más de un 90 %.

35 Esta invención usa la estrategia técnica de comprimir el diámetro promedio de los tallos entre un 20 % y un 90 % mientras los tallos se sumergen en una solución de reactivo que contiene uno o más organismos de fermentación. Esta compresión fractura los tallos sin pérdida significativa de los azúcares y la solución de reactivo se atrae a las grietas resultantes en el tejido de parénquima. Los azúcares difunden de las células del parénquima, entran en contacto con los organismos de fermentación ubicados en las grietas y producen etanol y/o ácido láctico dentro de los tallos. El etanol y/o el ácido láctico conservan los tallos para posterior extracción de etanol y/o consumo como
40 forraje para rumiantes. En algunas variantes, las enzimas en la solución de reacción degradan y separan las paredes celulares del parénquima para trituración de baja energía para extraer etanol o azúcares.

Los principios de la invención se demuestran en los ejemplos de este documento.

45 El pH bajo que resulta de las bacterias acidolácticas que fermentan los azúcares en los cultivos evita que otros organismos de descomposición crezcan. Mantener el cultivo anaeróbico evita que las bacterias acidoacéticas consuman el etanol y produzcan ácido acético (vinagre). Como las bacterias acidoacéticas con muy móviles, consumen todo el etanol en los tallos ensilados salvo que el entorno se mantenga anaeróbico (sin oxígeno).

50 Ahora se cree que el pH bajo causado por las bacterias acidolácticas también provoca un tipo de hidrólisis ácida diluida de la hemicelulosa en los tallos, que mejora la digestibilidad de los tallos. Normalmente se realiza hidrólisis ácida diluida en unas pocas horas a pH 2,0 o menos, pero a pH 4,0 en ensilaje, esta hidrólisis ácida diluida se realiza en semanas o menos. Los datos que apoyan la hidrólisis ácida diluida en ensilaje se describen en Henk, Linda L., y James C. Linden, "Solid-state production of ethanol from sorghum." Applied biochemistry and
55 biotechnology 57.1 (1996): 489-501, las notas de Henk (en la página 491; citas internas omitidas) de que "Nuestros datos muestran que el ensilado es una forma de hidrólisis ácida diluida. El ensilado mejoró la reactividad de las fibras lignocelulósicas a hidrólisis enzimática".

60 Los expertos en la materia reconocerán que muchos microorganismos y enzimas se usan habitualmente para ensilar cultivos, incluyendo levaduras, bacterias acidolácticas, hemicelulasa, celulasa y glucosa oxidasa. Esto se describe en Kung, L, "Silage fermentation and additives," Proceedings of Alltech's Seventeenth Annual Symposium. 2001. Esto también se describe en Charley, Robert C WO-A-2011050478., (solicitud de patente PCT PCT/CA2010/001729).

65 Los expertos en la materia, y los que están familiarizados con la caña de azúcar, el sorgo y el maíz recién recolectado, reconocerán que los tallos recién recolectados de estos cultivos son bastante quebradizos. Si una

persona promedio camina con su talón sobre un tallo depositado en el suelo, sentirá que cruje, y al mirar el tallo comprimido verá una gran grieta, unas pocas grietas más pequeñas y una cantidad de grietas aún más pequeñas, todas estas grietas en la dirección axial. También verá que se exprime un poco de jugo del tallo simplemente caminando sobre el tallo con su talón. También reconocerá que un tallo doblado se romperá repentinamente con un chasquido (rotura quebradiza) como en el caso de la rotura de "quebrado en verde" bien conocida en los cultivos de maíz. Esta invención aprovecha la naturaleza quebradiza de los tallos recién recolectados para propagar grietas en los tallos con muy poca energía.

Las células del parénquima de almacenamiento en los tallos de la familia *Poaceae* son células poliédricas de pared delgada de aproximadamente 360 micrómetros de longitud y 60 micrómetros de diámetro con un grosor de pared de aproximadamente 2 micrómetros. Esto se describe en mayor detalle en Dong, "A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast)," *Plant Physiology* 105.4 (1994): 1139-1147.

En particular, Dong muestra en la figura 2, imágenes C y G, que las células del parénquima de la caña de azúcar se alinean en la dirección axial, pero no se alinean en la dirección radial. Esto es porque fluye agua a través del apoplasto en la dirección axial (limitada por la longitud internodal) pero no fluye a través del apoplasto en las direcciones radial o lateral. Las células del parénquima de otros tallos de la familia *Poaceae* se alinean de forma similar. La caña de azúcar y otros tallos de la familia *Poaceae* se fracturan fácilmente en la dirección axial porque las paredes celulares del parénquima forman planos de fractura en la dirección axial. Los tallos de la familia *Poaceae* son difíciles de cortar en la dirección radial porque las paredes celulares no se alinean en la dirección radial, forzando el corte a través de las paredes celulares. Por el contrario, los tallos de la familia *Poaceae* no requieren mucha energía para dividir o agrietar en la dirección axial.

Los tallos de la familia *Poaceae* se agrietan fácilmente cuando se comprimen de forma radial. Los resultados del agrietamiento de los tallos de caña de azúcar, junto con un modelo de elemento finito de agrietamiento, están contenidos en Skantz, J., y S. A. Domanti, "Experiments into the constitutive behaviour of sugarcane billets." PROCEEDINGS-AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS. WATSON FERGUSON AND COMPANY, 1998. Sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, se cree que la compresión radial inicial produce una gran grieta, la posterior compresión produce dos grietas más pequeñas, la compresión posterior produce cuatro grietas aún más pequeñas, etc.

Los tallos de la familia *Poaceae* que se agrietan cuando se comprimen rápidamente vuelven a una forma redondeada cuando se retira la fuerza sobre el tallo. Las fibras de los tallos tienen una alta resistencia a tracción y sirven para devolver el tallo a una forma redondeada cuando se retira la fuerza sobre los tallos, aunque con grietas en el tejido del parénquima del tallo.

El jugo de las células del parénquima de los tallos de la familia *Poaceae* generalmente contiene entre un 2 % y un 20 % de azúcares de hexosa, que consisten principalmente en sacarosa, glucosa y fructosa. El tejido del parénquima también contiene a menudo gránulos de almidón. La materia seca de estos tallos, después de exprimir el jugo, a menudo se menciona como bagazo. El bagazo generalmente comprende aproximadamente un 35 % de celulosa, un 25 % de hemicelulosa y un 22 % de lignina. La hemicelulosa típicamente consiste en aproximadamente un 85 % de xilosa, un 13 % de glucosa y un 2 % de arabinosa. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina a menudo están fuertemente unidas juntas, evitando el acceso de enzimas para hidrolizar la celulosa y la hemicelulosa. El ensilado (convertir los azúcares libres en ácido láctico) es una forma de hidrólisis ácida diluida que hidroliza la hemicelulosa, haciendo que la celulosa sea más accesible a las enzimas en la digestión de los rumiantes, la digestión anaeróbica o la hidrólisis enzimática.

El contenido de almidón de tallos de sorgo dulce se describe en Zhao, Ya Li, *et al.*, "Changes in stem composition and harvested produce of sweet sorghum during the period from maturity to a sequence of delayed harvest dates", *Biomass and Bioenergy* 39 (2012): 261-273. Zhao muestra, en la tabla 2, que los tallos tienen aproximadamente un 10,1 % de su peso en azúcares y un 3,6 % de su peso en almidón. Si el almidón se manifestara en el jugo, el jugo tendría aproximadamente un 4,3 % de su peso en almidón, pero los estudios muestran que el jugo únicamente tiene aproximadamente un 0,1 % de su peso en almidón (1000 mg/l). Sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, se cree que la mayoría del almidón se queda atrás en los tallos cuando se exprime el jugo, porque se filtran los gránulos de almidón cuando los tallos están bajo presión extrema.

El contenido de almidón de la caña de azúcar y el jugo de sorgo dulce se describe en Alves, Fernanda Viginotti, *et al.*, "Structural and physicochemical characteristics of starch from sugar cane and sweet sorghum stalks", *Carbohydrate polymers* 111 (2014): 592-597. Alves muestra que el jugo de caña de azúcar tiene aproximadamente 356 mg/l de almidón y el jugo de sorgo dulce tiene aproximadamente 1147 mg/l de almidón. Esto implica que los tallos de caña de azúcar tienen aproximadamente un tercio del almidón que los tallos de sorgo dulce y, por lo tanto, aproximadamente un 1 % del peso del tallo de caña de azúcar es almidón.

El contenido de azúcar de los híbridos de maíz tropical se describe en White, Wendy G., *et al.*, "The sugar, biomass and biofuel potential of temperate by tropical maize hybrids", *GCB Bioenergy* 4.5 (2012): 496-508. White muestra

que los híbridos de maíz templado y tropical (*Zea mays*) producen tanto azúcares en el grano como azúcares fermentables del tallo.

5 Muchos organismos de fermentación pueden convertir directamente glucosa, fructosa, maltosa (dímero de glucosa) y sacarosa (dímero de glucosa-fructosa) en etanol y ácido láctico. En este documento, los monómeros y dímeros de glucosa y fructosa se mencionarán como azúcares, los organismos de fermentación que convierten los azúcares en etanol se mencionarán como levaduras y los organismos de fermentación que convierten los azúcares en ácido láctico se mencionarán como bacterias acidolácticas. Los organismos de fermentación que convierten azúcares en etanol pueden ser organismos monocelulares eucariotas o pueden ser bacterias. Los organismos de fermentación que convierten azúcares en ácido láctico pueden ser organismos monocelulares eucariotas o pueden ser bacterias.

15 Muchos organismos de fermentación convierten azúcares en etanol. Los organismos de fermentación más ampliamente usados que producen etanol, las levaduras cerveceras, son las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. El etanol tiene valor económico significativo en bebidas, combustibles de transporte y precursores para otros compuestos orgánicos.

20 Otros organismos de fermentación convierten azúcares en ácido láctico. Estos se conocen como bacterias acidolácticas y la cepa más habitual es *Lactobacillus plantarum*. El ácido láctico reduce el pH de lo que se está fermentando hasta aproximadamente 4,2, lo que inhibe el crecimiento de la mayoría de otras bacterias y hongos. Esto se usa habitualmente para conservar alimentos tales como el yogur y el chucrut. Esto también se usa habitualmente para conservar los cultivos para uso posterior como pienso animal (forraje), conocido como "ensilado".

25 Algunos organismos convierten el etanol en ácido acético (vinagre) en presencia de oxígeno (entornos aeróbicos). La cepa más habitual es *Acetobacter aceti*.

30 Una solución a un 0,5 % de ácido fórmico es un inhibidor selectivo de las bacterias acidolácticas, así como otras bacterias contaminantes, pero no inhibe las levaduras. Esto se describe en Schmidt, J., *et al.*, "Preservation of sugar content in ensiled sweet sorghum", *Bioresource Technology* 60.1 (1997): 9-13. Se usa un gran porcentaje del ácido fórmico producido en todo el mundo para el ensilado de pienso animal.

35 La inhibición de *Saccharomyces cerevisiae* por ácido láctico y ácido acético se describe en Narendranath, N. V., K. C. Thomas, y W. M. Ingledew, "Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26.3 (2001): 171-177. Narendranath indica que "Cuando había un 0,5 % p/v de ácido láctico presente en el medio, la presencia de incluso un 0,04 % p/v de ácido acético (que no causa un cambio significativo en la tasa de crecimiento de levaduras cuando está presente por sí mismo) causaba una reducción significativa en la tasa de crecimiento de *S. cerevisiae*".

40 El punto de ebullición del etanol es 78 °C, el punto de ebullición del ácido láctico es 122 °C y el punto de ebullición del ácido acético es 118 °C. Esto hace posible una separación de bajo coste del etanol de las soluciones que contienen ácido láctico y ácido acético usando un alambique de vaso (a veces llamado alambique). Sin embargo, el punto de ebullición del ácido fórmico es 100,8 °C, lo que hace más difícil separar una mezcla de etanol y ácido fórmico usando un alambique de vaso. El metanol también se produce en cantidades limitadas por organismos de fermentación y algunas enzimas, y tiene un punto de ebullición de 65 °C. Según hierve a una temperatura inferior del etanol, puede retirarse usando un alambique de vaso descartando el pequeño porcentaje inicial del destilado (llamado cabecera). Tanto el ácido fórmico como el metanol son tóxicos para los seres humanos, de modo que, si se produce alcohol de bebida a partir de tallos fermentados, no debe usarse ácido fórmico para ensilar los tallos.

50 Hay técnicas bien conocidas para fermentar los azúcares en los tallos de la familia *Poaceae* en etanol. Los tallos generalmente se trituran entre una serie de rodillos para extraer el jugo haciendo estallar las células del parénquima, y después el jugo se separa de los sólidos residuales y se fermenta. Como las células del parénquima son tan pequeñas, se requiere una gran cantidad de energía para triturarlas. Casi un 35 % del capital y los costes de funcionamiento de la producción de azúcar a partir de tallos se debe al coste de trituración. La economía de la trituración de la caña de azúcar se describe en 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.

55 La fermentación en estado sólido a veces se usa para fermentar tallos de la familia *Poaceae*, cortando los tallos en trozos pequeños (o picando los tallos), rociándolos con levadura y dejándolos fermentar. La levadura se adhiere al tejido de parénquima recién expuesto y los azúcares de dentro de los trozos troceados (o tallos picados) difunden a la levadura, que fermenta los azúcares en etanol. Este es el mismo mecanismo que el ensilado, pero en el que se usan bacterias acidolácticas en lugar de levadura. La desventaja de este tipo de fermentación en estado sólido es que requiere una gran cantidad de energía para pasteurizar los tallos antes de la fermentación. Otra desventaja de esta técnica es la gran cantidad de energía necesaria para cortar o picar los tallos. Otra desventaja de esta técnica es que no permite hacer reaccionar el interior de los tallos con enzimas, a causa de la difusión muy lenta de las enzimas. Otra desventaja es que los tallos troceados o picados tienen una densidad aparente muy inferior a los tallos completos o leños.

Un ejemplo de esto es el proceso EX-FERM, descrito en la patente de Estados Unidos n.º 4560659, expedida el 24 de diciembre de 1985 de Asturias. El proceso EX-FERM implica trocear la caña de azúcar en trozos con un diámetro de tamaño de partícula promedio entre 0,25 cm y 4,0 cm, mezclar con levadura y agua y fermentar. La solución fermentada entonces se reutiliza en posteriores fermentaciones para aumentar la concentración de etanol antes de la destilación.

Otro tipo de fermentación en estado sólido se describe en Bryan, William L., "Solid-state fermentation of sugars in sweet sorghum", *Enzyme and Microbial Technology* 12.6 (1990): 437-442. Esta técnica corta los tallos a longitudes de 0,6 cm o pica los tallos. Casi un 80 % del azúcar en los tallos se fermenta en etanol. Sin embargo, se producen grandes cantidades de ácido láctico y ácido acético porque los tallos no se pasteurizaron antes de la fermentación.

Un tipo similar de fermentación en estado sólido se describe en Henk, Linda L., y James C. Linden, "Solid-state production of ethanol from sorghum", *Applied biochemistry and biotechnology* 57.1 (1996): 489-501. Esta técnica usa una troceadora de forraje para trocear tanto los tallos como las hojas en el campo, rociando el forraje troceado con levadura y enzimas, y después permitir que fermenten. Una desventaja es que se necesita extracción contracorriente para extraer el etanol, que es un método de mayor capital que el triturado de los tallos. Henk indica (en la página 500) que "El ensilaje de sorgo etanólico es estable durante un periodo de al menos 230 d, produciendo por tanto potencialmente una materia básica de bajo coste para la producción continua de etanol en una base anual".

Otra técnica para fermentar los azúcares en los tallos de la familia *Poaceae* en etanol se describe en la patente de Estados Unidos n.º 9499839, expedida el 22 de noviembre de 2016 de Hamrick, que es del mismo propietario que la presente solicitud. Esta técnica usa vacío para infundir levadura y enzimas en el apoplasto de cultivos ricos en carbohidratos, incluyendo caña de azúcar y sorgo dulce, drenando el líquido de alrededor de los cultivos, y después fermentando dentro del apoplasto.

Los tallos de la familia *Poaceae* pueden digerirse por rumiantes después de ensilado. Henk afirma que esta digestibilidad mejorada está causada por hidrólisis ácida diluida de hemicelulosa. La digestibilidad del sorgo dulce se describe en Di Marco, O. N., *et al.*, "Digestibility of forage silages from grain, sweet and bmr sorghum types: Comparison of *in vivo*, *in situ* and *in vitro* data", *Animal Feed Science and Technology* 153.3 (2009): 161-168. La digestibilidad de la caña de azúcar se describe en Kawashima, T., *et al.*, "Feeding value of sugarcane stalk for cattle", *ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES* 15.1 (2002): 55-60. La digestibilidad de los tallos de rastrojos de maíz se describe en Tolera, Adugna, y Frik Sundstøl, "Morphological fractions of maize stover harvested at different stages of grain maturity and nutritive value of different fractions of the stover", *Animal Feed Science and Technology* 81.1 (1999): 1-16.

La digestibilidad y valor nutritivo de los cereales ensilados se describe en Jaakkola, Seija, Pekka Huhtanen, y K. Hissa, "The effect of cell wall degrading enzymes or formic acid on fermentation quality and on digestion of grass silage by cattle", *Grass and Forage Science* 46.1 (1991): 75-87. Jaakkola concluye que, cuando el fleo (*Phleum pretense*, de la familia *Poaceae*) contiene azúcares insuficientes para ensilado con bacterias acidolácticas, de modo que el ensilado con ácido fórmico funciona mejor que el ensilado con enzimas celulasa y hemicelulasa.

La mayoría de los organismos de fermentación oxidan azúcares en dióxido de carbono y agua en un entorno aeróbico (con oxígeno). Un mol de glucosa o fructosa ($C_6H_{12}O_6$) (o 0,5 moles de sacarosa o maltosa) y 6 moles de oxígeno (O_2) se oxidan en 6 moles de dióxido de carbono (CO_2) y seis moles de agua (H_2O). Este mecanismo retira rápidamente el oxígeno del entorno cuando se está fermentando.

Las levaduras fermentan azúcares en etanol en un entorno anaeróbico (sin oxígeno). Un mol de glucosa o fructosa (o 0,5 moles de sacarosa o maltosa) se fermenta en 2 moles de etanol y 2 moles de dióxido de carbono y proporciona 118 kJ de calor. Esto significa que la fermentación de una solución a un 18 % de azúcar producirá una elevación de la temperatura de 34 °C, lo que significa que se requiere refrigeración del medio de fermentación. Fermentar 1 litro de una solución de azúcar a un 18 % (1 mol de glucosa) también producirá 2 moles de dióxido de carbono, que tiene un volumen de aproximadamente 48 litros a 20 °C y presión atmosférica. Una levadura típica fermenta de forma más eficaz entre 20 °C y 40 °C, pero tiene actividad de fermentación significativa hasta 5 °C (el vino blanco se fermenta entre 7 °C y 15 °C). Las células de levadura mueren gradualmente a temperaturas por encima de 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 en 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.

Las bacterias acidolácticas fermentan los azúcares en ácido láctico en entornos tanto aeróbicos como anaeróbicos, dependiendo del tipo de bacteria acidoláctica. En una fermentación homoláctica, un mol de glucosa o fructosa ($C_6H_{12}O_6$) (o 0,5 moles de sacarosa o maltosa) se fermenta en dos moles de ácido láctico ($C_3H_6O_3$). En una fermentación heteroláctica, un mol de glucosa o fructosa ($C_6H_{12}O_6$) (o 0,5 moles de sacarosa o maltosa) se fermenta en un mol de ácido láctico ($C_3H_6O_3$), un mol de etanol (C_2H_6O) y un mol de dióxido de carbono (CO_2). *Lactobacillus plantarum* crece entre 15 °C y 40 °C en entornos tanto aeróbicos como anaeróbicos. En entornos aeróbicos,

Lactobacillus plantarum respira oxígeno y este oxígeno consumido produce peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que inhibe el crecimiento de otros organismos.

5 La mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tiene un diámetro de aproximadamente 10 micrómetros. Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con un tamaño celular de aproximadamente 5 micrómetros es Thermosacc® Dry, disponible en Lallemand Biofuels & Distilled Spirits, Duluth, Georgia, EE. UU. Produce concentraciones de etanol de hasta un 20 % en volumen (16 % en peso), de modo que cultivos ricos en azúcar con hasta un 32 % de azúcar en peso pueden fermentarse por esta levadura. Esto significa que un cultivo o jugo extraído puede deshidratarse antes de la fermentación, de modo que la concentración de etanol resultante sea mayor. La fermentación con levadura puede tardar de 1 hora a 8 horas antes de la producción significativa de etanol y dióxido de carbono. Esto se llama habitualmente el tiempo de retardo de fermentación. La deshidratación durante el tiempo de retardo de fermentación puede aumentar la concentración de etanol final.

15 La mayoría de las cepas de *Lactobacillus plantarum* tienen forma de varilla con un diámetro de aproximadamente 0,5-1,2 micrómetros y una longitud de 1-10 micrómetros. Una fuente de *Lactobacillus plantarum* es Inoculante de Ensilaje II BIOTAL®, disponible en Lallemand Animal Nutrition, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU. Otro *Lactobacillus plantarum* se usa con otras bacterias y enzimas para tratar el ensilaje. Esto se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5432074, expedida el 11 de julio de 1995 de Evans *et al.* Las formulaciones de ensilado actualmente disponibles de Lallemand Animal Nutrition contiene mezclas de *Lactobacillus plantarum* con *Lactobacillus buchneri*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* y *Propionibacterium freudenreichii*.

25 Los organismos de fermentación son tan grandes que no se mueven por difusión en su vida. Sin embargo, los gases y azúcares difunden fácilmente, y difunden fácilmente a través de las paredes celulares del parénquima, y las enzimas difunden a través de líquidos externos a las células del parénquima. El coeficiente de difusión de dióxido de carbono es $2,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, lo que significa que difunde 1 mm en aproximadamente 7 minutos y 10 mm en aproximadamente 11 horas. El coeficiente de difusión de la sacarosa es $7,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, lo que significa que difunde 1 mm en aproximadamente 17 minutos y 10 mm en aproximadamente 39 horas. El coeficiente de difusión de la pectina liasa es $8,0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, lo que significa que difunde 1 mm en aproximadamente 3,5 horas y 10 mm en aproximadamente 14 días.

30 Las células de levadura se adhieren a las superficies (tales como células del parénquima) en presencia de azúcares. Esto se describe en Verstrepen y Klis, "Flocculation, adhesión and biofilm formation in yeasts", Molecular microbiology 60.1 (2006): 5-15. Asimismo, las bacterias acidolácticas también se adhieren a superficies tales como células del parénquima.

35 Las levaduras y las bacterias acidolácticas se venden ambas en forma liofilizada y son fáciles de manipular. Ambas se clasifican como GRAS (generalmente reconocidas como seguras) y se consumen habitualmente en la dieta promedio, por ejemplo, el pan se hace con levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el yogur se hace con *Lactobacillus plantarum* (que también está presente en la saliva) y *Lactobacillus acidophilus*. Asimismo, las enzimas pectina liasa, amilasa, celulasa, glucosa oxidasa, hexosa oxidasa y xilanasas están disponibles en forma de calidad alimenticia.

45 El almidón es un polímero de glucosa. Antes de poder convertir el almidón por la levadura en etanol o por bacterias acidolácticas en ácido láctico, primero debe convertirse en glucosa por enzimas amilasa. El almidón es insoluble en agua en el intervalo de temperatura para el que las levaduras o las bacterias acidolácticas son activas.

50 Hay amilasas disponibles que convierten el almidón en glucosa de forma eficaz en el intervalo de temperatura en que funciona de forma eficaz la levadura. Un ejemplo es la formulación enzimática STARGEN® 002 de DuPont Industrial Biosciences, EE. UU. Esto contiene una alfa-amilasa de *Aspergillus kawachi* expresada en *Trichoderma reesei* y glucoamilasa de *Trichoderma reesei* que funciona de forma sinérgica hidrolizando el sustrato de almidón granular en glucosa. La endoactividad, alfa-amilasa y la exoactividad, glucoamilasa catalizan la hidrólisis completa del almidón granular en una diversidad de condiciones de fermentación de etanol. STARGEN® 002 tiene actividad significativa entre 20 °C y 40 °C, y entre pH 3,5 y 4,5, de modo que es adecuada para el pH y la temperatura de la levadura.

55 El tejido del parénquima puede macerarse (separarse las células entre sí) por enzimas. Cuando el tejido del parénquima está macerado, la membrana celular también se fractura, tanto como por acción mecánica como por enzimas que se liberan de la pared celular. Esto causa que los contenidos de las vacuolas filtren de las células del parénquima y causa que las enzimas difundan más fácilmente en las vacuolas. Esto también proporciona una acción de enriamiento, donde el líquido en las células del parénquima puede retirarse más fácilmente por exprimido o evaporación. La pectina liasa y la xilanasas maceran las células del parénquima en tallos de *Poaceae*. Esto se describe en Ishii, "Enzymes for the isolation of protoplasts", Plant Protoplasts and Genetic Engineering I. Springer Berlin Heidelberg, 1989, 23-33. Ishii también muestra que la celulosa también provoca degradación de la pared celular.

65 La pectina liasa degrada la pectina sin producir metanol como subproducto. Esto hace que el jugo fermentado sea más útil como producto de etanol de mayor valor de esta invención. Hay pectinas liasas disponibles que funcionan 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. Sin embargo, la pectina liasa es infrecuente porque tiene actividad significativa a temperaturas tan bajas como 5 °C. La pectina liasa se describe en Yadav *et al.*, "Pectin lyase: a review", *Process Biochemistry* 44.1 (2009): 1-10. Dos ejemplos de pectina liasa que funcionan en el mismo intervalo de pH y temperatura de la levadura son "Pectinex® XXL" (Novozymes A/S, Dinamarca) y "Rohapect 10L" (AB Enzymes GmbH, Alemania).

Ishii también muestra que la xilanasa macera las células del parénquima de tallos de los tallos de *Poaceae* y la celulasa estalla las paredes celulares de las células del parénquima de estos tallos. Un ejemplo de una xilanasa disponible en el mercado es HTec3 (Novozymes A/S, Dinamarca), que es una mezcla de endoxilanasa y celulasa. HTec3 tiene aproximadamente un 90 % de actividad a temperaturas por debajo de 30 °C y aproximadamente un 70 % de actividad a un pH de 4,0, de modo que es adecuada para el pH y la temperatura de la levadura.

La glucosa oxidasa convierte glucosa y O₂ en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Una combinación de glucosa oxidasa y celulasa ha demostrado prevenir la degradación del ensilaje de cereal. En condiciones aeróbicas. Esto se describe en Rauramaa, A. L., J. J. Setälä, y A. E. A. Tommila, "The effect of glucose oxidase on the preservation of Grass silage", *Grass and Forage Science* 46.4 (1991): 359-364. La glucosa oxidasa se activa en un amplio intervalo de pH y temperaturas, que se describe en Biyela, B. N. E., *et al.*, "The production of reduced-alcohol wines using Gluzyme Mono® 10.000 BG-treated grape juice", *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 30, n.º 2, (2009): 124-132. Sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, se cree que la celulasa libera glucosa de la celulosa difícil de hidrolizar, y esta liberación lenta de glucosa provoca la producción lenta de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, donde el efecto combinado del pH inferior debido al ácido glucónico y la toxicidad del peróxido de hidrógeno evita que la mayoría de los organismos contaminantes produzcan ácido láctico y ácido acético.

Cuando está fermentando, la levadura produce grandes cantidades de dióxido de carbono (CO₂). Se forma ácido carbónico por la disolución de CO₂ en agua. Cuando está fermentando, la presión parcial de CO₂ es 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® XXL y Rohapect 10L) tienen actividad significativa a este pH y las enzimas hidrolizantes de almidón granular (tales como STARGEN) tienen actividad significativa a este pH. Asimismo, todas estas enzimas tienen actividad significativa en el intervalo de temperatura de la levadura (25 °C a 40 °C).

La temperatura de recogida de la caña de azúcar, el sorgo y el maíz puede estar por debajo de 20 °C. Sin embargo, el calor liberado por la fermentación de los azúcares difundidos del tejido del parénquima aumentará rápidamente la temperatura de este tejido hasta el intervalo de temperatura en que las enzimas tienen actividad significativa.

La densidad aparente de caña de azúcar y sorgo de tallo completo es entre 300 y 400 kg/m³. La densidad aparente de leños (secciones cortadas) de caña de azúcar, sorgo y maíz (es decir, tallos), es entre 180 y 240 kg/m³. La densidad aparente de tallos troceados entre 10 mm y 25 mm de longitud es de aproximadamente 60 kg/m³. En general, la densidad aparente está inversamente relacionada con la longitud troceada de los tallos.

Si los tallos están completos, se fermentan leños o tallos troceados en una solución acuosa, se diluye el jugo de los tallos entre 2,5 x y 10 x. Como el coste de separación del etanol de las soluciones diluidas es prohibitivo, esto no es práctico. Por ejemplo, cuando la densidad aparente de los tallos es 200 kg/m³, 5 l de solución acuosa rodea cada 0,5 l de jugo de tallo. Si 1 l de jugo de tallo tiene un 10 % de azúcar, tendrá aproximadamente un 5 % de etanol después de la fermentación. Si los tallos se fermentan en una solución acuosa, la solución resultante tendrá un 0,5 % de etanol después de la fermentación, que no es comercialmente viable de extraer. Esto puede resolverse fermentando los tallos completos y los leños en una solución de etanol a un 5 %, pero esto tiene otros problemas de acumulación de contaminantes con el tiempo.

Como los costes de transporte son principalmente una función del volumen (y no del peso), y como los cultivos a menudo se recogen a distancias significativas de donde se procesan, es bastante caro transportar los azúcares a dichas bajas densidades aparentes, ya que únicamente un 2 % a un 5 % del volumen de un camión está ocupado por azúcar. Existe una necesidad en la técnica de reducir el coste de generación de etanol a partir de cultivos ricos en azúcar generando etanol en (o cerca de) el lugar de recolección de estos cultivos, reduciendo los costes de transporte.

Las células del parénquima en los tallos son tejido vivo y, por lo tanto, respiran después de la recolección. La respiración implica convertir oxígeno y azúcar en las células del parénquima en dióxido de carbono y energía para mantener la célula. La caña de azúcar, el sorgo y el maíz pierden cantidades significativas de azúcar en la respiración cuando se están almacenando. Existe una necesidad en la técnica de reducir el azúcar perdido en respiración convirtiendo más rápidamente los azúcares en etanol que los métodos actuales. Una vez que los azúcares en los cultivos se han convertido en etanol, pueden almacenarse durante largos periodos, permitiendo la retirada continua del etanol en aproximadamente un año. Se desea usar de forma más eficaz el capital invertido en la extracción con rodillos, la separación de etanol y la destilación usando este equipo durante todo el año, no solamente durante la estación de recolección.

Si los tallos de caña de azúcar, sorgo y maíz se almacenan en condiciones anaeróbicas (sin oxígeno), los microorganismos en el exterior de los tallos colonizarán los tallos y después de 21 días fermentarán completamente todos los azúcares en los tallos, principalmente en ácido láctico y ácido acético. Como la capa exterior de los tallos a menudo está erosionada y dañada por la recolección, los microorganismos pueden penetrar más fácilmente las capas exteriores de los tallos, dando lugar a pérdidas de azúcar debido a la fermentación en ácido láctico y ácido acético. Rociar los tallos con levaduras o bacterias acidolácticas sin trocear o picar los tallos en primer lugar es una técnica de ensilado ineficaz.

Las levaduras producen grandes cantidades de dióxido de carbono durante la fermentación, y la infusión de levaduras en tallos agrietados forma una espuma en el exterior de los tallos durante la fermentación y expulsa líquido de los tallos mediante la acción de formación de burbujas dentro del tejido. Sorprendentemente, las levaduras no quedan expulsadas por estas burbujas, y las levaduras siguen fermentando hasta que se fermentan todos los azúcares.

Si el deseo de limitarse a teoría particular alguna, se cree que la adhesión de las células de levadura en células del parénquima en presencia de azúcares es más fuerte que las fuerzas de las burbujas de dióxido de carbono que actúan expulsando las levaduras del tejido del parénquima.

Esta invención también se basa en el hecho de que la tasa de difusión de los azúcares a través de la membrana celular en células del parénquima de los tallos de la familia *Poaceae* es suficiente para posibilitar que los organismos de fermentación en las grietas fermenten los azúcares dentro de las células del parénquima a una alta tasa. El etanol entonces difunde en las células del parénquima. En algunas variaciones, la pectina liasa macera el tejido del parénquima, reduciendo la energía necesaria para triturar los tallos para recuperar el etanol o los azúcares no fermentados.

La invención proporciona un método para fermentar tallos de la familia *Poaceae*, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) proporcionar tallos de la familia *Poaceae*, en el que los tallos tienen una longitud promedio mayor de 100 mm, y en el que los tallos tienen un contenido de humedad inicial promedio entre un 25 % y un 80 % (base ponderal) tal como un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %;
- (b) comprimir los tallos entre rodillos mientras los tallos se sumergen en una solución acuosa de reactivo, en el que los rodillos comprimen el diámetro promedio de los tallos entre un 20 % y un 90 %, y en el que la solución acuosa de reactivo contiene uno o más organismos de fermentación seleccionados del grupo que consiste en levaduras, bacterias acidolácticas, bacterias acidoacéticas y combinaciones de las mismas;
- (c) retirar los tallos de la solución acuosa de reactivo, en el que los tallos retienen al menos una parte del uno o más organismos de fermentación; y
- (d) fermentar los tallos durante un tiempo de fermentación para producir productos de fermentación dentro de los tallos.

Los tallos de la familia *Poaceae* son quebradizos cuando tienen un contenido de humedad entre un 25 % y un 80 %, de modo que comprimirlos entre rodillos causa una fina red de grietas que se forman en la dirección axial. Las levaduras de tipo silvestre y las bacterias acidolácticas en el exterior de los tallos no se infunden en cantidades significativas en la red fina de grietas en los tallos durante la etapa (b) porque la concentración de organismos de fermentación en la solución acuosa de reactivo es mucho mayor que la concentración de esos organismos de fermentación de tipo silvestre del exterior de los tallos. Ni las levaduras ni las bacterias acidolácticas son móviles, de modo que los organismos de fermentación del exterior de los tallos no colonizan el interior de los tallos, y los azúcares que difunden desde el interior de los tallos se consumen dentro de los tallos por los organismos de fermentación infundidos con la solución acuosa de reactivo. Por lo tanto, se consume muy poco azúcar de los tallos por las levaduras de tipo silvestre y las bacterias acidolácticas en el exterior de los tallos.

Los tallos tienen que ser suficientemente largos para ser arrastrados desde un canal de alimentación, propulsados a través de rodillos (dos rodillos o tres rodillos en realizaciones preferidas) y expulsados a través una tolva de salida. La tolva de salida tiene que tener un diámetro constante (o creciente) para evitar el taponamiento en la salida. Los ensayos han demostrado que tallos de 100 mm o más largos pueden trabajar con los rodillos. Los expertos en la materia observarán que los tallos pueden comprimirse uno cada vez entre los rodillos o pueden alimentarse múltiples tallos entre los rodillos.

La operación unitaria clave en este método es la compresión de los tallos mientras se sumergen en la solución acuosa de reactivo, justo lo suficiente para formar una red de grietas microscópicas y no demasiado para que se manifieste una cantidad significativa de jugo. Sorprendentemente, los tallos pueden comprimirse mientras los tallos se sumergen a alta velocidad, y la solución acuosa de reactivo se arrastra dentro de la red de grietas microscópicas a esta alta velocidad. Los ensayos a 1 m/s de velocidad de caña muestran que la distancia sumergida de aproximadamente 200 mm tiene un tiempo sumergido de aproximadamente 200 ms para que las enzimas y los organismos de fermentación penetren en el tallo. Los ejemplos muestran que este tiempo es suficiente para provocar la penetración completa del tallo.

5 Diferentes tallos de la familia *Poaceae* (o diferentes híbridos) requieren diferentes cantidades de presión entre los rodillos. Diferentes diámetros de rodillo, diferentes resistencias elásticas, diferentes alturas de pala, diferentes cantidades de rodillos y diferentes velocidades tangenciales aplicarán diferentes fuerzas de propagación de grietas en diferentes tipos de tallos. Sin embargo, no se requiere experimentación excesiva para determinar la fuerza requerida entre los rodillos, ya que hay procedimientos simples para determinar la resistencia elástica óptima necesaria.

10 El ensayo de calibración más simple implica hacer pasar tallos entre los rodillos a la velocidad de producción (entre 0,1 y 10 m/s) sin líquido en el aparato, cambiando los resortes con diferentes constantes elásticas hasta que se experimenta menos de un 1 % de pérdida de jugo. Estos ensayos de pérdida de jugo pueden hacerse en unas pocas horas. Los ensayos han demostrado que únicamente un 0,5 % de pérdida de jugo se produce a presión suficiente entre los rodillos para lograr la infusión completa.

15 Los expertos en la materia se darán cuenta de que un ensayo de validación posterior es medir el Brix del jugo en el tallo antes de la infusión, infundir tallos con la solución acuosa de reactivo y medir el resultado de fermentación después de 3 días de fermentación. La medición del contenido de etanol y el ablandamiento del tejido del parénquima validará fácilmente que la presión elegida entre los rodillos es eficaz.

20 La realización preferida de esta invención es comprimir tallos completos entre los rodillos, ya que esto puede hacerse con un equipo barato y accionarse por labor manual, motores de compresión interna pequeños o motores eléctricos pequeños. La energía necesaria para comprimir se usa muy frecuentemente para la propagación de grietas, que es especialmente rentable. Los expertos en la materia pueden observar la manera de construir otras realizaciones con rodillos con capacidad de infusión a escala industrial (más de 10 toneladas métricas por hora).

25 Cuando los tallos se comprimen, la solución acuosa de reactivo fluye a la red de grietas microscópicas, distribuyendo los organismos de fermentación y las enzimas en la solución acuosa de reactivo por todo el tejido de parénquima de los tallos.

30 Los tallos de la familia *Poaceae* tienen un diámetro aproximadamente dos veces más grande en la parte inferior 1/3 que el diámetro en la parte superior 1/3 y la presión de compresión en la parte inferior 1/3 es aproximadamente dos veces la de la parte superior 1/3. Este perfil de diámetro (diámetro como una función de la distancia desde un extremo del tallo) se reduce por los rodillos que comprimen los tallos hasta entre un 20 % y un 90 % del diámetro en cada punto del tallo, incluyendo un 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % y 90 %, con el intervalo más preferido entre un 40 % y un 60 % del diámetro en cada punto del tallo.

35 Los rodillos de la realización preferida de esta invención necesitan una fuerza en el hueco entre los rodillos proporcional a la separación de los rodillos. La realización preferida de esta invención usa resortes que empujan o arrastran los rodillos juntos. Los resortes tienen la característica de que la fuerza suministrada por el resorte es linealmente proporcional al desplazamiento del resorte (ley de Hooke).

40 Los tallos no se doblan fácilmente antes de pasar a través de los rodillos, y se doblan fácilmente después de comprimirse mientras pasan a través de los rodillos. En realizaciones preferidas de esta invención, los rodillos están orientados de modo que la alimentación en la tolva desde arriba de la solución acuosa de reactivo hasta por debajo de la solución acuosa de reactivo alimenta directamente los rodillos. En realizaciones preferidas de esta invención, la tolva que sale de la solución acuosa de reactivo causa que el tallo se doble en una dirección ascendente después de pasar a través de los rodillos. La realización preferida de esta invención usa dos rodillos, pero los expertos en la materia también se darán cuenta que tres rodillos son una realización viable.

50 Los rodillos tienen que agarrar los tallos para alimentarlos a través los rodillos. En realizaciones preferidas de esta invención, los rodillos tienen palas horizontales elevadas para ayudar a arrastrar los tallos a través de los rodillos.

55 En realizaciones preferidas de esta invención, un tanque contiene la solución acuosa de reactivo y tiene una válvula de alimentación que mantiene el nivel de la solución acuosa de reactivo constante. Los tallos que pasan a través de la solución acuosa de reactivo se llevan algo de la solución acuosa de reactivo, y los ensayos han demostrado que se llevan agua en la cantidad de aproximadamente un 15 % de la masa del tallo por absorción en el tallo, que se necesita reponer desde el tanque que contiene la solución acuosa de reactivo. Esto significa que una tonelada de tallos absorberá aproximadamente 150 litros de solución acuosa de reactivo. Una realización de esta invención tiene un par de rodillos para comprimir los tallos en una dirección perpendicular a los rodillos **107** y **108** en la figura 1 antes de que los tallos emerjan del tubo de salida **113**, para exprimir la solución acuosa de reactivo innecesaria absorbida por los tallos.

60 La levadura es el organismo para producir etanol a partir de azúcares en el tejido del parénquima y a partir de la glucosa liberada por hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida diluida. Esto se usa para tallos ricos en azúcar cuando el propósito de la fermentación es recuperar el etanol. Las bacterias acidolácticas se usan para reducir el pH del interior de los tallos hasta aproximadamente 4,2, lo que evita que otros organismos colonicen los tallos. Esto se usa cuando se ensilan los tallos para posterior consumo por rumiantes. Los cocultivos de levadura y bacterias

acidoacéticas se usan para convertir los azúcares en ácido acético, en caso de que los tallos sean para usarse posteriormente para digestión anaeróbica después del ensilado. Los cocultivos de la mayoría de las levaduras con cantidades más pequeñas de bacterias acidolácticas se usan tanto para fermentar los azúcares en etanol como para conservar los tallos para posterior consumo por rumiantes.

5 En realizaciones preferidas, los tallos se seleccionan del grupo que consiste en tallos de caña de azúcar, tallos de sorgo y tallos de maíz.

Estos son los tallos más ampliamente cultivados de la familia *Poaceae*.

10 En algunas realizaciones, los tallos tienen hojas adheridas a los tallos.

15 Cuando se produce ensilaje, las hojas a menudo se digieren más fácilmente que los tallos y contienen nutrientes valiosos para los rumiantes. La planta completa, con hojas adheridas, puede triturarse entre rodillos para infundir la solución acuosa de reactivo en los tallos, mientras se tratan simultáneamente las hojas con la misma solución acuosa de reactivo. Cuando se comprime con hojas adheridas, se prefiere alimentar el tallo en los rodillos desde la parte inferior del tallo (el extremo grueso) hasta la parte superior del tallo (el extremo delgado), de modo que las hojas se plieguen contra el tallo.

20 En algunas realizaciones, los tallos están presentes como una planta completa.

Cuando se produce ensilaje, a veces es útil ensilar la planta completa, incluyendo las hojas y cualquier grano adherido a la planta completa. La compresión también romperá los granos encerrados en vainas, haciendo que los granos sean más accesibles para las levaduras y las enzimas, y haciendo que los granos sean más digeribles.

25 En realizaciones preferidas, los rodillos tienen una velocidad tangencial entre 0,1 m/s y 10 m/s.

30 Los ensayos han demostrado que una velocidad tangencial de 1 m/s puede infundir aproximadamente una tonelada métrica por hora de tallos de sorgo dulce, provocando que más de un 90 % de los azúcares en los tallos se fermenten. Velocidades tangenciales más lentas o más rápidas también pueden proporcionar infusión completa. Además, velocidades tangenciales más rápidas producen una red más fina de grietas, como se describe en Skantz.

35 En realizaciones preferidas, la solución acuosa de reactivo contiene enzimas seleccionadas del grupo que consiste en pectina liasa, amilasa, celulasa, glucosa oxidasa, xilanasas y combinaciones de las mismas.

Los ensayos han demostrado que la pectina liasa es útil para macerar tejido celular del parénquima en tallos de la familia *Poaceae*, haciendo que sea más eficaz extraer jugo por trituración.

40 La amilasa se usa junto con la pectina liasa para hidrolizar gránulos de almidón en células del parénquima en glucosa. La pectina liasa y/o la xilanasas maceran las células del parénquima y la celulasa estalla las células del parénquima, permitiendo la difusión de la amilasa a los gránulos de almidón.

45 La celulasa se usa para hidrolizar la celulosa en los tallos en glucosa, que es una manera de liberar lentamente la glucosa. La glucosa a su vez puede fermentarse en etanol o ácido láctico, y la glucosa oxidasa puede usarse para convertir la glucosa y el O₂ en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.

En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico y combinaciones de los mismos.

50 Los estudios han demostrado que el ácido fórmico es eficaz en el ensilado de tallos de la familia *Poaceae*. El ácido acético y el ácido láctico son útiles como tampón del pH, y también evitan el crecimiento de microorganismos indeseados.

55 En algunas realizaciones, la solución acuosa de reactivo contiene iones ferrosos, peróxido de hidrógeno o una combinación de los mismos.

60 Los iones ferrosos se usan con peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton. Las sales ferrosas son solubles en agua y pueden suministrarse de forma segura a rumiantes en las concentraciones necesarias para la reacción de Fenton. Algunas bacterias acidolácticas producen peróxido de hidrógeno, la hexosa oxidasas producen peróxido de hidrógeno a partir de glucosa, manosa y galactosa y este peróxido de hidrógeno junto con los iones ferrosos catalizan la descomposición de la matriz lignocelulósica, haciendo que sea más digerible y accesible a las enzimas. *Saccharomyces cerevisiae* puede tolerar hasta aproximadamente 2 mM de peróxido de hidrógeno, pero las bacterias acidolácticas y las bacterias acidoacéticas no pueden tolerar esta concentración de peróxido de hidrógeno. Esto se describe en Jamieson, DEREK J., "Saccharomyces cerevisiae has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione", Journal of bacteriology 174.20 (1992): 6678-6681.

65

En realizaciones preferidas, el tiempo de fermentación es entre 1 día y 7 días.

Los ensayos han demostrado que la fermentación completa tarda entre 1 día y 7 días, dependiendo de la temperatura y la concentración de los organismos de fermentación.

Los experimentos han demostrado que el tiempo de fermentación con una concentración de levadura de aproximadamente 2 células por célula de parénquima produce un tiempo de fermentación de aproximadamente 48 horas a 96 horas, pero concentraciones más bajas de levadura y bacterias acidolácticas pueden tardar más. Concentraciones inferiores producen una fermentación más lenta, lo que provoca menos aumento en la temperatura, lo que reduce la necesidad de mecanismos caros de refrigeración.

En realizaciones preferidas, la levadura es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más ampliamente usada para fermentar azúcares en etanol. Este organismo tiene la máxima tolerancia a etanol de cualquier organismo de fermentación y están disponibles muchos híbridos.

En algunas realizaciones, los tallos se deshidratan durante el tiempo de retardo de fermentación de la etapa (d).

La deshidratación de los tallos durante el tiempo de retardo de fermentación de la etapa (d) evapora el agua de los tallos, reduciendo la cantidad de agua en los tallos al final de la fermentación en la etapa (d). Cuando el producto de fermentación es etanol, esta opción provoca mayor concentración de etanol en el jugo de los tallos, que es más valioso que una concentración inferior de etanol. Cuando el producto de fermentación es ácido láctico, esta opción provoca mayor concentración de ácido láctico, que provoca un menor pH y mejora ensilado. El área superficial interna expuesta aumentada de los tallos causada por la red de pequeñas grietas aumenta la tasa de deshidratación, ya que la tasa de deshidratación es proporcional al área superficial expuesta.

El tiempo de retardo de fermentación puede prolongarse disminuyendo la concentración de organismos de fermentación en la solución acuosa de reactivo, aumentando de este modo la cantidad total de agua retirada durante el tiempo de retardo de fermentación. Aire calentado, calentamiento radiativo, calentamiento conductor y combinaciones de los mismos añaden energía térmica a los tallos durante la deshidratación, siendo el aire caliente solar una realización preferida. Los expertos en la materia se darán cuenta de que hay numerosas maneras de mantener la temperatura en los tallos por debajo de 38 °C durante la deshidratación, especialmente controlando la tasa de circulación de aire caliente a través de los tallos. En algunas realizaciones simples, los tallos simplemente pueden dejarse secar al sol durante el tiempo de retardo de fermentación, y posteriormente almacenarse en un entorno anaeróbico durante la mayor parte del tiempo de fermentación. El éxito de esta realización simple depende de que la temperatura de los tallos no se eleve por encima de 38 °C durante la etapa (d), lo que inactivaría los organismos de fermentación infundidos en la red fina de grietas en los tallos.

Durante el tiempo de retardo de fermentación, se produce poco etanol y la mayoría del agua de los tallos se retira por deshidratación. La cantidad óptima de deshidratación es tal que la concentración de azúcar en los tallos es máxima cuando los organismos de fermentación pueden fermentar, tal como aproximadamente un 32 % de azúcar en peso con algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. En algunas realizaciones, las bacterias acidolácticas se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Propionibacterium freudenreichii* y combinaciones de las mismas.

Estas bacterias acidolácticas se usan en formulaciones de ensilado disponibles en el mercado.

En realizaciones preferidas, el método comprende además mezclar la solución acuosa de reactivo usando energía turbulenta de 0,15 W/kg a 5 W/kg.

Se usa suficiente energía turbulenta de modo que la escala de longitud de Kolmogorov sea del orden de menos de la longitud libre del apoplasto (por ejemplo, aproximadamente 20 micrómetros). Usando la escala de longitud de Kolmogorov, y sabiendo que la viscosidad cinemática del agua a 20 °C es de aproximadamente 10^{-6} m²/s, la energía requerida para mezclar los reactivos y el agua del proceso hasta una escala de 20 micrómetros requiere aproximadamente 5 W/kg, y la mezcla hasta una escala de 50 micrómetros requiere aproximadamente 0,15 W/kg. Estas escalas son de tal manera que la difusión de los azúcares a esta escala tarda segundos y la difusión de las enzimas a esta escala tarda minutos.

En algunas realizaciones, el método comprende además mantener los tallos en un entorno anaeróbico durante un tiempo de ensilado posterior a completarse el tiempo de fermentación.

Cuando el entorno es anaeróbico y no hay azúcares en los tallos y/o el pH está por debajo de 4,0, los hongos y las bacterias no pueden crecer sobre la pectina o el etanol en los tallos.

En algunas realizaciones, el tiempo de ensilado es entre 1 día y 1 año.

- 5 Durante el tiempo de recolección, hay poco tiempo libre para procesar los cultivos para retirar los azúcares o el etanol, y el ensilado es un método para ampliar el procesamiento de un cultivo que consume mucho tiempo durante un año completo. Además, si los cultivos tienen que usarse como pienso para animales, tienen que ensilarse durante el periodo completo de modo que puedan suministrarse a los rumiantes hasta que se recoja el siguiente cultivo.
- En realizaciones preferidas, el método comprende además recuperar los productos de fermentación triturando los tallos.
- 10 La pectina liasa macera el tejido del parénquima en tallos de la familia *Poaceae*. Esto proporciona una acción de enriamiento, donde el líquido en las células del parénquima puede retirarse más fácilmente por trituración que por trituración convencional de tallos no tratados.
- 15 En algunas realizaciones, el método comprende además recuperar los productos de fermentación por evaporación de los productos de fermentación de los tallos.
- 20 La tasa de evaporación es proporcional al área superficial del líquido expuesto, y la red microscópica de grietas en los tallos en esta invención expone un área superficial muy grande por unidad de volumen, haciendo que la evaporación del etanol sea eficaz. Además, la concentración de etanol en el vapor evaporado es mayor que la concentración dentro de los tallos. Esto hace que sea práctico producir directamente una bebida alcohólica a partir del vapor evaporado de los tallos.
- 25 Un ejemplo de un alambique solar que evaporará etanol de los tallos fermentados se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4966655, expedida el 30 de octubre de 1990 de Wilkerson. El sol calienta los tallos al brillar la luz a través de la cubierta de plástico, y el aire frío por la noche causa la condensación del vapor de etanol evaporado. Este alambique solar se precinta y mantendrá un entorno anaeróbico porque seguirán produciéndose bajos niveles de dióxido de carbono por fermentación, manteniendo una presión positiva interna.
- 30 Este tipo de alambique solar requiere muy poco capital para construirlo, y únicamente se necesita reemplazar la lámina de cubierta de plástico cada pocos años debido a la degradación del plástico por la luz ultravioleta.
- En algunas realizaciones, el método comprende además suministrar los tallos a los rumiantes después de la etapa (d).
- 35 Los tallos triturados mecánicamente y degradados enzimáticamente son más fáciles de digerir para los rumiantes que los tallos no triturados. Además, la levadura en los tallos aumenta el contenido de proteína. Además, el efecto de la hidrólisis ácida diluida durante el ensilado causa que la hemicelulosa y la celulosa sean más digeribles.
- 40 En algunas realizaciones, el método comprende además usar los tallos con digestión anaeróbica para producir metano después de la etapa (d).
- 45 Los tallos triturados mecánicamente y degradados enzimáticamente se usan de forma más eficaz en digestión anaeróbica que los tallos no triturados. Además, el efecto de la hidrólisis ácida diluida durante el ensilado causa que la hemicelulosa y la celulosa sean más susceptibles a digestión anaeróbica.
- 50 En algunas realizaciones el método comprende además usar los tallos con hidrólisis enzimática para producir etanol a partir de celulosa después de la etapa (d).
- 55 Los tallos triturados mecánicamente y degradados enzimáticamente liberan más glucosa durante la hidrólisis enzimática que los tallos no triturados. Además, el efecto de la hidrólisis ácida diluida durante el ensilado causa que la hemicelulosa y la celulosa sean más susceptibles a hidrólisis enzimática.
- Un experto en la materia reconocerá que la temperatura durante la fermentación puede limitarse a aproximadamente 38 °C con una diversidad de técnicas de bajo coste, especialmente si la fermentación tiene lugar durante 3 días, y que una temperatura inicial tan baja como de 5 °C será suficiente para empezar la fermentación. Esta fermentación a baja temperatura eleva rápidamente la temperatura de los tallos hasta por encima de 38 °C.
- 60 Un experto en la materia reconocerá que pueden emplearse aparatos conocidos para los procesos, sistemas y métodos divulgados en este documento. Los procesos de este documento pueden ser discontinuos, continuos, semicontinuos o pseudocontinuos. Cualquier referencia a "recipiente" o "reactor" en este documento se interpretará que significa uno o una pluralidad de dichos aparatos (tales como en serie o en paralelo). Pueden desearse u observarse diversos patrones de flujo. Con reacciones químicas y procesos de transferencia en masa simultáneos que implican múltiples fases, la dinámica de fluidos puede ser bastante compleja. Dependiendo del diseño específico, los patrones de flujo pueden aproximarse al flujo de pistón o flujo bien mezclado.
- 65

El rendimiento, o capacidad del proceso, puede variar ampliamente de unidades de pequeña escala de laboratorio a biorrefinerías de escala comercial completa, incluyendo cualquier escala piloto, de demostración o semicomercial. En diversas realizaciones, la capacidad del proceso es de al menos aproximadamente 1 kg/día, 10 kg/día, 100 kg/día, 1 t/día (todas las toneladas son toneladas métricas), 10 t/día, 100 t/día, 500 t/día, 1000 t/día, 2000 t/día o mayor.

El sistema global puede ser una ubicación fija, o puede hacerse portátil. El sistema puede construirse usando módulos que simplemente pueden duplicarse para un aumento de escala práctico.

Diversas sondas pueden permitir el control preciso del proceso y el control entre diversas fases del proceso, hasta e incluyendo potencialmente todas las fases del proceso. Se esperaría que el control preciso del proceso produjera mejoras en el rendimiento y la eficacia, ambos de forma dinámica, así como durante un periodo de tiempo cuando puede utilizarse el historial operativo para ajustar las condiciones del proceso (incluyendo programas de ciclado de la presión). En algunas realizaciones, se dispone una sonda de reacción en comunicación funcional con una zona de proceso. Dicha sonda de reacción puede ser útil para extraer muestras líquidas y analizarlas, para determinar el grado de la hidrólisis o el perfil de azúcares, etc. Los ajustes del proceso pueden basarse en mediciones, si se considera necesario o deseable, usando principios bien conocidos de control del proceso (retroalimentación, compensación, lógica derivada-integral-proporcional, etc.).

Las corrientes de sólidos, líquidos y gases producidas o existentes dentro del proceso pueden reciclarse independientemente, pasarse a etapas posteriores o retirarse/purgarse del proceso en cualquier punto.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos demuestran los principios de esta invención. La infusión de levadura y enzimas por compresión mientras se sumerge, como se describe en este documento, ha demostrado ser, por evidencias experimentales, útil para fermentar tallos de la familia *Poaceae*.

El aparato experimental de la figura 1 está diseñado para reproducir la funcionalidad del proceso industrial de la realización preferida de esta invención en cuanto a temperatura, presión y control del flujo de una unidad industrial. Se usó en una recolección de sorgo dulce en la granja de sorgo dulce Delta BioRenewables en Memphis, Tennessee, EE. UU. en noviembre de 2016 para ensayar la compresión de tallos recién recogidos. Algunos tallos se congelaron después y se transportaron a Minneapolis, Minnesota, EE. UU. y se descongelaron y comprimieron posteriormente usando este aparato experimental, como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4 a continuación. La pérdida de masa causada por la compresión se describe en el ejemplo 2 y la eficacia de fermentación y enzimática se describe en el ejemplo 3 y 4.

La figura 1 ilustra el dispositivo usado. Tallos cortados más largos de 100 mm sin límite en la longitud máxima se alimentan a través del tubo de alimentación **103**. El recipiente **101** contiene la solución acuosa de reactivo. El tallo que se está alimentando al dispositivo se sumerge en primer lugar en la solución y después entra en contacto con los rodillos **108** y **107**. El rodillo **108** está rotando libre alrededor del eje **109** que a su vez puede moverse de forma vertical gracias al resorte **111**. La compresión del resorte y la cantidad de movimiento del rodillo pueden ajustarse usando un tensor **112**, permitiendo de ese modo el tratamiento óptimo de tallos de diverso diámetro y asegurando que la compresión de los tallos esté limitada entre un 20 % y un 90 %. El eje **114** del rodillo **107** no puede moverse de forma vertical y está accionado por una fuente externa de rotación. Esta fuente externa de rotación es muy típicamente un motor eléctrico, pero también puede ser una manivela manual, manivela bicicleta o un motor de combustión interna. El rodillo **107** proporciona fricción y compresión aumentadas de los tallos. Las palas metálicas **120** ayudan a impulsar los tallos a través del rodillo **107** y el rodillo **108**. El rodillo **107** dirige los tallos entre los dos rodillos y tras completarse su paso a través del sistema, los tallos se expulsan a través del tubo de salida **113**. Según abandona un tallo el espacio entre los rodillos y, por lo tanto, ya no está accionado por los mismos, se expulsa por el sistema siendo empujado por los siguientes tallos que se están comprimiendo entre los rodillos. El recipiente **101** funciona completo de solución acuosa de reactivo y se hacen provisiones para el recipiente para mantenerlo completo a través del tapón de rellenado **122** y se drena a través del tapón de drenado **121**.

El aparato experimental usó un diámetro de aproximadamente 90 mm para el rodillo **107**, y un diámetro de aproximadamente 100 mm para el rodillo **108**, un grosor y altura de aproximadamente 6 mm para las palas metálicas **120**, una distancia mínima de 9,5 mm entre el rodillo **107** y el rodillo **108**, una velocidad tangencial de aproximadamente 1 m/s para el rodillo **107**, un diámetro de 100 mm para el tubo de alimentación **103** y el tubo de salida **113**, y una longitud de 2 m para el tubo de alimentación **103** y el tubo de salida **113**.

Los siguientes ejemplos usan sorgo dulce de la granja de sorgo dulce Delta BioRenewables en Memphis, Tennessee, EE. UU. El jugo de tallos de sorgo dulce se manifestó por exprimido y se midió el contenido de azúcar en Brix con un refractómetro digital. Los tallos de sorgo dulce usados tenían un contenido de humedad de un 70 %.

Obsérvese que la medición de Brix de jugo de sorgo dulce se ajustó multiplicando el Brix por aproximadamente 0,8 para obtener el porcentaje en peso de azúcares totales. Esto es porque el jugo de sorgo dulce tiene más glucosa y

fructosa que el jugo de remolacha azucarera o de caña de azúcar, y el índice de refracción de la glucosa y la fructosa difieren del de la sacarosa. Esto se describe en Liu, Ronghou, Jinxia Li, y Fei Shen, "Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation", *Renewable Energy* 33.5 (2008): 1130-1135.

5 A continuación, se muestran cuatro ejemplos de esta invención.

Ejemplo 1

10 El ejemplo muestra la diferencia entre comprimir un trozo de tallo de sorgo dulce entre las mordazas de una prensa mientras se sumergen en una solución acuosa de reactivo y mientras otro trozo no se sumerge. La compresión mientras se sumerge provoca un 30 % más de fermentación que la compresión mientras no se sumerge y después se sumerge posteriormente.

15 Se fermentó sorgo dulce tanto con compresión a un 50 % mientras se sumerge en una solución acuosa de reactivo y con compresión mientras está al aire y se sumerge en una solución acuosa de reactivo durante 30 minutos.

20 Se usó un tallo de sorgo dulce que se recogió en la granja de sorgo dulce Delta BioRenewables en Memphis, Tennessee, EE. UU en octubre de 2015, se transportó en hielo seco y se almacenó en un congelador hasta que se ensayó en junio de 2016. Se eligió un tallo de sorgo dulce del congelador, de 200 mm de longitud y 10 mm de diámetro. Se descongeló en un frigorífico durante 2 días. El tallo se cortó en dos longitudes de 100 mm, pesando la muestra de la izquierda 7,1 g y pesando la muestra de la derecha 9,4 g. Se exprimió una pequeña cantidad de jugo y se midió el Brix como un 13 %.

25 Se preparó 1 litro de solución acuosa de reactivo calentando 1 litro de agua hasta 38 °C, después añadiendo 1 g de levadura Thermosacc de Lallemand Biofuels & Distilled Spirits y 1 g de nutrientes de levadura Fermox de BSG Corporation. Esta solución acuosa de reactivo se agitó con un agitador magnético durante 30 minutos para rehidratar la levadura liofilizada mientras la temperatura de la solución acuosa de reactivo se mantenía a 38 °C.

30 La muestra de la izquierda se puso en una bolsa de plástico llena con la solución acuosa de reactivo, se exprimió hasta un diámetro de 5 mm y después se retiró inmediatamente y se dejó drenar. La masa de la muestra de la izquierda aumentó de 7,1 g a 7,5 g, un aumento de aproximadamente un 5,6 %.

35 La muestra de la derecha se exprimió hasta un diámetro de 5 mm cuando se exponía al aire, después se pesó. La masa de la muestra de la derecha se redujo de 9,4 g a 8,7 g, una disminución de aproximadamente un 7,4 %. La muestra de la derecha después se sumergió en la solución acuosa de reactivo durante 30 minutos. Había burbujas del tallo visibles durante 10 minutos. Después de 30 minutos, la masa de la muestra de la derecha aumentó de 8,7 g a 9,3 g, un aumento de aproximadamente un 6,9 %.

40 Las muestras de la izquierda y de la derecha después se pusieron en dos tuberías de PVC precintadas, cada una de aproximadamente 100 mm de longitud y con un diámetro interior de 20,9 mm. Estas tuberías de PVC se sumergieron después en un baño de agua mantenido a 38 °C y conectado a un contador de gas.

45 Se midió el progreso de la fermentación por el gas producido de cada tubería de PVC usando dos MilliGascounter, de tipo MGC-1, de Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG en Bochum, Alemania. La cantidad de gas producida se mide a una resolución milimétrica durante el periodo de la fermentación. La fermentación de 3,35 g de azúcar (normalmente sacarosa) genera 1 litro de gas (CO₂) de modo que la cantidad de azúcar fermentado, la tasa de fermentación y la cantidad total de azúcar fermentado pueden deducirse por el gráfico de gas producido en el tiempo.

50 La muestra de la izquierda produjo 0,0753 l de gas en 897 minutos (14,95 horas). La muestra de la derecha produjo 0,0767 l de gas en 942 minutos (15,7 horas).

55 Después de completarse la fermentación, se exprimió el jugo de cada muestra, y el Brix de la muestra de la izquierda era de 2,6 y el Brix de la muestra de la derecha era de 4,2. El pH de la muestra de la izquierda era de 3,98 y el pH de la muestra de la derecha era de 3,61.

60 Para calcular el contenido de azúcar del jugo de sorgo dulce a partir de la medición del Brix, se multiplicó el Brix de un 13 % por 0,8, produciendo un contenido de azúcar del jugo de aproximadamente un 10,4 %. Esto es porque el jugo de sorgo dulce tiene más glucosa y fructosa que el jugo de caña de azúcar, y el índice de refracción de la glucosa y la fructosa difieren 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.

65 Para calcular el contenido de azúcar de cada tallo, se asume un contenido de humedad de aproximadamente un 70 %, que produce una estimación de un 8,3 % de la masa del tallo de azúcar. Dado que la muestra de la izquierda tenía una masa de 7,1 g antes de la compresión, y asumiendo una pérdida de un 7 % de azúcares debido a la compresión, se produce una estimación de 0,55 g de azúcar en la muestra de la izquierda. Asimismo, la muestra de

la derecha tenía una masa de 9,4 g antes de la compresión, que produce una estimación de 0,73 g de azúcar en la muestra de la derecha.

5 La muestra de la izquierda produjo $0,55 \text{ g}/0,0753 \text{ l} = 7,3 \text{ g/l}$ (49 % de eficacia) mientras que la muestra de la derecha produjo $0,73 \text{ g}/0,0767 = 9,5 \text{ g/l}$ (35 % de eficacia). Esto muestra que la eficacia de esta invención es significativamente mayor que la estrategia alternativa de fracturar el sorgo dulce y posteriormente sumergirlo. Además, esto muestra que esta invención infunde la solución acuosa de reactivo en el tallo al menos 100 veces más rápido que la estrategia alternativa (unos pocos segundos en lugar de 10 minutos), lo que es crítico a causa de la necesidad de una rápida infusión de los cultivos según se recogen.

10

Ejemplo 2

15 El ejemplo 2 muestra la pérdida de masa cuando se comprimen tallos de sorgo dulce usando el aparato descrito en la figura 1 a 1 m/s entre rodillos mientras no se sumergen. Esta compresión usó una alta carga de resorte (tensor **112** girado para comprimir el resorte **111** 5 mm pasada la presión de resorte en reposo de cero) y una baja carga de resorte (tensor **112** girado para comprimir el resorte **111** a la presión de resorte en reposo de cero). Esta baja carga de resorte se usó en el ejemplo 3 y esta alta carga de resorte se usó en el ejemplo 4.

20 El procedimiento experimental fue:

- (1) se cortan ocho secciones de 600 mm de sorgo dulce
- (2) se registra la masa y el diámetro promedio
- (3) se ajusta el tensor **112** hasta 5 mm pasada la presión de resorte en reposo de cero
- (4) se alimentan 4 secciones de sorgo y se registra la masa
- 25 (5) se ajusta el tensor **112** a la presión de resorte en reposo de cero
- (6) se alimentan 4 secciones de sorgo y se registra la masa

30 Los resortes usados en estos experimentos tenían una constante elástica de la ley de Hooke de 17,4 kN/m, medida añadiendo pesos en incrementos de 2 kg a los resortes y midiendo el desplazamiento del resorte. La curva fue bastante lineal, con 24 kg de peso (235,36 N) comprimiendo el resorte de 52,2 mm a 38,7 mm (13,5 mm de compresión).

35 La reducción del diámetro medido y la fuerza de trituración calculada en un tallo de 20 mm se muestran en la tabla 1. Esto muestra que a alta carga de resorte (5 mm de compresión del resorte), un tallo de 20 mm se comprimía un 75 % entre las palas **120** y el rodillo **108** y se comprimía un 45 % entre el rodillo **107** y el rodillo **108**.

Tabla 1: Reducción del diámetro y fuerza de trituración

Carga de resorte	Diámetro bajo las palas (mm)	Diámetro entre los rodillos (mm)	Reducción del diámetro bajo las palas (%)	Reducción del diámetro entre los rodillos (%)	Fuerza de trituración bajo las palas (MPa)	Fuerza de trituración entre los rodillos (MPa)
Alta	4,9	10,89	75,50 %	45,55 %	5,84	0,79
Baja	7,1	12,74	64,50 %	36,30 %	5,20	0,63

40 La tabla 2 muestra que para una alta carga de resorte (5 mm de compresión de resorte), había una pérdida de masa de un promedio de un 0,35 % y para una baja carga de resorte (0 mm de compresión de resorte), había una pérdida de masa de un promedio de un 0,24 %. Esta baja carga de resorte se usa en el ejemplo 3 y esta alta carga de resorte se usa en el ejemplo 4. Obsérvese que en el ejemplo 2, hubo una pérdida de jugo de un 7 % con una compresión de un 50 % del tallo. Este ejemplo demuestra que la compresión entre los rodillos a 1 m/s provoca significativamente menos pérdida de jugo que la simple compresión estática del tallo.

45

Tabla 2: Pérdida de masa con compresión

Muestra	Carga de resorte	Masa inicial (g)	Masa después de la trituración (g)	Diámetro promedio (mm)	Pérdida de masa (%)
1	Alta	127,4	127,0	16	0,31 %
2	Alta	127,3	126,9	18	0,31 %
3	Alta	174,5	174,0	19	0,29 %
4	Alta	193,1	192,2	21	0,47 %
5	Baja	137,0	136,8	17	0,15 %
6	Baja	183,2	182,7	24	0,27 %
7	Baja	150,3	150,2	20	0,07 %
8	Baja	105,1	104,6	15	0,48 %

Ejemplo 3

El ejemplo 3 muestra el resultado de fermentación después de comprimir entre los rodillos con baja carga de resorte con cuatro combinaciones diferentes de enzimas (ninguna, HTec3, Pectinex XXL y HTec3 y Pectinex XXL). Esto demuestra que la fermentación es satisfactoria con una baja carga de resorte, pero que la acción enzimática es ineficaz. Sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, se cree la baja carga de resorte producía una red menos amplia de grietas en los tallos que la alta carga de resorte, y que la distancia de difusión promedio para las enzimas era mayor que el tiempo de fermentación, mientras que la velocidad de difusión significativamente más rápida de los azúcares dio lugar a difusión completa de los azúcares a las células de levadura, a pesar de las distancias mayores.

La tabla 3 muestra la composición de levadura y enzima de las muestras 1-4 en el ejemplo 3 y el ejemplo 4.

Tabla 3: Levadura y enzimas usadas en los ejemplos 3 y 4

Muestra	Levadura 5 g/l	Htec3 5 g/l	Pectinex 5 g/l	pH
1	X			5,15
2	X	x		5,07
3	X		x	5,16
4	X	x	x	5,12

La tabla 4 muestra los resultados de fermentación de tallos con baja carga de resorte. No hubo ablandamiento visible del tejido del parénquima en ninguna de estas muestras después de completarse la fermentación.

Tabla 4: Resultados de fermentación del ejemplo 3

Muestra	Masa inicial (g)	Masa después de la infusión(g)	Masa después de la fermentación (g)	Brix (%)	Gas (l)	Eficacia (%)
1	122,0	137,3	126,7	20,0	3,839	94,11 %
2	100,3	122,7	102,5	20,8	3,115	89,32 %
3	117,1	136,7	126,3	19,8	3,843	99,15 %
4	92,4	106,6	97,3	20,4	2,944	93,44 %

Ejemplo 4

La tabla 5 muestra los resultados de fermentar tallos con alta carga de resorte. Después de la fermentación, el tejido del parénquima de la muestra 1 no se había ablandado, la muestra 2 se había ablandado moderadamente y el tejido del parénquima de las muestras 3 y 4 estaba completamente disuelto. Esto demuestra que tanto la fermentación como la acción enzimática son eficaces con una alta carga de resorte. Sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, se cree que las eficacias por encima de un 100 % estaban causadas por hidrólisis enzimática de la celulosa en los tallos por la celulasa en HTec3.

El jugo de estas cuatro muestras se exprimió con una prensa exprimidora de caña de azúcar comercial y se envió para el análisis del contenido de metanol a Galbraith Laboratories, Inc. en Knoxville, Tennessee, EE. UU. usando el procedimiento GC-100H. La muestra 1 tenía 42 ppm, la muestra 2 tenía 35 ppm, la muestra 3 tenía 64 ppm y la muestra 4 tenía 70 ppm de metanol en el jugo exprimido. Esto muestra que la producción de metanol durante la fermentación en el tallo es muy limitada, y que Pectinex XXL produce cantidades muy moderadas de metanol.

Tabla 5: Resultados de fermentación del ejemplo 4

Muestra	Masa inicial (g)	Masa después de la infusión (g)	Masa después de la fermentación (g)	Brix (%)	Gas (l)	Eficacia (%)
1	135,5	162,4	148,7	21,5	4,3114	88,53 %
2	125,5	147,9	133,9	16,8	3,9086	110,90 %
3	209,6	229,9	217,0	17,9	6,4593	102,99 %
4	157,5	183,5	169,7	15,6	4,2665	103,88 %

En esta descripción detallada, se ha hecho referencia a múltiples realizaciones y a los dibujos adjuntos en que se muestran, a modo de ilustración, realizaciones ejemplares específicas de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para fermentar tallos de la familia *Poaceae*, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) proporcionar tallos de la familia *Poaceae*, en el que dichos tallos tienen una longitud promedio mayor de 100 mm, y en el que dichos tallos tienen un contenido de humedad inicial promedio entre un 25 % y un 80 %;
 - (b) comprimir dichos tallos entre rodillos mientras dichos tallos se sumergen en una solución acuosa de reactivo, en el que dichos rodillos comprimen el diámetro promedio de dichos tallos entre un 20 % y un 90 %, y en el que dicha solución acuosa de reactivo contiene uno o más organismos de fermentación seleccionados del grupo que consiste en levaduras, bacterias acidolácticas, bacterias acidoacéticas y combinaciones de las mismas;
 - (c) retirar dichos tallos de dicha solución acuosa de reactivo, en el que dichos tallos retienen al menos una parte de dicho uno o más organismos de fermentación; y
 - (d) fermentar dichos tallos durante un tiempo de fermentación para producir productos de fermentación dentro de dichos tallos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dichos tallos se seleccionan del grupo que consiste en tallos de caña de azúcar, tallos de sorgo y tallos de maíz.
3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dichos tallos tienen hojas adheridas a dichos tallos.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dichos tallos están presentes como una planta completa.
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dichos rodillos tienen una velocidad tangencial entre 0,1 m/s y 10 m/s.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicha solución acuosa de reactivo contiene enzimas seleccionadas del grupo que consiste en pectina liasa, amilasa, celulasa, glucosa oxidasa, hexosa oxidasa, xilanasas y combinaciones de las mismas.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicha solución acuosa de reactivo contiene ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico y combinaciones de los mismos.
8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicha solución acuosa de reactivo contiene iones ferrosos, peróxido de hidrógeno o una combinación de los mismos.
9. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho tiempo de fermentación es entre 1 día y 7 días.
10. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicha levadura es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
11. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dichos tallos se deshidratan durante un tiempo de retardo de fermentación de la etapa (d).
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 u 11, en el que dichas bacterias acidolácticas se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus buchneri*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Propionibacterium freudenreichii*, y combinaciones de las mismas.
13. El método de cualquier reivindicación precedente, comprendiendo además dicho método mezclar dicha solución acuosa de reactivo usando energía turbulenta de 0,15 W/kg a 5 W/kg.
14. El método de cualquier reivindicación precedente, comprendiendo además dicho método mantener dichos tallos en un entorno anaeróbico durante un tiempo de ensilado posterior a completarse dicho tiempo de fermentación.
15. El método de la reivindicación 14, en el que dicho tiempo de ensilado es entre 1 día y 1 año.
16. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho método comprende además recuperar dichos productos de fermentación triturando dichos tallos.
17. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho método comprende además recuperar dichos productos de fermentación por evaporación de dichos productos de fermentación de dichos tallos.
18. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho método comprende además suministrar dichos tallos a rumiantes posteriormente a la etapa (d).

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho método comprende además usar dichos tallos con digestión aeróbica para producir metano posteriormente a la etapa (d).

5 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho método comprende además usar dichos tallos con hidrólisis enzimática y fermentación para producir etanol a partir de celulosa posteriormente a la etapa (d).

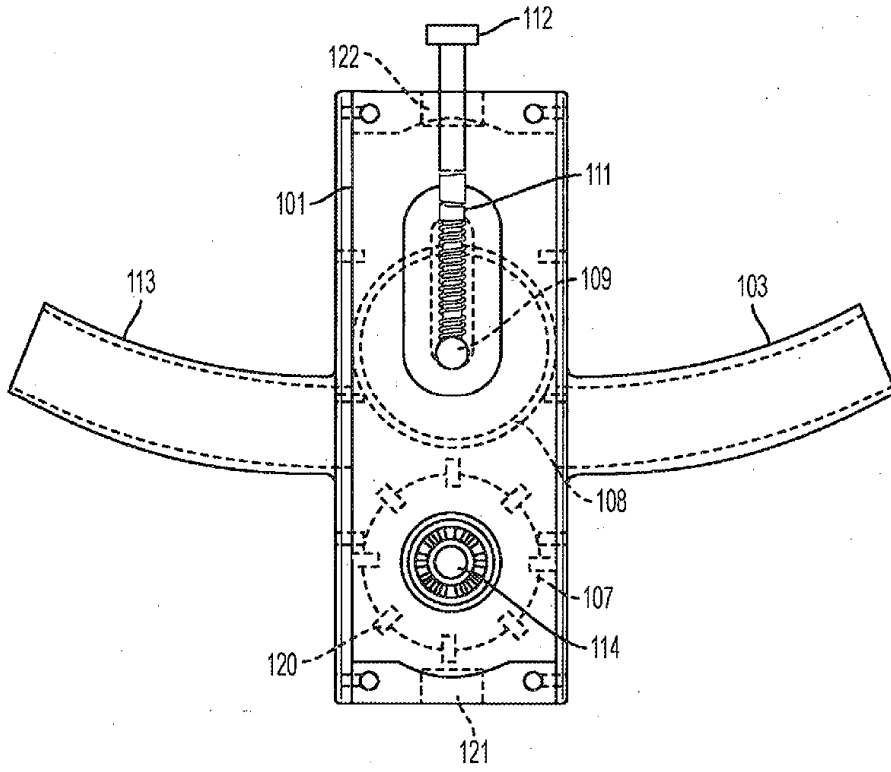


FIG. 1