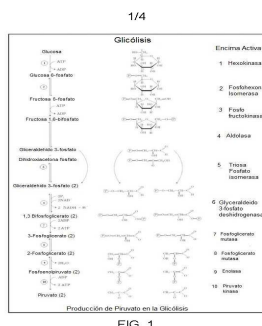


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT



1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
"UN PROCESO PARA LA FERMENTACIÓN MICROBIANA DE SUSTRATOS AZUCARADOS Y UTILIZACIÓN DEL HIDRÓGENO EN ESTADO ATÓMICO, IÓNICO O GASEOSO EN DICHO PROCESO"			
2	Datos del Solicitante		
Nombre:	MAHLE METAL LEVE S/A	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:	Rodovia Anhanguera, sentido Interior Capital, KM 49,7 CEP-13210-877,	Domicilio/País de constitución:	BRASIL - SAO PAULO - JUNDIAI
Identificación:			

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

1048664-

3

Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

- | | | | |
|----|--|----|---------|
| 1. | MAHLE METAL LEVE S/A | NN | 1048664 |
| 2. | LSDATA PLM SOFTWARE
LTDA - ME | NN | 1048665 |
| 3. | ADVEL TECNOLOGIA E
COMÉRCIO LTDA. EPP | NN | 1048666 |

4

Datos del Inventor

Nombre:

Antonio Pedro
LOURENCO,

**Dirección
Electrónica:**

notificaciones@clarkemodet.com.co

Dirección:

Rua Diogo Garcia,
678 Jardim
Recreio dos
Bandeirantes CEP:
14170-860,

**Domicilio/País de
constitución:**

BRASIL - SAO PAULO -
SERTÃOZINHO

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE
☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT
☒ No Aplica

Número:

-

5

Inventor(es)

Apellidos - Nombres

Domicilio

- | | | |
|----|-------------------------|--------|
| 1. | LOURENCO, Antonio Pedro | BRASIL |
|----|-------------------------|--------|

2.	KAWAKAMI, Masayuki		BRASIL
3.	LOPES, José Francisco		BRASIL
6	Datos Inventor(es)		
	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad
1.	BRASIL	SAO PAULO	SERTÃOZINHO
			Rua Diogo Garcia, 678 Jardim Recreio dos Bandeirantes CEP: 14170-860,
2.	BRASIL	SAO PAULO	SAO PAULO
			Rua Artur Saboia, 367, ap 43 - II CEP: 04104-060,
3.	BRASIL	SAO PAULO	SUMARE
			Rua Iracema Antas de Abreu Vieira, 326 Parque Residencial Casarao CEP: 13171-803,
7	Datos del Representante Legal / Apoderado		
Nombre:		CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO	Dirección Electrónica:
			notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:		CARRERA 11 NO. 86-53, PISO 6	Domicilio/País de constitución:
			COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación:			
☒ CEDULA DE CIUDADANIA		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA	
☐ EMPRESA EXTRANJERA		☐ NIT	
☐ PASAPORTE			
Número:		66783790-	
Presentación de Poder			

Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/BR2014/000300	Fecha Solicitud:	29/08/2014
Número Publicacion:		WO 2015/027306	Fecha Publicacion:	05/03/2015
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen BRASIL	Codigo del país BR	(31) No. Solicitud BR 10 2013 022434 0	(32) Fecha 02/09/2013
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		20	Pago Reivindicaciones:	Si
11	Reducción de tasas.			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
12	Documentos Anexos			
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☐ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos				

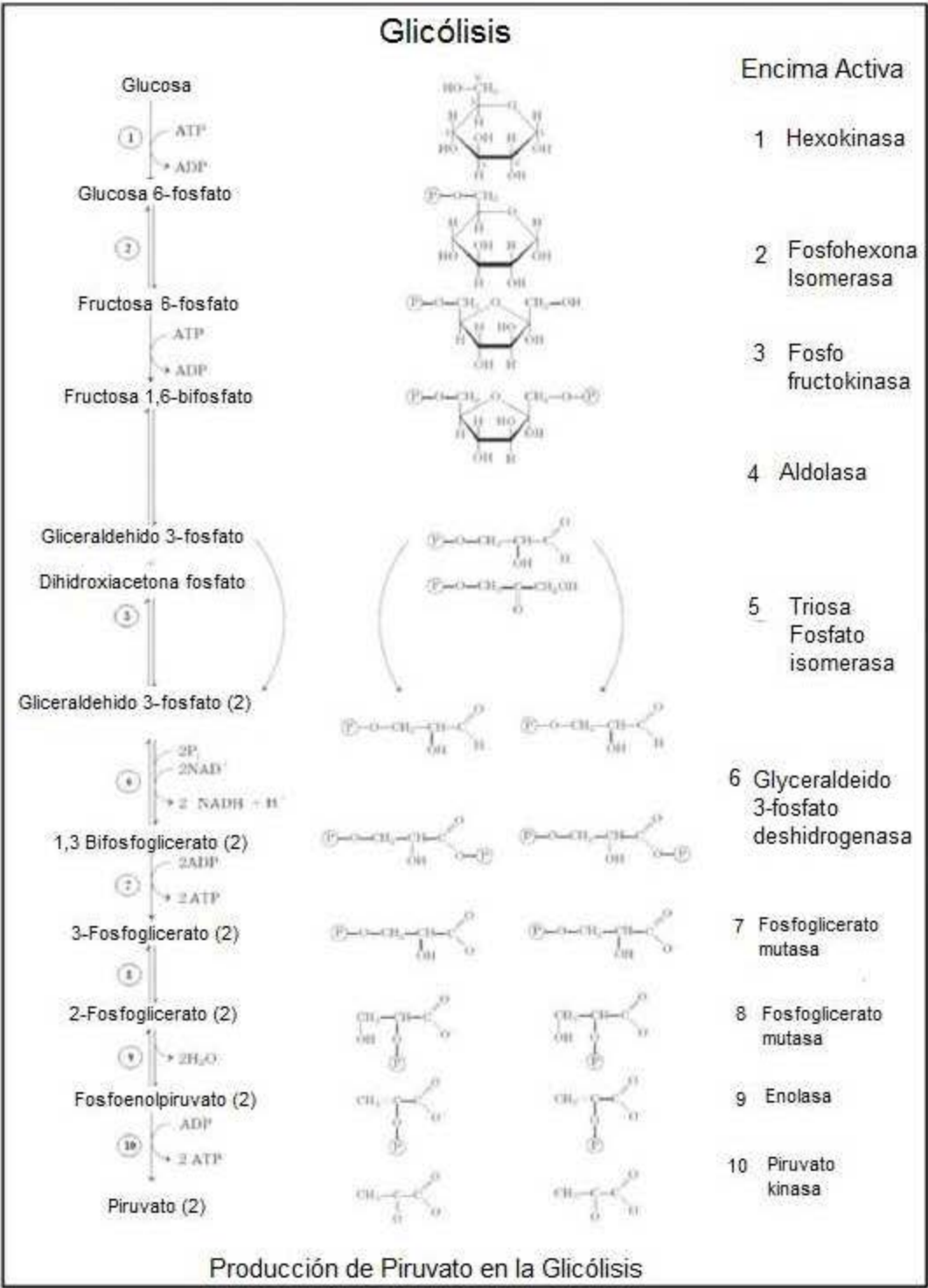


FIG. 1

ESPECIFICACIÓN DE LA PATENTE DE INVENCION PARA:

**"UN PROCESO PARA LA FERMENTACIÓN MICROBIANA DE SUSTRATOS
AZUCARADOS Y UTILIZACIÓN DEL HIDRÓGENO EN ESTADO ATÓMICO,
IÓNICO O GASEOSO EN DICHO PROCESO"**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso bioquímico para aumentar selectivamente la producción de alcohol a través de la fermentación microbiana de azúcares.

En particular, las concentraciones adecuadas de hidrógeno se inoculan en los microorganismos en el proceso, y esto puede tener lugar en un régimen de producción continuo, semi-continuo o por lotes, dicho proceso comprende mosto azucarado, microorganismos del género hongo o bacteria, con características de ocurrencia natural o especialmente seleccionadas o adaptadas, o características de recombinante, líneas floculantes, en suspensión en el mosto en fermentación o en un lecho inmovilizado y en micronutrientes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los alcoholes son compuestos orgánicos que tienen el grupo funcional hidroxilo (-OH) unido a uno o más átomos de carbono saturado, que contiene uno o más átomos de carbono. El compuesto más conocido de esta clase es el etanol o alcohol etílico. Este último se puede encontrar en las bebidas alcohólicas, en productos de limpieza, en productos farmacéuticos, tales como solventes químicos

y también en su aplicación más voluminosa como combustible para motor de combustión interna.

Más de 90% de etanol se produce en todo el mundo por la fermentación de azúcares procedentes de fuentes directas, tales como la caña de azúcar, melaza y pulpas de frutas, o se obtiene directamente por hidrólisis del almidón y la celulosa. En estos grupos amiláceos, feculentos y celulósicos, se destaca una amplia variedad de granos, como el maíz, la mandioca, otros tubérculos, sorgo, trigo, cebada, bagazo de caña de azúcar, papa, suero de leche, etc.

10

La fabricación de etanol por fermentación y destilación se divide básicamente en 4 fases: preparación de la materia prima o de sacarificación, licuefacción, fermentación y destilación. Para las producciones de vino y la cerveza no hay fase de destilación. La preparación de la materia prima, tal como molienda, trituración y lixiviación, comprende hacer pasar la fuente de azúcar, almidón o celulosa a través de los procesadores. En la segunda fase, se obtienen sustratos diluidos que pueden bien sea ser procesados en la fermentación o pasados a través de otro procesamiento intermedio de ruptura de las cadenas amiláceas o celulósicas en moléculas de azúcar por efecto de la hidrólisis. El jugo azucarado o mosto obtenido se lleva a la fermentación.

20

La fase de fermentación comprende la adición de microorganismos, hongos o bacterias, que transforman los azúcares en alcohol por una serie de reacciones enzimáticas. Después de este proceso, en escalas industriales, que se caracterizan por períodos de fermentación, como se muestra en la Tabla 1, se obtiene el mosto fermentado o vino.

25

Tabla 1 - períodos típicos de los procesos de fermentaciones alcohólicas	
Vino	Semana
Cerveza	Semanas
Producción genérica de Alcohol	De 10 horas a unos pocos días
Alcohol combustible - Brasil	De 4 a 12 horas

El vino a continuación sigue a la cuarta y última etapa, la destilación fraccionada, dando lugar al alcohol hidratado o anhidro, dependiendo de las características deseadas y empleadas del proceso de destilación y deshidratación.

5

La etapa que afecta el resultado de la producción de alcohol más directamente y, por lo tanto, una de las más estudiadas es, la fermentación, llamada también fermentación alcohólica o etílica, en el caso de la "ruta etílica" (vía etílica), que es el proceso bioquímico de transformación de azúcares tales como polisacáridos y monosacáridos tales como triosas, tetrosas, pentosas y hexosas, entre los que se destacan la sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, en alcohol. En este proceso, los microorganismos que son responsables de la conversión de azúcares en moléculas de ácido pirúvico o piruvato participan, en una serie de reacciones enzimáticas intracelulares, generalmente llamada vía glicolítica. Posteriormente, en condiciones anaerobias, tienen lugar otras dos reacciones enzimáticas, que caracterizan el proceso fermentativo. La primera reacción, descarboxilación del piruvato, se lleva a cabo por la enzima piruvato descarboxilasa, por medio de la cual el grupo carboxilo se elimina de la molécula de piruvato, convirtiéndolo a la molécula de acetaldehído, con liberación de dióxido de carbono. La segunda reacción es la reducción del acetaldehído a etanol, realizada por la enzima deshidrogenasa alcohólica, completando la reacción de fermentación adecuada.

En general, los procesos de fermentación se caracterizan porque se combinan sustratos, tipos y cepas de los microorganismos y las condiciones de

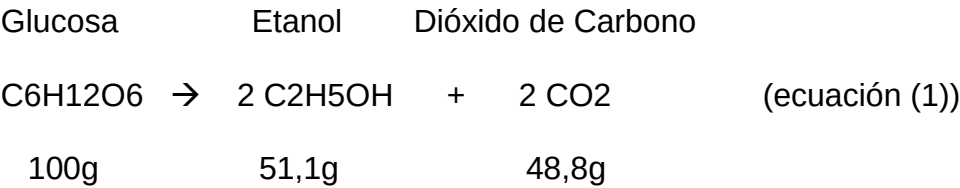
25

funcionamiento especialmente adecuadas, con el fin de maximizar el rendimiento del proceso y las características especiales a ser transferidas al mosto en fermentación, puesto que este se somete a diversas condiciones, tanto condiciones de activación e inhibición de la fermentación, con la consiguiente
5 interferencia en la eficacia y en la calidad del proceso mismo.

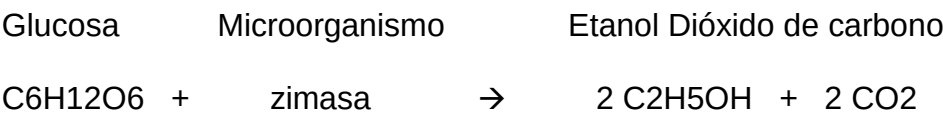
RENDIMIENTO DEL PROCESO FERMENTATIVO

Los principales rasgos que caracterizan todas las reacciones,
10 independientemente que sean químicas o enzimáticas, son los relacionados con los factores de conversión, o más específicamente con las eficiencias o rendimientos de estas conversiones. Evolucionando desde la concepción de la teoría de la generación espontánea, la fermentación alcohólica ha sido objeto de evaluaciones experimentales y consideraciones teóricas, siendo considerada
15 como uno de los procesos más exitosos del arte previo. Junto a la naturaleza celular de los microorganismos, principalmente de hongos, como organismos unicelulares eucariotas, como las células de la naturaleza animal, el estudio y la comprensión de este fenómeno ha sido privilegiado como un medio de acceso experimental fácil, en los procesos respiratorios aerobios y anaerobios, siendo
20 estas últimas conocidas también como la fermentación alcohólica y láctica, y desarrolladas libremente.

En 1810, Louis Joseph Gay-Lussac formuló la ecuación estequiométrica que relaciona la producción de etanol y dióxido de carbono de la fermentación
25 alcohólica de la glucosa, que se conoce hasta la fecha como:



En 1863, Louis Pasteur introdujo el concepto y la acción de los microorganismos responsables de la conversión de la glucosa (monosacárido) a etanol y dióxido de carbono. Treinta y cuatro años más tarde, en 1897, Eduard Buchner fermenta el azúcar en el laboratorio sin el uso de microorganismos vivos, introduciendo el concepto de acción enzimática del proceso fermentativo, que se ilustra a continuación:



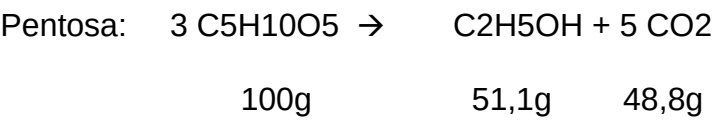
La zimasa se refiere a un complejo enzimático que cataliza la fermentación de azúcar en etanol y dióxido de carbono.

Por lo tanto, Buchner presenta la hipótesis que las proteínas secretadas por las células de la levadura en el medio, dan lugar a la fermentación de azúcar. Más tarde, se demostró que estas reacciones de fermentación se llevaron a cabo dentro de la célula de levadura.

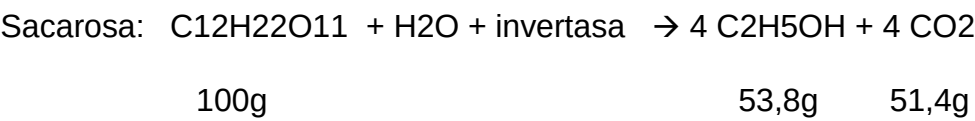
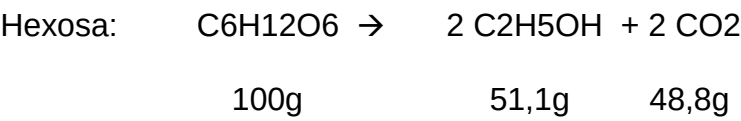
Todo este desarrollo está de acuerdo con la naturaleza de la eficiencia o rendimiento de la transformación de los azúcares en alcohol, por la constatación de que, en las condiciones de fermentación naturales, una molécula de glucosa podría producir hasta dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono. Esta comprensión es muy conocida como Rendimiento Gay-Lussac (GL), su valor máximo en la fermentación de la glucosa es del 51,1% (masa/masa). Las figuras 1 y 2 ilustran la secuencia de reacciones y el máximo rendimiento másico en la fermentación de la glucosa.

Con el propósito de comparar, las ecuaciones simplificadas para los rendimientos del proceso de fermentación de pentosas, hexosas y disacáridos (sacarosa) se muestran a continuación. La sacarosa es el azúcar disacárido predominante en la caña de azúcar.

5



10



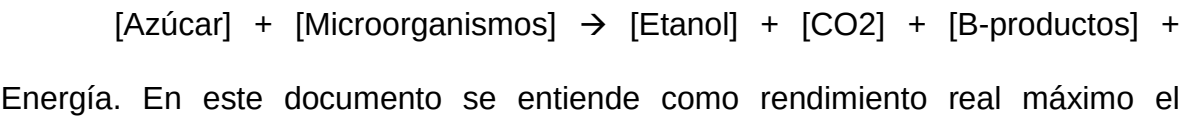
15

La invertasa se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de la sacarosa en hexosa, fructosa y glucosa, mezcla que también se llama jarabe de azúcar invertido.

20

En la industria del alcohol por fermentación de azúcares, la búsqueda de mayores rendimientos del proceso es una constante, que incluirá estudios y experimentos completos y complejos en los dominios fisicoquímicos y biológicos. De una manera general, se puede escribir la ecuación para el tratamiento completo del proceso de fermentación alcohólica desde el punto de vista del rendimiento alcohólico mineral de eficiencia como sigue:

25



cociente entre la concentración de etanol producido [Etanol] por la concentración de azúcar [azúcar] consumida en la conversión.

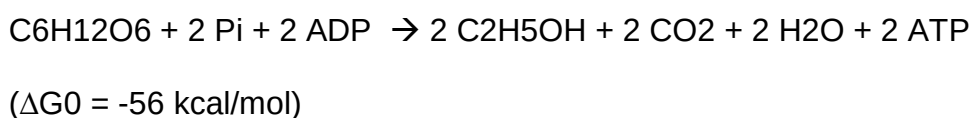
Durante el proceso de fermentación, diversas naturalezas de microorganismos pueden contribuir al consumo de azúcar, tal como levadura, que no sea hongos y bacterias. Estos microorganismos consumen el sustrato azucarado para el crecimiento celular de la especie y también en la producción de subproductos tales como ácidos y alcoholes superiores, convirtiendo los procesos parasitarios y causando reducciones en el rendimiento de fermentación.

En 1937, Firmin Boinot patentó en Francia y en 1941 obtiene la patente U.S. 2.230.318 para un proceso de llevar a cabo fermentaciones alcohólicas industriales. En los años treinta este proceso llega a Brasil, lo que contribuye notablemente al incremento del rendimiento de la fermentación, que ahora está muy extendida en el mundo y conocido por el nombre de proceso Melle-Boinot, y sobre todo, pero no se aplica exclusivamente a las fermentaciones con levaduras. Un mérito de este proceso es la reducción directa con concurrente de azúcar, proporcionado por la reutilización de los microorganismos y por el tratamiento y reciclaje del mismo, por separación centrífuga, seguido de un tratamiento ácido durante períodos de dos a cuatro horas en un medio con pH de 2 a 3, en forma concentrada, que promueve la reducción drástica de la población bacteriana. Después de este tratamiento, la leche de levadura, como la levadura se centrifuga es llamada, concentrada y tratada, si es devuelta al proceso. Esta operación puede provocar un consumo de azúcar reducido a menos de 1% (uno por ciento) del azúcar disponible.

El dióxido de carbono como los productos liberados en la descarboxilación de piruvato se considera como un producto paralelo del proceso fermentativo.

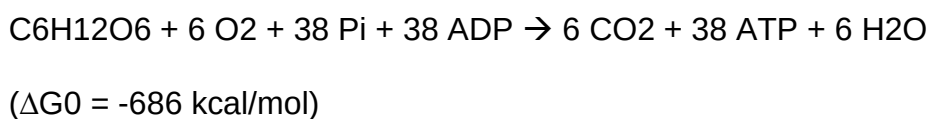
Además de los subproductos resultantes de procesos parasitarios, como se discutió anteriormente, se generan otros productos durante la fermentación alcohólica, tales como: glicerol, ácidos orgánicos (ácido succínico, acético, pirúvico, y otros) y alcoholes superiores, acetaldehído, acetoína, butilenglicol y otros compuestos. Se estima que del 3% al 5% (de tres a cinco por ciento) del azúcar disponible en el proceso se consume en estas conversiones.

En términos energéticos, de manera ilustrativa, en condiciones anaeróbicas, las levaduras desvían su metabolismo para la fermentación alcohólica, el etanol y dióxido de carbono que son los dos únicos productos que se excretan de todo el proceso. Por lo tanto, se deduce que:



15

Por otro lado, en condiciones aeróbicas, en particular en la fase de multiplicación celular, la levadura lleva a cabo la respiración. A diferencia de la fermentación que tiene lugar en su citoplasma, la respiración, que tiene lugar en las mitocondrias, conduce a la formación de una cantidad de ATP (trifosfato de adenosina) (significa el intercambio energético) diecinueve veces tan grandes como el obtenido en la fermentación alcohólica, como se ilustra a continuación:



25

Muchas de las acciones todavía se toman durante el proceso de fermentación, como las iniciativas para reducir el consumo de azúcares en los procesos parasitarios y subproductos indeseables. El control del pH y de la

temperatura del mosto en fermentación, así como el control de micronutrientes y contaminantes presentes, son variables que asumen posiciones importantes en el proceso y pueden estimular o inhibir la dinámica bioquímica.

5 El pH bajo del medio ($\text{pH} < 4,0$), en particular asociado a las altas temperaturas de operación ($\text{Top} > 38^\circ\text{C}$), demuestra ser el factor de mayor interés fisiológico para la levadura obtenido y utilizada en las unidades de producción industrial de etanol, cuando se compara con otros inhibidores, tales como sulfito, ácido láctico, grado alcohólico y altas concentraciones de azúcares). El pH 4.5 del
10 mosto, con temperatura que varía de 20°C a 37°C , permite la protección contra los factores de estrés, y se obtiene una mayor viabilidad de la célula, el brote, rendimiento alcohólico, morfología regular de las levaduras, disminución de azúcar residual y una menor liberación de amino ácidos en el medio, proporcionando una mejor eficiencia alcohólica y la estabilidad del proceso.

15

En cuanto a la nutrición, la levadura es un microorganismo heterótrofo, que se alimenta por absorción. Los principales nutrientes, necesarios para el desarrollo de las levaduras, de modo que tenga lugar una fermentación satisfactoria, son: (i) nitrógeno, un elemento de transformación plástico, importante
20 para el crecimiento de la levadura; (ii) fósforo, elemento de la translocación de la energía - en ausencia de éstos la fermentación no se llevará a cabo; (iii) potasio, (iv) magnesio; (v) zinc; (vi) manganeso, todos los cuales son importantes en reacciones enzimáticas; vitaminas del complejo B, que son aceleradores de fermentación, además de la presencia de otras sales, tales como cobalto, cobre,
25 azufre, boro, que se denominan como micronutrientes.

La levadura es también un microorganismo saprofita, que requiere una fuente elaborada de carbono - glucosa u otro azúcar, que suministra energía

química y el esqueleto carbónico de sus estructuras celulares, constituido predominantemente por carbono, oxígeno e hidrógeno. También se requieren algunas vitaminas, como la tiamina y el ácido pantoténico.

5 En cuanto a la fuente de nitrógeno, la levadura utiliza este elemento en las formas amoniacal (NH_4^+), amídico (urea) o amínico (en la forma de aminoácidos), sin capacidad metabólica para hacer uso de nitrato y poca o ninguna capacidad del uso de proteínas del medio.

10 Puesto que la forma amoniacal es la principal, en su defecto la levadura busca otras formas, tales como aminoácidos, lo que provoca un incremento en la producción de componentes secundarios, tales como alcoholes isoamilico, amilico, propilico, isopropilico, butílico e isobutilico. El fósforo es absorbido en forma de ion H_2PO_4^- , la forma predominante a pH 4,5, mientras que el azufre puede ser
15 asimilado a partir de sulfato, sulfito o tiosulfato. Sin embargo, con el uso del ácido sulfúrico en el tratamiento de la levadura, como se presentó anteriormente, o en el uso de melazas en mostos mezclados, se evita el uso adicional de azufre, el cual es letal para el microorganismo cuando está en exceso, puesto que el azufre presente prueba ser suficiente para el proceso.

20

 Sobre la base de lo anterior y teniendo en cuenta, por ejemplo, el rendimiento de la fermentación alcohólica con sustrato glucosa o con azúcares directamente fermentables, en el rendimiento másico GL teórico máximo de 0,511 m/m, de acuerdo con la ecuación (1), siendo el 100% el máximo rendimiento
25 teórico, el rendimiento del proceso fermentativo real puede alcanzar valores máximos que van desde 92% hasta 94% y, por otra parte, en los ambientes productivos más asépticos y controlados. En unidades de menor control y asepsia,

este valor puede ser inferior a 85%, lo que significa pérdidas considerables en el proceso productivo.

En este sentido, se busca continuamente todos y cada uno de los incrementos en eficiencia, centrándose en controles mejorados y operacionalmente adecuados, cepas y naturalezas de microorganismo, seleccionados, combinados y modificados, con una productividad más alta y más resistencia de proceso. Los incrementos en el rendimiento fermentativo de 0,1% a 0,5% ya justifican las inversiones considerables, en vista de los altos números relacionados con la producción alcohólica en estos medios industriales.

DESARROLLO DEL ARTE PREVIO

Se han desarrollado varios documentos para mejorar el rendimiento de un proceso para la producción de etanol, como se ejemplifica en lo sucesivo:

El documento U.S. 4.451.566 describe métodos y aparatos para la producción enzimática de etanol a partir de azúcares fermentables. Una secuencia de enzimas para la catálisis de la conversión de azúcares en etanol se retiene en una diversidad de zonas de reacción. La solución de azúcar fermentable pasa secuencialmente a través de estas zonas, y el alcohol se recupera en la última zona. A pesar de proporcionar una reacción más eficiente que el proceso usual, el presente documento proporciona una solución cara, compleja y difícil de mantener.

25

La solicitud de patente WO 2007/064546 describe un procedimiento para mejorar el rendimiento de etanol, disminuyendo el tiempo de fermentación y la reducción de la formación de subproducto mediante la supervisión y el control del

potencial de oxí-reducción del fermentador. Sin embargo, este proceso requiere monitoreo específico y difícil de mantener debido a los altos costos involucrados que afectan la aplicación industrial de esta solución.

5 El documento de patente WO 2008/024331 describe un método para la fermentación magnética que incluye someter un material biológico a un campo magnético estático para llevar a cabo la fermentación del material biológico en un producto fermentado. La reacción de fermentación se puede producir en un medio alcalino o ácido, y el campo magnético puede ser positivo o negativo. El presente
10 documento hace uso del campo magnético estático para proporcionar un entorno más adecuado para la reproducción celular de los microorganismos. A pesar de aumentar el número de microorganismos en la fermentación alcohólica, aumentando así el rendimiento de la reacción, este proceso requiere una vigilancia constante y el control total de la reacción, que hace que sea excesivamente caro
15 y, por lo tanto, económicamente inviable para aplicaciones industriales.

El arte previo también describe métodos para mejorar la eficiencia de la captura de carbono, como se describe en la patente U.S. 8.377.665. Este método comprende la fermentación bacteriana, utilizando sustratos gaseosos de acuerdo
20 con la vía de Wood-Ljungdahl, que comprende una secuencia de reacciones enzimáticas que tienen lugar en líneas bacterianas.

Aunque hay muchas referencias bibliográficas que describen procesos fermentativos para mejorar el rendimiento de la producción de etanol, el arte
25 previo no describe específicamente la acción de hidrógeno en un proceso de fermentación metabólico para el propósito de la producción selectiva, este proceso constituye una innovadora y original tecnología. Además, todos los procesos

desarrollados han buscado el incremento en el rendimiento real hasta el límite teórico del rendimiento G-L.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

5

La presente invención tiene el objetivo de proporcionar un proceso para la fermentación microbiana de sustratos azucarados, que comprende la inoculación de hidrógeno en los microorganismos del genero hongo o bacteria, con características de ocurrencia natural, o especialmente seleccionados o adaptados,
10 o de recombinantes, líneas floculantes, o en suspensión en el mosto en fermentación o en un lecho inmovilizado.

Un segundo objetivo de la invención consiste en el uso de hidrógeno en el estado iónico, atómico o gaseoso, o una mezcla de los mismos, para la
15 inoculación en los microorganismos del genero hongo o bacteria, con características de ocurrencia natural, o especialmente seleccionados o adaptados, o de recombinantes, líneas floculantes, o en suspensión en el mosto, o en lecho inmovilizado, para la producción selectiva de alcohol.

20 Un tercer objetivo de la invención consiste en el establecimiento de un proceso bioquímico innovador para la producción selectiva de alcohol a través de la fermentación de azúcares tales como polisacáridos y monosacáridos tales como triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, en el que se destacan la sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, con una mayor utilización de carbono y el consiguiente
25 incremento de la producción selectiva de alcohol, superando el rendimiento teórico de GL, y la reducción en la emisión de dióxido de carbono en la fermentación.

Por "estado atómico o iónico" se entiende en el presente documento el hidrógeno en la forma atómica (H) o forma iónica (H⁺).

Por "estado gaseoso" se entiende en este documento el hidrógeno molecular (H₂).

Un cuarto objetivo de la invención consiste en el establecimiento de un proceso eficaz y ambientalmente justificable, con una mayor utilización del carbono en la conversión de azúcares en la fermentación en alcohol, además de reducir la emisión de dióxido de carbono en el medio ambiente.

Un quinto objetivo de la invención consiste en la eliminación de los límites de la eficiencia para niveles más altos, alterando el metabolismo celular de los microorganismos, sin alterarlos genéticamente.

En virtud de su simplicidad, economicidad y eficiencia, el proceso de la presente invención se puede aplicar en nuevas unidades industriales de producción, o implementado en estructuras y unidades ya instaladas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para la fermentación microbiana de sustratos azucarados, que comprende la inoculación de hidrógeno en los microorganismos del género hongo o bacteria presente en suspensión en el mosto en fermentación o en lecho inmovilizado, dicho mosto en fermentación o lecho inmovilizado contiene sustratos azucarados y micronutrientes.

La inoculación de hidrógeno en estado atómico, iónico o gaseoso en los microorganismos presentes en la fermentación se lleva a cabo por medio de al menos dos electrodos aplicados directamente al mosto en fermentación o lecho inmovilizado con la aplicación de voltaje en régimen de pre-electrólisis o en
5 electrólisis completa. Este gas de hidrógeno también se produce fuera del biorreactor, a través de electrólisis del agua, y en este caso se lleva a cabo la inoculación de los microorganismos a través de chorro directo en dicho biorreactor.

10 El control sobre el hidrógeno en estado atómico, iónico o gaseoso se lleva a cabo por medio del voltaje aplicado a los electrodos de accionamiento en el mosto en fermentación o en el lecho inmovilizado, el voltaje en el régimen de pre-electrólisis está en el rango de 0,1 V a 1.24 V, y el voltaje en el régimen de completo de electrólisis está en el rango de 1.24 V a 30 V, ya sea en corriente
15 continua o de corriente alterna, este último comprende ciclos de 50 Hz a 100 Hz, de 100 Hz a 500 Ha, y de 500 Ha a 1000 Hz.

La presente invención también se refiere al uso de hidrógeno en estado atómico, iónico o gaseoso o mezclas de los mismos, caracterizado porque es para
20 la inoculación en los microorganismos presentes en un medio de fermentación que contiene sustratos azucarados, tales como polisacáridos y monosacáridos tales como triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, entre los que se destacan la sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, en alcohol.

25 El proceso descrito en la presente invención consiste, por lo tanto, en la modificación del límite de eficiencia másico de la producción de alcohol a los parámetros más altos, alterando el metabolismo celular de los microorganismos sin alterarlos genéticamente. La acción reductora del hidrogeno, acoplada a su

facilidad de penetrar las membranas celulares de los microorganismos, el acceso a su compartimentos internos, citoplasma, mitocondrias y organelos intracelulares proporcionan un proceso bioquímico innovador para la producción selectiva de alcohol a través de la fermentación de azúcares, dando lugar a un mejor uso del carbono, con el consiguiente incremento en el rendimiento alcohólico en la reacción de fermentación y la reducción en el contenido de la emisión de dióxido de carbono.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10

La figura 1 se refiere a la vía glicolítica (glicólisis) del arte previo, que tiene lugar en el citoplasma de un microorganismo o célula eucariótica o procariota, en el procesamiento de la glucosa, que comprende las etapas de esta secuencia, para la producción de piruvato;

15

La figura 2 esquematiza las reacciones de fermentación alcohólica que participan en un proceso de fermentación del arte previo donde cada molécula de piruvato, a través de la piruvato descarboxilasa, se somete a la liberación del carboxilo y la consiguiente liberación de una molécula de dióxido de carbono y una molécula de acetaldehído, siendo este último transformado en etanol por la acción de la enzima deshidrogenasa alcohólica;

20

La figura 3 esquematiza las reacciones de fermentación que participan en el proceso descrito por la presente invención, donde la reducción del grupo carboxilo con el grupo hidroxilo, derivado por descarboxilación de las dos moléculas de piruvato, por la enzima piruvato descarboxilasa, además de reductores equivalentes, preferiblemente reducida por el incremento de la disponibilidad de hidrógeno, llevan a la formación de una molécula de

25

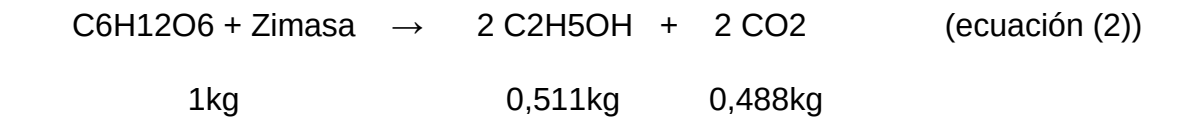
acetaldehído sintetizado a través del grupo carboxilo doble como el producto de una nueva vía de la fermentación alcohólica;

La figura 4 se refiere a un gráfico que contiene los rangos de operación con base en equivalentes molares de la presente invención, que contiene los límites de la curva de sacarosa, hidrógeno, etanol, dióxido de carbono, rendimiento másico (m/m) e incremento en el rendimiento másico con respecto al rendimiento teórico másico máximo G-L (%) de la sacarosa, según la ecuación (3);

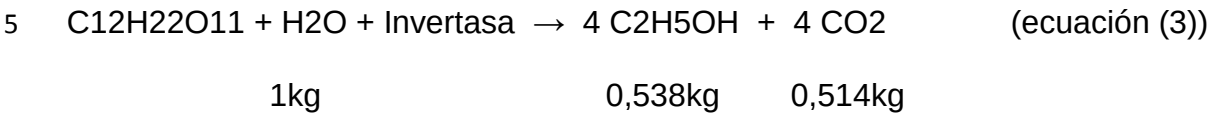
La figura 5 se refiere a un gráfico que contiene las mediciones logarítmicas de la curvas de rendimiento másicos, porcentaje de incremento en el rendimiento másico y en las concentraciones en equivalentes molares de [H], [etanol] y [CO2] en la presente invención.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Como se ha descrito antes, los procesos para la producción de alcohol a través de la fermentación de azúcares son ya conocidos por los versados en el arte y están universalmente considerados, en sus límites de la eficiencia, por la ecuación estequiométrica formulada por Gay-Lussac en 1810 (ecuación (1)). De acuerdo con esta formulación, en el arte previo actual, una molécula de glucosa en fermentación es capaz de producir, a lo sumo, 2 moléculas de alcohol etílico y 2 moléculas de dióxido de carbono, como se muestra en la ecuación (2).



Inversamente, considerando la fermentación de la sacarosa, sustancialmente presente en la caña de azúcar, una alternativa obtiene, la ecuación siguiente:



Se puede ver a partir de las ecuaciones (2) y (3) la condición de la eficiencia másica máxima de 0,511 (m/m), masa/masa, en la fermentación de la glucosa, y 0,538 m/m en la fermentación de la sacarosa. Incluso mediante los arreglos de ecuaciones más recientes, que tienen en cuenta las acciones de reacciones enzimáticas, este límite ha sido considerado en la evaluación global de rendimiento, en los procesos comprendidos en el estado de la técnica actual.

De acuerdo con el arte previo, en la vía glicolítica, llamada también la glicólisis, que es la secuencia de reacciones enzimáticas que tienen lugar en el citoplasma celular del microorganismo, que puede ser uno eucariótico o procariotico de una sola célula, en el procesamiento de la glucosa (azúcar con seis átomos de carbono en la molécula), en las últimas etapas de esta secuencia hay una producción de piruvato:

(Ion ) , ácido, en la molécula del cual hay 3 (tres) átomos de Carbono, como se muestra en la Figura 1. Por lo tanto, a partir de estas reacciones, dos moléculas de piruvato se originan a partir de una molécula de glucosa. Luego, en régimen anaeróbico, en ausencia de oxígeno, tiene lugar la fermentación alcohólica. En este proceso fermentativo, de cada molécula de piruvato, a través de la piruvato descarboxilasa, tiene lugar la liberación de carboxilo, así como la consiguiente liberación de una molécula de dióxido de carbono y una molécula de

acetaldehído, después de lo cual este último se transforma en etanol por la acción de la enzima deshidrogenasa alcohólica, como se muestra en la Figura 2. Estas reacciones enzimáticas son reversibles.

5 Así, de acuerdo con el arte previo, hay la relación de máxima producción de dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono por cada molécula de azúcar de glucosa en el proceso de fermentación alcohólica, llamado también fermentación etílica.

10 Por lo tanto, la reducción del grupo carbo:

que se deriva de la unión del grupo carbonilo:



15 (), Radical de cetonas y aldehídos, con el grupo hidroxilo OH () -, radical de alcoholes y fenoles, derivados por descarboxilación de las dos moléculas de piruvato por la enzima piruvato descarboxilasa, además de equivalentes de reducción - RE/ER, preferiblemente reducidos por la alta disponibilidad o abundancia de hidrógeno, dando como resultado la formación de
20 una molécula de acetaldehído sintetizado a través del grupo carboxilo doble, como el producto de una nueva vía de la fermentación alcohólica. Con la abundancia de hidrógeno, hay un incremento en la concentración de enzimas NADH, NADPH y FADH₂, entre otros transportadores importantes de electrones en los procesos de oxi-reducción citoplasmáticos o mitocondriales. Las ecuaciones a continuación
25 ilustran los procesos de oxi-reducción de estas coenzimas:

Reducción de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido



Reducción de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato



Reducción de la coenzima flavina y adenina dinucleótido

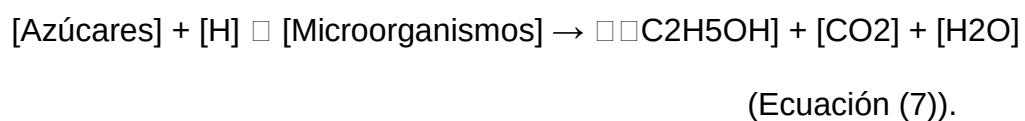


A continuación, las moléculas de acetaldehído se reducen a moléculas de etanol por la acción reductora de la enzima deshidrogenasa alcohólica, como se ilustra en la Figura 3.

10

Por lo tanto, la presente invención permite obtener ecuaciones genéricas y simplificadas, tal como la ecuación (7) siguiente, para las concentraciones típicas de azúcares, hidrógeno, microorganismos y productos obtenidos en este tipo de fermentación, como la concentración de etanol, dióxido de carbono y agua:

15



Los términos "[]" denotan las concentraciones respectivas de los azúcares, hidrógeno, microorganismo vivo, etanol, dióxido de carbono y agua, agentes y productos de la fermentación alcohólica en presencia de hidrógeno, en una reacción de fermentación típica de mosto azucarado, mediante el empleo de levadura , hongo unicelular eucariota. El símbolo "□" apunta a ilustrar la inoculación de hidrógeno en el microorganismo.

25

Este principio de la invención, junto con la ecuación genérica (7), se aplica también en las fermentaciones que implican bacterias, células procariotas, con el procesamiento de los carbohidratos, tales como polisacáridos y monosacáridos

como triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, en el que se destacan la sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, con una producción selectiva de etanol o alcoholes superiores.

5 En virtud de su simplicidad, economía y eficiencia, esta invención se puede aplicar en nuevas unidades de producción, o implementar en estructuras y unidades ya instaladas.

10 La presente invención se refiere, por lo tanto, a un proceso bioquímico para aumentar selectivamente el rendimiento de la producción de alcohol a través de modificaciones y mejoras en la etapa de fermentación de las soluciones que contienen azúcares, empleando microorganismos fermentativos de los grupos de hongos o bacterias. Estas mejoras consisten en la inoculación de hidrógeno en estado atómico, iónico o acuoso de mezclas de los mismos en los
15 microorganismos que participan en la reacción de fermentación del mosto azucarado.

 El presente procedimiento comprende la adición de 5% - 30% (masa/volumen) de sustratos azucarados, entre 5% y 25% (masa/volumen) del
20 microorganismo. Los microorganismos se completan de una manera automática y controlada como una función de los contenidos necesarios y los disponibles en el mosto en fermentación.

 Para la inoculación de hidrógeno, se requiere un sistema para la
25 generación de tales hidrógenos, el sistema comprende:

(i) suministrar un medio de fermentación con un voltaje de pre-electrólisis por medio de electrodos, dicho voltaje comprende valores más bajos

que el voltaje requerido para que ocurra la electrólisis del agua en el medio, caracterizado por las condiciones iónicas del mosto en fermentación, preferiblemente entre 0,1 V y 1.124 V, o]

5 (ii) suministrar el medio de fermentación con un voltaje completo de electrólisis del agua, caracterizado por las condiciones iónicas del mosto en fermentación, preferiblemente entre 1,24 V y 30 V, más preferiblemente entre 1,24 V y 20 V, y aún más preferiblemente entre 1,24 V y 10 V;

10 (iii) la producción de hidrógeno fuera del reactor se lleva a cabo a través de electrólisis del agua, con un voltaje de entre 1,5 V y 30 V. Los electrodos aplicados al medio de fermentación comprenden al menos un cátodo y un ánodo, el cátodo y el ánodo que actúan preferiblemente de manera directa en el mosto en fermentación. En una forma de implementación de la invención, los electrodos,
15 ánodo y cátodo, se aplican directamente sobre los microorganismos, en la fase de la alimentación de ellos al biorreactor. En una segunda forma de implementación de la invención, los electrodos utilizados en el medio de fermentación comprenden al menos un cátodo y un ánodo, el cátodo preferentemente actúa de manera directa sobre el mosto en fermentación, mientras que el ánodo se puede aplicar en
20 otro electrolito, siendo este último, alternativamente, solución salina, como dos electrolitos, con medios separadas por una membrana de separación permeable a los iones. El mosto azucarado comprende azúcares tales como polisacáridos y monosacáridos tales como triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, entre los que se destacan la sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, o mezclas de los mismos. En una
25 implementación de la invención, los microorganismos fermentativos de la invención se seleccionan a partir de levaduras del grupo de los hongos, como del género *Saccharomyces* y más concretamente la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y las especies del género *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia stipites*,

Torula, Candida shehatae, líneas de ocurrencia natural, o especialmente seleccionadas o adaptadas, o recombinantes, líneas floculantes, en suspensión en el mosto en fermentación o en lecho inmovilizado. En una segunda forma de implementación de la invención, los microorganismos fermentativos se
5 seleccionan del grupo de bacterias, más especialmente como especies de los géneros Zymomonas mobilis, Escherichia coli y Clostridium, líneas de ocurrencia natural, o especialmente seleccionadas o adaptadas, o de recombinantes, líneas floculantes, en suspensión en el mosto en fermentación o en lecho inmovilizado. En una implementación preferida, el microorganismo fermentativo seleccionado
10 comprende el hongo de la especie Saccharomyces cerevisiae. En otra implementación preferida, el microorganismo fermentativo seleccionado comprende la bacteria de la especie Zymomonas mobilis.

El mosto de fermentación también admite la adición de micronutrientes
15 tales como nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, zinc, manganeso, cobre, hierro, azufre, cobalto, yodo o mezclas de los mismos.

Los microorganismos se añaden al contenido como variables y deben ser controlados durante el proceso bajo demanda.

20

En particular, el procedimiento de la invención consiste en la inoculación de las concentraciones adecuadas de hidrógeno atómico, iónico o molecular, dicho hidrógeno ha sido producido en la condición de pre-electrólisis o completo de electrólisis en los microorganismos bajo proceso, de una manera controlada de
25 acuerdo con la ecuación (7), Tabla 2 y Figura 4. La presente invención contempla el régimen por lotes, los procesos de fermentación continua y semi-continua y puede adoptar arreglos de biorreactores, en número y en volumen, ya sea en funciones similares o diferentes en sus condiciones de funcionamiento de las

concentraciones de sustratos, microorganismos y disponibilidad del inóculo de hidrógeno en la fase iónica o molecular.

Aunque no se ha establecido aun, de manera definitiva y académicamente, las vías de transformación de azúcares en alcoholes, en regímenes tanto anaeróbicos y aeróbicos, en la presencia de hongos o bacterias en los medios de abundante concentración de hidrógeno, se puede ya seguir la producción selectiva de sustancias en estos procesos respiratorios y fermentativos. Los experimentos comparativos llevados a cabo en la presente invención apuntan al incremento teórico en el rendimiento de la producción de etanol de hasta 50%, lo que implica la eficiencia teórica másica máxima de 0,8 m/m en la fermentación de azúcares (sacarosa), con la consiguiente reducción del dióxido de carbono emitido de hasta 100%, con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En la presente invención, a través de pruebas realizadas, se ha observado que, en la vía etílica de la fermentación de los azúcares por las levaduras, las dos moléculas de ácido pirúvico, originadas en la glicólisis, en su descarboxilación por la enzima piruvato descarboxilasa, se promueve la liberación de dos carboxilos

(), que posteriormente reducida por equivalentes de reducción - ER/RE, por la acción del hidrógeno presente abundantemente en el medio, que puede producir otra molécula de acetaldehído que, deshidrogenado por la enzima alcohol deshidrogenasa en la reducción a etanol, ocasionando su incremento selectivo (sic). Como resultado, ocurre la reducción de dióxido de carbono liberado, tal como se puede deducir de la figura 3.

Mientras que el incremento en la producción de etanol puede alcanzar el límite teórico de 50%, la reducción de dióxido de carbono puede alcanzar el

consiguiente nivel teórico extremo de 100% con respecto al proceso tradicional. Además, en este modelo de fermentación, frente a las concentraciones de azúcares incrementadas en el procesamiento intracelular, como resultado del incremento de la concentración de hidrógeno disponible, causando mayores complejidades de las reacciones enzimáticas, se puede verificar las reducciones en la cinética de las reacciones, que pueden suponer un incremento en el período de fermentación.

El hidrógeno presente en el medio de fermentación puede estar en el estado atómico, iónico o gaseoso o una mezcla de los mismos. Con el fin de obtener hidrógeno, se requiere un sistema de generación de hidrógeno, y dicho sistema puede comprender: (i) someter el medio de fermentación a un voltaje eléctrico de pre-electrólisis (voltaje por debajo del voltaje necesario para que ocurra la electrólisis del agua, caracterizado por las condiciones iónicas del mosto en fermentación) o (ii) someter el medio de fermentación al voltaje completo de electrólisis igual o mayor que el voltaje-electrólisis del agua, caracterizado por las condiciones iónicas del mosto en fermentación.

En el régimen anterior a la electrólisis, hay formación de hidrógeno atómico e iónico, sin hidrógeno gaseoso. La formación de tal hidrógeno iónico y atómico requiere solamente un voltaje eléctrico más baja que el necesario para que ocurra la electrólisis del agua, que se caracteriza por las condiciones iónicas del mosto en fermentación. Este voltaje eléctrico varía de 0,1 V a 1,24 V, preferiblemente de 0,7 V a 1,1 V.

Los sistemas para la generación hidrogeno de pre-electrólisis y electrólisis completa se pueden producir de una manera tal que el voltaje sea directa o alterna, en el que este último puede tener ciclos que van desde 50 a 2.000Hz,

preferiblemente de 50 Hz a 150 Hz, o desde 100 Hz a 500 Hz o de 400 Hz a 1.000 Hz.

En una implementación de la invención, el sistema comprende iones de corriente directa de la condición de electrólisis completa, evitando la adición de oxígeno al mosto en fermentación, a fin de favorecer las condiciones anaeróbicas. Preferentemente el cátodo actúa directamente sobre el mosto en fermentación, mientras que el ánodo se aplicará en otro electrolito, siendo este último solución salina, de acuerdo con dos electrolitos, con medios separados por la membrana de separación permeable a los iones, la membrana es porosa y preferiblemente hecha de un material poroso.

Al iniciar el sistema de generación de hidrógeno en un reactor que opera en un régimen de lote semi-continuo o continuo, es importante que el proceso sea controlado continuamente por las mediciones de pH, temperatura, concentraciones de azúcares, concentración de hidrógeno, concentración de microorganismo vivos, concentraciones de alcohol, concentraciones de dióxido de carbono y contenidos y concentraciones de micronutrientes.

Además, o exclusivamente, el hidrógeno en la fase gaseosa se puede introducir directamente en el biorreactor en la fermentación, por chorro directo en el mosto en fermentación en el biorreactor, o a través de líneas para la alimentación o la circulación del mosto en el biorreactor. Este gas de hidrógeno se puede producir por fermentación bacteriana o por algas en otro proceso fermentativo paralelo, que se caracteriza por la producción de hidrógeno, o a través de electrólisis del agua, fuera del reactor, o puede ser hidrógeno industrial.

Se señala además que el hidrógeno se puede inocular ya sea inmediatamente en el inicio del proceso de fermentación o antes de esta etapa, es decir, durante la preparación del microorganismo.

5 El proceso descrito en la presente invención refleja un comportamiento diferenciado de los procesos fermentativos del arte previo, ya que:

- La alta dosis de hidrógeno actúa como un potente agente reductor;
- Proporciona un mejor rendimiento en la concentración de alcohol;
- No hay modificación genética del microorganismo;
- 10 - Hay una consiguiente reducción del contenido de dióxido de carbono liberado; y
- hay alteración en la cinética de la reacción.

Además, el proceso de la invención proporciona las siguientes ventajas
15 sobre un proceso de fermentación convencional:

1. proporciona una fácil difusión de hidrógeno a través de la membrana celular del microorganismo, hongo o bacteria, permitiendo que se alcancen compartimentos intracelulares;
- 20 2. no influye en los parámetros fisiológicos de la célula (temperatura, presión, pH y pO₂)/
3. no interfiere con las reacciones de oxidación metabólicas, sin detrimento de las especies reactivas de oxígeno ROS, y de la señalización celular;
- 25 4. son bien toleradas altas concentraciones de hidrógeno y por lo tanto tienen menos efectos secundarios sistémicos; y

5. se puede aplicar a fermentaciones en los regímenes de lotes semi-continuos y continuos, por ser de fácil adaptación a los procesos y equipos de fermentación existentes.

5 CONTROL DEL PROCESO Y RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE ACUERDO CON LA INVENCIÓN

De acuerdo con la ecuación genérica (7), el proceso fermentativo ahora proporciona y exige control operacional de las variables de proceso. De acuerdo con la ecuación genérica (7), el proceso fermentativo ahora proporciona y exige el control operacional de las variables de proceso. La lista de variables está compuesta por las comprendidas por el arte previo, la intención de mantener el proceso dentro de los estándares de proceso físicos y químicos usados generalmente en los procesos fermentativos abarcados por el arte previo, tales como el pH y la temperatura, los controles de los niveles, la alimentación y descarga, agregados de forma innovadora a los controles y con las concentraciones de reactivos y productos, incluyendo micronutrientes. Este control actúa durante todo el proceso de producción, lo que permite guiar dicho proceso dentro de las condiciones operativas adecuadas y previstas. El control de las concentraciones, en la presente invención, difiere de los controles de las concentraciones de sólidos y azúcares solubles, como en los casos de fermentación VHG (muy alto gravedad), por el que se obtiene una concentración de alcohol de más de 12% en volumen, por el proceso de fermentación de mostos con un alto contenido de azúcares, evitando daños en el microorganismo o fermentación retenida o retardada, así como en los procesos que tienen por objeto controlar o limitar el período de fermentación, como una herramienta para el control productivo. En estos casos tradicionales, el control de la concentración de azúcares y los microorganismos se reduce a establecer límites operacionales de

proceso. La fermentación de muy alta gravedad es fermentación empieza a partir de las altas concentraciones de sustratos con miras a la producción de vinos con alto contenido alcohólico, con concentración típica superior a 12% en volumen. La fermentación retenida o retardada tiene lugar cuando el proceso de fermentación se interrumpe, o cuando se reduce su cinética drásticamente, incluso con la existencia de un sustrato, como resultado de factores estresantes, tales como contenido de alcohol en exceso o la falta de micronutrientes estructurales para el microorganismo. Según la presente invención, el control sobre las concentraciones va más allá de los límites mencionados anteriormente, al ser un control de la bioquímica, para lograr un rendimiento productivo dentro de los conceptos involucrados por la ecuación genérica (7). El equilibrio esquemático de la ecuación genérica y simplificada (7) está directamente unida a los límites de rendimiento productivo, teniendo en cuenta las concentraciones de sustratos, azúcares, microorganismo vivo e inóculo [H], con miras a la producción selectiva de alcohol y la consiguiente reducción en la producción de dióxido de carbono. Con el fin de simplificar el establecimiento de regímenes de control, se definen para las concentraciones tres rangos operacionales para las concentraciones, a partir de la concentración de sustrato y de hidrógeno, con miras a la concentración de alcohol reducido. Estas definiciones, sin embargo, no delimitan la invención al uso de los rangos operacionales de los ejemplos del proceso, que operan más exhaustivamente en el modo de control continuo.

La Figura 4 muestra los rangos de operación con base en las moles de sacarosa, los valores de umbral de las curvas planteadas se transcriben en la Tabla 2 a continuación.

Rango de control operacional	Tabla 2 - Equivalentes molares					
	[sacarosa]	[hidrógeno]	[etanol]	[CO2]	Rendimiento [m/m]	Incremento en el rendimiento %
I	1 - 2	0 - 24	4 - 12	4 - 0	0.538 – 0.808	0 - 50
II	3 - 4	25 - 48	13 - 24	10 - 0	0.565 – 0.808	6 - 50
II	5 - 6	49 - 72	25 - 72	22 - 0	0.561 – 0.808	4 - 50

La Figura 5 muestra las mediciones logarítmicas de las curvas de rendimiento máxicos, porcentaje de incremento en el rendimiento másico y en las concentraciones en equivalente molar de [H], [Etanol] y [CO₂]. Estos valores, teniendo en cuenta que las condiciones de la estadística de las reacciones enzimáticas intracelulares, demostraron ser más realistas con respecto a los hallazgos operacionalmente más favorables.

ENSAYOS QUE PRUEBAN LA INVENCION

Se hicieron algunos ensayos para la validación y evaluación de la eficacia del proceso de mosto en fermentación, empleando jugo de la caña de azúcar y el microorganismo de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada ampliamente en la industria de etanol combustible y bebidas. Se da a continuación un ejemplo de un proceso sin la intención de limitar el alcance de protección de la invención. Las condiciones y los resultados del ensayo, así como la validación del modelo bioquímico, se presentan más adelante.

Ejemplo 1 - Comparación entre una fermentación convencional con la fermentación de acuerdo con la invención en un régimen de pre-electrólisis.

En este ensayo se ha buscado la influencia del hidrógeno en la fermentación etílica de mostos azucarados, con voltaje más bajo que el necesario para que ocurra la electrólisis de agua. En los ensayos, incluyendo los siguientes, se utilizan, como reactivos, azúcar sin refinar y levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación por lotes. Se construyeron dos biorreactores, uno como base o convencional, y el otro ensamblado con un sistema de generación de hidrógeno (mediante voltaje con corriente continua de 0.95V), para producir hidrógeno iónico y atómico, durante el proceso de fermentación. En los dos

biorreactores, con un volumen máximo de 100 litros, se añaden los reactivos y el agua hasta el volumen de operación de 50 litros. Más específicamente, se hacen dos ensayos en cada biorreactor, fermentando 8 kg del sustrato de azúcar morena (fundamentalmente constituida por sacarosa) con 5 kg de levadura comercial (hongos, *Saccharomyces cerevisiae*) en dos lotes separados y de forma simultánea. El sustrato y el hongo se disolvieron y se prepararon antes de ser mezclados en los biorreactores, bajo agitación con un agitador de paletas planas a 60-90 rpm. Se recogieron muestras de los reactores inmediatamente después de mezclar los dos ingredientes, y se midieron los parámetros iniciales, tales como sólidos solubles [Brix], la temperatura [°C] y la acidez [pH]. Las mediciones para Brix, temperatura y pH se llevaron a cabo cada hora, mediante el uso de un destilador y densímetro digital, adoptando las normas estándar de laboratorio de este tipo. No se agregaron micronutrientes al proceso, con miras a las variables de aislamiento. La Tabla 3 especifica los ingredientes utilizados en los experimentos y las condiciones de prueba de pre-electrólisis. Se realizaron dos ensayos en dos reactores simultáneos.

Tabla 3 - Ingredientes y condiciones de las pruebas (pre-electrolisis)		
Características	proceso convencional	proceso de la invención
volumen de reactor	~ 100 litros	~ litros
Volumen Fermentado	50 litros	50 litros
Levadura – Hongo	Comercial Fleischmann <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Commercial Fleishmann <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
masa de levadura	5 kg	5 kg
concentración de levadura	10% masa/volumen	10% masa/volumen
Sustrato	Azúcar morena	Azúcar morena
Masa del sustrato	8 kg	8 kg
Concentración del Sustrato	16% masa/volumen	16% masa/volumen
Velocidad de agitación	50-60 RPM	80-100 RPM
voltaje eléctrico	-	0.95 Volt
Temperatura ambiente	25°C	25°C

Tabla 4 especifica el equipo empleado para el control de los parámetros de pH, temperatura, °Brix y la concentración de etanol. En las pruebas se observan las variaciones de los parámetros para el control de la fermentación.

Tabla 4 - Equipo y Condiciones de pruebas			
Tipo	Magnitud medida	Tiempo de muestreo	Volumen de la muestra
medidor de pH	pH	Cada hora	Gotas
Termómetro	Temperatura	Cada hora	Termocupla
sólidos solubles	Brix	Cada hora	Gotas
Destilador	Separación de etanol	Cada dos horas	25 cm ³
Densitómetro	Concentración de etanol	Cada dos horas	Completado para 50 cm ³

5

Los resultados obtenidos en estos dos experimentos se describen en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5 - Resultados obtenidos en la fermentación de un biorreactor que contiene un sistema de generación de hidrógeno, en el régimen anterior a la electrólisis y un biorreactor convencional.

10

Tabla 5 - Datos y Resultados						Valor:	Prueba 1		Volumen = 50L		Azúcar = 8Kg	
Mosto - azúcar morena							Prueba 2		V/C = 0.95V/1.2A		Levadura = 5Kg	
Tiempo	sólidos solubles °Bx		Etanol °GL		Temperatura °C		Acidez pH		Lechada de cal añadida ml		acidez corregida pH	
h	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.
0	15.01	15.71	0.00	0.00	24.5	24.6	4.70	4.56				
	15.55	15.60	0.00	0.00	25.6	25.9	4.56	4.38				
1	13.99	14.68	x	x	27.2	27.2	3.98	4.02				
	13.95	14.01	x	x	28.6	28.8	3.98	3.98	100	100	4.29	4.29
2	10.40	12.47	3.46	2.74	29.6	30.1	3.73	3.85	100		4.05	
	10.30	11.23	4.18	3.58	32.1	31.7	4.10	4.18				
3	7.85	10.20	x	x	33.0	32.0	3.90	3.83		100		4.08

	7.41	9.30	x	x	35.6	32.3	3.93	4.11	100		4.24	
4	5.00	8.16	6.82	5.46	35.4	33.6	3.82	4.13	150		4.20	
	3.99	8.06	7.28	5.58	37.8	31.7	4.13	4.04				
5	4.13	6.87	x	x	35.1	34.6	4.36	4.13				
	4.28	6.75	x	x	36.9	31.9	4.21	3.94		100		4.15
6	3.91	5.94	7.24	6.82	34.0	32.7	4.38	4.14				
	3.93	5.14	7.50	7.10	35.7	32.5	4.24	4.16				
> 22	3.91*	4.60*	7.38*	8.10*	25.0	31.8	4.61	4.09				
	4.69*	4.71*	7.46*	8.04*	26.0	26.3	4.46	4.41				

* - Terminación de la fermentación – el sistema eléctrico del fermentador de acuerdo con la invención se apagó después de la sexta hora. Los reactores se mantuvieron en operación, con agitación, después de las últimas mediciones en la
 5 sexta hora. La fermentación residual se continuó durante 16 horas más. El incremento en la producción de etanol se puede observar fácilmente en el tiempo de 6 horas, ya que se puede verificar, en promedio, 1.62°C más azúcar para el proceso de la invención. Este contenido adicional de azúcar puede producir etanol 1.1°GL más, si la ecuación Gay-Lussac (1) se utiliza para calcular el valor teórico
 10 de conversión de azúcar en etanol. Como resultado, el rendimiento en la producción de etanol, lee directamente en la Tabla 5, el incremento de 6,8% y 8,3% en comparación con el valor teórico tradicional esperado (rendimiento Gay-Lussac) que tiene los mismos criterios experimentales y los cálculos de rendimiento. El incremento de la concentración de etanol y la reducción observada
 15 en la liberación de dióxido de carbono se acompaña de alteraciones en la cinética química, lo que demuestra que el modelo bioquímico simplificado se puede aplicar.

Ejemplo 2 - Comparación entre una fermentación convencional y la fermentación de acuerdo con la invención en régimen completo de electrólisis.
 20

En este ensayo, se inserta en los dos biorreactores (el de base y el de la presente invención) 9 kg de azúcar morena con 6 kg de levadura industrial, *Saccharomyces cerevisiae*. Los biorreactores de remolque se utilizaron en el ejemplo 1, uno como base o reactor convencional y el otro equipado con un sistema de generación de hidrógeno, fueron los mismos tal como se emplea en el ejemplo 2. En este ejemplo, se empleó un voltaje eléctrico de 1.6V - régimen de electrólisis completa, produciendo hidrógeno iónico y gaseoso, durante el proceso de fermentación. La Tabla 6 especifica los ingredientes utilizados en los experimentos y las condiciones de la prueba para la electrólisis completa.

10

Tabla 6 - ingredientes y condiciones para las pruebas en electrólisis completa		
Características	proceso convencional	proceso de la invención
volumen del reactor	~ 100 litros	~100 litros
Volumen Fermentado	50 litros	50 litros
Levadura – Hongo	Commercial Fleishmann Saccharomyces cerevisiae	Commercial Fleishmann Saccharomyces cerevisiae
masa de levadura	6 kg	6kg
concentración de la levadura	12% masa/volumen	12% masa/volumen
Sustrato	Azúcar morena	Azúcar morena
Masa del sustrato	9kg	9kg
Concentración del Sustrato	18% masa/volumen	18% masa/volumen
Velocidad de agitación	50-60 RPM	80-100 RPM
voltaje eléctrico	-	1.6 Volt
Temperatura ambiente	25°C	25C

Se recogieron muestras de los reactores inmediatamente después de la adición de los ingredientes, y se midieron los parámetros iniciales, tales como sólidos solubles [Brix], temperatura [°C] y acidez [pH]. Las mediciones de Brix, temperatura, pH y concentración alcohólica se realizaron cada hora. No se agregaron micronutrientes a los procesos, con miras a las variables de

15

aislamiento. Sólo se hizo una prueba con los dos biorreactores. Los resultados de las pruebas de este experimento se describen en las tablas 7 y 8.

Tablas 7 y 8 - Resultados obtenidos en la fermentación de un biorreactor que contiene un sistema de generación de hidrógeno en electrólisis competa y un biorreactor convencional.

Tabla 7 – Fermentación Convencional - Base										
Condiciones ambientales y convencionales										
Hora	°Bx	Etanol	Temp	pH	□Et/□Bx+	□B/□t	□Et/□t	□T/□t	□pH/□t	□Et/□Bx G-L+
0	19.2	0.00	26.8	4.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.682
1	17.83	1.78	29.6	4.04	1.299	1.37	1.78	2.8	-0.52	0.682
2	14.4	4.26	32.5	3.79	0.723	3.43	2.48	2.9	-0.25	0.682
3	10.32	6.46	33.5	4.1	0.539	4.08	2.20	1.0	0.31	0.682
4	8.38	7.94	33.5	4.05	0.763	1.94	1.48	0.0	-0.05	0.682
5	6.63	9.04	33.7	4.02	0.629	1.75	1.10	0.2	-0.03	0.682
>22*	5.6	9.28	33.1	4.08	0.233	1.03	0.24	-0.6	0.06	0.682
Tabla 8 - Fermentación de acuerdo con la invención										
1.6V y voltaje de corriente directa de 3.2A a 4.9A										
Hora	°Bx	Etanol	Temp	pH	□Et/□Bx+	□B/□t	□Et/□t	□T/□t	□pH/□t	□Et/□Bx G-L+
0	19.25	0.00	25.5	4.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.682
1	18.19	1.54	28.1	4.27	1.453	1.06	1.54	2.6	-0.53	0.682
2	16.19	2.76	30.1	4.19	0.610	2.00	1.22	2.0	-0.08	0.682
3	14.78	3.54	31.4	4.08	0.553	1.41	0.78	1.3	-0.11	0.682
4	13.98	4.28	32.2	4.03	0.925	0.80	0.74	0.8	-0.05	0.682
5	13.53	4.66	32.7	4.01	0.844	0.45	0.38	0.5	-0.02	0.682
>22*	13.12	4.88	32.9	4.23	0.537	0.41	0.22	0.2	0.22	0.682

* - Terminación de la fermentación – El sistema eléctrico del fermentador de acuerdo con la invención se apagó después de la sexta hora. Los reactores se mantuvieron en funcionamiento, con agitación, después de las últimas mediciones en la 6ª hora. La fermentación residual se continuó durante otras 16 horas.

+ Nota, los valores para ($\square Et/\square Bx$), se refieren a los rendimientos parciales, de acuerdo con el rendimiento del G-L. Para la sacarosa, el rendimiento máximo es de 0.538 m/m y 0.682 v/v, de acuerdo con los valores de la última columna derecha, de ambas tablas 7 y 8.

5

Como resultado, el rendimiento en la producción de etanol en el biorreactor de la presente invención fue de 17% a 20% por encima del valor teórico tradicional máximo esperado (rendimiento Gay-Lussac), como se puede observar más claramente en la Tabla 11. Para los valores parciales, se sabe que

los métodos analíticos tienen errores, entre la preparación de las muestras y la continuación del proceso fermentativo, incluso en la muestra recogida, lo que puede causar desviaciones significativas cuando los momentos de muestreo tienen períodos de mayor cinética que la reacción de fermentación en curso.

15 **RESULTADOS Y VALIDACIÓN DEL MODELO BIOQUÍMICO**

Con el fin de presentar los resultados anteriores de una mejor manera, las tablas siguientes explican los valores que se refieren a la producción parcial de etanol, durante el proceso, y al final del proceso de fermentación, siempre

acompañados por los valores del biorreactor de acuerdo con la invención y de los valores obtenidos en el proceso convencional, o biorreactor base. Se señala que

estos valores mostrados se obtienen directamente y no sólo a partir de los resultados obtenidos durante los ensayos.

Tabla 9 – Ensayo 1 : a 0.95V (Pre-electrolisis); 1.2A DC								
Reactor Convencional en ambiente y condiciones convencionales								
	$\square Bx$		$\square Etanol$		$\square Et/\square Bx$		Incremento en el rendimiento	
Hora	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv. %	Inv. %
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	0.0%	0.0%
2	4.61	3.24	3.46	2.74	0.751	0.846	110.1%	124.0%

4	10.01	7.55	6.82	5.46	0.681	0.723	99.9%	106.0%
6	11.10	9.77	7.24	6.82	0.652	0.698	95.6%	102.4%
22	11.10	11.11	7.38	8.04	0.665	0.724	97.5%	106.1%
Final	11.10	11.11	7.38	8.10	0.665	0.729	97.5%	106.9%

Table 10 – Ensayo 2: a 0.95V (Pre-electrolisis); 1.2A DC								
Bioreactor Convencional en ambiente y condiciones convencionales								
	□ Bx		□ Etanol		□ Et/DBx		Incremento en el rendimiento	
Hora	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	0.0%	0.0%
2	5.25	4.37	4.18	3.58	0.796	0.819	116.7%	120.1%
4	11.56	7.54	7.28	5.58	0.630	0.740	92.3%	108.5%
6	11.62	10.46	7.50	7.10	0.645	0.679	94.6%	99.5%
22	10.86	10.89	7.46	8.04	0.687	0.738	100.7%	108.3%
Final	10.86	10.89	7.46	8.04	0.687	0.738	100.7%	108.3%

Tabla 11 – Ensayo 3: a 1,6V (Electrólisis completa); 3,2A a 4,9A DC								
Bioreactor Convencional en ambiente y condiciones convencionales								
	□ B/Dt		□ Etanol		□ Et/DBx		Incremento en el rendimiento	
Hora	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.	Conv.	Inv.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,0%	0,0%
1	1,37	1,06	1,78	1,54	1,299	1,453	190,5%	213,0%
2	4,80	3,06	4,26	2,76	0,888	0,610	130,1%	132,3%
3	8,88	4,47	6,46	3,54	0,727	0,553	106,7%	116,1%
4	10,82	5,27	7,94	4,28	0,734	0,925	107,6%	119,1%
5	12,57	5,72	9,04	4,66	0,719	0,844	105,5%	119,5%
22	13,60	6,13	9,28	4,88	0,682	0,537	100,1%	116,7%
Final	13,60	6,13	9,28	4,88	0,682	0,796	100,1%	116,7%

Se observa que en las Tablas 9, 10 y 11 los valores en las columnas de "Incremento en el rendimiento" muestran valores acumulados y parciales finales, siempre más altos para los obtenidos según la invención. Los valores finales, de 6,9% y 8,3%, con respecto al rendimiento máximo de fermentación, teniendo en cuenta el arte previo, de 0.538 masa/masa o 0.682 volumen/volumen, obtenidos en los ensayos respectivos 1 y 2, que operan en régimen de voltaje de pre-electrólisis y corriente continua, DC, *per* se solamente califican la invención en sus límites productivos. Las concentraciones de [sacarosa], [hidrógeno] y [levadura]

están en el rango de bajo (I) a medio (II) equivalentes molares. Los valores presentados en la Tabla 11 en relación con el ensayo 3 para el "incremento en el rendimiento", tanto parcial y final, son elocuentes y definitivos. Se puede ver que el valor final o acumulado en el ensayo 3 de 16,7% refleja la rápida respuesta al proceso de acuerdo con la invención, al incremento de la concentración de hidrógeno en estado atómico, iónico y gaseoso, con un comportamiento esperado por las figuras 4 y 5. El modelo bioquímico en los dos primeros ensayos, además de los valores y peculiaridades que presenta el ensayo 3, prueba que está técnicamente validado en sus límites tecnológicos e innovadores. Como era de esperar, el ensayo 3, operando con equivalentes molares en el rango moderado (II), tuvo la cinética de reacción sustancialmente alterada, ya que el proceso tuvo reducción en la tasa de producción de etanol por el azúcar consumido ($\frac{\square Et}{\square Bx}$), todavía con una gran cantidad de azúcar presente en el medio. La disponibilidad de micronutrientes, principalmente de N (nitrógeno), en la fase de alta actividad microbiana, es fundamental para el incremento de la biomasa, que es un fenómeno natural en un proceso fermentativo. La falta principalmente de nitrógeno evita la multiplicación del microorganismo fermentativo, siendo una condición de fermentación estresante. Además de los análisis realizados y notificados en el presente documento, la reducción en la emisión de dióxido de carbono durante el proceso se verificó cualitativamente, con evidencia clara de la reducción, en comparación con el proceso desarrollado simultáneamente en el biorreactor convencional. Los expertos versados en el arte tienen estos medios - aspecto y olor - para este tipo de evaluación. En la Tabla 12, se presenta el resumen de los resultados fermentativos, teniendo en cuenta el volumen de etanol producido en los tres ensayos.

Tabla 12 - Resumen de los Ensayos 1, 2 y 3						
Tabla - Resumen	1		2		3	
Magnitudes	Convencional	Invención	Convencional	Invención	Convencional	Invención

Variación Azúcar □Bx	11.10	11.11	10.86	10.89	13.60	6.13
Variación Etanol □□t	7.38	8.10	7.46	8.04	9.28	4.88
Volumen Etanol - Litro	3.69	4.05	3.73	4.02	4.64	2.44
Volumen Etanol/□Bx	0.33	0.36	0.34	0.37	0.34	0.40

Por lo tanto, se considera validado el proceso de la invención, de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio. La reducción de la emisión de dióxido de carbono, como resultado del proceso bioquímico, con el incremento selectivo en la producción de alcohol, emerge como un complemento tecnológico de gran importancia ambiental y operativa. Las ventajas económicas y ambientales proporcionadas por la invención se pueden enumerar como sigue:

- 1- incremento económico directo, con el incremento en la producción de alcohol;
- 2- incremento en la producción sin causar un incremento de la superficie plantada;
- 3- reducción en la producción de dióxido de carbono;
- 4- el equipo de proceso no requiere ajustes en cuanto a volumen de producción, así como los biorreactores y el equipo de destilación;
- 5- reducción en el tamaño y el consumo de energía, en el equipo de recuperación de alcohol arrastrado por el dióxido de carbono en la fermentación;
- 6- incremento en el crédito de carbono con un incremento en la producción de alcohol y con la reducción de dióxido de carbono liberado;
- 7- tecnología dirigida con la mejora en el medio ambiente. El etanol se completa como combustible verde y una mayor viabilidad económica.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la fermentación microbiana de sustratos azucarados, caracterizado porque comprende la inoculación de hidrógeno en el microorganismo del género hongo o bacteria presente en suspensión en el mosto en fermentación o en un lecho inmovilizado, dicho mosto en fermentación o lecho inmovilizado contiene azúcares y microorganismo.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el hidrógeno se genera mediante la aplicación de voltaje eléctrico a al menos dos electrodos aplicados al mosto en fermentación o lecho inmovilizado.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el hidrógeno se genera mediante la aplicación de los electrodos que comprenden al menos un cátodo y un ánodo, dicho cátodo se aplica directamente al mosto en fermentación y el ánodo se aplica a otro electrolito, siendo el último solución salina, de acuerdo con dos electrolitos, que comprende una membrana de separación.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende la adición de:

- 5% a 30% (masa/volumen) de sustratos azucarados;
- 5% a 25% (masa/volumen) de los microorganismos del género hongo o bacteria.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, caracterizado porque el hidrógeno está en el estado atómico, iónico, gaseoso o mezcla de los mismos.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 a 5, caracterizado porque los electrodos son sometidos a un régimen de pre-electrólisis del agua con voltaje eléctrica que van desde 0,1 V a 1,24 V, para producir hidrógeno iónico y atómico.

5 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque el régimen de pre-electrólisis comprende un voltaje que van desde 0,7 V a 1,1 V.

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 a 5, caracterizado porque los electrodos se someten a un régimen de electrólisis completa del agua con
10 voltaje eléctrica que va desde 1,24 V a 30 V para producir, hidrógeno atómico, iónico o gaseoso o mezcla de los mismos.

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque el régimen de electrólisis completa comprende un voltaje eléctrico que va desde 1,24
15 V a 20 V, o preferiblemente de 1,24 V a 10 V.

10. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el voltaje eléctrico aplicado a los electrodos tiene lugar en un régimen de corriente continua o alterna con los ciclos que van desde 50 Hz a 2000 Hz.

20

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque el voltaje eléctrico aplicado a los electrodos tiene lugar en un régimen de alternancia con ciclos que van preferentemente de 50 Hz a 150 Hz, de 100 Hz a 500 Hz o de 400 Hz a 1000 Hz.

25

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque los azúcares se seleccionan de: polisacáridos y monosacáridos con triosas, tetrasas,

pentosas y hexosas, en el que se destacan la sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, o sus mezclas.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque los
5 microorganismos del género hongo presentes en el mosto en fermentación o en lecho inmovilizado se seleccionan del género *Saccharomyces* y más específicamente las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y la especie *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia stipites*, *Torula*, *Candida shehatae*, de líneas de ocurrencia natural, o especialmente seleccionadas y adaptadas, o líneas
10 recombinantes, floculantes.

14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque los microorganismos del género bacteria presentes en el mosto en fermentación o en lecho inmovilizado se seleccionan del grupo de bacterias, más especialmente,
15 como las especies del género *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* y *Clostridium*, de líneas de ocurrencia natural, o especialmente seleccionadas y adaptadas, o líneas recombinantes, floculantes.

15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque los
20 micronutrientes se seleccionan de: nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, zinc, manganeso, cobre, hierro, cobalto, azufre, yodo o mezcla de los mismos.

16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el hidrógeno gaseoso se produce, además, fuera del biorreactor mediante la
25 aplicación de voltaje eléctrico que va desde 1,24 V a 30 V en un régimen de pre-electrólisis de agua y luego se inserta directamente por chorro en los biorreactores.

17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el proceso de fermentación tiene lugar en proceso continuo, semi-continuo o por lotes.

5 18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 a 17, caracterizado porque el proceso fermentativo se controla continuamente por el pH, la temperatura, el control de los niveles, la alimentación y la descarga, las concentraciones de reactivos tales como azúcares, concentración de hidrógeno, las concentraciones de microorganismos vivos y concentración de producto, tales como concentración
10 de alcohol, las concentraciones de dióxido de carbono y el contenido de concentración de micronutrientes.

19. El uso de hidrógeno en estado atómico, iónico o gaseoso o mezclas de los mismos, caracterizado por ser para la inoculación en los microorganismos
15 presentes en un medio de fermentación que contiene sustratos azucarados para la producción selectiva de alcohol, como se define en las reivindicaciones 1 a 18.

20. Una invención que se caracteriza por cualquiera de sus caracterizaciones o reivindica categorías abarcadas por la materia descrita inicialmente en la
20 solicitud de patente o en sus ejemplos presentados en este documento.

(51) International Patent Classification:
C12P 7/06 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/BR2014/000300(22) International Filing Date:
29 August 2014 (29.08.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
BR 10 2013 022434 0
2 September 2013 (02.09.2013) BR

(71) Applicants: MAHLE METAL LEVE S/A [BR/BR]; Rodovia Anhanguera, sentido Interior, Capital, KM 49,7, CEP-13210-877 Jundiaí - SP (BR). LSDATA PLM SOFTWARE LTDA - ME [BR/BR]; Rua Silva Bueno, 1660, Conj. 204, Ipiranga, CEP: 04208-001 São Paulo - SP (BR). ADVEL TECNOLOGIA E COMÉRCIO LTDA. EPP [BR/BR]; Rua Iracema Antas de Abreu Vieira, 326, Casarão, CEP: 13171-803 Sumaré - SP (BR).

(72) Inventors: LOURENÇO, Antonio Pedro; Rua Diogo Garcia, 678, Jardim Recreio dos Bandeirantes, CEP: 14170-860 Sertãozinho - SP (BR). KAWAKAMI, Masayuki; Rua Artur Saboia, 367, ap 43 - II, CEP: 04104-060 São Paulo - SP (BR). LOPES, José Francisco; Rua Iracema Antas de Abreu Vieira, 326, Parque Residencial Casarão, CEP: 13171-803 Sumaré - SP (BR).

(74) Agent: DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPAN-EMA MOREIRA; Caixa Postal 2142, Rua Marquês de Olinda, 70, Botafogo, CEP-22251-040 Rio de Janeiro - RJ (BR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: A PROCESS FOR MICROBIAL FERMENTATION OF SUGARY SUBSTRATES AND USE OF THE HYDROGEN IN ATOMIC, IONIC OR GASEOUS STATE IN SAID PROCESS

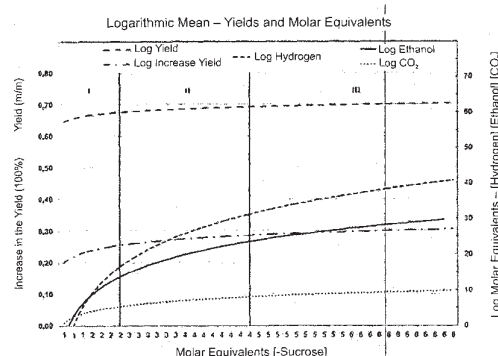


FIG. 5

(57) Abstract: The present invention relates to a biochemical process for increasing selectively the production of alcohol through fermentation of sugary substrates by inoculating hydrogen into the microorganism in a fermentative process comprising sugary wort, nutrients and microorganism of the genus fungus or bacterium. The production of hydrogen occurs through application of an electric voltage in pre-electrolysis or full electrolysis, under direct or alternating electric current, in the fermentative medium. The use of hydrogen in atomic, ionic or gaseous state for inoculation into the microorganisms present in a fermentative medium for the selective production of alcohol is also described.

RESUMEN

PATENTE DE INVENCION: "UN PROCESO PARA LA FERMENTACIÓN MICROBIANA DE SUSTRATOS AZUCARADOS Y UTILIZACIÓN DEL
5 **HIDRÓGENO EN ESTADO ATÓMICO, IÓNICO O GASEOSO EN DICHO PROCESO"**

La presente invención se refiere a un proceso bioquímico para aumentar selectivamente la producción de alcohol a través de la fermentación de sustratos
10 azucarados mediante la inoculación de hidrógeno en el microorganismo en un proceso fermentativo que comprende mosto azucarado, nutrientes y microorganismos del género hongo o bacteria. La producción de hidrógeno se produce mediante la aplicación de un voltaje eléctrico de pre-electrólisis o de
electrólisis completa, bajo corriente eléctrica continua o alterna, en el medio de
15 fermentación. También se describe el uso de hidrógeno en estado atómico, iónico o gaseoso para la inoculación en los microorganismos presentes en un medio de fermentación para la producción selectiva de alcohol.

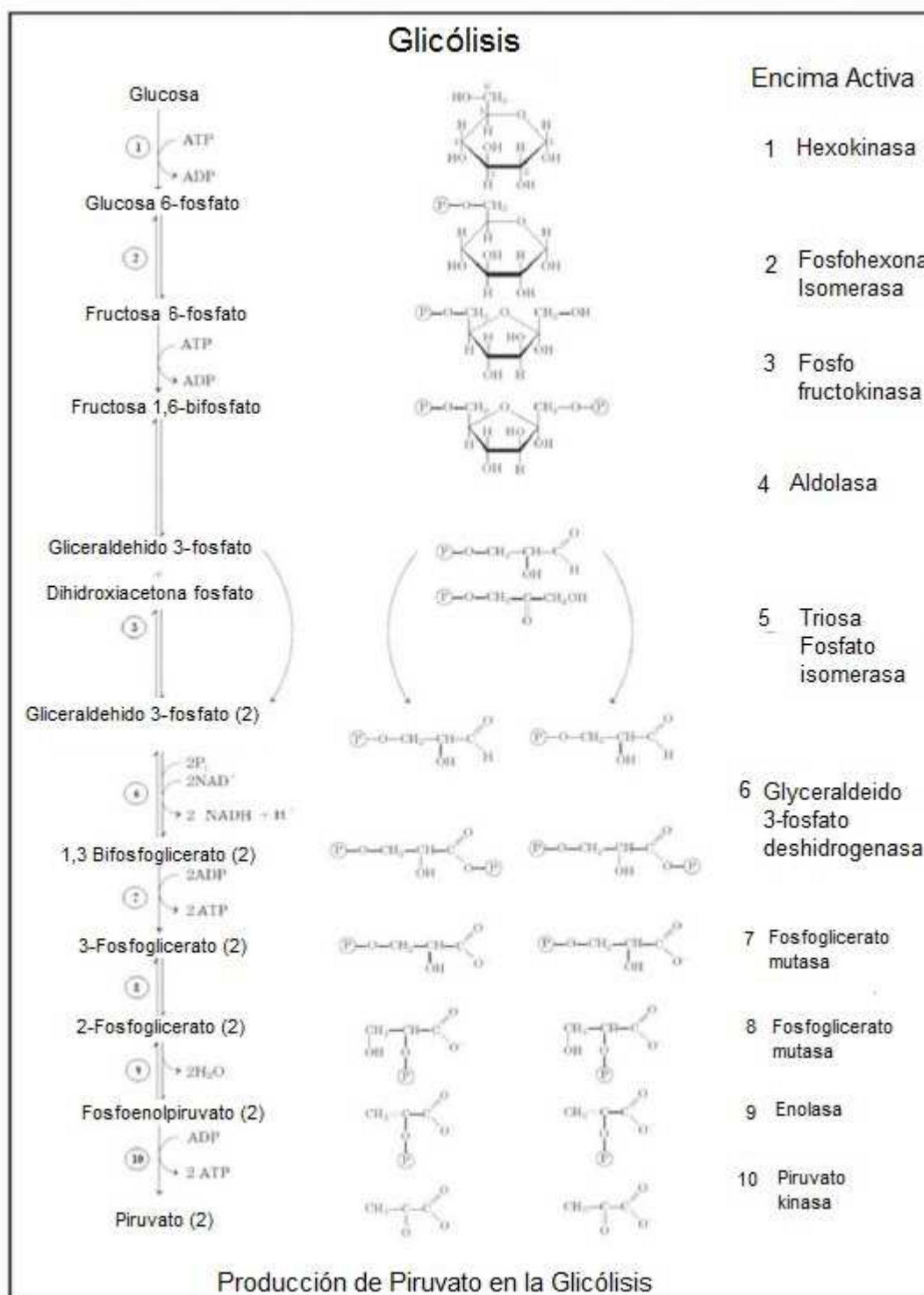


FIG. 1

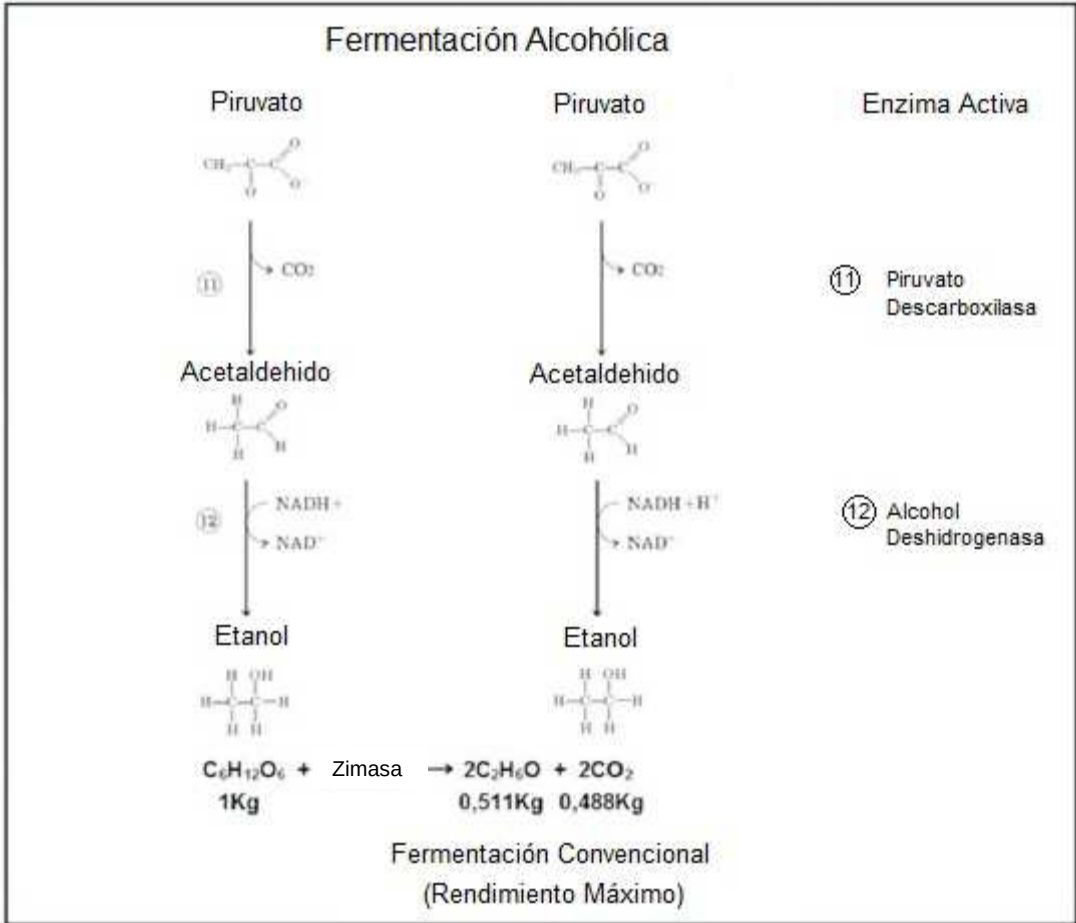


FIG. 2

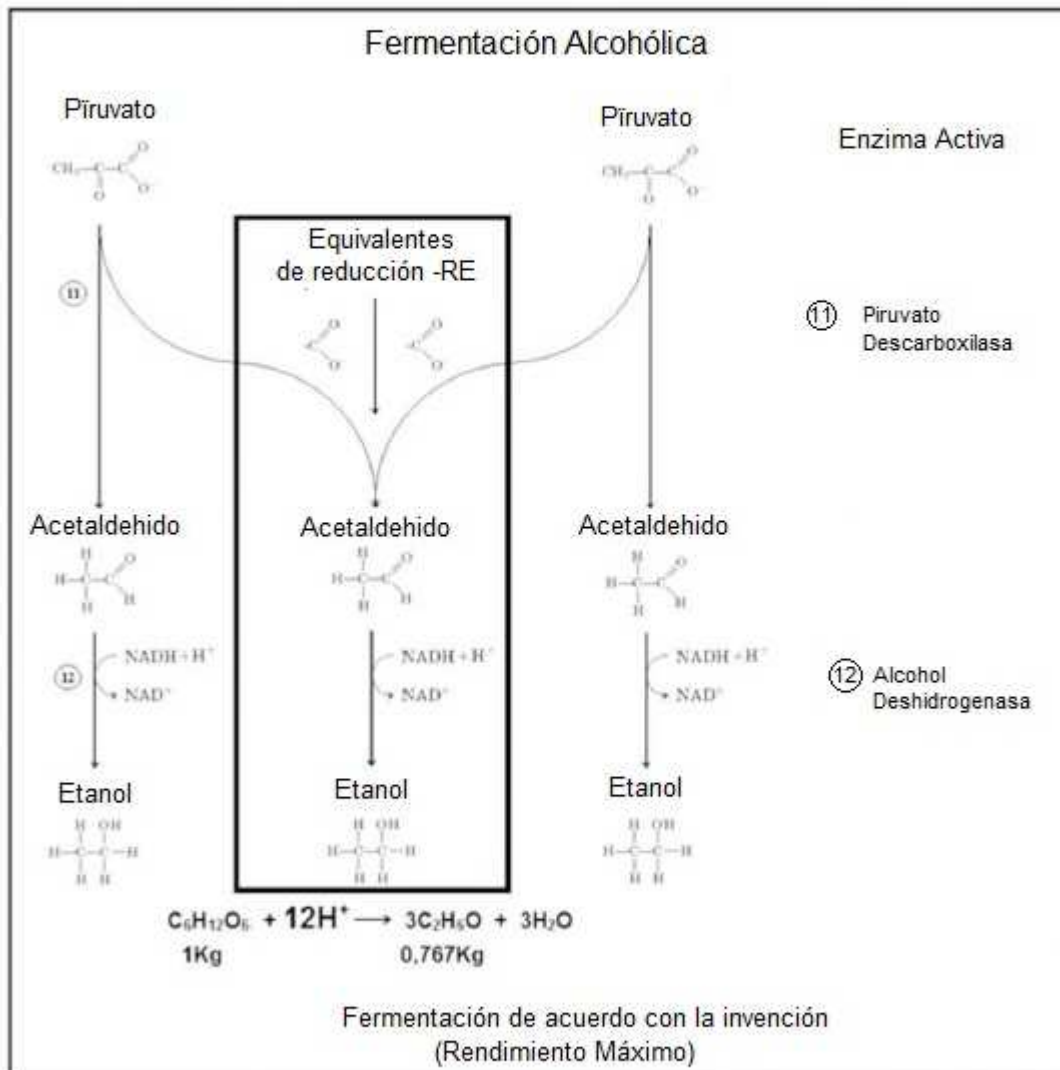


FIG. 3

