



Medellín, 04 de junio de 2019

[M.DE-395]

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. 16-148.549

Solicitud de Patente de Invención Titulada: "PROCESO PARA
PRODUCIR HIDRÓGENO MEDIANTE FERMENTACIÓN ANAERÓBICA
OSCURA DE RESIDUOS ORGÁNICOS"

Solicitante: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

RESPUESTA AL OFICIO No. 811, NOTIFICADO EL 11 DE MARZO DE 2019
(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

PATRICIA ARROYAVE FRANCO, identificada como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. En primer lugar, y con el ánimo de brindar mayor claridad a la materia reivindicada, me permito presentar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad el Capítulo Reivindicatorio

2
AÑOS Bicentenario
0

Modificado presentado junto con la respuesta al examen de forma el 13 de septiembre de 2016.

Así, el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto presenta los siguientes cambios:

- se limitó la Reivindicación 1 de acuerdo con el alcance de las antiguas Reivindicaciones 3, 6 y 7, que fueron, a su vez, eliminadas;
- se introdujo la nueva etapa d), que encuentra soporte en una de las actividades que se encontraban en la etapa c) originalmente reclamada;
- las nuevas Reivindicaciones 3 a 8 corresponden a las antiguas Reivindicaciones 4, 5 y 8 a 11, respectivamente.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas en el Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud original. Por el contrario, éstas corresponden a una limitación de la materia inicialmente reivindicada.

2. a- El Examinador eleva las siguientes objeciones en relación con la claridad y concisión del Capítulo Reivindicatorio:

- el procedimiento de la Reivindicación 1 no está definido correctamente puesto que no se especifican las condiciones en las que se realizan cada una de las etapas;
- las Reivindicaciones 1 a 4 y 7 contienen términos y expresiones generales como “*sustrato complejo*”, “*acidificación natural sin intervención*”, “*agente alcalinizante*”, “*condiciones ambien-*

- tales", "residuos orgánicos", "carbohidratos, proteínas y lípidos", "escalonadamente", "y/o", y "gradualmente" las cuales son imprecisas y no permiten diferenciar la invención del estado de la técnica;
- las Reivindicaciones 1, 6 y 7 reclaman resultados a alcanzar tales como: "*incrementar escalonadamente el pH (...) hasta obtener hidrógeno*", "*hasta alcanzar un pH entre 3,0 y 5,0*", "*el pH se incrementa gradualmente hasta alcanzar un valor entre 5,0 y 6,5*", los cuales no son permitidos porque no corresponden a características estructurales de la invención.

b- i) En primer lugar, llamo respetuosamente la atención sobre las modificaciones realizadas al Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, tal como se indicó en el numeral 1 del presente memorial.

En particular, vale la pena señalar que la Reivindicación 1 se limitó de acuerdo con el alcance de las antiguas Reivindicaciones 3, 6 y 7, de tal manera que el método reclamado ahora especifica características y condiciones en las etapas a), b) y c), como sigue:

- El sustrato complejo de la etapa a) se definió estructuralmente de acuerdo con la anterior Reivindicación 3, por lo que ahora se especifica que éste se selecciona entre carbohidratos, proteínas, lípidos, almidón, celulosa y hemicelulosa, lo cual encuentra soporte en la página 3 del Capítulo Descriptivo;
- Se especificaron las condiciones de tiempo y pH de la etapa b), esto es, de someter dicho sustrato complejo a acidificación, durante un tiempo de entre 12 y 72 horas, y hasta alcanzar un pH entre 3,0 y 5,0, de acuerdo con la antigua Reivindicación 6;

- La etapa c) originalmente reclamada se redactó nuevamente para especificar la actividad de adición de un agente alcalinizante. En otras palabras, ahora se reclama la actividad que se realiza, adición de un agente alcalinizante, en lugar de especificar su resultado, el incremento de pH. Adicionalmente, la anterior etapa c) reclamaba dos actividades, a saber, el incremento de pH y la obtención de hidrógeno. Con el fin de mejorar la claridad de la Reivindicación 1, la nueva etapa c) reclama únicamente una actividad, adicionar agente alcalinizante, y se incluyó la nueva etapa d), que reclama la etapa de obtención del hidrógeno. Finalmente, y de acuerdo con la antigua Reivindicación 7, la etapa de adición de pH se caracterizó por ser una adición escalonada, hasta alcanzar un pH entre 5,0 y 6,5 a condiciones ambientales.

Así, de acuerdo con las limitaciones introducidas, la Reivindicación 1 ahora reclama un proceso en el que sus etapas están debidamente caracterizadas de acuerdo con las condiciones esenciales y necesarias para que se lleven a cabo, de tal manera que el proceso resulta completamente claro y no genera ningún tipo de ambigüedad en relación con su alcance y los límites de la invención.

ii) Ahora bien, en relación con las objeciones sobre la claridad y concisión de expresiones que aún se encuentran en el Capítulo Reivindicatorio, difiero respetuosamente de la opinión del Examinador por cuanto dichas expresiones son perfectamente claras para una persona medianamente versada en la materia, en el contexto en el que son empleadas en la presente solicitud. Tal como se establece en el Manual Andino de Patentes (en adelante, MAP) y en la Guía para Examen de so-

licitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC (en adelante, Guía de la SIC) *“el significado y alcance de las palabras de las reivindicaciones debe ser el que normalmente se le da en el área técnica de la solicitud (...). Si la palabra tiene un significado especial dado por una definición en la descripción, esta definición deberá incluirse en la reivindicación siempre que esto sea factible”*,^{1,2} Lo anterior se basa en que la solicitud de patente (Capítulo Descriptivo, Capítulo Reivindicatorio y Figuras) es un documento legal con contenido técnico que está dirigido a personas medianamente versadas en la materia las cuales comprenden la terminología utilizada. De hecho, tanto el MAP como la Guía de la SIC señalan que si los inventores o el solicitante desean darle un significado particular a un término, éste debe encontrarse definido en la misma solicitud.

En este caso, la solicitud de patente se encuentra en el campo técnico de la ingeniería química, la química y la biotecnología, por lo cual, las personas medianamente versadas en la materia de dichas áreas están en total capacidad de comprender el alcance de expresiones como *“sustrato complejo”, “agente alcalinizante”, “condiciones ambientales”, “carbohidratos, proteínas, lípidos, almidón, celulosa y hemicelulosa”*, las cuales no representan un número infinito de posibilidades ya que su significado en el contexto de un proceso de fermentación de residuos orgánicos, es limitado y ampliamente conocido en la técnica. De igual manera, dichas expresiones deben ser analizadas teniendo en cuenta el contexto en el que se encuentran y la materia que se está reclamando a la luz de lo divulgado en el Capítulo Descriptivo y el conocimiento del área técnica de la solicitud.

¹ Superintendencia de Industria y Comercio, Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC, 2014, sección 2.6.5.1, página 73

² Comunidad Andina de Naciones, Manual Andino de Patentes, 2004, sección 9.4 (disponible en: <http://www.comunidadandina.org/public/patentes.pdf>)

Aun cuando no existe una obligación para el Solicitante de definir términos ampliamente conocidos en el campo técnico, en el presente caso llamo la atención sobre las definiciones de las páginas 3 a 5 del Capítulo Descriptivo, donde claramente se establece:

- *“El proceso inicia con la preparación de un sustrato complejo a partir de residuos orgánicos. Para efectos de la presente invención, el término “sustrato complejo” se refiere a aquel sustrato obtenido a partir de residuos orgánicos, entendiéndose éstos como aquellos materiales, sustancias o elementos resultantes de la actividad o del consumo doméstico, agrícola y/o agroindustrial, compuestos principalmente de carbohidratos, proteínas, lípidos, almidón, celulosa y hemicelulosa. El sustrato complejo de acuerdo al proceso de la invención puede estar conformado por residuos orgánicos sólidos y líquidos, solamente sólidos o solamente líquidos, siendo preferidos los residuos orgánicos sólidos. Entre los residuos orgánicos de los que se puede obtener el sustrato complejo se pueden mencionar las frutas y hortalizas (v.g. hojas de lechuga, repollo, naranja, limón, papayuela, mango, guayaba, pepino, cebolla, ajo, pimentón, tomate, cascarrilla de uchuva, banano), cáscaras y pulpas de frutas en estado de descomposición, alimentos, aguas negras, melazas, aguas residuales agroindustriales de frutas y hortalizas, así como vegetales provenientes de la poda de zonas verdes”. Adicionalmente, en la etapa a) de la nueva Reivindicación 1, se especifica que dicho sustrato complejo comprende carbohidratos, proteínas, lípidos, almidón, celulosa y hemicelulosa.*
- *“Para efectos de la presente invención, la expresión “agente alcalinizante” se entiende por cualquier compuesto o sustancia que permita incrementar el valor del pH, modificando el potencial redox en un medio. Los agentes alcalinizantes pueden ser, pero no*

se limitan a, cal agrícola (Material compuesto por carbonato de calcio y óxido de calcio, obtenido después de moler y pulverizar la piedra caliza), hidróxido de sodio (NaOH), óxido de calcio (CaO), carbonato de calcio (CaCO₃), hidróxido de calcio o cal hidratada (Ca(OH)₂), cal dolomita (CaMg(CO₃)₂) y óxido de calcio y magnesio (CaMgO₂). En una modalidad preferida, el agente alcalinizante empleado en el proceso es cal agrícola en una concentración entre 5 y 20 g/L de sustrato."

Adicionalmente, el término "escalonadamente" objetado por el Examinador y que se encuentra en la etapa c) de la Reivindicación 1, significa, de acuerdo con la Real Academia de la Lengua Española "*Distribuir en tiempos sucesivos las diversas partes de una serie*"³. De forma similar, en el Diccionario de Oxford, la misma palabra está definida como aquello "*que está organizado o distribuido de manera gradual*"⁴. El contexto en el que el término objetado está empleado en el Capítulo Descriptivo concuerda con lo definido en los diccionarios citados pero aplicado al campo reclamado, esto es, la adición de un agente alcalinizante de forma gradual, lo que lleva a un aumento del pH de manera correspondiente (página 5 del Capítulo Descriptivo).

En particular, las expresiones utilizadas para definir el proceso reclamado son válidas en tanto encuentran soporte en el hecho que un inventor está en su derecho de reclamar protección para la totalidad de un concepto inventivo desarrollado, sin importar la amplitud de éste, siempre y cuando se conserve el principio de unidad de invención y no haya arte previo que afecte su patentabilidad. Así, una reivindicación puede ser tan amplia como se requiera para así poder enmarcar la totalidad del concepto inventivo desarrollado, y dicha amplitud no necesariamente

³ Tomado de: <https://dle.rae.es/?id=G7Xmolc>

⁴ Tomado de: <https://es.oxforddictionaries.com/definicion/escalonado>

implica falta de claridad. En este sentido, el uso de dichas expresiones únicamente pretende proteger diferentes modalidades del invento, las cuales encuentran soporte en el Capítulo Descriptivo y en los Ejemplos, y que evidentemente están dentro del concepto inventivo desarrollado legítimamente por los inventores.

iii) Ahora bien, en este punto resulta pertinente señalar que contrario a la opinión del Examinador, la expresión “*sin intervención*” presente en la Reivindicación 1 no es imprecisa, pues corresponde a una característica esencial del método reclamado y que lo diferencia de lo divulgado en el arte previo. Como se explicará más adelante en el análisis de novedad y nivel inventivo, los procesos para producir hidrógeno por fermentación anaeróbica conocidos hasta el momento de la presentación de la presente solicitud, **requieren** diversos tipos de intervenciones para que la acidificación (etapa esencial en la obtención de las condiciones favorables para el crecimiento de las bacterias que son responsables de la producción de hidrógeno) ocurra. En el presente invento, “*La acidificación se realiza a temperatura ambiente, sin agitación, sin suministro de sustancias químicas y biológicas (...). Una vez realizada la etapa de acidificación, se proporcionan las condiciones favorables para el crecimiento de las bacterias que soportaron la acidificación y que son responsables de la producción del hidrógeno, a saber: el no suministro de oxígeno, pH, presión parcial de hidrógeno, temperatura y velocidad de agitación*”, tal como se enseña en las páginas 4 y 5 del Capítulo Descriptivo. Es decir, la característica esencial del proceso reclamado consiste en que la etapa de acidificación **no requiere** ningún tipo de intervención adicional, puesto que dichas intervenciones se realizan una vez se ha concluido dicha etapa.

Así, en el presente caso, la forma como se encuentra redactada la Reivindicación 1 corresponde con lo señalado en la Guía de la SIC, donde se

establece que “el alcance de una reivindicación puede estar limitado por medio de una “renuncia”, de una “limitación negativa” o de una “exclusión” de un elemento definido claramente. Sólo se utiliza cuando no es posible definir el objeto de la reivindicación sólo con características positivas. En sí, no hay nada ambiguo o vago en una limitación negativa”⁵. Por lo anterior, la expresión “sin intervención” de la Reivindicación 1, corresponde a una limitación negativa de elementos definidos de acuerdo con las divulgaciones del Capítulo Descriptivo y que permiten definir el alcance de la materia reclamada en la Reivindicación 1, tal como lo establece la Guía de la SIC.

iv) Finalmente en relación con las expresiones “*incrementar escalonadamente el pH*”, “*hasta alcanzar un pH entre 3,0 y 5,0*” y “*el pH se incrementa gradualmente hasta alcanzar un valor entre 5,0 y 6,5*”, difiero respetuosamente de la opinión del Examinador, por cuanto dichas expresiones no corresponden a resultados a alcanzar. Como se explicó anteriormente, la expresión “*incrementar escalonadamente el pH*” en la Reivindicación 1 fue eliminada, y en su lugar la etapa c) ahora especifica que la adición de un agente alcalinizante es escalonada, y se realiza hasta que se alcanza un pH determinado (5,0 y 6,5).

Contrario a lo que señala el Examinador, las expresiones “*hasta alcanzar un pH entre 3,0 y 5,0*” y “*el pH se incrementa gradualmente hasta alcanzar un valor entre 5,0 y 6,5*” corresponden a parámetros del proceso reclamado, los cuales, contrario a introducir ambigüedades en la reivindicación, establecen un límite técnico en las etapas b) y c). De acuerdo con el MAP, los parámetros “*son valores característicos de propiedades mensurables (por ejemplo el punto de fusión) o definidos como combinaciones matemáticas de varias variables. (...) En cualquier caso, el parámetro tiene que poder ser determinado y medido sin ambigüedad por métodos*

⁵ Superintendencia de Industria y Comercio, Óp Cit. sección 2.12.3.4, página 125

*estándar conocidos en el campo en cuestión o descritos claramente en la solicitud*⁶.

Universidad
Nacional
de Colombia

En este caso, el pH, contrario a ser un resultado a alcanzar, es una variable que puede ser determinada y medida sin ninguna ambigüedad por métodos estándar conocidos en la técnica⁷. Por consiguiente, para el presente caso, la persona medianamente versada en la materia se encuentra en total capacidad de comprender el alcance de la invención, pues notaría que éste se encuentra dentro de la materia divulgada en el Capítulo Descriptivo y sería capaz de reproducir la materia reclamada sin acudir a experimentación adicional excesiva.

v) En conclusión, a la luz de las modificaciones y argumentos planteados anteriormente, considero que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto cumple con los requisitos de claridad y concisión establecidos en la Decisión 486, y a la luz del MAP y la Guía de la SIC, permitiéndole a la persona medianamente versada en la materia comprender inequívocamente el alcance de la materia reclamada.

3. a- El Examinador señala que los documentos "*Analysis of hydrogen production by anaerobic fermentation from urban organic waste*" (D1) y "*Generation of Biohydrogen by Anaerobic Fermentation of Organics Wastes in Colombia*" (D2) anticipan la materia reclamada en la presente solicitud.

Particularmente, el Examinador indica que D1 y D2 anticipan las características técnicas esenciales del proceso de la Reivindicación 1, puesto que dichos documentos divulgan por separado un proceso de produc-

⁶ Manual Andino de Patentes, *Óp. cit.* 2004, Sección 4.6.7, p., 41.

⁷ Superintendencia de Industria y Comercio, *Óp Cit.* Sección 2.6.5.9

ción de hidrógeno por fermentación anaerobia de residuos orgánicos urbanos de frutas y verduras y una investigación para determinar la factibilidad inicial de generar biohidrógeno a partir de desechos orgánicos urbanos, respectivamente.

El Examinador añade que las Reivindicaciones 2 a 4, 8, 9 y 11 también se encuentran anticipadas por D1, dado que éste hace referencia a los residuos orgánicos de la materia prima, la adición de cal agrícola y el uso de tres biorreactores cilíndricos de 2.000 L. De igual manera, el Examinador señala que D2 también anticipa las Reivindicaciones 2 a 4, 5, 8, 9 y 11 puesto que este documento enseña una mayor producción de desechos de hojas de repollo y lechuga, valores de Demanda química de oxígeno (DQO) de 54 g de O_2/L y sólidos volátiles totales (SVT) con un valor de 54.8 g/L, adición de cal agrícola y la instalación de un biorreactor discontinuo de 2000 litros. Por lo tanto, el Examinador concluye que las Reivindicaciones 2 a 4, 5, 8, 9 y 11 carecen de novedad a la luz de lo enseñado en D1 y D2.

b- i) En primer lugar, llamo respetuosamente la atención sobre las modificaciones realizadas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto de acuerdo con lo mencionado en el punto 1 del presente memorial. En particular, la Reivindicación 1 se limitó de acuerdo con el alcance de las antiguas Reivindicaciones 3, 6 y 7, de tal manera que ahora el proceso reclamado está correctamente definido por las etapas que lo conforman y las condiciones esenciales en las cuales se llevan a cabo dichas etapas.

Ahora bien, respecto al arte previo citado, D1 divulga un diseño experimental factorial para determinar el contenido máximo y la producción máxima de hidrógeno producido por fermentación anaerobia de resi-

duos orgánicos urbanos de frutas y verduras. D1 divulga que se realizaron diez ensayos donde las variables estudiadas fueron pH de acidificación, tiempo de acidificación, pH de operación y carga orgánica. El pH de acidificación correspondió al pH del sustrato al inicio del ensayo, el cual permitió la eliminación de las bacterias metanogénicas, el tiempo de acidificación representó los días en los que el ensayo se mantuvo con un pH de acidificación (...) (p. 129). Más aún, como se puede observar en la sección 3.1 *Contenido y producción de hidrógeno*, los resultados obtenidos para la máxima producción y contenido de hidrógeno en los ensayos realizados se obtuvieron con un tiempo de acidificación de entre 7 y 8 días, lo cual, según la observación de los autores, corresponde a condiciones de operación similares a las reportadas por otros autores, cuando se emplean residuos orgánicos urbanos. Los resultados recopilados en la Tabla 5, correspondientes a los tres métodos evaluados, muestran que el tiempo de acidificación estuvo entre 5 y 11,4 días.

Así, considerando las enseñanzas de D1, es claro que este estudio no anticipa un proceso de producción de hidrógeno en el cual se lleve a cabo una etapa de acidificación con una duración de apenas entre 12 y 72 horas, como se reclama en la presente invención, lo cual es casi la mitad del tiempo mínimo de acidificación obtenido en el mejor de los casos en los modelos revelados en D1.

De forma similar, D2 corresponde a un capítulo de libro dedicado a determinar la factibilidad de generar bio-hidrógeno a partir de residuos urbanos y establecer las condiciones para la operación de bio-reactores. D2 enseña que, en una primera etapa del estudio, los residuos se sometieron a condiciones de acidez durante tres meses a un pH cercano a 3,5 con el fin de reducir la cantidad de bacterias metanogénicas (p.388). En una segunda etapa, fue necesario adicionar ácido muriático a los bio-reactores, con el fin de lograr el pH de la acidificación, pero no se obtuvo

respuesta (pH entre 3,5 y 4,5) (p.393). Finalmente, D2 enseña que la mayor producción de hidrógeno se logró cuando el tratamiento de acidificación se aplicó durante 8 días con un valor de pH=4. Es decir, el proceso divulgado en D2, no solo se diferencia del proceso aquí reclamado en que D2 enseña la adición de un ácido para lograr el pH de acidificación, sino además en que el tiempo de la etapa de acidificación que proporciona los mejores resultados es de 8 días, lo cual es 16 veces más que el tiempo mínimo de 12 horas, y casi 3 veces más que el tiempo máximo de 72 horas de la etapa de acidificación sin intervención del proceso reclamado.

En resumen, ni los modelos enseñados en D1, ni el proceso de fermentación propuesto en D2 comprenden una etapa de acidificación sin intervención con una duración de entre 12 y 72 horas como la reclamada en la presente invención.

Así las cosas, a la luz de lo anterior, me permito resaltar que, para fundamentar una afectación válida contra la novedad de una invención, el MAP exige que el arte previo debe divulgar explícitamente todas y cada una de las características de la invención.⁸ Adicionalmente, el Tribunal Andino de Justicia (TAJ) ha determinado que para establecer una objeción de novedad válida, la “*divulgación debe ser detallada y, en todo caso, suficiente para que una persona del oficio pueda utilizar esa información para ejecutar o explotar la invención*”.⁹

Así, en el presente caso, ni D1 ni D2 divulgan por separado explícitamente todas las características del proceso para la producción de hidrógeno por fermentación de residuos orgánicos en un entorno cerrado, sin

⁸ Manual Andino de Patentes, *Óp. cit.* Sección 9.4

⁹ Proceso 06-IP-89 (<http://intranet.comunidadandina.org/Documentos/Procesos/209-IP-2005.doc>) y Proceso 36-IP-2004 (<http://www.notinet.com.co/serverfiles/servicios/archivos/30jul04/ca36-04.htm>)

suministro de oxígeno y en ausencia de luz reclamado en las Reivindicaciones 1 a 7. En resumen, el proceso ahora reclamado en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto no está anticipado por las enseñanzas de ninguno de los documentos del arte previo citados por el Examinador.

4. a- i) El Examinador señala que D1 afecta el nivel inventivo del proceso de la Reivindicación 6.

Para el Examinador la diferencia entre el proceso de D1 y el reclamado en la Reivindicación 6, consiste en que la invención presenta una etapa de acidificación que tiene una duración de 12 a 72 horas. Sin embargo, el Examinador afirma que dicha diferencia no conlleva un efecto técnico inesperado, dado que ambos documentos solucionan el mismo problema técnico, que consiste en proporcionar un proceso para la producción de hidrógeno por fermentación anaerobia.

Por lo tanto, el Examinador formula el problema técnico objetivo de la siguiente forma: *“¿Cómo proporcionar un proceso para la producción de hidrógeno por fermentación anaerobia alternativo al revelado en el documento D1?”*

Sin embargo, el Examinador afirma que, de acuerdo con los ejemplos del Capítulo Descriptivo, el tiempo que requiere la etapa de acidificación depende del tamaño del biorreactor, ya que para un biorreactor de 20L el periodo de acidificación fue de 24 horas, mientras que para un biorreactor de 2000L la etapa de acidificación se realizó durante 4 días (96 horas). Por otro lado, en D1 se emplean 3 biorreactores de 2000L para los cuales la etapa de acidificación se establece entre 5 y 30 días (Tabla 2).

El Examinador concluye que cualquier persona medianamente versada en la materia se vería motivada a reducir el tiempo de la etapa de acidificación empleando biorreactores de menor capacidad en el proceso de D1, y llegaría así a la Reivindicación 6 de manera obvia.

ii) El Examinador argumenta que D2 afecta el nivel inventivo de la Reivindicación 10.

El Examinador señala que la diferencia entre la Reivindicación 10 y D2 consiste en que la invención presenta una etapa de aumento de pH con agitación entre 30 y 45 rpm, lo cual, según el Examinador no proporciona un efecto técnico inesperado dado que ambos documentos solucionan el mismo problema técnico.

Por lo tanto, el Examinador formula el problema técnico de la siguiente forma: *“¿Cómo proporcionar un proceso para la producción de hidrógeno por fermentación anaerobia alternativo al revelado en el documento D2?”*

Sin embargo, el Examinador afirma que es conocimiento de la persona versada en la materia que la producción de hidrógeno mediante un proceso de fermentación anaeróbica puede contar con agitación y en tal caso, velocidades entre 25 y 30 rpm son comúnmente usadas¹⁰.

El Examinador afirma que, de acuerdo con los ejemplos del Capítulo Descriptivo, es posible obtener hidrógeno empleando agitación (ejemplo biorreactor 20L) o sin agitación (ejemplo biorreactor 2000L).

¹⁰ El Examinador cita el documento Pandey, A., Mohan, S., Chang, J., Hallenbeck, P., & Larroche, C. (2013). Biohydrogen: Chapter 14. Scale-up and Commercial Applications of Biohydrogen Production Process (1st ed.).

Por lo tanto, cualquier persona medianamente versada en la materia estaría motivada a incluir agitación en el proceso de D2, y obtendría el proceso de la Reivindicación 10 de manera obvia.

b- i) En primer lugar, vale la pena señalar que las características previamente reclamadas en la antigua Reivindicación 6 fueron incorporadas en la nueva Reivindicación 1, la cual ahora reclama un proceso para la producción de hidrógeno por fermentación de residuos orgánicos en un entorno cerrado, sin suministro de oxígeno y en ausencia de luz, que comprende las siguientes 4 etapas:

- a) preparar un sustrato complejo que comprende carbohidratos, proteínas, lípidos, almidón, celulosa y hemicelulosa;
- b) someter dicho sustrato complejo a acidificación, sin intervención, entre 12 y 72 horas, hasta alcanzar un pH entre 3,0 y 5,0;
- c) adicionar un agente alcalinizante escalonadamente, hasta alcanzar un pH entre 5,0 y 6,5 a condiciones ambientales;
- d) obtener el hidrógeno.

Por otra parte, en relación con la nueva Reivindicación 7 (antigua Reivindicación 10), me permito señalar que de acuerdo con la Guía de la SIC, *“una reivindicación dependiente es la que contiene todas las características de la reivindicación de la cual depende (...)”*¹¹, es decir, en el presente caso, las características técnicas del proceso de la Reivindicación 7 son las de la Reivindicación 1 de la cual depende. Así, las condiciones de la etapa c) reclamadas en la Reivindicación 7 no pueden ser analizadas de manera independiente sino como una modalidad particular del proceso definido en la Reivindicación 1.

¹¹ Superintendencia de Industria y Comercio, Op Cit.. Sección 2.6.4.2

Ahora bien, teniendo claro el alcance del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, y en respuesta a las objeciones del Examinador relacionadas con la supuesta falta de nivel inventivo, me permito realizar el análisis de nivel inventivo de acuerdo con la Guía de la SIC¹². La Guía de la SIC señala que *“Durante el examen de nivel inventivo debe hacerse un juicio de valor y un análisis objetivo de las divulgaciones previas del estado de la técnica, no influenciados por el conocimiento que ya se tiene de la Invención que se está evaluando. Por tanto, con el fin de minimizar la subjetividad y evitar que se realice un análisis en retrospectiva (“hind-sight” ó “a posteriori”), el examen debe relacionar la invención con la solución de un problema técnico, mediante el Método “problema-solución”*(subrayado fuera de texto). De acuerdo con lo anterior, en adelante se presenta el análisis a través del método problema-solución de acuerdo con las etapas establecidas por la SIC en su Guía, teniendo en cuenta el alcance de las reivindicaciones y de la materia divulgada por el arte previo citado:

A. Identificar el estado de la técnica cercano a la invención reivindicada.

En primer lugar, me permito aclarar que la Guía de la SIC establece claramente que el estado de la técnica cercano es *“un documento que se encuentra en el mismo campo técnico que la invención o trata de solucionar el mismo problema o uno relevante. Suele ser el que tiene más características en común con la invención o presenta leves modificaciones de estructura e indica la misma función, o propósito”*. El Examinador identifica a D1 como el documento que está más cercano a la Reivindicación 6, así que con el único fin de hacer una comparación directa con las conclusiones a las que llega el Examinador en su análisis, consideraré también a D1 como el arte previo más cercano a la invención.

¹² íbidem Sección 2.13.5, páginas 131-134.

D1 enseña un diseño experimental factorial incompleto con cuatro factores y tres niveles para analizar la producción de hidrógeno por fermentación anaerobia de residuos orgánicos urbanos de frutas y verduras. Los resultados de las técnicas matemáticas utilizadas para obtener los valores máximos de producción de hidrógeno y contenido de hidrógeno, mostraron que el modelo con lógica difusa fue el que presentó mejor ajuste entre los valores experimentales y los estimados, con un contenido de hidrógeno de 58,8% y una producción máxima de 63,4 L/día. El valor máximo de contenido de hidrógeno estimado mediante el modelo con lógica difusa, se logró con un pH de acidificación de entre 4,4 y 4,6 y un tiempo de acidificación entre 5 y 7 días.

Ahora bien, en relación con la Reivindicación 7 respetuosamente difiero de la opinión del Examinador en cuanto a la determinación del arte previo más cercano, por cuanto el proceso reclamado, al depender de la Reivindicación 1 comprende las etapas a) y b) tal como están ahí definidas, lo cual no es de manera alguna cercano a las enseñanzas de D2, tal como se explicó en el análisis de novedad anteriormente. En ese sentido, consideraré a D1 como el arte previo más cercano, de manera similar al análisis de la Reivindicación 6.

B. Determinar las diferencias entre la invención y el estado de la técnica más cercano.

Contrario a la observación del Examinador, la materia reclamada en la Reivindicación 1 (que ahora incluye las limitaciones de la antigua Reivindicación 6) y la Reivindicación 7, no difiere de lo divulgado en D1 únicamente en que la etapa de acidificación en el proceso reclamado tiene una duración entre 12 y 72 horas y en que la etapa de aumento de pH se

realiza con agitación entre 30 y 45rpm. Como ya se mencionó anteriormente, el proceso reclamado en las Reivindicaciones 1 y 7 consta de cuatro etapas que se diferencian de lo divulgado en D1 al menos en lo siguiente:

- el sustrato complejo comprende carbohidratos, proteínas, lípidos, almidón, celulosa y hemicelulosa;
- la etapa de acidificación ocurre sin intervención y tiene una duración de entre 12 y 72 horas;
- el agente alcalinizante se adiciona escalonadamente, hasta alcanzar un pH entre 5,0 y 6,5 a condiciones ambientales;
- las condiciones ambientales corresponden a temperatura entre 30 y 40°C y agitación entre 30 y 45 rpm.

C. Definir el efecto técnico causado y atribuible al elemento diferencial.

En este punto, me permito diferir respetuosamente de la opinión del Examinador cuando afirma que no hay un efecto técnico asociado a las diferencias entre D1 y la presente invención.

Tal como se enseña en el Capítulo Descriptivo, los procesos de fermentación para la obtención de hidrógeno, requieren de una etapa de pre-tratamiento del sustrato, la cual tiene como finalidad eliminar bacterias metanogénicas. Dichos tratamientos previos incluyen tratamientos térmicos, de ultrasonido, someter el sustrato a condiciones ácidas o básicas, esterilización o el uso de un pre-inóculo, lo cual genera dependencia de insumos químicos o biológicos, prolonga el tiempo del proceso, incrementa notablemente su costo o lleva a una drástica reducción de la producción de hidrógeno.

En el presente caso, sin embargo, los inventores encontraron sorprendentemente que el consorcio bacteriano presente en los residuos presenta grupos de bacterias, cada una desarrollándose en un rango diferente de pH. Así, a partir de los procesos metabólicos de las bacterias presentes en el sustrato, se logra la acidificación del mismo, a temperatura ambiente, sin agitación, sin suministro de sustancias químicas y biológicas, y durante un tiempo entre 12 y 72 horas, preferiblemente 24 horas, hasta alcanzar un pH entre 3,0 y 4,0. El tiempo bajo el cual se somete el sustrato complejo a acidificación está en función del microorganismo a eliminar o reducir, del pH inicial del sustrato y de la cinética del descenso del pH. Una vez logrados los valores de pH de la etapa de acidificación, se deben proporcionar las condiciones favorables para el crecimiento de las bacterias que son responsables de la producción del hidrógeno, a saber: el no suministro de oxígeno, incremento gradual del pH (de 0,5 con un valor mínimo de pH de 5,0 y un valor máximo de pH de 6,5), presión parcial de hidrógeno, temperatura y velocidad de agitación.

Los inventores pudieron determinar que varios tipos de bacterias anaerobias metabolizan los carbohidratos presentes en el sustrato a través de la glicólisis, produciendo diversos ácidos que generan una reducción del pH hasta valores que son intolerables para microorganismos consumidores de hidrógeno, bacterias metanogénicas y bacterias acetogénicas presentes en los residuos orgánicos. Más aún, los inventores determinaron que la producción de hidrógeno en el proceso reclamado no está asociada con la fermentación de la glucosa por parte de las bacterias de los géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, y del género *Clostridium*, sino que, esta producción ocurre a partir del ácido láctico generado por bacterias presentes en el consorcio, que fermentan azúcares y generan ácido láctico. Dicho ácido láctico además de disminuir el pH controlando

el crecimiento de bacterias no deseadas, sirve como sustrato para bacterias de las familias *Bacillaceae*, algunas especies de *Staphylococcaceae* y *Micrococcaceae* y otras bacterias presentes en el sustrato que son productoras de hidrógeno. Así, la etapa de acidificación sin intervención reclamada en el proceso de la presente invención, no solo permite la eliminación de bacterias no deseadas en el proceso de fermentación, sino que además proporciona el sustrato (ácido láctico) necesario para la producción de hidrógeno.

Ahora bien, la producción de hidrógeno inicia una vez se alcanzan las condiciones de operación para el grupo correspondiente de bacterias del consorcio, por lo cual una etapa de acidificación con menor duración hace que el proceso sea más eficiente, puesto que las condiciones para la producción de hidrógeno se logran en menos tiempo.

A continuación, me permito presentar datos adicionales de ensayos realizados por los inventores, relacionados con el tiempo de duración de la etapa de acidificación y su relación con la producción de hidrógeno, los cuales soportan las afirmaciones hechas anteriormente, que se anexan en el documento "*Elaboración de un protocolo que permita la determinación por HPLC de carbohidratos y ácidos orgánicos presentes en una matriz compleja proveniente de un proceso de fermentación anaerobia de residuos orgánicos orientado a la generación de biohidrógeno*".

Tal como se puede observar en la tabla y la Figura 3, la glucosa y la fructosa se consumieron en la etapa 2, durante la acidificación natural, por microorganismos no productores de hidrógeno, independientemente de su duración (entre 1 y 4 días). En el ensayo 26, no hubo etapa 2 y se adicionó cal desde el principio de la fermentación, de tal manera que los azúcares estuvieron disponibles para los microorganismos pro-

ductores de hidrógeno. Sin embargo en este ensayo no se generó hidrógeno. Estos resultados llevaron a concluir que la etapa de acidificación sin intervención del proceso reclamado en la presente invención permitió que la glucosa y la fructosa se consumieran completamente, generando ácido láctico, el cual es el principal metabolito de la ruta metabólica homoláctica, de tal manera que el sustrato realmente utilizado por los microorganismos para producir hidrógeno es el ácido láctico y no las hexosas. Las condiciones de fermentación para que se obtuvieran los mayores valores de producción de hidrógeno, incluyen una duración de la etapa de acidificación de un día.

De acuerdo con los datos presentados, es evidente que la duración de la etapa de acidificación es determinante para la mayor producción de hidrógeno del proceso reclamado.

D. Deducir el problema técnico a solucionar.

En cuanto a la formulación del problema técnico, la Guía de la SIC establece que el problema técnico debe ser formulado de la siguiente manera: “¿cómo modificar o adaptar el estado de la técnica cercano para obtener el efecto técnico que la invención proporciona?”¹³. Adicionalmente, de acuerdo con el MAP “se debe definir el problema sin incluir elementos de la solución, porque entonces la solución sería evidente”¹⁴ (énfasis fuera del texto).

Dado que el Examinador no consideró todos los efectos técnicos logrados por el proceso reclamado, formula el problema técnico resuelto por la presente invención de manera equivocada, así: “¿Cómo proporcionar

¹³ Ibídem.

¹⁴ Comunidad Andina de Naciones, *óp. cit.*, sección 10.2.1

un proceso para la producción de hidrógeno por fermentación anaerobia alternativo al revelado en el documento D1?

No obstante, atendiendo lo estipulado por la Guía de la SIC y el MAP, considero que el problema técnico objetivo de la presente invención es: *¿cómo proporcionar un proceso para la producción de hidrógeno por fermentación anaerobia más eficiente y con mayor producción de hidrógeno?*

E. Evaluar si la invención reivindicada, partiendo del estado de la técnica cercano y del problema técnico objetivo, habría sido obvia para la persona medianamente versada en la materia.

De acuerdo con la Guía de la SIC *“esta etapa consiste en responder a la pregunta de si en el estado de la técnica en su conjunto hay un segundo documento que contiene una enseñanza que indicaría (no sólo que podría indicar, sino que indicaría) a la persona medianamente versada en la materia, enfrentada al problema técnico, cómo modificar o adaptar el estado de la técnica más cercano para resolver el problema, de la forma reivindicada”* (énfasis fuera del texto). Así, el análisis de nivel inventivo de solicitudes de patente, y en particular de procesos, no se trata de encontrar en el arte previo una mera invitación a experimentar con uno o más cambios aleatorios, sino de identificar en los documentos citados una enseñanza y guía específica para hacer las modificaciones necesarias que lo lleven con certeza a la materia reclamada.

En este punto el Examinador indica que, de acuerdo con los ejemplos del Capítulo Descriptivo, el tiempo que requiere la etapa de acidificación depende del tamaño del biorreactor, ya que para un biorreactor de 20L el periodo de acidificación fue de 24 horas, mientras que para un biorreac-

tor de 2000L la etapa de acidificación se realizó durante 4 días (96 horas). Por otro lado, en D1 se emplean 3 biorreactores de 2000L para los cuales la etapa de acidificación se establece entre 5 y 30 días (Tabla 2).

Sin embargo, contrario a la observación del Examinador, el Capítulo Descriptivo claramente establece que el tiempo bajo el cual se somete el sustrato complejo a acidificación está en función del microorganismo a eliminar o reducir, del pH inicial del sustrato y de la cinética del descenso del pH. Es decir, en ningún momento se establece relación alguna entre el tiempo de la etapa de acidificación y el tamaño del reactor. Más aún D1 no enseña o siquiera sugiere la producción de hidrógeno en un reactor de 20 litros, mucho menos las condiciones que se requerirían para tal tamaño de reactor, las cuales únicamente están divulgadas en el Capítulo Descriptivo y en el Ejemplo 1 de la presente invención.

Adicionalmente, el Examinador argumenta que el Capítulo Descriptivo enseña que el proceso de fermentación puede realizarse con agitación, en cuyo caso velocidades entre 25 y 30 rpm son comúnmente usadas. Sin embargo, las enseñanzas de D1 son completamente contrarias, dado que este documento claramente enfatiza que en las pruebas realizadas la temperatura estuvo en el rango mesofílico, no se empleó inóculo y la fermentación se llevó a cabo sin agitación. Más aún, como el Examinador lo señala, el ejemplo en el que se emplea agitación es el realizado en el reactor de 20L, el cual, de nuevo, únicamente está divulgado en la presente invención, de tal manera que el arte previo citado no ofrece ninguna sugerencia o pista en el sentido de realizar la fermentación con agitación.

ii) Así, en vista de lo anteriormente expuesto, salta a la vista que en el momento de la realización del primer examen de fondo, el Examinador no fundamenta su análisis según lo estipulado en la Guía de

la SIC en cuanto a la evaluación del nivel inventivo, ya que ésta debe basarse únicamente en si existen sugerencias explícitas y suficientes en el arte previo que indicarían de manera clara cómo desarrollar de manera obvia las composiciones aquí reclamadas, las cuales, como se demostró anteriormente, no existen. En consecuencia, no es aceptable a quien examina o a quién concede o deniega una patente desvirtuar el nivel inventivo de la misma por desglosar sus elementos separadamente y luego buscar referencias en el estado del arte que los incluyan, como si de armar un rompecabezas con piezas aisladas, o una colcha de retazos, se tratara. En este caso particular, y contrario al análisis del Examinador, la única forma en que una persona medianamente versada en la materia podría llegar al proceso de la presente invención, sería al realizar un análisis en retrospectiva una vez conoce la invención aquí reclamada.

Sin embargo, el estudio de solicitudes de patente que conduzca a ese tipo de conclusiones anticipadas corresponde abiertamente a un análisis conocido en el ámbito de patentes como "análisis hindsight" o en retrospectiva. Para entender el análisis equivocado que realiza el Examinador, podemos citar nuevamente el MAP, que indica claramente que *"...la búsqueda de anterioridades se efectúa a posteriori, tomando como punto de partida la misma invención,...(La SIC) debe realizar el esfuerzo intelectual de colocarse en la situación que ha tenido que afrontar el técnico con conocimientos medios en la materia en un momento en que la invención no era conocida, es decir antes de la invención"*¹⁵ (mi subrayado). Por ende, no es apropiado anticiparse a los resultados presentados por la invención, ya que así, siempre resultará "*obvio*" todo objeto de una solicitud de patente, pues inevitablemente está parecerá derivada de la teoría en que se basa su desarrollo, sin dar mayor importancia al trabajo, intelecto y creatividad involucrados en la invención para llegar a la solución del problema planteado en la solicitud.

¹⁵ Superintendencia de Industria y comercio, *óp. cit.*, sección 2.13.5

En este sentido, el Examinador no reconoce el nivel inventivo de la presente invención debido a una búsqueda acomodada y subjetiva de las características esenciales reclamadas en las enseñanzas de D1 y D2 (que no es el documento más cercano), sin considerar adecuadamente si el arte previo, entendido como un todo, comprende sugerencias claras y evidentes que guíen inequívocamente a la persona medianamente versada en la materia a obtener la presente invención de manera obvia. De hecho, el análisis en retrospectiva se hace evidente al considerar que D1 no solo enseña una fermentación sin agitación, sino que además no menciona o siquiera sugiere el uso de un bio-reactor de 20L ni las condiciones en las que se realizaría el proceso en dicho bio-reactor, las cuales únicamente se encuentran divulgadas en el Capítulo Descriptivo de la presente invención.

Contrario a lo que concluye el Examinador, el arte previo citado no le permitiría a la persona medianamente versada en la materia desarrollar de manera obvia y evidente el proceso de la presente invención, pues esta persona encontraría obstáculos sin superar ni responder por el arte previo citado. Aunque el documento citado por el Examinador divulga procesos similares al de la presente invención, no proporciona enseñanzas que le indicarían a la persona medianamente versada en la materia cómo desarrollar un proceso de fermentación anaerobia más eficiente y con mayor producción de hidrógeno. Por el contrario, a partir de las enseñanzas de D1, la persona medianamente versada en la materia realizaría un proceso con una etapa de acidificación entre 8 y 30 días, con adición de agentes químicos y una fermentación sin agitación.

iii) En este punto me permito llamar la atención sobre los indicios de nivel inventivo establecidos en la Guía de la SIC y en el MAP,

que señalan que la simplicidad (reemplazo de procedimientos complicados por versiones más simples) o sorprendente sencillez de la solución propuesta y la superación de dificultades no resueltas por las técnicas rutinarias, sin que ello produzca un efecto perjudicial, como ocurre en el presente caso, con una etapa de acidificación que no requiere ningún tipo de intervención y que no obstante su simplicidad permite iniciar la producción de hidrógeno en menor tiempo que procesos más complejos, son indicios de nivel inventivo.

Así, una persona medianamente versada en la materia a partir de las enseñanzas de D1, lo único que lograría obtener sería un proceso en el cual la producción efectiva de hidrógeno comienza a partir del quinto día, contrario a 12 a 72 horas, con preferencia 24 horas, como en el proceso reclamado.

Por lo anterior, la solución de diseñar un proceso donde la etapa de acidificación ocurre sin ningún tipo de intervención, en un período de entre 12 y 72 horas, no estaba considerada ni sugerida individualmente por el documento citado, ni se llega a este a partir del mismo.

iv) Así las cosas, y a la luz de las evidentes diferencias encontradas entre la materia reclamada en la solicitud frente al arte previo citado, vale la pena señalar que de acuerdo con el MAP, las invenciones en el campo de la química (ingeniería química) tienen nivel inventivo cuando la materia reclamada tiene características estructurales inesperadas (no derivables por la persona medianamente versada en la materia) o cuando presentan un efecto técnico inesperado o mejorado impredecible del arte previo¹⁶. Por tales razones, nada en el arte previo sugiere ni enseña la materia de la presente invención, por lo que ésta reviste nivel inventivo sobre el arte previo citado. De manera similar, la Guía de la SIC establece

¹⁶ *Íbidem*. Sección 2.13.5.3.1

que, para que una invención no resulte inventiva “*el conjunto de enseñanzas del estado de la técnica lo llevarían* (a la persona medianamente versada en la materia) *de forma inmediata a la solución propuesta por la solicitud. Si se requiere de pasos adicionales o de corroboración o de superar obstáculos revelados por las propias enseñanzas entonces el estado de la técnica no revela la solución al problema*”¹⁷ (énfasis fuera del texto).

En el presente caso, la persona medianamente versada en la materia no se habría visto motivada de manera obvia y evidente a desarrollar el proceso de la presente invención, en tanto D1 no guiaría a dicha persona a reducir el tiempo de la acidificación y hacerlo sin incluir ningún tipo de intervención.

En conclusión, según la aproximación problema-solución utilizada anteriormente, la presente invención es inventiva a la luz del arte previo citado, pues siguiendo las enseñanzas de D1 la persona medianamente versada en la materia no obtendría el proceso reclamado, ni podría esperar que este tuviera los resultados que en efecto reviste.

5. a- El Examinador indica que el título de la presente invención es general y no menciona el tipo de proceso para la producción de hidrógeno.

b- De acuerdo con la amable sugerencia del Examinador, el título de la solicitud se ha modificado como sigue:

“PROCESO PARA PRODUCIR HIDRÓGENO MEDIANTE FERMENTACIÓN ANAERÓBICA, OSCURA DE RESIDUOS ORGÁNICOS”.

¹⁷ Íbidem. Sección 2.13.2

6. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por el Examinador en su primer examen de fondo han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tenga por cumplidos los requisitos de patentabilidad y proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,


PATRICIA ARROYAVE FRANCO
Abogada apoderada
C.C. 43.260.140 de Medellín
T.P. 131.871


V.B. CLAUDIA PATRICIA GARCIA GARCIA
Directora Investigación y Extensión
Sede Medellín

Anexos:

Capítulo Reivindicatorio Modificado;

Anexo 1. Reporte proyecto de investigación titulado *“Elaboración de un protocolo que permita la determinación por HPLC de carbohidratos y ácidos orgánicos presentes en una matriz compleja proveniente de un proceso de fermentación anaerobia de residuos orgánicos orientado a la generación de biohidrógeno”*, código 19522, convocatoria interna Universidad Nacional de Colombia. 2013–2015.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO
(Primer Examen de Fondo)

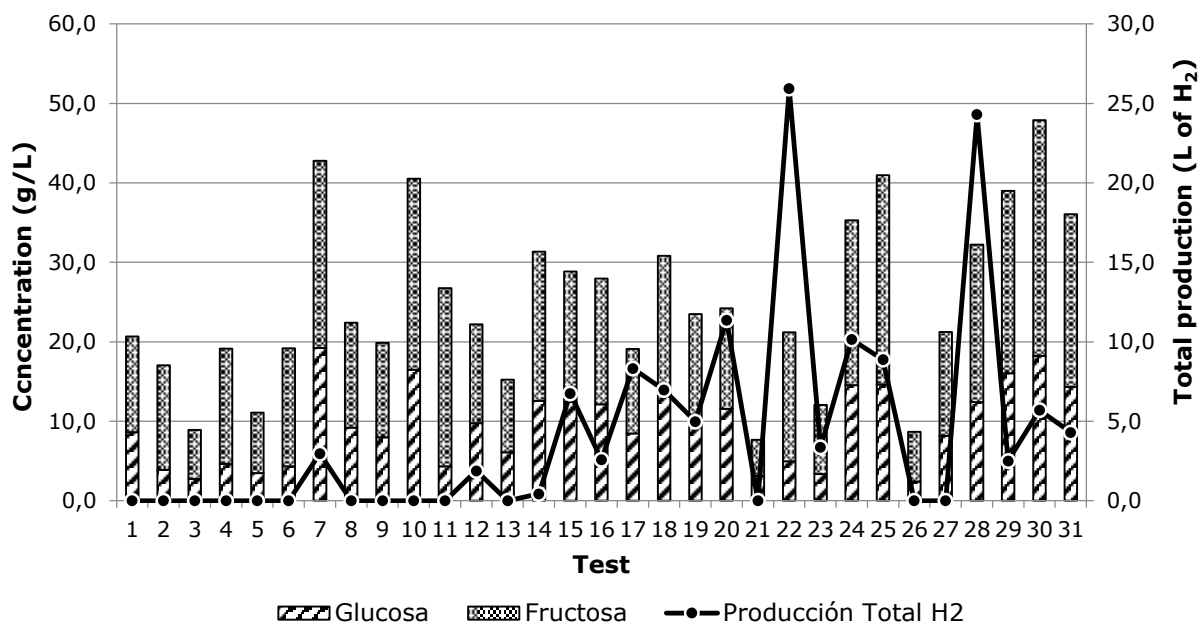
1. Un proceso para la producción de hidrógeno por fermentación de residuos orgánicos en un entorno cerrado, sin suministro de oxígeno y en ausencia de luz, que comprende las siguientes etapas:
 - a) preparar un sustrato complejo que comprende carbohidratos, proteínas, lípidos, almidón, celulosa y hemicelulosa;
 - b) someter dicho sustrato complejo a acidificación, sin intervención, entre 12 y 72 horas, hasta alcanzar un pH entre 3,0 y 5,0;
 - c) adicionar un agente alcalinizante escalonadamente, hasta alcanzar un pH entre 5,0 y 6,5 a condiciones ambientales;
 - d) obtener el hidrógeno.
2. El proceso según la Reivindicación 1, donde el sustrato complejo se prepara por trituración y/o molienda de residuos orgánicos.
3. El proceso según la Reivindicación 1, donde los carbohidratos comprenden polisacáridos, disacáridos o monosacáridos tipo glucosa y fructosa.
4. El proceso según la Reivindicación 1, donde el sustrato complejo tiene valores de demanda química de oxígeno (DQO) entre 20 y 100g de O₂/L y de sólidos volátiles totales (SVT) entre 10 y 100g/L.
5. El proceso según la Reivindicación 1, en donde el agente alcalinizante se selecciona del grupo que consiste de cal agrícola, óxido de calcio, hidróxido de sodio (NaOH), bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y sus combinaciones.
6. El proceso según la Reivindicación 1, donde el agente alcalinizante es cal agrícola.
7. El proceso según la Reivindicación 1, donde en la etapa c) las condiciones ambientales son temperatura entre 30 y 40°C y agitación entre 30 y 45 rpm.
8. El proceso según la Reivindicación 1, donde las etapas b) y c) se realizan en el mismo bioreactor o en bioreactores diferentes, operados en forma continua o discontinua y con o sin la presencia de agitadores.

Elaboración de un protocolo que permita la determinación por HPLC de carbohidratos y ácidos orgánicos presentes en una matriz compleja proveniente de un proceso de fermentación anaerobia de residuos orgánicos orientado a la generación de biohidrógeno

Table 1. Duration of acidification stage.

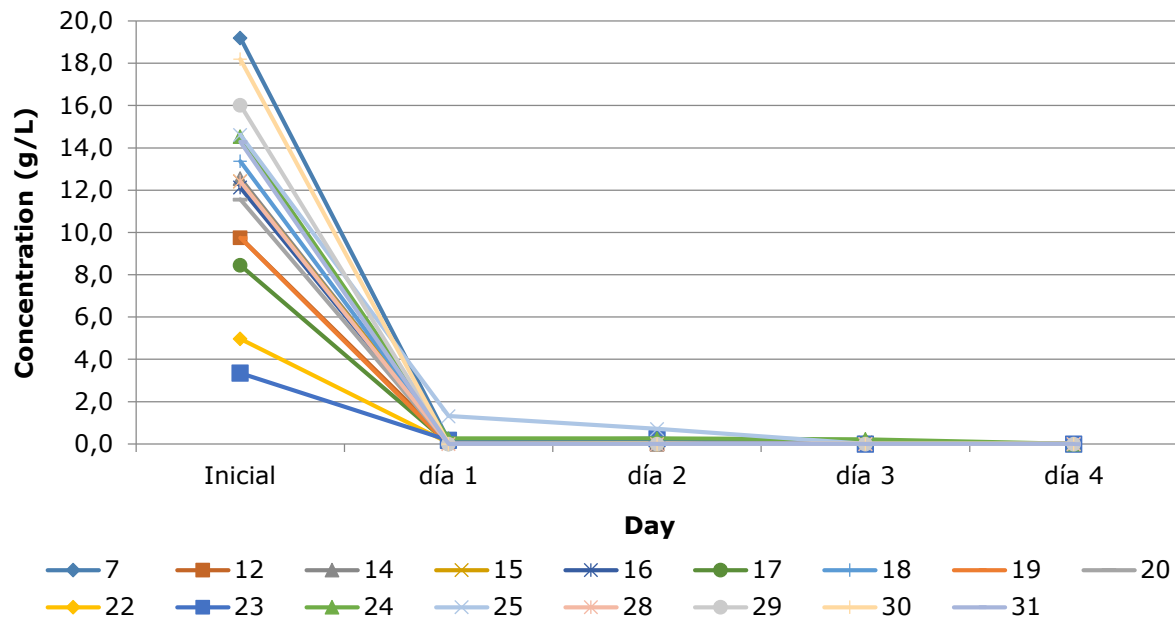
Test	Tacn (days)	Tacn (hours)
1	2	48
2	3	72
3	3	72
4	1	24
5	1	24
6	3	72
7	1	24
8	1	24
9	3	72
10	3	72
11	1	24
12	1	24
13	3	72
14	2	48
15	2	48
16	2	48
17	2	48
18	2	48
19	2	48
20	2	48
21	1	24
22	1	24
23	3	72
24	3	72
25	2	48
26	0	0
27	3	72
28	1	24
29	1	24
30	3	72
31	3	72

Figure 2. Hydrogen production and initial concentration of sugars (hexoses) in the tests.

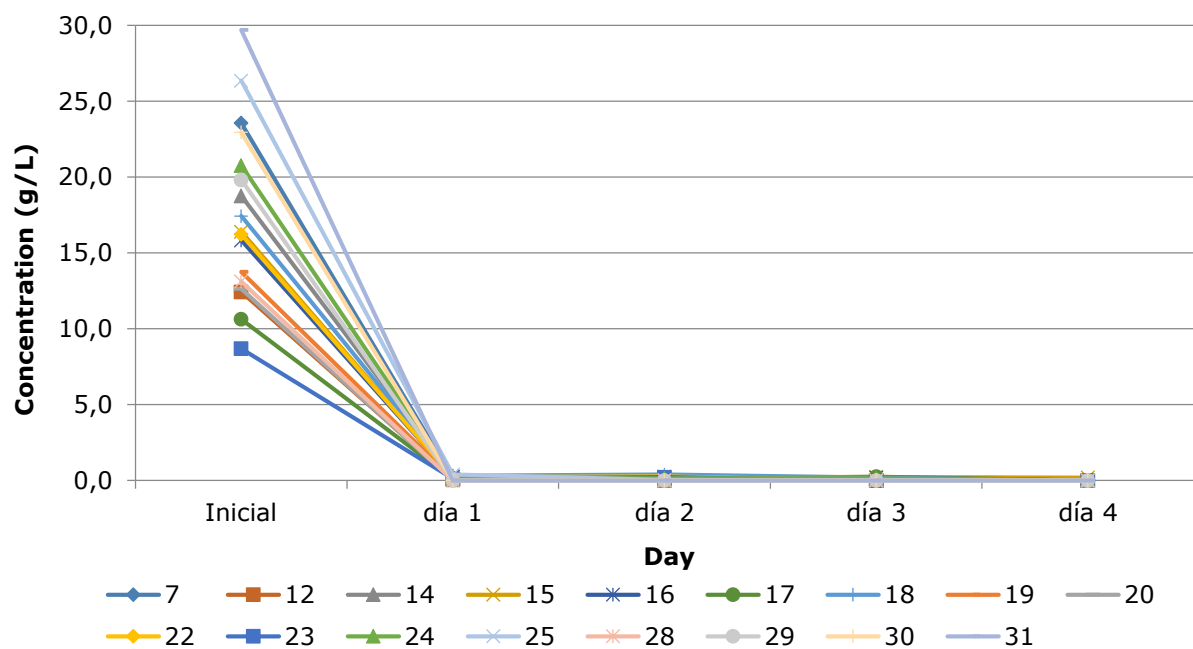


The consumption of glucose and fructose in the tests where hydrogen was generated (Figure 3) indicate that by the first day of gas production, both had already been consumed. Therefore, these were not taken as a substrate for the hydrogen generation but consumed in stage 2 during the natural acidification by non-hydrogen producing microorganism, regardless of its duration (between 1 and 4 days). In test 26 there was no stage 2 (ACT = 0 days), in it, lime was added from the beginning of the fermentation, making the sugars available for the hydrogen-producing microorganisms, however, the gas was not generated.

Figure 3. Performance of glucose (a) and fructose (b) in the tests where hydrogen was generated.



(a)

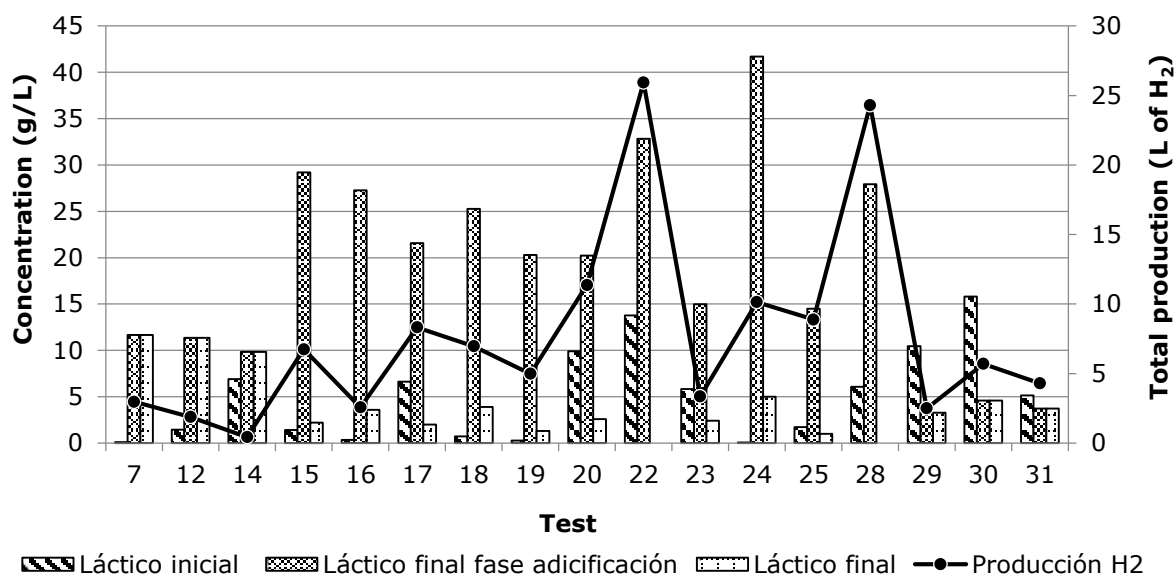


(b)

Performance of acids. The main acids detected were lactic, acetic, propionic and butyric. In general, lactic acid showed an increase in stage 2 during the natural acidification of the substrate (Figure 4). Afterward, in those tests where hydrogen was generated, its concentration decreased until the production stopped. The increase in the lactic acid concentration

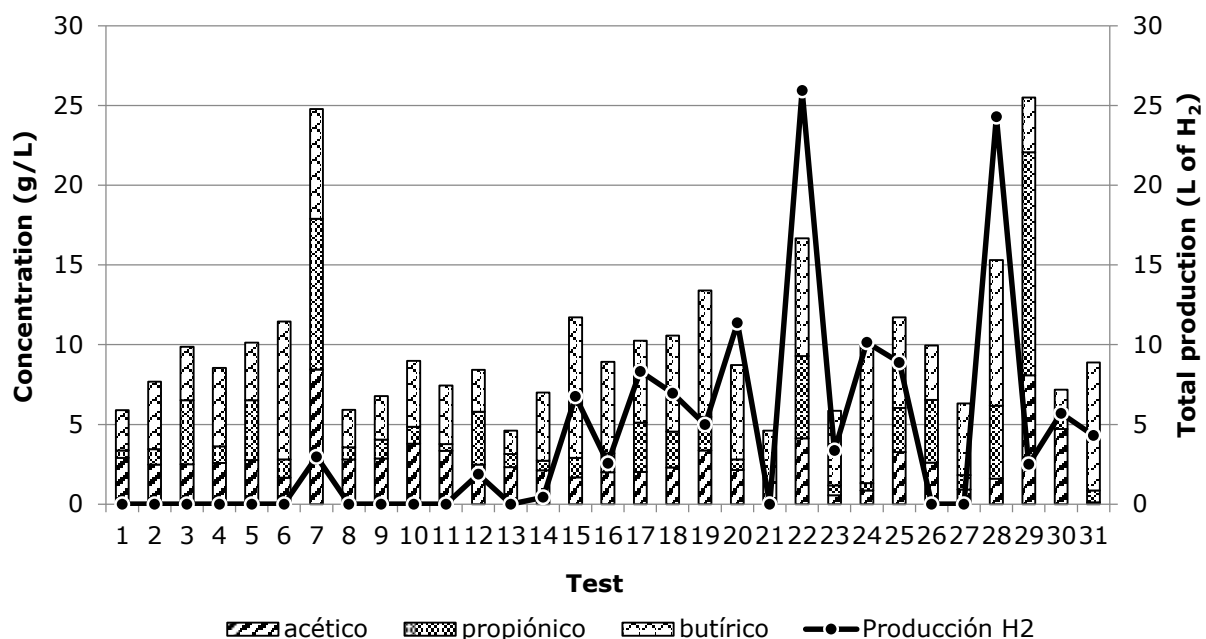
and the small variation of acetic, propionic and butyric during the natural acidification in stage 2, coincides with the complete consumption of hexoses, which would indicate that these sugars were used in this stage primarily to generate lactic acid without producing hydrogen.

Figure 4. Performance of lactic acid at the beginning and end of the acidification phase, and at the end of the fermentation.



In the tests where hydrogen was generated, the acid with the highest concentration at the end of the fermentation was butyric acid, except for test 30, where the acid with the highest concentration was acetic acid (Figure 5). In general, acetic acid slightly increased its concentration in all the tests where hydrogen was produced. A different situation occurred for butyric acid given that for most of the fermentations and as a general rule, its concentration vastly increased every day with the generation of hydrogen. In tests 7 and 29, the predominant acid was propionic, which explains their low hydrogen production. The high concentration of this acid can be attributed to the temperature of the fermentation tests, which was of 40 °C, under these conditions some bacteria adopt the propionic pathway in which hydrogen is not produced (Li *et al.*, 2014; Rosa *et al.*, 2016).

Figure 5. Concentration of organic acids at the end of the fermentations.



Performance indicators and metabolic pathways in fermentation tests

The maximum conversion efficiency of hexoses to lactic acid was 1.9 mol lactic acid/mol hexose (Table 4). When homolactic bacteria are found in acidic environments, rich in nutrients and at Mesolithic temperature, they use the Embden-Meyerhof-Parnas pathway to form lactic acid from glucose with a conversion percentage greater than 85% (Parra, 2010) and a theoretical yield of 2 moles of lactic acid/hexose mole (Equation 9, thermodynamically favorable reaction, Saady, 2013). The yield in the fermentation with the higher hydrogen production (assay 22) was of 1.8, which represents a conversion efficiency of 90%; this indicates that during the natural acidification stage, the hexoses were transformed mainly into lactic acid following the homolactic pathway.

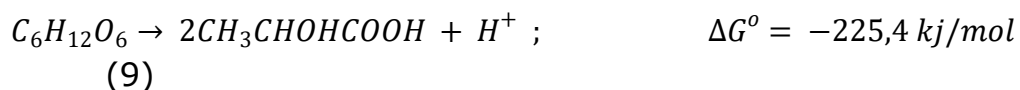


Table 4. Process indicator of the process yields and predominant metabolic pathway.

Test	Ylac-hex (mol lactic acid/hexose mol)	Ylac (molH ₂ /mol lactic acid)	Yhex (molH ₂ /hexose)	Ratio AA/AB
7	0.5	0.2	0.1	1.8
12	0.9	0.1	0.1	1.4
14	0.2	0.1	0.02	0.7
15	1.9	0.2	0.3	0.3
16	1.9	0.1	0.1	0.5
17	1.6	0.4	0.6	0.6
18	1.6	0.2	0.3	0.6
19	1.7	0.2	0.3	0.6
20	0.9	0.7	0.6	0.5
22	1.8	0.9	1.6	0.6
23	1.5	0.3	0.4	0.2
24	1.7	0.2	0.4	0.1
25	0.9	0.3	0.3	0.8
28	1.4	0.8	0.8	0.3
29	0.2	0.4	0.1	3.5
30	0.2	0.8	0.2	6.0
31	0.2	0.8	0.3	0.02

During the hydrogen production stage, four metabolic pathways were detected as follows:

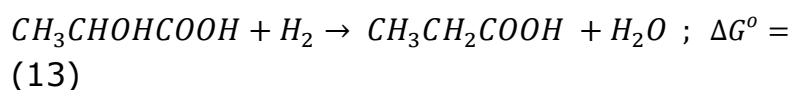
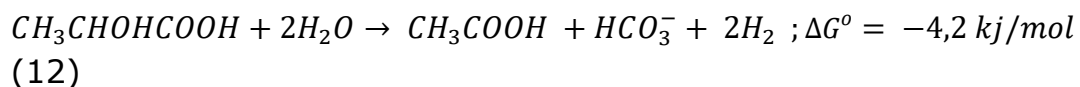
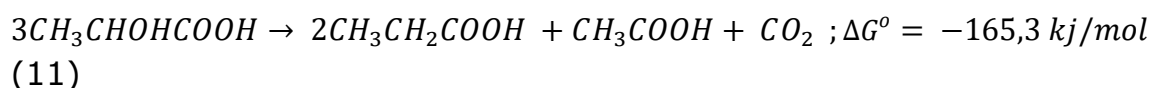
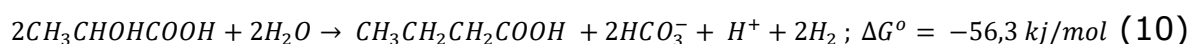
Lactic acid to butyric acid pathway. In this pathway, lactic acid is used to generate hydrogen and butyric acid, with a maximum theoretical yield of 1 mol H₂/mol lactic acid (Equation 10, Saady, 2013). This indicates that in those tests where butyric acid was the predominant metabolite, hydrogen was generated following this metabolic pathway. Such was the case in test 22 where the maximum hydrogen production was reached, in it, its yield was of 0.9 mol H₂/mol of lactic acid (Table 4), which represents a conversion efficiency of 90%.

Lactic acid to acetic acid pathway, homoacetogenesis. In it, lactic acid is used to generate acetic and propionic acid with hydrogen consumption (Equation 11). This pathway may explain why in some of the tests no hydrogen was generated despite detecting both acetic and propionic acid at the same time (tests 1 to 6 and 8 to 11).

Lactic acid to acetic acid pathway, acetogenesis. Unlike the previous one, in this pathway acetic acid is formed and hydrogen is produced (Equation

12). This pathway may have been present in several tests where hydrogen was generated but especially in test 30 since the main metabolite identified in it was acetic acid.

Lactic acid to propionic acid pathway. This pathway consumes lactic acid to form propionic acid without generating hydrogen (Equation 13), it could have occurred in tests 1 to 6 and 8 to 11.



Only in the tests with the highest hydrogen production (22 and 28) lactic acid was consumed in its entirety, in them the largest number of metabolic pathways was identified. It was in test 22 that the maximum conversion efficiency of hexoses to hydrogen was reached, 1.6 moles of H₂/mole of glucose; this value is considered high, given that if the predominant acid is butyric, the theoretical maximum yield is of 2 moles of H₂/mole of hexose, however it is usually less than 1.5 (Whang *et al.*, 2011; Plangklang *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2014; Dahiya *et al.*, 2015).

In the test with the highest hydrogen production (22) only the butyric acid increased during the first two days of production (equation 10 pathway), meaning that hydrogen was generated only through the butyric pathway. By the third and fourth day, the concentration of said acid remained stable, close to 10 g/L. However, on the third day, the hydrogen production continued, and an increase only in the concentration of acetic acid was detected (equation 12 pathway), completely depleting the lactic acid. This may indicate that the combination of these pathways in a sequential manner (first lactic-butyric and then lactic-acetic), allowed greater use of hexoses with respect to other pathways where hydrogen-producing microorganisms take hexoses directly and generate butyric acid or acetic acid.

The value of the ratio between acetic and butyric acid for tests 7, 12, 29 and 30 was greater than 0.79 (Table 4) indicating that hydrogen could have been generated through an acetic acid metabolic pathway (Robledo-Narváez *et al.*, 2013). For the other tests where hydrogen was produced, the value of the AA/AB ratio was lower than 0.79; thereby hydrogen was generated by the predominance of the butyric acid metabolic pathway. However, it is emphasized that the maximum hydrogen production was reached for an AA/AB ratio of 0.6 (test 22), that is to say when both pathways contributed in a similar way to the gas generation.

Conclusions

The results obtained indicate that it was possible to produce hydrogen by dark fermentation of organic residues in co-digestion, in a mesophilic environment, without sterilizing the substrates or using any type of inoculum. Stage 2 the natural acidification of the substrate without intervention allowed glucose and fructose to be consumed, generating lactic acid as the main metabolite following a homolactic metabolic pathway. Therefore, the real substrate used by microorganisms to produce hydrogen was lactic acid instead of hexoses. The highest values in hydrogen production and efficiency coincide with the presence of two different but sequential metabolic pathways, where the first days, hydrogen was generated through a butyric metabolic pathway from lactic acid and the final days through an acetic acid metabolic route also using the remaining lactic acid as a substrate, until it was consumed in its entirety. The fermentation conditions under which the above occurred were an organic load around 60,000 mg of O₂/L, a substrate ratio of 80:20 (fresh mucilage: fruit-vegetable waste), a temperature of 30 °C, an acidification time of 1 day and a final fermentation pH of 6.5.

Acknowledgment. The authors wish to thank the Universidad Nacional de Colombia for funding the research.