

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 642**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2014 PCT/BR2014/000300**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15027306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2014 E 14761782 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3041943**

54 Título: **Procedimiento para fermentación microbiana de sustratos azucarados (mosto) mediante el uso de hidrógeno**

30 Prioridad:

02.09.2013 BR 102013022434

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

03.03.2020

73 Titular/es:

**MAHLE METAL LEVE S/A (33.3%)
Rodovia Anhanguera, Sentido Interior - capital
Km 49, 7
13210-877 Jundiaí, SP, BR;
LSDATA PLM SOFTWARE LTDA. - ME (33.3%) y
ADVEL TECNOLOGIA E COMÉRCIO LTDA. EPP
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**LOURENÇO, ANTONIO PEDRO;
KAWAKAMI, MASAYUKI y
LOPES, JOSÉ FRANCISCO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 745 642 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para fermentación microbiana de sustratos azucarados (mosto) mediante el uso de hidrógeno

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento bioquímico para aumentar de manera selectiva la producción de alcohol a través de la fermentación microbiana de mosto.

10 Particularmente, se inoculan concentraciones adecuadas de hidrógeno en los microorganismos en el procedimiento, y esto puede tener lugar en un régimen de producción continuo, semicontinuo o discontinuo, comprendiendo dicho procedimiento mosto azucarado, un microorganismo seleccionado de un hongo y una bacteria, en suspensión o en un lecho inmovilizado en el mosto bajo un lecho de fermentación, y micronutrientes.

15 El hidrógeno se genera al aplicar voltaje eléctrico a al menos dos electrodos aplicados al mosto bajo fermentación.

Antecedentes de la invención

20 Los alcoholes son compuestos orgánicos que tienen el grupo hidroxilo funcional (-OH) unido a uno o más carbonos saturados, que contienen uno o más átomos de carbono. El compuesto más conocido de esta clase es etanol o alcohol etílico. Este último puede encontrarse en bebidas alcohólicas, en productos de limpieza, en productos farmacéuticos, tales como disolventes químicos y también en su aplicación más voluminosa como combustible para motores de combustión interna.

25 Más del 90% de etanol se produce en todo el mundo a partir de fermentación de azúcares procedentes de fuentes directas tales como caña de azúcar, melaza y pulpas de frutas, o se obtiene directamente mediante hidrólisis de almidón y celulosa. En estos grupos amiláceos, feculentos y celulósicos, se resalta una gran variedad de granos, tal como maíz, yuca, otros tubérculos, sorgo, trigo, cebada, bagazo de caña de azúcar, patata, suero de leche, etc.

30 La fabricación de etanol mediante fermentación y destilación se divide básicamente en 4 fases: preparación del material de partida o sacarificación, licuefacción, fermentación y destilación. Para la producción de vino y cerveza no hay fase de destilación. La preparación del material de partida, tal como molienda, trituración y lixiviación, comprende hacer pasar la fuente de azúcar, almidón o celulosa a través de procesadores. En la segunda fase, se obtienen sustratos diluidos que pueden o bien procesarse en la fermentación o bien hacerlos pasar a través de otro procesamiento intermedio de rompimiento de las cadenas amiláceas o celulósicas en moléculas de azúcar por efecto de hidrólisis. Se conduce el mosto o zumo azucarado obtenido a fermentación.

35 La fase de fermentación comprende añadir microorganismos, hongos o bacterias, que transforman los azúcares en alcohol mediante varias reacciones enzimáticas. Tras este procedimiento, a escalas industriales, que se caracterizan por periodos de fermentación tal como se muestra en la tabla 1, se obtiene el mosto fermentado o el vino.

Tabla 1 – Periodos típicos de procedimientos para fermentaciones alcohólicas	
Vino	Semanas
Cerveza	Semanas
Alcohol – producción genérica	Desde 10 horas hasta unos pocos días
Alcohol combustible - Brasil	Desde 4 hasta 12 horas

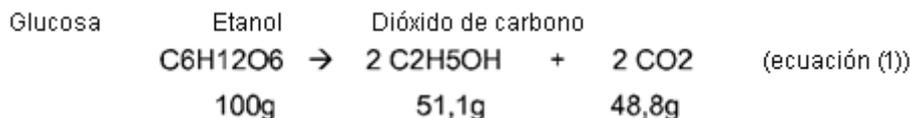
45 Entonces el vino sigue para la cuarta y última etapa, la destilación fraccionada, dando lugar a alcohol anhidro o hidratado, dependiendo de las características deseadas y empleadas del procedimiento de destilación y deshidratación.

50 La etapa que afecta el resultado de la producción de alcohol más directamente y, por tanto, uno de los más estudiados es la fermentación, denominada también fermentación alcohólica o etílica, en el caso de la “ruta etílica” (ruta glicolítica), que es el procedimiento bioquímico de transformación de azúcares tales como polisacáridos y monosacáridos tales como triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, entre ellos se destacan sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, en alcohol. En este procedimiento, participan los microorganismos que son responsables de conversión de azúcares en moléculas de ácido pirúvico o piruvato, en varias reacciones enzimáticas intracelulares, habitualmente denominadas ruta glicolítica. Posteriormente, en condiciones anaeróbicas, dos otras reacciones enzimáticas tienen lugar, que caracterizan el procedimiento fermentativo. La primera reacción, se realiza descarboxilación del piruvato por la enzima piruvato descarboxilasa, por medio de la cual el grupo carboxilo se elimina de la molécula de piruvato, convirtiéndola a molécula de acetaldehído, con liberación de dióxido de carbono. La segunda reacción es la reducción de acetaldehído a etanol, realizada por la enzima alcohol deshidrogenasa, completando la reacción fermentativa apropiada.

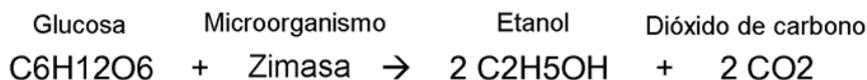
En general, los procedimientos fermentativos se caracterizan porque combinan sustratos, tipos y cepas de microorganismos y condiciones de operación especialmente adecuadas, con el fin de maximizar el rendimiento del procedimiento y características especiales que van a transferirse al mosto bajo fermentación, puesto que se somete a diversas condiciones, tanto a condiciones de activación como de inhibición de fermentación, con la consiguiente interferencia en la eficiencia y en la calidad del procedimiento en sí.

Rendimiento del procedimiento fermentativo

- 10 Las principales características que caracterizan todas las reacciones, independientemente de que sean químicas o enzimáticas, son las relacionadas con los factores de conversión, o más específicamente con las eficiencias o rendimientos de estas conversiones. Al evolucionar desde la concepción de la teoría de la generación espontánea, se ha sometido la fermentación alcohólica a evaluaciones experimentales y consideraciones teóricas, siendo considerada como uno de los procedimientos más exitosos por la técnica anterior. Junto con la naturaleza celular de los microorganismos, principalmente de hongos, como organismos unicelulares eucariotas, como las células de naturaleza animal, se han privilegiado el estudio y el entendimiento de los mismos como medios de fácil acceso experimental, en los procedimientos respiratorios aeróbicos y anaeróbicos, siendo este último conocido también como fermentación alcohólica y láctica, y se desarrolla libremente.
- 15
- 20 En 1810, Louis Joseph Gay-Lussac formuló la ecuación estequiométrica que relaciona la producción de etanol y dióxido de carbono a partir de la fermentación alcohólica de glucosa, que se conoce hasta la fecha como:



25 En 1863, Louis Pasteur introdujo el concepto y acción de microorganismos responsables de la conversión de glucosa (monosacárido) a etanol y dióxido de carbono. Treinta y cuatro años más tarde, en 1897, Eduard Buchner fermentó el azúcar en el laboratorio sin usar microorganismos vivos, introduciendo el concepto de acción enzimática del procedimiento fermentativo, ilustrado a continuación:

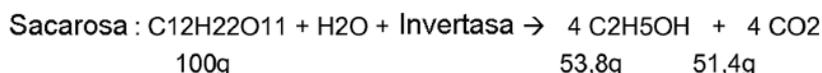
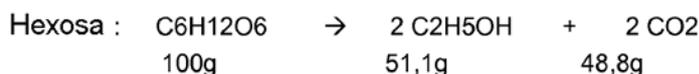
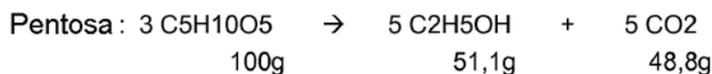


30 Zimasa se refiere a un complejo enzimático que cataliza la fermentación de azúcar en etanol y dióxido de carbono. Por tanto, Buchner presentó la hipótesis de que las células de levadura secretaron proteínas en el medio, provocando la fermentación del azúcar. Después, se demostró que estas reacciones de fermentación tuvieron lugar dentro de la célula de levadura. Todo este desarrollo está de acuerdo con la naturaleza de la eficiencia o rendimiento de la transformación de azúcares en alcohol, mediante la verificación que, en las condiciones de fermentación natural, una molécula de glucosa podría producir hasta dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono. Este entendimiento se conoce como rendimiento Gay-Lussac (G-L), siendo que su valor máximo en la fermentación de glucosa es del 51,1% (masa/masa). Las figuras 1 y 2 ilustran la secuencia de reacciones y el rendimiento masivo máximo en la fermentación de glucosa. Para fines de comparación, las ecuaciones simplificadas para los rendimientos del procedimiento fermentativo de pentosas, hexosas y disacárido (sacarosa) se muestran a continuación.

35

40

El disacárido sacarosa es el azúcar predominante en la caña de azúcar.



45 Invertasa se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de sacarosa en hexosas, fructosa y glucosa, la mezcla de ellos también se denomina jarabe de azúcar invertido. En la industria del alcohol por fermentación de azúcares, la búsqueda por mayores rendimientos del procedimiento es una constante, que implica experimentos y estudios complejos y completos en los dominios fisicoquímicos y biológicos. De manera general, se puede escribir la ecuación para el tratamiento completo del procedimiento de fermentación alcohólica desde el punto de vista de la eficiencia o rendimiento alcohólico tal como sigue:

50

ES 2 745 642 T3



En el presente documento se entiende como rendimiento real máximo o cociente entre la concentración de etanol producido [Etanol] por la concentración de azúcar [Azúcar] consumido en la conversión.

5

Durante el procedimiento de fermentación, diversos microorganismos pueden contribuir para el consumo de azúcar, tal como levadura, distinto de hongos y bacterias. Estos microorganismos consumen el sustrato azucarado para el crecimiento celular de las especies y también en la producción de subproductos tales como ácidos y alcoholes superiores, convirtiendo procedimientos parasitarios y provocando reducciones en el rendimiento de la fermentación.

10

En 1937, Firmin Boinot patentó en Francia y en 1941 obtuvo la patente US 2.230.318 para un procedimiento de llevar a cabo fermentaciones alcohólicas industriales. En los años treinta este procedimiento llegó en Brasil, contribuyendo notablemente al aumento del rendimiento de la fermentación, que ahora se extiende en el mundo y se conoce por el nombre de procedimiento Melle-Boinot, y se aplica principalmente pero no exclusivamente a fermentaciones con levadura. Un mérito de este procedimiento es la reducción concurrente directa de azúcar, proporcionada por la reutilización de los microorganismos y por el tratamiento y recirculación de los mismos, por separación centrífuga, seguido por un tratamiento ácidos durante periodos 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. Tras este tratamiento, la leche de la levadura, como se denomina la levadura centrifugada, se concentra y se trata, y se regresa al procedimiento. Esta operación puede provocar un consumo de azúcar reducido hasta menos del 1% (uno por ciento) del azúcar disponible.

15

20

El dióxido de carbono como el producto liberado en la descarboxilación de piruvato se considera como un producto paralelo del procedimiento fermentativo.

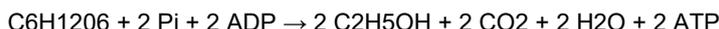
25

Además de los subproductos resultantes de los procedimientos parasitarios, tal como se discutió anteriormente, se generan otros productos durante la fermentación alcohólica, tal como: glicerol, ácidos orgánicos (ácidos succínicos, acéticos, pirúvicos, y otros) y alcoholes superiores, acetaldehído, acetoína, butilenglicol y otros compuestos. Se estima que se consume desde el 3% hasta el 5% (desde el tres hasta el cinco por ciento) del azúcar disponible en el procedimiento en estas conversiones.

30

En términos energéticos, de manera ilustrativa, en condiciones de anaerobiosis, las levaduras desvían su metabolismo para la fermentación alcohólica, siendo el etanol y el dióxido de carbono los únicos dos excrementos de todo el procedimiento. Por tanto, resulta que:

35



($\Delta G_0 = -56 \text{ kcal/mol}$)

40

Por otro lado, en condiciones de aerobiosis, particularmente en la fase de multiplicación celular, la levadura realiza 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 (Adenosina Trifosfato) (los medios de intercambio energético) diecinueve veces mayor que la obtenida en la fermentación alcohólica, tal como se ilustra a continuación:

45



($\Delta G_0 = -686 \text{ kcal/mol}$)

50

Aun se toman muchas acciones durante el procedimiento de fermentación, como iniciativas para reducir el consumo de azúcares en procedimientos parasitarios y subproductos no deseados. El control del pH y la temperatura del mosto bajo fermentación, así como el control de micronutrientes y contaminantes presentes, son variables que asumen posiciones importantes en el procedimiento y pueden estimular o inhibir la dinámica bioquímica.

55

El pH bajo del medio ($\text{pH} < 4,0$), particularmente asociado a altas temperaturas de operación $T_{op} > 38^\circ\text{C}$, demuestra ser el factor de mayor interés fisiológico para la levadura obtenida y se usa como unidades de producción industrial de etanol, en comparación con otros inhibidores, tales como sulfito, ácido láctico, contenido alcohólico y altas concentraciones de azúcares. El pH 4,5 del mosto, con temperatura que oscila desde 20°C hasta 37°C , permite la protección frente a los factores de estrés, y se obtiene una mayor viabilidad celular, brotación, rendimiento alcohólico, morfología regular de las levaduras, disminución en el azúcar residual y menor liberación de aminoácidos en el medio, proporcionando mejor eficiencia alcohólica y estabilidad del procedimiento.

60

En cuanto a la nutrición, la levadura es un microorganismo heterotrófico, que se alimenta mediante absorción. Los principales nutrientes, necesarios para el desarrollo de las levaduras, de modo que una fermentación satisfactoria pueda tener lugar, son: (i) nitrógeno, un elemento de transformación de plásticos, importante para el crecimiento de la levadura; (ii) fósforo, elemento de translocación de energía, en ausencia del mismo no tendrá lugar la

65

fermentación; (iii) potasio, (iv) magnesio; (v) zinc; (vi) manganeso, todos de ellos son importantes en las reacciones enzimáticas; vitaminas del complejo B, que son aceleradores de fermentación, además de la presencia de otras sales, tales como cobalto, cobre, azufre, boro, que se denominan como micronutrientes.

5 La levadura también es un microorganismo saprófito, que requiere una fuente de carbono elaborada, glucosa u otro azúcar, que suministre energía química y el esqueleto carbónico de sus estructuras celulares, constituidas de manera predominante por carbono, oxígeno e hidrógeno. También se demandan algunas vitaminas, tales como tiamina y ácido pantoténico.

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

15 Puesto que la forma amoniacal es la principal, en ausencia de la misma, la levadura busca por otras formas, tales como aminoácidos, provocando de ese modo un aumento en la producción de componentes secundarios, tales como alcoholes isoamílico, amílico, propílico, isopropílico, butílico, isobutílico. El fósforo se absorbe en forma de ion H_2PO_4^- , la forma predominante a pH 4,5, mientras que el azufre puede asimilarse del sulfato, sulfito o tiosulfato. Con el uso de ácido sulfúrico en el tratamiento de levadura, sin embargo, tal como se presentó anteriormente, o en el uso de melaza en mosto mixto, se evita el uso adicional de azufre, que es letal para el microorganismo cuando se usa en exceso, ya que el presente azufre demuestra ser suficiente para el procedimiento. Partiendo de una base de lo anterior y considerando, por ejemplo, el rendimiento de la fermentación alcohólica con sustrato de glucosa o con azúcares directamente fermentable, en el rendimiento G-L másico teórico máximo de 0,511 masa/masa, según la ecuación (1), como siendo el 100% de rendimiento teórico máximo, el rendimiento fermentativo del procedimiento real puede alcanzar valores máximos que oscilan desde el 92% hasta el 94% y, además, en los ambientes productivos más asépticos y controlados. En unidades de menor control y asepsia, este valor puede ser inferior al 85%, lo que significa pérdidas considerables en el procedimiento productivo.

20 En este sentido, se busca de manera continua todos y cada aumento en eficiencia, enfocándose en controles operacionales mejorados y adecuados, cepas y naturalezas de microorganismo, seleccionados, combinados y modificados, con mayor productividad y más resistencias del procedimiento. Los aumentos en el rendimiento fermentativo del 0,1% al 0,5% ya justifican inversiones considerables, con el fin de los altos volúmenes relacionados con la producción alcohólica en la industria.

25 Desarrollo de la técnica anterior

30 Se han desarrollado diversos métodos para mejorar el rendimiento de un procedimiento para la producción de etanol, tal como se ejemplifica a continuación en el presente documento:

35 El documento US 4.451.566 describe métodos y un aparato 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 disolución de azúcar fermentable se hace pasar 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 procedimiento habitual, el presente documento proporciona una disolución costosa, compleja y difícil de mantener.

40 La solicitud de patente WO 2007/064546 describe un procedimiento para mejorar el rendimiento de etanol, disminuir el tiempo de fermentación y reducir la formación de subproducto mediante monitorización y control del potencial de oxi-reducción del fermentador. Sin embargo, este procedimiento requiere monitorización muy específica y difícil de mantener debido a los altos costes implicados, afectando la aplicación industrial de esta disolución.

45 La solicitud 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 puede producirse en un medio alcalino o ácido, y el campo magnético puede ser positivo o negativo. El método hace uso del campo magnético estático para proporcionar un ambiente más adecuado para la reproducción celular de los microorganismos. A pesar de aumentar el número de microorganismos en la fermentación alcohólica, aumentando de ese modo el rendimiento de la reacción, este procedimiento necesita monitorización constante y control total sobre la reacción, lo que hace excesivamente caro y, por tanto, económicamente inviable para la aplicación industrial.

50 La técnica anterior también da a conocer métodos para mejorar la eficiencia de la captura de carbono, tal como se describe en la patente US 8.377.665. Este método comprende fermentación bacteriana, usando sustratos gaseosos según la ruta Wood-Ljungdahl, que comprende una secuencia de reacciones enzimáticas que tienen lugar en líneas bacterianas.

55 Steinbusch *et al.*, Environmental Science and Technology, Vol. 44, 2010, páginas 513-517, dan a conocer un estudio sobre la producción de etanol bioelectroquímica a través de la reducción de acetato mediada por cultivos mixtos.

Nakanishi *et al.*, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 85, n.º 2, 250-253, 1998, dan a conocer un estudio sobre el efecto de corriente eléctrica en el crecimiento y producción de alcohol por célula de levaduras.

5 Aunque hay muchas referencias bibliográficas que describen procedimientos fermentativos para mejorar el rendimiento de la producción de etanol, la técnica anterior no describe específicamente la acción de hidrógeno en un procedimiento metabólico de fermentación para el fin de producción selectiva, este procedimiento que constituye una tecnología innovadora y original. Además, todos los procedimientos desarrollados han buscado el aumento en el rendimiento real hasta el límite teórico del rendimiento G-L.

10
Objetivos de la invención

La presente invención tiene el objetivo de mejorar un procedimiento para la fermentación microbiana de sustratos azucarados, mosto, que comprende la inoculación del hidrógeno en un microorganismo, seleccionado de un hongo y una bacteria, en suspensión o en un lecho inmovilizado en el mosto bajo fermentación.

El hidrógeno se genera al aplicar voltaje eléctrico a al menos dos electrodos aplicados al mosto bajo fermentación.

20 Un segundo objetivo de la invención consiste en usar hidrógeno en el estado iónico, atómico o gaseoso, o una mezcla de los mismos, para la inoculación en el microorganismo en un procedimiento de la invención.

Un tercer objetivo de la invención consiste en establecer un procedimiento bioquímico innovador para la producción selectiva de alcohol a través de la fermentación de azúcares, mosto, que comprende polisacáridos y monosacáridos tales como triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, destacándose sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, con mayor utilización de carbono y el consiguiente aumento en la producción selectiva de alcohol, superando el rendimiento teórico de G-L, y la reducción en la emisión de dióxido de carbono en la fermentación.

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

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

Un cuarto objetivo de la invención consiste en establecer un procedimiento efectivo y ambientalmente justificable, con 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 ambiente.

Un quinto objetivo de la invención consiste en retirar el límite de eficiencia para los niveles mayores, alterando el metabolismo celular de los microorganismos, sin alterarlos genéticamente.

40 En virtud de su simplicidad, economía y eficiencia, el procedimiento de la presente invención puede aplicarse en nuevas unidades industriales de producción, o implementarse en estructuras y unidades ya instaladas.

Breve descripción de la invención

45 La presente invención se refiere a un procedimiento, tal como se define en las reivindicaciones, para la fermentación microbiana de sustratos azucarados, que comprende la inoculación de hidrógeno en los microorganismos de los géneros de hongo o bacteria presentes en suspensión en el mosto bajo fermentación o en lecho inmovilizado, conteniendo dicho mosto bajo fermentación sustratos azucarados y micronutrientes.

50 La inoculación de hidrógeno en estado atómico, iónico o gaseoso en los microorganismos presentes en la fermentación tiene lugar por medio de al menos dos electrodos aplicados directamente al mosto bajo fermentación con aplicación de voltaje en régimen de pre-electrolisis o en electrolisis completa. Tal como se da a conocer adicionalmente, este gas hidrógeno también se produce fuera del biorreactor, a través de electrolisis del agua, y en este caso la inoculación de los microorganismos tiene lugar a través de chorro directamente en dicho biorreactor.

55 El control del hidrógeno en estado atómico, iónico o gaseoso tiene lugar por medio del voltaje aplicado a los electrodos actuando en el microorganismo bajo fermentación o en lecho inmovilizado, el voltaje en régimen de pre-electrolisis que oscila desde 0,1 V hasta 1,24 V, y el voltaje en régimen de electrolisis completa que oscila desde 1,24 V hasta 30 V, o bien en corriente continua o bien en corriente alterna, comprendiendo este último ciclos de 50 Hz a 100 Hz, desde 100 Hz hasta 500 Hz y desde 500 Hz hasta 1000 Hz.

60 La presente invención también se refiere al uso de hidrógeno en estado atómico, iónico o gaseoso o mezclas de los mismos, en un procedimiento tal como se define por las reivindicaciones, caracterizado porque es para la inoculación en los microorganismos presentes en un medio fermentativo que contiene sustratos azucarados, mosto, tal como polisacáridos y monosacáridos como triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, destacándose sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, para la producción selectiva de alcohol.

Por tanto, el procedimiento descrito en la presente invención consiste en modificar el límite de eficiencia másica de producción de alcohol para parámetros mayores, alterando el metabolismo celular de los microorganismos sin alterarlos genéticamente. La acción de reducción de hidrógeno, acoplada a su facilidad de penetración de las membranas celulares de los microorganismos, accediendo sus compartimentos internos, citoplasma, mitocondrias y orgánulos intracelulares proporcionan un procedimiento bioquímico innovador para la producción selectiva de alcohol a través de la fermentación de azúcares, provocando mejor uso del carbono, con el consiguiente aumento en el rendimiento alcohólico en la reacción de fermentación y reducción en el contenido de emisión de dióxido de carbono.

10 Descripción de las figuras

La figura 1 se refiere a la ruta glicolítica (glicólisis) de la técnica anterior, que tiene lugar en el citoplasma de un microorganismo o célula eucariota o procariota, en el procesamiento de glucosa, que comprende las últimas etapas de esta secuencia, la producción de piruvato;

La figura 2 esquematiza las reacciones de fermentación alcohólica implicadas en un procedimiento de la técnica anterior de fermentación en el que cada molécula de piruvato, a través de la piruvato descarboxilasa, experimenta liberación del carboxilo y la consiguiente liberación de una molécula de dióxido de carbono y una molécula de acetaldehído, transformándose esta última en etanol mediante la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa;

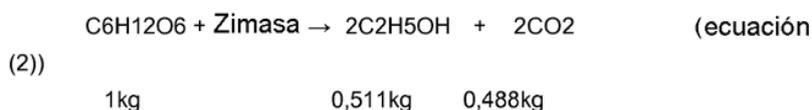
La figura 3 esquematiza las reacciones de fermentación implicadas en el procedimiento descrito por la presente invención, en el que la reducción del grupo carboxilo con el grupo hidroxilo, derivado por la descarboxilación de las dos moléculas de piruvato, por la enzima piruvato descarboxilasa, además de reductores equivalentes, preferiblemente reducidos por la elevación de la disponibilidad de hidrógeno, provocando la formación de una molécula de acetaldehído sintetizada a través del doble grupo carboxilo como el producto de una nueva ruta de fermentación alcohólica;

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

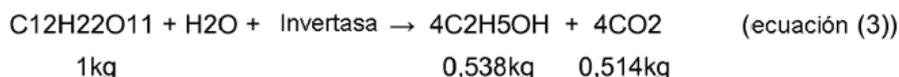
La figura 5 se refiere a un gráfico que contiene las mediciones logarítmicas de las curvas de rendimiento másico, aumento del porcentaje en el rendimiento másico y en las concentraciones en equivalentes molares para [H], [Etanol] y [CO₂] en la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Tal como se describió anteriormente, ya se conocen los procedimientos para la producción de alcohol a través de la fermentación de azúcares por los expertos en la técnica y se consideran universalmente, en sus límites de eficiencia, por la ecuación estequiométrica formulada por Gay-Lussac en 1810 (ecuación (1)). Según esta formulación, en la técnica anterior, una molécula de glucosa bajo fermentación puede producir, como máximo, 2 moléculas de alcohol etílico y 2 moléculas de dióxido de carbono, tal como se muestra en la ecuación (2).



A la inversa, considerando la fermentación a partir de sacarosa, sustancialmente presente en el azúcar de la caña de azúcar, se obtiene alternativamente la ecuación a continuación:



Puede observarse a partir de las ecuaciones (2) y (3) la condición de eficiencia másica máxima de 0,511 (m/m), masa/masa, en la fermentación de glucosa, y 0,538 m/m en la fermentación de sacarosa. Incluso por las disposiciones de ecuación más recientes, que consideran las acciones de reacciones enzimáticas, se ha considerado este límite en la evaluación de rendimiento global, en los procedimientos comprendidos por la técnica anterior.

Según la técnica anterior, en la ruta glicolítica, también denominada glicólisis, que es la secuencia de reacciones enzimáticas que tiene lugar en el citoplasma celular del microorganismo, que puede ser unicelular eucariota o procariota, en el procesamiento de glucosa (azúcar con seis átomos de carbono en la molécula), en las últimas etapas de esta secuencia hay producción de piruvato: (ion),



ácido, en la molécula de la cual hay 3 (tres) átomos de carbono, tal como se muestra en la figura 1. Por tanto, a partir de estas reacciones, dos moléculas de piruvato se originaron partiendo de una molécula de glucosa. Entonces, en régimen anaeróbico, en ausencia de oxígeno, la fermentación alcohólica tiene lugar. En este procedimiento fermentativo, de cada molécula de piruvato, a través de piruvato descarboxilasa, la liberación de carboxilo tiene lugar, 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 mediante la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, tal como se muestra en la figura 2. Estas reacciones enzimáticas son reversibles.

5

10 Por tanto, según la técnica anterior, existe la relación de producción máxima de dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono para cada molécula de azúcar de glucosa en el procedimiento de fermentación alcohólica, también denominada fermentación etílica.

Por tanto, la reducción del grupo carbo:

15



que se deriva de la unión del grupo carbonilo: (), 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 equivalente reductor - RE/ER, preferiblemente reducidos por la alta disponibilidad o abundancia de hidrógeno, da como resultado la formación de una molécula de acetaldehído sintetizada a través del doble grupo carboxilo, como el producto de una nueva ruta de fermentación alcohólica. Con la abundancia de hidrógeno, existe un aumento en la concentración de las enzimas NADH, NADPH y FADH2, entre otros importantes portadores de electrones en los procedimientos de óxido-reducción citoplasmático o mitocondrial. Las ecuaciones ilustran a continuación los procedimientos de óxido-reducción de estas coenzimas:

20

25

Reducción de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido



30

Reducción de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato



35

Reducción de la coenzima flavina y adenina dinucleótido



40

Entonces se reducen las moléculas de acetaldehído en moléculas de etanol mediante la acción de reducción de la enzima alcohol deshidrogenasa, tal como se ilustra en la figura 3.

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

45



50

Los términos “[]” indican las respectivas concentraciones de 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, empleando levadura, hongo unicelular eucariota. El símbolo “□” tiene como objetivo ilustrar la inoculación de hidrógeno en el microorganismo.

55

Este principio inventivo, junto con la ecuación genérica (7), también se aplica en fermentaciones que implican bacterias, células procariontas, con procesamiento de hidratos de carbono, tales como polisacáridos y monosacáridos como triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, destacándose sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa,

con producción selectiva de etanol o alcoholes superiores. En virtud de su simplicidad, economía y eficiencia, esta invención puede o bien aplicarse a nuevas unidades de producción, o bien implementarse en estructuras y unidades ya instaladas.

5 Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento bioquímico, tal como se define en las reivindicaciones, para aumentar selectivamente el rendimiento de la producción de alcohol a través de modificaciones y mejoras en la etapa de fermentación de las disoluciones que contienen azúcares, empleando microorganismos fermentativos del grupo 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 microorganismos que participan en la reacción fermentativa del mosto azucarado.

10 El presente procedimiento puede comprender añadir del 5% al 30% (masa/volumen) de sustratos azucarados y entre el 5% y el 25% (masa/volumen) de microorganismo. Los microorganismos se completan de manera automática y controlada como una función del contenido necesario y los disponibles en el mosto bajo fermentación.

15 Para la inoculación de hidrógeno, se requiere un sistema para generar tal hidrógeno, comprendiendo el sistema:

(i) suministrar un medio fermentativo con un voltaje de pre-electrolisis por medio de electrodos, comprendiendo dicho voltaje valores inferiores al voltaje requerido para la aparición de electrolisis del agua en el medio, caracterizado por las condiciones iónicas del mosto bajo fermentación, preferiblemente entre 0,1 V y 1,124 V, o]

(ii) suministrar el medio fermentativo con un voltaje de la electrolisis completa del agua, caracterizado por las condiciones iónicas del mosto bajo 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; o tal como se da a conocer adicionalmente

(iii) la producción de hidrógeno fuera del reactor tiene lugar a través de electrolisis del agua, con el voltaje entre 1,5 V y 30 V.

20 Los electrodos aplicados al medio fermentativo comprenden al menos un cátodo y un ánodo, el cátodo y el ánodo actuando preferiblemente directamente en el mosto bajo fermentación.

En una realización de la invención, los electrodos, ánodo y cátodo, se aplican directamente al mosto bajo fermentación.

35 En una segunda realización de la invención, los electrodos usados en el medio fermentativo comprenden al menos un cátodo y un ánodo, el cátodo actuando directamente en el mosto bajo fermentación, mientras que el ánodo se aplica en otro electrólito, siendo este último solución salina, como dos electrolitos, con los medios separados por una membrana de separación permeable a iones.

40 El mosto azucarado comprende azúcares tales como polisacáridos y monosacáridos como triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, destacándose sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, o mezclas de los mismos.

45 En una realización de la invención, los microorganismos fermentativos para su uso en la invención se seleccionan de levaduras del grupo de hongo, desde el género *Saccharomyces* y más específicamente la cepa *Saccharomyces cerevisiae* y las especies del género *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia stipites*, *Torula*, y *Candida shehatae*.

En una segunda realización de la invención, los microorganismos fermentativos se seleccionan del grupo de bacterias, más especialmente especies de los géneros *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* y *Clostridium*.

50 En una realización preferida, el microorganismo fermentativo seleccionado comprende el hongo de las especie *Saccharomyces cerevisiae*.

En otra realización preferida, el microorganismo fermentativo seleccionado comprende la bacteria de la especie *Zymomonas mobilis*.

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

60 Los microorganismos se añaden a contenido como variables y deben controlarse durante el procedimiento bajo demanda.

65 Particularmente, el procedimiento de la invención consiste en la inoculación de concentraciones adecuadas de hidrógeno atómico, iónico o molecular, habiendo sido producido dicho hidrógeno en la condición de pre-electrolisis y/o electrolisis completa en los microorganismos bajo procedimiento, de manera controlada según la ecuación (7), tabla 2 y figura 4. Los procedimientos de fermentación de régimen discontinuo, continuo y semicontinuo se contemplan por la presente invención, y se puede adoptar disposiciones de biorreactores, en número y volúmenes, o bien en funciones similares o diferentes en sus condiciones operacionales de concentraciones de sustratos, microorganismos y disponibilidad del inóculo de hidrógeno en la fase iónica o molecular.

Aunque todavía no se ha establecido, definitivamente y académicamente, las rutas de transformaciones de azúcares en alcoholes, tanto en regímenes anaeróbicos y aeróbicos, en presencia de hongos o bacterias en medios de concentración de hidrógeno abundante, ya se puede seguir la producción selectiva de sustancias en estos procedimientos respiratorios y fermentativos.

Los experimentos comparativos realizados en la presente invención apuntan al aumento teórico en el rendimiento de producción de etanol de hasta el 50%, lo que implica una eficiencia teórica masiva máxima de 0,8 m/m (masa/masa) en la fermentación de azúcares (sacarosa), con la consiguiente reducción del dióxido de carbono emitido de hasta el 100%, con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En la presente invención, a través de pruebas llevadas a cabo, se ha observado que, en la ruta etílica de fermentación de azúcares con levaduras, las dos moléculas de ácido pirúvico, que se originan de la glicólisis, en su descarboxilación por la enzima piruvato descarboxilasa, se promueven las liberaciones de los dos carboxilos ()



que posteriormente se reducen por equivalente de reducción - ER/RE, mediante la acción de hidrógeno presente abundantemente en el medio, que puede producir otra molécula de acetaldehído que, se deshidrogena por la enzima alcohol deshidrogenasa en la reducción a etanol, provocando su aumento selectivo (sic). Como resultado, existe la reducción de dióxido de carbono liberado, tal como se puede inferir a partir de la figura 3.

Mientras que el aumento en la producción de etanol puede alcanzar el límite teórico del 50%, la reducción de dióxido de carbono puede alcanzar el consiguiente nivel teórico extremo del 100% con respecto al procedimiento tradicional. Además en este modelo fermentativo, en la cara de las concentraciones de azúcares aumentaron en el procesamiento intracelular, como resultado del aumento en la concentración de hidrógeno disponible, provocando mayores complejidades de las reacciones enzimáticas, se puede verificar reducciones en la cinética de las reacciones, que pueden implicar un aumento en el período de fermentación.

El hidrógeno presente en el medio de fermentación puede estar en los estados 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 fermentativo a un voltaje eléctrico de la pre-electrolisis (voltaje por debajo del voltaje requerido para que se produzca la electrolisis del agua, caracterizado por las condiciones iónicas del mosto bajo fermentación) o (ii) someter el medio fermentativo a voltaje de la electrolisis completa igual a o superior al voltaje de electrolisis del agua, caracterizado por las condiciones iónicas del mosto bajo fermentación.

En el régimen de pre-electrolisis, existe formación de hidrógeno iónico y atómico, sin hidrógeno gaseoso. La formación de tal hidrógeno iónico y atómico sólo requiere voltaje eléctrico menor que la necesaria para la aparición de la electrolisis del agua, que se caracteriza por las condiciones iónicas del mosto bajo fermentación. Este voltaje eléctrico oscila desde 0,1 V hasta 1,24 V, preferiblemente desde 0,7 V hasta 1,1 V.

Los sistemas para la generación de pre-electrolisis y electrolisis completa pueden producirse hidrógeno de tal manera que el voltaje será o bien continuo o bien alterno, en la que esta última puede ser ciclos que oscilan desde 50 hasta 2.000 Hz, preferiblemente desde 50 Hz hasta 150 Hz, o desde 100 Hz hasta 500 Hz o desde 400 Hz hasta 1.000 Hz.

En una realización de la invención, el sistema comprende ion de corriente continua en condición de electrolisis completa, evitando la adición de oxígeno al mosto bajo fermentación, con el fin de favorecer condiciones anaeróbicas. Preferiblemente el cátodo actúa directamente en el mosto bajo fermentación, mientras que el ánodo se aplicará en otro electrolito, siendo este último, solución salina, según dos electrolitos, con medios separados por membrana de separación permeable a iones, siendo la membrana porosa y hecha preferiblemente de un material poroso. Tras iniciar el sistema de generación de hidrógeno en un reactor que funciona en un régimen discontinuo, semicontinuo o continuo, es importante para el procedimiento que va a controlarse continuamente por las mediciones de pH, temperatura, concentraciones de azúcares, concentración de hidrógeno, concentraciones de microorganismo vivo, concentraciones de alcohol, concentraciones de dióxido de carbono y contenido y concentraciones de micronutrientes.

Adicionalmente, puede introducirse directamente hidrógeno en la fase gaseosa en el biorreactor en la fermentación, mediante chorreo directo en el mosto bajo fermentación en el biorreactor, o a través de líneas para la alimentación o circulación de mosto en el biorreactor. Este gas hidrógeno puede producirse a través de la fermentación bacteriana o por algas en otro procedimiento fermentativo paralelo, caracterizado por la producción de hidrógeno, o a través de electrolisis del agua, fuera del reactor, o puede ser hidrógeno industrial.

Se señaló adicionalmente que el hidrógeno puede inocularse o bien inmediatamente en el inicio del procedimiento

fermentativo o bien después de esta etapa, es decir, durante la preparación del microorganismo.

El procedimiento descrito en la presente invención, y definido en las reivindicaciones, refleja un comportamiento diferenciado de los procedimientos fermentativos de la técnica anterior, puesto que:

- 5
- la alta dosificación de hidrógeno actúa como un potente agente reductor;
 - se proporcionan mejores rendimientos en la concentración de alcohol;

10

 - no hay modificación genética del microorganismo;
 - hay una consiguiente reducción del contenido de dióxido de carbono liberado; y
 - hay alteración en la cinética de la reacción.

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

- 20
1. se proporciona fácil difusión de hidrógeno a través de la membrana celular del microorganismo, hongo o bacteria, permitiendo compartimientos intracelulares que van a alcanzarse;
 2. no incluye en los parámetros fisiológicos de la célula (temperatura, presión, pH y pO₂);

25

 3. no interfiere con las reacciones de oxidación metabólica, sin detrimento de las especies reactivas de oxígeno ROS, y de señalización celular;
 4. altas concentraciones de hidrógeno se toleran bien y por consiguiente tienen menos efectos secundarios sistémicos; y

30

 5. se puede aplicar a fermentaciones en los regímenes discontinuos, semicontinuos y continuos, siendo de fácil adaptación al equipo y procedimientos de fermentación existentes.

Control del procedimiento y rendimiento productivo según la invención

35 Según la ecuación genérica (7), el procedimiento fermentativo proporcionará ahora y demandará control operacional de las variables del procedimiento.

40 La lista de variables está compuesta por las comprendidas por la técnica anterior, pretendidas para mantener el procedimiento dentro de los patrones del procedimiento fisicoquímico usados normalmente en los procedimientos fermentativos abarcados por la técnica anterior, tal como pH y temperatura, controles de niveles, alimentación y descarga, y las concentraciones de reactivos y productos, incluyendo micronutrientes. Este control actúa durante el procedimiento de producción completa, lo que permite guiar dicho procedimiento dentro de las condiciones operacionales adecuadas y pretendidas.

45 El control sobre las concentraciones, en la presente invención, difiere de los controles de las concentraciones de sólidos solubles y azúcares, como en los casos de fermentaciones de VHG (gravedad muy alta), por los cuales se obtiene una concentración de alcohol de por encima del 12% en volumen, evitando daño al microorganismo o fermentación detenida y lenta, así como sobre los procedimientos en los que tiene el objetivo de controlar o limitar el periodo de fermentación, como una herramienta para el control productivo. En estos casos tradicionales, el control sobre la concentración de azúcares y microorganismos se reduce para establecer los límites operacionales del procedimiento.

50

La fermentación de gravedad muy alta es la fermentación partiendo de altas concentraciones de sustratos con el fin de producir vinos con alto contenido alcohólico, con concentración típica superior al 12% en volumen.

55 La fermentación detenida y lenta tiene lugar cuando se interrumpe el procedimiento de fermentación, o cuando reduce drásticamente su cinética, incluso con la existencia de un sustrato, como resultado de factores estresantes, tales como contenido alcohólico en exceso o falta de micronutrientes estructurales al microorganismo.

60 Según la presente invención, el control sobre las concentraciones va más allá de los límites mencionados anteriormente, siendo un control bioquímico, teniendo como objetivo el rendimiento productivo dentro de los conceptos implicados por la ecuación genérica (7).

65 El balance esquemático de la ecuación genérica y simplificada (7) se une directamente a los límites de rendimiento productivo, considerando las concentraciones de sustratos, azúcares, microorganismo vivo e inóculo [H], con el fin de 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 tres rangos operacionales para las

concentraciones, partiendo de la concentración de sustrato e hidrógeno, teniendo como objetivo la concentración de alcohol reducido. El procedimiento funciona de manera más comprensiva en el modo de control continuo.

La figura 4 muestra los rangos de operación basados en moles de sacarosa, se transcriben los valores umbral de las curvas elevadas en la tabla 2 a continuación.

Rango de control operacional	Tabla 2 – Equivalentes molares					
	[sacarosa]	[hidrógeno]	[etanol]	[CO ₂]	Rendimiento [m/m]	% de aumento 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 másico, aumento del porcentaje en el rendimiento másico y en las concentraciones en equivalente molar para [H], [Etanol] y [CO₂]. Estos valores, considerando las condiciones estadísticas de las reacciones enzimáticas intracelulares, demostraron ser más realista con respecto a los hallazgos operacionalmente más favorables.

Ensayos que demuestran el procedimiento de la invención

Se realizaron algunos ensayos para la validación y evaluación de la eficacia del procedimiento en mosto bajo fermentación, empleando zumo de caña de azúcar y microorganismo levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, usada intensamente en la industria de etanol combustible y bebidas. A continuación se proporciona un ejemplo de un procedimiento. Los resultados y condiciones de ensayo, así como la validación del modelo bioquímico, se notifican a continuación.

Ejemplo 1 - Comparación entre una fermentación convencional con la fermentación según la invención en un régimen de pre-electrolisis

En este ensayo se ha buscado la influencia del hidrógeno en la fermentación de etilo de mostos azucarados, con voltaje inferior a la necesaria para la aparición de electrolisis del agua. En los ensayos, incluyendo los siguientes, se usó, como reactivos, azúcar sin refinar y la levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación discontinua.

Se construyeron dos biorreactores, uno como una base o convencional, y el otro ensamblado con un sistema de generación de hidrógeno (usando voltaje con corriente continua de 0,95V), para producir hidrógeno iónico y atómico, durante el procedimiento de fermentación.

En los dos biorreactores, con un volumen máximo de 100 litros, se añaden los reactivos y agua hasta el volumen de operación de 50 litros.

Más específicamente, se realiza dos ensayos en cada biorreactor, fermentando 8 kg del sustrato de azúcar moreno (constituido fundamentalmente por sacarosa) con 5 kg de levadura comercial (hongo, *Saccharomyces cerevisiae*) en dos lotes separados y simultáneamente.

Se disolvieron el sustrato y el hongo y se prepararon antes de mezclarse en los biorreactores, con agitación con un agitador de cuchilla plana a 60 - 90 rpm. Se recogieron muestras de los reactores inmediatamente tras mezclar los dos componentes, y se midieron los parámetros iniciales, tal como sólidos solubles [Brix], temperatura [°C] y acidez [pH]. Se llevaron a cabo mediciones para Brix, temperatura y pH cada hora, usando un destilador y densímetro digital, adoptando patrones de laboratorio patrón. No se añadió micronutriente al procedimiento, con el fin de aislar variables.

La tabla 3 especifica los componentes usados en los experimentos y condiciones de prueba de pre-electrolisis. Se realizaron dos ensayos en dos reactores simultáneos.

Tabla 3 - Componentes y condiciones de las pruebas (pre-electrolisis)		
Características	Procedimiento convencional	Procedimiento de la invención
Volumen del reactor	~ 100 litros	~ litros
Volumen fermentado	50 litros	50 litros
Levadura – Hongo	Fleishmann comercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fleishmann comercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Tabla 3 - Componentes y condiciones de las pruebas (pre-electrolisis)

Características	Procedimiento convencional	Procedimiento de la invención
Masa de levadura	5 kg	5 kg
Concentración de levadura	masa/volumen al 10%	masa/volumen al 10%
Sustrato	Azúcar moreno	Azúcar moreno
Masa de sustrato	8 kg	8 kg
Concentración de sustrato	masa/volumen al 16%	masa/volumen al 16%
Velocidad de agitación	50-60 RPM	80-100 RPM
Voltaje eléctrico	-	0,95 Volt
Temperatura ambiente	25°C	25°C

La tabla 4 especifica el equipo empleado para controlar los parámetros de pH, temperatura, Brix y concentración de etanol. En las pruebas se observan las variaciones en 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
Medidores de pH	pH	Cada hora	Gotas
Termómetro	Temperatura	Cada hora	Termopar
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 logrados en estos dos experimentos se describen en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5 - Resultados logrados en la fermentación usando un biorreactor que contiene un sistema de generación de hidrógeno, en régimen de pre-electrolisis y un biorreactor convencional.

10

	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			

*- Final de la fermentación – se apagó el sistema eléctrico del fermentador para su uso en la invención tras la 6ª hora. Se mantuvieron los reactores en la operación, con agitación, tras las últimas mediciones en la 6ª hora. Se continuó la fermentación residual durante 16 horas más.

15

El aumento en la producción de etanol puede observarse fácilmente en el tiempo de 6 horas, puesto que se puede verificar, en media, 1,62°C más azúcar para el procedimiento de la invención. Este contenido de azúcar adicional puede producir 1,1°GL más etanol, si se usa la ecuación de Gay-Lussac (1) para calcular el valor teórico de la conversión de azúcar en etanol.

20

Como resultado, el rendimiento en la producción de etanol, leído directamente en la tabla 5, aumentó en el 6,8% y el 8,3% en comparación con el valor teórico tradicional esperado (rendimiento de Gay-Lussac) teniendo los mismos criterios experimentales y cálculos de rendimiento. Se acompañaron el aumento en la concentración de etanol y la reducción observada en la liberación de dióxido de carbono mediante alteraciones en la cinética química, lo que muestra que se puede aplicar el modelo bioquímico simplificado.

Ejemplo 2 - Comparación entre una fermentación convencional y la fermentación según la invención en régimen de electrolisis completa

5 En este ensayo, se inserta en los dos biorreactores (la base y la usada en el procedimiento de la invención) 9 kg de azúcar moreno con 6 kg de levadura industrial, *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Los dos biorreactores usados en el ejemplo 1, uno como una base o reactor convencional y el otro equipado con un sistema de generación de hidrógeno, fueron los mismos que se emplearon en el ejemplo 2. En este ejemplo, se emplea el voltaje eléctrico de 1,6 V - régimen de electrolisis completa, produciendo hidrógeno iónico y gaseoso, durante el procedimiento de fermentación.

La tabla 6 especifica los componentes usados en los experimentos y condiciones de la prueba para la electrolisis completa.

Tabla 6 - Componentes y condiciones de las pruebas en electrolisis completa		
Características	Procedimiento convencional	Procedimiento de la invención
Volumen del reactor	~ 100 litros	~100 litros
Volumen fermentado	50- litros	50 litros
Levadura - hongo	Fleishmann comercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fleishmann comercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Masa de levadura	6 kg	6 kg
Concentración de levadura	masa/volumen al 12%	masa/volumen al 12%
Sustrato	Azúcar moreno	Azúcar moreno
Masa de sustrato	9 kg	9 kg
Concentración de sustrato	masa/volumen al 18%	masa/volumen al 18%
Velocidad de agitación	50-60 RPM	80-100 RPM
Voltaje eléctrico	-	1,6 Volt
Temperatura ambiente	25°C	25°C

15 Se recogieron muestras de los reactores inmediatamente después de la adición de los componentes, y se midieron los parámetros iniciales, tales como sólidos solubles [Brix], temperatura [°C] y acidez [pH]. Se llevaron a cabo las mediciones de Brix, temperatura, pH y concentración alcohólica cada hora. No se añadió micronutriente a los procedimientos, con el fin de aislar variables. Se realizó solo una prueba con los dos biorreactores.

20 Los resultados de las pruebas para este experimento se describen en las tablas 7 y 8.

25 Tablas 7 y 8 - Resultados logrados en la fermentación usando un biorreactor que contiene un sistema de generación de hidrógeno en electrolisis completa y un biorreactor convencional.

Tabla 7 - Fermentación convencional - Base										
Condiciones ambientales y convencionales										
Hora	oBx	Etanol	Temp.	pH	□Et/□Bx +	□B/□t	□Et/□t	□T/□t	□pH/□t	□Et/□Bx G-L+
0	19,2	0,0 0	26,8	4,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,682
1	17,83	1,7 8	29,6	4,04	1,299	1,37	1,78	2,8	-0,52	0,682
2	14,4	4,2 6	32,5	3,79	0,723	3,43	2,48	2,9	-0,25	0,682
3	10,32	6,4 6	33,5	4,1	0,539	4,08	2,20	1,0	0,31	0,682
4	8,38	7,9 4	33,5	4,05	0,763	1,94	1,48	0,0	-0,05	0,682
5	6,63	9,0 4	33,7	4,02	0,629	1,75	1,10	0,2	-0,03	0,682
>22 *	5,6	9,2 8	33,1	4,08	0,233	1,03	0,24	-0,6	0,06	0,682

Tabla 7 - Fermentación convencional - Base										
Condiciones ambientales y convencionales										
Hora	oBx	Etanol	Temp.	pH	□Et/□Bx +	□B/□t	□Et/□t	□T/□t	□pH/□t	□Et/□Bx G-L+
Tabla 8 - Fermentación según la invención										
1,6 V y voltaje de corriente continua de 3,2 A a 4,9 A										
Hora	oBx	Etanol	Temp.	pH	□Et/□Bx +	□B/□t	□Et/□t	□T/□t	□pH/□t	□Et/□Bx G-L+
0	19,25	0,0 0	25,5	4,8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,682
1	18,19	1,5 4	28,1	4,27	1,453	1,06	1,54	2,6	-0,53	0,682
2	16,19	2,7 6	30,1	4,19	0,610	2,00	1,22	2,0	-0,08	0,682
3	14,78	3,5 4	31,4	4,08	0,553	1,41	0,78	1,3	-0,11	0,682
4	13,98	4,2 8	32,2	4,03	0,925	0,80	0,74	0,8	-0,05	0,682
5	13,53	4,6 6	32,7	4,01	0,844	0,45	0,38	0,5	-0,02	0,682
>22 *	13,12	4,8 8	32,9	4,23	0,537	0,41	0,22	0,2	0,22	0,682

*- Final de la fermentación – Se apagó el sistema eléctrico del fermentador para su uso en la invención tras la 6ª hora. Se mantuvieron los reactores en la operación, con agitación tras las últimas mediciones en la 6ª hora. Se continuó la fermentación residual durante otras 16 horas.

+ Obsérvese que los valores para (□Et/□Bx), se refieren a los rendimientos parciales, según el rendimiento de G-L. Para la sacarosa, el rendimiento máximo es de 0,538 m/m (masa/masa) y 0,682 v/v (volumen/volumen), según los valores de la última columna de la derecha, tanto en la tabla 7 como 8. Como resultado, el rendimiento en la producción de etanol en el biorreactor para su uso en la presente invención fue del 17% al 20% por encima del valor teórico tradicional máximo esperado (rendimiento de Gay-Lussac), tal como se puede observar más claramente en la tabla 11.

5 Para los valores parciales, se sabe que los métodos analíticos portan errores, entre la preparación de muestras y la continuación del procedimiento fermentativo, incluso en la muestra recogida, lo que puede provocar desvíos significativos cuando los momentos de muestro tienen periodos de mayor cinética de la reacción fermentativa en curso.

Resultados y validación del modelo bioquímico

10 Con el fin de presentar los resultados anteriores de manera mejor, las tablas a continuación explican los valores haciendo referencia a la producción parcial de etanol, durante el procedimiento, y al final del procedimiento fermentativo, siempre acompañados por los valores del biorreactor para su uso en la invención y de los valores obtenidos en el procedimiento convencional, o biorreactor base. Se señala que estos valores mostrados se obtienen directamente y no solo a partir de los resultados logrados durante los ensayos.

15

Tabla 9- Ensayo 1: a 0,95 V (Pre-electrolisis); 1,2 A CC								
Reactor convencional en condiciones ambientales y convencionales								
Hora	□Bx		□ Etanol		□Et/□Bx		Aumento en el rendimiento	
	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%

Tabla 10 - Ensayo 2: a 0,95 V (Pre-electrolisis); 1,2 A CC								
Biorreactor convencional en condiciones ambientales y convencionales								
Hora	□Bx		□ Etanol		□ Et/DBx		Aumento en el rendimiento	
	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 1,6 V (Pre-electrolisis); 3,2 A a 4,9 A CC								
Biorreactor convencional en condiciones ambientales y convencionales								
Hora	□B/Dt		□Etanol		□Et/DBx		Aumento en el rendimiento	
	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%

5

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 "aumento en el rendimiento" presentan valores parciales finales y acumulados, siempre mayores para los obtenidos según la invención. Los valores finales, del 6,9% y el 8,3%, con respecto al rendimiento fermentativo máximo, considerando la técnica anterior, de 0,538 masa/masa o 0,682 volumen/volumen, obtenido en los respectivos ensayos 1 y 2, funcionando en régimen de voltaje de pre-electrolisis y corriente continua, CC, en si mismo sólo califica el procedimiento de la invención en sus límites productivos. Las concentraciones de [sacarosa], [hidrógeno] y [levadura] están en el rango de equivalentes molares desde bajo (I) hasta medio (II).

15

Los valores presentados en la tabla 11 en relación con el ensayo 3 para el "aumento en el rendimiento", tanto para parcial como final, son elocuentes y definitivos. Se puede observar que el valor final o acumulado en el ensayo 3 del 16,7% refleja la rápida respuesta al procedimiento de la invención, con respecto al aumento en la concentración de hidrógeno en estado atómico, iónico y gaseoso, con un comportamiento esperado por las figuras 4 y 5.

20

El modelo bioquímico en los primeros dos ensayos, más los valores y peculiaridades presentados por el ensayo 3, demuestran ser validados técnicamente.

25

Tal como se espera, el ensayo 3, que funciona con equivalentes molares en el rango moderado (II), tuvo la reacción cinética sustancialmente alterada, puesto que el procedimiento tuvo una reducción en la tasa de producción de etanol por el azúcar consumido (□Et/□Bx), todavía con una gran cantidad de azúcar presente en el medio. La

disponibilidad de micronutrientes, principalmente de N (nitrógeno), frente a la alta actividad microbiana, es fundamental para el aumento en la biomasa, que es un fenómeno natural en un procedimiento fermentativo. La falta principalmente de nitrógeno evita la multiplicación del microorganismo fermentativo, siendo una condición de fermentación estresante.

5 Además de los análisis realizados y notificados en el presente documento, se verificó cualitativamente la reducción en la emisión de dióxido de carbono durante el procedimiento, con clara evidencia de la reducción, en comparación con el procedimiento desarrollado simultáneamente en el biorreactor convencional. Los expertos en la técnica tienen estos medios para esta naturaleza de evaluación.

10 En la tabla 12, se presenta los resúmenes de los resultados fermentativos, considerando 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	Invencción	Convencional	Invencción	Convencional	Invencción
Variación de azúcar □Bx	11,10	11,11	10,86	10,89	13,60	6,13
Variación de etanol □□t	7,38	8,10	7,46	8,04	9,28	4,88
Volumen de 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

15 Por tanto, se considera validado el procedimiento de la invención, según los resultados logrados en los ensayos de laboratorio.

La reducción de emisión de dióxido de carbono, como resultado del procedimiento bioquímico, con el aumento selectivo en la producción de alcohol, surge como un complemento tecnológico de gran importancia ambiental y operacional. Algunas ventajas económicas y ambientales proporcionadas por la invención pueden listarse tal como sigue:

- 1- aumento económico directo, con el aumento en la producción de alcohol;
- 25 2- aumento en la producción sin provocar un aumento en el área de la planta;
- 3- reducción en la producción de dióxido de carbono;
- 4- equipo del procedimiento no requiere ajustes en cuanto al volumen de producción, así como los biorreactores y el equipo de destilación;
- 30 5- reducción en el dimensionamiento y consumo de energía, en el equipo de recuperación de alcohol arrastrado por el dióxido de carbono en la fermentación;
- 35 6- aumento en el crédito de carbono con un aumento en la producción de alcohol y con la reducción de dióxido de carbono liberado;
- 7- tecnología dirigida con la mejora en el ambiente. El etanol se completa como un combustible verde y mayor viabilidad económica.

40

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para fermentación microbiana de mosto para la producción de alcohol, caracterizado por comprender la inoculación de hidrógeno en un microorganismo, seleccionado de un hongo y una bacteria, presente en suspensión o en un lecho inmovilizado en un mosto bajo fermentación, conteniendo dicho mosto bajo fermentación azúcares y el microorganismo, en el que el hidrógeno se genera al aplicar voltaje eléctrico a al menos dos electrodos aplicados al mosto bajo fermentación.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el hidrógeno se genera al aplicar los electrodos que comprenden al menos un cátodo y un ánodo, siendo dicho cátodo aplicado directamente al mosto bajo fermentación y siendo el ánodo aplicado a otro electrolito, siendo este último una solución salina, con los medios separados por una membrana permeable a iones.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el mosto bajo fermentación se obtiene mediante la adición
 - del 5% al 30% (masa/volumen) de sustratos azucarados;
 - del 5% al 25% (masa/volumen) del microorganismo.
4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 3, caracterizado porque el hidrógeno está en el estado atómico, iónico, gaseoso o una mezcla de los mismos.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se someten los electrodos a un régimen de pre-electrolisis del agua con voltaje eléctrico que oscila desde 0,1 V hasta 1,24 V, para producir hidrógeno iónico y atómico.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el régimen de pre-electrolisis comprende un voltaje que oscila desde 0,7 V hasta 1,1 V.
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se someten los electrodos a un régimen de electrolisis completa del agua con voltaje eléctrico que oscila desde 1,24 V hasta 30 V para producir hidrógeno atómico, iónico, gaseoso o una mezcla de los mismos.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el régimen de electrolisis completa comprende un voltaje eléctrico que oscila desde 1,24 V hasta 20 V.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el voltaje eléctrico aplicado a los electrodos tiene lugar en un régimen continuo o alterno con ciclos que oscilan desde 50 Hz hasta 2000 Hz.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque el voltaje eléctrico aplicado a los electrodos tiene lugar en un régimen alterno con ciclos que oscilan desde 50 Hz hasta 150 Hz, desde 100 Hz hasta 500 Hz o desde 400 Hz hasta 1000 Hz.
11. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los azúcares en el mosto son polisacáridos y monosacáridos con triosas, tetrasas, pentosas y hexosas, destacándose sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa o mezclas de los mismos.
12. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los microorganismos del género de hongos presente en el mosto bajo fermentación o en el lecho inmovilizado se seleccionan del género *Saccharomyces*.
13. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los microorganismos del género de bacterias presente en el mosto bajo fermentación o en el lecho inmovilizado se seleccionan del grupo de bacteria *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* y *Clostridium*.
14. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se añaden micronutrientes y se seleccionan de: nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, zinc, manganeso, cobre, hierro, cobalto, azufre, yodo o mezcla de los mismos.
15. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el hidrógeno gaseoso se produce adicionalmente fuera del biorreactor al aplicar voltaje eléctrico que oscila desde 1,24 V hasta 30 V en un régimen de pre-electrolisis del agua y entonces se inserta directamente mediante chorro en los biorreactores.
16. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el procedimiento fermentativo tiene lugar en un procedimiento continuo, semicontinuo o discontinuo.

17. Procedimiento según la reivindicación 1 a 16, caracterizado porque se controla de manera continua el procedimiento fermentativo para el pH, temperatura, niveles, alimentación y descarga, concentraciones de reactivos, concentración de hidrógeno, concentraciones de microorganismos vivos, concentración de producto y concentración de micronutrientes.

5

18. Uso de hidrógeno en estado atómico, iónico o gaseoso o mezclas de los mismos para la inoculación en los microorganismos presentes en un medio de fermentación que contiene sustratos azucarados para la producción selectiva de alcohol en un procedimiento tal como se define en las reivindicaciones 1 a 17.

10

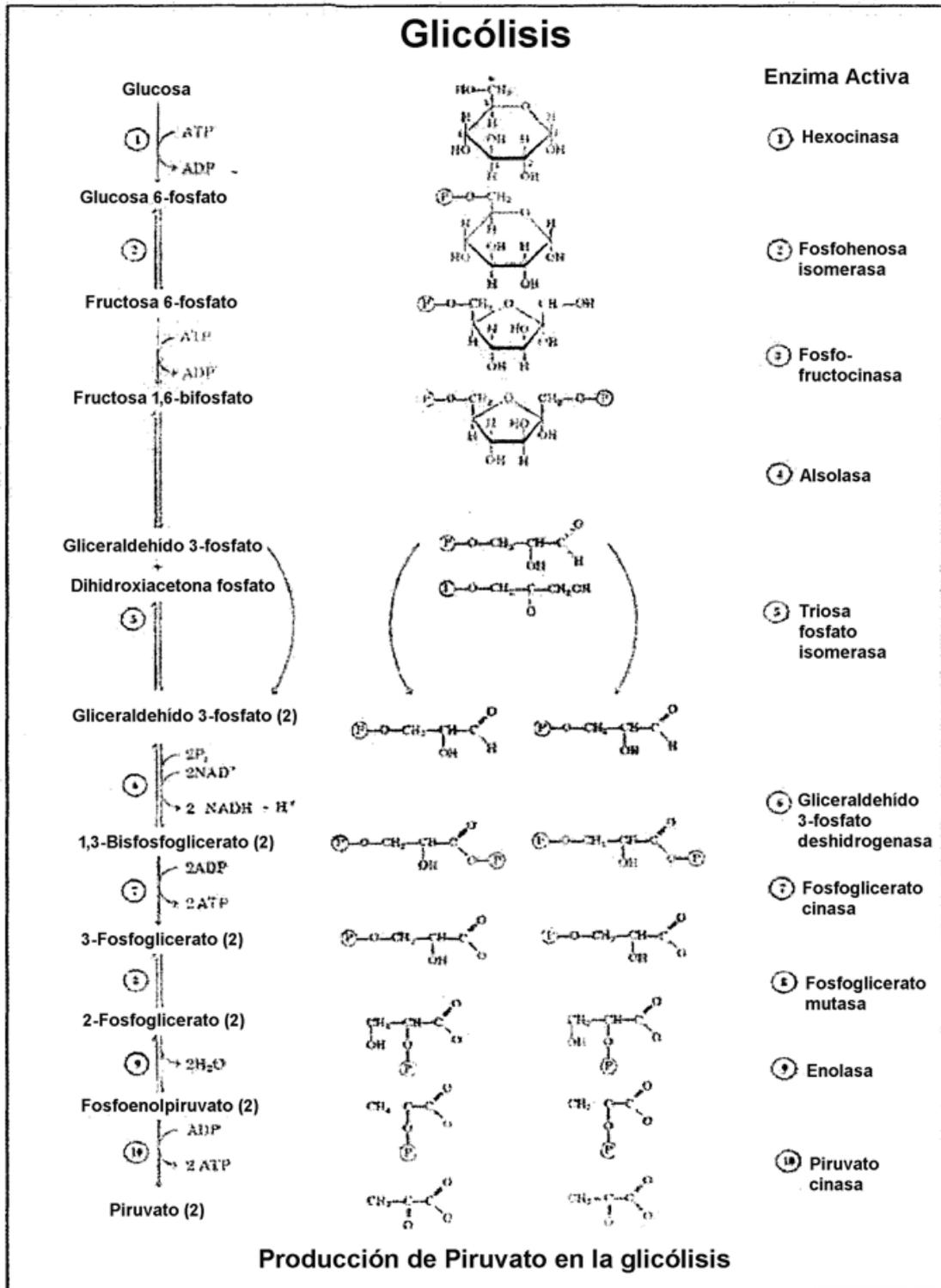


FIG. 1

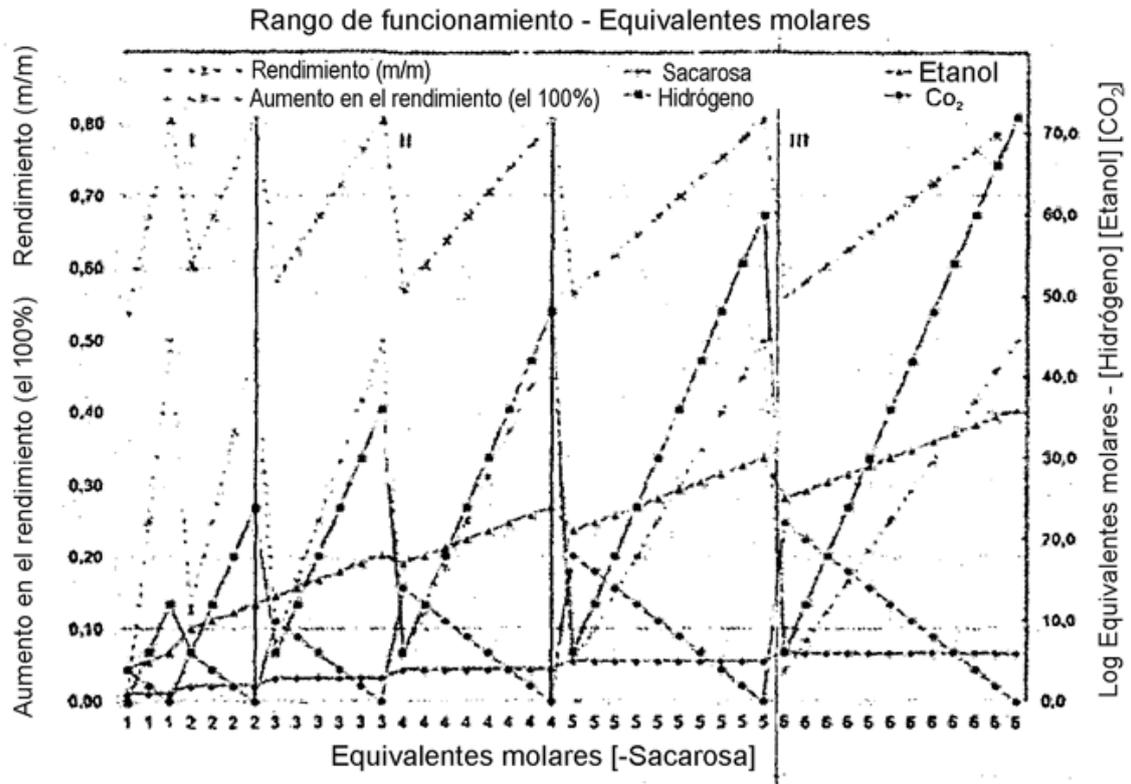


FIG. 4

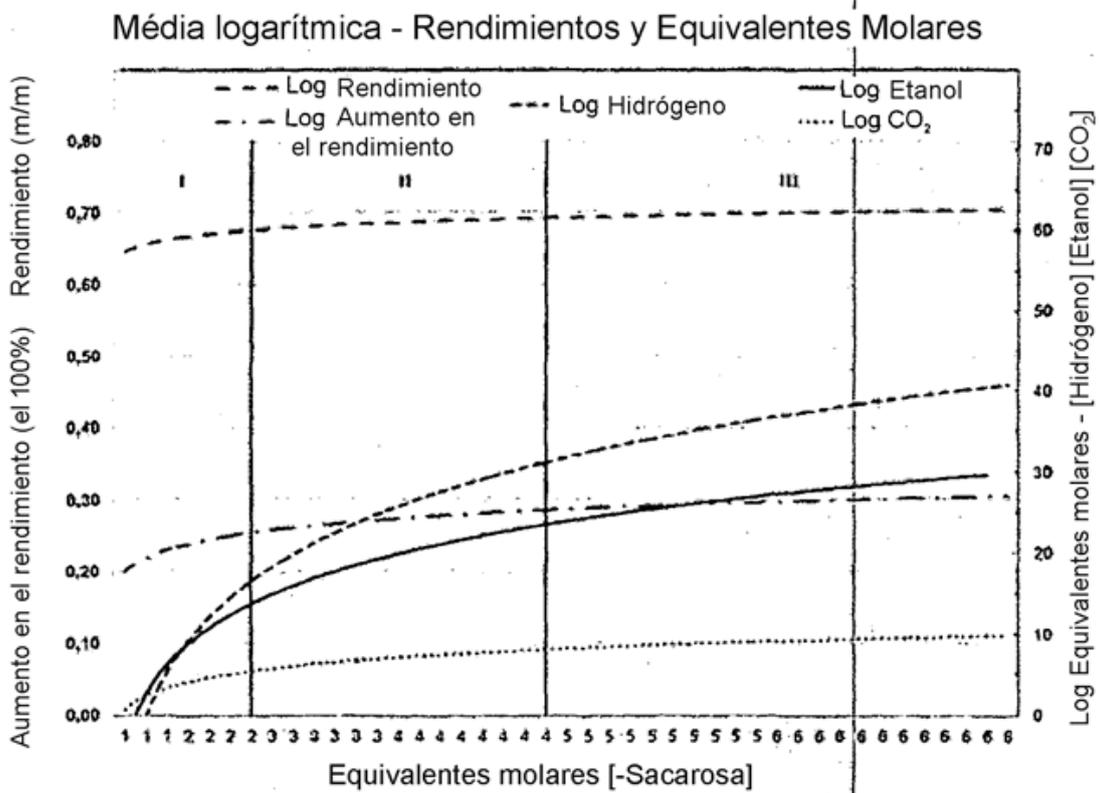


FIG. 5