

TÍTULO DE PATENTE NO. 271316

Titular(es): UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO; JESÚS CAMPOS GARCÍA; CARLOS RUBÉN SOSA AGUIRRE

Domicilio(s): Santiago Tapia 403, Centro, 58000, Morelia, Michoacán, MÉXICO

Denominación: LEVADURA FERMENTADORA PARA LA ELABORACION DE BEBIDAS ALCOHOLICAS DESTILADAS.

Clasificación: Int.Cl.8: A23L1/221; A23L1/314; C12G3/00; C12G3/02; C12G3/12; C12P7/02; C12R1/00

Inventor(es): JESÚS CAMPOS GARCÍA; CARLOS RUBÉN SOSA AGUIRRE; HOMERO REYES DE LA CRUZ; JOSÉ ARNOLDO LÓPEZ ÁLVAREZ

Número:
MX/a/2007/014445

Fecha de presentación:
16 de noviembre de 2007

Hora:
16:57

País:

PRIORIDAD
Fecha:

Número:

ESTA PATENTE CONCEDE A SU TITULAR EL DERECHO EXCLUSIVO DE EXPLOTACIÓN DEL INVENTO RECLAMADO EN EL CAPÍTULO REIVINDICATORIO Y TIENE UNA VIGENCIA IMPRORRROGABLE DE VEINTE AÑOS CONTADOS A PARTIR DE LA FECHA DE PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD, QUE ESTARÁ SUJETA AL PAGO DE LA TARIFA CORRESPONDIENTE.

Fecha de expedición: 21 de agosto de 2009

EL DIRECTOR DIVISIONAL DE PATENTES

QUÍM. FABIAN R. SALAZAR GARCÍA

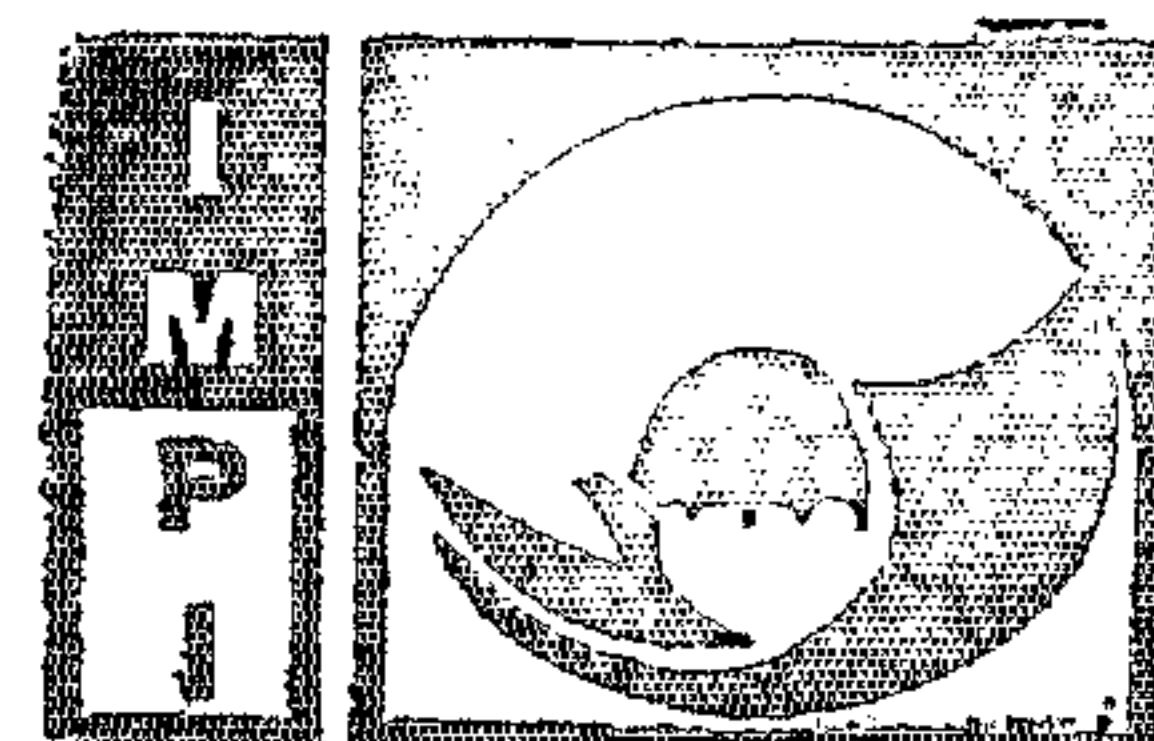


MX/a/2007/14445

271316

21-VIII-09

1



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

TITULO DE LA PATENTE

Levadura fermentadora para la elaboración de bebidas alcohólicas destiladas.

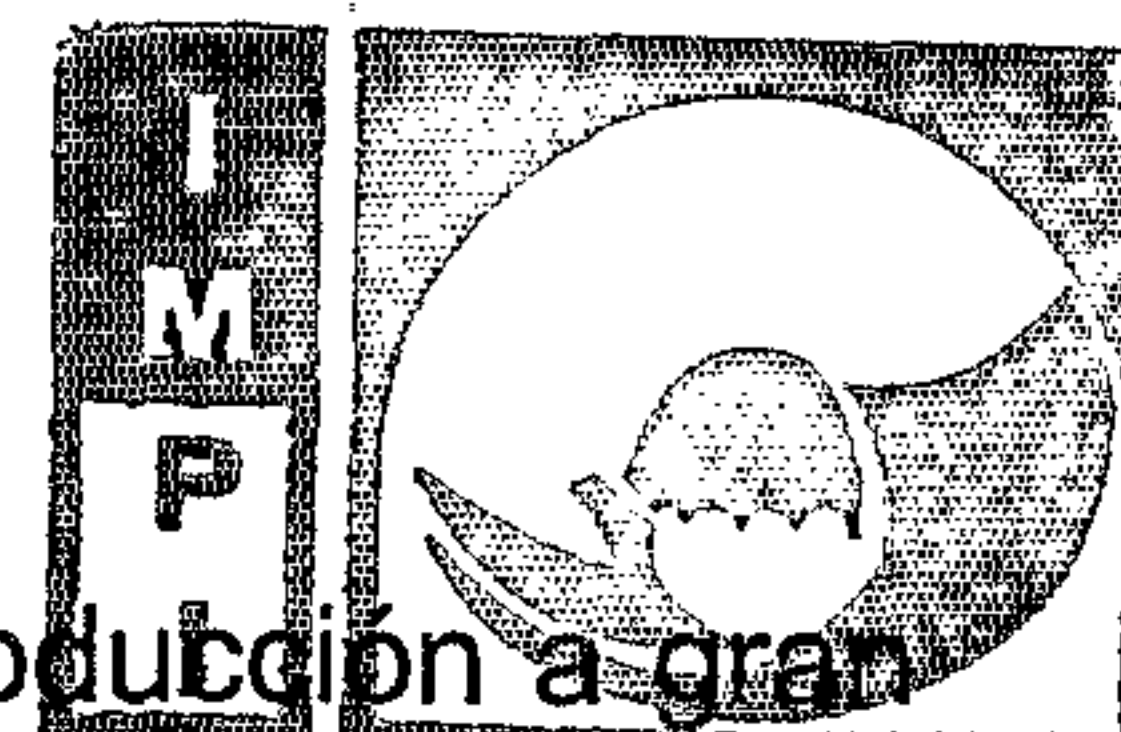
CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 El campo técnico de la presente invención se refiere a un proceso de fermentación. En particular, al aislamiento y caracterización de una cepa de levadura útil en la fermentación de mostos provenientes de distintas fuentes de azúcares para la producción de bebidas alcohólicas y la obtención de etanol.

ANTECEDENTES

10 El tequila -"bebida espirituosa de alta graduación alcohólica obtenida de jugos fermentados provenientes de piñas de Agave maduro previamente cocido"- es una bebida alcohólica de distribución e importancia mundial que se asocia a la cultura Mexicana. Esta bebida es obtenida por destilación de los mostos fermentados
15 procedentes de plantas de la familia Amaryllidaceae (tradicionalmente conocida como *Agavaceae*) en específico de *Agave tequilana* F.A.C. Weber (Conocido también como *Agave tequilana* var. Azul). La Industria del tequila ha experimentado diferentes fases respecto a sus procesos tecnológicos y productivos (Casas, R. 2004; Between Tradition and Modernity: Technological Strategies in Three Tequila Firms,
20 Paper presented at the Second Globelics Conference: Innovation Systems and Development. Emerging Opportunities and Challenges; Beijing, China, October 16-20, 2004). Con la excepción de la fase de hidrólisis, todas las otras tecnologías en el proceso de producción de tequila se derivaron de los procesos de obtención por destilación de otras bebidas alcohólicas, principalmente brandy y ron, así como de
25 otros procesos industriales tales como la obtención de etanol a partir de la caña de azúcar.

La producción de tequila recae principalmente en la combinación de 5 bases tecnológicas: su cultivo, su cocimiento y molienda, su fermentación, su destilación y su maduración. Las características de estas tecnologías y la multicientenaria
30 formulación del tequila han venido cambiando con el tiempo. Sin embargo, el desarrollo tecnológico en esta industria ha sido pobre y la demanda del producto se ha venido incrementando en las últimas décadas. En el desarrollo tecnológico en la



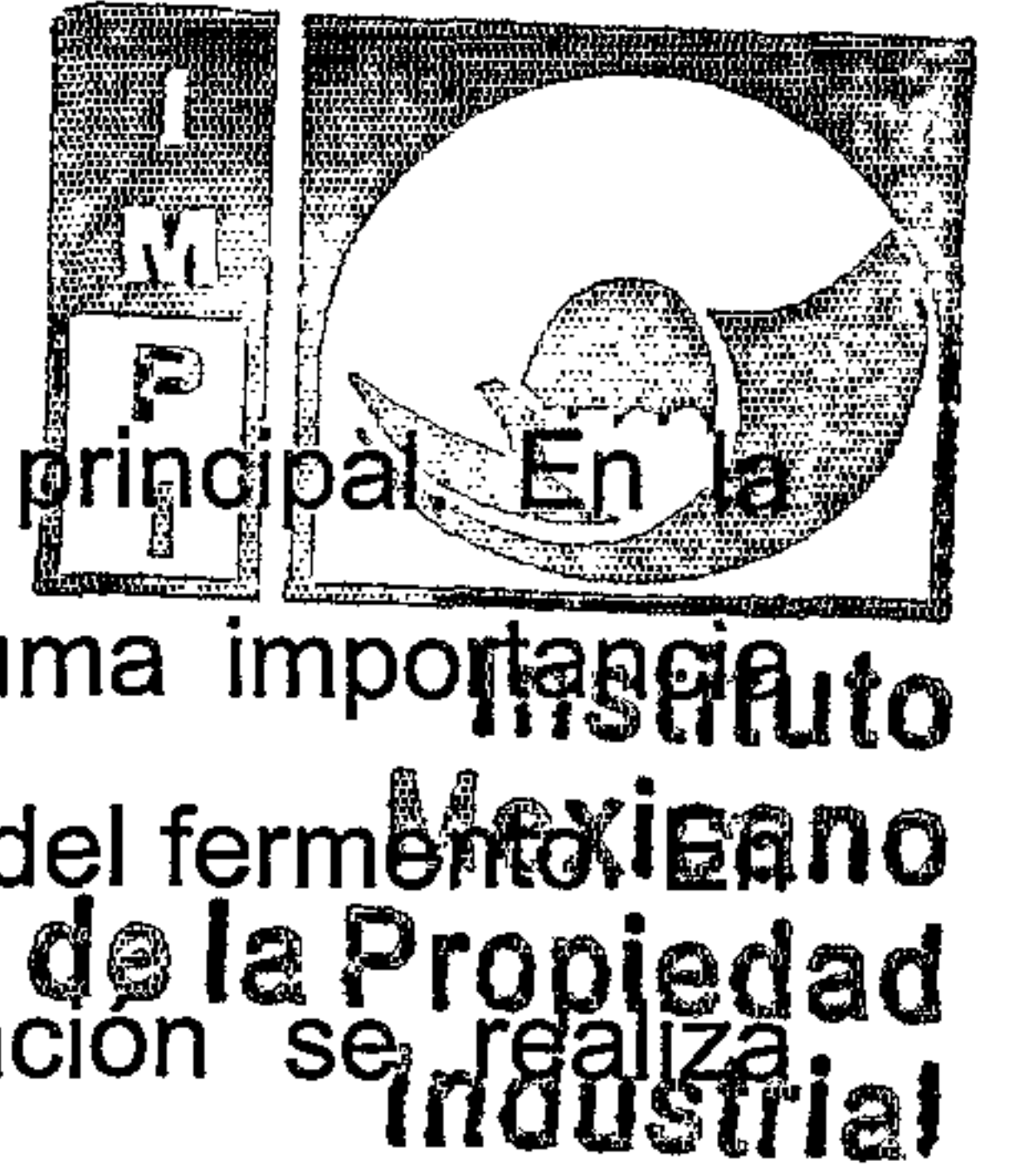
tecnológicas a finales del siglo XIX, tales como el mejoramiento y producción a gran escala de alambiques, la sustitución del horno subterráneo prehispánico por el horno de mampostería, seguida por el uso de autoclaves y la construcción de plantas modernas en lugar de las viejas destilerías, como se describe en: Casas, R. (2004).

5 Between Tradition and Modernity : Technological Strategies in Three Tequila Firms, Paper presented at the Second Globelics Conference: Innovation Systems and Development. Emerging Opportunities and Challenges; Beijing, China, October 16-20; y en la Patente Mexicana MX7179. Debido a que uno de los factores limitantes más importantes en la producción del tequila es la maduración de la planta -de 12 a 10 13 años-, en la década de los 90 se puso gran énfasis en invertir y desarrollar tecnologías agrícolas que ayudaron a la propagación en gran escala de las plantas de Agave como se describe en las Solicitudes de Patente en México 9400703, JL/a/2001/000023, JL/a/2002/000040 y JL/a/2002/000044, logrando acortar el tiempo de maduración hasta 5 años (de 12-13 años a 6-7 años). Fue en esta época cuando se dio el auge del tequila tanto doméstica como internacionalmente, reflejándose en 15 el incremento de la producción y exportación del tequila; quedando la necesidad de implementar desarrollos tecnológicos en otras áreas, específicamente en el proceso de fermentación, que permitan hacer más eficiente el proceso de producción, conservando o mejorando las características organolépticas del producto.

20 El tequila puede ser de dos tipos de acuerdo a la materia prima usada. Tequila 100% de Agave cuando sólo fue usado jugo de Agave en la preparación de los mostos y tequila mixto cuando se usa un máximo de 49% de azúcares adicionales procedentes de otras fuentes distintas al *Agave tequilana* F.A.C. Weber.

25 El tequila posee aromas y sabores particulares que lo hacen distintivo de otras bebidas, los cuales se asocian con la cantidad y tipo de compuestos volátiles adquiridos o presentes en el destilado. Esencialmente estos compuestos volátiles dependerán de varios factores como lo son: área de cultivo de la planta, madurez, cocimiento, fermentación y tipo de levadura usada en ésta, destilación, reposado y añejamiento.

30 En la producción de bebidas alcohólicas y de etanol a partir de azúcares fermentables de distintas fuentes, uno de los parámetros de mayor importancia es la fermentación. La fermentación alcohólica es definida como un proceso bioquímico en



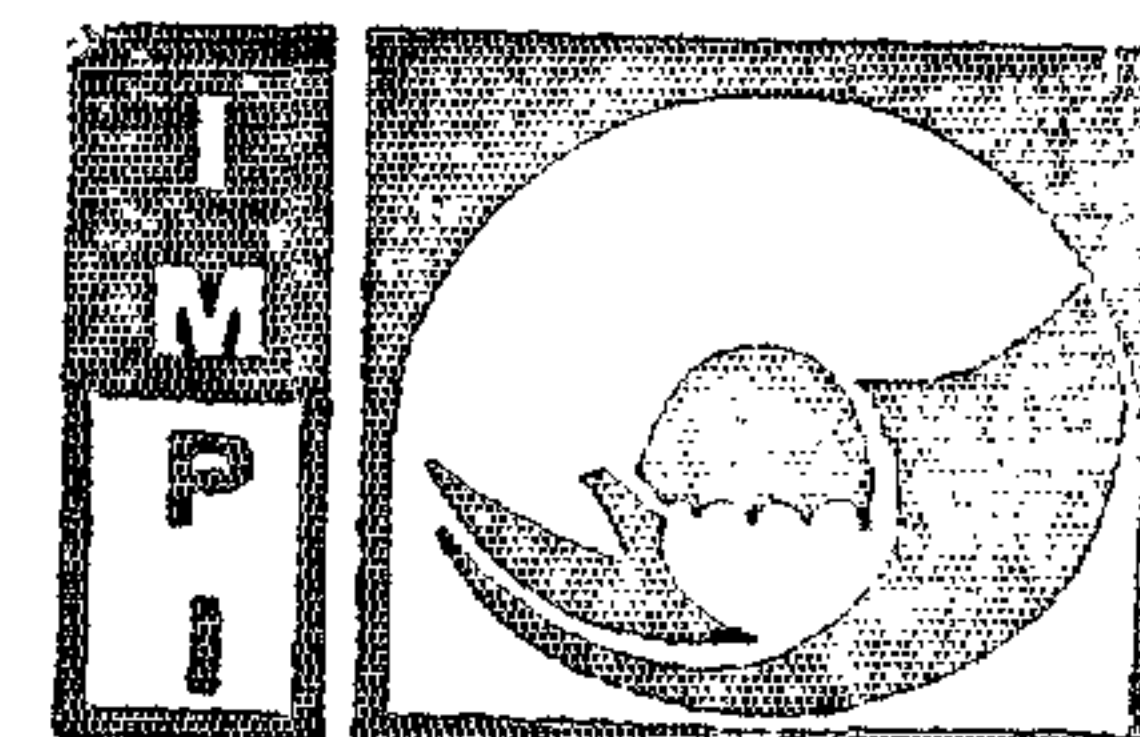
el cual los azúcares son transformados a etanol como producto principal. En la fermentación como proceso industrial el microorganismo es de suma importancia para obtener los rendimientos óptimos en productividad y en calidad del fermento. En la elaboración de bebidas alcohólicas generalmente la fermentación se realiza mediante tres posibilidades:

1) Fermentación natural, en la cual los mostos o jugos azucarados se dejan fermentar de manera natural, mediante los microorganismos presentes en la materia prima o bien en la fábrica, lo cual hace el proceso, lento y con bajos rendimientos.

2) Fermentación natural asistida; en este caso la manera es similar a la anterior, con la diferencia que en este caso se adiciona levaduras de panadería o comerciales para tener un proceso de fermentación en un menor tiempo aunque con detrimento en las características organolépticas del fermento, que se reflejan en una calidad del producto disminuida.

3) Fermentación mediante cepas específicas; en este caso son utilizadas cepas de levaduras u otros microorganismos, así como mezclas de éstos, para obtener fermentos cuyas características organolépticas serán mas homogéneos y los rendimientos generalmente son mayores a los métodos anteriores.

Al respecto, Pinal y colaboradores (Pinal, L. Cedeño, M., Gutiérrez, H., and Alvarez-Jacobs J 1997. Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnology Letters*. 19: 45–47.) describen la importancia que tiene la elección de la cepa de levadura utilizada y el tiempo de fermentación en las características organolépticas de tequila, por lo que para este último caso, existe la necesidad de obtener cepas nativas especializadas en el proceso de fermentación con mejoras en algunos de los parámetros entre los que están, el rendimiento en la conversión de azúcares fermentables a etanol, las características organolépticas, tolerancia a condiciones del proceso (etanol, azúcares, contaminantes, temperatura, pH, etc.), que son factores importantes durante la fermentación.



BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se contempla la selección de una cepa de levadura de origen nativo denominada UMPe-1 depositada en el Microbial Type Culture Collection & Gene Bank localizado en el Institute of Microbial Technology Chandigarh, India, con No. de depósito MTCC 5309, en lo sucesivo denominada como cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309. La levadura se aisló a partir de jugos azucarados de Agave previamente cocido, la cual después de someterla a diversas pruebas fue seleccionada por sus características particulares en la productividad y calidad organoléptica del producto. La posterior identificación taxonómica por amplificación de un fragmento del gen codificante del rRNA 28S reveló que se trata de otra variedad de la cepa *Kluyveromyces marxianus*, a la cual se le denominó UMPe-1.

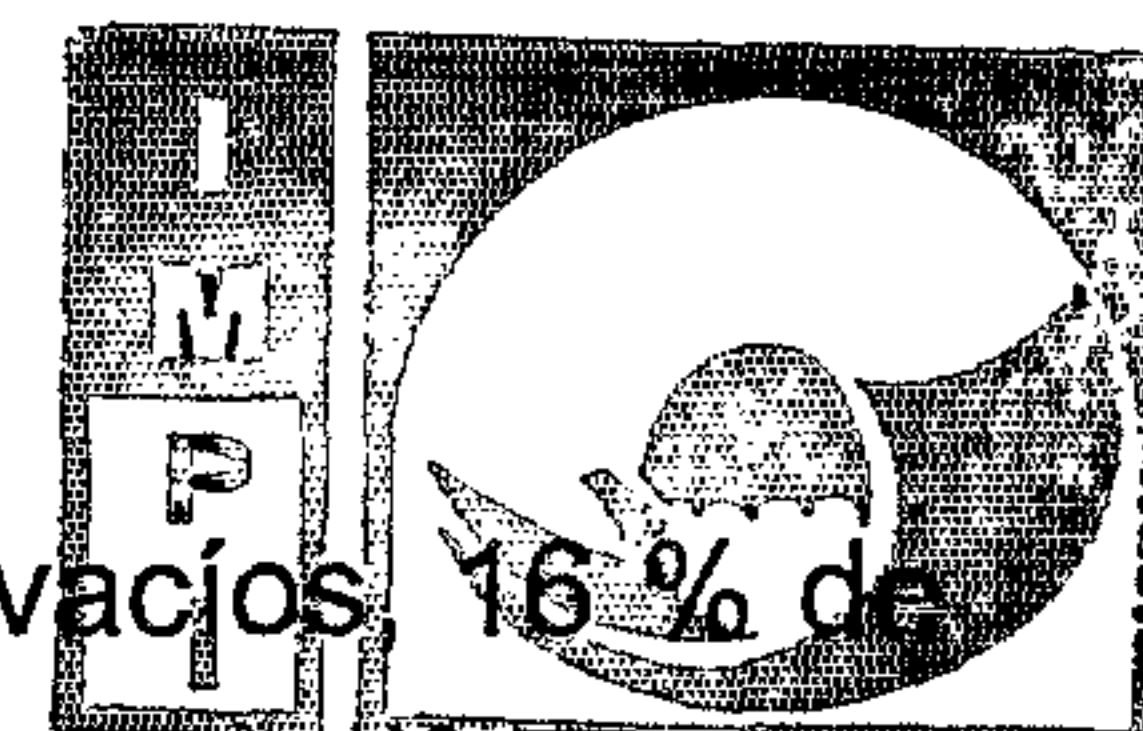
Las pruebas a las que fue sometida la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 demostraron su alto rendimiento en la producción de tequila con las características organolépticas distintivas de dicha bebida, por lo que otro objetivo de la presente invención, es utilizar la levadura para fermentar mostos provenientes de otras fuentes (uvas, caña de azúcar, y otras frutas) para la obtención de bebidas alcohólicas como mezcal, vinos de mesa, ron, charanda y otras.

Debido a la eficiencia de la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 en la fermentación alcohólica de azúcares, un objetivo adicional de la presente invención es la producción de etanol, a partir de productos de desecho que contengan azúcares mediante la utilización de la levadura aislada en la presente invención.

Además, otro objetivo de la presente invención consiste en un proceso para la producción de bebidas alcohólicas y la producción de etanol, en cuyas fases de fermentación comprenden utilizar la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Figura 1. Gráfica de las curvas de crecimiento de la cepa *K. marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 en medio YPD incubando a 30 °C, aerobiosis y 150 rpm de agitación. Las levaduras se crecieron en medio YPD con diferentes concentraciones de glucosa



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

(cuadros, 2 % de glucosa; círculos llenos, 12 % de glucosa; círculos vacíos, 16 % de glucosa). Está graficada la Densidad Óptica a 600 nm (eje Y) contra el tiempo en horas (eje X). n=3.

5 **Figura 2.-** Curvas de crecimiento de la cepa de *K. marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 en medio YPD con glucosa a diferentes concentraciones (cuadros, 2 % de glucosa; círculos llenos, 12 % de glucosa; círculos vacíos 16 % de glucosa), incubando 24 hrs a 30 °C, anaerobiosis y 100 rpm de agitación. Está graficada la Densidad Óptica a 600 nm (eje Y) contra el tiempo en horas (eje X). n=3.

10

Figura 3.- Curvas comparativas de osmotolerancia en anaerobiosis de la cepa de *K. marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 (círculos), con las cepas AM2 (cuadrados) y una cepa de panadería (rombos) en medio YPD con diferentes concentraciones de azúcares (% de glucosa indicado en el eje X), incubando por 24 hrs a 30 °C y 100 rpm de agitación. La escala del eje Y es la Densidad Óptica medida a 600 nm. n=3.

15

Figura 4.- Curvas comparativas de Tolerancia a Etanol en condiciones de anaerobiosis de la cepa de *K. marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 (círculos), con las cepas AM2 (rombos) y una cepa de panadería (cuadrados), en medio YPD con glucosa al 2% y diferentes concentraciones de etanol en el medio (% de etanol v/v indicado en el eje de las X), incubadas por 24 hrs a 30 °C, 100 rpm de agitación. La escala del eje Y es la Densidad Óptica medida a 600 nm. n=3.

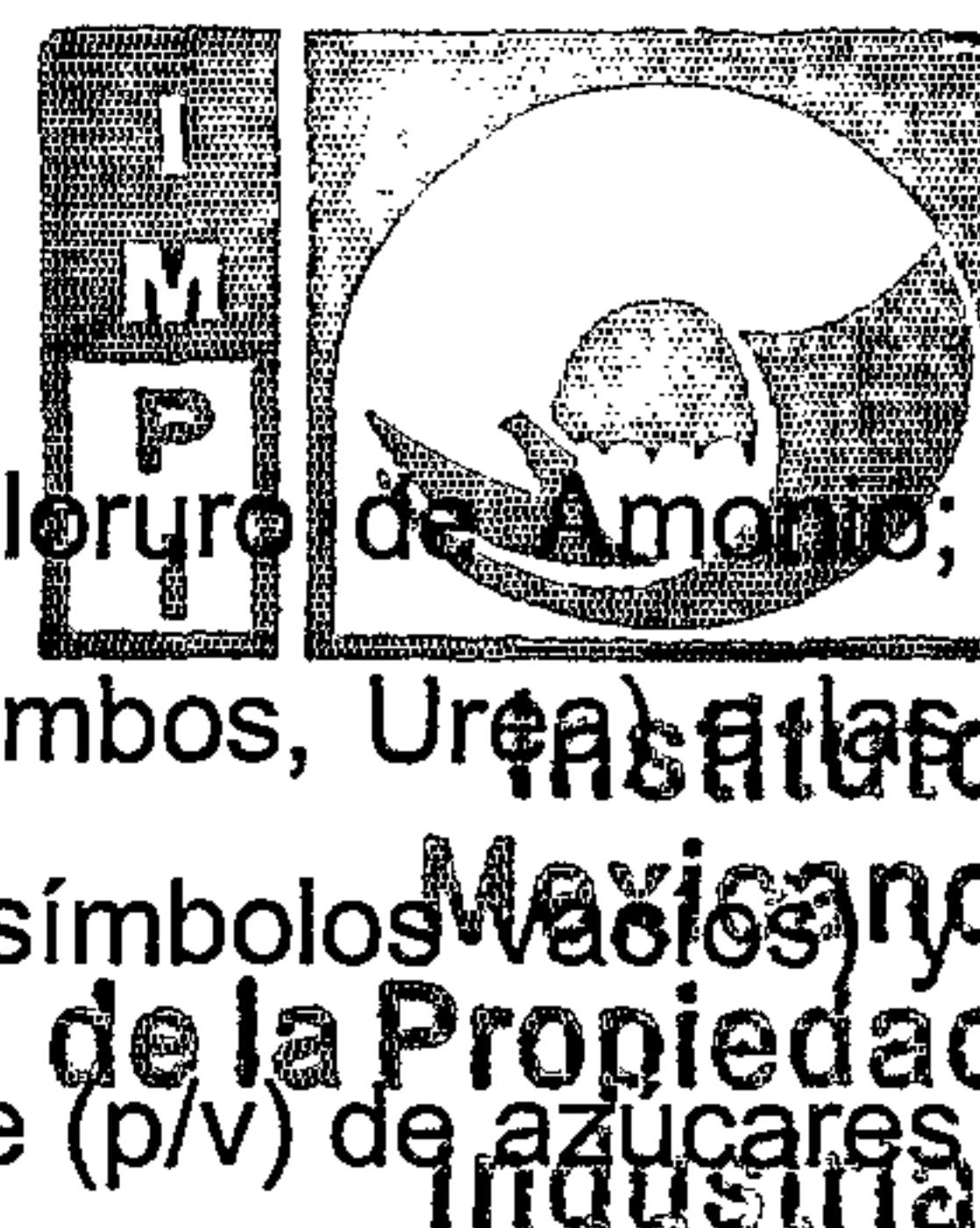
20

Figura 5.- Curvas de crecimiento de la cepa de *K. marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 en medio YPD (glucosa 2%) con las concentraciones de etanol (cuadros vacíos 2%; cuadros llenos, 5%; triángulos arriba, 8%; triángulos abajo, 10%; rombos, 11% y círculos 12% v/v), incubadas a 30 °C, 100 rpm de agitación. Está graficado el tiempo en horas (eje X) contra la Densidad Óptica medida a 600 nm (eje Y). n=3. **A)** Aerobiosis, **B)** Anaerobiosis.

25

30

Figura 6.- Producción de etanol de la cepa *K. marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 en jugo de Agave a 16 °Brix, 30 °C y 100 rpm. **A)** Está graficado el porcentaje de etanol



- producido (eje Y) con diferentes fuentes de amonio (círculos, Cloruro de Amonio; triángulos, Fosfato de Amonio; cuadrados, Sulfato de Amonio; rombos, Urea) a diferentes concentraciones indicadas en el eje X (g/L), a 24 hrs (símbolos vacíos) y 48 hrs (símbolos llenos). **B)** Está graficado en el eje Y el porcentaje (p/v) de azúcares remanentes (símbolos llenos) y la producción de etanol (% v/v) (símbolos vacíos) a 0.8 g/L de diferentes fuentes de amonio (cuadrados, Cloruro de Amonio; triángulos, Fosfato de Amonio; círculos, Sulfato de Amonio; rombos, Urea) contra el tiempo en horas (eje X).
- 5
- 10 **Figura 7.-** Cuantificación de azúcares fermentables y etanol durante la fermentación de un tanque con 11,534 litros de mosto de *Agave tequilana* F.A.C. Weber utilizando la cepa de *Kluyverimyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309. Los principales picos corresponden: a, sacarosa u otros disacaridos; b, glucosa; c, fructosa y d, etanol. La cuantificación se realizó mediante HPLC a los tiempos de fermentación indicados. La
- 15 escala corresponde a unidades expresadas en mVolts.
- Figura 8.-** Cromatograma del tequila obtenido a nivel industrial por fermentación de jugo de *Agave tequilana* F.A.C. Weber con la cepa de *Kluyverimyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 en la Tequilera Embajador S.A. de C.V. El análisis fue realizado
- 20 a 1 μ L del tequila obtenido a 54-55° Alc. vol. en un cromatógrafo de gases certificado por el CRT (Consejo Regulador del Tequila). La cuantificación y correspondencia de los datos del cromatograma son mostrados en la tabla 5A. Eje Y corresponde a abundancia relativa (mvolts) y eje X, tiempos de retención.
- 25 **Figura 9.-** Cromatograma obtenido por Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de Masas (CG-EM) de tres diferentes muestras de tequilas, obtenidos a nivel industrial. El análisis fue realizado a 1 μ L del tequila obtenido a 38-40° Alc. vol. **A** y **B** cromatogramas de dos lotes distintos de tequila obtenidos en Mayo del 2006 y Enero del 2007, respectivamente; a partir de mostos de *Agave*
- 30 *tequilana* F.A.C. Weber, fermentados con la cepa de *Kluyverimyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309. **C** cromatograma obtenido del tequila obtenido a partir de

