



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

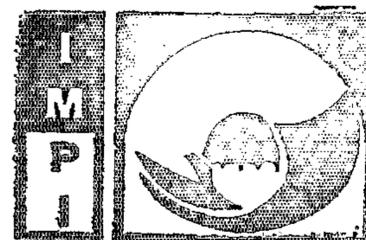


MX/a/2007/14445

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



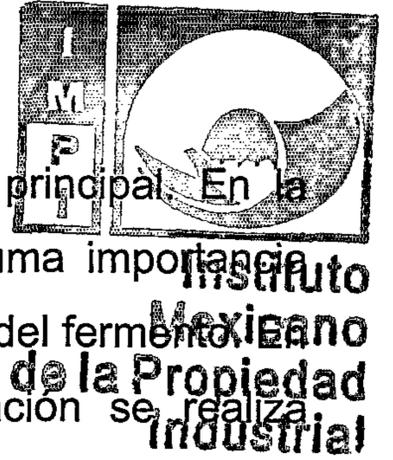
tecnológicas a finales del siglo XIX, tales como el mejoramiento y producción a gran escala de alambiques, la sustitución del horno subterráneo prehispánico por el horno de mampostería, seguida por el uso de autoclaves y la construcción de plantas modernas en lugar de las viejas destilerías, como se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



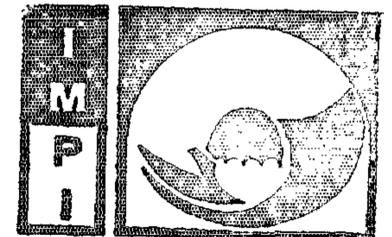
el cual los azúcares son transformados a etanol como producto principal. En la fermentación como proceso industrial el microorganismo es de suma importancia para obtener los rendimientos óptimos en productividad y en calidad del fermento. En la elaboración de bebidas alcohólicas generalmente la fermentación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

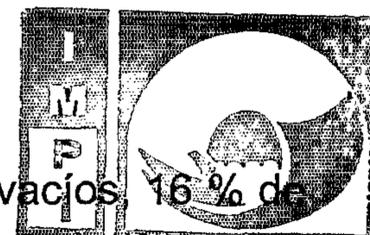
Las pruebas a las que fue sometida la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 demostraron su alto rendimiento en la producción de tequila con las características organolépticas distintivas de dicha bebida, por lo que otro objetivo de la presente invención, es utilizar la levadura para fermentar 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.

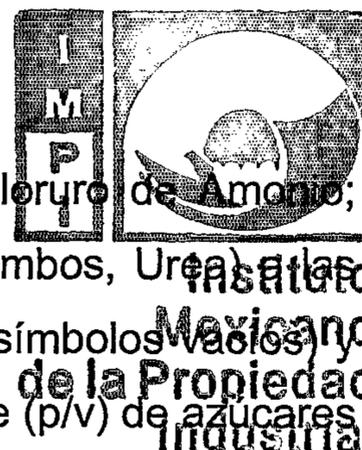
20

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

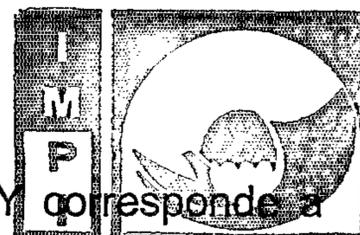
30

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

mostos de agave fermentados con levadura de panificación. Eje Y corresponde a abundancia relativa (mvolts) y eje X, tiempos de retención.



**Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial**

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5

Obtención de la cepa de Levadura:

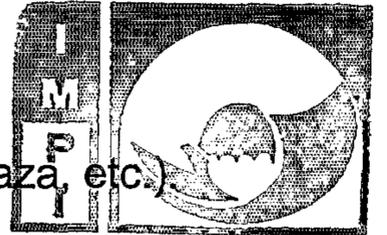
Se colectaron muestras de Agave en proceso de descomposición, vinazas de varias tequileras de la región de nominación (Jalisco y Michoacán, México) y se diluyeron con una solución de sacarosa entre 8 a 12 °Brix. Las muestras diluidas se dejaron a temperatura ambiente (22-25 °C) para favorecer el desarrollo de microorganismos presentes por 48 a 72 h. Posteriormente, se realizaron diluciones del cultivo en medio YPD (Extracto de levadura, peptona y dextrosa) y las diluciones fueron espatuladas en placas de medio YPD sólido. De lo anterior se obtuvieron múltiples colonias aisladas de microorganismos en primer indicio levaduras. De las distintas placas fueron seleccionadas alrededor de 100 colonias cuya morfología colonial sugería ser diferentes. Estas 100 colonias fueron sometidas a un proceso de purificación para la obtención de un cultivo puro, esto mediante técnicas microbiológicas clásicas, conocidas por un experto en la materia.

El total de cepas levaduriformes obtenidas fueron sometidas a procesos de selección descritos abajo.

Selección de la levadura fermentadora:

Las cepas obtenidas de los diversos cultivos posterior a la purificación de cada una fueron sometidas a varias pruebas de selección:

- 1.- Morfología microscópica.
- 2.- Método de para-rosa anilina.
- 3.- Velocidad de crecimiento aeróbico.
- 4.- Velocidad de crecimiento anaeróbico.
- 5.- Osmotolerancia a concentraciones elevadas de azúcares.
- 6.- Susceptibilidad a etanol.
- 7.- Producción de etanol en medio sintético YPD-sacarosa, YPD-glucosa.
- 8.- Efecto de fuente de nitrógeno en pruebas de fermentación a nivel laboratorio.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

9.- Producción de etanol en mostos fermentables (jugos de Agave, melaza, etc.)

1.- Morfología microscópica.

Al total de las 100 colonias aisladas y purificadas como cultivo puro, se sometieron a elaboración de frotis fresco y seco teñido con azul de metileno, o por tinción Gram y fueron observados por microscopia visible usando objetivo 40 X y 100 X. Del examen microscópico se seleccionaron 86 cepas que presentaron morfología característica de levaduras. Estas 86 cepas se sometieron a la prueba siguiente (2).

10 **2.- Selección por el método de la para-rosa anilina:**

Se prepararon cajas de medio sólido YPD adicionando 8 ml de *para-rosa* anilina disuelta en etanol en las placas. Las distintas cepas aisladas (86 cepas) se inocularon por picadura en las cajas petri y se incubaron por 48 h a 30 °C para su crecimiento. Las placas fueron observadas y se seleccionaron las cepas de levadura que presentaron un halo de coloración rosado de mayores dimensiones e intensidad alrededor de la colonia. Este halo es producido como indicativo cualitativo de formación de acetaldehído en cepas productoras de etanol (Conway, T., G.W. Sewell, Y.A. Osman, and L.O. Ingram 1987, Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 169: 2591-2597.). Con esta prueba se seleccionaron 16 cepas, las cuales se sometieron a las pruebas siguientes (3, 4, 5 y 6).

3.- Velocidad de crecimiento aeróbico:

La velocidad de crecimiento aeróbico se realizó en matraces erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio líquido YPD usando glucosa como fuente de carbono, incubando a 30 °C y 150 rpm de agitación. El medio de cultivo fue inoculado a una dilución 1:50 con un cultivo saturado de la levadura a probar, crecido de 12 a 18 horas a 30 °C y agitación. La determinación del crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro. El ensayo fue repetido al menos tres veces y graficado. Después de esta prueba se seleccionaron las cepas que presentaron las mayores velocidades de crecimiento bajo las condiciones probadas. En la Figura 1



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

se encuentra graficada la curva de crecimiento de la cepa de *marxianus* UMPe-1 No. MTCC 5309 en condiciones aeróbicas.

4.- Velocidad de crecimiento anaeróbico:

5 La velocidad de crecimiento anaeróbico se realizó en tubos de ensaye con tapón de rosca hermético de 15 ml con 10 ml de medio líquido YPD usando glucosa a 20 g/L como fuente de carbono, incubando a 30 °C y 100 rpm de agitación. El medio de cultivo fue inoculado a una dilución 1:50 con un cultivo saturado de la levadura a probar crecido de 12-18 horas a 30 °C y agitación. La determinación del crecimiento
10 fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro. Después de esta prueba, se seleccionaron las cepas que presentaron las mayores velocidades de crecimiento bajo las condiciones probadas. En la Figura 2 se encuentra graficada la curva de crecimiento de la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 en condiciones anaeróbicas.

15

5.- Osmotolerancia a azúcares.

La osmotolerancia se realizó midiendo la velocidad de crecimiento en condiciones anaeróbicas realizada en tubos de ensaye con tapón de rosca hermético de 15 ml con 10 ml de medio líquido YPD usando glucosa a diferentes concentraciones como
20 fuente de carbono, incubando a 30 °C y 100 rpm de agitación. El medio de cultivo fue inoculado a una dilución 1:50 con un cultivo saturado de la levadura a probar crecido de 12 a 18 horas, a 30 °C y agitación. La determinación del crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro. Después de esta prueba fueron seleccionadas las cepas que presentaron las mayores
25 velocidades de crecimiento a las más altas concentraciones de azúcar presente en el medio (Fig. 3). Como se puede observar, la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 fue capaz de crecer eficientemente a concentración de 250 g/L (25 °Brix) de glucosa, comparado con el crecimiento presentado por una levadura de panificación la cual presentó afección a concentraciones por arriba de 130 g/L (13
30 °Brix) de glucosa en el medio, observando que la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 fue la que presentó una mayor osmotolerancia a glucosa presente en el medio (Fig. 3).



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Resultados similares se obtuvieron cuando las cepas se crecieron en condiciones aeróbicas (datos no presentados).

6.- Susceptibilidad a etanol.

5 Las pruebas de susceptibilidad a etanol se realizaron midiendo el crecimiento en condiciones anaeróbicas realizada en tubos de ensaye con tapón de rosca hermético de 15 ml y 10 ml de medio líquido YPD, usando glucosa al 2% y diferentes concentraciones de etanol adicionado a los cultivos (0 a 20%, v/v). El medio de cultivo fue inoculado a una dilución 1:50 con un cultivo saturado crecido de 12 a 18
10 horas, e incubando a 30 °C y 100 rpm de agitación por 18-24 horas. La determinación del crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro.

Después de esta prueba fueron seleccionadas las cepas que presentaron la mayor tolerancia a etanol (Fig. 4). Posteriormente, la cepa *Kluyveromyces marxianus*
15 UMPe-1 MTCC 5309 fue inoculada en matraces con medio YPD con 20 g/L (2%) de glucosa y diferentes concentraciones de etanol (0, 5, 8, 10, 11 y 12% de etanol v/v) y el crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm (Fig. 5). Los resultados mostraron que la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309, es capaz de crecer eficientemente en presencia de concentraciones de etanol menores a 10%
20 en condiciones anaeróbicas. Adicionalmente, a concentraciones de 12% de etanol presente en el medio se muestra que la cepa es capaz de crecer, aunque a una menor velocidad. Cabe mencionar que 8.18 % de etanol, es la producción máxima de alcohol producido a partir de mostos con 16 °Brix de concentración tomando en cuenta una eficiencia de fermentación del 100 % y suponiendo una concentración
25 equivalente a 160 g/L de glucosa.

7.- Producción de etanol en medio sintético YPD-glucosa (prueba de micro-fermentación en tubos).

Las pruebas de fermentación se realizaron en tubos con tapón de rosca hermética de
30 15 ml adicionados con 10 ml de medio sintético YPD usando glucosa a una concentración de 160 y 220 g/L (16 y 22 °Brix, respectivamente). Los tubos fueron inoculados a una dilución del 1:50 del volumen con un cultivo saturado de las



levaduras a probar, crecidos de 12 a 18 horas, e incubando a 30 °C y 100 rpm de agitación en un rotador de tubos. La determinación del crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro y la concentración de etanol producido se determinó mediante cromatografía de gases. Mediante este

5 fueron seleccionadas las cepas que produjeron mayores cantidades de etanol en la micro-fermentación (Tabla 1).

Tabla 1.- Prueba de micro-fermentación para la cepa de *K. marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 en medio YPD con 160 g/L y 220 g/L de glucosa, respectivamente.

10

CEPA	Etanol ^a (% v/v)		Eficiencia ^b (%)	
	160 g/L	220 g/L	160 g/L	220 g/L
UMPe-1	10.2	11.6	98.6	81.6
15 UMArn-3	9.5	9.5	91.8	66.8
AMP-1	8.8	9.3	85.1	65.4
Cepa de panadería	8.9	9.5	86.0	66.8

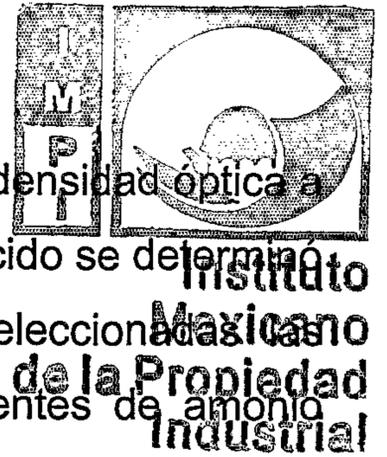
^a Determinación mediante cromatografía de gases a las 48 hrs de fermentación.

20 ^b Calculada en relación a la conversión teórica esperada (densidad 0.789, 1 g. de glucosa producirá 0.51 g de etanol).

8.- Efecto de fuente de nitrógeno adicional en pruebas de fermentación a nivel laboratorio.

25 El efecto de la adición de fuente nitrogenada se realizó en pruebas de microfermentación realizadas en frascos de 150 ml tapados con tapones de algodón conteniendo 100 ml de mostos preparados con jugos de Agave o melaza estériles, a 16 °Brix. Los frascos con los respectivos mostos fueron suplementados con diferentes fuentes de nitrógeno (urea, cloruro de amonio, fosfato de amonio, y sulfato

30 de amonio) a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 mg/L). Los frascos fueron inoculados a una dilución del 5% del volumen con un cultivo saturado de las levaduras a probar, crecidos de 12 a 18 horas, e incubando a 30 °C y 100 rpm



de agitación. La determinación del crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro y la concentración de etanol producido se determinó mediante HPLC (Fig. 6). Después de estas pruebas fueron seleccionadas las concentraciones de entre 0.025 y 1 g/L de cualquiera de las fuentes de amonio probadas para ensayos posteriores.

9.- Pruebas de fermentación en mostos formulados con jugo de Agave, melaza y otras fuentes de azúcares, (prueba de micro-fermentación en frascos).

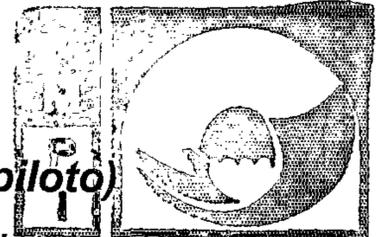
Las pruebas de fermentación se realizaron en frascos de 150 ml tapados con tapones de algodón conteniendo 100 ml de mostos preparados con jugos de Agave o melaza diluidos a 16 ° Brix, estériles y suplementados con 0.025 a 1 g/L de sulfato de amonio. Los frascos fueron inoculados a una dilución del 5% del volumen con un cultivo saturado de las levaduras a probar, fueron incubados a 30 ° C y 100 rpm de agitación. La determinación del crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro y la concentración de etanol producido se determinó mediante cromatografía de líquidos (HPLC). Adicionalmente se realizaron pruebas organolépticas de aromas y sabor de los fermentos. Después de éstas pruebas fueron seleccionadas las cepas que presentaron mayores cantidades de etanol en la prueba de micro-fermentación y mejores características organolépticas (Tabla 2).

Tabla 2.- Prueba de micro-fermentación (100 ml) para la cepa de *K. marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 en jugo de *Agave tequilana* F.A.C. Weber a 16 ° Brix.

CEPA	Etanol (% , v/v) ^a	Características organolépticas ^b
UMPe-1	9.5	Aroma y sabor frutal
UMArn-3	9.0	Poco aroma y sabor frutal
AMP-1	8.7	Aroma y sabor frutal
Cepa de Panadería	8.5	Sin aroma o sabor frutal

^a Determinación mediante HPLC a las 48 hrs de fermentación.

^b Apreciación olfativa y gustativa personal.



10.- Prueba de fermentación a nivel laboratorio (fermentación piloto)

Las pruebas de fermentación a nivel laboratorio (fermentaciones piloto), se realizaron en garrafones de 18 L conteniendo 10 L de mostos preparados con jugos de *Agave tequilana* F.A.C. Weber estériles, diluidos a 16 °Brix. Los garrafones con los respectivos mostos fueron suplementados con fuentes de nitrógeno adicional (sulfato de amonio entre 0.025 y 1 g/L). Los garrafones fueron inoculados a una dilución del 5% del volumen con un cultivo saturado de la levadura a probar, crecido de 12 a 18 horas, presentando una cuenta total inicial de células de levadura de 10×10^6 células/ml. Los garrafones fueron incubando a temperatura ambiente 20-26 °C sin agitación. A las fermentaciones piloto les fue determinado crecimiento del cultivo (monitoreado por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro), consumo de azúcares y etanol producido (mediante cromatografía líquida de alta resolución, HPLC). Adicionalmente se realizaron pruebas organolépticas de aromas y sabor de los fermentos. Después de estas pruebas fueron seleccionadas las cepas que presentaron mayores cantidades de etanol y mejores características organolépticas (Tabla 3).

Tabla 3.- Prueba de fermentación piloto (10 L) para la cepa de *K. marxianus* UMPE-1 MTCC 5309 en jugo de *Agave tequilana* F.A.C. Weber a 16 °Brix.

20

CEPA	Etanol ^a (% v/v)	Tequila blanco (Litros)	Características organoléptica del tequila blanco bi-destilado ^b
UMPe-1	9.7	2.5 (55° Alc.vol.)	Aromático y sabor frutal, no seco y suave.
UMArn-3	8.8	2.2 (50° Alc.vol.)	Poco aroma y desabrido, seco, fuerte.
AMP-1	7.9	2.0 (50° Alc.vol.)	Aromático y sabor frutal, seco.

30 ^a Determinación mediante cromatografía de líquidos (HPLC) a las 48 hrs de fermentación. ^b Apreciación olfativa y gustativa personal.



- Los mostos fermentados obtenidos posteriormente fueron sometidos a destilación, utilizando un sistema de destilación simple en el que por cada lote fueron destilados 3 L. En la primera destilación se desecharon cabezas 1% del volumen de destilado (30 ml) y colas del destilado (posterior a 10 % etanol en el destilado). Una vez destilado el total del mosto, el destrozado fue sometido a una segunda destilación, eliminando de igual manera las cabezas y colas de la destilación. El producto de la segunda destilación posteriormente fue sometido a análisis organoléptico y determinación de etanol, metanol y alcoholes superiores mediante cromatografía de gases.
- 10 Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 3. En este punto fue seleccionada para escalamiento industrial la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309, en base a las distintas características presentadas (velocidad de crecimiento, osmotolerancia, tolerancia a etanol, mayor productividad de etanol en YPD y jugo de Agave, aroma y sabor frutal del mosto fermentado y del destilado obtenido, entre otras).

11.- Prueba de fermentación a nivel industrial

La prueba de fermentación a nivel industrial se desarrollo de la siguiente manera:

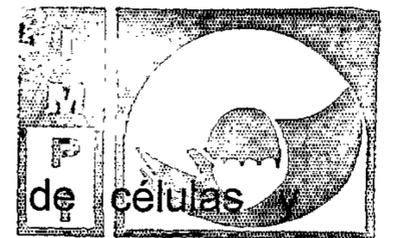
20

A) Desarrollo del inóculo:

La levadura de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 fue crecida en una placa petri con medio YPD (sacarosa 2%) por 12 hrs a 30 °C. De la caja se tomó una colonia aislada la cual se inoculó en un tubo de ensaye con 4 ml de medio de cultivo YPD (sacarosa 2%) estéril y se incubó por 12 hrs a 30 °C y 100 rpm de agitación. Los 4 ml del cultivo crecido posteriormente fueron adicionados a un matraz de fermentación de 1 L, conteniendo 400 ml de medio líquido YPD (sacarosa 2%) estéril y se incubó 12 hrs a 30 °C y 150 rpm de agitación. El total del cultivo posteriormente fue utilizado para inocular un garrafón de 20 L de volumen, conteniendo 15 L de jugo estéril de *Agave tequilana* F.A.C. Weber diluido de entre 2 y 10 °Brix, incubando por 12 hrs a temperatura ambiente (18-25 °C), agitación (con una barra magnética 100 rpm) y aireación 1 L/min. Posteriormente este cultivo fue sometido a análisis

25

30



microscópico para determinar contaminación bacteriana, conteo de células viables y viabilidad. Los 15 L de cultivo a una densidad celular de 145×10^6 células/ml fueron trasladados a la industria tequilera "Tequilera Embajador S.A. de C.V." y utilizado para la preparación del pie de levadura.

5

B) Desarrollo del pie de levadura para la fermentación:

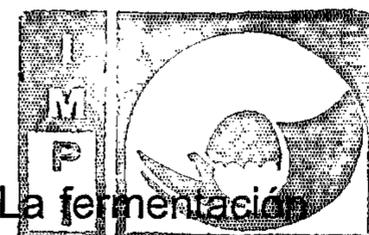
A 400 L de jugo de Agave diluido entre 2 y 10 °Brix se les adicionaron los 15 L del inóculo de la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 desarrollada en laboratorio como se describió en el paso anterior. Además fue adicionado fosfato de amonio a una concentración de entre 0.025 y 1 g/L, el antibacteriano disulfuro de amonio (100 mg/L) y aireación mediante burbujeo de aire de un compresor (aprox. 25 L/min). El desarrollo del cultivo se realizó en un tanque de 1,000 L en condiciones sin esterilizar y a temperatura ambiente (15-22 °C) durante 18 hrs. Transcurrido el periodo de tiempo se realizó el escalamiento a 4,000 L, utilizando un tanque de 15,000 L, bajo las mismas condiciones anteriores por 18 hrs. Transcurrido el tiempo indicado se realizó análisis microbiológico, conteo de células y viabilidad. Los resultados mostraron baja o nula presencia de bacterias, células totales de 145×10^6 células/ml y una viabilidad de 98% mediante el método de azul de tripano y/o de azul de metileno. Este pie de levadura fue calculado para la inoculación de 45,000 L de mosto a fermentar (5-10% en volumen).

20

C) Preparación de mostos y fermentación:

8.7 toneladas de *Agave tequilana* F.A.C. Weber de la región de los Altos de Jalisco, perteneciente a la Sociedad Productiva "Altos Ciénega Unidos S.L.R.L." de Atotonilco el Alto, Jalisco, México, fueron sometidas a cocimiento en una autoclave durante 4 hrs de vapor a 90°C de temperatura y 8 hrs de reposo. El Agave cocido posteriormente fue sometido a molienda para la extracción de jugos. El jugo fue utilizado para la preparación del mosto a una concentración de 16 °Brix (medidos mediante densímetro industrial como lo realiza la empresa), el mosto fue suplementado con fosfato de amonio a una concentración de entre 0.025 y 1 g/L. El pie de levadura adicionado fue 1,200 L para un volumen final de mosto de 11,500 L a 16 °Brix y el antibacteriano disulfuro de amonio 50 mg/L. El mosto inoculado se dejó

30



fermentar a temperatura ambiente, entre los 20 y 28 °C, en reposo. La fermentación se monitoreó durante 0 a 90 hrs tomando muestras a los tiempos indicados y sometidos a los análisis siguientes: pureza del cultivo, conteo de células, viabilidad, determinación de azúcares y etanol mediante HPLC (Fig. 7) y Tabla 4.

- 5 Una vez declarado como mosto muerto el fermento fue sometido a destilación (destrozado).

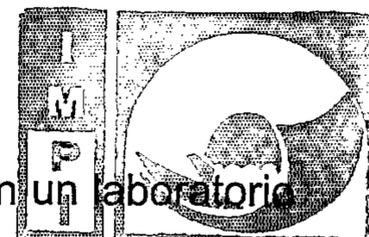
10 **Tabla 4.-** Prueba de fermentación a nivel industrial (aprox. 13,000 L) para la cepa de *K. marxianus* UMPE-1 MTCC 5309 en jugo de *Agave tequilana* F.A.C. Weber a 16 °Brix (determinados por la empresa).

	Tiempo de muestreo (horas)	Sacarosa (% p/v) ^a	Glucosa (% p/v) ^a	Fructosa (% p/v) ^a	Etanol (% v/v) ^a
15	0	0.537	1.103	9.145	0.0
	12	0.377	0.0	2.66	3.53
	42	1.016	0.0	0.69	7.34
	72	0.626	0.0	0.33	7.45
	90	0.66	0.0	0.0	6.88

20 ^a La cuantificación de azúcares fermentables y etanol durante la fermentación de mosto se realizó mediante HPLC.

D) Destilación de mostos:

- 25 La destilación se realizó en alambiques de acero inoxidable con capacidad de 3000 L, a una temperatura de 90°C y corte de cabezas de 15 L y colas a una riqueza alcohólica medido en los condensados de 10° Alc. Vol. La riqueza alcohólica del destrozado fue en promedio alrededor de 32° Alc. Vol. El cual posteriormente fue sometido a una segunda destilación bajo el mismo criterio de corte. El producto
- 30 obtenido de la segunda destilación presentó una riqueza alcohólica de alrededor de



55° Alc. vol. el cual fue analizado mediante cromatografía de gases en un laboratorio certificado por el CRT (Consejo Regulador del Tequila), con la finalidad de determinar que las cantidades de metanol y de alcoholes superiores se encuentran dentro de las concentraciones permitidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-006-

5 SCFI-2005, figura 8 y tabla 5A y 5B.

Tabla 5A.- Datos obtenidos por el Cromatógrafo de gases al analizar 1 μL del tequila obtenido a 54-55° Alc. vol. Los datos corresponden a los principales picos representados en la figura 8.

10

Tiempo de Retención (min)	Pico	Área	Concentración (ng/100 μL)	Grupo	Compuesto
3.915	a	4.40707	7.415557	1	Acetaldehído
6.335	b	1.86066	2.63423	2	Acetato de etilo
6.601	c	204.437	314.14527	3	Metanol
7.51	d	n.d.	n.d	-	Etanol
20 9.107	e	78.6324	75.15825	4	n-Propanol
10.023	f	140.9265	115.51871	4	Isobutanol
10.405	g	868.6881	76.63920	4	2-Pentanol
10.709	h	2.36410	2.05101	4	n-Butanol
11.454	i	386.534	305.93821	4	Alcohol Isoamílico
25 12.946	j	1.77890	2.93211	2	Lactato de etilo

n.d. dato no estimado por salir del rango de determinación.

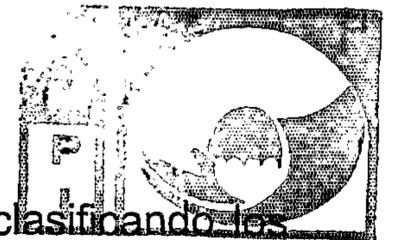


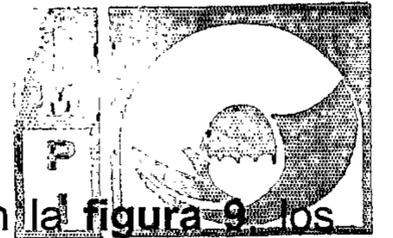
Tabla 5B. Resumen de los resultados presentados en la tabla 5A, clasificando los compuestos identificados en el cromatograma de la figura 8 por grupo.

Grupo	Área	Concentración (ng/100 μ L)	Nombre del Grupo	
5				
	1	4.40707	7.41	Acetaldehído
	3	3.63964	5.56	Esteres
	3	204.43735	314.14	Metanol
10	4	608.45762	498.66	Alcoholes superiores

El análisis mostró que el destilado obtenido presentó 54.1° Alc. Vol. conteniendo una concentración de metanol de 314.14 mg/100 ml, alcoholes superiores (498 mg/100 ml), ésteres (5.56 mg/100 ml), aldehídos (7.41 mg/100 ml). Al hacer los cálculos correspondientes a una riqueza alcohólica de 42° Alc. Vol. Se presenta el contenido de metanol de 243.87 mg/100 ml, alcoholes superiores (386.6 mg/100 ml), ésteres (4.31 mg/100 ml), aldehídos (5.75 mg/100 ml). Como se puede observar, los valores de metanol y alcoholes superiores se encontraron por debajo de los límites máximos permisibles por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005.

E) Perfil cromatográfico de los compuestos aromáticos presentes en el tequila producido a nivel industrial.

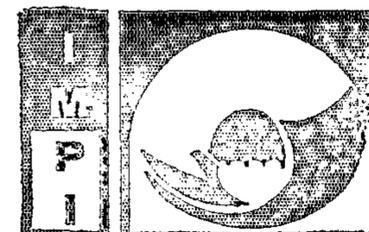
Con la finalidad de obtener un análisis cualitativo de las características organolépticas del tequila obtenido a nivel industrial, se realizó un análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de Masas, para obtener el perfil de compuesto aromáticos presentes en el tequila y que son responsables del aroma



y sabor característicos del producto. Como podemos observar en la figura 9 los perfiles de compuestos aromáticos presentes en dos lotes distintos de tequila obtenido en las mismas condiciones pero en diferentes fechas (Mayo de 2006, figura 9A; Enero de 2007, figura 9B) fueron similares y característicos del tequila obtenido por destilación de los mostos fermentados con la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309. También podemos observar una diferencia marcada entre los perfiles de compuestos aromáticos de éste tequila (identificándose 29 diferentes compuestos aromáticos) con el perfil de compuestos aromáticos obtenido del tequila obtenido bajo las condiciones realizadas por la tequilera "Tequilera Embajador S.A. de C.V." con el mosto de *Agave tequilana* F.A.C. Weber fermentado con una levadura de panificación (Figura 9C). Los principales picos observados en las Cromatografías de Gases acoplada a Espectroscopia de Masas están representados en la tabla 6.

Tabla 6.- Compuestos aromáticos identificados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) en el tequila producido por la cepa *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309.

Pico	Nombre del compuesto
1	1,2-butanediol
2	ethanol
3	2,3-butanedione
4	1-propanol
5	1-propanol,2-methyl-
6	1-butanol
7	cyclopentanone
8	1-butanol,3-methyl-
9	3-buten-1-ol-3,methyl-
10	3(2H)-furanone,dihydro-2-methyl



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

11	4-penten-1-ol
12	1-pentanol,3-methyl
13	propanoic acid, 2-hydroxy-,ethyl ester
14	octanoic acid ethyl ester
15	cis-linalool-oxide
16	furfural
17	ethanone,1-(2-furanyl)-
18	linalool
19	2-furancarboxaldehyde,5-methyl-
20	decanoic acid, ethyl ester
21	2-furanmethanol
22	(+).alpha-terpineol
23	desconocido
24	acetic acid,2-phenylethylester
25	dodecanoic acid ethyl ester
26	phenylethyl alcohol
27	nerolidol
28	1-hexadecanol
29	thymol

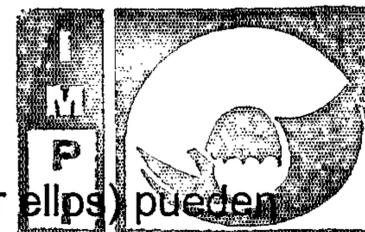
Nota: Los nombres de los compuestos identificados por espectrometría de masas fueron obtenidos de la librería de espectros del equipo, los cuales presentaron identidades arriba del 90%.

5

E) Cálculos de rendimientos.

Los rendimientos obtenidos en el proceso de producción del tequila utilizando la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 se resumen en las tablas 7 y 8.

Como se puede observar, los datos de A.R.T. (azúcares reductores totales) determinados por la empresa (12.92 g/L y 15.4 °Brix del mosto) y los correspondientes a la determinación realizada como se muestra en la figura 7 mediante HPLC (10.9 g/L), así como las riquezas alcohólicas obtenidas por la empresa (6.4 % Alc. Vol.) y por nuestro laboratorio mediante HPLC (6.88 % Alc. Vol.) resultaron con diferencias significativas. Adicionalmente, el bajo rendimiento obtenido



por la empresa en el proceso de la destilación (datos determinados por ellos) pueden

explicar el rendimiento final de la producción de tequila a 55° Alc. vol. por kilogramo

de agave procesado (considerado moderado), que correspondió a 8.5 kg de agave

por litro de Tequila a 55° Alc. vol. bajo los datos obtenidos en el laboratorio mediante

5 cuantificación por HPLC (Figura 7). Si tomamos en cuenta una riqueza alcohólica

promedio de 6.88% Alc. Vol. obtenida a las 72 horas de tiempo de fermentación (94

% de eficiencia) y con una eficiencia de destilación de 90% (mínima obtenida en

otras industrias) se obtiene un estimado de rendimiento de 6.5 - 7 kg de agave por

litro de Tequila a 55° Alc.vol. Considerando en consecuencia un proceso altamente

10 rentable, adicionando las características organolépticas resultantes en el tequila

obtenido, las cuales fueron de particular apreciación superiores a las obtenidas en

destilados de la misma empresa obtenidos mediante fermentaciones con levaduras

de panificación.

15 **12.- Prueba de fermentación en mostos provenientes de otras fuentes de carbohidratos.**

Las pruebas de fermentación de mostos provenientes de otras fuentes de

carbohidratos se realizaron a nivel laboratorio (fermentaciones piloto). Los jugos

estériles se colocaron en garrafones de 18 L conteniendo 10 L de mostos preparados

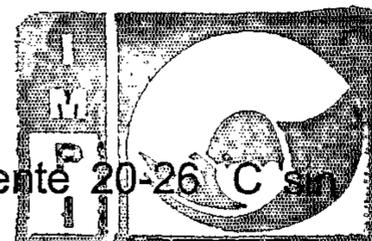
20 con jugos de uva, caña, mango o melaza en garrafones por separado y diluidos a 16

°Brix. Los garrafones con los respectivos mostos fueron suplementados con fuentes

de nitrógeno adicional (sulfato de amonio a 0.8 g/L) e inoculados a una dilución del

5% del volumen con un cultivo saturado de la levaduras *Kluyveromyces marxianus*

UMPe-1 MTCC 5309 y crecido de 12 a 18 horas a una densidad celular de 145×10^6



células/ml. Los garrafrones fueron incubados a temperatura ambiente 20-26 °C sin
 agitación durante 56 hrs. A las fermentaciones piloto, les fue determinado
 crecimiento del cultivo (monitoreado por cuenta de células), consumo de azúcares
 etanol producido (mediante cromatografía líquida de alta resolución, HPLC) (Tabla
 9).

Tabla 9.- Prueba de fermentación a nivel laboratorio (10 L) para la cepa de *K. marxianus* UMPE-1 en jugos de diferente fuentes de azúcares a 16 °Brix.

	Jugos/16 °Brix	Etanol ^a (% v/v)	Eficiencia ^b (%)
10	Uva	9.3	93
	Caña de azúcar	9.8	98
	Melaza	9.0	90
15	Mango	9.5	95

^a Determinación mediante cromatografía de líquidos (HPLC) a las 56 hrs de fermentación. ^b Calculada en relación a la conversión teórica esperada, mediante la determinación de azúcares fermentables por HPLC.

20

Los mostos fermentados obtenidos fueron posteriormente sometidos a destilación, utilizando un sistema de destilación simple en el que por cada lote fueron destilados 3 L. En la primera destilación se desecharon cabezas 1% del volumen de destilado (30 ml) y colas del destilado (posterior a 10 % etanol en el destilado). Una vez
 25 destilado el total del mosto, el destrozado fue sometido a una segunda destilación, eliminando de igual manera las cabezas y colas de la destilación.

Tabla 7.- Cálculos del proceso de producción de tequila a nivel industrial por la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPE-1.

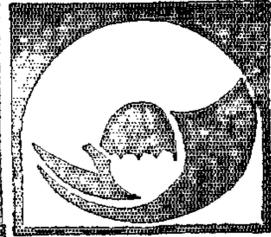
Vol. Mosto (L)	°Brix	A.F. (g/L)	R.A. (v/v)	Eficiencia Ferment. (%)	1ª. Destil. 30° Alc. vol.(L)	2ª. Destil. 55° Alc. vol.(L)	Eficiencia de destilación (%)
3300	15.4	10.9	6.4 ^a - 6.88 ^b	81 ^a - 94 ^b	557	295	76.6
3300	15.4	10.9	6.4 ^a - 6.88 ^b	81 ^a - 94 ^b	523	293	76.3
3300	15.4	10.9	6.4 ^a - 6.88 ^b	81 ^a - 94 ^b	570	303	78.9
1634	15.4	10.9	6.4 ^a - 6.88 ^b	81 ^a - 94 ^b	264	134	69.8
11534	15.4	10.9	6.4 ^a - 6.88 ^b	81 ^a - 94 ^b	1914	1025	75.4

^a En referencia a la determinación realizada por la empresa mediante destilación simple.

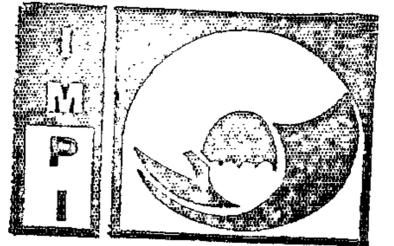
^b En referencia a la determinación realizada por nosotros mediante HPLC.

Tabla 8.- Rendimientos del proceso en base a las determinaciones de la industria.

Kg. Agave A.R.T.	Agave crudo A.R.T.	Vol. Mosto (L)	°Brix	A.R.T. (%)	A.R.T. (kg)	Tequila 55° Alc. Vol. (L) (75% Efic. Dest.)	Eficiencia (Kg. Agave crudo/L de tequila a 55° Alc. Vol.)
8713	24.75	11534	15.46	12.92	1490	1025	8.5



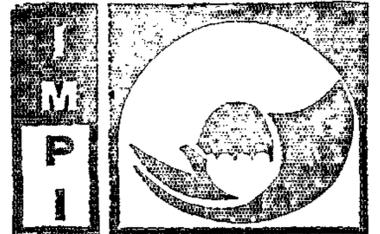
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

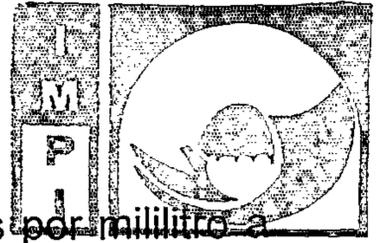
REIVINDICACIONES

- 1.- Una cepa de levadura aislada de *Kluyveromyces marxianus* denominada UMPe-1 MTCC 5309.
- 2.- La cepa de conformidad con la reivindicación 1 caracterizada adicionalmente por que crece a concentraciones de glucosa de hasta 250 g/L tanto en condiciones aeróbicas como en condiciones anaeróbicas.
- 3.- La cepa de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada adicionalmente porque su eficiencia de fermentación es al menos del 95% cuando el mosto a fermentar es inoculado con la levadura en donde:
 - I El mosto esta a una concentración entre 12 y 25 °Brix.
 - II El mosto es suplementado con una fuente de nitrógeno a una concentración de entre 0.025 y 1 g/L.
 - III El mosto es suplementado además con un antibacteriano.
 - IV El mosto inoculado se deja fermentar a temperatura entre los 20 y 28 °C, durante 56 a 90 hrs.
- 4.- Un proceso para la producción de bebidas alcohólicas destiladas caracterizado porque comprende las etapas de:
 - I Preparar un volumen total de mostos de fermentación.
 - II Inocular los mostos de fermentación con la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309.
 - III Fermentar los mostos con la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309.
 - IV Destilar los mostos de fermentación.
- 5.- El proceso según la reivindicación 4 en donde la etapa I comprende los pasos de:

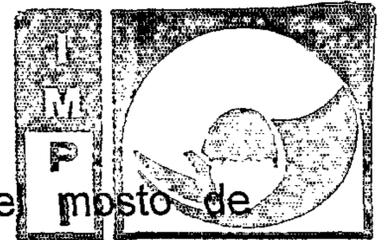


Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

- a) Diluir los mostos de fermentación de 12 a 25 °Brix.
 - b) Adicionar una fuente de nitrógeno.
 - c) Adicionar un antibacteriano.
- 6.- El proceso según la reivindicación 5 en donde los mostos se diluyen
5 preferentemente a 16 °Brix.
- 7.- El proceso según la reivindicación 5 en donde la fuente de nitrógeno puede ser
seleccionada de entre urea, cloruro de amonio, fosfato de amonio, y sulfato de
amonio.
- 8.- El proceso según la reivindicación 7 en donde la fuente de nitrógeno es
10 preferentemente fosfato de amonio.
- 9.- El proceso según la reivindicación 8 en donde el fosfato de amonio se adiciona a
una concentración de entre 0.025 a 1 g/L.
- 10.- El proceso según la reivindicación 5 en donde el antibacteriano es disulfuro de
amonio.
- 15 11.- El proceso según la reivindicación 10 en donde el disulfuro de amonio se
adiciona a una concentración de 50 mg/L.
- 12.- El proceso según la reivindicación 4 en donde la etapa II comprende los pasos
de:
- a) Crecer un inóculo con la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPE-1 MTCC 5309
20 en medio YPD líquido suplementado con sacarosa al 0.2 % a 18-25 °C y aireación de
10 L/min, hasta una densidad celular de 145×10^6 células/mililitro.
 - b) Inocular el mosto diluido de 2 a 10 °Brix, con el inóculo crecido con la levadura
Kluyveromyces marxianus UMPE-1 MTCC 5309 a una dilución 1:10 del volumen
total.



- c) Crecer la levadura hasta una densidad celular de 145×10^6 células por mililitro a una temperatura de 18-25 °C y aireación.
- 13.- El proceso según la reivindicación 4 a 6 en donde la etapa II comprende adicionar el inóculo obtenido de conformidad con la reivindicación 12 al mosto de fermentación a 16 °Brix a un volumen del inóculo es del 5 al 10 % del volumen de mosto de fermentación.
- 14.- El proceso según la reivindicación 4 en donde la etapa III comprende incubar el mosto de fermentación inoculado con la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPE-1 MTCC 5309 durante 48 a 90 horas a una temperatura de 20 a 28 °C, en reposo.
- 15.- El proceso según la reivindicación 4, en donde la etapa IV comprende una primera destilación a 90 °C desechando cabezas 1% del volumen y colas con una riqueza alcohólica del 10 % Alc. Vol.
- 16.- El proceso según la reivindicación 4 en donde la etapa IV comprende además una segunda destilación a 90 °C desechando cabezas 1% del volumen y colas con una riqueza alcohólica del 10 % Alc. Vol.
- 17.- El proceso de acuerdo a la reivindicación 4 en donde el mosto de fermentación es mosto de Agave.
- 18.- El proceso de acuerdo a la reivindicación 17 en donde el mosto de Agave es mosto de *Agave tequilana* F.A.C. Weber.
- 19.- El proceso de acuerdo a la reivindicación 4 en donde el mosto de fermentación es mosto de caña de azúcar.
- 20.- El proceso de acuerdo con la reivindicación 4 en donde el mosto de fermentación es mosto de uva.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

- 21.- El proceso de acuerdo con la reivindicación 4 en donde el mosto de fermentación es mosto de mango.
- 22.- Una bebida alcohólica destilada obtenida por el proceso descrito en las reivindicaciones 4 a 18, caracterizada además porque tiene un perfil CG-EM como el que se muestra en las figuras 9A y 9B.
- 23.- Un proceso para la producción de etanol a partir de mostos de fermentación de frutas de desecho, caracterizado el proceso porque comprende las etapas de:
- I Preparar un volumen total de mostos de fermentación.
 - II Inocular los mostos de fermentación con la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309.
 - III Fermentar los mostos de fermentación con la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309.
 - IV Destilar los mostos fermentados.
- 24.- El proceso según la reivindicación 23 en donde la etapa I comprende los pasos de:
- a) Diluir el mosto de fermentación de 12 a 25 °Brix.
 - b) Adicionar una fuente de nitrógeno.
 - c) Adicionar un antibacteriano.
- 25.- El proceso según la reivindicación 24 en donde los mostos de fermentación se diluyen preferentemente a 16 °Brix.
- 26.- El proceso según la reivindicación 24 en donde la fuente de nitrógeno se selecciona de urea, cloruro de amonio, fosfato de amonio, y sulfato de amonio.
- 27.- El proceso según la reivindicación 26 en donde la fuente de nitrógeno es preferentemente fosfato de amonio.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

- 28.- El proceso según la reivindicación 27 en donde el fosfato de amonio se adiciona a una concentración de entre 0.025 a 1 g/L.
- 29.- El proceso según la reivindicación 24 en donde el antibacteriano es disulfuro de amonio.
- 5 30.- El proceso según la reivindicación 29 en donde el disulfuro de amonio se adiciona a una concentración de 50 mg/L.
- 31.- El proceso según la reivindicación 23 en donde la etapa II comprende los pasos de:
- a) Crecer un inóculo con la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309
- 10 en medio YPD líquido suplementado con sacarosa al 0.2 % a 18-25 °C y aireación de 10L/min, hasta una densidad celular de 145×10^6 células/mililitro.
- b) Inocular el mosto diluido de 2 a 8 °Brix, con el inóculo crecido con la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 a una dilución 1:10 del volumen total.
- 15 c) Crecer la levadura hasta una densidad celular de 145×10^6 células por mililitro a una temperatura de 18-25 °C y aireación.
- 32.- El proceso según la reivindicación 23 a 25 en donde la etapa II comprende adicionar el inóculo de conformidad con la reivindicación 31 al mosto de fermentación a 16 °Brix a un volumen de inóculo de 5 al 10 % del volumen de mosto a fermentar.
- 20 33.- El proceso según la reivindicación 23 en donde la etapa III comprende incubar el mosto de fermentación inoculado con la levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 MTCC 5309 durante 48-60 horas a una temperatura entre los 20 y 26 °C en reposo.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

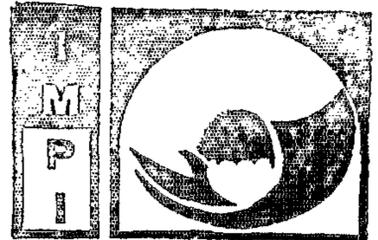
34.- El proceso según la reivindicación 23, en donde la etapa IV comprende una primera destilación a 90 °C desechando cabezas 1% del volumen y colas con una riqueza alcohólica menor al 10 % Alc. Vol.

35.- El proceso según la reivindicación 23 en donde la etapa IV comprende además una segunda destilación realizada a 90 °C desechando cabezas 1% del volumen y colas con una riqueza alcohólica menor al 10 % Alc. Vol.

10

15

20

**RESUMEN.**

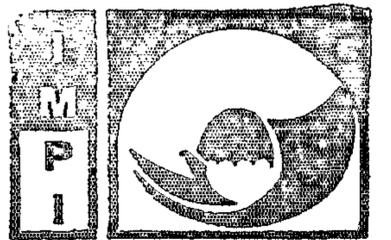
La presente invención consiste en el aislamiento y caracterización de una cepa de levadura proveniente de jugos de Agave, con resistencia a altas concentraciones de azúcares y de etanol. La presente invención comprende también la utilización de esta cepa de levadura para la fermentación de mostos provenientes de Agave, de caña de azúcar, uva, mango y otras frutas, así como melazas, para la elaboración de bebidas alcohólicas y/o la obtención de etanol. Además, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de bebidas alcohólicas o de etanol, el cual comprende la utilización de la cepa de levadura antes mencionada.

10

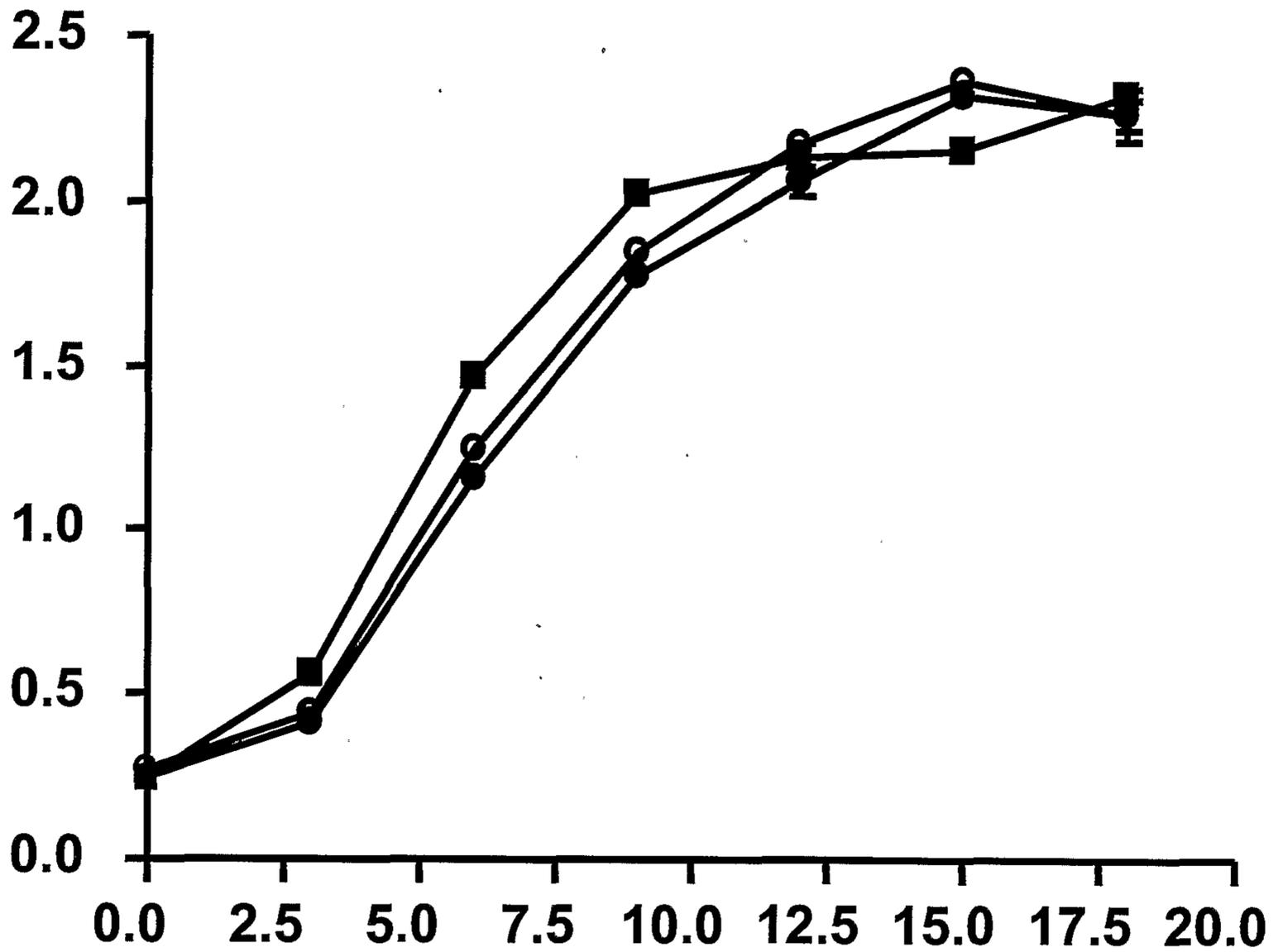
15

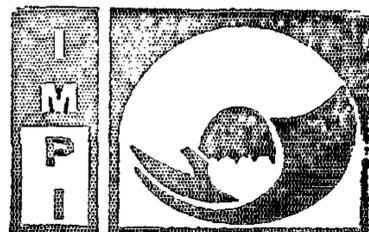
20

FIGURA 1



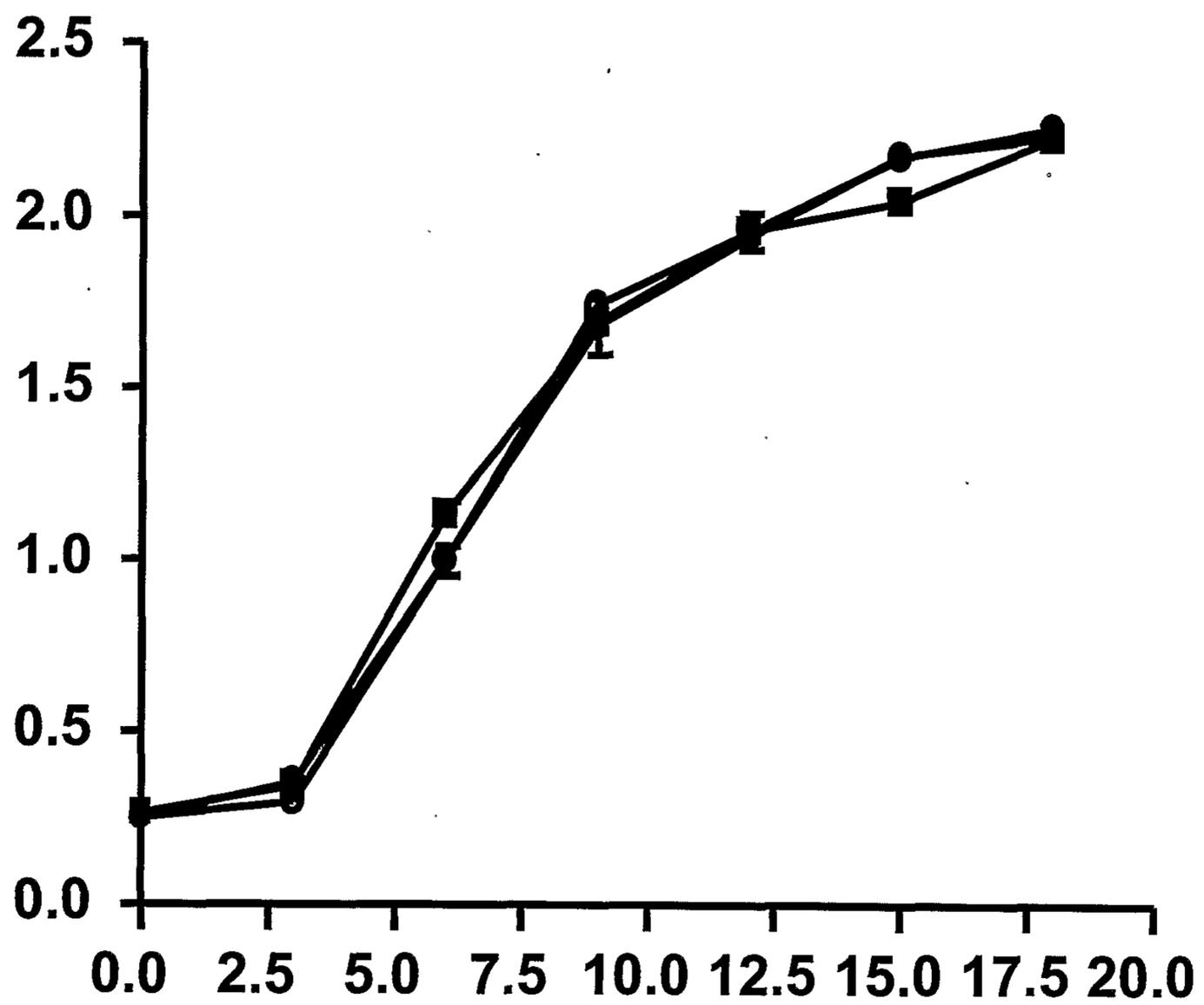
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

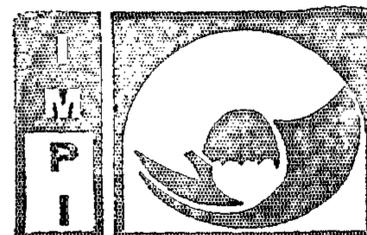




Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

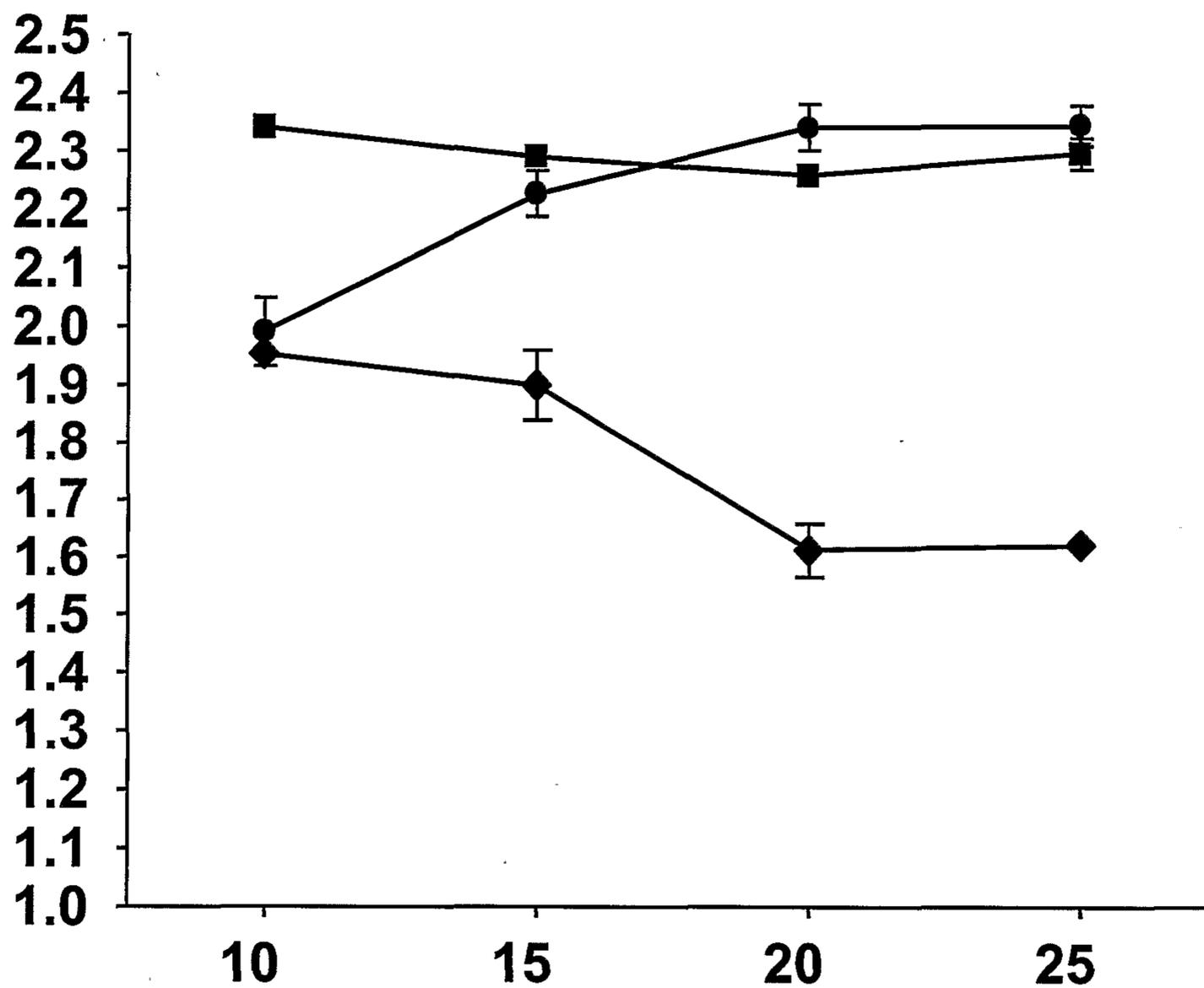
FIGURA 2

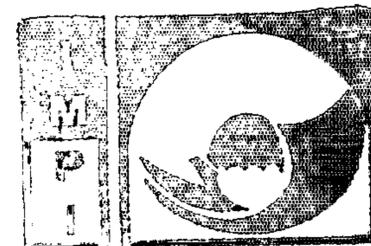




Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

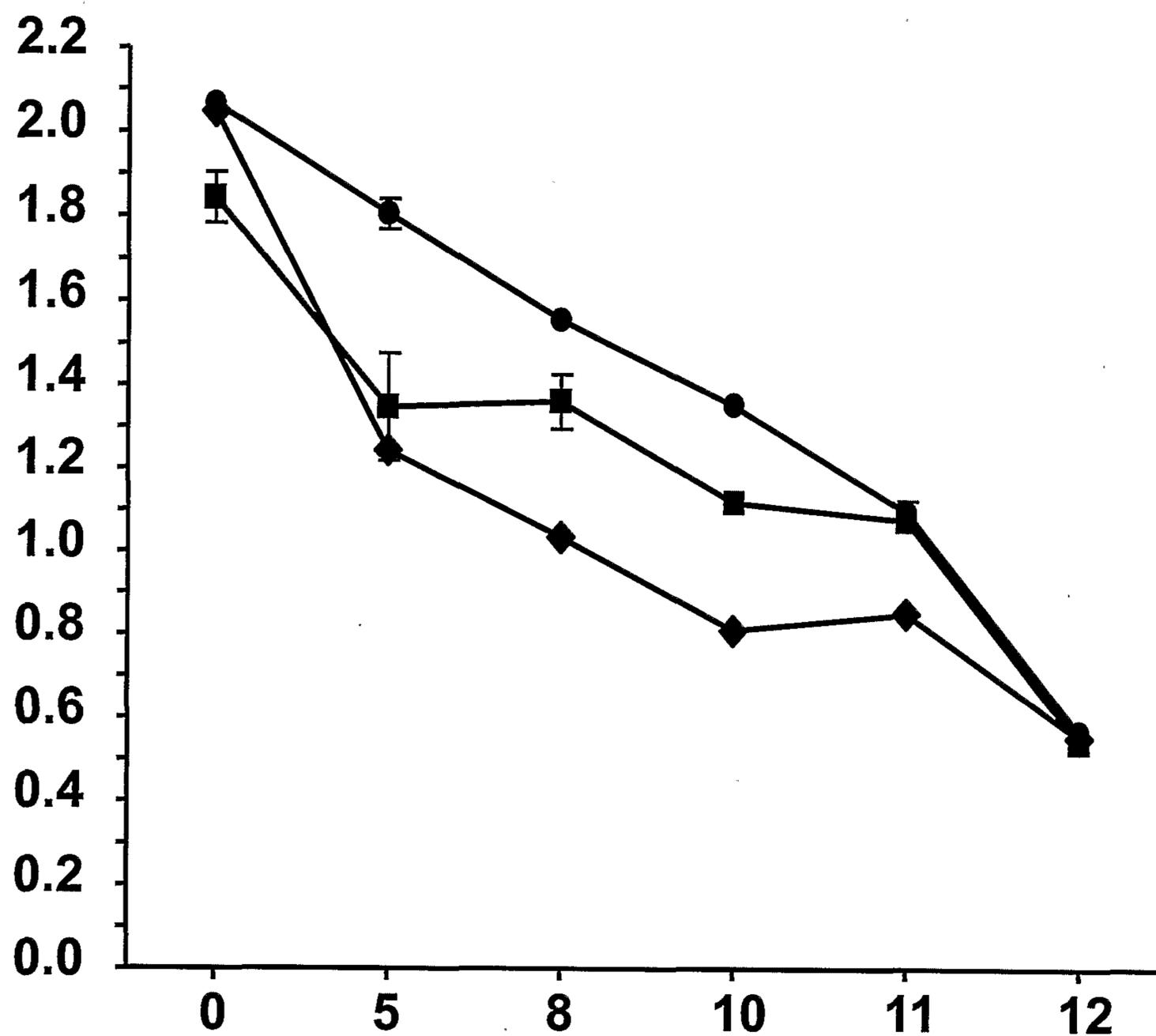
FIGURA 3

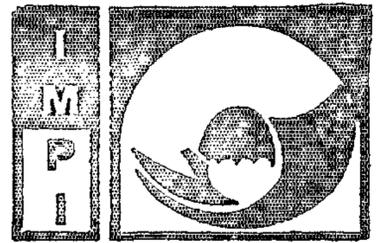




Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

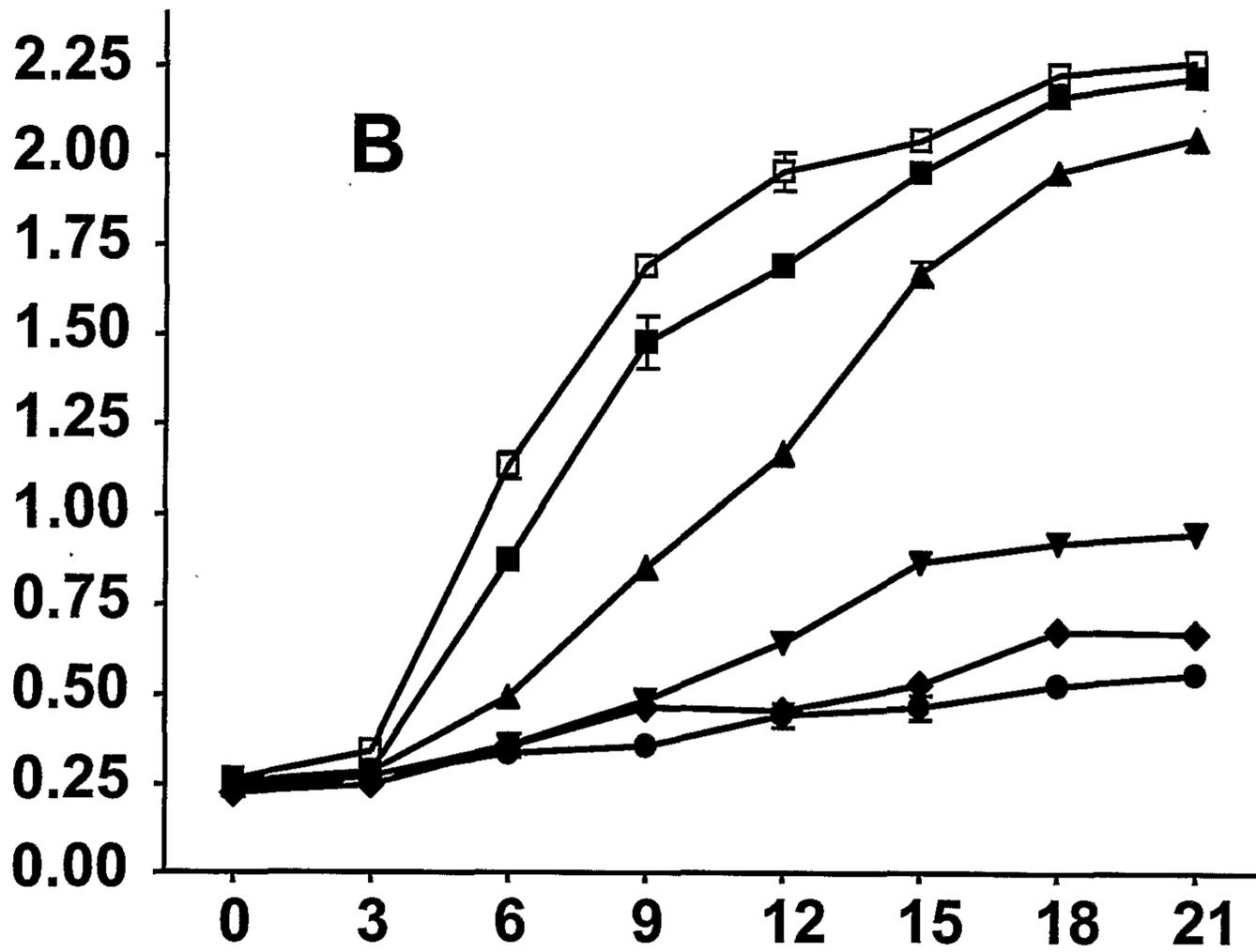
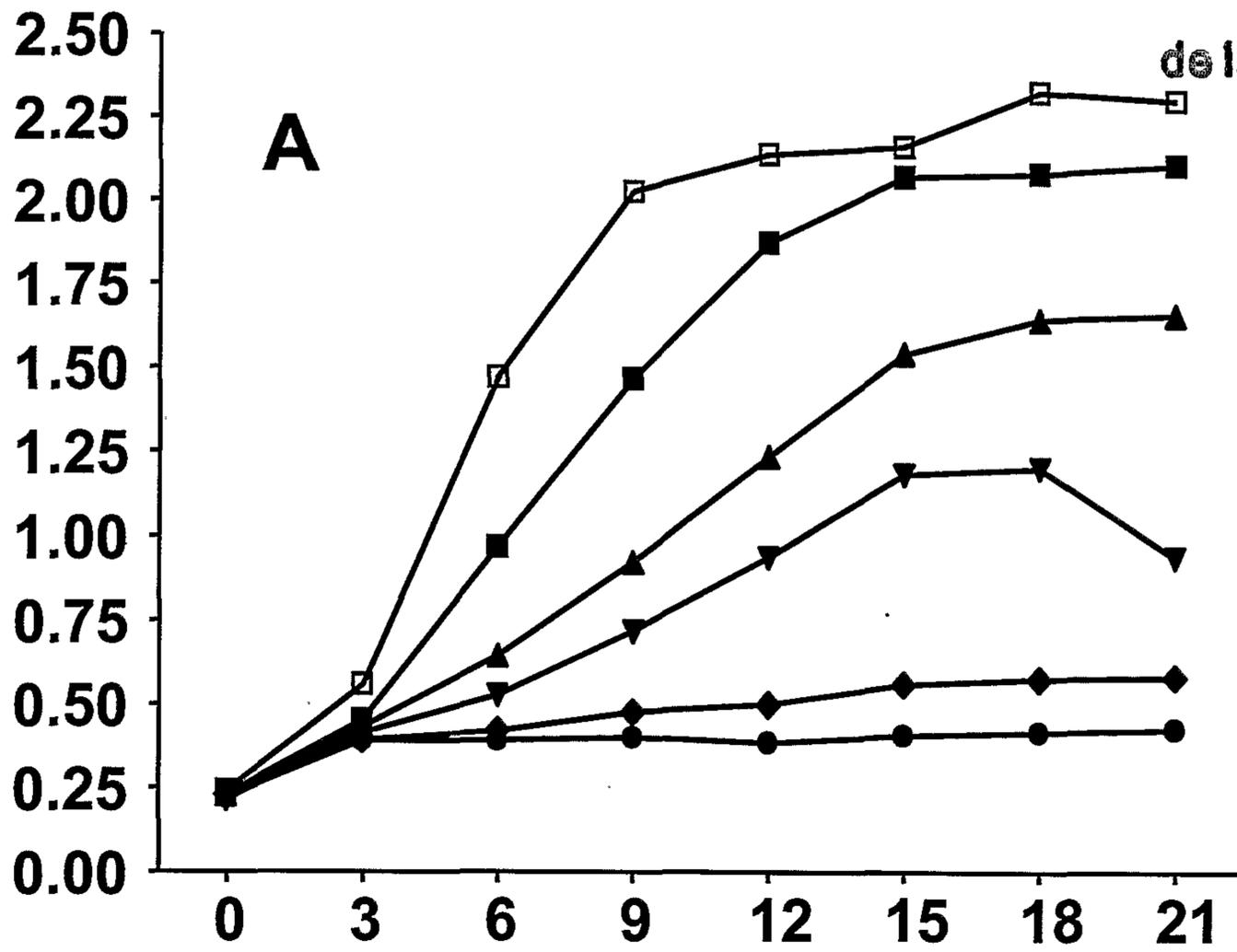
FIGURA 4

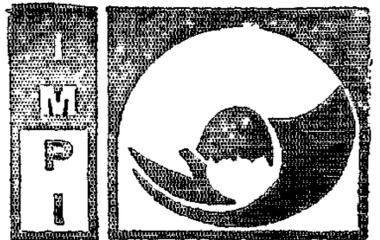




Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

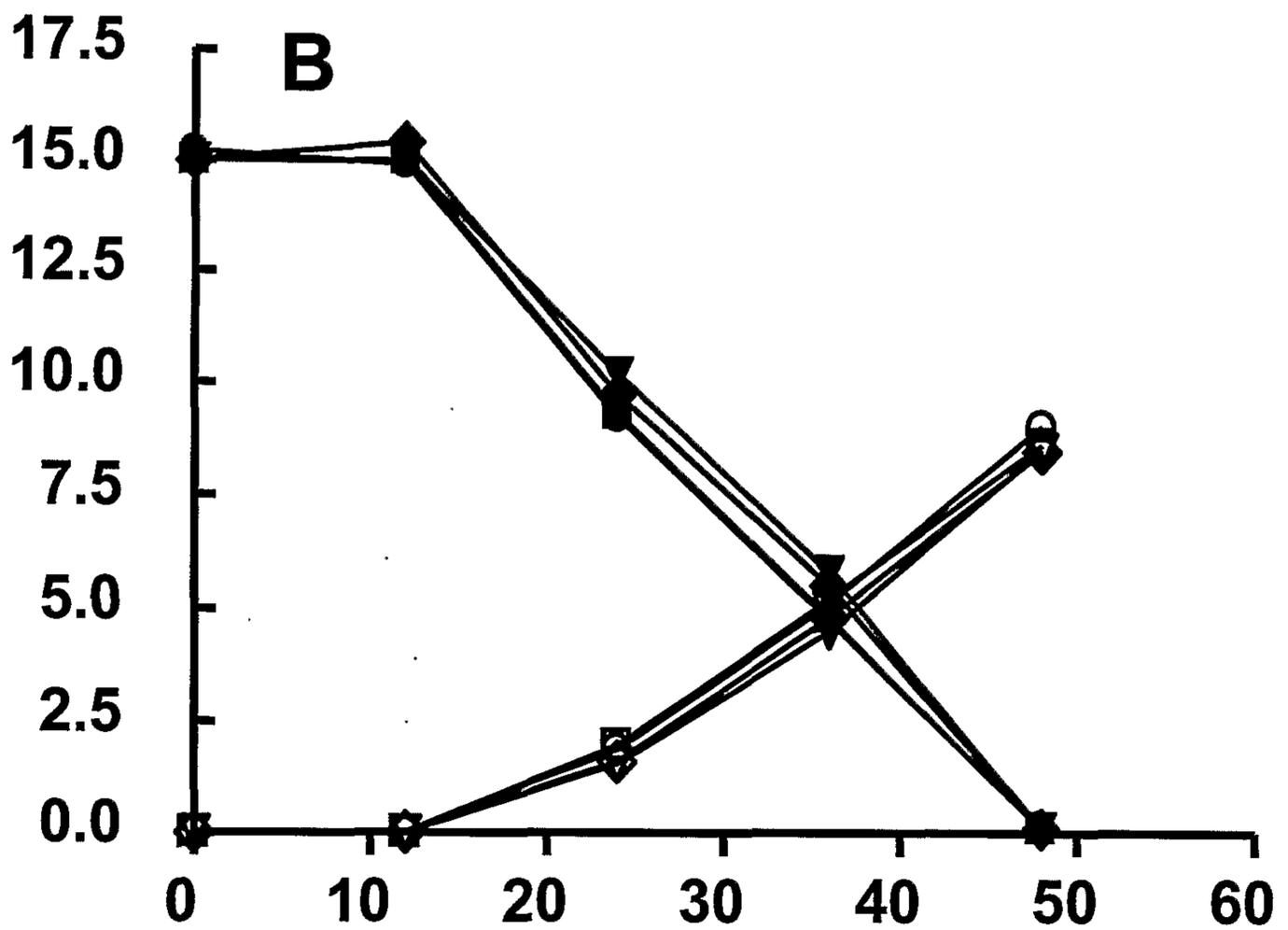
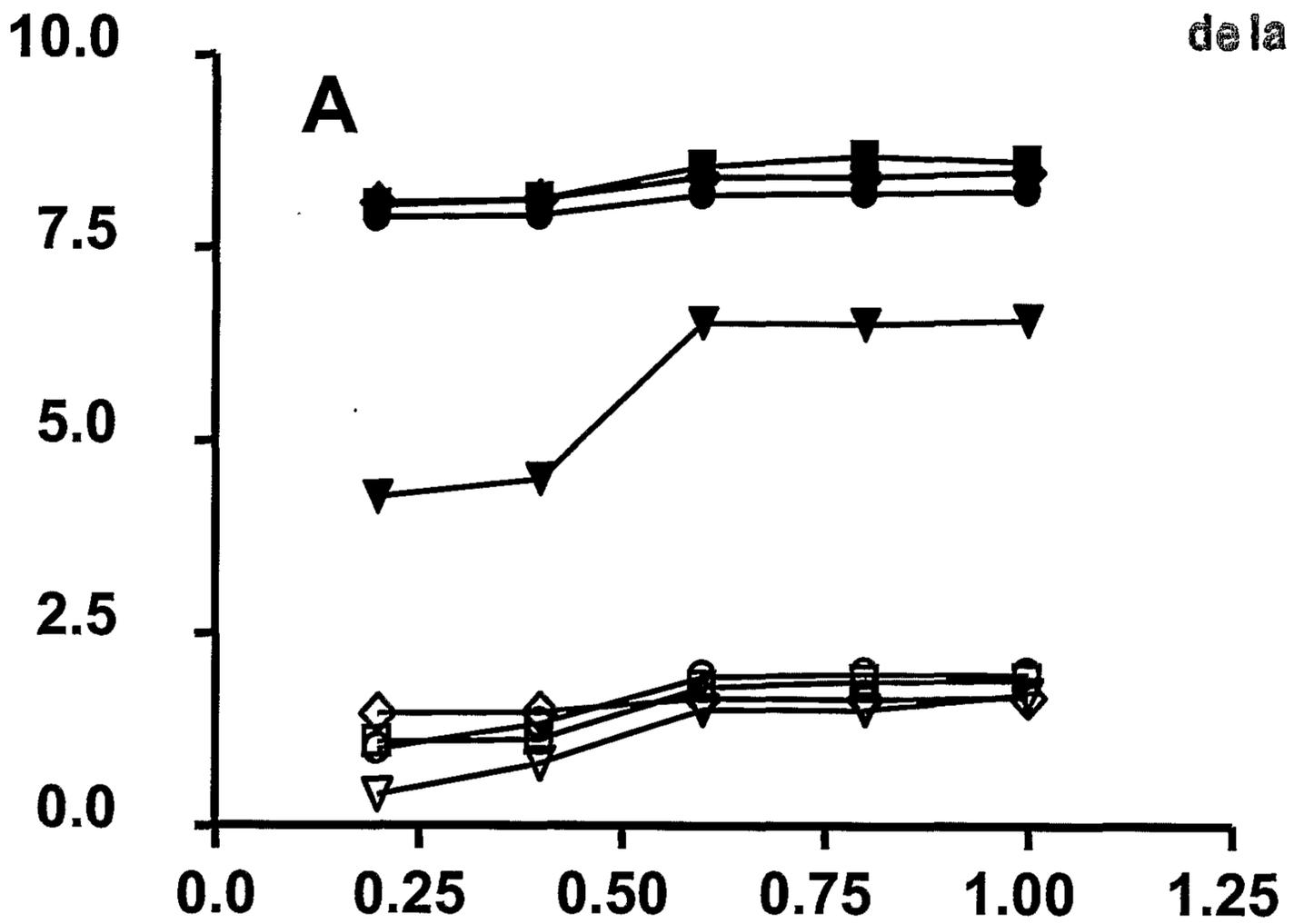
FIGURA 5

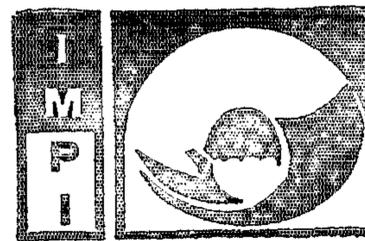




Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

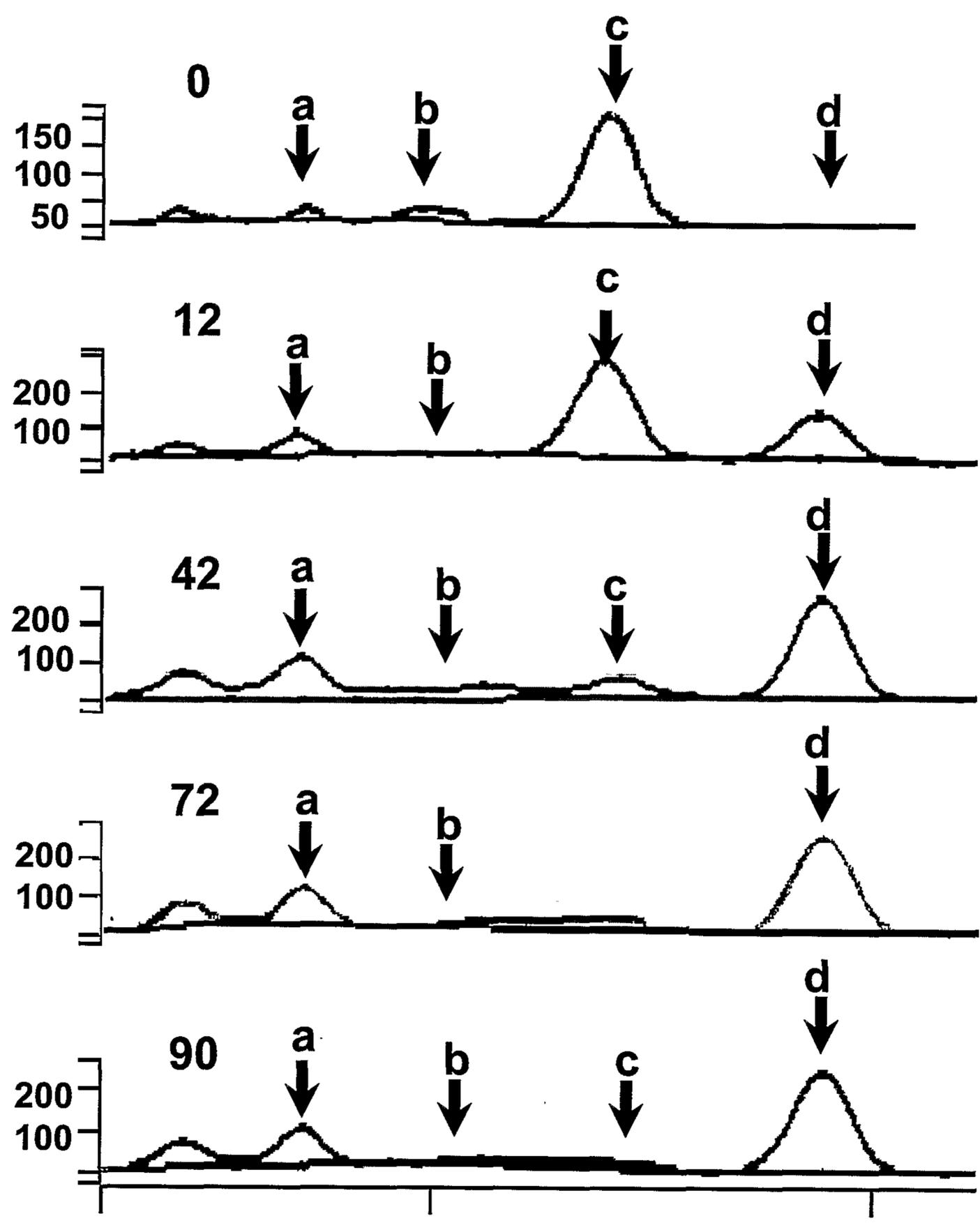
FIGURA 6

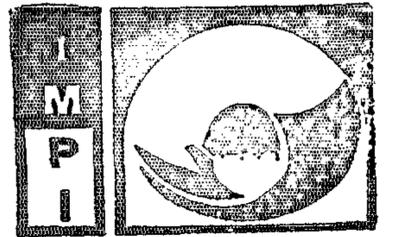




Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

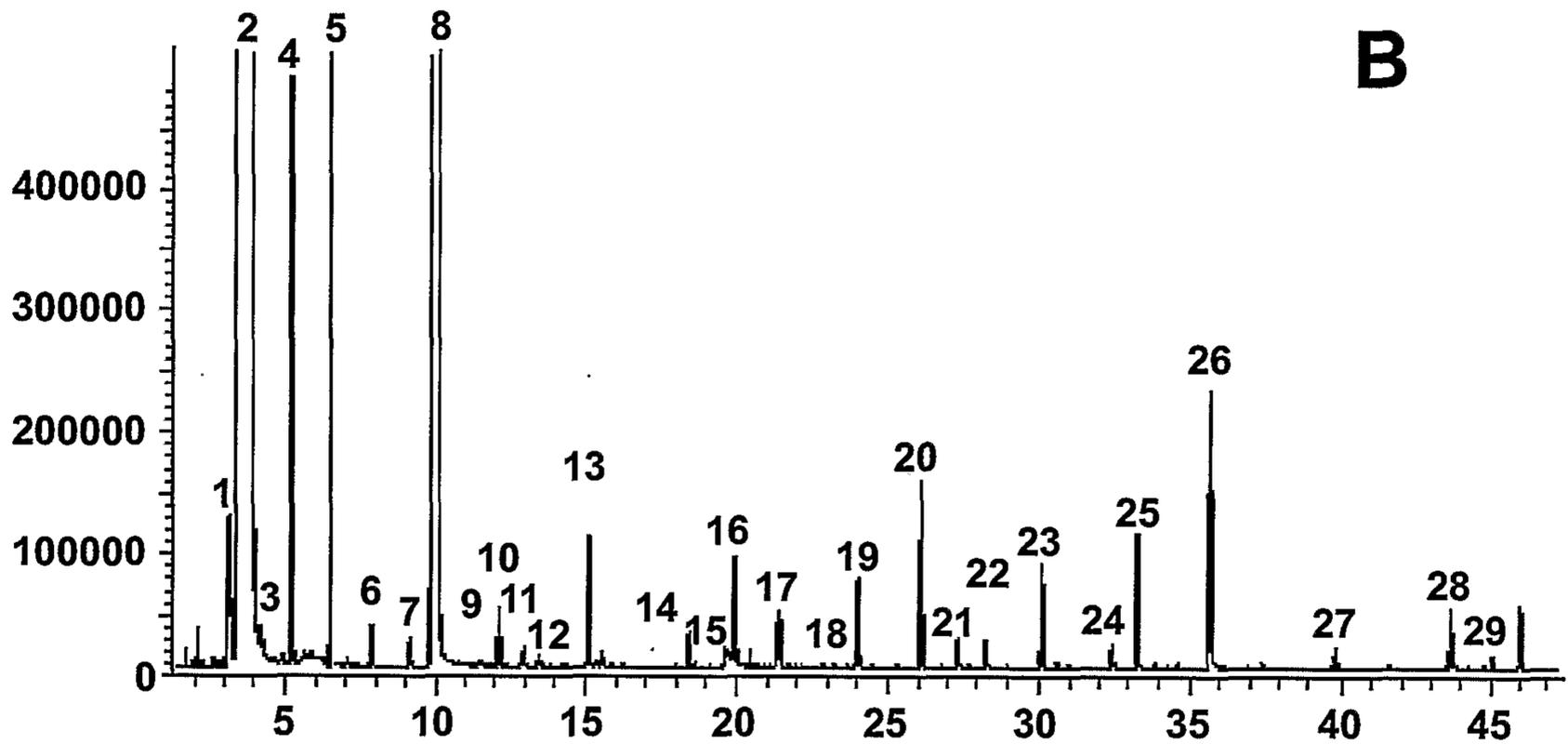
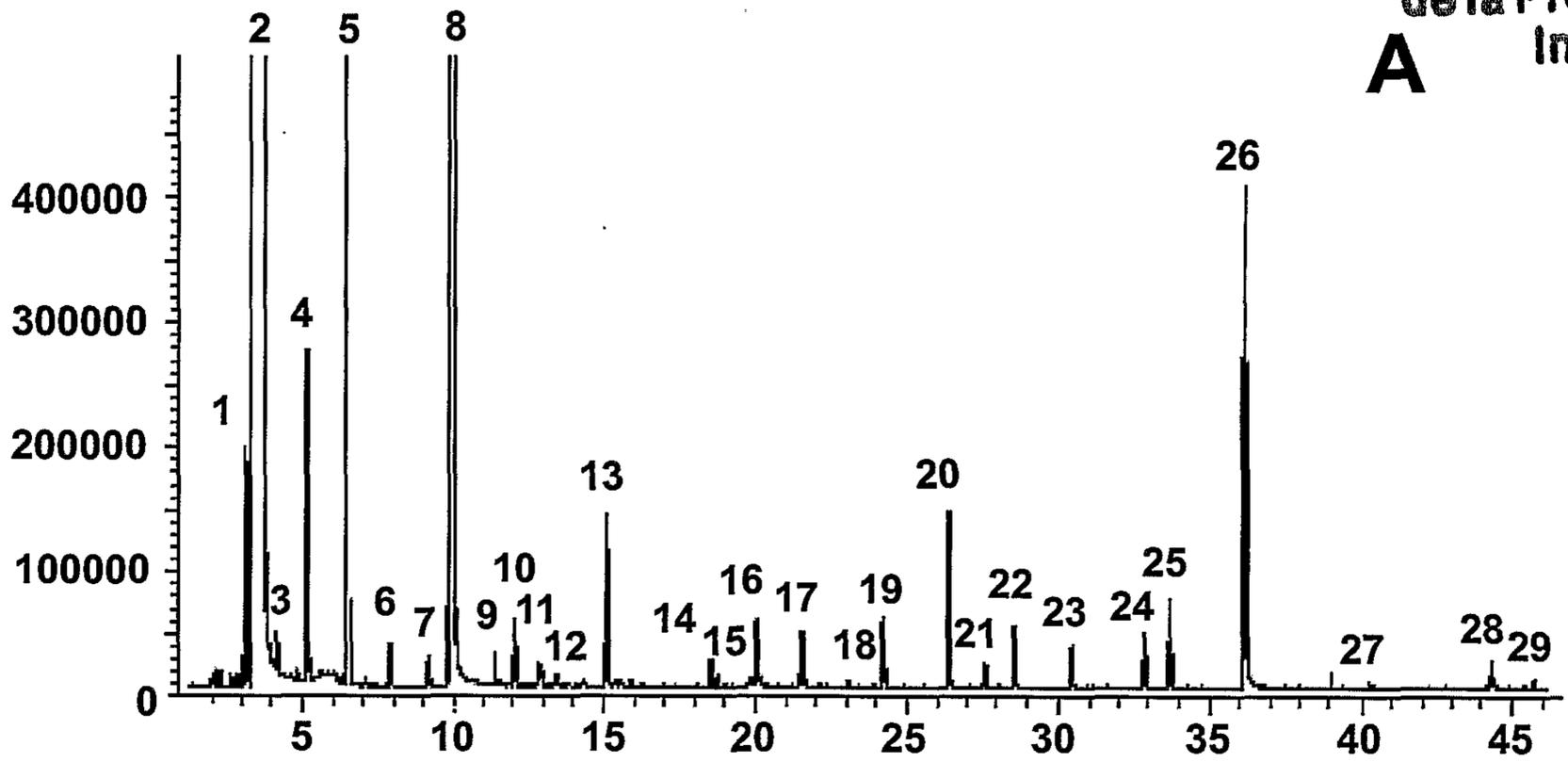
FIGURA 7

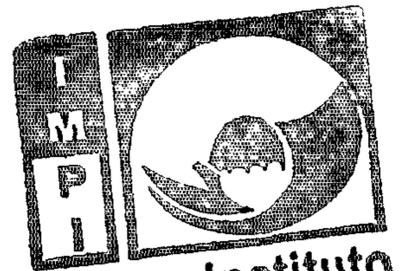




Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

FIGURA 9





Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial
C

FIGURA 9

