



TÍTULO DE PATENTE NO. 328904

Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.

Domicilio: Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO

Denominación: PROCESOS PARA FERMENTAR JUGO DE AGAVE UTILIZANDO KLOECKERA SPP.

Clasificación: Int.Cl.8: C12G/; C12G1/022

Inventor: DULCE MARIA DÍAZ MONTAÑO

Número de solicitud: 328904

Fecha de presentación: 29 de septiembre de 2006

País: México

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 29 de septiembre de 2026

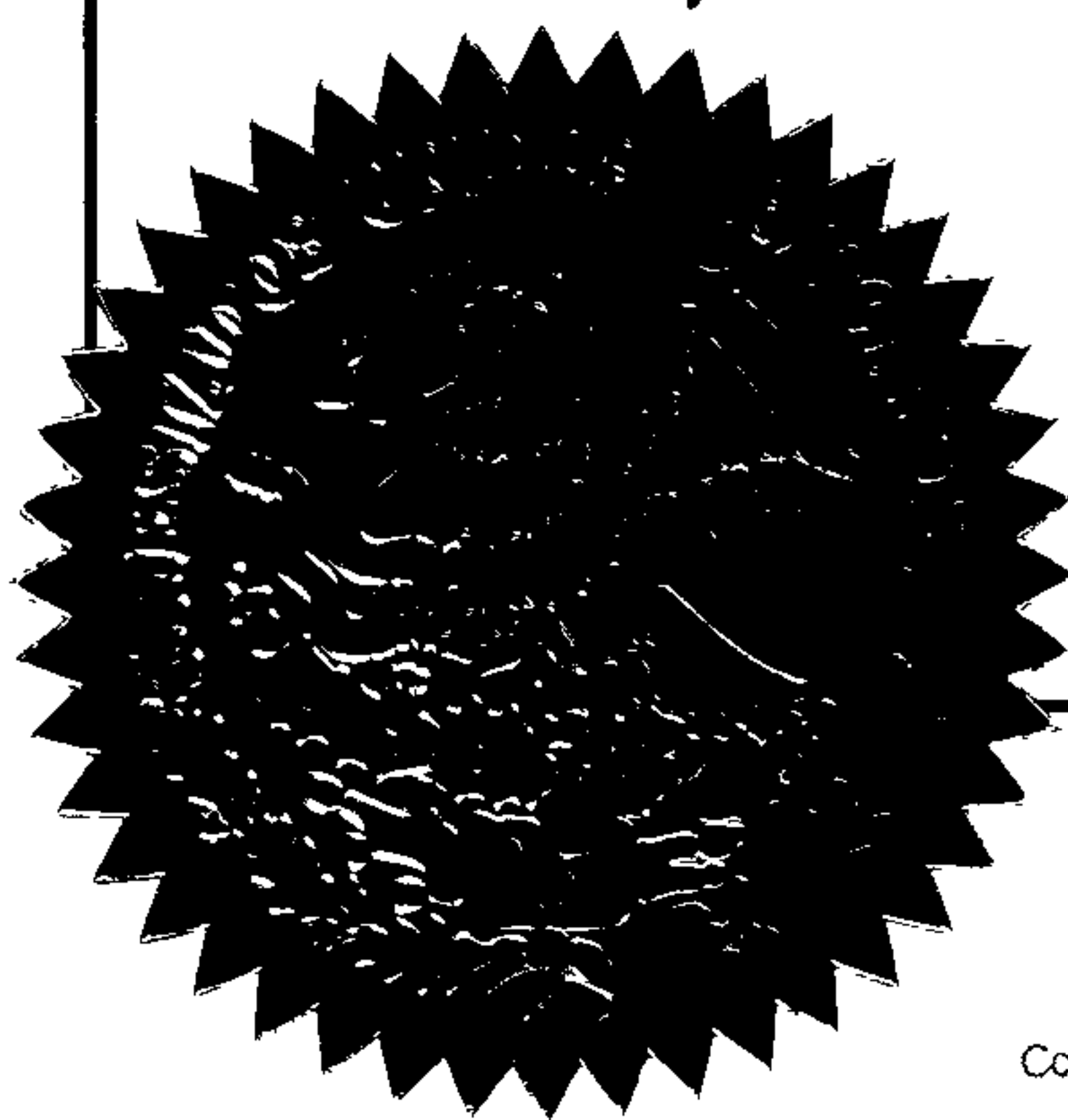
La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigente los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y IV y 7º inciso 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación 15/12/1999, reformada el 02/08/1999, 25/05/1999, 12/1997, 10/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 23/01/2006, 16/05/2009, 06/01/2010, 13/09/2007, 28/06/2010, 27/01/2010, 09/05/2010) artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso iii) 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a) y sub inciso iii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 10/10/2002, 23/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo del Reglamento de las Facultades en los Directores Generales, Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 02/02/2000, 26/07/2004, 04/06/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 29 de enero de 2015

SUBDIRECTOR DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES, ÁREAS MECÁNICA, ELÉCTRICA Y DE REGISTROS DE DISEÑOS INDUSTRIALES Y MODELOS DE UTILIDAD



[Handwritten Signature]
PEDRO DAVID FRAGOSO LÓPEZ



328904-Normal
29-06-26



Instituto
Mexicano
de Propiedad
Industrial

-1-

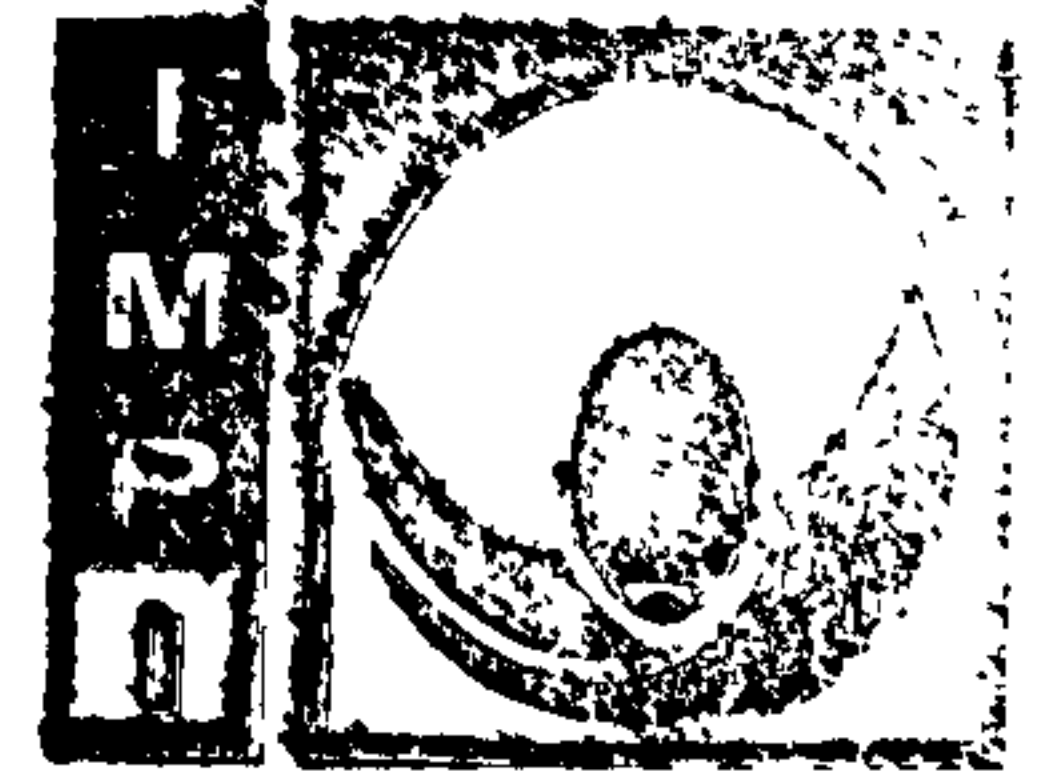
"Procesos para fermentar jugo de agave utilizando *Kloeckera* spp."

CAMPO TECNICO DEL INVENTO

5 La presente invención esta relacionada a la etapa de fermentación en el proceso de producción de tequila, el cual se refiere a un proceso para propagar *Kloeckera* spp. así como utilizarla en la fermentación de jugo de agave en un sistema por lotes como en un sistema continuo.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad la industria tequilera utiliza tradicionalmente el sistema por lotes para la etapa de fermentación, el cual se basa en cargar el equipo fermentador con el medio de cultivo y vaciarlo cuando la reacción se ha completado. Por otro lado, en el campo de las fermentaciones alcohólicas, también existe el sistema de fermentación en continuo que consiste en introducir continuamente en el equipo fermentador un flujo de medio de cultivo a transformar, extrayendo de modo regular el medio fermentado. El sistema de fermentación en continuo se ha utilizado hasta la fecha en la producción de alcohol como combustible (Bayrock and Ingledew, 2001; Plessas et al., 2006) y en la producción de cerveza (Ryu and Kim, 1984; Mitsuyasu et al., 1994; Brányik et al., 2004), este último sistema a presentado varias ventajas en la industria cervecera y alcoholera, las cuales son: reducción en los niveles de contaminación microbiana manifestándose en mayores rendimientos de conversión de azúcar a etanol, incremento de la concentración de etanol en la fermentación, mayor disponibilidad de espacio debido a que con un solo equipo fermentador se puede fermentar grandes volúmenes del medio de cultivo, aumento de la productividad en el proceso de fermentación ya que se realizan fermentaciones por periodos largos con un mayor control del proceso y una reducción de los costos de operación tanto de la etapa de fermentación, como de las otras etapas del proceso de producción de alcohol, debido a que estará sincronizado la etapa de fermentación en continuo a todo el proceso de producción que también trabaja en forma continua, permitiendo utilizar sin desperdiciar la energía eléctrica y el vapor de agua generado por la caldera (Stanbury et al., 1999; Bayrock and Ingledew, 2001; Vasconcelos et al., 2004).

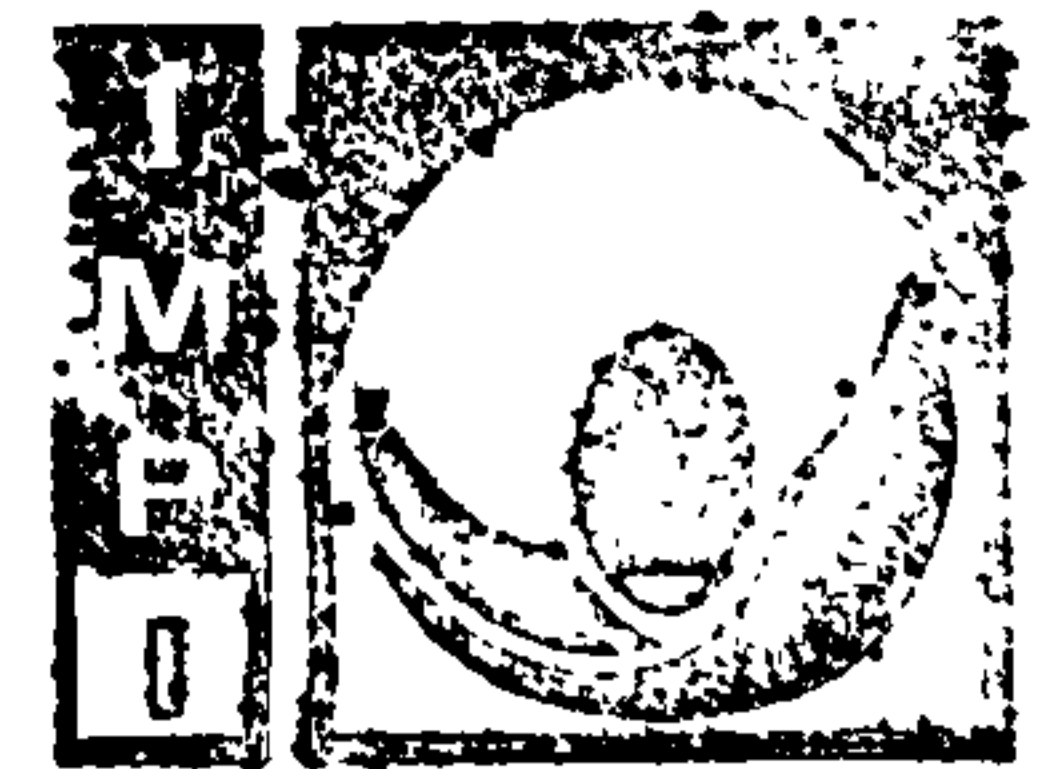


-2-

Entre los procesos para fermentar jugo de agave que propone la presente invención, esta el empleo de un sistema continuo, el cual aun no se ha utilizado en la industria tequilera.

5 Todas las etapas del proceso de elaboración del tequila influyen de forma determinante en la composición del producto final, las cuales son: el cocimiento, la fermentación, la destilación y si se desea madurar el tequila, el añejamiento (Cedeño, 1995). La etapa de fermentación juega un papel muy importante en el proceso de elaboración de tequila, ya que ahí se produce todo el etanol que contiene el tequila y la mayor parte de los
10 compuestos aromáticos que dan personalidad al tequila. El sistema de fermentación por lotes es limitante en el proceso de tequila, ya que requiere de varios días para que se realice la fermentación. Además el sistema por lote, no permite realizar un buen control ya que existen variables que son dependientes de ese sistema. Sin embargo el sistema continuo tiene la ventaja que es un sistema sencillo para operar y controlar durante la
15 fase estacionaria, lo cual facilita la estandarización del proceso y permite mantener una misma calidad del producto.

La cepa de levadura utilizada universalmente en las fermentaciones alcohólicas es *Saccharomyces cerevisiae*, debido a sus altos rendimientos de conversión de sustrato a etanol, alcanzando en vinos concentraciones del orden de 11.8% (v/v) de alcohol
20 (Soufleros, 1979). Sin embargo, las bebidas alcohólicas obtenidas con el sistema normal, es decir el sistema por lotes utilizando solamente este género, presentan una baja riqueza de compuestos volátiles (Romano et al., 2003). Asimismo el uso de diferentes tipos de levaduras como las llamadas levaduras aromáticas (principalmente las del género *Kloeckera*) producen compuestos volátiles que generan perfumes agradables los
25 cuales aumentan las notas aromáticas de la bebida final (Romano et al., 2003). Sin embargo estas levaduras no se utilizan como levaduras iniciadoras como es el caso de *Saccharomyces*, ya que no pueden predominar en la fermentación por su baja capacidad fermentativa debido a una presunta intolerancia a etanol (Kunkee, 1984), lo cual impide su utilización industrial a pesar de sus cualidades para generar compuestos aromáticos
30 agradables. La presente invención **establece los procesos adecuados para propagar la *Kloeckera* y utilizarla precisamente en la etapa de fermentación de la elaboración del tequila**, lo que permitirá que la *Kloeckera* presente un alto consumo de



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

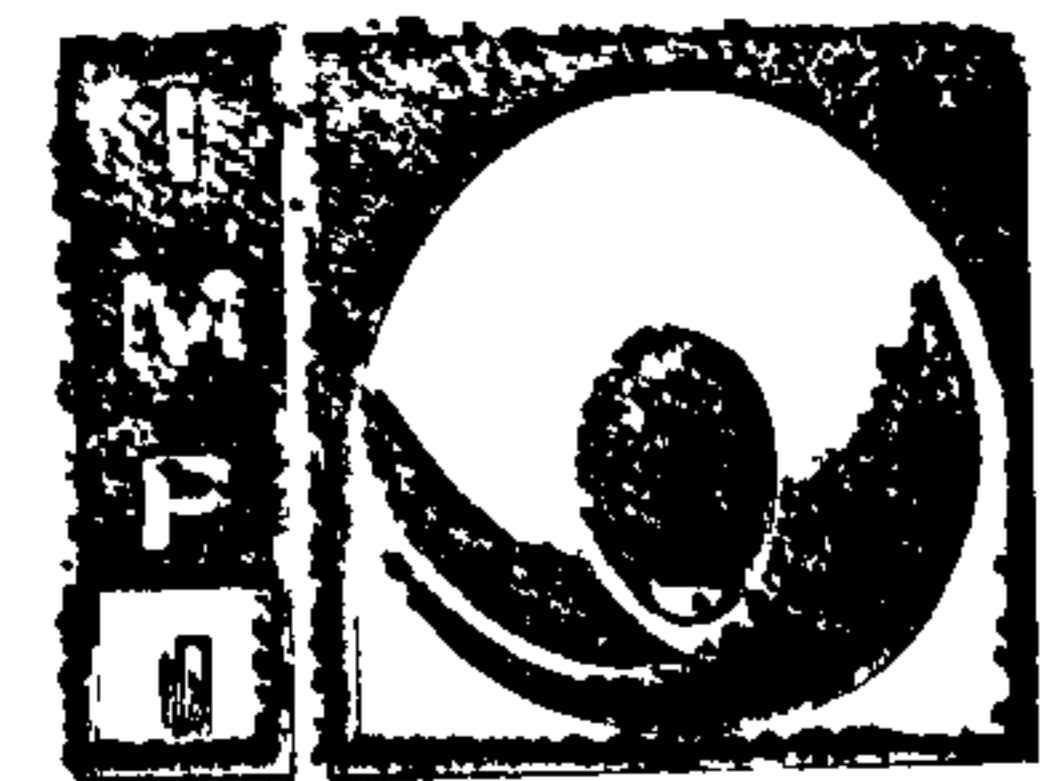
-3-

azucres así como una alta producción de etanol y pueda ser utilizada en la elaboración de tequila, en la etapa de fermentación de éste proceso.

En la actualidad existen patentes ya otorgadas para la producción de yogurt, cerveza y alcohol como combustible utilizando un sistema continuo, sin embargo los procesos que proponen estas patentes, no pueden ser aplicadas con *Kloeckera*. Como ejemplo tenemos la patente No. US4808527 con título: Continuous process for ethanol production by bacterial fermentation, en la cual propone la producción de etanol para combustible en un sistema continuo utilizando bacterias *Zymomonas*, ésta patente señala amplios rangos en las condiciones de fermentación, los cuales no permite el crecimiento adecuado de *Kloeckera* evitando una fermentación completa, no obstante en la invención que nosotros proponemos si logra que la *Kloeckera* presente altas capacidades fermentativas debido a que se determinan las mejores condiciones físico químicas y nutrimentales de la etapa de propagación como de la etapa de fermentación en un sistema continuo como en un sistema por lote. Por otro lado existe la patente Norteamérica US5688674 con título: Continuous fermentation process for the production of metabolites using a moving filter, el cual trabaja el sistema continuo de fermentación con recirculación de células, que en este caso es la levadura *Saccharomyces*, para producir metabolitos, principalmente etanol; sin embargo las condiciones de fermentación que reclama en las reivindicaciones son tan amplias que no son viables para el crecimiento de *Kloeckera* y mucho menos para el desarrollo de la fermentación en los límites superiores e inferiores.

Cabe señalar que en la literatura no se ha reportado un proceso y/o método de propagación para *Kloeckera* que le permita aumentar su capacidad fermentativa en forma similar a la obtenida con la levadura del género *Saccharomyces* en un sistema por lotes. De la misma manera no se ha reportado un proceso y/o método para fermentar el jugo de agave en un sistema continuo utilizando levaduras *Kloeckera* en cultivo puro.

Las ventajas directas que obtiene la industria tequilera con la utilización de los procesos de fermentación propuestos en esta invención son: **la disminución de los costos de proceso para la elaboración de Tequila, proporcionar diferentes aromas y olores a la bebida final (Tequila) de forma natural y obtener productos dentro de la norma oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005**; todos los aspectos mencionados anteriormente, son necesidades actuales que la industria tequilera requiere (PECYTJAL,



Instituto
Mexicano
de Propiedad
Industrial

-4-

2003, Fundación produce, 2003), y que resuelve la invención que propone en la presente solicitud.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

- 5 Los detalles característicos de esta invención que se refiere a los “**procesos para fermentar jugo de agave utilizando *Kloeckera spp.***”, se muestran claramente en la siguiente descripción y figuras:

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 10 Fig. 1.- Es una gráfica que muestra la evolución del consumo del azúcar (sust.) y la formación de etanol (ETOH), utilizando *Kloeckera africana* propagada conforme al proceso que proponemos para producir la ***Kloeckera activada*** (*K activada sust*, *K activada ETOH*) y *Kloeckera africana* propagada de la forma tradicional nombrada como *Kloeckera africana sin activar* (*K sin activar sust*, *K sin activar ETOH*).

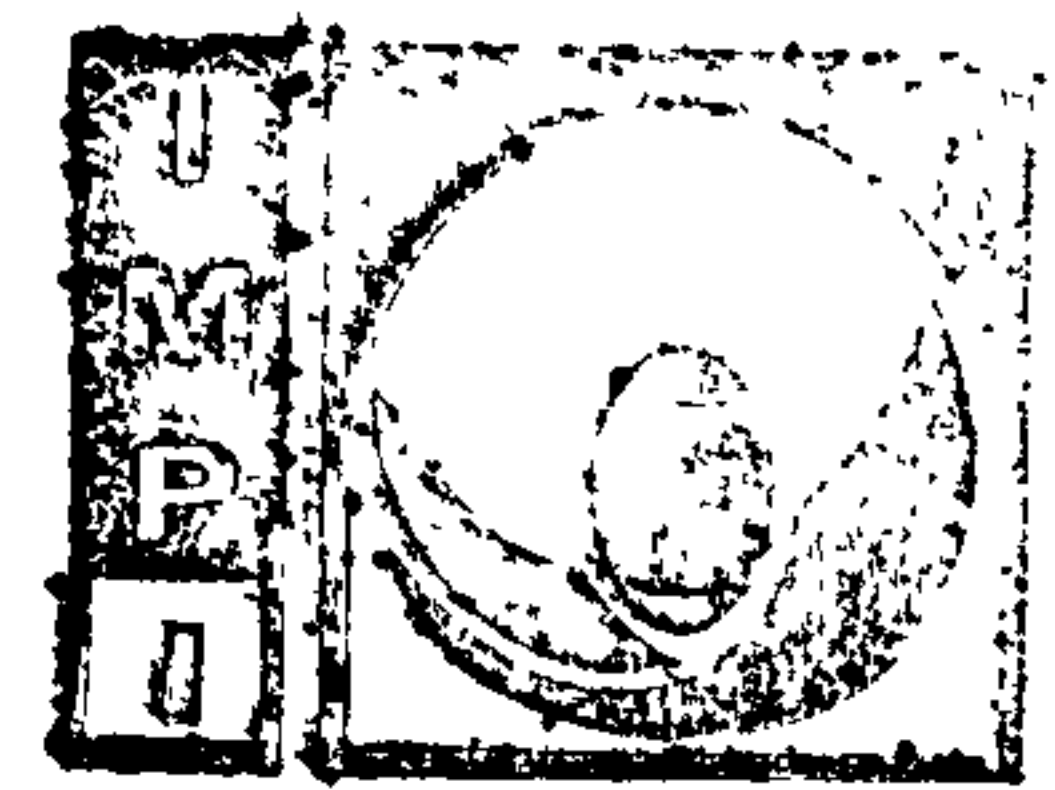
15

- Fig. 2.- Se presenta una gráfica en donde se compara los diferentes sistemas de fermentación utilizando *Kloeckera africana*, con respecto a la concentración inicial del azúcar (°Bx), azúcar consumido (Sc), azúcar sin consumir (S s/c), etanol formado (ETOH) y productividad; en donde *Tradicional* corresponde a la fermentación con las condiciones que utiliza la industria tequilera, el cual se realiza en un sistema por lotes; *Inv-Lote*, se refiere a la fermentación en un sistema por lotes con las condiciones de cultivo que menciona esta invención utilizando la *Kloeckera* propagada como también se indica en esta invención (*Kloeckera activada*); e *Inv-SC*, corresponde a la fermentación en un sistema continuo utilizando las condiciones de cultivo y la *Kloeckera* propagada (*Kloeckera activada*) como se mencionan en esta invención.
- 20
- 25

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- Con la finalidad de comparar los procesos presentados en esta invención con respecto a los procesos tradicionales, a continuación se muestra una breve explicación de las Figuras 1 y 2.
- 30

En la figura 1 se presenta los resultados obtenidos en la fermentación de jugo de agave a 12° Bx adicionado con 1 g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio monobásico en



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

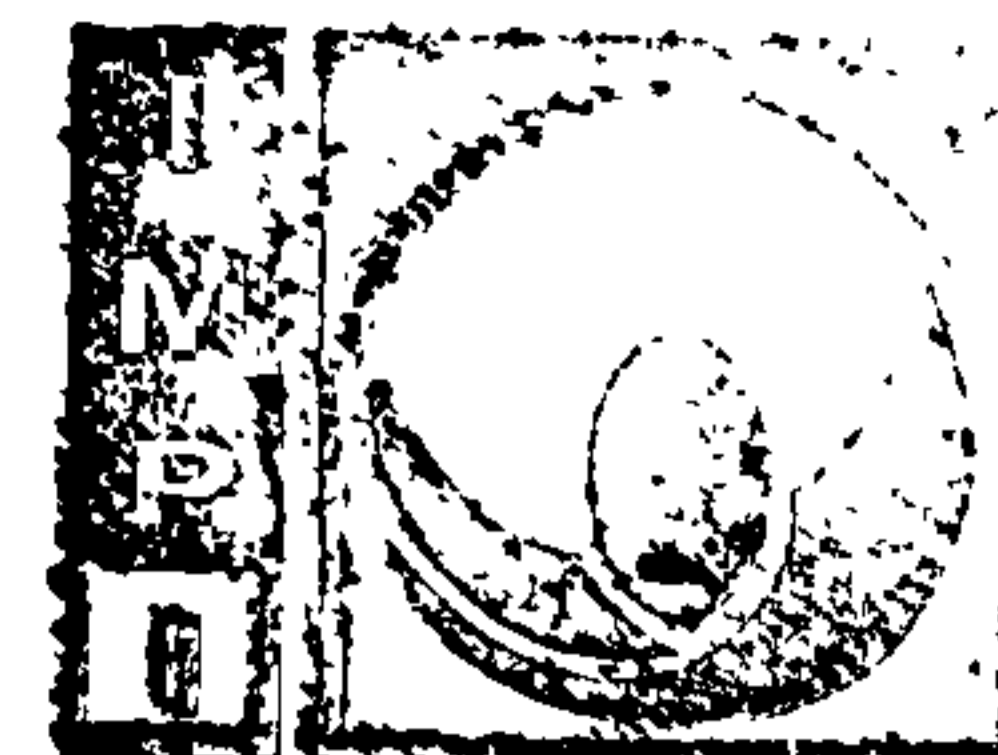
-5-

un sistema por lotes utilizando *Kloeckera* propagada mediante la forma tradicional y mediante el proceso presentado en esta invención (***Kloeckera* activada**). En la gráfica se puede observar que la *Kloeckera africana* propagada por el proceso de la invención (***Kloeckera* activada**), consume mayor cantidad de sustrato y produce una alta concentración de etanol en la fermentación que la *Kloeckera* propagada de la forma tradicional. Además las concentraciones finales de etanol obtenidas con la *Kloeckera* propagada mediante el proceso de esta invención (***Kloeckera* activada**), son similares a lo que se obtiene con la *Saccharomyces* a las mismas condiciones de fermentación.

10 En la Figura 2 se presenta la comparación del proceso de fermentación tradicional en la industria tequilera, con respecto a los **procesos de fermentación de jugo de agave** que propone esta patente. Se puede observar que en un sistema por lotes de fermentación de jugo de agave, las mayores concentraciones de etanol, los mas altos consumos de sustrato y el mayor valor de la productividad se muestran utilizando el proceso de fermentación y propagación que se menciona en la invención que proponemos, así mismo mediante estos procesos de fermentación y propagación se puede someter a la *Kloeckera africana* a fermentar altas concentraciones de azúcar con buenos resultados. Referente a la fermentación en un sistema continuo se puede apreciar que la productividad se eleva, por ejemplo a 12° Bx se presenta un aumento del 75% y de un 86% a 20°Bx. Cabe mencionar que las comparaciones anteriores solo se realizaron entre el sistema por lotes y el sistema continuo utilizando la ***Kloeckera* activada** y las condiciones de cultivo que menciona esta invención ya que no es posible compararla con el proceso tradicional debido a la baja capacidad fermentativa que presenta la *Kloeckera* utilizando la propagación y las condiciones de fermentación tradicionales.

25 Los siguientes procesos presentados muestran las condiciones óptimas de propagación y de fermentación en sistema por lotes y sistema continuo para la *Kloeckera* spp. Estos procesos aseguran un alto consumo del azúcar por parte de la *Kloeckera* así como un alto rendimiento de conversión azúcar etanol, altas productividades con respecto a lo que se obtiene normalmente en tequila y una concentración dentro de norma de los compuestos aromáticos volátiles que son regulados por el consejo regulador de tequila (CRT) a través de la norma NOM-006-SCFI-2005. No obstante que los procesos

30



presentados en esta invención se utilizaron solamente con *Kloeckera apiculata* y *Kloeckera africana*, pueden ser aplicados a cualquier especie de *Kloeckera*.

MEJOR METODO CONOCIDO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

5 El "proceso para propagar *Kloeckera apiculata* y *africana*", consta de las siguientes cuatro fases:

10 Fase 1. Obtención del jugo de agave: con el fin de realizar la propagación de la *Kloeckera apiculata* y *africana*, se requiere obtener jugo de agave a la concentración de 12 a 20 °Bx, según el proceso tradicional utilizado por la industria tequilera; una vez adquirido el jugo de agave a estas concentraciones, se procede la realización del *medio de propagación*,

15 Fase 2. Medio de propagación: con la finalidad de que la *Kloeckera apiculata* y *africana* presenten un crecimiento vigoroso y una alta concentración de biomasa, para lo cual se requiere formular un *medio de propagación* para evitar que la *Kloeckera apiculata* y *africana* sufran de limitación de nutrientes y/o inhibición por altas concentraciones de sustrato; el *medio de propagación* se realiza diluyendo el jugo de agave obtenido de la Fase 1, con agua destilada o de pozo hasta la concentración entre 6 a 8 °Bx, inmediatamente después de haber diluido el jugo de agave a la concentración mencionada, se le agrega a este último los siguientes nutrientes: 0.5 g/l, sulfato de amonio; 0.8 g/l, fosfato de amonio monobásico; 0.40 g/l, extracto de levadura; 0.19 g/l, cloruro de potasio; 0.06 g/l, cloruro de sodio; 0.021 g/l, cloruro de calcio; 0.01 g/l, sulfato de magnesio y 0.051 g/l, sulfato ferroso; inmediatamente después se homogeneiza el *medio de propagación* y a continuación se esteriliza a 15 psi durante 15 minutos; se deja enfriar el *medio de propagación* hasta temperatura ambiente para que se pueda continuar con el pre-inóculo,

25 Fase 3. Pre-inóculo de la *Kloeckera apiculata* y *africana*, a fin de iniciar la activación de la *Kloeckera apiculata* y *africana* se debe de realizar los siguiente pasos: en 50 ml de *medio de propagación* obtenido de la fase anterior, se le adiciona en condiciones de esterilidad aprox. $2 \pm 1 \times 10^6$ células/ml de *Kloeckera apiculata* y *africana*; al *medio de propagación* inoculado con *Kloeckera apiculata* y *africana*

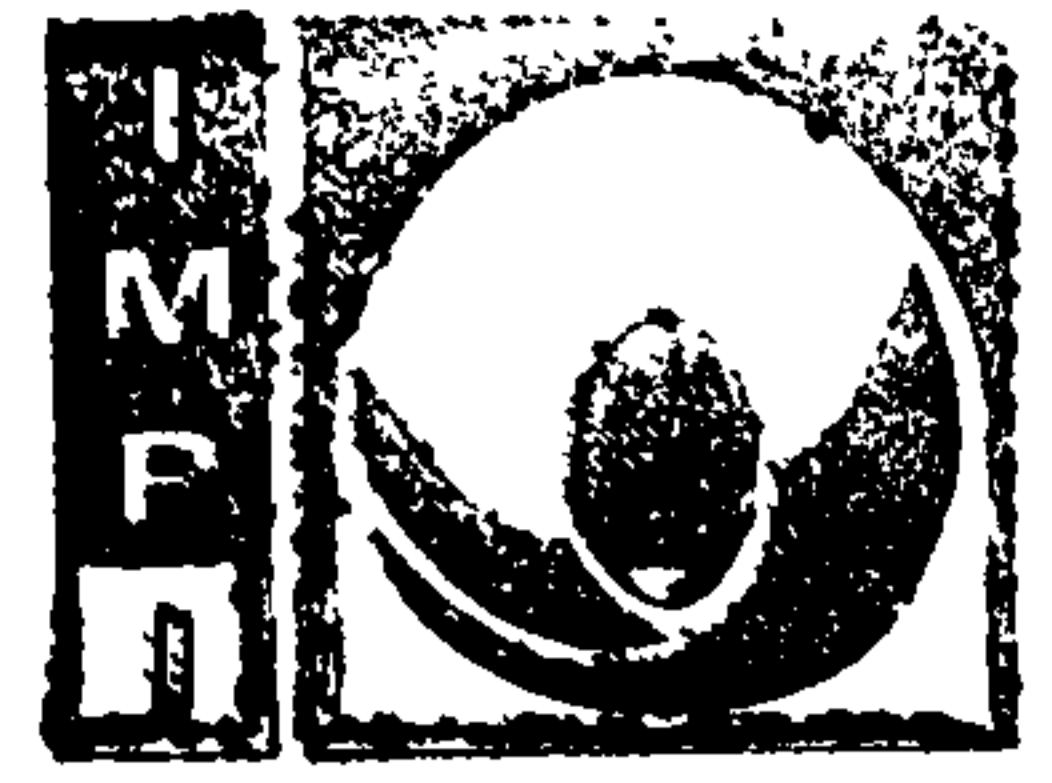
30



-7-

se incuba a 30 °C, 200 rpm durante 24 horas; a partir de este cultivo se preparará el inóculo,

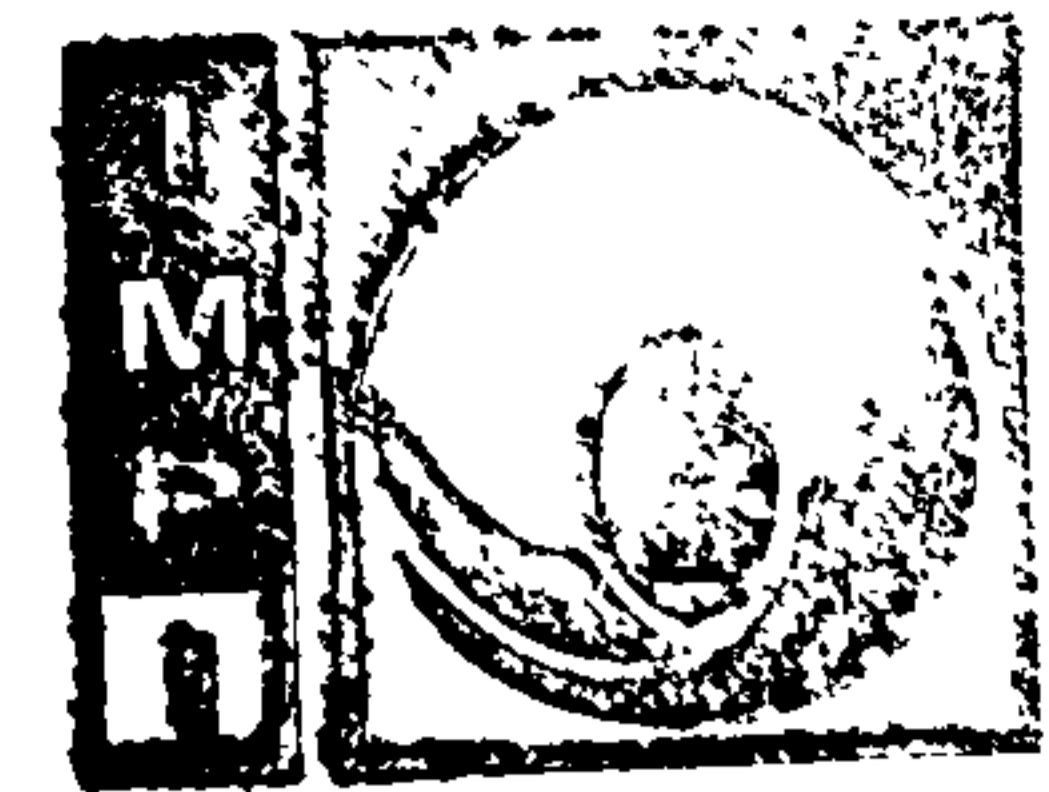
- 5 Fase 4. Inóculo de la *Kloeckera apiculata* y *africana*: para preparar el inóculo se agrega en condiciones de esterilidad a 250ml del *medio de propagación* obtenido de la fase 2, $20 \pm 5 \times 10^6$ células/ml de la *Kloeckera apiculata* y *africana* obtenidas del pre-inóculo de la fase anterior; el *medio de propagación* inoculado con la *Kloeckera apiculata* y *africana* se incuba a las mismas condiciones que se indican en la fase 3 (30 °C, 200 rpm) durante 10 a 12 horas con la finalidad de obtener $>100 \times 10^6$ células/ml de *Kloeckera apiculata* y *africana*. A la *Kloeckera apiculata* y *africana* propagada según este proceso se le llamará ***Kloeckera activada***, la cual estará apta y lista para ser utilizada en la fermentación de jugo de agave dentro del proceso para elaborar Tequila, tanto en un sistema por lotes como en un sistema en continuo.
- 10
- 15 El “proceso para fermentar jugo de agave en un sistema por lotes utilizando la *Kloeckera apiculata* y *africana*” consta de las siguientes cinco fases:
- Fase 1. Propagación de *Kloeckera apiculata* y *africana*, el cual se desarrolla según como se indica en el “proceso para propagar *Kloeckera apiculata* y *africana*”, una vez obtenida la ***Kloeckera activada*** se procede a realizar el *medio de fermentación*,
- 20
- Fase 2. *Medio de fermentación*, el *medio de fermentación* se realiza como a continuación se indica: para concentraciones de jugo de agave entre 12 a 15 °Bx se adiciona al medio líquido 1 g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio monobásico y para concentraciones de jugo de agave entre 16 a 20° Bx, se complementa con 1 g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio y 0.5 g/l de extracto de levadura; habiendo efectuado la adición de los nutrientes en el jugo de agave, estos se mezclan hasta su homogeneización completa, al jugo de agave adicionado con los nutrientes se le llamará: *medio de fermentación*; una vez que se haya obtenido el *medio de fermentación* homogeneizado se procede a la inoculación,
- 25
- 30



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Intelectual

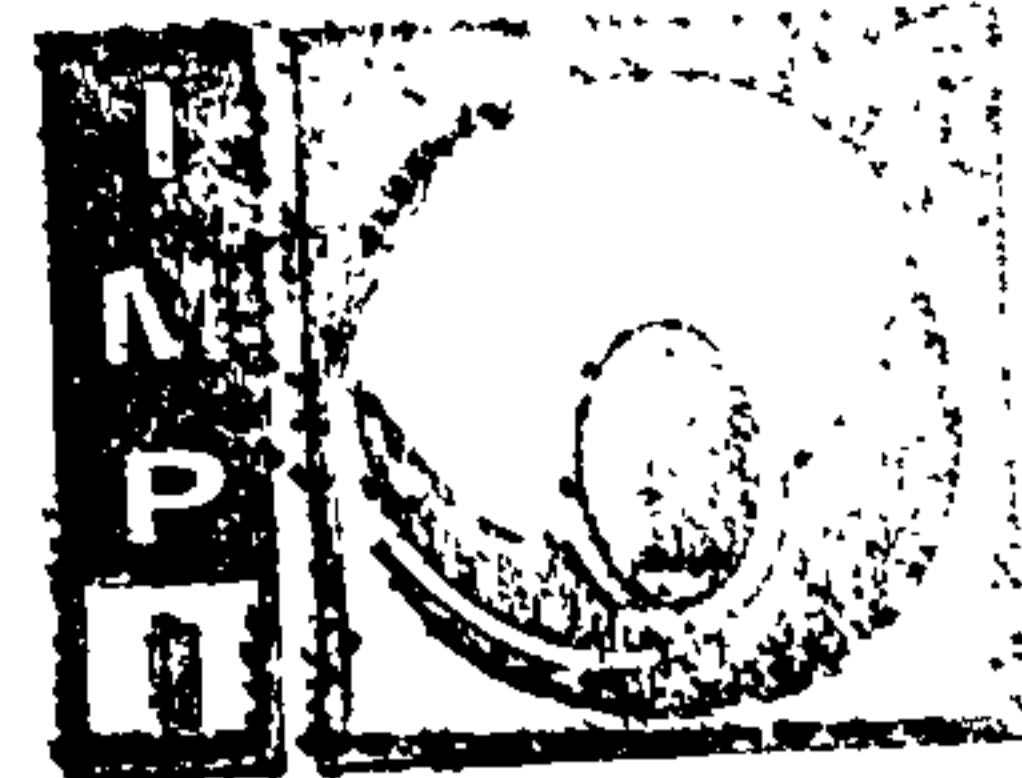
-8-

- Fase 3. Inoculación: la inoculación se realiza agregando 3.5×10^6 células/ml de la ***Kloeckera activada*** en 2.5 litros de *medio de propagación* obtenido en la fase anterior; una vez que el *medio de fermentación* este inoculado con la ***Kloeckera activada***, se inicia la fermentación,
- 5 Fase 4. Fermentación: con el fin de que todo el azúcar presente en el *medio de fermentación* se convierta principalmente en etanol y en compuestos aromáticos mediante el uso de la ***Kloeckera activada***; se requiere que se mantenga el *medio de fermentación* inoculado con ***Kloeckera activada*** en un equipo fermentador en condiciones de anaerobiosis no estrictas a 30 °C de temperatura y 250 rpm de agitación durante 72 horas. El equipo fermentador a utilizar puede ser un tanque abierto o cerrado de fondo redondo con agitación mecánica. El material del equipo fermentador no debe ser tóxico ni corrosivo como por ejemplo: vidrio y acero inoxidable. Para un buen control en el equipo fermentador, este debe de estar equipado para que pueda medir y regular la temperatura, una vez que concluya las 72 horas de fermentación, se obtiene el *mosto muerto* el cual se somete a una destilación,
- 10
- 15
- Fase 5. Destilación: con el objetivo de separar el alcohol del *mosto muerto*, se puede realizar en alambiques de cobre o de acero inoxidable o también en torres de destilación en forma continua; la metodología para destilar el *mosto muerto* es mediante la técnica tradicional utilizada por la industria tequilera. Terminado ésta fase es como obtenemos el tequila blanco, si se desea madurar el tequila, este se lleva a añejar en barricas de roble blanco por los procesos ya conocidos.
- 20
- 25 El “proceso para fermentar jugo de agave en un sistema continuo utilizando la ***Kloeckera africana*** en cultivo puro” consta de las siguientes seis fases:
- Fase 1. Propagación de *Kloeckera africana*, el cual se desarrolla según como se indica en el “proceso para propagar ***Kloeckera apiculata y africana***”, una vez obtenida la ***Kloeckera activada*** se procede a realizar el *medio de fermentación*,
- 30



-9-

- Fase 2. *Medio de fermentación*, el *medio de fermentación* se realiza como continuación se indica: al jugo de agave entre 12 a 20 °Bx se le adiciona los siguientes nutrientes: 1.0 g/l, sulfato de amonio; 1.6 g/l, fosfato de amonio monobásico; 0.90 g/l, extracto de levadura; 0.3815 g/l, cloruro de potasio; 0.013 g/l, cloruro de sodio; 0.042 g/l, cloruro de calcio; 0.021 g/l, sulfato de magnesio y 0.124 g/l, sulfato ferroso; habiendo efectuado la adición de los nutrientes en el jugo de agave, estos se mezclan hasta su homogeneización completa, al jugo de agave adicionado con los nutrientes se le llamará: *medio de fermentación*; una vez que se haya obtenido el *medio de fermentación* homogeneizado se procede a la inoculación,
- Fase 3. Inoculación, el cual se realiza agregando en 2.5 litros de *medio de fermentación* obtenido de la fase anterior, en condiciones estériles 3.5×10^6 de células/ml de la ***Kloeckera* activada**; una vez que la ***Kloeckera* activada** este inoculada en el *medio de fermentación*, se inicia la etapa de fermentación,
- Fase 4. Fermentación del *medio de fermentación* utilizando ***Kloeckera* activada**: esta fase inicia manteniendo el *medio de fermentación* obtenido de la fase 2 inoculado con ***Kloeckera* activada** en un equipo fermentador en un sistema por lotes con las siguientes condiciones: 30-35°C de temperatura y 200-300 rpm de agitación durante 10 horas o hasta obtener una concentración entre 80 y 100 $\times 10^6$ células/ml de ***Kloeckera* activada**, en ese momento se efectúa la alimentación del *medio de fermentación* y el desalojo del *mosto muerto*,
- Fase 5. La alimentación del *medio de fermentación* y el desalojo del *mosto muerto* en el equipo fermentador se realiza mediante dos bombas peristálticas (para un bajo flujo) o bombas centrífugas (para un alto flujo), con el objetivo de iniciar la fermentación en el sistema continuo. Las condiciones de fermentación con el sistema en continuo son: 0.06-0.12h⁻¹ de tasa de dilución, 200-300 rpm de agitación, 30-35 °C de temperatura, 3-4 de pH y 12-24 ml/s de flujo de aire, siendo las condiciones óptimas para la ***Kloeckera* activada**: 0.06 h⁻¹ de 16 a 20 °Bx y 0.10 h⁻¹ de 12 a 15 °Bx de la tasa de dilución; así como los siguientes parámetros de fermentación: 250 rpm, 35 °C, 3 de pH y 12 ml/s de flujo de aire, los cuales son independientes de la concentración del azúcar inicial. Para esta fase se requiere un equipo fermentador que sea un tanque abierto o cerrado de



-10-

fondo redondo con agitación mecánica, el material debe ser de acero inoxidable para evitar que sea tóxico y corrosivo; además para obtener un óptimo control de las condiciones de fermentación, el equipo fermentador debe de estar equipado para medir y regular la temperatura y el pH del *medio de fermentación*; se requiere además que el equipo fermentador tenga acceso a un sistema de aeración siendo el más común un distribuidor de aire situado al final de eje del agitador. El flujo de aire puede ser proporcionado por un compresor o un cilindro de aire comprimido; la adición de aire puede ser regulado por un rotámetro. El *mosto muerto* obtenido del flujo de salida del equipo fermentador es sometido a una destilación,

Fase 6. Destilación: se realiza la destilación del *mosto muerto* con el fin de separar el etanol y los compuestos aromáticos, para lo anterior se puede utilizar alambiques de cobre o de acero inoxidable o puede ser en torres de destilación en forma continua; la metodología para destilar el **mosto muerto** es mediante la técnica tradicional que realiza la industria tequilera, obteniendo así el tequila blanco, si se desea madurar el tequila, este se lleva a añejar en barricas de roble blanco por lo procesos ya conocidos.

DOCUMENTOS CITADOS

1. Bayrock, D.P. and Ingledew, W.M. 2001. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. J. of Ind. Microbiol. and Biotech., 27: 87-93.
2. Brányik, T., Vicente, A.A., Machado Cruz, J.M. and Teixeira, J.A. 2004. Continuous Primary Fermentation of Beer with Yeast Immobilized on Spent Grains-The Effect of Operational. Conditions. J. Am. Soc. Brew. Chem., 62: 29-34.
3. Cedeño C. M. (1995). Tequila production. Critical Reviews in Biotechnology, Vol. 15, No.1:1-11.
4. Choi C. Y. et al. (1997). Continuous fermentation process for the production of metabolites using a moving filter. North American Patent US5688674.
5. Consejo Regulador del Tequila. <http://www.crt.org.mx>.



6. Fundación Produce Jalisco. 2003. Programa Nacional Estratégico de Necesidades de Investigación y de Transferencia de Tecnología. Reporte Final Etapa II.
- 5 7. Kunkee R. E. (1984) Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. Food Microbiology No. 1:315-332.
8. Lawford H. G. (1985) Continuous process for ethanol production by bacterial fermentation. North American Patent US4808527.
9. Mitsuyasu Okabe, Atsushi Oda, Yong Soo Park, Katsuhiro Noguchi, Takanori Okamoto and Shunsuke Mitsui. 1994. Continuous beer fermentation by high cell-density culture of bottom brewer's yeast Journal of Fermentation and Bioengineering, 77: 41-445.
- 10 10. Nilsson A., Liden G., Gorwa-Grauslund M. F., Hahn-Haegerdal B. (2005) Ethanol productivities of *Saccharomyces cerevisiae* strains in fermentation of dilute-acid hydrolyzates depend on their furan reduction capacities. European Patent WO2005111214.
- 15 11. PECYTJAL 2001-2007. 2003. Programa Estatal de Ciencia y Tecnología del estado de Jalisco.
12. Plessas, S., Bekatorou, A., Koutinas, A.A., Soupioni, M., Banat, I.M. and Marchant, R. 2006. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. Bioresources Technology, xx: xx,xx.
- 20 13. Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M y Capece A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. International Journal of Food Microbiology, No. 86:169-180.
- 25 14. Ryu D. and Kim Y. 1984. Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. Biotechnology and Bioengineering, 16: 12-16.
- 30 15. Soufleros E. (1979). Les levures de la région de Naoussa (grèce). Identification et classification, étude des produits volatils formés au cours de la fermentation. Thèse de Docteur-ingénieur. Univ. Bordeaux II.



Instituto
Brasileiro
de Tecnologia
Industrial

-12-

- 5
16. Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall S.J. 1999. Principles of fermentation technology (2da. Ed). Butterworth Heinemann, 13-31.
 17. Vasconcelos, J.N. de, Lopes, C.E. and França, F.P. 2004. Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. Braz. J. Chem. Eng. [online]. July/Sept. 2004, vol.21, no.3 [cited 05 July 2006], p.357-365.



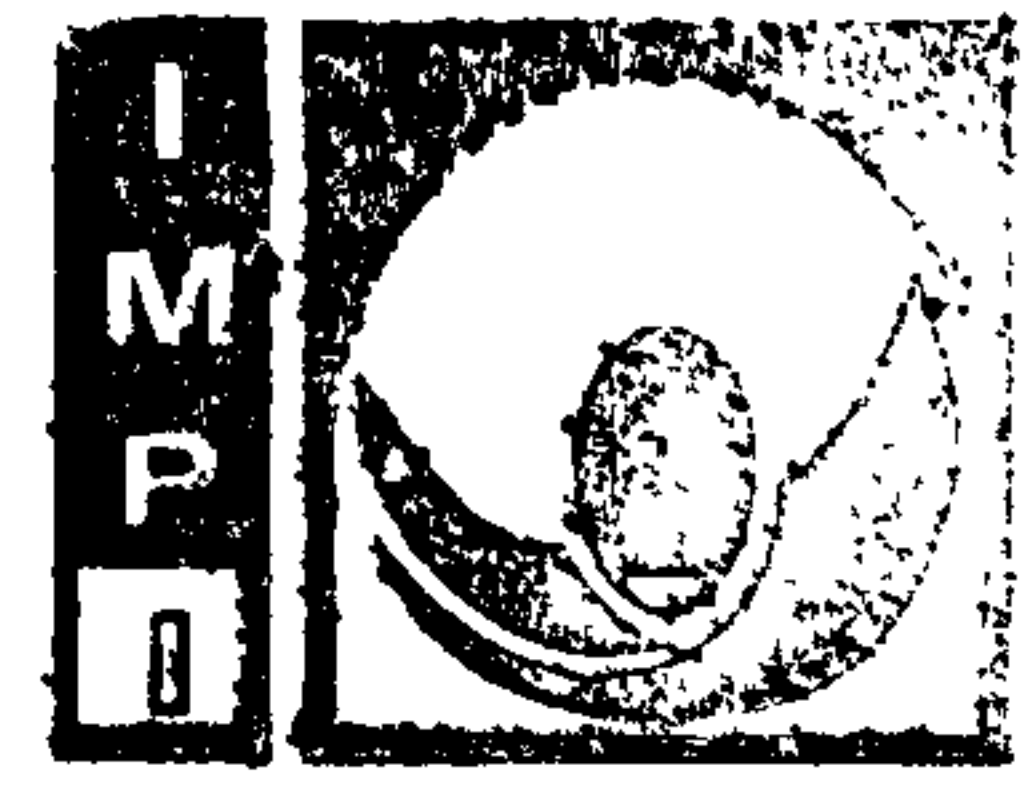
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

-13-

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficientemente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

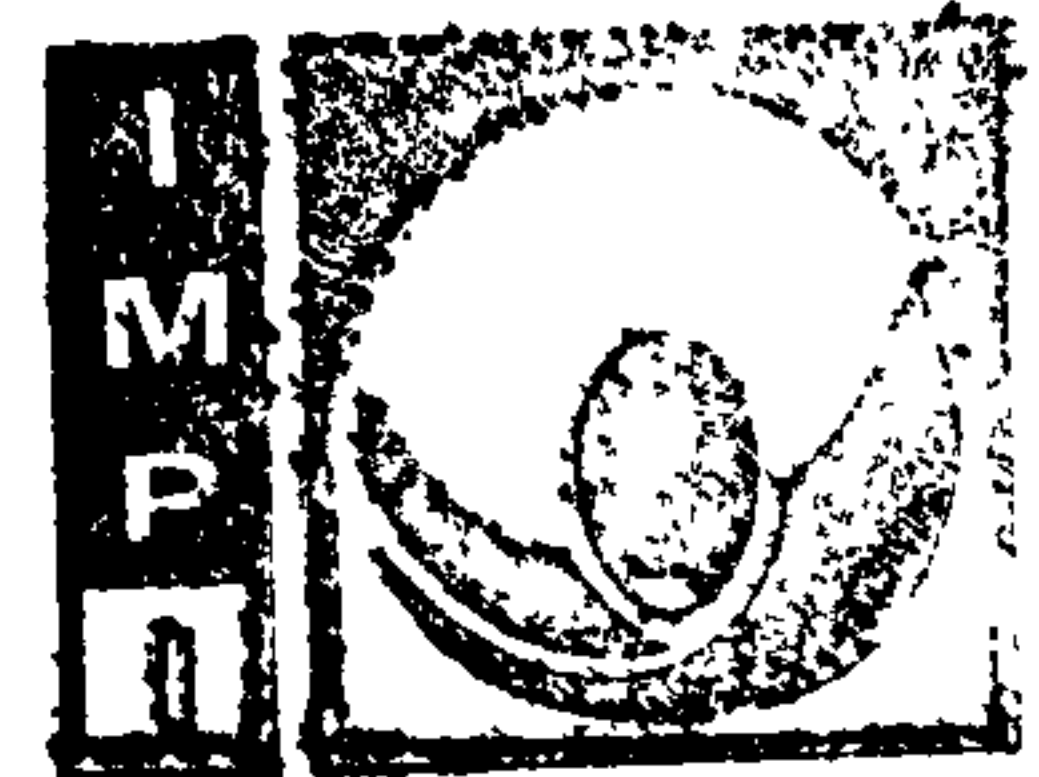
- 5 1. Proceso para propagar *Kloeckera africana activada* lista para ser utilizada en la fermentación de jugo de agave en la elaboración de tequila caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- 10 a. preparar pre-inóculo: agregar $2\pm 1 \times 10^6$ células/ml de *Kloeckera africana* a 50 ml de un medio de propagación que contiene jugo de agave en una concentración de 6 a 8°Bx, 0.5g/l de sulfato de amonio, 0.8g/l de fosfato de amonio monobásico, 0.40 g/l extracto de levadura; 0.19 g/l cloruro de potasio; 0.06 g/l, cloruro de sodio; 0.021 g/l de cloruro de calcio; 0.01 g/l de sulfato de magnesio y 0.051 g/l de sulfato ferroso, e incubar a 30°C y 200rpm durante 24 horas;
- 15 b. preparar inóculo: agregar $20\pm 5 \times 10^6$ células/ml de *Kloeckera africana* obtenidas de la etapa anterior a 250ml de un medio de propagación que contiene: jugo de agave en una concentración de 6 a 8°Bx, 0.5g/l de sulfato de amonio, 0.8g/l de fosfato de amonio monobásico, 0.4g/l de extracto de levadura, 0.19g/l de cloruro de potasio, 0.06 g/l de cloruro de sodio, 0.021g/l de cloruro de calcio, 0.01g/l de sulfato de magnesio y 0.051g/l de sulfato ferroso, e incubar a 30°C y 200rpm durante 10 a 12 horas; hasta que la propagación de *Kloeckera africana activada* sea $> 100 \times 10^6$ celular/ml.
- 20 2. Proceso para fermentar jugo de agave con *Kloeckera africana* para la elaboración de tequila en un sistema por lotes caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- 25 a. inocular: agregar 3.5×10^6 células/ml de *Kloeckera africana activada* conforme a la reivindicación 1 en 2.5l de un medio de propagación que contiene jugo de agave en una concentración de 12 a 15°Bx, 1g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio monobásico;
- 30



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

-14-

- b. fermentar: a 30°C y 250rpm durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis no estrictas en un tanque abierto o cerrado de fondo redondo con agitación mecánica; y
- c. destilar: separar el alcohol del mosto muerto en alambiques de cobre o acero inoxidable o en torres de destilación en forma continua.
- 5
3. Proceso para fermentar jugo de agave con *Kloeckera africana* para la elaboración de tequila en un sistema por lotes de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque en la etapa a), el medio de propagación contiene jugo de agave en una concentración de 16 a 20°Bx, 1 g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio y 0.5g/l de extracto de levadura.
- 10
4. Proceso para fermentar jugo de agave con *Kloeckera africana* para la elaboración de tequila en un sistema continuo caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- a. inocular: agregar 3.5×10^6 células/ml de *Kloeckera africana* activada obtenida conforme a la reivindicación 1 en 2.5L de un medio de fermentación que contiene jugo de agave en una concentración de 12 a 20°Bx, 0.1g/l de sulfato de amonio, 1.6g/l de fosfato de amonio monobásico, 0.9g/l de extracto de levadura, 0.3815g/l de cloruro de potasio, 0.013g/l de cloruro de sodio, 0.042g/l de cloruro de calcio, 0.021 g/l de sulfato de magnesio y 0.124g/l de sulfato ferroso;
- 15
- b. fermentar: en un rango de 30-35°C y 200-300rpm de agitación durante 10 horas o hasta obtener una concentración entre 80 y 100×10^6 células/ml de *Kloeckera africana* activada en un tanque abierto o cerrado de fondo redondo con agitación mecánica, de vidrio o acero inoxidable equipado para medir y regular temperatura, pH y aireación del medio de fermentación;
- 20
- c. adicionar medio de fermentación como se define en el paso a), y desalojar el mosto muerto manteniendo las siguientes condiciones: tasa de dilución $0.06-0.12 \text{ h}^{-1}$, 200-300rpm, 30-35°C, pH 3-4, y 12-24ml/s de flujo de aire; y
- 25
- d. destilar: separar el alcohol del mosto muerto en alambiques de cobre o acero inoxidable o en torres de destilación en forma continua.
- 30



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

-15-

- 5
- 10
- 15
- 20
5. Proceso para fermentar jugo de agave con *Kloeckera africana* para la elaboración de tequila en un sistema continuo de conformidad con la reivindicación 4 caracterizado porque en la etapa a) el medio de fermentación contiene jugo de agave en una concentración de 16 a 20°Bx y en la etapa c) las condiciones son tasa de dilución $0.06h^{-1}$, pH3, 250rpm, 35°C y flujo de aire de 12ml/s.
 6. Proceso para fermentar jugo de agave con *Kloeckera africana* para la elaboración de tequila en un sistema continuo de conformidad con la reivindicación 4 caracterizado porque en la etapa a) el medio de fermentación contiene jugo de agave en una concentración de 12 a 15°Bx y en la etapa c) las condiciones son tasa de dilución $0.1h^{-1}$, pH3, 250rpm, 35°C y flujo de aire de 12ml/s.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

-16-

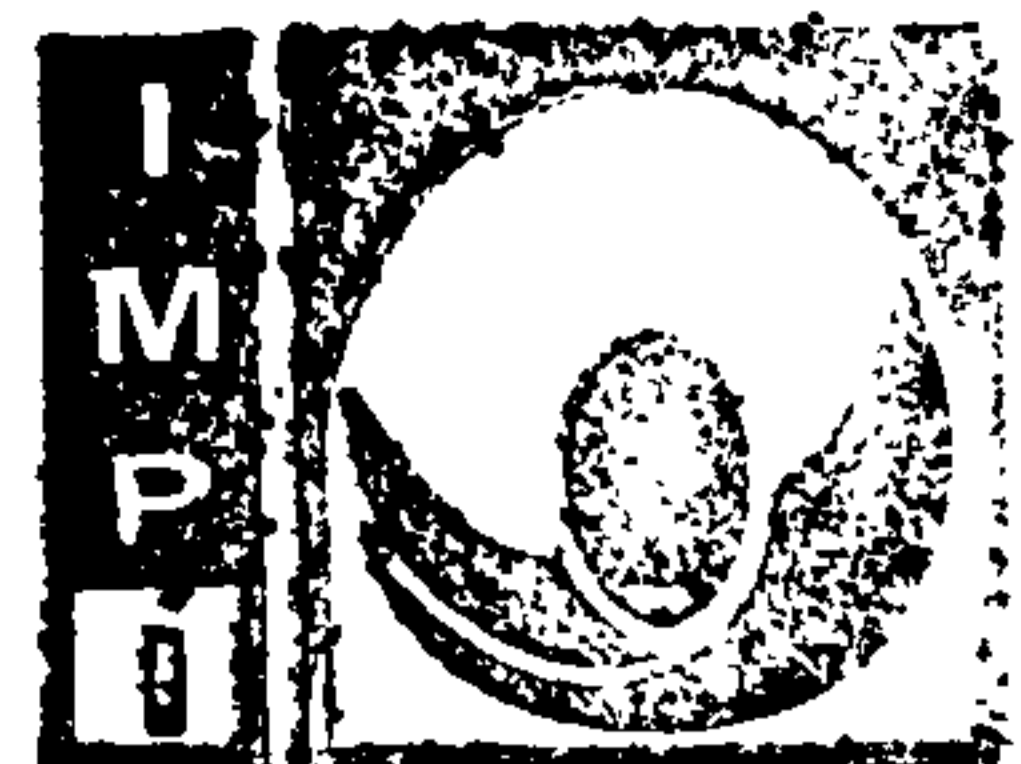
RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a procesos para fermentar jugo de agave utilizando *Kloeckera* spp., así como un proceso de propagación de la *Kloeckera*. Desde hace más de cinco años, las levaduras del genero *Kloeckera* han recobrado interés por su capacidad de generar aromas y perfumes agradables, sin embargo su uso en la elaboración de bebidas alcohólicas esta limitada por su baja capacidad fermentativa debido a una presunta intolerancia a altas concentraciones de etanol. En esta invención se presenta un proceso de propagación para activar esta levadura y hacerla eficiente en la fermentación de jugo de agave en un sistema por lotes a altas concentraciones de azúcar a condiciones similares a la que utiliza la industria tequilera, alcanzando concentraciones finales de etanol equiparadas a las que se obtienen con la levadura universalmente utilizada en este campo que es la *Saccharomyces*. Conjuntamente se muestra en esta invención la metodología para utilizar la *Kloeckera* en la fermentación de jugo de agave a altas concentraciones de azúcar en un sistema continuo, el cual aun no se ha establecido en la industria tequilera; presentando productividades arriba de 72% con respecto al sistema por lotes.

20

25

30



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

FIGURA 1

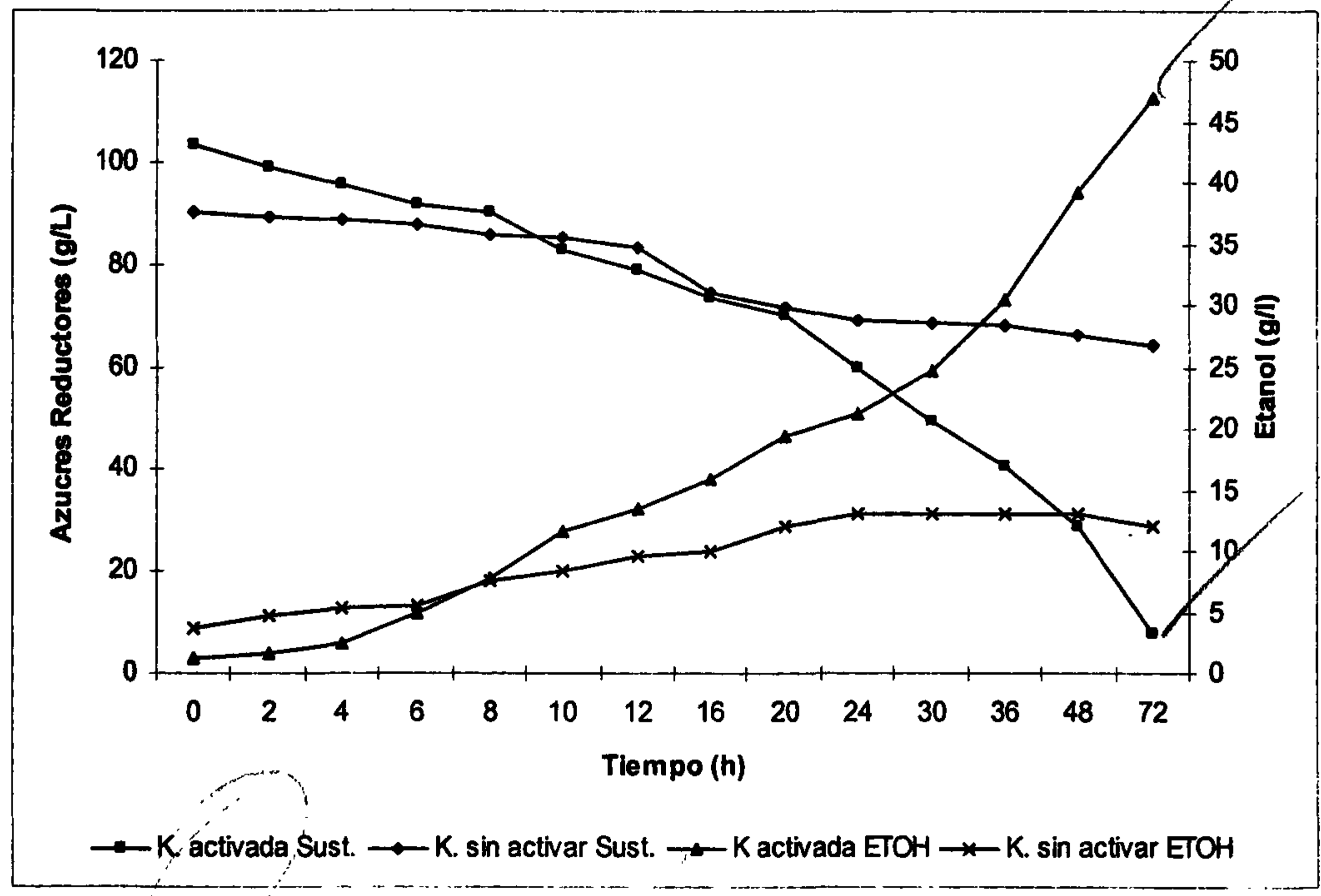




Figura 2

