SE
SECRETARÍA DE ECONOMÍA

Institut M xican d la Pr pi dad Industrial

# TÍTULO DE PATENTE NO. 328903

| | |
|---|---|
| **Titular(es):** | CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C. |
| **D micilio:** | Av. Normalistas, No. 800, Col. Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO |
| **Denominación:** | APLICACIÓN DE LAS LEVADURAS SACCHAROMYCES Y KLOECKERA NATIVAS EN LA FERMENTACIÓN DE JUGO DE AGAVE PARA GENERAR UN PERFIL AROMÁTICO DISTINTIVO |
| **Clasificación:** | Int.Cl.8: C12G3/00 |

**Inve** LCE MARIA DÍAZ MONTAÑO, MINA ESTAMPRON

**Núme**

**Fe presentación:** **H**

19 de diciembre de 2008 16:27

**PRIORIDAD**

**País:** **Fecha:** **Número:**

**Vigencia:** Veinte años

**Fecha de Vencimiento:** 19 de diciembre de 2028

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1°, 2° fracción V, 6° 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, sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6° fracciones III y 7° bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.), publicada el 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1994, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/07/2006, 06/05/2009,06/01/2010, 18/06/2010, 26/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1°, 3° fracción V inciso a), sub inciso iii) 4° y 12° fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículo 1°, 3° fracción V inciso a), sub inciso iii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 25/11/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1°, 3° y 5° inciso a) y antepenúltimo párrafo del Acuerdo que delega 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 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

**Fecha de expedición:** 29 de enero de 2015

**ECTOR DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES, ÁREAS A, ELÉCTRICA Y DE REGISTROS DE DISEÑOS INDUSTRIALES Y MODELOS DE UTILIDAD**

**PEDRO DAVID FRAGOSO LÓPEZ**

Arenal No 550 Piso 1,
Col Pueblo Santa María Tepepan
Delegación Xochimilco
C P 16020 México, D. F
Tel (55) 53 34 07 00 www.impi.gob.mx

MX/2015/32146

328903
29-I-2015

MX2008/000577

**"Aplicación de las l vaduras *Saccharomyces* y *Kloeckera* nativas en la fermentación de jugo de agave para generar un perfil aromático distintivo"**

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

## CAMPO TÉCNICO.

La presente invención se refiere a la aplicación de las levaduras tequileras *Saccharomyces* (S1, S2 y S3) y *Kloeckera* (K1 y K2) en la fermentación de jugo de agave de forma tradicional, que genera un perfil aromático distintivo en el tequila.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El tequila es una bebida destilada Mexicana con reconocimiento internacional, obtenida del *agave tequilana* Weber var. azul. El proceso de la elaboración del tequila envuelve cinco etapas principales: cosecha y jimado de la materia prima (agave), cocimiento, molienda, fermentación y destilación. El agave es cocido y molido con la finalidad de hidrolizar la inulina principalmente en fructosa así como facilitar la extracción del jugo. Además de la hidrólisis de inulina durante el cocimiento de agave, se presentan las reacciones de Maillard debido al calentamiento, formándose varios compuestos aromáticos principalmente, 5-hidroximetil furfural [Mancilla-Margalli & López, 2002]. El jugo de agave es diluido para alcanzar de 12-14° Bx y en algunos casos una fuente de nitrógeno inorgánico es agregada antes de iniciar la fermentación alcohólica. En algunas destilerías la fermentación es llevada a cabo espontáneamente mientras que en otras, el jugo de agave es inoculado con levaduras seleccionadas, usualmente *Saccharomyces*. El jugo de agave fermentado es sometido a una doble destilación y después diluido con agua potable para obtener una concentración final de alcohol del 38-40% v/v. Si se desea, el producto es añejado en barricas de roble blanco de 2 a 12 meses como mínimo para obtener tequila reposado y tequila añejo respectivamente [Cedeño, 1995]. Durante la fermentación alcohólica, la levadura consumen azucares y producen principalmente etanol y $CO_2$ como también numerosos compuestos volátiles como productos secundarios que imparten aromas y perfumes a la bebida final. En la etapa primaria de la fermentación de jugo de agave, las levaduras non-*Saccharomyces* (principalmente *Kloeckera* y *hanseniaspora*, proliferan y su crecimiento es detenido por una intolerancia a etanol [Kunkee, 1984] y/o a una

limitación nutricional [Díaz-Montaño et al., 2008], cediendo su lugar progresivamente a levaduras con alta capacidad fermentativa, *Saccharomyces cerevisiae* [Lacchance, 1995]. En vinos, se ha detectado que las levaduras non-*Saccharomyces*, *Kloeckera* y *Hanseniaspora* producen altas concentraciones de compuestos volátiles interesantes, como son: etil acetato (aroma frutal), fenil etil acetato (aroma floral), fenetil alcohol (aroma a rosas) y acetoína (aroma a mantequilla fresca) [Romano et al., 2003; Moreira et al., 2005]. En tequila, aun no se ha reportado trabajos en donde se muestre la huella aromática de las levaduras tequileras con la finalidad de generar un perfil aromático característico en la bebida final. Lo anterior es de importancia, ya que la mayoría de los compuestos aromáticos que impactan en la bebida final, son producidos en la fermentación por acción de las levaduras. Cabe mencionar que en tequila existen estudios que reportan el perfil aromático del destilado [Aguilera-Rojo et al., 2003; Vallejo-Cordova et al., 2004; Lachenmeier et al., 2006; Benn & Peppard, 1966] en donde destacan compuestos de las familias de los alcoholes, esteres y ácidos y en menor concentración los: aldehídos, cetonas, terpenos, fenoles y sulfuros.

A pesar del gran avance que se ha presentado en vinos sobre la caracterización aromática de levaduras indígenas, en la industria tequilera, aun es escaso el conocimiento sobre las capacidades aromáticas de levaduras nativas (tequileras), hasta ahora solo se ha reportado una caracterización aromática parcial de levaduras tequileras en jugo de agave fermentado, presentando principalmente los compuestos aromáticos volátiles que regulan la norma oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005 [Díaz-Montaño et al., 2008; Arrizon & Gschaedler, 2007]. En la actualidad existen patentes otorgadas en la producción de compuestos aromáticos por levaduras, sin embargo ninguna contiene lo que propone la invención que se esta presentando. Como ejemplo tenemos la patente WO2007099230 (Expression system for yeast for the production of aromatic molecules). Esta patente tiene el objetivo de producir el precursor de vainilla natural como son el eugenol y el acido ferúlico así como la transformación genética de la levadura que contenga por lo menos un gen que codifica vainillina alcohol oxidasa proveniente de *Penicillium simplicissimun*. En cambio, en la invención que nosotros proponemos no realizamos una transformación genética, ni tampoco nos enfocamos en un solo compuesto, sino

que analizamos todos los compuestos aromáticos que pueden producir las levaduras nativas (silvestres) obtenidas en la etapa de fermentación del proceso de tequila a condiciones establecidas por la industria. Otra patente es la WO9620272 (Novel aromatic yeast strains), la cual utiliza la hibridación haploide con *Saccharomyces* para obtener nuevas levaduras que produzcan altas concentraciones de isoamil acetato y/o etil hexanoato (caproato). Estas levaduras tienen la finalidad de ser empleadas en la etapa de fermentación de bebidas alcohólicas y/o alimentos para enriquecerlos con aromas agradables. En la invención que nosotros presentamos, se realiza una huella aromática donde se efectúa un escaneado del jugo de agave fermentado en búsqueda de compuestos aromáticos de diferentes naturalezas que impacten en el bouquet del tequila utilizando levaduras nativas (indígenas) sin ninguna modificación genética. La presente invención relaciona las cualidades aromáticas de levaduras tequileras de los géneros *Saccharomyces* (S1, S2 y S3) y *Kloeckera* (K1 y K2) así como su utilización en la industria tequilera en función del perfil aromático que generan.

Las ventajas directas que obtiene la industria tequilera con la utilización de la invención que se presenta son: mediante la determinación de los compuestos aromáticos producidos en la fermentación de jugo de agave por acción de las levaduras nativas seleccionadas, conocer el perfil aromático generado para cada levadura tequilera con el fin de diseñar perfiles aromáticos distintivos que provean de una personalidad al producto final. El aspecto antes mencionados es una de las necesidades actuales que la industria tequilera requiere (PECYTJAL, 2003, Fundación produce, 2003) y que resuelve la invención que aquí proponemos.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los detalles característicos de esta invención: "Aplicación de las levaduras *Saccharomyces* y *Kloeckera* nativas en la fermentación de jugo de agave para generar un perfil aromático distintivo" se muestran claramente en la siguiente descripción y figuras:

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1y 2 son los resultados obtenidos de un análisis estadístico multivariado llamado componentes principales PCA, en el cual se puede definir los principales

compuestos aromáticos por concentración (Figura 1) que caracterizan cada genero de levaduras tequileras: *Saccharomyces cerevisiae* S1, S2 y S3, *Kloeckera africana* K1 y *Kloeckera apiculata* K2 (Figura 2), en una fermentación de jugo de agave a las condiciones de la industria tequilera; El análisis estadístico se realizó con el programa Simca-P7.01

En lo referente a la Figura 1 se observa una agrupación de los compuestos aromáticos identificados según concentración y naturaleza química. Simultáneamente (figura 1) se puede observar los compuestos que muestran mayor variabilidad entre las cinco levaduras. Los compuestos aromáticos fueron: EA: acetato de etilo, IB: acetato de isobutilo, ISB: isobutanol, IA: acetato de isoamilo, BUT: n-butanol, LIM: limoneno, ISOA: alcohol amílico e isoamílico, HE: hexanoato de etilo, MT: 2-metil tetrahidrofurano-3-ona, ACET: acetoina, EL: lactato de etilo, HEX: n-hexanol, EO: hexanoato de etilo, AA: ácido acético, AF: 2-acetil furano, BENZ: benzaldehído, LINA: linalol, OCT: n-octanol, MF: 5-metil furfural, 4TERP: 4-terpineol, ED: decanoato de etilo, GA: geranil acetato, FFA: alcohol furfurilico, GTERP: α-terpineno, CT: citronelool, NER: nerol, EFA: etil fenil acetato, DDA: dodecanoato de etilo, HEXAN: ácido hexanoico, FA: 2-fenil etanol, DD: n-dodecanol, NERO: nerolidol, TTD: tetradecanoato de etilo, OA: ácido octanóico, TT: tetradecanol, HEA: hexadecanoato de etilo, HEP: n-hexadecanol, DA: ácido decanoico, FAR: farnesol, IEU: isoeugenol, LA: ácido dodecanoico, FAR2: farnesol, EUG: eugenol, PA: ácido hexadecanoico, y los que presentaron mayor variación entre levaduras son: etil fenil acetato, acetoina, acetato de etilo, n-butanol, ácido acético, benzaldehído, ácido octanoico, ácido hexanoico, acetato de isoamilp, hexanoato de etilo, isoeugenol, alcoholes isoamilicos, α-terpineno, nerolidol, 2-fenil etanol, 5-metil furfural, farmesol, n-dodecanol, tetradecanoato de etilo, nerolidol, limoneno, isobutanol y n-hexadecanol.

Los primeros seis compuestos etil fenil acetato, acetoina, etil acetato, n-butanol, ácido acético, benzaldehído, son sintetizados en mayor concentración por las levaduras del genero *Kloeckera* mientras que los demás compuestos son producidos principalmente por las levaduras del género *Saccharomyces*.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

En lo referente a la Figura 2, se observa que las levaduras se agruparon por su género según la concentración, así como la naturaleza del compuesto aromático sintetizado.

Las levaduras tequileras que se presentan en esta invención aseguran que las concentraciones de los compuestos aromáticos volátiles que son regulados por el consejo regulador de tequila (CRT) a través de la norma NOM-006-SCFI-2005, están dentro de rango y pueden ser etiquetadas como levaduras seguras para ser utilizadas en la industria tequilera.

Figura 3 - Es el proceso de aplicación de las levaduras *Saccharomyces* y *Kloeckera* nativas en la fermentación de jugo de agave para generar un perfil aromático distintivo.

MEJOR METODO CONOCIDO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

La "Aplicación de las levaduras *Saccharomyces* y *Kloeckera* nativas en la fermentación de jugo de agave para generar un perfil aromático distintivo" consta de las siguientes ocho etapas:

Etapa 1. **Obtención del jugo de agave:** con el fin de formular el medio de propagación y el de fermentación para las levaduras tequileras *Saccharomyces cerevisiae* S1, S2 y S3, *Kloeckera africana* K1 y *Kloeckera apiculata* K2, 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 a la realización del *medio de propagación y del medio de fermentación*,

Etapa 2. **Mosto de agave y de propagación,** el mosto de agave y de propagación de las levaduras tequileras *Saccharomyces cerevisiae* S1, S2 y S3, *Kloeckera africana* K1 y *Kloeckera apiculata* K2, se prepara con la finalidad de que las levaduras se acondicionen al medio de jugo de agav ; para ello es necesario formular el jugo de agave a utilizar, para evitar que este presente una limitación de nutrientes ocasionando un bajo crecimiento del microorganismo así como una fermentación lenta.

Fase 2.1. **Mosto de agave**: con la finalidad de obtener un medio de cultivo que no presente limitación por nutrientes para las levaduras tequileras, se prepara adicionando al jugo de agave a 12 °Bx obtenido de la etapa anterior, 1 g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio monobásico o mezcla de ambos, el *medio de fermentación* se homogeneiza y se continua con la preparación del *medio de propagación,*

Fase 2.2 **Medio de propagación:** con la finalidad de acondicionar las levaduras tequileras al *medio de fermentación* dentro del proceso de elaboración de tequila, se debe formular un *medio de propagación* diluyendo el jugo de agave obtenido de la etapa 1 con agua destilada o de pozo hasta la concentración entre 3 a 6 ºBx, inmediatamente después de haber diluido el jugo de agave a la concentración mencionada, se le agrega 1 g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio monobásico o mezcla de ambos; 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,

Etapa 3. **Pre-inóculo de las levaduras tequileras,** a fin de obtener una alta concentración de biomasa de las levaduras tequileras para utilizarla después en el *inóculo*, se adicionan en condiciones de esterilidad aprox. 2±1 x$10^6$ células/ml de las levaduras tequileras a examinar en 50 ml de *medio de propagación* obtenido de la etapa 2, el *medio de propagación* con las levadura tequileras se incuba entre 30 a 35 ºC, 200 a 300 rpm durante 24 horas; a partir de este cultivo se preparará el inóculo,

Etapa 4. **Inóculo de las levaduras tequileras:** con el fin de acondicionar fisiológicamente las levaduras tequileras, el mosto de agave obtenido de la etapa 2, se agrega en condiciones de esterilidad a 250ml del *medio de propagación* obtenido de la etapa 2, 20±5 x$10^6$ células/ml de las levaduras tequileras obtenidas del pre-inóculo de la etapa 3; el *medio de propagación* inoculado con las levaduras tequileras se incuban a las mismas

IMPI
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

condiciones que se indican en la etapa 3 (30-35°C, 200-300 rpm) durante 10 a 12 horas con la finalidad de obtener >100 x$10^6$ células/ml de levaduras, una vez alcanzado >100 x$10^6$ células/ml de levadura, se continúa con la etapa de inoculación del *mosto de agave*,

Etapa 5. **Inoculación del *mosto de agave*,** el proceso de inoculación del *mosto de agave* es el siguiente: en 2.5 litros del *medio de fermentación* obtenido en la etapa 2 se le agrega como mínimo 3.5 x$10^6$ células /ml de levaduras tequileras obtenida de la etapa anterior, una vez realizado la inoculación del *mosto de agave* se inicia la fermentación,

Etapa 6. **Fermentación del *mosto de agave***: 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 levadura tequilera seleccionada propagada como se menciona en las etapas 3 y 4 e inoculado en el *mosto de agave* como se indica en la etapa 5, el mosto de agave inoculado con levadura tequilera seleccionada se mantiene en un equipo fermentador abierto o cerrado en condiciones de anaerobiosis no estrictas entre 30 a 35 °C de temperatura y 200 a 300 rpm de agitación entre 48 a 72 horas.

Etapa 7. **Análisis de los compuestos aromáticos volátiles en el *medio de fermentación*** Con el objetivo de identificar y medir la concentración de los compuestos aromáticos volátiles producidos por las levaduras tequileras, en el jugo de agave fermentado, se requirió el uso de un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard 5890 Series II) acoplado a un espectrómetro de masas (HP 5972). El procedimiento utilizado fue el siguiente: 35 ml de 3:1 v/v de una solución de pentano:diclorometano fue agregado a 160 ml del *medio de fermentación* inoculado con la levadura tequilera seleccionada y fermentado durante 72 horas, obtenido de la etapa 6. La mezcla anteriormente mencionada fue centrifugada a 5 °C y 7,552 x g por 5 min. El sobrenadante obtenido por la acción de la centrifugación llamados como "*extractos orgánicos*" fueron secados con sulfato de sodio y reducido a 0.4 ml utilizando un aparato Kuderna-Danish. Una muestra de 0.5 µl del *extracto orgánico seco*, fue inyectado en el cromatógrafo con detector de

masas en modo split (60:1). La separación fue realizada utilizando una columna capilar marca HP-Innowax (60 x 0.25mm x 0.25 µm). Las condiciones de operación fueron las siguientes: gas acarreador (helio) a 1 ml/min; temperatura del horno inicial 40 °C por 5 min, después se elevó a 2.5 °C/min hasta llegar a 220 °C y se mantuvo a esta ultima temperatura por 35 min. El detector y el inyector del equipo de cromatografía acoplado al detector de masas se mantuvieron respectivamente en 220 °C y 260 °C. El espectrofotómetro de masas fue operado a un voltaje de ionización de 70 eV, escaneando entre 30-350 m/z a 1.39 scans/s.

Etapa 8. **Identificación de los compuestos aromáticos volátiles** con el fin de identificar los compuestos aromáticos volátiles extraídos en la etapa 7, se utilizó una librería (5972 MS ChemStation G 1034 C version C.01.05 Wiley 175), mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos de la etapa 7 y la librería de espectros, así como también del tiempo de retención de estándares de compuestos aromáticos volátiles.

Etapa 9. **Cuantificación de los compuestos aromáticos volátiles** con el fin de determinar la concentración de los compuestos aromáticos volátiles extraídos en la etapa 7, se realizó mediante estándares externos usando siete soluciones diluidas conteniendo 0.1, 0.2, 1.25, 3.5, 7, 14 y 25 mg/L de cada uno de los siguientes compuestos: isobutanol, n-butanol, alcoholes amilicos, n-hexanol, n-octanol, 2-fenil etanol, n-dodecanol, n-tetradecanol, n-hexadecanol, etil acetato, isobutil acetato, isoamil acetato, etil hexanoato, etil lactato, etil octanoato, etil decanoato, geranil acetato, etil fenil acetato, etil dodecanoato, etil tretadecanoato, etil hexadecanoato, benzaldehido, acetoina, ácido acético, ácido octanoíco, ácido decnoíco, ácido dodecanoíco, ácido hexadecanoíco, limoneno, linalool, 4-terpineol, α-terpineno, citronelool, nerol, nerodilol, farmesol trans trans, isoeugenol, eugenol, 2-metil tetrahidrofurano-3-one, 2-acetil furan y 5-metil furfural. A partir de la ecuación obtenida de la concentración del compuesto (estándares externos) y el área del pico obtenido en el cromatograma, se determinó la concentración del compuesto.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

DOCUMENTOS CITADOS

Aguilera-Rojo DK, Martín del Campo ST, Cosio-Ramirez R, Escalona-Buendía HB, Estarron-Espinosa M. 2003. Identification of distinctive parameters between Tequila mixto and Tequila 100% agave by gas chromatography. In: Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century, Proceedings of the 10th Weurman Flavor Research Symposium (Editions Tec & Doc: Paris, France). p. 761-764. Beaune, France, June 25-28.

Arrizon, J. and Gschaedler, A. 2007. Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *J appl microbial* **102**, 1123-1131.

Benn S, Peppard LT. 1996. Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. J Agric Food Chem, 44: 557-566.

Cedeño M. 1995. Overview of tequila production with an emphasis on the role of yeast. Dist. Bev. Ind. Ferment. Technol. 11:87-92.

Consejo Regulador del Tequila. http://www.crt.org.mx.

Díaz-Montaño D. M., Délia M. L., Estarrón-Espinosa M. and Strehaiano P. 2008. Fermentative capability and aroma compounds production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice.

Fundación Produce Jalisco. 2003. Programa Nacional Estratégico de Necesidades de Investigación y de Transferencia de Tecnología. Reporte Final Etapa II.

Fundación Produce Jalisco. 2003. Programa Nacional Estratégico de Necesidades de Investigación y de Transferencia de Tecnología. Reporte Final Etapa II.

Kunkee D. 1984. Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. Food Microbiology. 1:315-332.

Kurose N. et al., 1996. Novel aromatic yeast strains. European Patent WO9620272.

Lachance M. A. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek. 68: 51-60.

Lachenmeier DW, Sohnius EM, Attig R, López MG. 2006. Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). J of Agric and food chem, 54: 3911-3915.

Mancilla-Margalli N, López M. 2002. Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. azul. J. Agric. Food

Chem, 50: 808-812.

Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T. and Vasconcelos, I. 2005. Alcohols, esters and heavy sulfur compounds productions by pure and mixed cultures of apiculate wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **103**: 285-294.

PECYTJAL 2001-2007. 2003. Programa Estatal de Ciencia y Tecnología del estado de Jalisco.

Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M, Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor. Int J Food Microbiol, 86: 169-180.

Vallejo-Cordova B, González-Córdova AF, Estrada-Montoya CM. 2004. Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. J Agric Food Chem, 52: 5567-5571.

Zucca J. et al. 2008. Expresión system for yeast for the production of aromatic molecules. European Patent WO2007099230.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

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:

1.- Un método "**para generar un perfil aromático distintivo mediante la utilización de las levaduras *Saccharomyces* (S1, S2 y S3) y *Kloeckera* (K1 y K2) nativas en la fermentación de jugo de agave**" caracterizado porque se compone de las siguientes etapas y fases:

Etapa 1. **Obtener el jugo de agave,** obtener jugo de agave a la concentración de 12 a 20 °Bx;

Etapa 2. **formular el mosto de agave**, con las siguientes fases:

Fase 2.1. **preparar mosto de agave**: adicionar al jugo de agave obtenido de la etapa anterior, 1 g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio o bien una mezcla de ambos; el *medio de fermentación* se homogeneiza y se continua con la preparación del *medio de propagación;*

Fase 2.2 **preparar medio de propagación:** diluir el jugo de agave obtenido de la etapa 1 con agua destilada o de pozo hasta la concentración entre 3 a 6 °Bx, inmediatamente después, agregar 1 g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio monobásico o mezcla de ambos; después homogeneizar el *medio de propagación* y esterilizar a 15 psi durante 15 minutos; enfriar el *medio de propagación* hasta temperatura ambiente para continuar con el pre-inóculo;

Etapa 3. **Pre-inóculo de la levaduras tequileras**, adicionar en condiciones de esterilidad aprox. 2±1 x$10^6$ células/ml de *Saccharomyces cerevisiae* y/o *Kloeckera* en 50 ml de *medio de propagación* obtenido de la etapa 2, el *medio de propagación* con la levadura tequilera a estudiar, incubar entre 30 a 35 °C, 200 a 300 rpm durante 24 horas; a partir de este cultivo se preparará el inóculo;

Etapa 4. **preparar inóculo de las levaduras tequileras,** al *medio de fermentación* obtenido de la etapa 2, agregar en condiciones de esterilidad a 250ml del *medio de propagación* obtenido de la etapa 2, 20±5 x$10^6$ células/ml de la levadura tequilera seleccionada obtenida del pre-inóculo de

la etapa 3; el *medio de propagación* inoculado con la levadura tequilera seleccionada, incubar a 30-35°C, 200-300 rpm durante 10 a 12 horas con la finalidad de obtener >100 x$10^6$ células/ml de la levadura tequilera seleccionada;

Etapa 5. **realizar inoculación del *medio de fermentación*,** en 2.5 litros del *medio de fermentación* obtenido en la etapa 2 agregar como mínimo 3.5 x$10^6$ células /ml de *la* levadura tequilera seleccionada obtenida de la etapa 4;

Etapa 6. **fermentar el jugo de agave**: mantener el *medio de fermentación* inoculado con la levadura tequilera seleccionada en un equipo fermentador abierto o cerrado en condiciones de anaerobiosis no estrictas entre 30 a 35 °C de temperatura y 200 a 300 rpm de agitación durante 48 o 72 horas;

Etapa 7. **analizar los compuestos aromáticos volátiles en el *medio d fermentación*** mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, utilizando el procedimiento siguiente: 35 ml de 3:1 v/v de una solución de pentano:diclorometano agregar a 160 ml del *medio de fermentación* inoculado con la levadura tequilera seleccionada y fermentado durante 72 h; centrifugar la mezcla a 5 °C y 7,552 x g por 5 min; secar los *extractos orgánicos* con sulfato de sodio y reducido a 0.4 ml utilizando un aparato Kuderna-Danish; inyectar una muestra de 0.5 µl del *extracto orgánico seco* en el cromatógrafo con detector de masas en modo split (60:1) en donde la separación es realizada utilizando una columna capilar marca HP-Innowax (60 x 0.25mm x 0.25 µm); las condiciones de operación son las siguientes: gas acarreador (helio), a 1 ml/min, temperatura del horno inicial 40 °C por 5 min, después elevar a 2.5 °C/min hasta llegar a 220 °C durante 35 min, mantener el detector y el inyector del equipo respectivamente en 220 °C y 260 °C en donde el espectrofotómetro de masas se opera a un voltaje de ionización de 70 eV, escaneando entre 30-350 m/z a 1.39 scans/s;

Etapa 8. **identificar los compuestos aromáticos volátiles** se utilizó una librería (5972 MS ChemStation G 1034 C version C.01.05 Wiley 175), mediante la comparación de los espectros de masas y la librería de espectros, así como también del tiempo de retención de estándares de compuestos aromáticos volátiles;

Etapa 9. **cuantificar los compuestos aromáticos volátiles** por medio de estándares externos usando siete soluciones diluidas conteniendo 0.1, 0.12, 1.25, 3.5, 7, 14 y 25 mg/L de cada uno de los siguientes compuestos: isobutanol, n-butanol, alcoholes amilicos, n-hexanol, n-octanol, 2-fenil etanol, n-dodecanol, n-tetradecanol, n-hexadecanol, etil acetato, isobutil acetato, isoamil acetato, etil hexanoato, etil lactato, etil octanoato, etil decanoato, geranil acetato, etil fenil acetato, etil dodecanoato, etil tretadecanoato, etil hexadecanoato, benzaldehido, acetoina, acido acético, acido octanoíco, acido decnoíco, acido dodecanoíco, acido hexadecanoíco, limoneno, linalool, 4-terpineol, α-terpineno, citronelool, nerol, nerodilol, farmesol trans trans, isoeugenol, eugenol, 2-metil tetrahidrofurano-3-one, 2-acetil furan y 5-metil furfural; a partir de la ecuación obtenida de la concentración del compuesto (estándares externos) y el área del pico obtenido en el cromatograma, se determina la concentración del compuesto;

2.- Proceso de conformidad con la reivindicación 1 en donde la levadura empleada es *Saccharomyces S1.*

3.- Proceso de conformidad con la reivindicación 1 en donde la levadura empleada es *Saccharomyces S2 .*

4.- Proceso de conformidad con la reivindicación 1 en donde la levadura empleada es *Saccharomyces S3.*

5.- Proceso de conformidad con la reivindicación 1 en donde la levadura empleada es *Kloeckera K1.*

6.- Proceso de conformidad con la reivindicación 1 en donde la levadura empleada es Kloeckera K2.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

5.- Perfil aromático de acuerdo a reivindicación 6 o 7 caracterizado por tener altas concentraciones de los siguientes compuestos aromáticos: etil fenil acetato, acetoina, etil acetato, n-butanol, ácido acético y benzaldehído.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial


RESUMEN

La presente invención se refiere a la **"Aplicación de las levaduras del género de *Saccharomyces* y de *Kloeckera* nativas del proceso de tequila, en la fermentación de jugo de agave para generar un perfil aromático distintivo".** A pesar del gran interés de la industria tequilera de obtener bouquet distintivos que provean de una personalidad al producto final, aun no se han hecho estudios profundos en este aspecto. En esta invención se presentan un método de producción de compuestos aromáticos obtenidos por levaduras tequileras de diferentes géneros.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

**Figura 1**

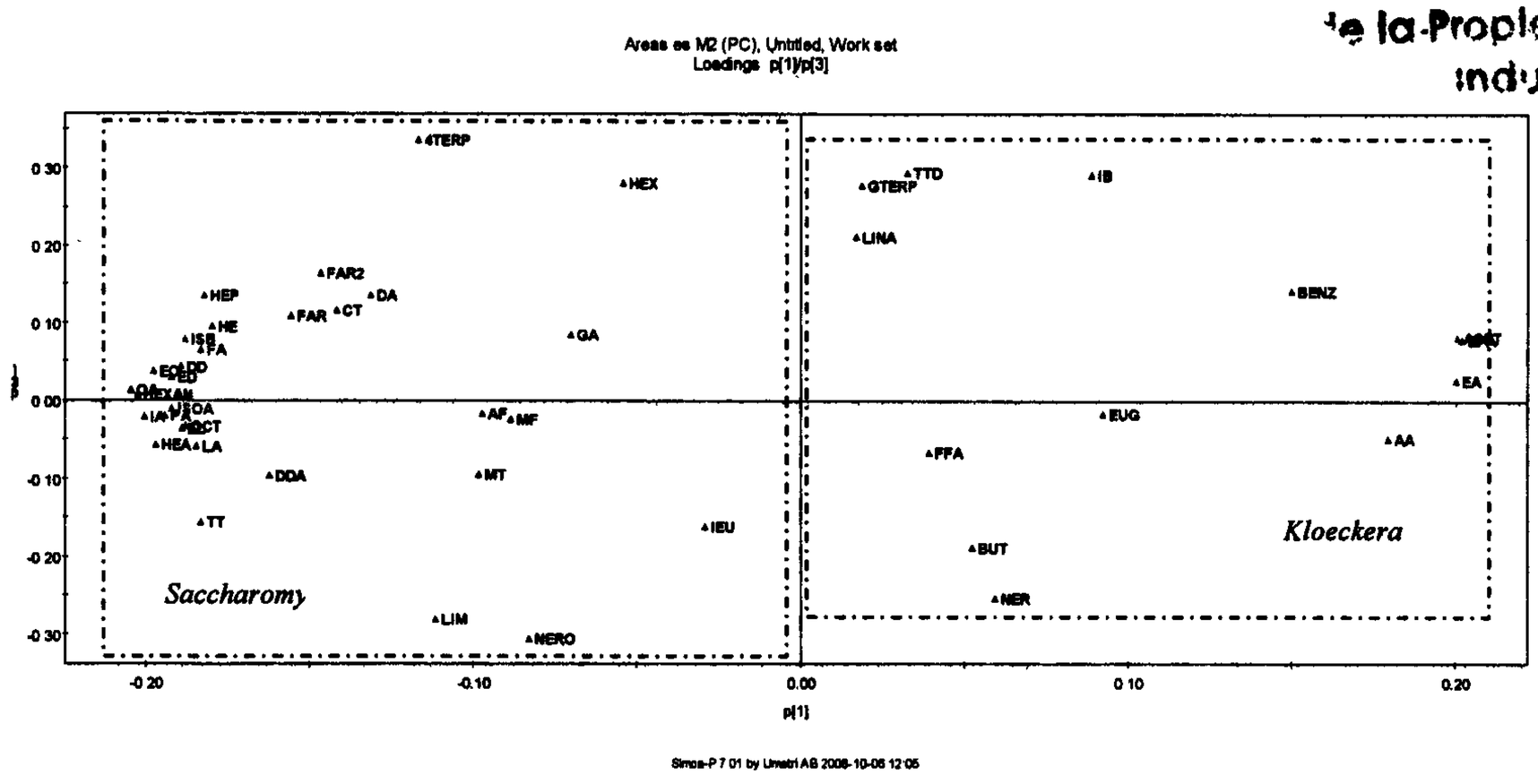



**Figura 2**

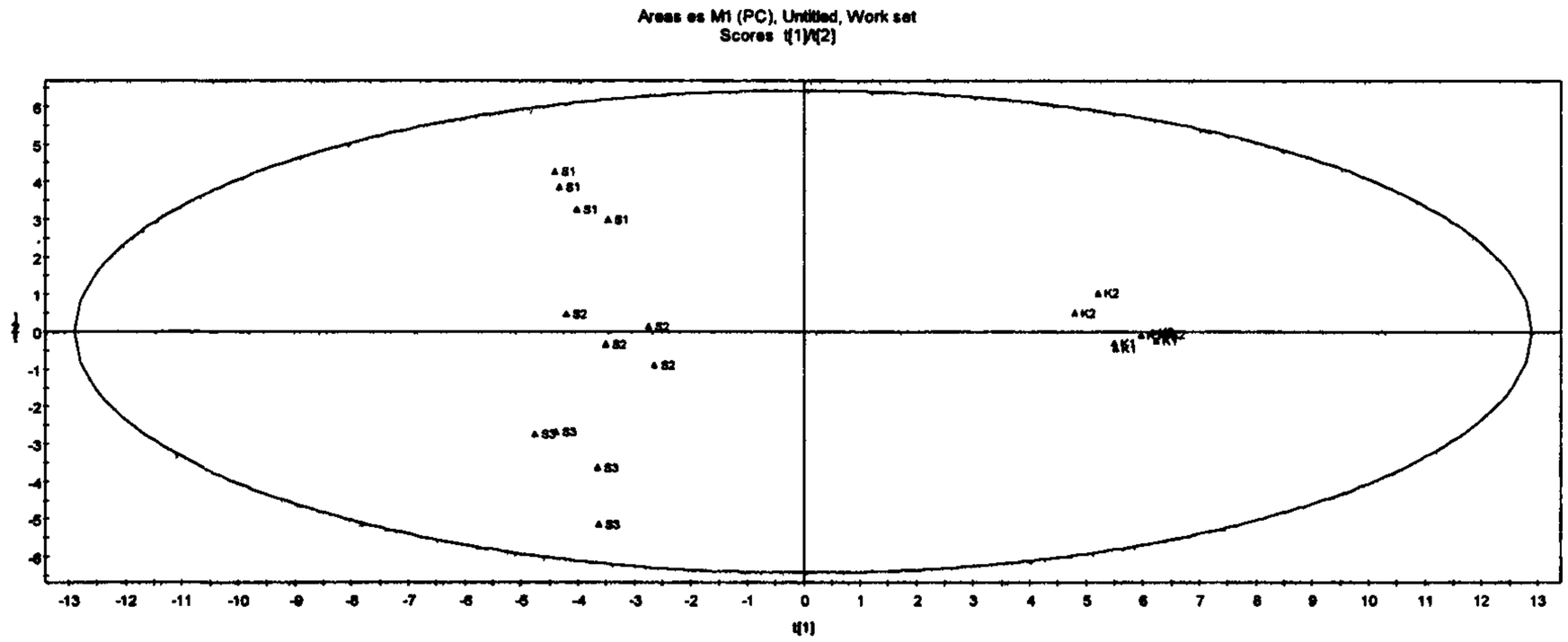
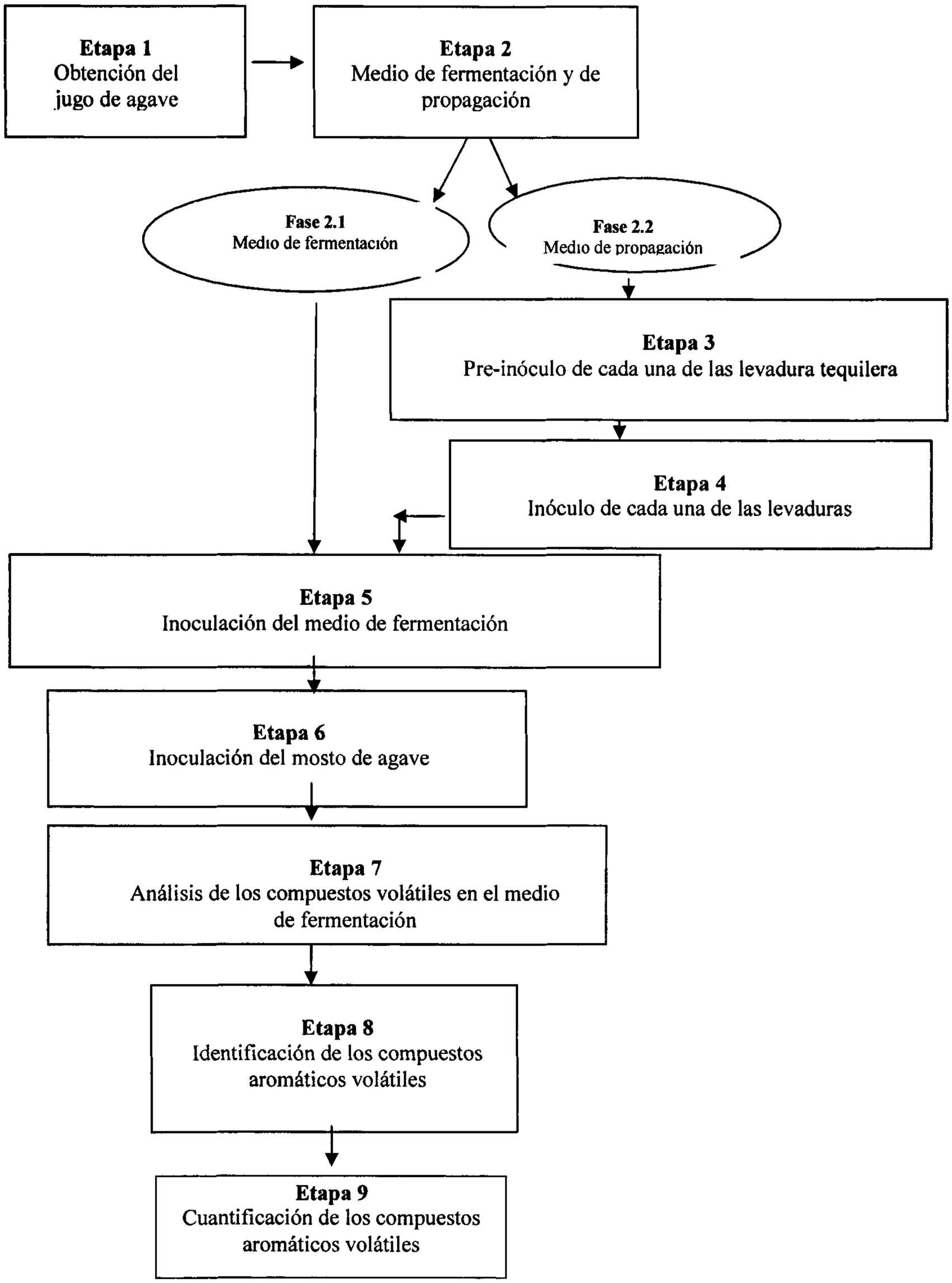


Figura 3

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial