Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

SE
SECRETARÍA DE ECONOMÍA

TÍTULO DE PATENTE NO. 337330

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 AUMENTAR LA CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES.

Clasificación: Int.Cl.8: [illegible]

Inventor(es): DULCE [illegible] DÍAZ MONTAÑO; JUAN OCTAVIO VALLE RODRÍGUEZ

SOLICITUD

Número:	**Fecha de presentación:**	**Hora:**
MX/a/2009/014243	21 de diciembre de 2009	15:59

PRIORIDAD

País:	**Fecha:**	**Número:**

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 21 de diciembre de 2029

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos [illegible] fracción V, 6º fracción [illegible] de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente [illegible] de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y [illegible] sujeta al pago de la tarifa [illegible] vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto en los artículos [illegible] fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 1[illegible]/05/1999, [illegible]6/01/2004, 16/06/2005, 2[illegible]/01/2006, [illegible]6/05/2009,06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º 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); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) 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: 8 de febrero de 2016

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES

NAHANNY CANAL REYES

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

MX/2016/15049

337330

2009/14243

IMPI INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

"Procesos para aumentar la capacidad fermentativa de levaduras no-*Saccharomyces*."

CAMPO TECNICO DEL INVENTO

La presente invención esta relacionada a la etapa de fermentación en el proceso de producción de bebidas alcohólicas destiladas como no destiladas, el cual se refiere a un proceso para propagar levaduras no-*Saccharomyces*, así como para utilizarlas en la fermentación de jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada en cultivos puros.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La fermentación alcohólica tradicional a partir de jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada para producir bebidas alcohólicas destiladas como no destiladas (tequila, vinos, cerveza, ron, bacanora, mezcal, whisky, vodka,), se realiza de forma espontánea en cultivos por lotes. La fermentación espontánea se lleva a cabo mediante una sucesión de poblaciones de diferentes levaduras. En vinos se ha reportado 15 géneros de levaduras durante la fermentación de jugo de uva (Pretorius *et al.*, 1999): *Dekkera* y su versión asexual *Brettanomyces*, *Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Hanseniaspora* y su equivalente asexual *Kloeckera, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces, Saccharomycodes, Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces*; mientras que en tequila se han identificado 10 géneros (Lachance, 1995): *Brettanomyces, Candida, Hanseniaspora, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycodes, Zygosaccharomyces, Torulaspora* y *Iwatchenkia,* de los cuales, la mayoría se hallan en vinos. Durante la fermentación alcohólica, las levaduras consumen azúcares y producen principalmente etanol y CO_2 como también numerosos compuestos volátiles como productos secundarios que imparten aromas y perfumes a la bebida final. La levaduras no-*Saccharomyces*, proliferan en las primeras etapas de la fermentación y su crecimiento es rápidamente inhibido por la presencia de etanol, aprox. 5 a 6 % vv[1], cediendo progresivamente el lugar a levaduras mas tolerantes al alcohol con alta capacidad fermentativa, principalmente *S. cerevisiae* (Kunkee, 1984; Fleet GH and Heard GM,, 1993; Ciani M and Picciotti G, 1995). A pesar que las levaduras no-*Saccharomyces* están activas en un corto periodo (pocas horas) en la

IMPI
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

fermentación alcohólica, contribuyen en la calidad aromática de la bebida final (Comi *et al.,* 2001; Romano *et al.*, 2003). En contraste con levaduras *Saccharomyces*, las no-*Saccharomyces* tienen la capacidad de sintetizar varias enzimas extracelulares tales como esterasas y *β*-glucosidasas las cuales poseen un importante rol en las características aromáticas del vino, convirtiendo los compuestos precursores de aromas en el jugo de uva a compuestos aromáticos activos (Charoenchai *et al.*, 1997). En efecto, se ha detectado que las levaduras no-*Saccharomyces* del género *Kloeckera*/*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), los cuales impactan en el bouquet (Romano *et al.*, 2003; Moreira *et al.,* 2005). En tequila, se ha reportado que las levaduras nativas no-*Saccharomyces* del género *Kloeckera* sintetizan en mayor medida (Díaz-Montaño & Estarrón-Espinosa, 2008): etil fenil acetato (aroma a rosas), acetoína (aroma a mantequilla), etil acetato (aroma frutal), acido acético (olor a vinagre) y benzaldehído (aroma a almendras). Por otro lado, se ha obtenido una alta aceptabilidad de vinos elaborados con jugo de uva Pinot Noir y Chardonay utilizando levaduras no-*Saccharomyces* del género *P. membranaefaciens* y *Kloeckera apiculata*, respectivamente en cultivo puro (Mamede *et al.,* 2005). Los anteriores estudios, revalúa el rol de las levaduras no-*Sacharomyces* para ser utilizadas en la elaboración de bebidas alcohólicas a partir de la fermentación de jugos de frutas, vegetales, tubérculos o de macerados de cereales, sin embargo, la baja capacidad fermentativa que presentan, hace que estos géneros solo puedan ser utilizados en cultivos mixtos junto con *S. cerevisiae*. No obstante, estudios recientes en vinos (Albergaria *et al.,* 2003) como en tequila (Díaz-Montaño *et al.,* 2008; Valle-Rodriguez *et al.,* 2009; Juan Octavio Valle-Rodriguez, 2009), han mostrado que la baja capacidad fermentativa de las levaduras no-*Saccharomyces* del género *Kloeckera* se debe principalmente a una limitación nutricional mas que a una intolerancia a etanol. Efectivamente, medios de cultivos de jugo de agave suplementados con ciertos nutrientes (minerales, extracto de levadura y sulfato de amonio), han permitido elevar las capacidades fermentativas de levaduras no-*Saccharomyces* del género *Kloeckera* (Díaz-Montaño *et al.,* 2010).

Debido a que la mayoría de los compuestos aromáticos que impactan en la bebida final son producidos en la fermentación por la acción de levaduras principalmente no-

Saccharomyces y que el grado de contribución al perfil aromático del bouquet depende en gran medida del periodo de supervivencia de estas levaduras en las fermentaciones, el objetivo de la presente invención "**Procesos para aumentar la capacidad fermentativa de levaduras no-*Saccharomyces*"**, es el de establecer los procesos adecuados de propagación de levaduras no-*Saccharomyces* de los géneros: *Candida shehatae, Pichia pastoris, Debaryomyces hansenii, Torulaspora delbrueckii, Hanseniaspora uvarum, Pichia membranaefaciens, Kloeckera africana y apiculata, Kluyveromyces marxianus* y *Pichia kluyveri,* para utilizarlas precisamente en la etapa de fermentación de jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada, lo que permitirá que las levaduras no-*Saccharomyces* mencionadas anteriormente, presenten un alto consumo de azucares así como una alta producción de etanol, para que de esta manera puedan ser utilizadas en la elaboración de bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas.

Lo anterior permitirá que las levaduras no-*Saccharomyces* aumenten su duración en la etapa fermentativa así como su capacidad fermentativa, traduciéndose en una alta conversión de azúcar a etanol ($Y_{p/s}$ ≥0.49), mayor tolerancia al etanol así como una rápida fermentación de los azúcares, de forma similar a las que presentan las levaduras de las especies *S. cerevisiae*, la cual es la levadura universalmente utilizada en la producción de bebidas alcohólicas.

Actualmente existe una solicitud de patente MX/a/2006/000053, titulada: Procesos para fermentar jugo de Agave utilizando *Kloeckera* spp., la cual describe un proceso para aumentar las capacidades fermentativas de levaduras no-*Saccharomyces* del género *Kloeckera* en la elaboración de tequila, en donde se determina las condiciones fisicoquímicas y nutrimentales de la etapa de propagación y de fermentación, pero no contienen lo que se propone en esta invención, ya que sólo se limita a un sólo género de levaduras no-*Saccharomyces* (*Kloeckera*) y a un sólo medio de cultivo (jugo de agave), además de que las condiciones nutrimentales que menciona, son diferentes a las que se propone en la presente invención. Por otro lado, la solicitud de patente No. WO2004072271 propone una composición de levaduras no-*Saccharomyces* para ser utilizadas como cultivos iniciadores en la fermentación de jugo de uva, incluyendo los métodos de preparación de la composición y del uso de ésta en la etapa fermentativa en el proceso de elaboración de vinos. No obstante que en esta solicitud se utilizan

levaduras no-*Saccharomyces*, no contempla un proceso para aumentar las capacidades fermentativas de levaduras no-*Saccharomyces*; igualmente la solicitud de patente No. WO2004072271 no incluye diferentes medios de propagación y de fermentación como se propone en la presente patente (jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada).

Las ventajas directas que obtiene la industria de bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas con la utilización de los **"Procesos para aumentar la capacidad fermentativa de levaduras no-*Saccharomyces*"**, propuestos en esta invención son: proporcionar diferentes aromas y olores a la bebida final de forma natural mediante el uso de las levaduras no-*Saccharomyces* como cultivos iniciadores con alta eficiencia fermentativa en la fermentación de jugos de: agave, uva, caña y macerado de cebada, siendo este un aspecto de gran interés en la industria de bebidas alcohólicas y que resuelve la invención que proponemos en la presente solicitud.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los detalles característicos de esta invención que se refiere a los **"Procesos para aumentar la capacidad fermentativa de levaduras no-*Saccharomyces*"**, se muestran claramente en las siguientes figuras:

Figura 1.- Es una tabla que presenta los valores del % de azúcares consumidos utilizando levaduras del género *no-Saccharomyces*, propagadas conforme al proceso que proponemos para obtener **levaduras no-*Saccharomyces* activas** y puestas a fermentar de acuerdo al "**Proceso para fermentar jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada utilizando levaduras no-*Saccharomyces***" nombrada como *proceso de la invención* comparado con el *proceso tradicional* de propagación y de fermentación de la industria de bebidas alcohólicas.

Figura 2.- Es una tabla que presenta los valores de la productividad de etanol (g/lh) utilizando levaduras del género *no-Saccharomyces*, propagadas conforme al proceso que proponemos para obtener **levaduras no-*Saccharomyces* activas** y puestas a fermentar de acuerdo al "**Proc so para f rm ntar jugo de agav , uva, caña y mac rado d c bada utilizando levadura no-*Saccharomyc s***" nombrada como

proceso de la invención comparado con el *proceso tradicional* de propagación y de fermentación de la industria de bebidas alcohólicas.

En la Figura 1 y 2, se presentan los resultados obtenidos en la fermentación de jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada a 100 g/l de azúcares reductores adicionado con 1 g/l de sulfato de amonio y/o fosfato de amonio monobásico o mezclas de estos compuestos en una fermentación por lotes utilizando levaduras no-*Saccharomyces* y fermentadas mediante la forma tradicional *proceso tradicional* y mediante el proceso presentado en esta invención.

En las Figuras 1 y 2 se puede observar que las levaduras no-*Saccharomyces* propagadas por los *procesos de la invención* "**levaduras no-*Saccharomyces* activas**" y "**Proceso para fermentar jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada utilizando levaduras no-*Saccharomyces*"**, consumen una mayor cantidad de azucares y presentan alta productividad de etanol que las *levaduras no-Saccharomyces* propagadas de la forma tradicional *proceso tradicional*. Además las productividades de etanol obtenidas con las *levaduras no-Saccharomyces* propagadas mediante los *procesos de esta invención*, son similares en algunas levaduras no-*Saccharomyces*, a lo que se obtiene con levaduras con alta capacidad fermentativa, como son las de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (control) a las mismas condiciones de fermentación.

Fig. 3- Es un diagrama de flujo de los "**Procesos para aumentar la capacidad fermentativa de levaduras no-*Saccharomyces***" en la producción de bebidas alcohólicas tanto destiladas como no destiladas.

La invención muestra las condiciones óptimas de propagación y de fermentación para levaduras no-*Saccharomyces*. La invención asegura un alto consumo del azúcar por parte de las levaduras no-*Saccharomyces* así como un alto rendimiento de conversión azúcar etanol, altas productividades y una mayor tolerancia al etanol con respecto a lo que se obtiene normalmente con levaduras no-*Saccharomyces* con el *proceso tradicional*. No obstante que en esta invención se utilizaron solamente con levaduras no-*Saccharomyces*, en jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada, pueden ser

aplicados para fermentar cualquier jugo de frutas, vegetales, tubérculos y macerados de cereales.

MEJOR METODO CONOCIDO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

El "**Proceso para propagar las levaduras no-*Saccharomyces***", constan de las siguientes cuatro fases:

Fase 1. Obtención de los jugos: con el fin de realizar la propagación de las levaduras no-*Saccharomyces*, se requiere obtener jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada a la concentración de 100 a 200 g/l de azúcares reductores, según el proceso tradicional utilizado por la industria de bebidas alcohólicas; una vez adquirido el jugo a estas concentraciones, se procede la realización del *medio de propagación*,

Fase 2. Medio de propagación: con la finalidad de que las levaduras no-*Saccharomyces* presenten un crecimiento vigoroso y una alta concentración de biomasa, para lo cual se requiere formular un *medio de propagación* para evitar que las levaduras no-*Saccharomyces* sufran de limitación de nutrientes y/o inhibición por altas concentraciones de sustrato; el *medio de propagación* se realiza diluyendo el jugo de: agave, uva, caña y macerado de cebada obtenido de la Fase 1, con agua potable hasta la concentración entre 3 a 6 ºBx, inmediatamente después de haber diluido el jugo de agave, uva, caña y el macerado de cebada a la concentración mencionada, se le agrega a este último 1.0 g/l, extracto de levadura; inmediatamente después se homogeneiza agitando durante 5 minutos con una espátula o cuchara 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 (30±5°C) para que se pueda continuar con el pre-inóculo,

Fase 3. Pre-inóculo de las levaduras no-*Saccharomyces* a fin de iniciar la activación de cada una de levaduras, 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 a 5 x10^6 células/ml de un género de las levaduras *no-Saccharomyces: Candida shehatae, Pichia pastoris,*

Debaryomyces hansenii, Torulaspora delbrueckii, Hanseniaspora uvarum, Pichia membranaefaciens, Kloeckera africana y apiculata, Kluyveromyces marxianus y *Pichia Kluyveri;* al *medio de propagación* inoculado con cada una de las levaduras no-*Saccharomyces* en cultivo puro, se incuba a 33±3 ºC, 200 a 300 rpm durante 24 horas; a partir de este cultivo se preparará el inóculo,

Fase 4. Inóculo para cada levadura no-*Saccharomyces*: para preparar el inóculo se agrega en condiciones de esterilidad a 250ml del *medio de propagación* obtenido de la fase 2 dos, 2 a 5 x10^6 células/ml de alguna de las levaduras no-*Saccharomyces*: *Candida shehatae, Pichia pastoris, Debaryomyces hansenii, Torulaspora delbrueckii, Hanseniaspora uvarum, Pichia membranaefaciens, Kloeckera africana y apiculata, Kluyveromyces marxianus* y *Pichia Kluyveri*, obtenidas del pre-inóculo de la fase anterior; el *medio de propagación* inoculado con cada una de las levaduras no-*Saccharomyces* en cultivo puro, se incuba a las mismas condiciones que se indican en la fase 3 (30±5ºC, 200 a 300 rpm) durante 10 a 12 horas con la finalidad de obtener >100 x10^6 células/ml de cada una de las levaduras no-*Saccharomyces*. A cada una de las levaduras no-*Saccharomyces* propagada según este proceso se le llamará **levadura no-*Saccharomyces* activa,** la cual estará apta y lista para ser utilizada en la fermentación de jugo de: agave, uva, caña y macerado de cebada dentro del proceso para elaborar bebidas alcohólicas; una vez obtenida la **levadura no-*Saccharomyces* activa,** se procede para que sean utilizadas como cultivos iniciadoras en la etapa de *fermentación*.

El "**Proceso para fermentar jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada utilizando levaduras no-*Saccharomyces***", constan de las siguientes cinco fases:

Fase 1. Propagación de las levaduras no-*Saccharomyces*, el cual se desarrolla según como se indica en el "**Proceso para propagar las levaduras no-*Saccharomyces***" una vez obtenida las levaduras **no-*Saccharomyces* activas** se procede a realizar el medio de *fermentación*,

Fase 2. *Medio de fermentación*, el *medio de fermentación* se realiza como a continuación se indica: para concentraciones de jugo de agave, uva, caña y macerado de

IMPI
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

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 de bebidas alcohólicas destiladas. Terminado ésta fase es como obtenemos el producto destilado, si se desea madurar, este se lleva a añejar en barricas de roble blanco por los procesos ya conocidos.

DOCUMENTOS CITADOS

1. Pretorius, I.S., van der Westhuizen T.J. and Augustyn O.P.H.. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *South African Journal of Enology and Viticulture* **20**:61-74 (1999).
2. Lachance MA, Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Ant. Van Leeuw* **68**: 151-160 (1995).
3. Kunkee RE, Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiol* **1**: 315-332 (1984).
4. Fleet GH and Heard GM, Yeast: growth during fermentation, in *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed by Fleet GH, Harwood Academic Publishers, Chur Switzerland, pp. 27-57 (1993).
5. Ciani M and Picciotti G, The growth kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeast associated with wine-making. *Biotech. Lett* **17**: 1247-1250 (1995).
6. Comi G, Romano P, Cocolin L and Fiore C, Characterization of *Kloeckera apiculata* strains from Friuli region in North Italy. *World J Microbiol Biotech.* **17**: 391-394 (2001).
7. Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M and Capece A, Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol* **86:** 169-180 (2003).
8. Charoenchai C, Fleet GH, Henschke PA and Todd BEN, Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aus J Grape Wine Res* **3**: 2-8 (1997).
9. Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T. and Vasconcelos, I. Alcohols, esters and heavy sulfur compounds productions by pure and mixed cultures of apiculate wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **103**: 285-294 (2005).

10. Díaz-Montaño D. M., Estarrón-Espinosa M. 2008. Aplicación de las levaduras *Saccharomyces* y *Kloeckera* nativas en la fermentación de jugo de agave para generar un perfil aromático distintivo. Número de Expediente Mx/a/2008/016577 (entregado el 19 de diciembre del 2008, aprobación del examen de forma el 3 de julio del 2009).

11. Mamede, M. E. O., Cardello, H. M. A. B., and Pastore, G. M. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. *Food Chemistry*, **89**, 63–68 (2005).

12. Albergaria H, Torrao AR, Hogg T and Gírio FM, Physiological behavior of *Hanseniaspora guilliermondii* in aerobic glucose-limited continuous culture. *FEMS Yeast Res* **3**: 211-216 (2003).

13. Diaz-Montaño Dulce, Délia Marie-Line, Estarrón Mirna and Strehaiano Pierre. (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strain isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology*. **42**: 608-616.

14. Valle-Rodríguez JO, Córdova JA, Estarrón-Espinosa M, Morán-Marroquín GA, Hernández-Cortés G, Díaz-Montaño DM. "Influencia de las fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico en la fermentación de jugo de agave con una levadura no convencional (*Kloeckera africana*)" "Influence of the organic and inorganic nitrogen sources in the fermentation of agave juice with a non-conventional yeast (*Kloeckera africana*)".*Bebidas Mexicanas*. "Bebidas Mexicanas". Edición Junio-Julio. Alfa Editores Técnicos. México D.F., México Vol **18** No. 3. ISSN 0188-8080. (2009).

15. Juan Octavio Valle-Rodriguez. Estudio Fisiológico y de los requerimientos nutricionales de *Kloeckera africana* implicados en una fermentación alcohólica eficiente del jugo de *Agave tequilana* Weber var. azul". Tesis de Maestría en procesos Agroindustriales. Posgardo del PICYT sede CIATEJ, examen el 3 de noviembre del 2009.

16. Díaz-Montaño D. M., Favela E. and Córdova J. Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of *agave tequilana* juice by addition of yeast extract. *J of Science of food and Agriculture*. **90**: 321-328. (2010).

17. Sommer Peter and Nielsen Jan Clair. Yeast Compositions and starter cultures. WO 2004072271. Entregada el 26 de agosto del 2004.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de fermentación para aumentar la capacidad fermentativa de levaduras no-*Saccharomyces* caracterizado porque comprende por cada 100 a 200 g/L de azúcares reductores: 40 a 800 mgN/L de asparagina, glutamina, glutamato, aspartato y/o arginina o mezclas de los mismos, 30 a 800 mgN/L de sulfato de amonio o fosfato de amonio monobásico o mezclas de los mismos y de 10 a 1200 µg/L de tiamina, rivoflavina y/o biotina o mezclas de los mismos.
2. El medio de fermentación para aumentar la capacidad fermentativa de levaduras no-*Saccharomyces* de conformidad con la reivindicación 1, en donde los azúcares reductores provienen de jugo de agave, uva, caña o macerado de cebada.
3. Un proceso para aumentar la capacidad fermentativa de levaduras *no-Saccharomyces* en la elaboración de bebidas alcohólicas caracterizado porque comprende:
   i. una fase de preparación de un pre-inóculo de levaduras *no-Saccharomyces* mediante su propagación en un medio de propagación que incluye una solución de azúcares reductores a una concentración de 3 a 6 °Bx y extracto de levadura;
   ii. una fase de inoculación del pre-inóculo de las levaduras *no-Saccharomyces* en un medio de fermentación como el que se reclama en la reivindicación 1, para obtener levaduras *no-Saccharomyces* activas que son los cultivos iniciadores de la siguiente fase de fermentación;
   iii. una fase de fermentación de un jugo o macerado con las levaduras *no-Saccharomyces* activas de la fase anterior para la conversión de los azúcares del jugo o macerado en etanol y compuestos aromáticos, en donde la

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

fermentación se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis no estrictas durante 72 horas.

4. Proceso de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque comprende además:

   iv. una fase de destilación para separar el alcohol del *mosto muerto* en aquellos productos de la fermentación que son bebidas destiladas.

5. Proceso de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque los azúcares reductores del medio de propagación provienen de jugo de agave, uva, caña y macerado de cebada.

6. Proceso de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el medio de propagación de la fase de preparación del pre-inóculo favorece el crecimiento vigoroso de las levaduras *no-Saccharomyces* y aumenta su concentración de biomasa.

7. Proceso de conformidad con alguna de las reivindicaciones 3-5, caracterizado porque el jugo o macerado de la fase de fermentación incluye al jugo de agave, uva, caña y al macerado de cebada.

8. Proceso de conformidad con alguna de las reivindicaciones 3-5, caracterizado porque las levaduras no-*Saccharomyces* se seleccionan a partir de un grupo que consiste de *Candida shehatae*, *Pichia pastoris*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranaefaciens*, *Kloeckera africana*, *Kloeckera apiculata*, *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia kluyveri*.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere a procesos para aumentar la capacidad fermentativa de levaduras *no-Saccharomyces* en la fermentación de jugo de frutas, vegetales, tubérculos y macerados de cereales. Las levaduras *no-Saccharomyces* han recobrado interés por su capacidad de generar aromas y perfumes agradables; sin embargo, su uso en la elaboración de bebidas alcohólicas está limitada por su baja capacidad fermentativa debido a una presunta intolerancia al etanol. En esta invención se presenta un proceso para alcanzar una alta eficiencia fermentativa en las condiciones que utiliza la industria de bebidas alcohólicas.

IMPI
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

FIGURA 1

Jugos / Levaduras	Agave		Uva		Caña		Macerado de Cebada	
Candida shehatae	58.56 ± 1.66	69.66 ± 2.12	62.52 ± 2.18	89.61 ± 2.60	37.99 ± 0.61	44.22 ± 0.56	46.56 ± 4.42	53.10 ± 3.17
Pichia pastoris	31.68 ± 2.74	49.26 ± 4.16	4.10 ± 0.68	19.38 ± 2.15	48.17 ± 3.61	45.83 ± 3.44	1.11 ± 0.21	11.45 ± 0.98
Debaryomyces hansenii	79.27 ± 12.62	86.77 ± 3.17	91.07 ± 0.79	98.26 ± 3.68	42.48 ± 6.42	46.82 ± 1.77	14.00 ± 2.21	12.95 ± 1.78
Torulaspora delbrueckii	24.66 ± 2.16	79.99 ± 3.24	65.03 ± 5.72	85.10 ± 4.67	93.41 ± 7.15	97.20 ± 6.48	16.30 ± 2.97	27.09 ± 1.53
Hanseniaspora uvarum	99.57 ± 5.40	95.74 ± 3.61	89.42 ± 7.81	99.84 ± 9.65	40.12 ± 3.25	46.91 ± 2.44	8.52 ± 0.73	13.07 ± 1.04
Pichia membranaefaciens	53.93 ± 1.53	57.63 ± 2.63	6.23 ± 1.10	13.01 ± 2.42	15.31 ± 6.73	15.22 ± 7.69	12.06 ± 0.96	15.72 ± 1.25
Kloeckera africana	39.09 ± 4.29	76.03 ± 4.58	11.91 ± 1.46	91.06 ± 4.15	43.42 ± 2.13	49.22 ± 0.24	14.11 ± 0.32	13.66 ± 0.99
Kloeckera apiculata	56.76 ± 1.47	63.94 ± 2.59	14.80 ± 2.63	79.05 ± 1.51	42.42 ± 0.23	49.64 ± 2.00	13.08 ± 1.77	28.60 ± 3.28
Kluyveromyces marxianus	45.37 ± 5.14	55.72 ± 4.97	42.62 ± 4.19	62.72 ± 5.87	97.26 ± 6.95	98.91 ± 7.13	3.92 ± 0.41	9.74 ± 0.88
Pichia kluyveri	73.50 ± 6.48	99.26 ± 6.36	46.05 ± 8.94	85.13 ± 7.93	72.91 ± 3.05	93.20 ± 9.61	2.49 ± 0.25	11.99 ± 0.77
Saccharomyces cerevisiae- control	86.02 ± 2.26	97.29 ± 1.78	85.99 ± 0.04	72.46 ± 2.72	99.31 ± 1.93	92.93 ± 1.73	55.47 ± 3.94	59.13 ± 4.16
Proceso	Tradicional	Invención	Tradicional	Invención	Tradicional	Invención	Tradicional	Invención

IMPI
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

FIGURA 2

Jugos / Levaduras	Agave		Uva		Caña		Macerado de Cebada	
Candida shehatae	0.473 ± 0.013	0.599 ± 0.018	0.280 ± 0.010	0.461 ± 0.013	0.193 ± 0.003	0.244 ± 0.003	0.217 ± 0.021	0.224 ± 0.013
Pichia pastoris	0.276 ± 0.024	0.430 ± 0.036	0.036 ± 0.006	0.169 ± 0.019	0.240 ± 0.018	0.240 ± 0.018	0.101 ± 0.010	0.470 ± 0.100
Debaryomyces hansenii	0.644 ± 0.103	0.751 ± 0.027	0.519 ± 0.004	0.627 ± 0.019	0.239 ± 0.009	0.249 ± 0.038	0.061 ± 0.010	0.062 ± 0.008
Torulaspora delbrueckii	0.215 ± 0.019	0.698 ± 0.028	0.568 ± 0.050	0.743 ± 0.041	0.815 ± 0.062	0.848 ± 0.057	0.142 ± 0.026	0.236 ±0.013
Hanseniaspora uvarum	1.393 ± 0.044	1.501 ± 0.033	0.405 ± 0.035	0.776 ± 0.050	0.205 ± 0.017	0.262 ± 0.014	0.074 ± 0.006	0.114 ± 0.009
Pichia membranaefaciens	0.440 ± 0.012	0.514 ± 0.023	0.029 ± 0.005	0.069 ± 0.013	0.076 ± 0.038	0.082 ± 0.036	0.105 ± 0.008	0.137 ± 0.011
Kloeckera africana	0.358 ± 0.039	0.683 ± 0.041	0.079 ± 0.010	0.468 ± 0.021	0.277 ± 0.014	0.293 ± 0.001	0.067 ± 0.001	0.074 ± 0.005
Kloeckera apiculata	0.471 ± 0.012	0.585 ± 0.024	0.069 ± 0.012	0.477 ± 0.009	0.232 ± 0.001	0.290 ± 0.012	0.059 ± 0.008	0.147 ± 0.017
Kluyveromyces marxianus	0.396 ± 0.045	0.486 ± 0.043	0.372 ± 0.037	0.547 ± 0.051	0.849 ±0.061	0.863 ± 0.062	0.034 ± 0.004	0.085 ± 0.008
Pichia kluyveri	0.641 ± 0.057	0.866 ± 0.056	0.402 ± 0.078	0.743 ± 0.069	0.636 ± 0.027	0.813 ± 0.084	0.022 ± 0.002	0.105 ± 0.007
Saccharomyces cerevisiae-control	0.777 ± 0.032	0.849 ± 0.016	0.561 ± 0.001	0.568 ± 0.021	0.907 ± 0.015	0.951 ± 0.014	0.484 ± 0.034	0.516 ± 0.036
Proceso	Tradicional	Invención	Tradicional	Invención	Tradicional	Invención	Tradicional	Invención

IMPI
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
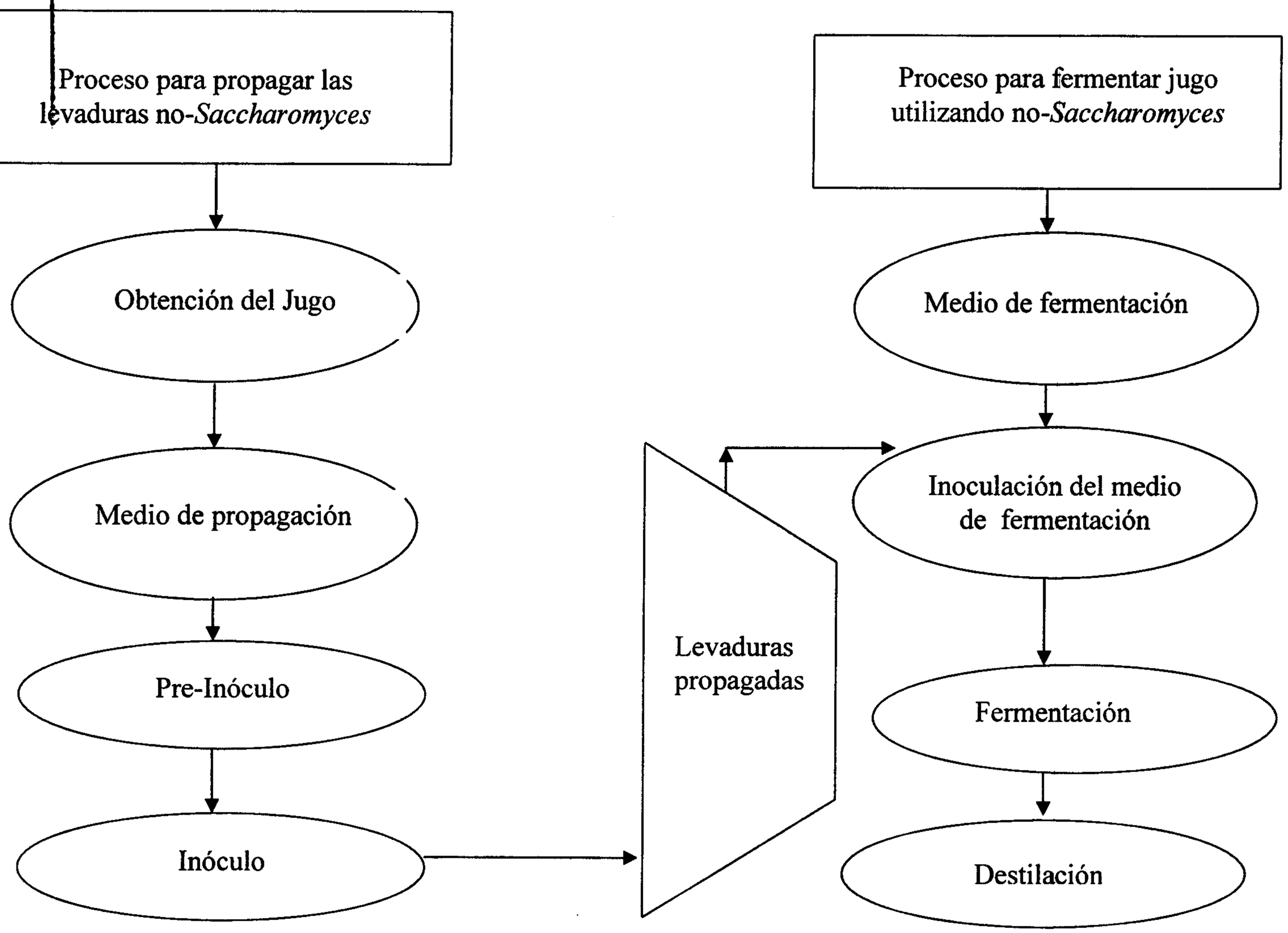
FIGURA 3