



TÍTULO DE PATENTE No. 387137

Titular(es): UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Domicilio: Lascuráin de Retana No. 5, Colonia Centro, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO

Denominación: LEVADURA PARA FERMENTACIONES DE ALTA GRAVEDAD EN JUGO DE AGAVE CON ALTO RENDIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.

Clasificación: **CIP:** C12N1/14; C12G3/02; C12H6/02; C12R1/865
CPC: C12N1/145; C12G3/02; C12H6/02; C12R2001/865; Y10S435/942

Inventor(es): JUAN CARLOS TORRES GUZMÁN; GLORIA ANGÉLICA GONZÁLEZ HERNANDEZ; ISRAEL ENRIQUE PADILLA GUERRERO; ADRIANA GARCÍA TAPIA; IVÁN HORACIO PIÑA TORRES; FRANCISCO EDUARDO LÓPEZ MEDRANO; NAURU IDALIA VARGAS MAYA; MARIA DEL ROSARIO RAMÍREZ ZÚÑIGA

SOLICITUD

Número:	Fecha de Presentación:	Hora:
MX/a/2015/016199	24 de Noviembre de 2015	15:41

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 24 de noviembre de 2035

Fecha de Expedición: 30 de septiembre de 2021

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 vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I y antepenúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:

EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION
TRIBUTARIA|56||MX/2021/97907|MX/a/2015/016199|Título de patente normal|1223|GAGV|Pág(s)
1|nmhaJC/KNNUtilYuxfrBTjsXlzU=

Sello Digital:

gMRnkjktLsjOCm6dFsu0LNrYJiinSgYz195TZKHGqT8/IUbEML3Lg0jJ6OfG/MjO6PxuVAVV3oweShkertEVkLn47W
o2XpOill4EmuCG1SX53HpT4LvUO+yIswMMNqKa/53roViixBV8xJW/Qo+xRJEo2dRFdC8/njM96JO5Yvn0gh3buutG
f7SmRK8SC/3gxeAN/YR4TWHs9m49Qg/0SSZ9f6ef3hq8chSutAYBsXyBaf2Qqy7JKGzveOzbMRF//+RD4VeBLYdpDY
TG3gdh6DdtGMPWatygPZtirnIBB2GKkCQp2XvHYVglePFVhtUmCHOXR9rcAtoXmnMmogQuDw==



MX/2021/97907

LEVADURA PARA FERMENTACIONES DE ALTA GRAVEDAD EN JUGO DE AGAVE CON ALTO RENDIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

DESCRIPCIÓN

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada a la fermentación alcohólica, en particular, está relacionada con una cepa de levadura adecuada para fermentaciones de alta gravedad del mosto de *Agave* con alto rendimiento en la producción de etanol.

10 ANTECEDENTES

Saccharomyces cerevisiae es el microorganismo que por excelencia predomina en las frutas, ya que son una fuente abundante de alimentos ricos en azúcares simples. Una de las características más destacadas de estas levaduras, la cual probablemente es la que les permite predominar en estos nichos, es su capacidad para convertir rápidamente azúcares a etanol en condiciones anaeróbicas y aeróbicas (Dashko *et al.* 2014). Esta característica hace que *Saccharomyces cerevisiae* sea la principal levadura utilizada en la producción de bebidas con alto contenido alcohólico, como el ron y el tequila, entre muchos otros.

El tequila es la bebida representativa de México, llena de tradición y cultura, conocida en el mundo, es la bebida alcohólica destilada más importante del país (Arellano Plaza *et al.* 2007). Su proceso de producción está sujeto a la regulación mexicana por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SIFI-2012, y las modificaciones a los numerales 6.5.4.2, 6.5.4.3, 11.1 inciso c), 11.2.1, artículo transitorio primero y artículo transitorio cuarto de la NOM-006-SCFI-2012 publicados por el Diario Oficial de la Federación el 13 de Diciembre de 2012, y se define como: “La bebida alcohólica obtenida exclusivamente de la destilación del mosto de las piñas o cabezas de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, previamente o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con

levaduras, cultivadas o no, producido en la región comprendida en la denominación de origen”.

El *Agave tequilana* Weber variedad Azul pertenece a la familia de las Agaváceas, sus principales características son: hojas largas fibrosas, forma lanceolada, color azulado; la parte aprovechable para la elaboración del tequila es la piña. El ciclo biológico del cultivo oscila entre 6 y 8 años (Ibarra Hernández *et al.* 2010). El polisacárido predominante en la planta de agave es la inulina, fructano del tipo levano compuesto principalmente de cadenas lineales de fructosa (85 a 92 %) unidas por enlaces β 2-1 fructosil-fructosa y terminan en una unidad de glucosa unida por un enlace α (1-2) (residuo-D-glucopiranosil), como en la sacarosa (Madrigal y Sangroni, 2014). Estas hexosas se liberan mediante hidrólisis por calor durante el cocimiento de las piñas. En la molienda se separan los azúcares de las fibras del agave obteniéndose el jugo. Este jugo es utilizado como sustrato durante la fermentación a una concentración de azúcares que puede variar desde 60 g de azúcares por litro, hasta 130 g de azúcares por litro. En las fermentaciones industriales, la gravedad representa los gramos de azúcares en solución, de manera que 1 °Bx corresponde a 1 g de azúcares por 100 mL, y la gravedad original (GO) es un término empleado para referirse a la gravedad del mosto antes de empezar la fermentación y la gravedad final (GF) se refiere a la gravedad del mosto ya fermentado. Es decir, en la fermentación del jugo de agave se emplean GO que varían entre 6 y 13 °Bx.

La fermentación es un paso sumamente importante en la producción del tequila. Este proceso consiste en la transformación de los azúcares glucosa y fructosa, provenientes del jugo de agave, a etanol y dióxido de carbono, además se producen otros compuestos en cantidades menores que le proporcionan características organolépticas como el sabor y el aroma al producto final. Este proceso es llevado a cabo primordialmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Durante la fermentación de los mostos elaborados a partir de jugo de agave, cada molécula de fructosa o de glucosa se convierte en dos moléculas de etanol y dos de dióxido de carbono. La conversión teórica de 180 g de azúcar en 92 g de etanol (51.1%) y 88 g de dióxido de carbono (48.9%) se puede obtener únicamente en ausencia de crecimiento de las

levaduras, de producción de otros metabolitos y de pérdidas de etanol ligadas a la evaporación. En una fermentación modelo en condiciones óptimas, cerca del 95 % de los azúcares se convierten en alcohol y dióxido de carbono, 1 % en biomasa y el 4 % en otros productos, como el glicerol (Gschaedler *et al.* 2004).

- 5 Como ya se mencionó, en la industria del Tequila normalmente se emplean entre 6 y 13 °Bx al inicio de la fermentación, de manera que Alta Gravedad (HG) se define como una GO mayor de 12 °Bx, entre 15 a 20 °Bx, y de muy alta gravedad (VHG) corresponde a 25 °Bx (Zhao y Bai, 2009). Una HG o VHG son deseables en una fermentación etanólica debido a las ventajas que conlleva, si se cuenta con una levadura capaz de crecer y
10 fermentar eficientemente en esas altas concentraciones de azúcares iniciales, las cuales son: aumento en la capacidad de producción de la planta, ahorro de energía en los procesos posteriores, tales como destilación, y la menor cantidad de vinazas generadas, con el consiguiente beneficio ambiental.

- Sin embargo, las altas concentraciones de azúcares iniciales en las fermentaciones etanólicas (GO) representan para la levadura condiciones de estrés muy fuertes, debidas al
15 factor de alta osmolaridad ocasionado por la presencia de los azúcares, y durante la fermentación, las células de levadura están expuestas a diversos factores de estrés adicionales tales como: la inhibición por el mismo etanol producido y sustancias inhibidoras liberadas del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, o inhibidores
20 presentes en los mostos como las saponinas (Cira *et al.* 2008); aunado al efecto letal de la alta temperatura que se puede alcanzar en este proceso, los cuales inevitablemente afectan el rendimiento en la producción del etanol. Todo ello afecta la viabilidad de las células, observándose una gran pérdida de viabilidad al incrementarse los niveles de etanol en la cuba de fermentación. Por lo tanto es deseable el contar con cepas de levadura con
25 tolerancia a los diferentes tipos de estrés a los que son sometidas las células desde el inicio hasta el final de la fermentación.

Las cepas de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* se han estudiado ampliamente en las fermentaciones tradicionales (para la producción de bebidas o panadería), así como para la producción de bioetanol. Mediante ingeniería genética se han generado cepas con

características que les permiten ser más eficientes en el proceso fermentativo, como es el caso de la sobre-expresión del gen *ADHI* y/o del gen *HXT1* en la fermentación del jugo de agave (Gutierrez Lomeli, *et al.* 2008). Por otra parte, en estudios de los mecanismos de respuesta a estrés de la levadura, se ha visto que la osmotolerancia (tolerancia a osmolaridad alta) contribuye a la obtención de cepas mejor preparadas para la producción de etanol, sobre todo en condiciones de alta gravedad (Zhao y Bai, 2009), de manera que en el documento de patente **US2007092895 A1**, mediante el rescate simultáneo de genes que confieren fenotipos deseados en una población de levaduras transformantes sobrevivientes durante la producción de etanol, se obtuvieron cepas mejoradas en su respuesta al estrés, identificando entre otros a los genes *RPII*, *SOLI* y *ADE16* como responsables de este fenotipo.

En el registro de solicitud de patente **JL/a/2006/000066** se refiere a un proceso para fermentar jugo de agave a altas concentraciones de azúcar en un sistema continuo para la producción de tequila utilizando levaduras de *Saccharomyces*. Por otra parte en el documento de patente **20110306083**, se ha descrito un método para la selección de cepas microbianas con propiedades mejoradas para la fermentación y/o producción de bioetanol mediante selección de mutantes en altas concentraciones de sales las cuales tienen mayor tolerancia al bioproducto butanol, mayor título, o mayor tolerancia al choque osmótico.

En el documento de patente **MXJL06000053 A** se describe un proceso de fermentación de jugo de agave con la levadura no convencional *Kloeckera spp*, debido a los aromas que produce, y un proceso para producir esta levadura activándola para un buen desempeño fermentativo en un sistema continuo a concentraciones de azúcar similar a la usada en la industria del tequila (6-13 °Bx), obteniéndose un rendimiento mayor a 72 %.

En el documento de patente **WO 2011/048238 A2** se ha descrito un método de fermentación para la producción de vino, en el cual a partir de las levaduras silvestres del productor, fue posible obtener tres levaduras distintas que permiten producir bebidas de alta calidad como: sidra, cervezas, coñacs, rones, vodkas, etc., y productos hasta con 60% vol./vol. de alcohol, incluso a alta osmolaridad y diferentes fuentes fermentables. Siendo útiles incluso en la producción de pan.

Por lo que, considerando los inconvenientes de introducir mediante ingeniería genética cambios genéticos en levaduras empleadas en productos para consumo humano, que impacten en el rendimiento de las cepas en la producción etanólica, y atendiendo la necesidad de disponer de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que sean capaces de crecer y fermentar eficientemente mostos con alta gravedad (HG) y muy alta gravedad (VHG); con el consiguiente impacto directo en la capacidad de producción de una planta, es necesario disponer de una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con estas características como se describe en este documento, para su uso en la elaboración de tequila.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Considerando la importancia que tiene el desarrollo de cepas generadas mediante evolución dirigida, sin manipulación genética, para ser utilizadas en la producción de bebidas alcohólicas para consumo humano como lo es el tequila, mediante inducción y posterior selección de los cambios que se han dado en las cepas silvestres propias de la fermentación del jugo de agave, se seleccionó una cepa con mejores cualidades en cuanto a la tolerancia al estrés por alta gravedad en el jugo de agave. La cepa de la presente invención es *Saccharomyces cerevisiae* y ha sido depositada en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)**: cepa **LABGENMOLH01**, con número de acceso **CECT 13095**; atribuido el 5 de mayo de 2014 por la Autoridad Internacional del Depósito. Esta cepa fue obtenida mediante evolución dirigida seleccionando aquellas que a partir de una cepa silvestre nativa de los mostos para la producción de tequila, fueron capaces de crecer en condiciones de alta gravedad, mayor a la comúnmente utilizada en la industria del tequila y es capaz de llevar a cabo el proceso de fermentación etanólico con alto rendimiento.

La invención involucra la fermentación de jugo de *Agave tequilana* para la producción de Tequila en condiciones de alta gravedad empleando la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* **LABGENMOLH01**.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la secuencia de DNA y el porcentaje de identidad de la secuencia de la región ITS del aislado **P1** nativo de mostos de jugo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul utilizado como parental y de la cepa **LABGENMOLH01**, proveniente de **P1**. Las bases marcadas con * señalan las diferencias entre las cepas P1 y LABGENMOLH01. La identidad entre las cepas P1 y LABGENMOLH01 (LGMH01) de *Saccharomyces cerevisiae* es = 99.9 Para ello mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando DNA genómico de las cepas y los oligonucleótidos TS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) y TS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) descritos por Esteve-Zarzoso *et al* (1999), se amplificaron las secuencias ITS: ITS1 e ITS2 que son regiones no codificantes y variables; y el gen 5.8S del rRNA que es una región codificante y variable, facilitando la discriminación entre distintos tipos de levaduras. Este fragmento de aproximadamente 841 pb fue secuenciado y al compararlo en las bases de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostró una identidad entre 99.0 a 100 % con los ITS reportados de varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* como YJM451, S288c, YJM592, entre otras. El alineamiento entre las secuencias ITS de P1 e ITS de LGMH01, utilizando el programa DNASTAR Lasergene 8 ClustalW se observó que tiene entre 99.2 y 100 % de identidad y una divergencia entre 0 y 0.80 %. Es decir las sustituciones en la secuencia nucleotídica del aislado es menor a 1 %, por tanto la identidad del aislado **P1** obtenido del jugo de agave y de la cepa **LABGENMOLH01**, proveniente de **P1**, son *Saccharomyces cerevisiae*.

En la **Figura 2** se muestra la cinética de fermentación del jugo de *Agave tequilana* de la cepa parental **P1** Para ello se preparó un preinóculo crecido toda la noche a 28 °C en jugo de Agave a 2-3 °Bx. Se contaron las células al microscopio en cámara de Neubauer y se inocularon $1-5 \times 10^8$ células mL⁻¹ en jugo de agave a una concentración entre 25-30 °Bx durante 48 h. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos durante las 48 h de fermentación para cuantificar ARD (azúcares reductores) y el etanol producido.

En la **Figura 3** se muestra la cinética de fermentación de la cepa **LABGENMOLH01** en pequeña escala. Para ello se preparó un preinóculo crecido toda la noche a 28 °C en jugo de

Agave a 2-3 °Bx. Se contaron las células al microscopio en cámara de Neubauer y se inocularon $1-5 \times 10^8$ células mL^{-1} en jugo de agave a una concentración entre 25-30 °Bx durante 48 h. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos durante las 48 h de fermentación para cuantificar ARD (azúcares reductores) y el etanol producido.

- 5 En la **Figura 4**. Se muestra el monitoreo de la fermentación realizada por la cepa **LABGENMOLH01** a escala industrial del jugo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul. Esta fermentación se realizó en tanques de 18000 L en condiciones de Alta Gravedad con una concentración inicial de azúcares de 16 °Bx durante 44 h a una temperatura entre 32-36 °C. El fermentador de 18000 L el cual cuenta con chaqueta para el control de
- 10 temperatura, se inoculó, empleando la cepa **LABGENMOLH01**. Se tomaron muestras cada 2 h cuantificando °Bx, azúcares totales (AT), número de células y riqueza alcohólica (RA).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

- 15 La invención se refiere a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en la fermentación del mosto de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, ya sea 100 %, y/o en combinaciones con otras fuentes de azúcares, en una proporción no mayor al 49%, como describe la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SIFI-2012 para la producción de Tequila; esta fermentación se realiza en condiciones de alta gravedad, en concentraciones de azúcares
- 20 mayores a las normalmente utilizadas en la industria del tequila, la cual despliega una mayor eficiencia fermentativa incidiendo en el incremento en la producción. Las cepas normalmente utilizadas en la industria del tequila suelen ser cepas panaderas, raramente se utilizan cepas especializadas o adaptadas a desarrollarse en ambientes extremos como lo es el jugo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, presentando rendimiento bajo en la
- 25 producción de etanol, alrededor del 6 % en el fermentado, aún a pesar de que normalmente se emplean concentraciones de azúcares al inicio de la fermentación entre 6 y 13 °Bx. Por otra parte este jugo representa un ambiente estresante, entre otras razones debido a la alta osmolaridad inicial ocasionada por el alto contenido de azúcares (60-130 g de azúcares/L, 6-13 °Bx) y la presencia de saponinas, componentes naturales del jugo de agave; las cuales



son letales para la mayoría de las levaduras, debido a que forman complejos con los esteroides de las membranas permeabilizándolas provocando muerte celular. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida mediante evolución dirigida, **LABGENMOLH01**, empleando concentraciones crecientes de azúcares en el jugo de agave, está adaptada a las

5 condiciones que representa iniciar la fermentación con concentraciones de azúcares mayores a 13 °Bx y tolera al mismo tiempo la mayor concentración de saponinas presente en el jugo de agave concentrado y produce una mayor cantidad de etanol, superior a 12 % en el fermentado, como puede verse en la Tabla 1; en la cual se muestra la eficiencia fermentativa de la cepa **LABGENMOLH1** en comparación con la parental **P1**, las cuales

10 son mejores que las cepas normalmente utilizadas en la producción de tequila, donde se obtienen en el mejor de los casos una eficiencia fermentativa alrededor del 70 % y el tiempo de fermentación es de 2 a 7 días (Bautista Justo *et al.* 2001). En más del 50 % de las tequileras se utilizan levaduras silvestres presentes en el jugo de agave y en las demás por lo regular se usan levaduras panaderas o de vinificación (Bautista Justo, et al, 2001)

15 En la presente invención se usa una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa **P1**, denominada **LABGENMOLH01** con número de acceso **CECT 13095**, de la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** de la Universidad de Valencia, capaz de crecer en mostos con concentraciones de azúcares arriba del doble a lo normalmente empleado en la industria tequilera. Por ejemplo; normalmente se usan mostos con

20 concentraciones iniciales entre 6-13 °Bx (60 a 130 g de azúcares/L de jugo), con este método es posible recuperar cepas capaces de crecer en mostos concentrados hasta al menos 20-30 °Bx (200-300 g de azúcares/L de jugo).

En la presente invención se usa una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa **P1**, denominada **LABGENMOLH01** con número de acceso **CECT 13095**, de la

25 **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** de la Universidad de Valencia, capaces de iniciar la fermentación y alcanzar mayores rendimientos en la producción de etanol en mostos concentrados hasta al menos 20-30 °Bx.

En la presente invención se usa una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa **P1**, denominada **LABGENMOLH01** con número de acceso **CECT 13095**, de la



Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia, capaces de crecer y fermentar en mostos de jugo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul en altas concentraciones de compuestos nocivos propios del jugo de agave, como las saponinas, produciendo a pesar de ello el etanol, ya que la fermentación se realiza en el jugo de agave sin tratamiento alguno que permitiera la eliminación de estos compuestos tóxicos naturales del agave.

En la presente invención se usa un microorganismo proveniente de la cepa **P1**, denominado **LABGENMOLH01** con número de acceso **CECT 13095**, de la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** de la Universidad de Valencia, el cual tienen mayor tolerancia al estrés causado por la alta concentración de azúcares mediante la selección y enriquecimiento de estas variantes a partir de la población nativa.

Aunque en las fermentaciones del mosto del jugo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, se ha observado la presencia de hasta diez géneros de levaduras, como *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, entre otras sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura fermentadora por excelencia, es quien inicia y se encuentra en todo el proceso fermentativo y hasta el final del mismo (Lachance, 1995, Arrizon y Gschaedler, 2002). Por ello, es importante verificar el género y especie de los aislados presentes en el mosto fermentado de partida, para proceder con la selección de cepas con mayor tolerancia al estrés causado por la alta concentración de azúcares mediante la selección y enriquecimiento de estas variantes a partir de la población nativa mediante evolución dirigida. La identidad del parental **P1** mediante amplificación por PCR de la región intergénica ITS de los genes ribosomales (ITS1-5.8S-ITS2), su secuenciación (secuencias ITS P1 LGMH01.txt) y análisis comparativo en las bases de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) indican que la cepa **P1** corresponde a *Saccharomyces cerevisiae* ya que tiene una identidad mayor al 99.2% con las secuencias ITS descritas para otras cepas de este género y especie (Figura 1). Se inicia con el inóculo madre con la cepa nativa **P1** usada en la producción de tequila en jugo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, con una concentración de azúcares entre 2 y 4 °Brix, se recuperan las células viables, las cuales se van transfiriendo a un nuevo medio de cultivo

incrementándose gradualmente los grados °Brix, repitiendo el ciclo hasta llegar a la concentración deseada donde esperamos que crezcan los microorganismos seleccionados. De esta manera se aisló la cepa que ha sido depositada en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** de la Universidad de Valencia el 5 de mayo de 2014: cepa 5 **LABGENMOLH01**, con número de acceso **CECT 13095** atribuido por la Autoridad Internacional del Depósito. El depósito referido en la presente solicitud se refiere al depósito ante la CECT, y tal depósito es mantenido bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con propósito de Patente. La identificación molecular de las cepas se realizó mediante la 10 reacción en cadena de la polimerasa, utilizando DNA genómico de las cepas y los oligonucleótidos: TS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) y TS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC), descritos por Esteve-Zarzoso *et al* (1999). Estos oligonucleótidos amplifican las secuencias ITS: ITS1 e ITS2 que son regiones no codificantes y variables; y el gen 5.8S del rRNA que es una región codificante y variable facilitando la discriminación 15 entre distintos tipos de levaduras. Este fragmento de aproximadamente 841 pb fue secuenciado (secuencias ITS P1 LGMH01.txt) y al compararlo en las bases de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostró una identidad entre 99.2 a 100 % con los ITS reportados de varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. El alineamiento entre las secuencias, utilizando el programa DNASTar Lasergene 8 ClustalW se observó que tiene 20 entre 99.2 y 100 % de identidad. Es decir las sustituciones en las secuencias nucleotídicas del aislado y de la cepa seleccionada es menor a 1%, por tanto la identidad del aislado denominado **P1** obtenido del jugo de agave y de la cepa **LABGENMOLH01**, son *Saccharomyces cerevisiae*.

En la presente invención se usa un microorganismo proveniente de la cepa P1, denominado 25 **LABGENMOLH01**, con número de acceso **CECT 13095**, de la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** de la Universidad de Valencia, en el proceso de fermentación alcohólica.

En la presente invención se usa un microorganismo proveniente de la cepa P1, denominado **LABGENMOLH01**, con número de acceso **CECT 13095**, de la **Colección Española de**

Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia, en el proceso de fermentación alcohólica, para la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas.

EJEMPLOS

- 5 Ejemplo 1. Proporcionar cepas con mayor tolerancia al estrés causado por la alta concentración de azúcares mediante la selección y enriquecimiento de estas variantes a partir de la población nativa.

Usando la modalidad preferida de esta invención, a partir del aislado nativo de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante selección dirigida se aisló una cepa capaz de crecer y fermentar con alto rendimiento de producción de etanol (entre 70 y 90 %) en condiciones de alta gravedad, mayores a las concentraciones de azúcares normalmente empleadas (alrededor de 6 a 13 grados Brix) en la fabricación de tequila. El ensayo consistió en selección y enriquecimiento de estas variantes a partir de la población nativa de levaduras usadas en la fermentación del jugo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul.

- 15 De esta manera se aisló la cepa que ha sido depositada en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** de la Universidad de Valencia el 5 de mayo de 2014: cepa LABGENMOLH01, con número de acceso **CECT 13095** atribuido por la Autoridad Internacional del Depósito. El depósito referido en la presente solicitud se refiere al depósito ante la CECT y tal depósito es mantenido bajo los términos del Tratado de
20 Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con propósito de Patente.

Medición de los grados Brix. Se midió la cantidad de azúcares del jugo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul utilizando el Refractómetro de Abbe, Type 3T de ATAGO CO., LTD. Es un método rápido que da una buena aproximación de los azúcares presentes.

- 25 Los azúcares también pueden cuantificarse de manera mucho más exacta mediante la técnica del ácido dinitrosalicílico como se detalla en el ejemplo 2.

Ejemplo 2. Proporcionar cepas de levaduras de con mayor eficiencia fermentativa

Para ello, se compara la eficiencia fermentativa de la nueva cepa contra la eficiencia fermentativa de la cepa parental en las condiciones de alta gravedad. Se inocula alrededor de 10^7 células de levadura. mL^{-1} de la cepa a probar y se realiza la fermentación del jugo de agave a concentraciones de azúcares reductores entre 25 y 30 °Bx a temperatura de 32-36 °C durante 40 a 72 h monitoreando cada cierto tiempo (2 horas, por ejemplo) el número de células en la fermentación, azúcares consumidos, y etanol producido (ver **Figura 2** y **Figura 3**).

De manera que al final de la fermentación, con estas cepas se logra tener una eficiencia fermentativa entre 70 y 93 % (ver Tabla 1), donde la eficiencia fermentativa corresponde a:

$$\% \text{ Eficiencia Fermentativa } (Ep) = (\text{volumen etanol experimental} / \text{volumen etanol teórico}) \times 100.$$

El rendimiento teórico de etanol por gramo de glucosa consumido es de 0.511

Tabla 1. Eficiencia fermentativa de la cepa obtenida por evolución dirigida en comparación con la cepa parental.

Cepa	Eficiencia fermentativa (Ep) (%) = (Etanol experimental/Etanol teórico) x 100
P1	79.6
LABGENMOLH01	93.6

La **determinación de número de células** se realiza siguiendo el protocolo siguiente: Se toman tres alícuotas de 1 mL cada una del cultivo en proceso de fermentación. Se prepara una dilución seriada base 10, de cada alícuota, como sigue: en un tubo eppendorf conteniendo 900 μL de agua destilada se adicionan 100 μL de la alícuota (dilución 10^{-1}), se mezcla agitando durante un minuto en un vortex y se procede a realizar la siguiente dilución; para ello en un tubo eppendorf conteniendo 900 μL de agua destilada se adicionan 100 μL de la dilución 10^{-1} , se mezcla agitando durante un minuto en un vortex

obteniendo así la dilución 10^{-2} . De esta última dilución se toma, por duplicado, 10 μ L y se colocan en una cámara de Neubauer y se realiza el conteo de células al microscopio óptico, donde:

Número de células totales /mL de cultivo = (número de células contabilizadas en los 25 cuadros) (100)(10000). Donde 100 corresponde a al factor de dilución 10^{-2} ; y 10000 corresponde al factor para convertir la superficie en la que se contó las células al volumen de 1 mL.

En el método preferido de esta invención, **los azúcares consumidos** se evalúan mediante la reacción del ácido dinitrosalicílico (DNS) descrita por Miller (1959) la cual permite medir con precisión los azúcares reductores directos como sigue:

Las alícuotas de 1 mL, tomadas a los diferentes tiempos del proceso de la fermentación se centrifugan a 6000 xg durante 5 minutos para retirar células y residuos fibrosos del jugo. En tubos de ensaye de 10 mL se colocaron 500 μ L de los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación, se adicionaron 500 μ L de reactivo de Miller (DNS), se agitó en vórtex para mezclar bien durante 15 segundos y se incubó en baño maría (96-100°C) durante 15 minutos, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente, se aforaron a 5 mL con agua destilada y se dejó reposar por 15 minutos. Luego se midió la Densidad Óptica de las muestras a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro. La concentración de azúcares calculada en las muestras se multiplicó por el factor de dilución, los resultados se reportan en g/L. Para calibrar el espectrofotómetro se corrió al mismo tiempo un blanco que consta de 500 μ L de agua destilada tratados con el mismo procedimiento anterior.

Preparación del reactivo Miller (DNS): El reactivo de Miller se preparó de la siguiente manera; en 600 mL de agua se disolvieron 10 g de hidróxido de sodio, 200 g de tartrato de sodio y potasio, 0.5 g de metabisulfito de sodio, 2 g de fenol y 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, se aforó a 1 L de agua y se almacenó en un recipiente protegido de la luz cubierto de papel aluminio. Preparación de la curva de calibración; se preparan soluciones de 0.0 a 1.0 g/L de glucosa y se realiza la determinación de azúcares reductores como ya se indicó líneas arriba empleando el reactivo DNS. Las absorbencias obtenidas se someten a

un análisis de regresión lineal a fin de obtener una ecuación que predice la concentración de azúcares reductores directos en una muestra a partir de una sustancia dada.

5 **Cuantificación del etanol producido durante la fermentación en jugo de *Agave tequilana* Weber variedad azul.**

De los cultivos se colectaron 1.5 mL de jugo de agave por triplicado de cada matraz en tubos Eppendorf, a cada uno de los tiempos que se haya definido el muestreo; las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 20800 $\times g$ en una centrífuga para sedimentar las células y residuos fibrosos del jugo, el sobrenadante recupera en un tubo nuevo y se congela a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez colectadas todas la muestras, se descongelan y los sobrenadantes se diluyeron 1:10 o 1:100 con agua destilada. La muestra se colocó en un Analizador Bioquímico modelo YSI 2700 Select, utilizando la membrana YSI 2786 en la cual esta inmovilizada la enzima alcohol oxidasa quien convierte el etanol y el oxígeno en peróxido de hidrógeno y acetaldehído. A su vez el peróxido de hidrógeno es oxidado en el ánodo de platino liberándose dos electrones por cada molécula de peróxido, de modo que el aparato reporta el etanol presente en la muestra en g/L. El rango de detección de etanol del aparato es de 0.0 a 3.2 g de etanol/L.

Ejemplo 3. Eficiencia fermentativa

Posteriormente estas cepas pueden ser evaluadas en producción industrial, en tanques de fermentación de 18000 L o mayores, con temperatura controlada de $32\text{-}36\text{ }^{\circ}\text{C}$. El jugo de agave es inoculado con alrededor de 10^7 células de levadura. mL^{-1} y se realiza la fermentación del jugo de agave a concentraciones de azúcares reductores iniciales de 16°B a temperatura controlada de $32\text{-}36\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 a 72 h monitoreando cada cierto tiempo (2 h, por ejemplo) el número de células en la fermentación, los azúcares consumidos cuantificando los azúcares reductores, y el etanol producido o riqueza alcohólica (ver **Figura 4**), y valorando en el producto final de la destilación mediante Cromatografía de Gases de Alta Resolución; los alcoholes superiores (alcoholes de peso molecular superior al alcohol etílico o aceite de fusel, como alcohol isoamílico), ésteres (como acetato de etilo) y

aldehídos (como acetaldehído) producidos para determinar su presencia y cantidades en el producto obtenido y dictaminar si cumple con la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, **Bebidas** alcohólicas-Tequila-Especificaciones

(http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5282165&fecha=13/12/2012). Se observó que

- 5 el producto obtenido en cuanto a calidad cumple con la NOM-006-SCFI-2012 (ver **Tabla 2**) y además en cuanto a la producción de etanol se obtuvo una eficiencia de fermentación de 81.01 % y una eficiencia de destilación de 90 % en comparación con las cepas tequileras usadas por la mayoría de los productores las cuales en el mejor de los casos tienen un eficiencia de fermentación alrededor de 70 %.

10 **Tabla 2. Calidad del tequila producido con la cepa LABGENMOLH01**

Parámetros Evaluados	Tequila Blanco*		Tequila Blanco producido con la cepa LABGENMOLH01
	Mínimo* (mg/100 mL alcohol anhidro)	Máximo* (mg/100 mL alcohol anhidro)	Valor observado (mg/100 mL alcohol anhidro)
Alcoholes superiores (PM superior al alcohol etílico)	20	500	266.67
Alcohol Isoamílico	30	300	174.14
Aldehídos (como acetal-dehído)	0	40	2.0
Ésteres (como acetato de etilo)	2	200	14.09

* valores establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, **Bebidas** alcohólicas-Tequila-Especificaciones (http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5282165&fecha=13/12/2012)

- 15 Para medir los **Azúcares Reductores Totales** (ART), a las alícuotas tomadas del tanque de fermentación se hizo de acuerdo a la (NOM-006-SCFI-2012) mediante titulación con el

siguiente procedimiento: La muestra a analizar se hidrolizó utilizando HCl (1:1) calentando a 70 °C, a esta solución se le adicionó fenolftaleína y NaOH 6N para tener el analito y se aforó a 250 mL con agua tridestilada. La solución titulante se preparó con una solución alcalina (A) (173 g de tartrato de sodio y potasio, y NaOH en 500 ml de agua tridestilada) y una solución (B) (34,639 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua tridestilada) y se le adicionó 2 a 3 gotas de azul de Metileno 1%. La **Medición de Azúcares Reductores Directos (A.R.D)**, también se mide de acuerdo a la (NOM-006-SCFI-2012): Al sobrenadante del cultivo de la fermentación se le adicionó fenolftaleína e NaOH 6N para tener el analito y se aforó a 250 mL con agua tridestilada. La solución titulante se preparó con una solución alcalina (A) (173 g de tartrato de sodio y potasio, y NaOH en 500 ml de agua tridestilada) y una solución (B) (34,639 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua tridestilada) y se le adicionó 2 a 3 gotas de azul de Metileno 1%. Cabe mencionar que también es posible medirlo siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 2, debiendo proporcionar resultados similares.

15 **Riqueza Alcohólica (R.A).** La muestra a analizar, se destila para obtener etanol y así medir su riqueza alcohólica a 20 °C usando un alcoholímetro.

Medición de °Bx se realiza con un sacarímetro, tomando en cuenta la temperatura de la muestra.

20 **Conteo celular.** Se toma la muestra, se diluye 10 veces y se cuentan las células en una cámara de recuento Neubauer.

El resultado es el promedio de tres experimentos por duplicado en una fermentación de 48 horas, en jugo de *Agave tequilana* Weber 100 %, con una concentración inicial de 271 ± 11.3 g/L de Azúcares Reductores Directos (ARD) para el caso de P1 y de 265.5 ± 6.1 para la cepa LABGENMOLH01

25 Los análisis se realizaron en el destilado antes del destrozado y rectificado, mediante cromatografía de gases de alta resolución de acuerdo a la NOM-006-SCFI-2012.

Referencias

- Arellano-Plaza M., E. J. Herrera-López, D. M. Díaz-Montaño, A. Moran, and J. J. Ramírez-Córdova (2007). "Unstructured Kinetic Model for Tequila Batch Fermentation". *International Journal of Mathematics and Computer Simulation* 1: 1 – 6.
- 5 Arrizon J., and Anne Gschaedler (2002). "Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process". *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 965–970.
- 10 Bautista-Justo M., L. García-Oropeza, R. Salcedo-Hernández y L. A. Parra-Negrete (2001). "Azúcares en Agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el estado de Guanajuato". *Acta Universitaria*. 11.1: 33- 38.
- 15 Cira L.A., González G.A., Torres J.C., Pelayo C., Gutiérrez M., Ramírez J. (2008). " Heterologous expression of *Fusarium oxysporum* tomatinase in *Saccharomyces cerevisiae* increases its resistance to saponins and improves ethanol production during the fermentation of *Agave tequilana* Weber var. azul and *Agave salmiana* must". *Antonie van Leeuwenhoek* 93:259–266
- Dashko S., Zhou N., Compagno C., and Jure Piskur (2014). "Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?". *FEMS Yeast Research* 14: 826-832.
- 20 Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Urubur F., I and Quero A., (1999). "Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers". *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329-337
- 25 Gschaedler A., J.Ramirez, D.Díaz-Montaño, E.Herrera, M.Arellano, J. Arrizon, and L. Pinal, (2004). "Fermentación, etapa clave en la elaboración de tequila," *en Ciencia y Tecnología del Tequila*, Primera Edición, CIATEJ- CONACYT, Ed. México,. ISBN 970-9714-00-7, pp. 62-120.
- 30 Gutiérrez-Lomelí M., Torres-Guzmán J.C., González-Hernández G.A., Cira-Chávez L.A., Pelayo-Ortiz C., Ramírez-Córdova J.J., (2008). "Overexpression of *ADH1* and *HXT1* genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* improves the fermentative efficiency during tequila elaboration". *Antonie van Leeuwenhoek* 93:363–371.
- Ibarra- Hernández E.B., Botero González J.F. and Cortés Amador C., (2010). "Ingeniería de Tequilas". Primera Edición, Bogotá Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. ISBN: 978-958-719-541-5
- 35 Lachance M.A., (1995). "Yeast communities in a natural fermentation". *Antonie van Leeuwenhoek* 68:151-160.

Madrigal L., and E. Sangronis, (2007). "La inulina y derivados como ingredientes clave en alimentos funcionales". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57 (4):387-396.

Miller G.L., (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Analytical Chemistry* 31 (3): 426 – 428.

- 5 Zhao X.Q., and F.W. Bai, (2009). "Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology* 144: 23–30

10

15

20

REIVINDICACIONES

1. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito CECT 13095, caracterizada porque
5 tiene eficiencia fermentativa en condiciones de alta gravedad.
2. La cepa descrita de conformidad con la reivindicación 1 para usarse en un proceso de fermentación de jugo de Agave, con una eficiencia de fermentación de al menos el 81 % y una eficiencia de destilación del 90%.
3. La cepa descrita de conformidad con la reivindicación 1 para usarse en un proceso de
10 fermentación de jugo de Agave en donde el producto final contiene 266.67 alcoholes superiores (PM superior al alcohol etílico), 174.14 de alcohol isoamílico, 2.0 de aldehídos (como acetal-dehído) y 14.09 de ésteres (como acetato de etilo).
4. La cepa descrita de conformidad con la reivindicación 1 para usarse en un proceso de
15 fermentación de jugo de Agave a concentraciones de azúcares iniciales de 30 °Bx a una temperatura de 32-36 °C durante 40 a 72 h.

RESUMEN

La presente invención se refiere al uso de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa P1, denominada LABGENMOLH01 con número de acceso CECT 13095, de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia. Esta cepa

5 *Saccharomyces Cerevisiae* seleccionada es capaz de crecer e iniciar la fermentación de mostos de jugo de Agave tequilana Weber variedad Azul con alta gravedad (HG) y muy alta gravedad (VHG) (GO=20-30°Bx) y puede usarse en la elaboración de tequila. Esta cepa es capaz de producir mayor cantidad de etanol alcanzando una eficiencia fermentativa de

10 93.6%. Tiene mayor tolerancia al estrés osmótico causado por la alta concentración de azúcares, debido a la selección y enriquecimiento de estas variantes a partir de la población nativa.



FIGURAS

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      TCCGTAGGTGAACCTGCCGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTGTGGCAAGAGCAT
LGMH01  TCCGTAGGTGAACCTGCCGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTGTGGCAAGAGCAT

      90      100     110     120     130     140     150     160
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      GAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTT
LGMH01  GAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTT

      170     180     190     200     210     220     230     240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      GTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATACA
LGMH01  GTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATACA

      250     260     270     280     290     300     310     320
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      ACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAA
LGMH01  ACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAA

      330     340     350     360     370     380     390     400
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      ACAATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAATTTTAAATATTTAAAACTTTCA
LGMH01  ACAATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAATTTTAAATATTTAAAACTTTCA
      *

      410     420     430     440     450     460     470     480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      ACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAGAATCCCGTGAA
LGMH01  ACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAGAATCCCGTGAA

      490     500     510     520     530     540     550     560
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCGCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAAC
LGMH01  TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCGCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAAC

      570     580     590     600     610     620     630     640
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      ATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAA
LGMH01  ATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAA
      *

      650     660     670     680     690     700     710     720
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      GAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTT-A
LGMH01  GAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTA
      *

      730     740     750     760     770     780     790     800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
P1      TACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGG
LGMH01  TACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGG

      810     820     830     840
-----+-----+-----+-----+
P1      TAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
LGMH01  TAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

```

Figura 1

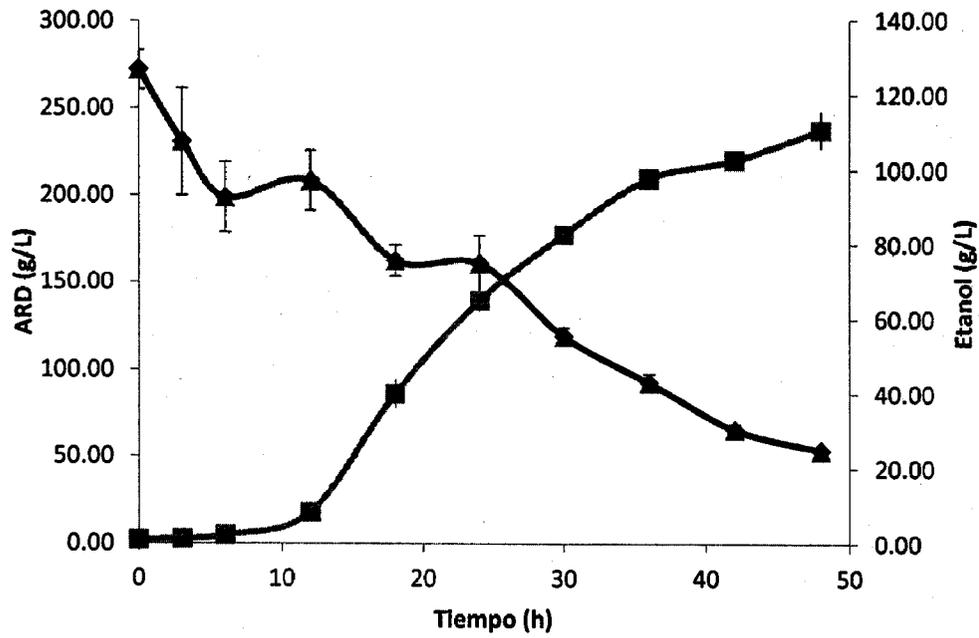


Figura 2

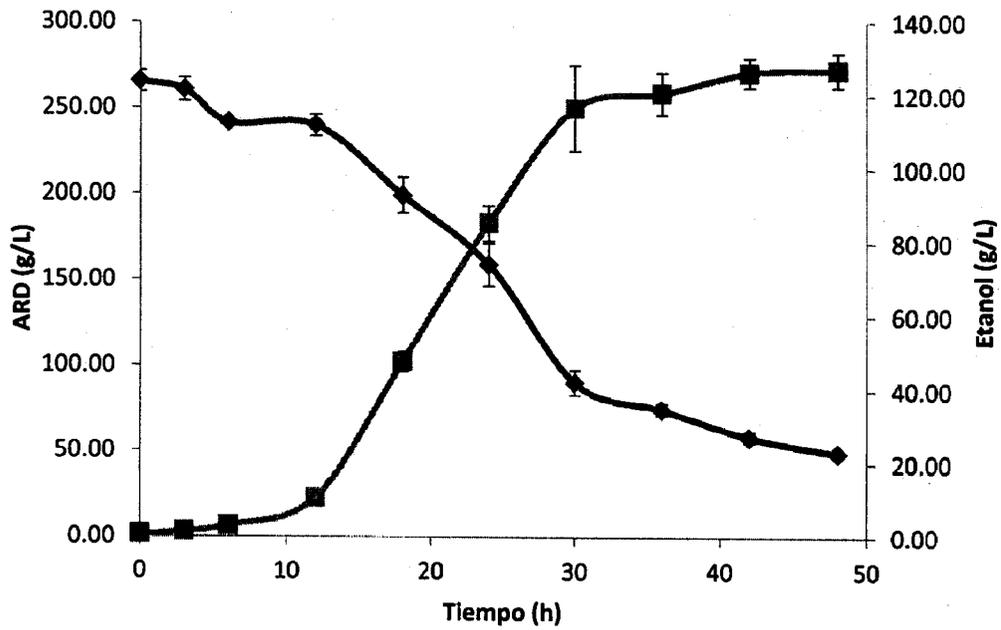


Figura 3

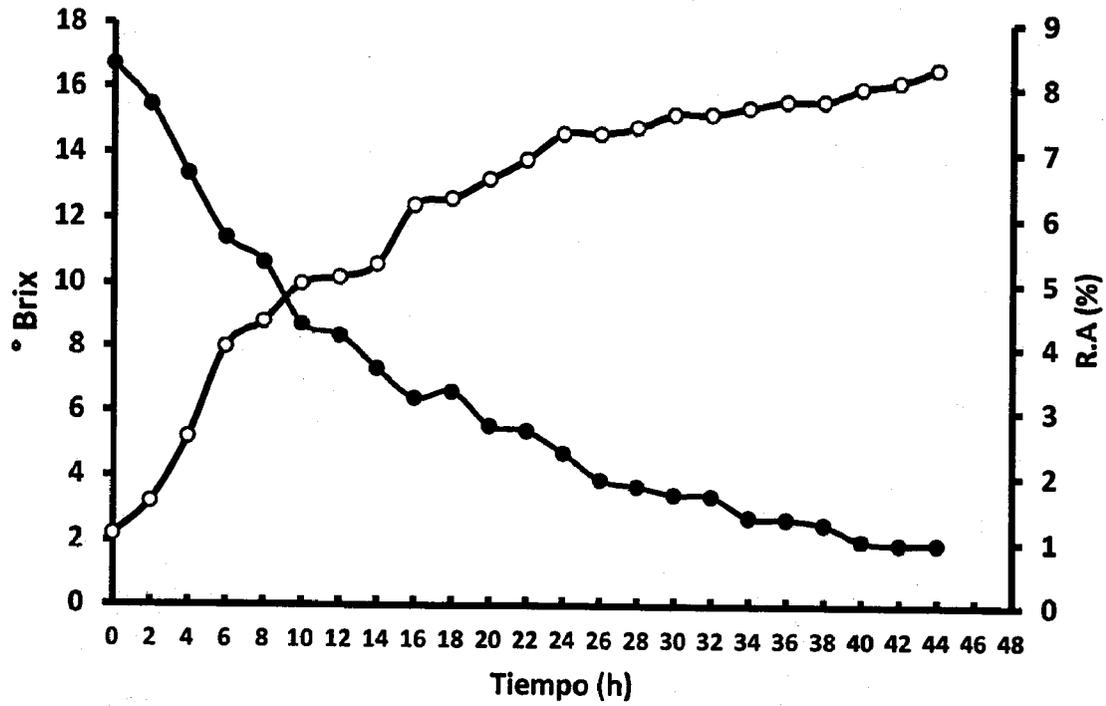


Figura 4

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Guanajuato
Torres Guzmán, Juan Carlos
González Hernández, Gloria Angélica
Padilla Guerrero, Israel Enrique
García Tapia, Adriana
Piña Torres, Iván Horacio
López Medrano, Francisco Eduardo
Vargas Maya, Nauru Idalia
Ramírez Zúñiga, María del Rosario
- <120> LEVADURA PARA FERMENTACIONES DE ALTA GRAVEDAD EN JUGO DE AGAVE
CON ALTO RENDIMIENTO EN LA PRODUCCION DE ETANOL
- <130> no aplica
- <140> no aplica
- <141> 2015-11-13
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 841
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae
- <220>
<221> ITS4AR5-2/KU131578
<222> (1)..(30)
<223> PRODUCT 18sRIBOSOMAL RNA
- <220>
<221> ITS14AR5-2/KU131578
<222> (31)..(391)
<223> internal transcribed spacer 1

<220>
<221> ITS14AR5-2/KU131578
<222> (392)..(549)
<223> 5.8S ribosomal RNA

<220>
<221> ITS14AR5-2/KU131578
<222> (550)..(781)
<223> internal transcribed spacer 2

<220>
<221> ITS14AR5-2/KU131578
<222> (782)..(841)
<223> 28S ribosomal RNA

<300>
<308> KU131578
<309> 2015-11-12
<313> (1)..(30)

<300>
<308> KU131578
<309> 2015-11-12
<313> (31)..(391)

<300>
<308> KU131578
<309> 2015-11-12
<313> (392)..(549)

<300>
<308> KU131578
<309> 2015-11-12
<313> (550)..(781)

<300>
<308> KU131578
<309> 2015-11-12
<313> (782)..(841)



<400> 1
tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta aagaaattta ataattttga aaatggattt 60
ttttgttttg gcaagagcat gagagctttt actgggcaag aagacaagag atggagagtc 120
cagccgggcc tgcgcttaag tgcgcggtct tgctaggctt gtaagtttct ttcttgctat 180
tccaaacggt gagagatttc tgtgcttttg ttataggaca attaaaaccg tttcaatata 240
acacactgtg gagttttcat atctttgcaa ctttttcttt gggcattcga gcaatcgggg 300
cccagaggtg acaaacacaa acaattttat ttattcatta aatttttgtc aaaaacaaga 360
attttcgtaa ctggaaattt taaaatatta aaaactttca acaacggatc tcttggttct 420
cgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga tacgtaatgt gaattgcaga attccgtgaa 480
tcatcgaatc tttgaacgca cattgcgccc cttggtatc cagggggcat gcctgtttga 540
gcgtcatttc cttctcaaac attctgtttg gtagtgagtg atactctttg gagttaactt 600
gaaattgctg gccttttcat tggatgtttt tttttccaaa gagaggtttc tctgctgtct 660
tgaggataaa tgcaagtacg gtcgttttag gttttaccaa ctgoggctaa tcttttttat 720
actgagcgta ttggaacggt atcgataaga agagagcgtc taggcaaca atgttcttaa 780
agtttgacct caaatcaggt aggagtaccc gctgaactta agcatatcaa taagcggagg 840
a 841

<210> 2
<211> 841
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> ITS14LABGENMOLHO1-2/KU131579
<222> (1)..(30)
<223> product 18S ribosomal RNA

<220>
<221> ITS14LABGENMOLHO1-2/KU131579
<222> (31)..(391)
<223> product internal transcribed spacer 1

<220>
<221> ITS14LABGENMOLHO1-2/KU131579
<222> (392)..(549)
<223> product 5.8S ribosomal RNA

<220>
<221> ITS14LABGENMOLHO1-2/KU131579
<222> (550)..(781)
<223> product internal transcribed spacer 2

<220>
<221> ITS14LABGENMOLHO1-2/KU131579
<222> (782)..(841)
<223> productt 28S ribosomal RNA

<300>
<308> KU131579
<309> 2015-11-12
<313> (1)..(30)

<300>

<308> KU131579
<309> 2015-11-12
<313> (31)..(391)

<300>
<308> KU131579
<309> 2015-11-12
<313> (392)..(549)

<300>
<308> KU131579
<309> 2015-11-12
<313> (550)..(781)

<300>
<308> KU131579
<309> 2015-11-12
<313> (782)..(841)

<400> 2

tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta aagaaattta ataattttga aaatggattt	60
ttttgttttg gcaagagcat gagagctttt actgggcaag aagacaagag atggagagtc	120
cagccggggc tgcgcttaag tgcgcggtct tgctaggctt gtaagtttct ttcttgctat	180
tccaaacggt gagagatttc tgtgcttttg ttataggaca attaaaaccg tttcaataca	240
acacactgtg gagttttcat atctttgcaa ctttttcttt gggcattcga gcaatcgggg	300
cccagaggta acaaacacaa acaattttat ctattcatta aatttttgtc aaaaacaaga	360
attttctgtg ctggaaattt taaaatatta aaaactttca acaacggatc tcttggttct	420
cgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga tacgtaatgt gaattgcaga attccgtgaa	480
tcacogaatc tttgaacgca cattgcgcc cttggta-tc cagggggcat gcctgtttga	540
gcgtcatttc cttctcaaac attctgtttg gtagtgagtg atactctttg gagttaactt	600
gaaattgctg gccttttcat tggatgtttt ttttccaaag agaggtttct ctgcgtgctt	660

gaggtataat gcaagtacgg tcgttttagg tttaccaac tgcggctaata cttttttat	720
actgagcgta ttggaacggt atcgataaga agagagcgtc taggcgaaca atgttcttaa	780
agtttgacct caaatcaggt aggagtaccc gctgaactta agcatatcaa taagcggagg	840
a	841