



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

03-27771

21 EXPEDIENTE N°

54 TÍTULO

HONGOS PARA DESCAFEINAR Y PROCESO DE BIODESCAFEINACION

DE SOLUCIONES QUE CONTIENEN CAFEINA

61

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A23F 5/20; C12S 13/00

71 SOLICITANTE

COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH

DOMICILIO

Karnataka, India,

74. APODERADO

EDILTO FERRERO

Código No. 1092

22. BOGOTÁ, D. C.

QF

PETITORIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 03027771 00000000

Folios: 47

Fecha (ANO): 2003-04-02 17:01:55

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2320 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3

1	SOLICITUD DE:
☒ Patente de Invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH Entidad constituida y existente bajo las leyes de la India. Dirección: Rafi Marg, New Delhi 110 001, India. Teléfono: 546 09 70 E-mail: clientes@camyp.com Fax: 249 40 70 Domicilio: New Delhi, India.	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
--------------------------	---	--

3 REPRESENTANTE AP DERADO (74)	Nombre: Emilio Ferrero Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 38 11 E-mail: cavalier@cavalier.com Fax: 217 92 11 Domicilio: Bogotá, Colombia	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: 438.019 TP 31.929
---	--	---

4 INVENTOR(ES) (72)	1-IMANNU SINGH THAKUR 2-RENU SARATH BABU VEGESNA 3-NAIKANKATTE GANESH KARANATH 4-MANDYAM CHAKRAVARATHY VARADARAJ Domiciliados: Central Food Technological Research Institute Mysore 570 013, Karnataka, India, respectivamente.	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
---------------------------	---	--

5 TITULO (54)	HONGOS PARA DESCAFEINAR Y PROCESO DE BIODESCAFEINACION DE SOLUCIONES QUE CONTIENEN CAFEINA
------------------	--

6 Clasificación Internacional (51)	A23F 005/020
---------------------------------------	--------------

7 Prioridad SI ☐ NO ☒	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud

8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los
6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☒ Otro ☐

Comprobante de pago No. 03 - 19.444
Comprobante de pago No.Fecha: 17 de marzo de 2003
Fecha

10

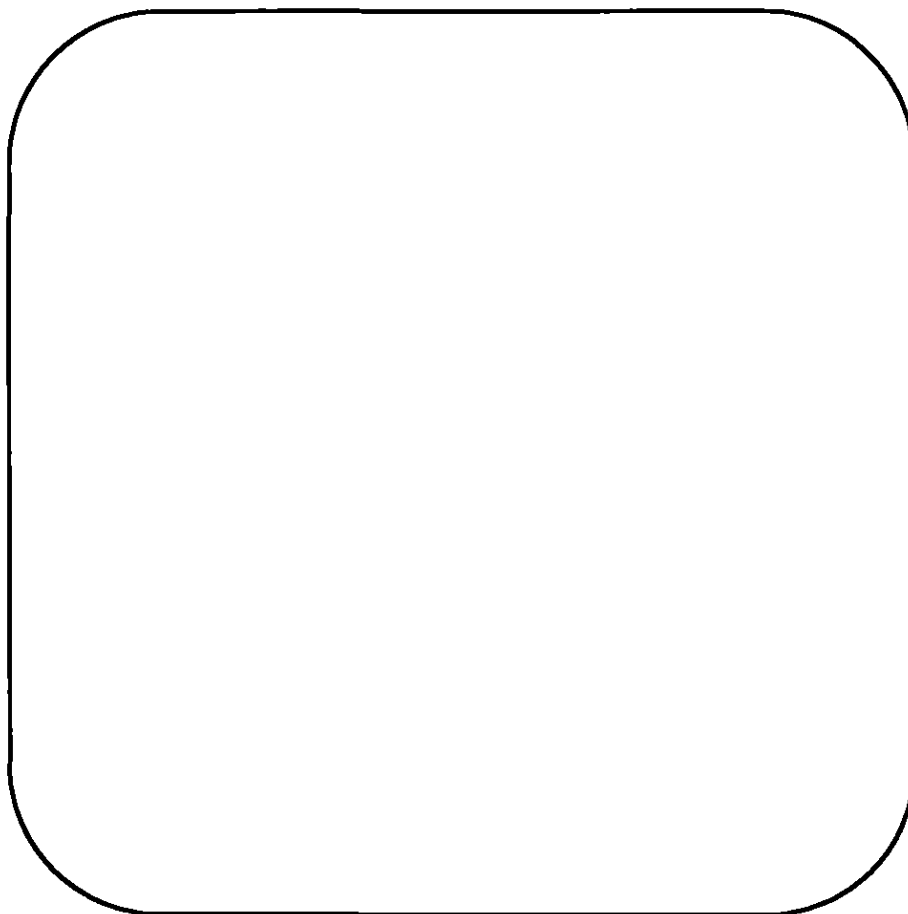
ANEXOS

2

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 400.000.00
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA:

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

HONGOS PARA DESCAFEINAR Y PROCESO DE BIODESCAFEINACIÓN DE
SOLUCIONES QUE CONTIENEN CAFEÍNA

CAMPO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se relaciona con un proceso simple seguro y eficiente para la biodescafeinación completa de soluciones que contienen cafeína usando el hongo *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708, un método para aislar las *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708 útiles para la biodescafeinación de soluciones que contienen cafeína, una cepa de *Pseudomonas alcaligenes* de con número de acceso CFR 1708, y una solución descafeinada obtenida por el proceso anteriormente mencionado.

ANTECEDENTES Y ESTADO DE LA TÉCNICA DE LA PRESENTE
INVENCION

La cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$) es un alcaloide que ocurre naturalmente en el café, en granos de coca, nueces de cola, y hojas de te. La cafeína está descrita como un derivado del alcaloide de xantina metilada (1,3-7 Trimetil xantina). La cafeína es soluble en agua por

encima de 175° F y es soluble en metanol, etanol etc. En mamíferos la cafeína ingestada es rápidamente absorbida, metabolizada y excretada en la orina como derivados de metil xantina. La cafeína es medianamente estimulante y es usada como un agente terapéutico.

La cafeína se ha vuelto una droga ubicua. La cafeína es ampliamente distribuida en preparaciones farmacéuticas y bebidas. Esta tiene una variedad de efectos biológicos. Estimula el sistema nervioso central, muestra toxicidad cuando se alimenta excesivamente y es aún mutagénica in vitro. La teobromina muestra actividades farmacológicas similares a la cafeína pero no causa una reacción excesiva como la cafeína, de modo que es usada como diurético.

Muchos de los efectos fisiológicos de la bebida de café son debidos a su contenido de cafeína. El Doctor Karal Wimmer de Alemania, inventó el proceso para remover la cafeína del café. Este proceso es conocido como descafeinación y el producto es conocido como "café libre de cafeína". La referencia puede ser hecha al trabajo sobre Coffee Solubilization: Commercial Processes and Techniques, Pintauro and Nicholas, D., (1975), en donde

ellos han utilizado cloruro de metileno para descafeinación del café. Los inconvenientes de este proceso es que los elementos de sabor y aceite son retirados de los granos; la presencia de disolvente residual que no es seguro para la salud humana y el tiempo tomado en el proceso completo es de más de 24 horas.

Se hace referencia al trabajo de Zeller y Saleeb, Proceedings of 18 ASIC Colloquium (Helsinki), 168-172, (1999), en donde ellos han reportado la descafeinación de los granos de café usando acetato de etilo. El inconveniente de este método es que envuelve el uso de disolventes orgánicos, que hacen el proceso peligroso para la salud, costoso, consumidor de tiempo, y de una intensidad de trabajo muy alta.

Se hace referencia a Hincan y Saleeb (1984), (General Foods Corp.), patente europea No. EP-0140269, Coffee Technology; en donde ellos han reportado la descafeinación del café usando carbón. Los inconvenientes de este proceso son la pérdida de los elementos de sabor y color, la presencia de cafeína residual en el producto

adicionalmente al tiempo de duración muy largo involucrado en el proceso completo.

Se hace referencia a hora a una patente de General Foods Corporation, USA, (1973), patente No.: Br. 1,313,047, en donde ellos han reportado el uso de triglicéridos. Los inconvenientes de este proceso son la pérdida de sabor y la remoción incompleta de cafeína del producto final.

Se hace referencia al trabajo de Katz, S.N., Coffee Technology, (1987), en donde él ha reportado el uso de CO₂ supercrítico para la descafinación. El inconveniente de este proceso es que aunque este no afecta la calidad del producto final, necesita de la extracción de la cafeína hacia la superficie del grano por vapor e involucra costos muy altos y la cafeína no es completamente removida del producto final.

Se hace referencia al trabajo de Michael Gluck y Franz Lingens (19987), Applied Microbiology and Biotechnology 334-340, sobre los estudios en la producción microbial de teobromina y heteroxantina a partir de la cafeína en donde ellos han usado una cepa de .

Pseudomonas putida. Los inconvenientes de este proceso son que las células crecen muy lentamente en el medio que contiene cafeína, la degradación de la cafeína es muy lenta y la acumulación de productos fue demasiado baja para propósitos comerciales y los productos producidos en este proceso tienen efectos similares a aquel de la cafeína.

Se hace referencia al trabajo de Wouter J. Middlehoven y Cor. M. Bakker (1982) Eur. J. Appl. Microbio. Biotechnol. 214-217, en donde ellos han reportado la degradación de la cafeína por células inmovilizadas de *Pseudomonas putida* cepa C 3024 en donde ellos han inmovilizado las células en pepitas de agar. Las desventajas de este proceso son que el método de inmovilización tiende a remover sustancias diferentes a la cafeína afectando por lo tanto adversamente el sabor del café tostado y los productos de crecimiento de las células son muy lentos.

Se hace referencia a la patente Suiza de Robert, F.D., Nestle Group (1981) patente No. Ch626781 "Decaffeination process" sobre la descafeinación de material vegetal cuando se expone al microorganismo de la

especie *Acinetobacter*. La desventaja de este método es que la remoción de la cafeína del extracto de café es muy lenta y solamente a cerca de la mitad del contenido de cafeína inicial es removido de los extractos.

Se hace referencia a la patente estadounidense No. 4228191 (1980) en donde ellos han reportado el uso de extractos libres de organismos similares a *Pseudomona* para la descafeinación de líquidos que contienen cafeína acuosa tales como extractos de café. La desventaja de este requerimiento de adición de cofactores para descafeinación, que altamente inestable.

OBJETOS DE LA PRESENTE INVENCION

El objeto principal de la presente invención es desarrollar un proceso simple, seguro, y eficiente para la biodescafeinación completa de soluciones que contienen cafeína usando el hongo *Pseudomonas alcaliegenes* CFR 1708.

Otro objetivo principal de la presente invención es descafeinar soluciones que contienen cafeína de alta concentración en cafeína.

Todavía otro objetivo de la presente invención es desarrollar un método para la degradación completa de la cafeína.

Otro objeto adicional de la presente invención es desarrollar un proceso para una descafinación rápida y eficiente.

Otro objetivo principal de la presente invención es desarrollar un método para aislar el hongo *Pseudomonas alcaliegenes* CFR1708 útil para la descafeinación de soluciones que contienen cafeína.

Otro objetivo principal de la presente invención es aislar una cepa de *Pseudomonas alcaliegenes* con número de acceso CFR1708.

Otro objetivo principal de la presente invención es desarrollar una solución descafeinada usando el proceso anteriormente mencionado.

Otro objetivo principal de la presente invención es suministrar "un proceso para la biodescafeinación de

soluciones que contiene cafeína", el cual obvia o elimina los inconvenientes detallados anteriormente.

Otro objetivo de la presente invención es aislar microorganismos, que poseen actividad para la descafeinación.

Todavía otro objeto de la presente invención es preparar cultivos inoculados de cultivos microbiales para la descafeinación efectiva.

Todavía otro objeto de la presente invención es preparar un medio que contiene cafeína adecuado para el crecimiento del organismo.

Otro objeto de la presente invención es optimizar las condiciones para la degradación efectiva de la cafeína en solución.

RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se relaciona con un proceso simple seguro y eficiente para la biodescafeinación completa de soluciones que contienen cafeína usando

Pseudomonas alcaliegenes CFR 1708, un método para aislar el Pseudomonas alcaliegenes CFR 1708 útil para la biodescafeinación de soluciones que contienen cafeína, una cepa de Pseudomonas alcaliegenes con número de acceso CFR 1708, y una solución descafeinada obtenida por el proceso anterior.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se relaciona con un proceso simple, seguro, y eficiente para la biodescafeinación completa de soluciones que contienen cafeína usando el hongo Pseudomonas alcaliegenes CFR 1708, un método para aislar el Pseudomonas alcaliegenes CFR 1708 útil para la biodescafeinación de las soluciones que contienen cafeína, una cepa de Pseudomonas alcaliegenes con número de acceso CFR 1708 y una solución descafeinada obtenida por el proceso anteriormente mencionado.

En una modalidad de la presente invención, en donde un proceso simple, seguro y eficiente para la biodescafeinación completa de soluciones que contienen

cafeína usando el hongo de *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708, dicho proceso comprende las etapas de:

- cultivar el hongo en placas de agar con cafeína,
- transferir el cultivo de crecimiento activamente en un caldo nutriente que contiene 0,1 a 0,5 g/ l de cafeína,
- incubar el cultivo de la etapa (b) a cerca de 28 a 30° C durante 20 a 24 horas bajo agitación de entre 50 a 200 rpm para obtener el preinoculado,
- transferir el preinoculado al caldo nutriente que comprende cerca de 0,5 a 2 g/l de cafeína,
- incubar el preinoculado a cerca de 28 a 30° C durante cerca de 20 a 24 horas bajo agitación durante cerca de 50 a 200 rpm para acumular biomasa,
- cosechar la biomasa por centrifugación entre 10 a 20 minutos a cerca de 10.000 a 16.000 g a una

temperatura en el rango de entre 0 a 4° C para obtener pepitas,

- inducir las pepitas para la degradación de la cafeína por la transferencia aséptica de las pepitas dentro del medio de líquido de cafeína esterilizado con un pH entre 5 a 9,
- incubar las pepitas inducidas a cerca de 25 a 35° C bajo agitación entre 50 a 200 rotaciones por minuto durante un tiempo de duración entre 36 a 60 horas, y
- descafeinar la solución que contiene cafeína por medio de incubar la pepita de la etapa (h).

En otra modalidad de la presente invención, en donde la concentración de cafeína en el caldo nutriente está en el rango entre 0,2 a 0,4 g/l.

Todavía otra modalidad de la presente invención, en donde el medio líquido de cafeína esterilizada comprende entre 40 a 60 g/l de septahidrato de ortofosfato de disodio de hidrógeno, cerca de 10 a 15 g/l de ortofosfato

/X

de dihidrógeno de potasio, cerca de 1 a 5 g/l de cloruro de sodio cerca de 2 a 7 g/l de cloruro de amonio, y cerca de 0,1 a 0,5 g/l de cafeína.

Todavía otra modalidad de la presente invención, en donde el tiempo de inducción está entre 40 a 48 horas.

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde la concentración de cafeína en la solución que contiene cafeína está en el rango entre 0,01 a 5 g/l de cafeína.

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde la degradación de la cafeína es completa en 1 a 14 horas.

Todavía otra modalidad de la presente invención, en donde la incubación se hace a temperatura en el rango entre 28 a 30° C.

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde el caldo nutriente, comprende cerca de 0,5 a 4 g/l de extracto de levadura, cerca de 3 a 8 g/l de

peptona, cerca de 3 a 8 g/l de cloruro de sodio, y cerca de 0,08 a 0,7 g/l de cafeína.

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde el efecto de descafeinación se mejora con un incremento en el pH entre 5 a 9.

En otra modalidad de la presente invención en donde un método para aislar *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708 útil para la biodescafeinación de soluciones que condenen cafeína, dicho método comprende las etapas de:

- Mezclar una muestra de suelo que comprende microbios obtenidos de unidades de procesamiento de café con medio líquido de cafeína para obtener un cultivo,
- Incubar el cultivo durante cerca de 70 a 74 horas a cerca de 28 a 30° C en un agitador a 140 a 160 rpm,
- Hacer diluciones seriales del cultivo de crecimiento anterior,

- Inocular los cultivos diluidos en placas petri de medio de agar y cafeína,
- Incubar las placas inoculadas a cerca de 35 a 39° C durante 1 a 3 días, y
- Aislar las colonias separadas en pozos de la bacteria que degrada la cafeína en crecimiento sobre las placas incubadas para obtener cultivos puros,

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde el medio líquido de cafeína comprende entre 40 a 60 g/l de septahidrato de ortofosfato de hidrógeno de disodio, cerca de 10 a 15 g/l de ortofosfato de dihidrógeno de potasio, cerca de 1 a 5 g/l de cloruro de sodio, cerca de 2 a 7 g/l de cloruro de amonio, y cerca de 0,1 a 0,5 g/l de cafeína.

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde las dilusiones seriales están en el rango de 10^{-1} hasta 10^{-9} .

17

En otra modalidad principal de la presente invención, en donde una cepa de *Pseudomonas alcaliegenes* de número de acceso CFR 1708.

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde las características de las cepas están dadas con el signo + mostrando Positivo para crecimiento, y el signo - muestra Negativo para crecimiento.

**Ensayos de cultivos bioquímicos para la
identificación del aislado**

Ensayo Bioquímico	Resultado
Catalasa	+
Oxidasa	-
Reducción de Nitrato	-
Producción de Indol	-
Ensayo de rojo metilo	-
Ensayo Voges Proskauer	-
Hidrólisis de almidón	-
Utilización de citrato	+
Oxidación	+
Fermentación	+

Motilidad	+
Utilización de Mlonato	+
Dihidrolasa de arginina	+
Hidrólisis de gelatina	-
Crecimiento a 41° C	+
Crecimiento a 4° C	-
Eslanto ácido	-
Ácido Butt	-
Eslanto alcalino	+
Alcalino Butt	+
Producción H ₂ S	+ (débil)
Producción de gas	-
Ureasa	+
Utilización de dextrosa	-
Utilización de manitol	-
Acumulación de alcanato polihidróxi (PHB)	-

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde una solución descafeinada es obtenida por el proceso anteriormente mencionado.

Todavía otra modalidad de la presente invención, en donde la presente invención está relacionada con un proceso para la biodescafeinación de soluciones que contiene cafeína.

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde la utilidad principal de la invención es la degradación completa de la cafeína a un pH neutro y a temperatura ambiente en un medio simple que puede ser usado para la descafeinación de soluciones que contiene cafeína.

En todavía otra modalidad de la presente invención, en donde la novedad de la presente invención es la degradación completa de la cafeína rápida y completamente usando un crecimiento de cultivo microbial en un medio líquido sintético.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS ADJUNTOS

La figura 1 muestra el porcentaje de degradación de cafeína con respecto al tiempo.

En el dibujo adjunto esa especificación de la figura 1 representa los datos HPLC de la degradación de cafeína por el cultivo.

De acuerdo con la presente invención se suministra un proceso para la biodescafeinación de soluciones que contienen cafeína, que comprende:

1. un proceso para la biodescafeinación de soluciones que contienen cafeína que comprende:

- a) aislar el microorganismo por:

- i) mezclar un gramo de muestra de suelo que puede ser recolectado de unidades de procesamiento de café con 100 ml de medio líquido de cafeína en un frasco de 250 ml,

- ii) incubar durante un rango de periodo entre 68 a 76 horas a 24 a 34° C que puede ser efectuado en un agitador orbital giratorio colocado entre 130 a 170 rpm,

iii) preparar y verter el medio de agar y cafeína puede ser efectuado en placas petri,

iv) hacer 10 diluciones seriales (10^{-1} a 10^{-9}) del anterior cultivo de crecimiento

v) inocular 0,04 a 0,2 ml de las diluciones que pueden ser efectuadas sobre cada placa,

vi) incubar a una temperatura en el rango de 32 a 40° C durante un periodo de 1 a 4 días,

vii) seleccionar y purificar adicionalmente las colonias aisladas puede ser efectuado por el crecimiento sobre las placas anteriores para obtener cultivos puros,

viii) seleccionar asépticamente y transferir las colonias separadas en pozos de la bacteria que degrada la cafeína formada sobre placas de agar y cafeína incubadas puede ser efectuada sobre la base de la morfología de colonias en placas de agar cafeína frescas e incubadas en

el rango entre 26 a 34° C durante 68 a 76 horas
y

ix) mantener el organismo por subcultivación
que puede ser efectuado sobre cultivos
inclinados sobre agar cafeína en intervalos
regulares de 25 a 35 días.

b) identificar el organismo como *Pseudomonas*
alcaliegenes CFR1708 que puede ser hecho en
base a las características morfológicas:

i) formar gramos de colonias coccobacilli
negativos, redondos, pequeños, elevados y
suaves,

ii) positivo para la producción de catalasa,
inclinado alcalino y but, sulfito de hidrógeno y
ureasa,

iii) negativo para la producción de oxidasa,
indol, inclinado ácido y but, gas y alcanato de
polihidroxi,

iv) positivo para utilización de citrato, oxidación, fermentación de azúcares, motilidad, utilización de malonato, actividad de hidrolasa de arginina, crecimiento a 41° C,

v) negativo para reducción de nitrato, ensayo rojo metil, ensayo voges proskauer, hidrólisis de almidón, hidrólisis de gelatina, crecimiento a 4° C de utilización de dextrosa y utilización de manitol

c) desarrollar u preinoculado para ser efectuado por transferencia de un lazo completo de cultivo de crecimiento activamente de *P. alcaligenes* sobre agar nutriente fortificado con 0,08 - 0,7 g/l de cafeína a 40-110 ml de caldo nutriente que contiene 0,8 a 0,7 g/l de cafeína,

d) incubar en el rango entre 24 a 36° C durante un periodo de 18 a 26 horas que puede ser efectuado bajo agitación ente 40 a 210 rpm.

e) transferir entre 40 a 110 ml del crecimiento de preinoculado de 16 a 26 horas que puede

ser efectuado entre 0,8 a 0,22 l de caldo nutriente que contiene 0,1 a 5 g/l de cafeína e incubación a 26-32° C durante 18 a 26 horas bajo agitación entre 40 a 210 rpm.

f) Cosechar la biomasa acumulada después de 18 a 26 horas que puede ser efectuado por centrifugación entre 8 a 22 min en una centrífuga refrigerada tipo mesa entre 8.000 a 18.000 g entre 0 a 6° C para obtener una biomasa húmeda como pepea.

g) inducir la biomasa anterior para la degradación de la cafeína que puede ser efectuado por una transferencia aséptica de los granos de biomasa en un frasco de 500 ml que contiene 40 a 160 ml de un medio líquido de cafeína esterilizada y se incuba en el rango entre 26 a 32° C bajo agitación entre 40 a 210 rotaciones por minuto durante un periodo de 38 a 50 horas.

h) Descafeinación usando la biomasa así inducida para la degradación de cafeína que

puede ser hecho por la adición de 0,5 a 4 gramos de peso húmedo de esta biomasa al medio líquido de cafeína que contiene 0,1 a 3 g/l de cafeína y se incuba durante un periodo de 1 a 14 horas.

- i) Retirar alícuotas de 0,5 a 2 ml de las muestras de los frascos a intervalos deseados de tiempo y someterlas a centrifugación entre 8.000 a 17.000 g durante un periodo de 8 a 17 minutos.
- j) Análisis de los sobrenadantes de las muestras de caldo de cultivo centrifugado retirado a diferentes intervalos de tiempo para ver la cafeína residual lo que puede ser hecho por cromatografía líquida de alto desempeño usando una columna C18 con una mezcla de agua y acetonitrilo en la proporción de 80:20-90:10 como fase móvil con una elusión isocrática a una velocidad de flujo de 0,5 a 1,5 ml/min con un aparato detector espectrofotométrico de ultravioleta visible a 273 nm.

En una modalidad de la presente invención, la edad del cultivo inclinado puede ser seleccionado entre 0,5 a 4 semanas y la edad del inoculado puede ser de 10 a 20 horas de crecimiento bajo agitación entre 40 a 210 rpm.

Todavía en otra modalidad de la presente invención, los nutrientes empleados en el cultivo pueden incluir 0,5 a 4 g/l de extracto de levadura, 3 a 8 g/l de peptona, 3 a 8 g/l de cloruro de sodio y 0,08 a 0,7 g/l de cafeína.

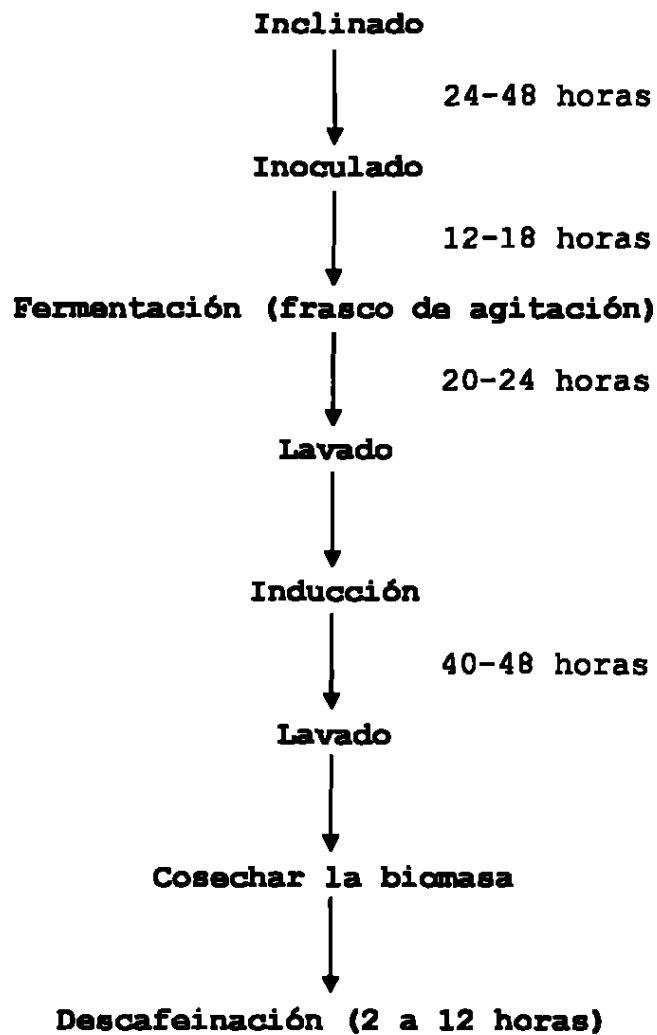
En todavía otra modalidad de la presente invención, el tiempo de crecimiento puede estar en el rango entre 26 a 70 horas bajo agitación a 210 rpm.

En todavía otra modalidad de la presente invención, el medio para inducción puede incluir entre 30 a 70 g/l de septahidrato de ortofosfato de hidrógeno de disodio, 5-20 g/l de ortofosfato de dihidrógeno de potasio, 0,5 a 7 g/l de cloruro de sodio, 1 a 8 g/l de cloruro de amonio y 0,08-0,7 g/l de cafeína.

En todavía otra modalidad de la presente invención, 0,08 a 2 g/l de cafeína pueden ser removidos

completamente de 8 a 30 ml de soluciones por 0,5 a 4 gm de peso húmedo de las células microbiales en un periodo entre 1 a 14 horas.

Un proceso general para la biodescafeinación de soluciones que contienen cafeína se da en el siguiente diagrama de flujo:



Los siguientes ejemplos se dan como vía de ilustración de la presente invención solamente y no deben tomarse como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Después de tamizar varios microorganismos aislados a partir de desechos de proceso de café, un cultivo bacterial es seleccionado sobre la base de la habilidad de degradar cafeína en un medio líquido bien definido que contiene cafeína. El aislamiento del microorganismo fue hecho mezclando un gramo de la muestra de suelo con 100 ml de medio líquido de cafeína en un frasco de 250 ml e incubado durante 72 horas a 30° C en un agitador giratorio orbital a 150 rpm. El medio de agar cafeína fue preparado y vertido en platos petri. Entonces se hicieron 10 diluciones seriales (10^{-1} a 10^{-9}) del anterior cultivo de crecimiento y se inocularon 0,1 ml de las diluciones sobre cada plato y se incubaron a 37° C durante dos días.

Las colonias aisladas crecieron sobre los platos anteriores y fueron seleccionadas y purificadas adicionalmente para obtener cultivos puros. Sobre la base

de la morfología de las colonias, las colonias bien separadas de la bacteria de degradación de cafeína formada sobre placas de agar cafeína incubadas fueron seleccionadas y transferidas asépticamente en placas de agar cafeína frescas e incubadas a 30° C durante 72 horas. El organismo es mantenido por subcultivo sobre inclinados de agar cafeína cada 30 días. La bacteria es caracterizada por los ensayos morfológicos, culturales y bioquímicos. Los ensayos incluyeron reacción de Gram, producción de catalasa, producción de oxidasa, reducción de nitrato, producción de indol, ensayo rojo metil, ensayo Voges Proskauer, hidrólisis de almidón, utilización de citrato, oxidación, fermentación de azúcares, motilidad, utilización de malonato, actividad de hidrolasa de arginina, licuefacción de gelatina, crecimiento a 4° C y 41° C, inclinado ácido, ácido but, inclinado alcohol, alcohol butt, producción de H₂S, producción de gas, producción de ureasa, utilización de dextrosa, utilización de manitol y acumulación de alcanato de polihidroxi y los resultados se dan en la tabla 1.

Las características taxonómicas de la bacteria, *Pseudomonas alcaligenes* se resumen como sigue:

Las colonias bacteriales fueron redondas, pequeñas, elevadas y suaves y la observación microscópica reveló que la bacteria era Coccobacilli de gram negativo. Los ensayos de cultivo y bioquímicos fueron llevados a cabo para la identificación y el aislamiento y los resultados se dan en la tabla 1.

Tabla 1: Ensayos de cultivo y bioquímicos para la identificación del aislado

Ensayo Bioquímico	Resultado
Catalasa	+
Oxidasa	-
Reducción de Nitrato	-
Producción de Indol	-
Ensayo de rojo metilo	-
Ensayo Voges Proskauer	-
Hidrólisis de almidón	-
Utilización de citrato	+
Oxidación	+
Fermentación	+

Motilidad	+
Utilización de Malonato	+
Dihidrolasa de arginina	+
Hidrólisis de gelatina	-
Crecimiento a 41° C	+
Crecimiento a 4° C	-
Eslanto ácido	-
Ácido Butt	-
Eslanto alcalino	+
Alcalino Butt	+
Producción H ₂ S	+ (débil)
Producción de gas	-
Ureasa	+
Utilización de dextrosa	-
Utilización de manitol	-
Acumulación de alcanoato polihidróxi (PHB)	-

+, positivo para crecimiento; -, negativo para crecimiento;

El aislado es positivo para la producción de catalasa. El aislado es negativo para la producción de oxidasa, reducción de nitrato, producción de indol, ensayo rojo metilo, ensayo Voges Proskauer e hidrólisis de almidón. El aislado es positivo para la utilización de citrato, oxidación, fermentación de azúcares, motilidad, utilización de malonato, actividad de dihidrolasa de arginina, es negativo para la hidrólisis de gelatina. El aislado mostró un crecimiento a 41° C y un crecimiento inhibido a 4° C. el aislado fue ensayado y fue negativo para el inclinado ácido y butt, y positivo para el inclinado alcalino y butt. El aislado se encontró que era débil productor de sulfuro de hidrógeno. El aislado no mostró ninguna producción de gas. El aislado fue positivo para la producción de ureasa y fue negativo para la utilización de dextrosa, utilización de manitol y producción de alcanato de polihidroxi.

Sobre la base de las características morfológicas, culturales y bioquímicas, el aislado es identificado Pseudomonas alcaligenes y fue designado como CFR 1708, y depositado en el Central Food Technological, Research Institute Cultura Collection.

Ejemplo 2

Un lazo completo de cultivos de crecimiento activo de *Pseudomonas alcaligenes* es transferido a 100 ml de caldo nutriente que contiene 0,3 g/l de cafeína y fue incubado a 30° C en un agitador giratorio a 120 rpm durante 24 horas. 5 ml de las 24 horas de crecimiento de preinoculado es transferido a 100 ml de caldo de nutriente que contiene 1 g/l de cafeína y fue incubado a 20° C durante 48 horas en el agitador giratorio. La biomasa acuitada durante 24 horas es cosechado por centrifugación durante 20 min en una centrífuga de mesa a 16.000 x g a 4° C.

La biomasa es transferida asépticamente en un frasco de 500 ml que contiene 100 ml de medio líquido de cafeína que contiene 0,5 g/l de cafeína y se incubó a 30° C en el agitador giratorio durante 48 horas. 1 gm de peso húmedo de los granos de la biomasa anteriormente inducida es suspendida en 2 ml de un amortiguador de fosfato al 0,1 M. esta suspensión es entonces agregada a un frasco que contiene 10 ml de medio líquido de cafeína que contiene 1

g/l de cafeína ajustado a un pH de 5,0 e incubado a 30° C bajo agitación en un agotador giratorio a 120 rpm. Alícuotas de 1 ml del medio son retiradas a 2, 4, 6, 12 y 24 horas como intervalos, sometida a centrifugación a 16.000 x g durante 10 minutos a 4° C y analizadas en cuanto a la cromatografía líquida de alto rendimiento para su contenido de cafeína. Existe una degradación rápida de cafeína que se incrementa entre 54% a 2 horas hasta 96% en 6 horas de incubación (figura 1).

Ejemplo 3

El cultivo de organismos se lleva a cabo como en el ejemplo 1. Sin embargo, el pH del medio para la descafinación se ajusta a 6,0. La degradación de la cafeína es mucho más eficiente que en el pH 5, dando valores de 94,5% en dos horas a 98% en 6 horas de incubación (figura 1).

Ejemplo 4

El cultivo de organismos se lleva a cabo como en el ejemplo 1. Sin embargo, el pH del medio para descafeinación se ajusta a 7,0. La cafeína es

completamente removida de la solución en dos horas de incubación (figura 1).

Ejemplo 5

El cultivo de organismos se lleva a cabo como en el ejemplo 1. Sin embargo, el pH del medio para descafeinación se ajusta a 8,0. 9,33% de la cafeína es removida de la solución en dos horas de incubación (figura 1).

La novedad de la presente invención es la degradación completamente de la cafeína de manera rápida y completamente usando un cultivo microbial de crecimiento en un medio líquido sintético.

Las principales ventajas de la presente invención son:

- Degradación de la cafeína ocurre en un pH neutro en el rango entre 7,0 a 8,0.
- Es un método de descafeinación rápido y degrada completamente la cafeína entre 2 a 12 horas de incubación.

- Evita el uso de disolventes orgánicos peligrosos para la remoción de la cafeína.
- Emplea un medio simple y no costoso para el cultivo de un cultivo de *Pseudomonas alcaliegenes* para la degradación de la cafeína.
- Impide la pérdida de elementos de sabor y aceites de las soluciones que contienen cafeína.
- Es rápida la descafeinación.
- Es extremadamente económico.
- Es fácil de llevara cabo y no requiere un trabajo intensivo.
- Las células de los hongos de la presente solicitud crecen rápidamente a diferencia de las células del estado de la técnica.
- La acumulación de producto libre de cafeína es alta.
- El producto de descafeinado es útil comercialmente.
- No requiere cofactores (usualmente inestables) para la descafeinación.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso simple, seguro y eficiente para la biodescafeinación completa de soluciones que contienen cafeína usando el hongo *Pseudomonas alcaliegenes* (CFR 1708,) dicho proceso comprende las etapas de:
 - a. Cultivar el hongo en platos de agar de cafeína,
 - b. Transferir el cultivo en crecimiento activamente en un caldo nutriente que contiene 0,1 a 0,5 g/l de cafeína,
 - c. Incubar el cultivo de la etapa (b) entre 28 a 30° C durante 20 a 24 horas bajo agitación entre cerca de 50 a 200 rpm para obtener el preinoculado,
 - d. Transferir el preinoculado al caldo nutriente que comprende 0,5 a 2 g/l de cafeína,

- e. Incubar el preinoculado entre 28 a 30° C durante cerca de 20 a 24 horas bajo agitación entre 50 a 200 rpm para acumular biomasa,
- f. Cosechar la biomasa por centrifugación durante 10 a 20 min a cerca de 10.000 a 16.000 g en una temperatura entre 0 a 4° C para obtener gránulos,
- g. Inducir los gránulos para la degradación de cafeína por medio de transferir asépticamente los gránulos en un medio líquido de cafeína esterilizada en un pH entre 5 a 9,
- h. Incubar los gránulos inducidos entre 25 a 35° C bajo agitación entre cerca de 50 a 200 rotaciones por minuto durante un tiempo de duración entre 36 y 60 horas, y
- i. Descafeinar la solución que contiene cafeína incubando con los gránulos de la etapa (h).

2. Un proceso, según la reivindicación 1, en donde la concentración de cafeína en el caldo nutriente está en el rango entre 0,2 a 0,4 g/l.
3. Un proceso según la reivindicación 1, en donde el medio de cafeína líquida esterilizada comprende entre 40 a 60 g/l de septahidrato de ortofosfato de hidrógeno de disodio, cerca de 10 a 15 g/l de ortofosfato de dihidrógeno de potasio, cerca de 1 a 5 g/l de cloruro de sodio, cerca de 2 a 7 g/l de cloruro de amonio, y cerca de 0,1 a 0,5 g/l de cafeína.
4. Un proceso según la reivindicación 1, en donde el tiempo de inducción está entre 40 a 48 horas.
5. Un proceso según la reivindicación 1, en donde la concentración de cafeína en la

solución que contiene cafeína está en el rango entre 0,01 a 5 g/l de cafeína.

6. Un proceso según la reivindicación 1, en donde la degradación de cafeína es completa en cerca de 1 a 14 horas.

7. Un proceso según la reivindicación 1, en donde se incuba a temperatura entre 28 a 30° C.

8. Un proceso según la reivindicación 1, en donde el caldo nutriente comprende entre 0,5 a 4 g/l de extracto de levadura, cerca de 3 a 8 g/l de peptona, cerca de 3 a 8 g/l de cloruro de sodio, y cerca de 0,08 a 0,7 g/l de cafeína.

9. Un proceso según la reivindicación 1, en donde el efecto de descafeinación mejora con un incremento en el pH de entre 5 a 9.

7
c 10. Un método para aislar Pseudomonas
alcaliegenes CFR1708 útil en la

biodescafeinación de soluciones que contienen cafeína, dicho método comprende las etapas de:

- a. Mezclar una muestra de suelo que comprende microbios obtenidos de unidades de procesamiento de café con medio líquido de cafeína para obtener un cultivo,
- b. Incubar el cultivo durante cerca de 70 a 74 horas a cerca de 28 a 30° C en un agitador a 140 a 160 rpm,
- c. Hacer dilusiones seriales del cultivo de crecimiento anterior,
- d. Inocular los cultivos diluidos en placas petri de medio de agar y cafeína,
- e. Incubar las placas inoculadas a cerca de 35 a 39° C durante 1 a 3 días, y

f. Aislar las colonias separadas en pozos de la bacteria que degrada la cafeína en crecimiento sobre las placas incubadas para obtener cultivos puros.

11. Un método según la reivindicación 10, en donde el medio líquido de cafeína comprende entre 40 a 60 g/l de septhidrato de ortofosfato de hidrógeno de disodio, cerca de 10 a 15 g/l de ortofosfato de dihidrógeno de potasio, cerca de 1 a 5 g/l de cloruro de sodio, cerca de 2 7 g/l de cloruro de amonio, y cerca de 0,1 a 0,5 g/l de cafeína.

12. Un método según la reivindicación 10, en donde las dilusiones seriales están entre 10^{-1} a 10^{-9} .

13. Una cepa *Pseudomonas alcaliegenes* con número de acceso CFR 1708.

14. Una cepa según la reivindicación 13, en donde las características de la cepa están dadas por los signos + mostrados para positivo en crecimiento, y signo - mostrado para negativo en crecimiento.

Ensayo Bioquímico	Resultado
Catalasa	+
Oxidasa	-
Reducción de Nitrato	-
Producción de Indol	-
Ensayo de rojo metilo	-
Ensayo Voges Proskauer	-
Hidrólisis de almidón	-
Utilización de citrato	+
Oxidación	+
Fermentación	+
Motilidad	+
Utilización de Mlonato	+
Dihidrolasa de arginina	+
Hidrólisis de gelatina	-
Crecimiento a 41° C	+

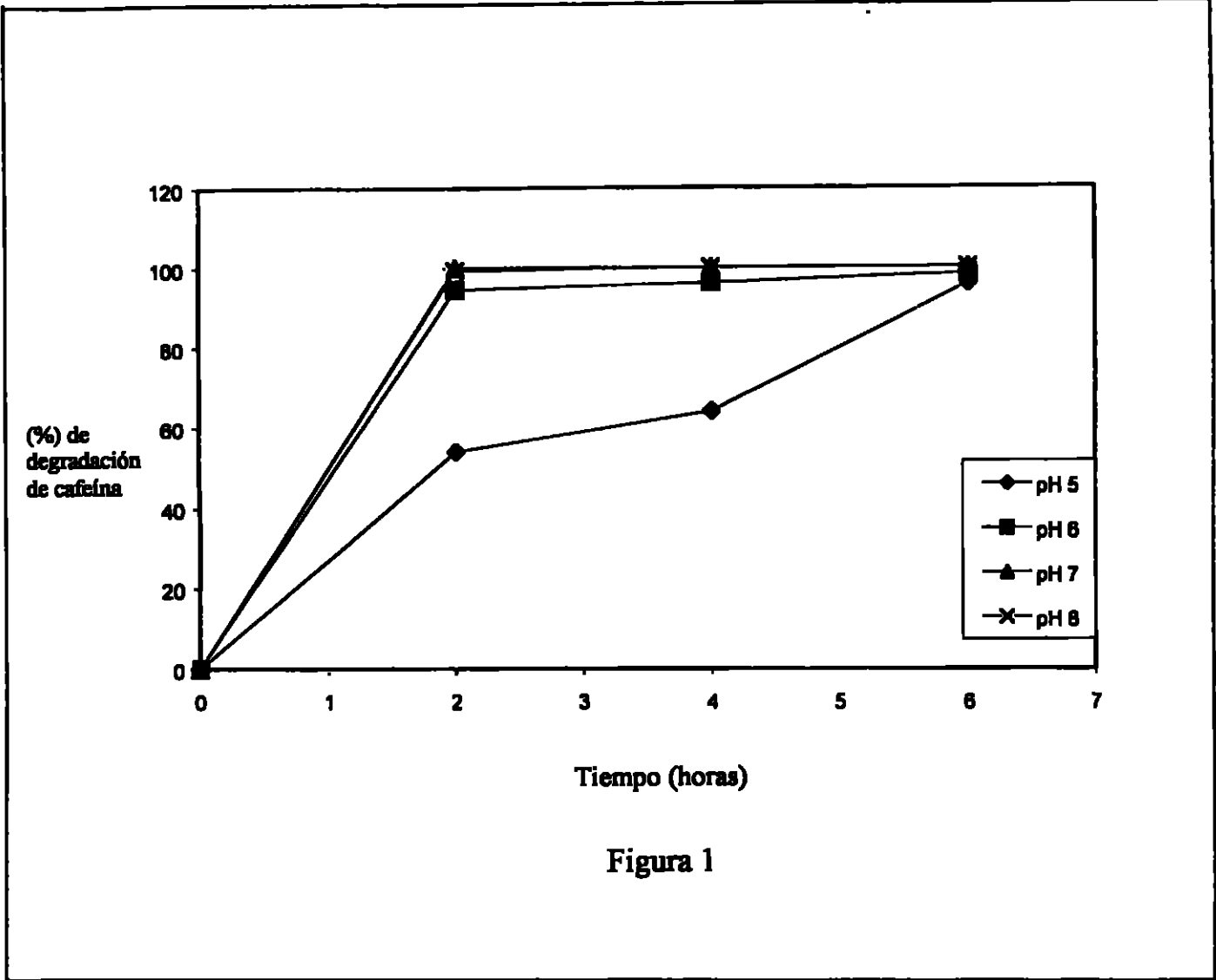
Crecimiento a 4° C	-
Eslanto ácido	-
Ácido Butt	-
Eslanto alcalino	+
Alcalino Butt	+
Producción H ₂ S	+ (débil)
Producción de gas	-
Ureasa	+
Utilización de dextrosa	-
Utilización de manitol	-
Acumulación de alcanoato polihidróxi (PHB)	-

15. Una solución descafeinada obtenida por el
proceso de la reivindicación 1.

100.000 g
0.5 g

RESUMEN

La presente invención se relaciona con un proceso simple, seguro y eficiente para la biodescafeinación completa de soluciones que contienen cafeína usando el hongo *Pseudomonas alcaliegenes* CFR 1708, un método para aislar *Pseudomonas alcaliegenes* CFR 1708 útil para la biodescafeinación de soluciones que contienen cafeína, una cepa *Pseudomonas alcaliegenes* de número de acceso CFR 1708, y una solución descafeinada obtenida por el proceso anteriormente mencionado.





47

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación : 83827771 00000000

Folios: 47

Fecha (ARC): 2003-04-02 17:01:55

Trámite : BOE PATENTES D / 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 19,444
FECHA : MARZO 17 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9005688	17/03/2003	13,478,560.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISEÑOS INDUS	400,000.00
	TOTAL :	\$ 400,000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Edo 13724-801-001-9

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. () ()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas () ()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud. () ()
- Representación gráfica del esquema de trazado () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 03027771 00000000

Folios: 47

Fecha: Fecha (MM): 2003-04-02 17:01:55

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folio 46

2020
Bogotá, D. C.

Doctor(a)
EMILIO FERRERO

Oficio N.º 03457

REFERENCIA:	Radicación	03-27771
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Allegar copia del documento en que conste la cesión del derecho a la patente otorgado por el(los) inventor(es) al solicitante o a su causante. (art. 26-k, Dec 486/2000).
- Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Cuando se requiera debe allegarse la sustitución del poder, otorgada por quien aparece como apoderado principal. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enuncados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 02 MAYO 2003

202027

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia