

TÍTULO DE PATENTE No. 363577

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

Domicilio: Normalistas 800, Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO

Denominación: CEPA DE *Candida glabrata* Y SU USO EN PROCESO DE FERMENTACIÓN DE MEZCLAS DE AZÚCARES PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL.

Clasificación: **CIP:** C12P7/06; C12P1/02; C12P7/10; C12R1/72
CPC: C12P7/06; C12P1/02; C12P7/10; C12P2201/00; C12R1/72; Y02E50/16

Inventor(es): NEITH ARACELY PACHECO LÓPEZ; INGRID MAYANÍN RODRÍGUEZ BUENFIL; MARÍA DE LOS ANGELES SÁNCHEZ CONTRERAS

SOLICITUD

Número:	Fecha de Presentación:	Hora:
MX/a/2013/014179	3 de Diciembre de 2013	13:52

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 3 de diciembre de 2033

Fecha de Expedición: 13 de marzo de 2019

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 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012, 09/04/2012, 01/06/2016 y 13/03/2018); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES NAHANNY CANAL REYES



Cadena Original:
NAHANNY MARISOL CANAL REYES|00001000000403252793|Servicio de Administración Tributaria|1695||MX/2019/29486|MX/a/2013/014179|Título de patente normal|1027|RGZ|Pág(s) 1||kMaWb4vVB8wdnCAAetc1JY5lco=

Sello Digital:
A3ut6brqGijYxnx8iueV/+ZfaurSXL+VihvxjCQEasaEG7xaTdOH1DOtLO5qTFc/WhsyYKlvAUq0/jHNdRIOZVdUI
5WJ403IXo54e1lqkhHgywNGRP92LwXDSx9Sa1/MuluuU5QNHUct+5Z6wk6jQBFoJ5GwBCHBJR4sWGXCITc7fy4rWO
NIH6tF4YlwLIXZTaA0r5NczQAfd78mZK6MtPN6wVdvfJ+eiyK7KPTKGdclIO35YFHkmpHHBw1mgwL7TR909OM878
Hs2DTRVJx/OPNMJickGAijRTxfJfVlVb6fzX3WSBO9V1QoE8bHc0KYVEKfPelKeJpxXlw==



CEPA DE *Candida glabrata* Y SU USO EN PROCESO DE FERMENTACIÓN DE MEZCLAS DE AZÚCARES PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de los biocombustibles, más particularmente procesos para la obtención de alcohol, dado que describe y reclama una cepa de *Candida glabrata* llamada T1, dicha cepa fue aislada del estómago de termita y es capaz de producir alcohol como principal producto de la fermentación de mezclas de azúcares. La composición de la mezcla de azúcares incluye azúcares de 6 y 5 carbonos tales como: glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, xilosa y arabinosa. La utilización de esta cepa capaz de asimilar diferentes azúcares tanto hexosas como pentosas es prometedora para la producción de alcohol como fuente de energía alternativa, a partir de residuos lignocelulósicos agroindustriales.

15 ANTECEDENTES

La creciente búsqueda de fuentes alternativas de energía ha llevado al rápido desarrollo de la industria de los biocombustibles, no sólo por el problema del recurso limitado del combustible fósil, sino también por la preocupación por cuidar el medio ambiente. La producción de etanol mediante el uso de microorganismos, mejor conocido como "bioetanol", es un proceso ya bien descrito y ampliamente estudiado, el cual ha sido

planteado como una alternativa de fuente de energía. El uso del bioetanol y de los biocombustibles en general producidos a partir de recursos renovables podría ayudar a minimizar las emisiones de CO₂ producidas por la quema del combustible fósil, debido a que las plantas de las que son
5 obtenidos requieren del CO₂ para su crecimiento, y de esta forma ser una alternativa amigable contra el medio ambiente.

La producción mundial de bioetanol durante los 10 últimos años, supera los 70 billones de litros anuales, la cual es dominada por países como Estados Unidos y Brasil. El bioetanol producido es utilizado
10 mayoritariamente como una alternativa de biocombustible para los medios de transporte, en respuesta al aumento de los precios del combustible fósil. Sin embargo, las principales materias primas para la producción de este bioetanol, conocido como de primera generación, son el almidón proveniente del maíz y los jarabes de sacarosa provenientes
15 de la caña de azúcar. El uso de azúcares obtenidos a partir de esta biomasa para producir biocombustibles ha generado grandes críticas, ya que se hace uso de un alimento o de recursos de calidad alimentaria. En Estados Unidos la competencia por la disponibilidad de estos alimentos, se ha visto reflejada en la disminución de la disposición de estos recursos para
20 la producción de alcohol, lo que ha traído como consecuencia el retraso en el desarrollo de los mismos, así como la búsqueda de nuevas alternativas de materias primas para la producción de bioetanol que lo

hagan verdaderamente sustentable (Wiloso *et al.*, 2012. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:5295-5308).

La biomasa, conocida como la materia orgánica de origen biológico que incluye plantas, residuos de la agricultura, desechos del bosque, células microbianas y desechos municipales provenientes de fuentes biológicas, sin incluir los materiales fósiles, representa uno de los más abundantes y subutilizados recursos biológicos en el planeta, y se visualiza como una fuente prometedora para la obtención de materias primas para la generación de biocombustibles. Adicionalmente los residuos agroindustriales obtenidos a partir de procesamiento de los alimentos, también representan una gran fuente de biomasa, que por lo general son desechados al ambiente o utilizados en bajas cantidades para otros fines (Abdeshahian *et al.*, 2010. *Biotechnology* 9(3):274-282). La biomasa total producida anualmente en el mundo, es aproximadamente de 100 billones de toneladas de materia orgánica en base seca provenientes de tierra, y alrededor de 50 billones de toneladas de biomasa acuática. En México se generan aproximadamente 400 mil toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales anuales y sólo alrededor del 1.25 % de estos residuos es utilizada como alimento, energía y materia prima para procesos industriales, el resto es desechado y reciclado en el ecosistema. La biomasa de residuos forestales y de la agricultura, son una alternativa prometedora para la fermentación de los azúcares presentes en los mismos

con el fin de obtener biocombustibles tales como el bioetanol, el cual al ser producido a partir de biomasa es llamado de segunda generación. Estos residuos se han reconocido como una posible fuente de energía renovable sin causar presión por el uso de fuentes fermentables como el maíz y la sacarosa que son fuente de alimentación, además su utilización disminuye la generación de contaminación ocasionada por los mismos y se le da un valor agregado (Naik *et al.*, 2010. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:578-597).

Los residuos lignocelulósicos ocupan aproximadamente el 50% de toda la biomasa producida proveniente de tierra, representando un recurso renovable amplio. Están compuestos por tres principales biopolímeros denominados, celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales están unidos fuertemente por enlaces no covalente y enlaces covalentes cruzados, con un relativamente bajo contenido de monosacáridos, almidón, proteínas y aceites (Abdeshahian *et al.*, 2010. *Biotechnology* 9(3):274-282). Los residuos lignocelulósicos ofrecen el potencial para producir biocombustibles de segunda generación. Sin embargo hasta ahora los costos de producción de biocombustibles a partir de estas materias primas son todavía muy elevados. La razón está relacionada con las características de los desechos lignocelulósicos que requieren tecnologías de procesamiento avanzadas que incluyen pretratamientos; hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa presente, así como la co-

fermentación de los azúcares resultantes. Para favorecer la utilización de los residuos lignocelulósicos se requieren grandes esfuerzos para desarrollar nuevos sistemas en los que la producción, conversión y utilización de los productos sean eficiente (Fu *et al.*, 2013. *Enzyme and Microbial Technology*. 45:210-217; Boluda-Aguilar *et al.*, 2013. *Industrial Crops and Products*. 41:188-197).

La obtención de bioetanol de segunda generación, requiere del uso de procesos químicos o enzimáticos para la liberación de los azúcares presentes en las estructuras lignocelulósicas, tales como hexosas y pentosas, entre las principales hexosas se encuentran la *D*-glucosa, *D*-mannosa y *D*-galactosa, mientras que las pentosas principalmente encontradas son las (*D*-xylosa y *L*-arabinosa). (Fonseca *et al.*, 2007. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:303-310; Hickert, *et al.*, 2013. *Bioresource Technology* 131:508-514). El uso de eficientes pretratamientos de los desechos lignocelulósicos proporcionan rendimientos de más del 20% de pentosas, las cuales no pueden ser asimiladas por microorganismos comúnmente utilizados para la fermentación de azúcares y producción de alcohol, tal es el caso de las cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae*, el microorganismo más usado para la producción de etanol. Uno de los principales problemas para la rentabilidad de los procesos industriales de producción de bioteno a partir de biomasa lignocelulósica es la

necesidad de una conversión eficiente de las hexosas y pentosas a alcohol (Fonseca *et al.*, 2007. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:303-310).

La selección de un microorganismo para un proceso biotecnológico industrial, se determina principalmente por su potencial para producir eficientemente el producto de interés, además existe una preferencia por microorganismos que se encuentren bien caracterizados, genéticamente accesibles o que tenga el potencial de convertirse en plataformas de producción. La mayoría de los microorganismos usados en la industria para la producción de etanol tienen la ventaja de ser altos productores de alcohol, con alta tolerancia a inhibidores. Sin embargo, la mayoría de estos microorganismos no son capaces de asimilar a las pentosas provenientes de hidrolizados de biomasa como fuente de carbono. Por el contrario, existen microorganismos convertidores de pentosas que presentan baja tolerancia a inhibidores, además de que requieren una pequeña y bien controlada fuente de oxígeno para una máxima producción de alcohol, además de ser altamente sensibles al alcohol (Hickert, *et al.*, 2013. *Bioresource Technology* 131:508-514; Matsushika *et al.*, 2009 *Bioresource Technology* 100:2392-2398). En el caso de la producción de etanol de segunda generación, al tener materias primas tan complejas, los microorganismos a utilizar deben de estar bien adaptados al medio y ser capaces de asimilar todos los azúcares presentes en el mismo. Aunque existe un gran desarrollo en ingeniería genética y metabólica para la

adaptación de microorganismos productores de alcohol de primera generación para la producción de alcohol de segunda generación, hasta la fecha ha sido más eficiente cambiar la selección del microorganismo, buscando microorganismos por naturaleza ya adaptados a ciertos
5 sustratos (Rumbold *et al.*, 2009. *Microbial cell Factories*).

Las termitas junto con otros artrópodos comparten la habilidad inusual de crecer en materiales lignocelulósicos tales como en madera sana o en descomposición, en pasto, estiércol de animales así como en residuos vegetales y cartón. Las condiciones a las que éste tipo de artrópodos
10 proliferan son muy diversas en cuanto a humedad se refiere, existen más de 2600 especies descritas y ampliamente estudiadas en la naturaleza. El tracto intestinal de la termita es un microambiente axial bien estructurado con diferentes actividades metabólicas y comunidades microbianas. El estómago de termita generalmente se encuentra constituido por 3 partes
15 las cuales en conjunto son consideradas como un digestor anaeróbico bien estructurado. La principal función del estómago de la termita es depolimerizar la celulosa y hemicelulosa de los materiales lignocelulósicos de los que se alimentan, fermentando los carbohidratos resultantes a cadenas cortas de ácidos grasos que son absorbidos y asimilados por el
20 hospedero, esto mediante la microflora simbiótica presente en los sistemas. En éste sentido el estómago de termita se parece al rumen del ganado, caracterizado por concentraciones altas de ácidos grasos volátiles, la

presencia de bacteria fermentadoras y protozoarios. Los principales microorganismos encontrados en los sistemas se refieren a bacterias y levaduras aerotolerantes, algunos aerobios facultativos y aerobios estrictos (Brune, 1998. TIBTECH; Ni and Tokura, 2013. Biotechnology Advances).

5 La presencia de enzimas degradadoras de residuos lignocelulósicos, así como de los microorganismos previamente adaptados metabólicamente a sustratos específicos encontrados en sistemas tan organizados como el estómago de termita, representan una fuente alternativa para la búsqueda de microorganismos útiles en la producción
10 de etanol de segunda generación.

El género *Candida* comprende un grupo de levaduras de reproducción vegetativa, las células son globosas, elipsoidales y cilíndricas y ocasionalmente presentan forma ojival, triangular o semilunar. Son capaces de formar pseudohifas y no formar artroconidias, fisiológicamente
15 presentan la capacidad de fermentar azúcares, asimilar el nitrato y formar películas en medios líquidos, algunas especies pueden asimilar el inositol y no producen ureasa. En específico *Candida glabrata* se reproduce por gemación holobástica y la pared celular es de dos capas y crecen generalmente a 37°C (Kurtzman and Jack, 1998. Elsevier Science B.V.). Por
20 otro lado, diversas Levaduras del género *Candida* han sido utilizadas en fermentación de azúcares debido a la cercanía que presentan con la

levadura *Sacharomices cereviceae*. Existen reportes de cepas de *Candida* capaces de utilizar xilosa para crecer y producir alcohol, aunque han sido consideradas como microorganismos poco fermentativos y con baja tolerancia al alcohol, (Govindaswamy *et al.*, 2007, *Bioresource Technology* 5 98:677-685), también han sido empleadas para la producción de alcohol bajo condiciones aerobias y la producción de etanol y xilitol en mezcla de azúcares conteniendo glucosa, xilosa, galactosa y arabinosa, tal es el caso de la cepa *Candida tropicalis* ATCC 13803, además existen reportes en donde muestran ser capaces de crecer bajo condiciones anaeróbicas y 10 producir alcohol con resultados similares a los obtenidos por *S. cereviseae*. En estudios centrados en microorganismos naturalmente fermentadores de pentosas, algunas levaduras del género *Candida* han presentado los mejores resultados en términos de rendimiento y productividad. Específicamente existen reportes en los que mencionan la utilización de 15 *Candida glabrata* para la producción de alcohol a partir de paja de arroz pretratada, sin embargo el microorganismo ha sido modificado genéticamente para la expresión de enzimas que favorezcan la hidrólisis del sustrato (Wang *et al.*, 2013. *Journal of Bioscience and Bioengineering*). Adicionalmente, existen autores que reportan la utilización de cepas de 20 *Candida* como *C. tropicalis* que ha sido aplicada en la fermentación de algunos materiales agroindustriales como el almidón en combinación con otros microorganismos fermentadores de hexosas para obtener elevados

rendimientos de etanol (Watanabe *et al.*, 2008 *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1117-1122; Oberoi *et al.*, 2010 *Process Biochemistry* 45:1299-1306).

Con base a lo descrito, en la presente invención se ha detectado una cepa nativa de *Candida glabrata* con número de registro NRRL Y-50877
5 aislada de estómago de termita, capaz de asimilar hexosas y pentosas para la producción de alcohol como principal producto de fermentación, esta cepa es capaz de asimilar individualmente azúcares tanto hexosas como pentosas, y la mezcla de ellas.

En el estado de la técnica no se encontraron documentos que
10 mencionen específicamente a la cepa *Candida glabrata* aislada del estómago de termita descrita en la presente solicitud, considerando que la capacidad de asimilación de azúcares para la producción de alcohol, debido a la fuente de donde fue aislada, es diferente al de otras cepas de *Candida glabrata* mencionados en el estado de la técnica, información
15 que se evidenciará en las tablas y figuras que se mostrarán posteriormente.

Dentro de las patentes publicadas y solicitudes de patentes registradas existen algunas que mencionan el uso de microorganismos para producción de alcohol a partir de mezclas de azúcares, así como el uso de la cepa *Candida glabrata* para la producción de metabolitos, sin
20 embargo no afectan la novedad o actividad inventiva de la presente solicitud, ya que los microorganismos descritos son distintos a la cepa que

se protege en esta solicitud o son utilizados para la generación de metabolitos distintos a los que se mencionan en el presente documento, a continuación se mencionan las más relevantes.

La solicitud de patente europea EP2518167A1 describe el uso de bacterias anaeróbicas extremo termofílicas para la producción de etanol como principal producto de fermentación, de interés prometedor para la producción sustentable de bioetanol de segunda generación. A pesar de que la patente describe la capacidad del microorganismo de asimilar tanto hexosas como pentosas en mezcla para la producción de etanol, el microorganismo utilizado es una bacteria que difiere claramente de la levadura que se describe en el presente documento.

La patente de los Estados Unidos 8,3946,22B2, protege el uso de cepas de levaduras que incrementan la producción de etanol, protegiendo el uso de levaduras del género *Sacharomices cerevisae* productoras de mayores rendimientos de alcohol y tolerantes a temperaturas superiores a las utilizadas comercialmente para la fermentación de glucosa y producción de alcohol. Este microorganismo y su utilización son claramente diferentes al que se busca patentar, ya que manejan un microorganismo que ha sido genéticamente modificado. En su mayoría las patentes o registros relacionados con la producción de alcohol a partir de mezclas de azúcares que pueden encontrarse en desechos

agroindustriales, protegen el uso de microorganismos genéticamente modificados como la WO2010057064A2, o tratamientos y procesos que modifiquen los sustratos a utilizar.

De acuerdo a los antecedentes de la invención, el problema técnico que se resuelve es la descripción y uso de una cepa novedosa de *Candida glabrata* capaz de asimilar diferentes fuentes de carbono individuales o en mezcla tales como: glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, xilosa y arabinosa que son los principales azúcares obtenidos a partir de la hidrólisis de residuos lignocelulósicos para la producción de etanol y que comúnmente no son asimilables en mezcla por otros microorganismos ya utilizados industrialmente. Además han sido evaluados en las proporciones que los azúcares podrían encontrarse en desechos de la industria citrícola. Lo que hace que la presente invención sea novedosa, con actividad inventiva y con una aplicación industrial específica en la producción de etanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos hidrolizados. Así como en la industria de la fabricación de alcohol a partir de diferentes fuentes de carbono. Adicionalmente es capaz de tolerar altas concentraciones de azúcares, no es inhibida por la presencia de alcohol y es capaz de crecer en un medio mínimo de sales, lo que hace aún más ventajoso su uso industrial por no requerir la adición de vitaminas o algún otro compuesto que pudiera encarecer el proceso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los detalles característicos del uso de la cepa *Candida glabrata* para la asimilación de mezclas de azúcares para la producción de alcohol como principal producto de fermentación, se muestran claramente en las
5 siguientes figuras y descripción:

Figura 1. *Candida glabrata* cepa T1, A) Cultivo puro crecido en medio sólido de YPD después de 24h de incubación a 35°C; se observan colonias de forma circular, con una elevación convexa y de borde liso, la colonia presenta un tono opaco. B) Imagen al microscopio con aumento de 40x
10 que muestra células medianas y de circunferencia redonda.

Figura 2. Porcentaje del consumo de *Candida glabrata* T1 de cada una de las hexosas presentes en la mezcla de azúcares a concentraciones reportadas y alcanzadas en hidrolizados obtenidos a partir de residuos lignocelulósicos de la industria citrícola, determinados mediante HPLC
15 durante 10 días de fermentación en medio mínimo de sales.

Figura 3. Porcentaje del consumo de *Candida glabrata* T1 cada una de las pentosas presentes en la mezcla de azúcares a concentraciones reportadas y alcanzadas en hidrolizados obtenidos a partir de residuos lignocelulósicos de la industria citrícola, determinados mediante HPLC
20 durante 10 días de fermentación en medio mínimo de sales.

Figura 4. Contenido de etanol producido por *Candida glabrata* T1 y expresado en g/L en el medio adicionado con la mezcla de azúcares, así como el crecimiento de *Candida glabrata* T1 expresado como peso seco (g/L) producido en el medio adicionado con la mezcla de azúcares a 5 concentraciones reportadas y alcanzadas en hidrolizados obtenidos a partir de residuos lignocelulósicos de la industria citrícola.

Figura 5. Muestra la producción de alcohol y los rendimientos Producto/Sustrato en medio YPD a diferentes temperaturas de crecimiento de *Candida glabrata* T1 después de 2 días de fermentación.

10 **Figura 6.** Muestra la producción de alcohol y los rendimientos Producto/Sustrato en medio YPD a diferentes rpm de agitación durante el crecimiento de *Candida glabrata* T1 después de 2 días de fermentación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una cepa nativa de *Candida* 15 *glabrata* con número de acceso de NRRL Y-50877, la cual se obtiene del estómago de termita y es capaz de asimilar mezclas de azúcares conteniendo hexosas y pentosas para producir alcohol como principal producto de fermentación. Seleccionada como la mejor asimiladora de hexosas y pentosas a partir de varias cepas aisladas del mismo estómago 20 de termita.

En otro aspecto de la presente solicitud, la cepa que se reclama es capaz de crecer y producir alcohol a diferentes condiciones de temperatura, pH y agitación, en medio de extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa (YPD). La cepa acorde a la invención tiene el potencial de crecer a concentraciones elevadas de mezcla de azúcares y co-fermentar hexosas y pentosas, además de crecer y producir alcohol en medio mínimo de sales en ausencia de vitaminas, peptona o extracto de levaduras, lo que lo hace un buen candidato para ser utilizado en la producción de bioetanol de segunda generación donde la fermentación puede llevarse a cabo sin la adición de suplementos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un aspecto de la invención la cepa T1, aislada del intestino de termita, es capaz de asimilar mezclas de azúcares para la producción de alcohol como producto principal de la fermentación. Dicha cepa ha sido depositada bajo los términos del Tratado de Budapest, en el Agricultural Research Service Culture Collection (ARS Patent Culture Collection, 1815 North University St, Peoria, IL, 61604, Estados Unidos de Norteamérica). El número de acceso asignado a esta cepa es NRRL Y-50877

El aislamiento de la cepa *Candida glabrata* capaz de asimilar mezclas de azúcares (hexosas y pentosas) para la producción de alcohol, se llevó a cabo a partir de los intestinos de termitas de una proliferación

natural en donde se alimentaban con cajas de cartón. El proceso de aislamiento comprende 3 etapas que se enlistan a continuación:

- a. Obtención de los microorganismos presentes en el intestino de termita, el cual se lleva a cabo mediante disección empleando un estereoscopio con aumento óptico 10X y una aguja de disección, una vez obtenido el intestino de termita se procede al lavado del mismo en un buffer de fosfatos a pH 7, posteriormente se disgregan por maceración en mortero estéril para obtener los microorganismos.
- b. Aislamiento de los microorganismos, el cual se lleva a cabo mediante la preparación de diferentes diluciones a partir de la muestra de microorganismos obtenida en el inciso anterior, la siembra de las mismas se realiza en placas de agar que conteniendo carboximetil celulosa al 0.1% y rojo congo como indicador, posteriormente son incubadas a condiciones aeróbicas. Las colonias que se seleccionan y purifican son aquellas en las que se observan zonas libres de coloración, purificándolas por resiembra en estría, una vez aisladas se confirma la capacidad celulolítica mediante la decoloración del rojo congo en las placas de agar.
- c. Posteriormente se realiza una selección más específica de los microorganismos aislados, mediante la siembra de los mismos en medio mínimo de sales suplementado con celobiosa, carboximetilcelulosa o

xilosa al 0.1% e incubadas a 150rpm durante 48h, para crecer los aislados a condiciones aeróbicas. Después de que el crecimiento celular alcanza la fase estacionaria, el caldo de cultivo es centrifugado a 6000g durante 20 min y las células son re suspendidas en solución amortiguadora de fosfato de sodio (pH7,0) para pasos posteriores de selección.

d. Posteriormente se realiza una selección más específica de los microorganismos que son obtenidos en la etapa precedente, utilizando medios con diferentes fuentes de carbono, las cuales incluyen hexosas y pentosas tales como: glucosa, galactosa, fructosa, sacarosa, arabinosa, xilosa. Se verifica la asimilación de los diferentes azúcares de manera individual, para por último evaluar los microorganismos que además de asimilar los diferentes azúcares, también producen alcohol.

Purificación del DNA y amplificación por PCR para identificación molecular de la cepa T1 NRRL Y-50877

La identificación molecular de la levadura T1 se realizó mediante el análisis de la secuencia parcial del gen ribosomal 16S. La obtención del DNA genómico usado como templado para la reacción de PCR se realizó a partir de un cultivo fresco mediante técnicas estándares, pero incorporando en la extracción 0.5% de microperlas de vidrio (106 μ m) y realizando agitaciones con vortex tres veces en periodos de 1 minuto en cada uno. El PCR para amplificar el fragmento se realizó en un volumen

final de 50 μ l que contiene 1X del buffer de reacción, $MgCl_2$ a 2 mM, dNTP cada uno a 0.2 mM, 2 ng de DNA cromosomal, 0.4 μ M de cada oligonucleótido y 2 unidades de la enzima Taq DNA polymerase. El PCR se realizó bajo las condiciones previamente reportadas por Weisburg y otros

5 (1991. J. Bacteriol. 173:697-703) empleando los oligonucleótidos fD1 y rD1. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pCR2.1 (TA Cloning kit, Invitrogen) para ser secuenciados y la secuencia obtenida es la señalada en la SEQ ID No. 1. La metodología que se seleccionó para la identificación molecular de la cepa, es una metodología que amplifica

10 una región del ADN ribosomal y que se considera una región muy conservada entre especies por ello la amplificación y secuenciación de estos ITS son una herramienta de gran utilidad para la identificación de cepas de (microorganismos eucariotas) levaduras y hongos, sin embargo no significa que las dos cepas de una misma especie sean o tengan un

15 comportamiento similar, ya que esta sección del ADN que se amplifica no corresponde a ninguna enzima específica del metabolismo.

La secuencia SEQ ID No. 1 tiene una similitud de 99% con secuencias reportadas de la región 5.8 ARNr de *Candida glabrata*.

Depósito de la cepa:

Se depositó la cepa de la especie *Candida* T1 de acuerdo a lo siguiente:

La cepa de *Candida* ha sido depositada bajo los términos del
5 Tratado de Budapest, en el Agricultural Research Service Culture Collection
(ARS Patent Culture Collection, 1815 North University St, Peoria, IL, 61604, Estados
Unidos de Norteamérica). El número de acceso NRRL Y-50877 se asignó
después de la verificación de la viabilidad de la cepa, y se han pagado los
impuestos de requisición. El acceso a dicha cepa será posible durante el
10 trámite de la solicitud de patente. Todas las restricciones sobre la
disponibilidad de dicha cepa al público se removerán irrevocablemente
una vez que se acepte la patente basándose en la solicitud. Además, el
depósito designado se mantendrá por un periodo de treinta (30) años
desde la fecha de depósito, o cinco (5) años después de la última
15 requisición para el depósito, o para la vida de cumplimiento de la patente
mexicana, cuan larga sea. Si la cepa se vuelve no viable o
inadvertidamente es destruida, será reemplazada con una cepa viable. En
la tabla 1 se presenta la descripción morfológica de la cepa *Candida*
glabrata (T1) con número de acceso de NRRL Y-50877

Tabla 1. Descripción morfológica.

	T1 NRRL Y-50877
TINCIÓN (CULTIVO FRESCO)	Azul de bromo fenol
	+
FORMA	levadura
AGRUPACIÓN	Hifa
CRECIMIENTO AEROBIO	+
ESPORAS	-
MOVILIDAD	-
CATALASA	+

Proceso de asimilación de mezcla de azúcares para la producción de alcohol.

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona una cepa de *Candida glabrata* (NRRL Y-50877) capaz de metabolizar azúcares de 6 carbonos (hexosas) como de 5 carbonos (pentosas), tal como se muestran en la figura 2 y 3, en donde se puede apreciar el consumo de cada uno de los azúcares presentes en la mezcla obtenidos mediante el uso de un equipo de
- 10 cromatografía equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, un autoinyector termostatado, un horno de columna y un detector de índice de refracción. La columna utilizada para la cuantificación de intercambio iónico de 300 x 4.6 mm de dimensiones y diámetro de

partícula de relleno 5 μm . El tratamiento de datos de los cromatogramas se realizó con un sistema informático. Todas las medidas indicadas se realizaron sobre muestras del mismo volumen, obtenidas durante el curso de la fermentación, las cuales fueron previamente filtradas con filtros de
5 celulosa de 0.22 micras. Inyectando 5 μl de muestra y eluyendo con agua grado HPLC.

En otro aspecto, la invención comprende un método para la asimilación de azúcares de 6 carbonos (hexosas) y 5 carbonos (pentosas) que comprende:

- 10 a. Preparación de medios de cultivo adicionados con azúcares de 6 y 5 carbonos tales como: glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, xilosa y arabinosa, individualmente en medio YPD a concentración de 70 g/L de cada azúcar y en mezcla a concentraciones de 200 g/L en medio mínimo de sales, el cual se describe en la tabla 2. El pH es
15 ajustado en cualquiera de los dos casos a 4.5.
- b. Adición de la cepa *Candida glabrata* (NRRL Y-50877) capaz de
asimilar y utilizar los azúcares (hexosas y pentosas) adicionados en los medios de manera individual o en mezcla, como fuente de carbono para el crecimiento de la cepa a temperatura de 35°C.

20

Tabla 2. Contenido del medio mínimo de sales

Compuesto	Contenido g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12.7
NH_4PO_3	2.4
MgSO_4	0.75
KCl	2.3
CaCl_2	0.25
Azúcares totales	200
Glucosa	51% (w/v)
Fructosa	30% (w/v)
Galactosa	8 % (w/v)
Arabinosa	7 % (w/v)
Sacarosa y Xilosa	2% (w/v)

Lo anterior se puede corroborar en las figuras 2 y 3, donde se observa el consumo de los azúcares en el medio adicionado con la mezcla de azúcares a las concentraciones descritas en la tabla 2. En la tabla 3 se muestra el porcentaje de consumo de cada azúcar presente y las velocidades de consumo del mismo, indicando que no existen diferencias significativas en las velocidades de consumo de los sustratos asimilados.

Los porcentajes de los sustratos se encuentran a las concentraciones reportadas y obtenidas a partir de la hidrólisis de residuos lignocelulósicos provenientes de la industria citrícola. Los valores de pH obtenidos durante la asimilación de los azúcares disminuyen de 4.5 que es el valor inicial al que es ajustado el medio hasta 2.2, valor que puede ser obtenido después del tercer día de asimilación y el cual no afecta el desarrollo de *Candida glabrata*.

Tabla 3. Consumo de azúcares (pentosas y hexosas) presentes en la mezcla de azúcares a concentraciones reportadas y alcanzadas en hidrolizados obtenidos a partir de residuos lignocelulósicos de la industria citrícola, asimilados por *Candida glabrata* T1 en medio mínimo de sales.

Azúcar	[azúcar en el medio] (%)	<i>Candida glabrata</i> (T1)	
		Consumo de azúcar después de 10.5 días de fermentación (%)	Velocidad de consumo de sustrato total (μ_s)* (g.h ⁻¹)
Glucosa	51	65.0±0.31 ^c	0.022 ^{a,b}
Fructosa	30	48.5±0.78 ^e	0.031 ^a
Galactosa	8	78.9±0.12 ^b	0.019 ^b
Sacarosa	2	82.7±0.05 ^a	0.019 ^b
Arabinosa	7	52.1±0.33 ^d	0.014 ^b
Xilosa	2	47.5±0.22 ^e	0.013 ^b

5 *Determinado por los ajustes del modelo de Gompertz ($r^2 > 0.95$) azúcar consumido en el curso del tiempo, SD de la μ_s fue <20% a partir de dos experimentos independientes. Los valores en una columna con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ determinados por múltiples comparaciones de medias por Tukey Kramer's test.

10 La invención también comprende el método para la producción de alcohol, que comprende:

a. Preparación de una mezcla de diferentes azúcares que contiene hexosas, pentosas tales como: glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, sacarosa xilosa y arabinosa en las proporciones descritas en la tabla 2, dichos valores han sido encontrados en hidrolizados provenientes de
 15 residuos lignocelulósicos de la industria citrícola como el caso de cáscaras de cítricos, los cuales se encuentran para cada azúcar entre

los siguientes valores: glucosa (50-51 %), fructosa (28-30 %), galactosa (9-16 %), arabinosa (7-8 %), xilosa (2-4 %), sacarosa (1-2 %). Estos valores se basan en lo reportado por autores como Wilkins et al., 2005 y Boluda-Aguilar et al., 2013. La concentración total de los azúcares en el medio puede variar de 20g/L a 220 g/L y el pH es ajustado a 4.5.

b. Utilización de la mezcla como fuente de carbono, a partir de la cual la cepa de *Candida glabrata* T1 (NRRL Y-50877) en presencia de un medio mínimo de sales que se describe en la tabla 3, y a temperatura de 35°C sin agitación por 11 días crece. Adicionalmente el pH es ajustado a 4.5 para favorecer el crecimiento de *Candida glabrata*.

c. Fermentación de los azúcares presentes en el medio por la cepa de *Candida glabrata* T1 (NRRL Y-50877) para la producción de alcohol, como se observa en la figura 4 donde se presentan el contenido de alcohol en g/L durante el tiempo de fermentación evaluado. La fermentación requerida para la producción de alcohol se puede mantener hasta alcanzar rendimientos específicos de alcohol, la fermentación se puede llevar a cabo a periodos extendidos de un día a 11 días a temperaturas de 30 a 50 °C a un pH inicial de 4.5. Los rendimientos de etanol en función del sustrato así como la velocidad de producción y productividad del mismo se presentan en la tabla 4.

Los valores de pH inicialmente son ajustados a 4.5, sin embargo durante la fermentación varían hasta valores de 2.2, los cuales no afectan el crecimiento de *Candida glabrata*, tampoco la producción de alcohol, lo que proporciona una ventaja sobre otros procesos que se ven afectados por el pH.

Tabla 4. Parámetros de producción de alcohol

Parámetro	Valor
Consumo de sustrato total en 10.5 días	60.3 ± 4.4 %
Etanol (g/L)	28.9 ± 1.3
Rendimiento producto/sustrato	0.26 ± 0.01
Velocidad de producción de etanol (g/h)	0.040 ± 0.006
Consumo de sustrato al día que se obtuvo máxima producción de etanol	58.1 ± 0.7
Productividad (g/L.d)	3.9 ± 0.17

La invención también se refiere al crecimiento de la levadura en co-cultivo con alguna otra levadura que potencialice la producción de alcohol, como se muestra en la tabla 5, en la que se adiciona otra cepa del género *Candida* para incrementar la asimilación de azúcares y producción de etanol a diferentes concentraciones de células.

La preparación de los medios de cultivo conteniendo mezclas de azúcares de 6 y 5 carbonos de los procesos de asimilación de azúcares y producción de alcohol, pueden obtenerse a partir de procesos de hidrólisis de residuos

lignocelulósicos, tal como se muestra en la figura 7 en donde se presenta la asimilación de los azúcares presentes a concentración de 26 g/L a pH inicial de 6 el cual se incrementó hasta 7 para posteriormente descender sin afectar la asimilación de azúcares. De igual forma se presenta la producción de alcohol en el sistema a partir de residuos hidrolizados de la industria citrícola en combinación con otra levadura del género *Candida*. Adicionalmente en la tabla 5 se muestran algunos de los parámetros cinéticos de la producción de alcohol obtenidos durante la fermentación de los hidrolizados cítricos.

10

Tabla 5. *Candida glabrata* con mezcla de otra cepa del género *Candida* para incrementar producción de alcohol

Azúcar	[azúcar en el medio] (%)	Mezcla 1 (60% otra cepa; 40% <i>Candida glabrata</i> T1)		Mezcla 2 (20% otra cepa; 80% <i>Candida glabrata</i> T1)	
		Consumo después de 10.5 días (%)	Vel. de consumo (μ_s)* (g.h ⁻¹)	Consumo después de 10.5 días (%)	Vel. de consumo (μ_s)* (g.h ⁻¹)
Glucosa	51	82.3±0.36 ^a	0.020 ^{b,c}	77.4±0.95 ^c	0.020 ^{b,c}
Fructosa	30	62.8±2.78 ^c	0.042 ^{a,b}	68.2±0.12 ^d	0.042 ^{a,b}
Galactosa	8	86.0±0.50 ^a	0.017 ^{b,c}	83.9±0.46 ^b	0.017 ^{b,c}
Sacarosa	2	74.1±0.02 ^b	0.023 ^b	92.1±0.10 ^a	0.023 ^b
Arabinosa	7	51.6±0.88 ^d	0.021 ^{b,c}	58.3±0.15 ^e	0.021 ^{b,c}
Xilosa	2	44.9±0.52 ^e	0.012 ^c	47.4±0.15 ^f	0.012 ^c

*Determinado por los ajustes del modelo de Gompertz ($r^2 > 0.95$) azúcar consumido en el curso del tiempo, SD de la μ_s fue <20% a partir de dos experimentos independientes. Los valores en una columna con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ de terminados por múltiples comparaciones de medias por Tukey Kramer's test.

15

Patentes relacionadas.

EP2518167A1 Bacteria for second generation bioethanol production

US8394622 Yeast strains for improved ethanol production

- 5 WO2010057064A2 Fermentative production of ethanol from glucose, galactose and arabinose employing a recombinant yeast strain.

Otras publicaciones.

- 10 - Abdeshahian, P., Dashti, M. G., Kalil, M.S. Yusoff, W. M. W. 2010. Production of Biofuel using Biomass as a sustainable biological resource. *Biotechnology* 9(3):274-282.
- Boluda-Aguilar, M., López-Gómez, A., 2013. Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limón* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*. 41, 188-197.
- 15 - Brune, A. 1998. Termite guts: the world's smallest bioreactors. *TIBTECH* January (16):16-21.
- Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Hahn-Hägerdal, B., 2007. L-Arabinose metabolism in *Candida arabinofermentans* PYCC 5603t and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product
20 formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 303-310.
- Fu, N., Peiris, P., Markham, J., Bavor, J., A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol

production on glucose/xylose mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*. 45, 210-217.

- Govindaswamy, S., Vane, L. M., 2007. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresour. Technol.* 98, 677-685.
- 5 - Hickert, L. R., Da Cunha-Pereira, F., De Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A., Záchia, M. A., 2013. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysates. *Bioresour. Technol.* 131, 508-514.
- 10 - Kurtzman Cletus and Jack W. Fell. El Sevier B.V. 1998. *The Yeasts (Fourth Edition) A Taxonomic Study*. ISBN: 978-0-444-81312-1
- Matsushika, A., Inoue, H., Murakami, K., Takimura, O., Sawayama, S., 2009. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 100, 2392-2398.
- 15 - Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., Dalai, A. K. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:578-597
- 20 - Ni, J. Tokuda G. 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnology Advances*. (31):838-850.

- Oberoi, H. S., Vadlani, P. V., Brijwani, K., Bhargav, V. K., Patil, R. T.,
2010. Enhanced ethanol production via fermentation of rice Straw
with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803.
ProcessBiochemistry. 45, 1299-1306.
- 5 - Rumbold, K., Buijsen, H. J. V., Overkamp, K. M., Groenestijn, J. W. V.,
Punt, P. J., Werf, M. J. V. 2009. Microbial production host selection for
converting second-generation feedstocks into bioproducts. *Microbial
cell Factories*. 8(64):1-11.
- Watanabe, I., Nakamura, T., Shima, J., 2008. A strategy to prevent the
10 occurrence of lactobacillus strains using lactate-tolerant yeast
Candida glabrata in bioethanol production. *J. Ind. Microbiol.
Biotechnol.* 35, 1117-1122.
- Wang, X., Ike, M., Shiroma, R., Tokuyasu, K., Sakakibara, Y. 2013.
Expression of neutral b-glucosidase from *Scytalidium thermophilum* in
15 *Candida glabrata* for ethanol production from alkaline-pretreated rice
Straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*
[dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.03.007](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.03.007).
- Wiloso, E. I., Heijungs, R., Snoo, G. R. 2012. LCA of second generation
bioethanol: A review and some issues to be resolved for good LCA
20 practice. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:5295-5308

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito lo suficiente la invención como antecede, se considera de nuestra exclusiva propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

- 5 1. Un método para la producción de alcohol como producto principal de la fermentación, mediante la utilización de una cepa de *Candida glabrata* capaz de asimilar mezclas de azúcares, caracterizado porque comprende:
 - a. proporcionar las condiciones para la asimilación de azúcares por una
10 cepa de *Candida glabrata* (NRRL Y-50877) de acuerdo a los pasos siguientes:
 - i. preparar el medio de cultivo adicionado con azúcares de 6 y 5 carbonos; y
 - 15 ii. adicionar la cepa *Candida glabrata* (NRRL Y-50877), manteniéndola en cultivo a temperatura de entre 35°C, y pH ajustado a 4.5;
 - b. llevar a cabo la fermentación de los azúcares con la cepa *Candida glabrata* (NRRL Y-50877) para la producción de alcohol de acuerdo a los pasos de:
 - 20 i. preparar una mezcla de diferentes azúcares;
 - ii. mantener el cultivo de *Candida glabrata* (NRRL Y-50877) en un medio mínimo de sales en presencia de la mezcla de azúcares del paso previo, de manera que la cepa utilice dicha mezcla de azúcares como fuente de carbono; y
 - 25 iii. llevar a cabo la fermentación de los azúcares con la cepa *Candida glabrata* (NRRL Y-50877) para la producción de alcohol, durante un

período de 1 a 11 días, a una temperatura de entre 30 y 50°C sin agitación, y a un pH inicial de 4.5.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en (a-i), los azúcares de 6 y 5 carbonos comprenden: glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, xilosa y arabinosa, ya sea individualmente o en mezcla.
3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque los azúcares se obtienen a partir de hidrolizados de residuos lignocelulósicos.
4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque los residuos lignocelulósicos son subproductos cítricos.
5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque los subproductos cítricos comprenden cáscaras, semillas y bagazos de limón, naranja o toronja.
6. El método de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque en (a-i), los azúcares son azúcares individualmente presentes en medio YPD en una concentración de 70 g/L.
7. El método de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque en (a-i), los azúcares son mezclas de azúcares en una concentración total de entre 20 y 220 g/L en medio mínimo de sales.
8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el medio mínimo de sales comprende: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en una concentración de 12.7 g/L; NH_4PO_3 en una concentración de 2.4 g/L; MgSO_4 en una concentración de 0.75 g/L; KCl en una concentración de 2.3 g/L; CaCl_2 en una concentración de 0.25 g/L.

9. EL método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los azúcares en (b-i), comprenden: glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, xilosa y arabinosa.
10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque
5 los azúcares se obtienen a partir de hidrolizados de residuos lignocelulósicos.
11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque los residuos lignocelulósicos son subproductos cítricos.
12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado
10 porque los subproductos cítricos comprenden cáscaras, semillas y bagazos de limón, naranja o toronja.
13. El método de conformidad con alguna de las reivindicaciones 1 – 12, en donde el alcohol producido por la fermentación de los azúcares es etanol.
- 15 14. El método de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque la velocidad de producción de etanol es de 0.040 ± 0.006 g/L.

20

25

RESUMEN

La presente invención describe y reclama una cepa de *Candida glabrata*, aislada del estómago de termina con No. De Acceso NRRL Y-50877 para la
5 producción de alcohol a partir de mezclas de azúcares que incluyen glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, xilosa y arabinosa en un medio mínimo de sales.

10

15

20

Figura 1.

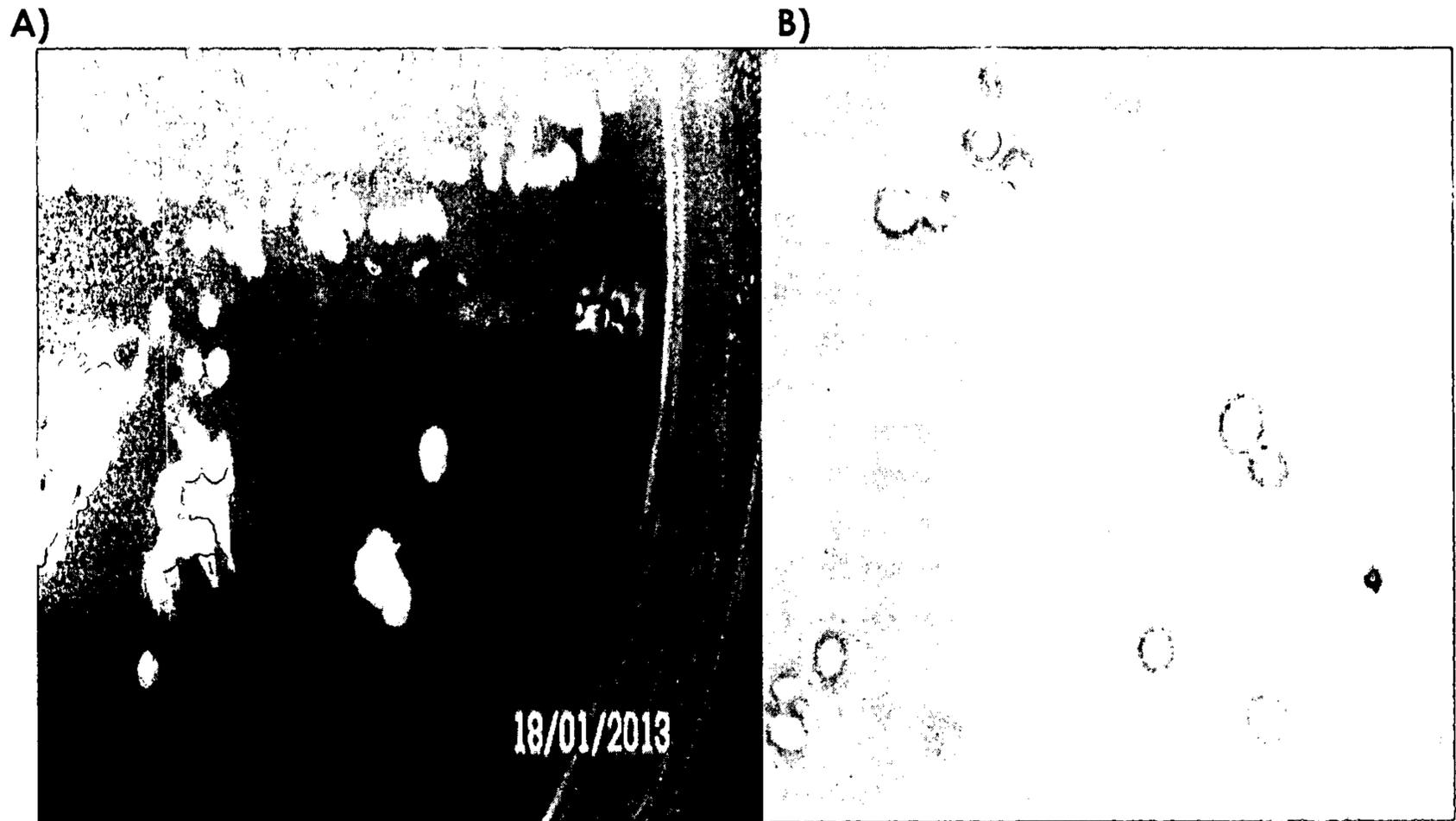


Figura 2.

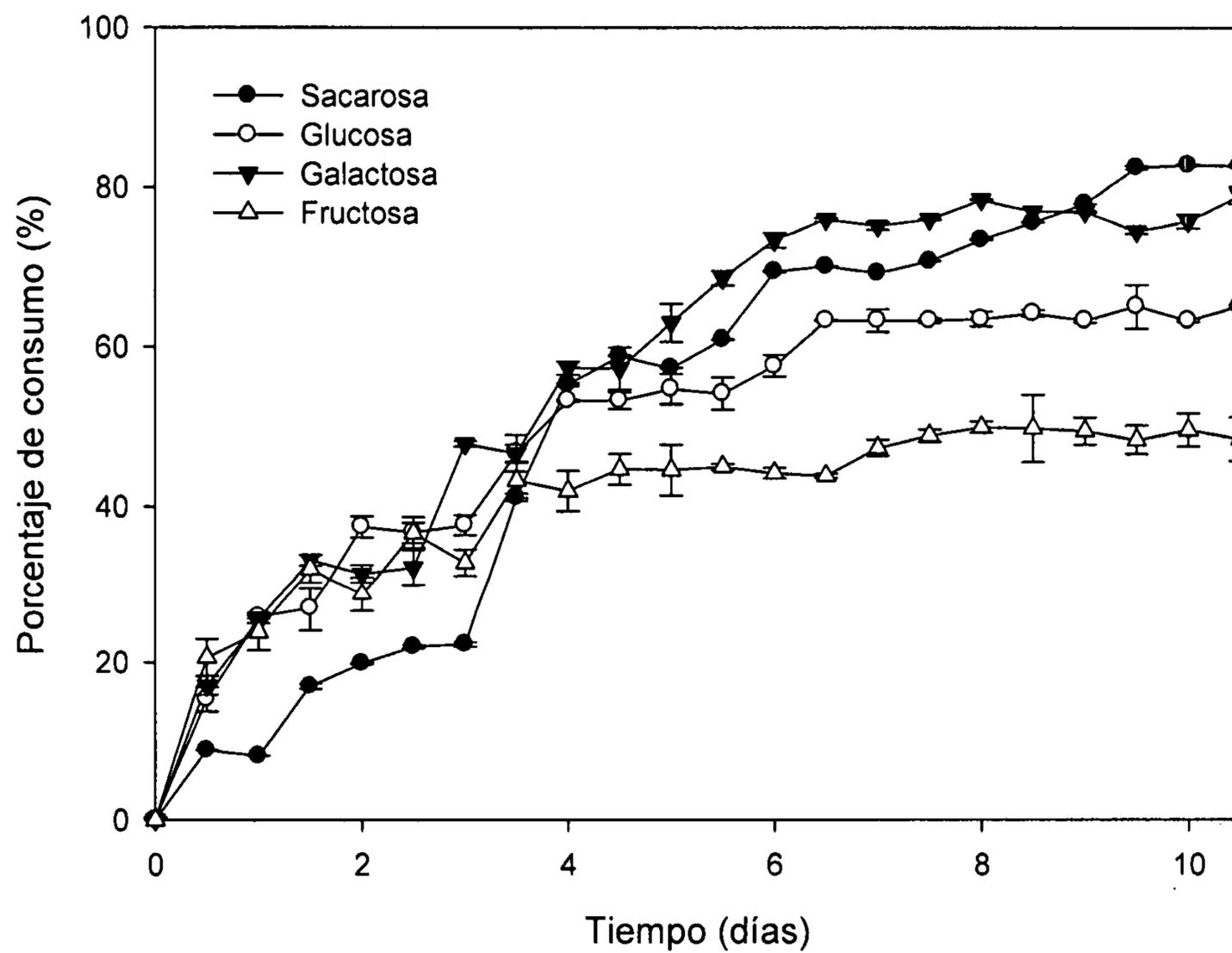


Figura 3.

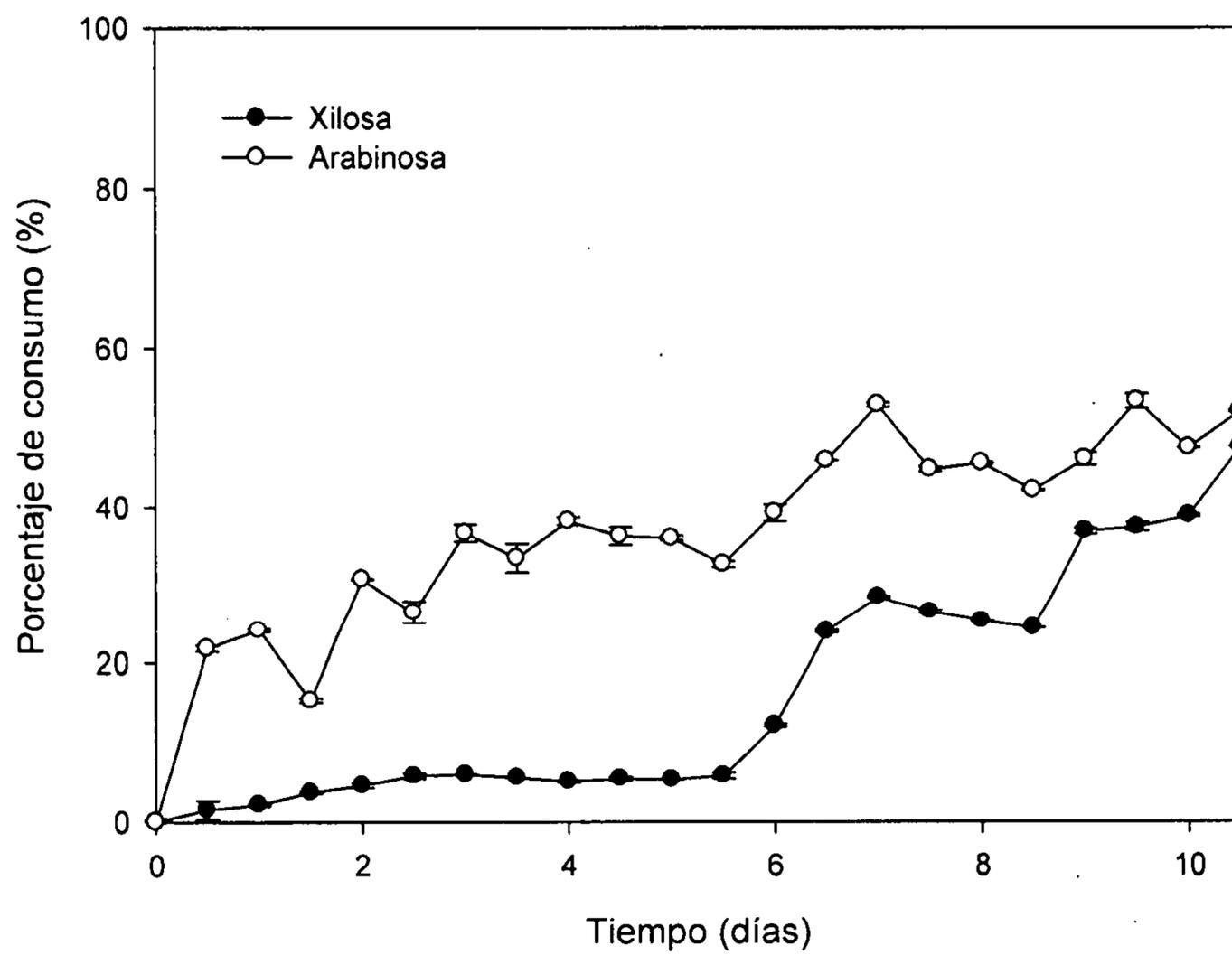


Figura 4.

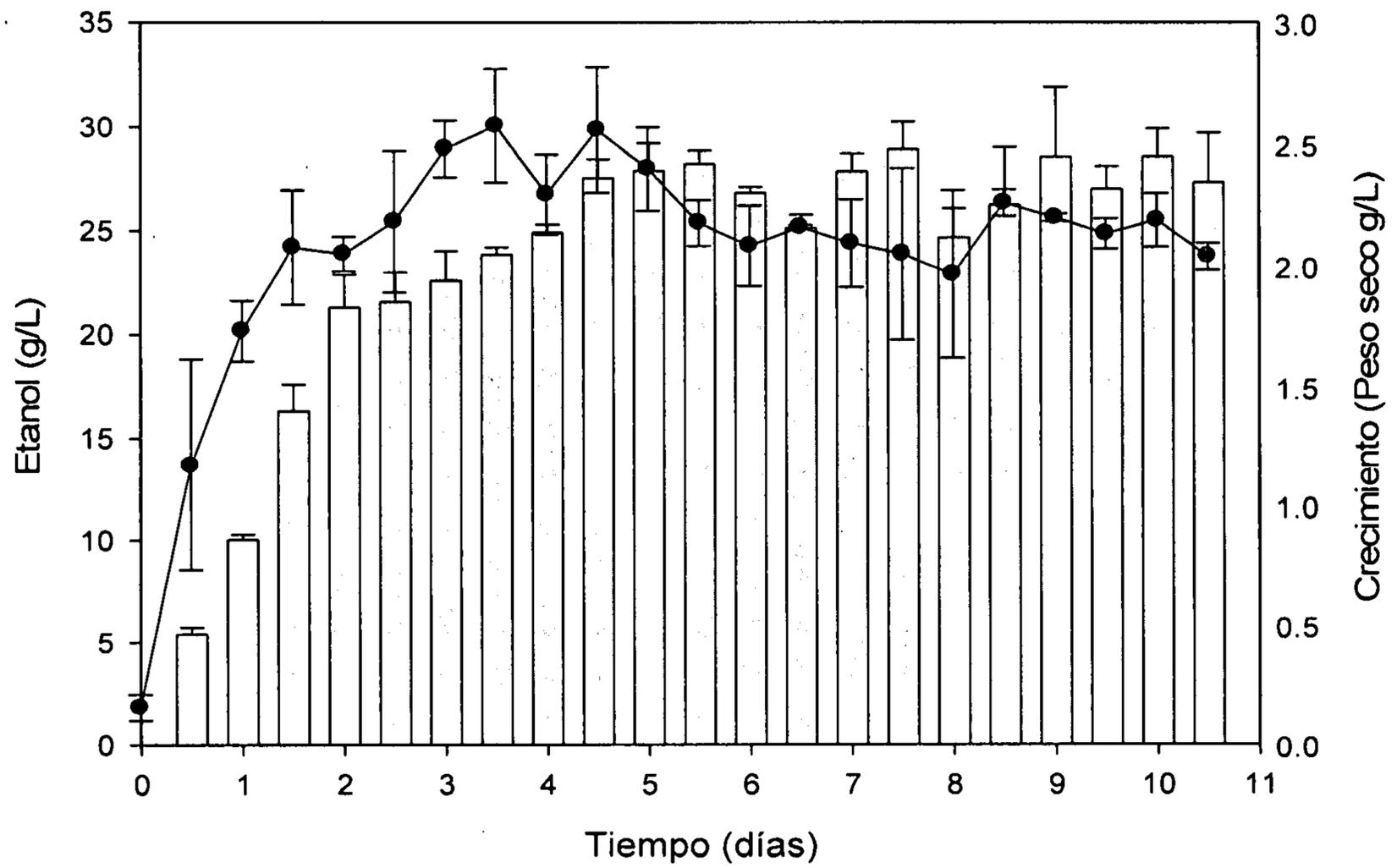


Figura 5.

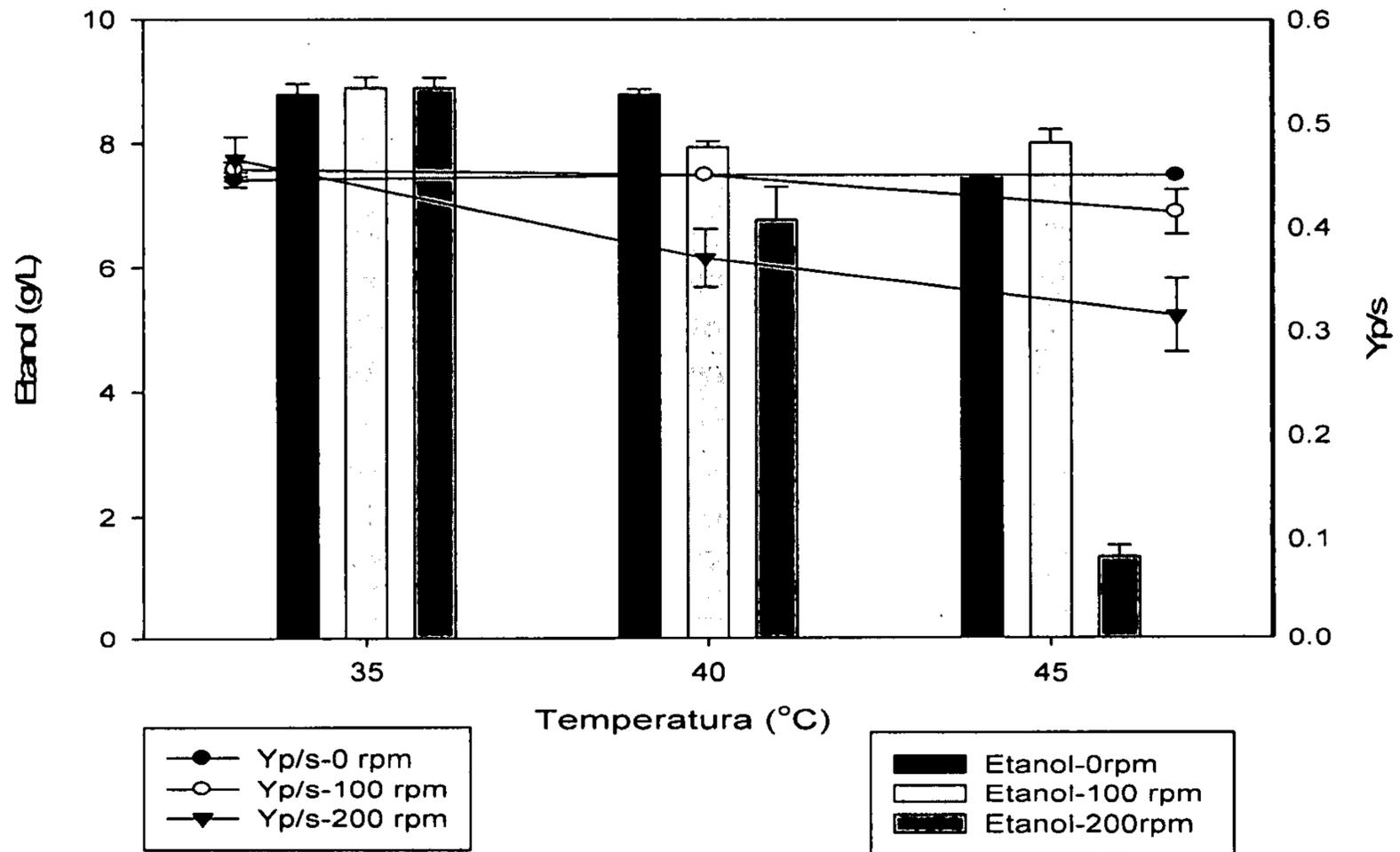


Figura 6.

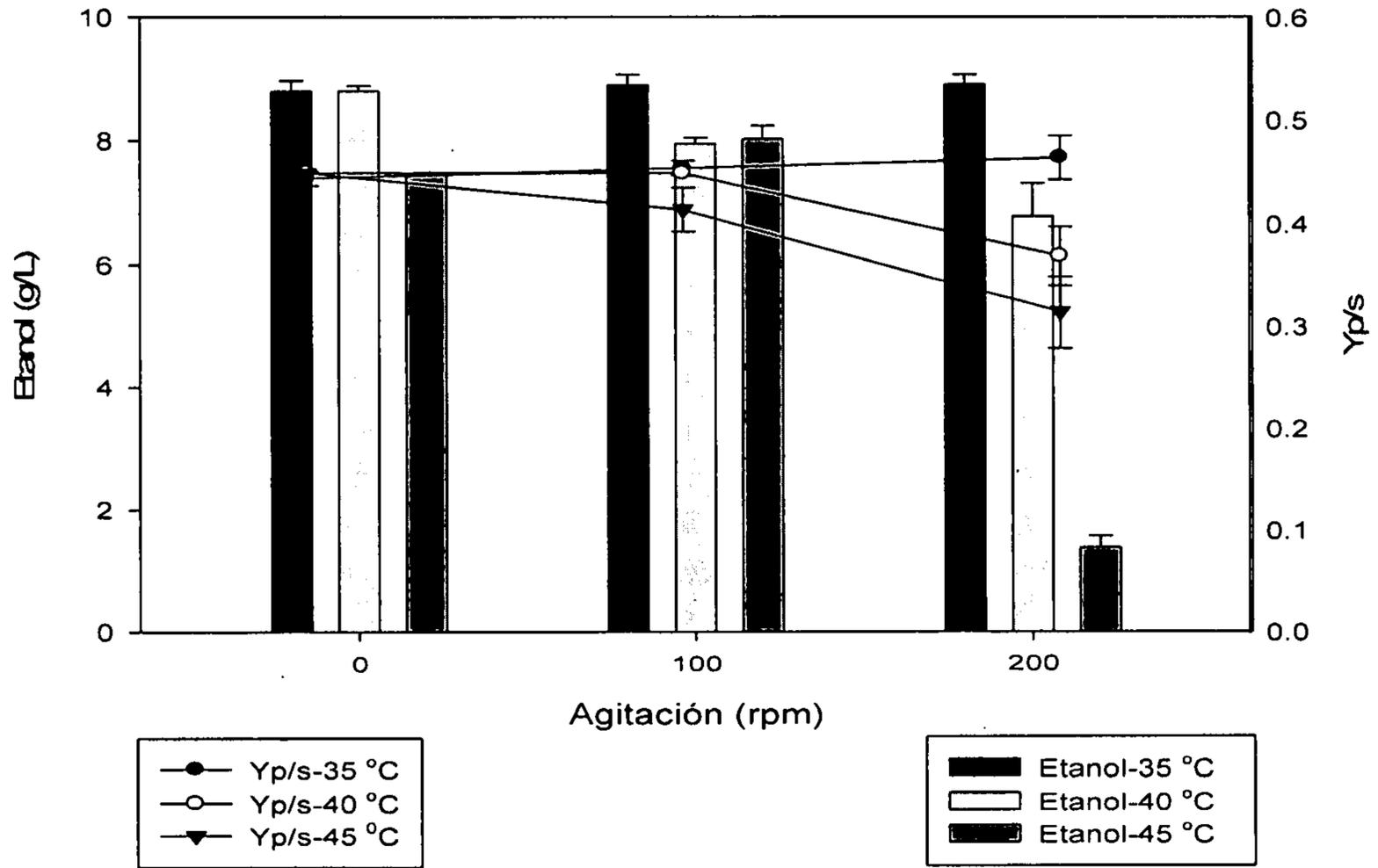
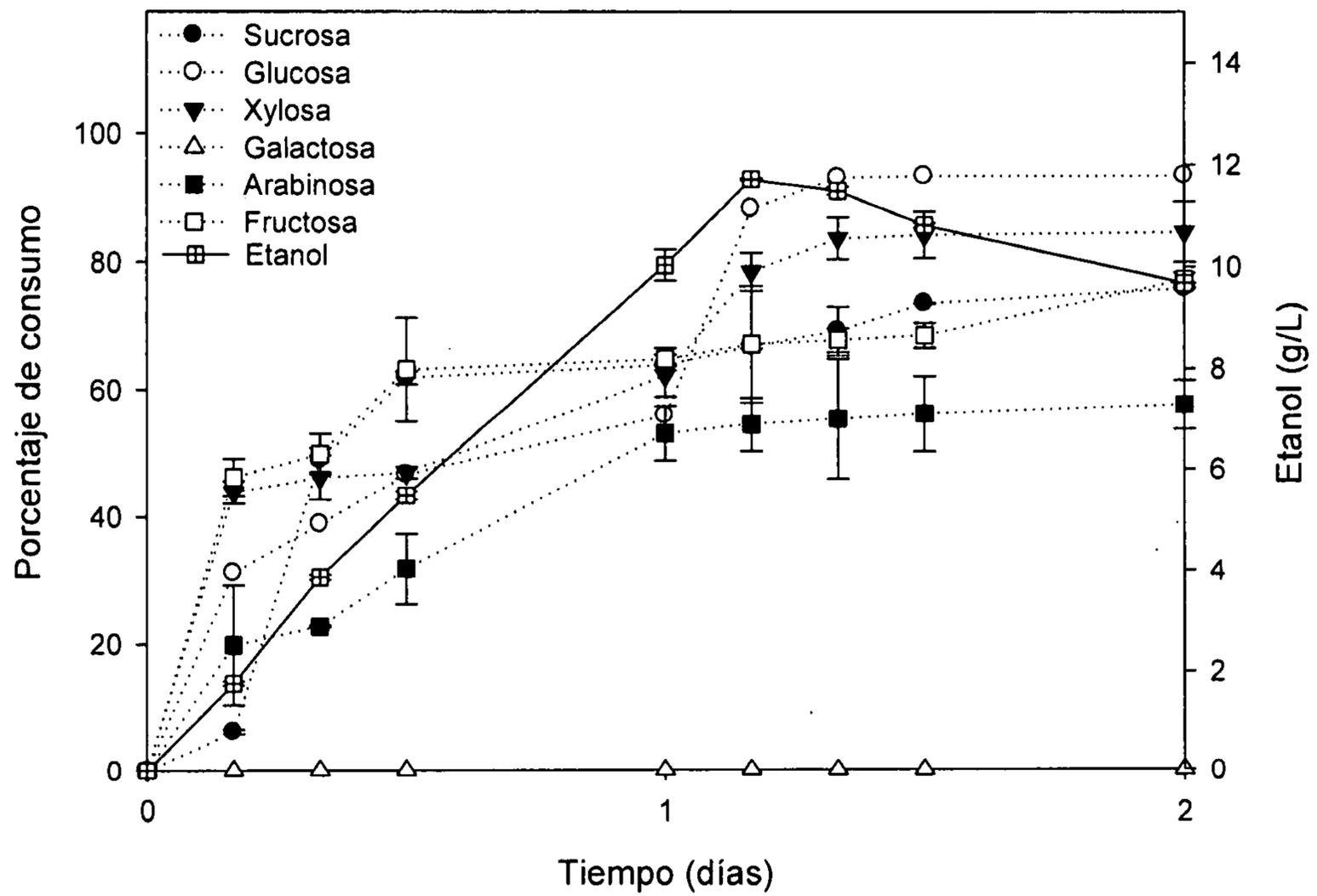


Figura 7.



La SEQ ID No. 1.

La secuencia obtenida tiene una similitud de 99% con secuencias reportadas de la región 5.8 ARNr de *Candida glabrata*.

TCTGCTGTGA	ATGCTTTTTT	AATCCTGCCT	GCGCTTAAGT	GCGCGGTTGG	TGGGTGTTCT	60
GCAAGTGGGG	GAGGGAGCCG	ACAAAGACCT	GGGAGTGTGC	GTGGATCTCT	CTATTCCAAA	120
GGAGGTGTTT	TATCACACGA	CTCGACACTT	TCTAATTACT	ACACACAGTG	GAGTTTACTT	180
TACTATTCTT	TTGTTCGTTG	GGGGAACGCT	CTCTTTCGGG	GGGGAGTTCT	CCCAGTGGAT	240
GCAAACACAA	ACAAATATTT	TTTTAAACTA	ATTCAGTCAA	CACAAGATTT	CTTTTAGTAG	300
AAAACAACCT	CAAAACTTTC	AACAATGGAT	CTCTTGGTTC	TCGCATCGAT	GAAGAACGCA	360
GCGAAATGCG	ATACGTAATG	TGAATTGCAG	AATTCCGTGA	ATCATCGAAT	ATTTGAACGC	420
ACATTGCGCC	CTCTGGTATT	CCGGGGGGCA	TGCCTGTTTG	AGCGTCATTT	CCTTCTCAAA	480
CACGTTGTGT	TTGGTAGTGA	GTGATACTCT	CGTTTTTGAG	TTAACTTGAA	ATTGTAGGCC	540
ATATCAGTAT	GTGGGACACG	AGCGCAAGCT	TCTCTATTAA	TCTGCTGCTC	GTTTGCGCGA	600
GCGGCGGGGG	TTAATACTGT	ATTAGGTTTT	ACCAACTCGG	TGTTGATCTA	GGGAGGGATA	660
AGTGAGTGTT	TTGTGCGTGC	TGGGCAGACA	GACGTCTTTA	AGTTTGAC		708

5 I.- CARACTERISTICAS DE LAS SECUENCIAS.

(A). LONGITUD (longitud de la secuencia expresada como el número de pares de bases o residuos de aminoácidos); 708 bp

(B) TIPO (secuencia tipo, por ejemplo de aminoácidos o nucleótidos); ADN

10 (C) TIPO DE CADENA (cuando es un ácido nucléico, número de cadenas de la molécula del organismo original, por ejemplo si es un cadena simple, doble, ambas o desconocidas para el solicitante); Doble

(D) TOPOLOGIA (si la molécula original es circular, lineal, ambas o desconocidas por el solicitante). Lineal

II.- TIPO DE MOLECULA (tipo de molécula secuenciada en la SEQ ID NO: 1):

15 (Por lo menos una de las siguientes debe ser incluida con subtítulos en el Listado de Secuencias) : ADN Genómico

III.- HIPOTETICA: (si/no)

IV.- ANTI-SENTIDO: (si/no)

5 V.- TIPO DE FRAGMENTO: (Sólo para proteínas y péptidos, por lo menos uno de los siguientes debe ser incluido en el Listado de Secuencias): No aplica

VI.- FUENTE ORIGINAL (fuente original de molécula secuenciada en SEQ ID NO:1)

10 (A) ORGANISMO (nombre científico del organismo original); Levadura

(B) CEPA; Candida glabrata con Número de identificación de NRRL Y50877

(C) INDIVIDUAL / AISLADA (nombre / número de individuo / aislado);

Aislada de estómago de termita

(D) ESTADO DE DESARROLLO (dar el estado de desarrollo del organismo
15 original e indicar además la línea germinal de donde se derivó o el patrón
rearreglado de desarrollo); Levadura liofilizada

(E) HAPLOTIPO;

(F) TIPO DE TEJIDO;

(G) TIPO DE CELULA;

20 (H) LINEA CELULAR;

(I) ORGANELO.

VII.- FUENTE INMEDIATA (fuente experimental inmediata de la secuencia en SEQ ID NO:1): Levadura liofilizada

(A) BIBLIOTECA (biblioteca tipo, nombre)

(B) CLONA(S).

5

VIII.- POSICION EN EL GENOMA (posición de la secuencia en la SEQ ID NO:1 en el genoma);

Los genes nucleares ribosomales 18S, 5.8S, y 28S son altamente conservados, y se encuentran flanqueados por las regiones llamadas:

10 "Internal Transcribe Sequences" (ITS).

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO (cromosoma/nombre del segmento/número):

(B) POSICION EN EL MAPA.

15 (C) UNIDADES (unidades para la posición en el mapa, por ejemplo, si las unidades están en porcentaje del genoma, número de nucleótidos u otros (especificar))

IX.- CARACTERISTICAS (descripción de puntos de importancia biológica en la secuencia en SEQ ID NO:1, puede ser repetida dependiendo de las características indicadas):

20

Con base en el vocabulario utilizado en la literatura científica, las características significativas pueden incluir:

(A) NOMBRE/CLAVE' (provee un identificador apropiado para la característica): ADN ribosomal

5 (B) LOCALIZACION:

- de (número de la primera base/aminoácido en la característica)

- a (número de la última base/aminoácido en la característica)

- pares de bases (números referidos a las posiciones de los pares de bases en una secuencia de nucleótidos)

10 - aminoácidos (números referidos a los residuos de los aminoácidos en una secuencia de aminoácidos)

- si la característica está localizada en una cadena complementaria a la que se ha presentado en el Listado de Secuencias.

15 (C) METODO DE IDENTIFICACION (por el cual la característica fue identificada):

- experimentalmente

- por similitud con una secuencia conocida o a una secuencia establecida por consenso.

20 - por similitud con algún otro patrón.

(D) OTRA INFORMACION:

- fenotipo(s) asociado(s)
 - actividad biológica/enzimática
 - actividad biológica/enzimática de sus productos
 - clase funcional general del gen y/o producto del gen
- 5 - macromoléculas enlazantes, macromoléculas a las cuales el producto del gen puede enlazarse
- localización subcelular, localización subcelular del producto del gen
 - cualquier otra información relevante.
- 10 La metodología que se seleccionó para la identificación molecular de la cepa, es una metodología que amplifica una región del ADN ribosomal y que se considera una región muy conservada entre especies por ello la amplificación y secuenciación de estos ITS son una herramienta de gran utilidad para la identificación de cepas de (microorganismos eucariotas)
- 15 levaduras y hongos, sin embargo no significa que las dos cepas de una misma especie sean o tengan un comportamiento similar, ya que esta sección del ADN que se amplifica no corresponde a ninguna enzima específica del metabolismo.