

## TÍTULO DE PATENTE No. 354312

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

**Domicilio:** Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO

**D nominación:** CEPA DE CANDIDA KRUSEI Y USO PARA UN PROCESO DE RECUPERACIÓN DE AGLICONAS DE ORIGEN VEGETAL

**Clasificación:** CIP: C12N1/14; C07D311/32; C07D311/40; C12R1/72  
CPC: C12N1/14; C07D311/32; C07D311/40; C12R1/72

**Inventor(es):** MARIA DE LOS ANGELES SANCHEZ CONTRERAS; INGRID MAYANIN RODRIGUEZ BUENFIL

### SOLICITUD

<b>Número:</b>	<b>Fecha de Presentación:</b>	<b>Hora:</b>
MX/a/2012/014557	13 de Diciembre de 2012	12:22

**Vigencia:** Veinte años

**Fecha de Vencimiento:** 18 de diciembre de 2032

**Fecha de Expedición:** 12 de febrero de 2018

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, 10/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 2º 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, 16/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 6º 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); y el artículo 1º 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/2018/17905|MX/a/2012/014557|Título de patente normal|1223|GAGV|Pág(s) 1|6sXXH2Awmm74vmonh2UwJHKESQw=

Sello Digital:  
i1SpU1+3VZ6EMTRj0JCsY/Fet2C75NCPbzryB2eCcxvjrVTDqANXElubURu8eONuca0LdSSyd0zAVOvrniaGTYv9Pz  
4SI2x3NBw1si46eeUOM6jQ+PC24IDoQKafYyaDAAhRpFuYB483yayMnJ/5p4u4/n1N7BKE/hwn4c/27zOyBQywJrTA  
kDOb92QXP1c7BOFQybixMtGyYhHct9E2ed0UN3CwhgiVgcJEhmcBXDem0q/iechWxZiuLD2/QPjBzcxZMa/55jOaXS  
36KuhLnaXzdsQQFgzZtyab/iSyuhy28UDYR/dh5hcQkO6oUB4A2jXvEELk+uqmpPvMd9KXQ==





## **CEPA DE *Candida krusei* Y USO PARA UN PROCESO DE RECUPERACIÓN**

### **DE AGLICONAS DE ORIGEN VEGETAL**

#### **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología  
5 relacionado con el aprovechamiento de residuos agroindustriales  
mediante el uso de microorganismos.

#### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las frutas cítricas, naranja, toronja, mandarina y limón, contienen  
metabolitos llamados fitocompuestos de tres tipos principales:  
10 Flavonoides, limonoides y carotenoides, estos compuestos se  
encuentran distribuidos en todo el fruto: jugo, cascara, pericarpio y  
endocarpio. Los flavonoides cítricos son una clase de fitocompuestos  
con un amplio rango de aplicaciones, son considerados una  
importante fuente de fitonutrientes, los cuales poseen una amplia  
15 actividad biológica en humanos (US2002/006953 A1). En las frutas  
cítricas los flavonoides más predominantes son las Flavononas,  
hesperidina y naringinina. Las evidencias sugieren que estos flavonoides  
juegan un papel determinante en el tratamiento de enfermedades  
crónico degenerativas y se ha probado su función como antioxidantes,  
20 anticancerígenos, protectores cardiovasculares y anti-inflamatorios. Por  
esta razón actualmente se ha dado un espectacular crecimiento en el

mercado de nutracéuticos en relación en el desarrollo de los flavonoides y los mercados de isoflavonas en Europa en los próximos seis años. Nueva investigación de mercado de analistas Frost y Sullivan, revela que el mercado combinado, fue \$144 millones en 2008 y se  
5 estima una tendencia al crecimiento de 5% anual. Los glicosidos de los flavonoles no son antioxidantes presentando únicamente actividad antioxidante su correspondiente aglicona. Este hecho se debe a que la molécula de azúcar reduce la eficacia antioxidante de los grupos hidroxilos adyacentes debido a ser un obstáculo estérico (Hollman PCH  
10 y Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. Biomed and Pharmacother 1997; 51: 305-310.

La industria de procesamiento de cítricos a nivel mundial, genera principalmente productos de producción primaria: jugo y aceite esencial. Esta industria en constante crecimiento, genera  
15 subproductos de hasta un 50% del peso del fruto procesado. Los subproductos en forma de cáscara, bagazo y semilla han sido empleados como alimento de ganado, para la obtención de melasas, pectinas y flavonoides, MX PA02010051(A), US2010/0159115 A1, sin lograr una eficiencia de producción rentable debido a que las plantas  
20 poseen una variedad de mezclas de compuestos bioactivos tales como lípidos, grasas, fitoquímicos, fragancias, pigmentos y sabores. Para separar estos compuestos de la fase sólida vegetal, se pone en

contacto con una fase líquida, ambas fases entran en contacto y el o los solutos se difunden desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes de su estructura natural original. Este proceso se conoce como extracción y para realizarlo existen  
5 varios métodos ampliamente conocidos. Un proceso importante es la extracción de azúcares con agua caliente. Otros procesos muy utilizados consisten en la extracción de fracciones oleosas, en los cuales se emplean disolventes orgánicos como hexano, acetona y éter, para extraer aceites. En todos los métodos tradicionales de  
10 extracción se requieren altos tiempos de residencia y grandes cantidades de solvente. Estos métodos se basan principalmente en la selección del solvente asociado con el uso de calor y/o agitación e incluyen la hidrodestilación y maceración mezclada con agua, alcohol o grasa caliente. Lamentablemente estos métodos degradan  
15 significativamente a los fitocompuestos, deteriorando su funcionalidad.

De un tiempo a la fecha se han desarrollado varias técnicas novedosas para la extracción de solutos de matrices sólidas, entre ellas se reporta: la extracción asistida con ultrasonido (Vinatoru, M, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs,  
20 Ultrasonics Sonochemistry, 8, 303-313 (2001), la extracción asistida con microondas (Kaufmann, B. y P. Christen, Recent extraction techniques

for natural products: Microwaveassisted extraction and pressurized solvent extraction, *Phytochem. Anal.*, 13, 105-113 (2002)), la extracción con solvente acelerado (Kaufmann, B. y P. Christen, Recent extraction techniques for natural products: Microwaveassisted extraction and pressurized solvent extraction, *Phytochem. Anal.*, 13, 105-113 (2002); 5 Smith, R. M, Extractions with superheated water, *J. Chromatogr. A*, 975, 31-46 (2002) y la extracción con fluidos supercríticos (Brunner, G, *Supercritical fluids: technology and application to food processing*, *Journal of Food Engineering*, 67. 21-33 (2005); Rozzi, N. L. y R. K. Singh, 10 *Supercritical Fluids and the Food Industr*, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 33-44 (2002), el objeto de todos ellos es acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de solvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto. Y aun cuando diversos procedimientos se han diseñado, no 15 se ha logrado eliminar por completo el empleo de reactivos tóxicos, requiriendo extracciones múltiples con significantes cantidades de solventes orgánicos para obtener bajos rendimientos de flavonoides glicosilados como se describe en US6528099 en donde se desarrolla un método para obtener selectivamente extractos ricos en antioxidantes 20 de frutas cítricas empleando resinas de intercambio tipo Amberlita XAD. Otros métodos incluyen el empleo de enzimas comerciales ROHACEOT®PTE para favorecer la despectinación de extractos

acuosos, logrando la obtención de fracciones acuosas que contienen flavonoides las cuales son extraídas mediante el empleo de resinas de poliéster Bucher Alimentech P495 y recuperadas empleando solventes polares, logrando pobres rendimientos de flavonas y flavononas glicosiladas. US2010/0159115 A1 y WO2010/080246 A1. Debido a que el rechazo es cada vez mayor por parte de los consumidores hacia el uso de antioxidantes sintéticos, como el BHA (Butil-Hidroxi-Anisol) y el BHT (Butil-Hidroxi-Tolueno) y además, dadas las restricciones legales levantadas hacia estos productos, se ha potenciado el empleo de antioxidantes naturales, libres de compuestos químicos sintéticos, como los ácidos fenólicos, los flavonoides y los tocoferoles (Yépez, B., M. Espinosa., S. López. y G. Bolanos, Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, Fluid Phase Equilibria, 194, 879 - 884 (2002)). Por lo que los métodos de extracción limpios son altamente cotizados. Existen también métodos mediante los cuales se obtienen agliconas de flavonoides empleando hidrolasas comerciales de diferentes orígenes. US7507423B2. La desventaja de estos sistemas hidrolíticos es que son costosos y de limitada selectividad.

Ahora bien, hasta el momento no se han descrito métodos de extracción de agliconas mediante el uso de *Candida krusei*, por lo que se considera que la materia que se describe y reclama en la presente invención es nueva y con actividad inventiva, toda vez que el proceso

de agliconas de flavonoides cítricos aquí descrito hace uso de la levadura antes mencionada, evitando así los problemas técnicos reflejados en los documentos antes mencionados, con la ventaja competitiva adicional de mejorar el rendimiento y calidad de las agliconas extraídas en hasta un 25% con respecto a los métodos descritos en el estado de la técnica.

### **BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

La presente invención describe y reclama, en primera instancia, una cepa de *Candida krusei*, caracterizada porque tiene el No. de Acceso NRRL- Y-50738, que además tiene una secuencia de RNA ITS tal y como se describe en la SEQ. ID No. 1 y en donde dicha cepa es útil para la obtención de agliconas de residuos agroindustriales.

Asimismo, se describe un proceso para la extracción y purificación de agliconas a partir de residuos agroindustriales cítricos, caracterizado porque comprende los pasos de: a) obtener un extracto flavonólico a partir de residuos agroindustriales cítricos; b) poner en contacto la cepa de *Candida krusei* NRRL: Y-50738 con dicho extracto flavonólico para producir agliconas y; c) recuperar las agliconas producidas. Dicho proceso está caracterizado además porque los residuos agroindustriales cítricos se seleccionan a partir de un grupo que consiste de: cáscara, bagazo ó semilla de diferentes especies de

cítricos, en donde los cítricos se seleccionan a partir de un grupo que consiste de: naranja, toronja, lima, mandarina o limón.

En una modalidad preferida en dicho proceso el paso a), la obtención del extracto flavonólico se realiza por difusión utilizando un extractante, en donde dicho extractante es una disolución de etanol o metanol con agua y se encuentra en una proporción de 1:2-3:5 con respecto al extracto.

Asimismo, en una modalidad preferida el paso a) del proceso se realiza a una temperatura de entre -10 y -50°C, durante un tiempo de 1 a 3 horas.

Es una modalidad preferida que el paso b) comprende incubar a la cepa de *Candida krusei* NRRL Y-50738 con el extracto final obtenido a partir del paso a), en donde dicha incubación se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 a 36°C.

Ahora bien, el paso c) del proceso comprende además la separación de la fracción líquida y sólida del producto de fermentación del paso b), en donde dicha fracción líquida es concentrada hasta obtener un polvo y en donde dicho polvo comprende mayoritariamente agliconas.



## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 es un cromatograma de HPLC de los citroflavonoides aislados con extracción criogénica de residuos de toronja

La Figura 2 es un cromatograma de HPLC de los citroflavonoides  
5 aislados con extracción criogénica de residuos de toronja

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención describe y reclama un proceso para la obtención de agliconas de flavonoides cítricos que comprende producir un extracto enriquecido en agliconas de flavonoides a partir  
10 de flavonoides glicosilados comunes en los cítricos y otras especies vegetales. Dicho extracto enriquecido es puesto en contacto con un inóculo de *Candida krusei* y mediante dicho contacto se logra el enriquecimiento de fracciones que contienen diversos tipos de agliconas de interés comercial.

15 La cepa de *Candida krusei*, objeto de la presente invención, fue aislada a partir del líquido rumial de *Bovis indicus*, en donde dicho líquido rumial fue obtenido a través de su extracción por medio de una fístula ruminal.

A partir del líquido ruminal, se procedió a seleccionar cepas capaces  
20 de crecer en medios adicionados con residuos cítricos. A partir de las

cepas capaces de crecer en dicho medio selectivo, se aisló y seleccionó la cepa de *Candida krusei*, dada su capacidad de deglicolizar flavonoides a sus respectivas agliconas a partir de desechos agroindustriales cítricos.

- 5 La utilización de esta cepa ayuda a disminuir el tiempo de proceso de purificación de agliconas, incrementado notablemente su pureza, siendo posible aplicar este método a diversos residuos agroindustriales ricos en estos fitoquímicos.

La cepa elegida fue denominada YOS-1 YUC y se procedió a su  
10 caracterización molecular y descripción morfológica.

La identificación molecular de *Candida krusei*, YOS-1 YUC 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  
15 técnicas estándares, pero incorporando en la extracción 0.5 % de microperlas de vidrio (106  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{l}$  que contiene 1X del buffer de reacción,  $\text{MgCl}_2$  a 2 mM, dNTP cada uno a 0.2 mM, 2 ng de  
20 DNA cromosomal, 0.4  $\mu\text{M}$  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 (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

5 señalada en la SEQ ID No. 1.

Así, la cepa de *Candida krusei* YOS-1 YUC fue caracterizada morfológicamente, obteniéndose los siguientes resultados como se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción morfológica de la Cepa de *Candida krusei* de la

10 presente invención.

<b>TINCIÓN (CULTIVO FRESCO)</b>	Azul de bromo fenol +
<b>FORMA</b>	levadura
<b>AGRUPACIÓN</b>	Hifa
<b>CRECIMIENTO AEROBIO</b>	+
<b>CRECIMIENTO ANAEROBIO</b>	+
<b>ESPORAS</b>	-
<b>MOVILIDAD</b>	-
<b>CATALASA</b>	+

Depósito de la cepa:

La cepa de *Candida krusei* YOS-1 YUC 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 Y-50738 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 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 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. Así, la cepa descrita y reclamada en la presente invención corresponde a lo mostrado en la siguiente tabla:

Nombre de la cepa	Fecha de Depósito	Número NRRL
YOS-1 YUC <i>Candida krusei</i>	Marzo 19, 2012	NRRL Y-50738

### **Proceso de extracción y purificación de agliconas de residuos cítricos.**

Ahora bien, para la extracción y purificación de agliconas a partir de residuos cítricos, se diseñó un procedimiento, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) Obtener un extracto flavonólico a partir de subproductos cítricos;
- b) Poner en contacto la cepa de *Candida krusei* NRRL: Y-50738 con dicho extracto flavonólico para producir agliconas y;
- c) Recuperar las agliconas producidas.

La obtención del extracto flavonólico se hace a partir de subproductos cítricos tales como, pero no limitados a cáscara, bagazo ó semilla de diferentes especies de cítricos, como por ejemplo: naranja, toronja, lima, mandarina ó limón, entre otros. Estos subproductos son convertidos en extractos que contienen altos niveles de las principales agliconas comercialmente útiles. El método para la obtención del extracto flavonólico es un método criogénico, tal y como se describe en el ejemplo 1 de la presente solicitud.

Ahora bien, en el paso b en donde se pone en contacto un cultivo de la cepa de *Candida krusei* NRRL: Y-50738 con el extracto flavonólico obtenido en el paso a, se lleva a cabo una conversión microbiana de dicho extracto en donde se obtiene, por ejemplo, hesperidina,



naringina y diosmina que son los disacáridos reductores de rutinosa, formado por una ramnosa (6-desoxi-L-manosa) unida a una glucosa mediante un enlace glicosídico de tipo (1 $\beta$ -6). Las agliconas o geninas obtenidas en este proceso son las flavononas denominadas  
5 hesperitina, naringenina y diosmetina. Estas flavononas, además de reducir los niveles de colesterol, se le atribuyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas.

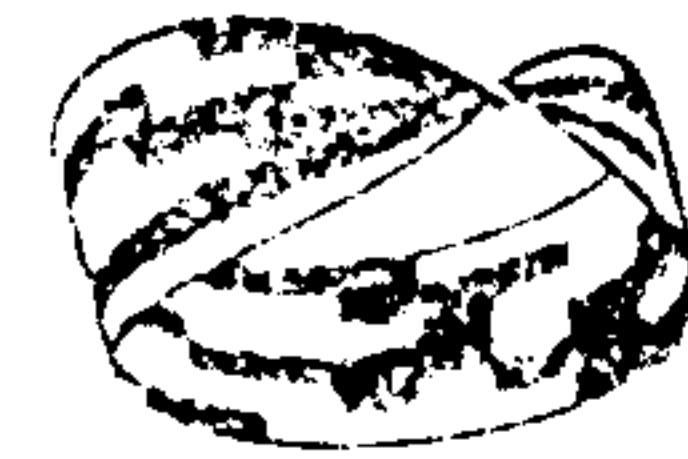
Ahora bien, las agliconas son recuperadas durante el paso c del proceso por métodos tales como, pero no limitados a, centrifugación,  
10 cromatografía, y cualquier otro que permita la separación de compuestos específicos. Un ejemplo de dicha recuperación se puede apreciar en el ejemplo 3 de la presente invención.

El procedimiento antes descrito permite un mayor rendimiento de extracción evitando la presencia de impurezas o residuos de los  
15 reactivos utilizados o de posibles reacciones secundarias.

La invención se refiere también a los extractos así obtenidos y a productos enriquecidos que los incorporan.

## **EJEMPLOS**

### Ejemplo 1. Obtención de extractos flavonólicos.



Se utilizaron como materia prima subproductos procedente de la industrialización de cítricos, en forma de cáscara, bagazo y semilla. Para la realización de las distintas pruebas se ha utilizado residuos deshidratados y triturados a una temperatura y número de malla variable. Los extractantes empleados son agua, etanol y metanol de forma que con la primera se puedan extraer las sales y polifenoles de pequeño tamaño molecular, y con el segundo el resto de polifenoles de interés. Se determinó el contenido polifenólico total, según el método de Folin Ciocalteu, expresado como equivalentes de ácido gálico (GAE). El método adoptado es de conocimiento general y consistente en la lectura espectrofotométrica de la absorbancia, a una longitud de onda de 765 nm. Así mismo, los resultados analíticos se completan con análisis detallados de los compuestos polifenólicos presentes en los extractos mediante cromatografía líquida de alta resolución las cuales se muestran, a manera de ejemplo, en las figuras 1 y 2 que acompañan esta invención.

Se usó un equipo de cromatografía equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, un autoinyector termostataado, un horno de columna y un detector de diodos en fila (DAD). Columna de fase inversa tipo RP-18, de 150 x 4,6 mm de dimensiones y diámetro de partícula de relleno 5  $\mu\text{m}$ . El tratamiento de datos de los



cromatogramas se realizó con un sistema informático. Todas las medidas indicadas se realizaron sobre muestras del mismo volumen extraídas, secadas y resuspendidas a las cuales fueron previamente filtradas con filtros de Nylon de 0,45 micras, inyectando 25  $\mu$ l y eluyendo con una mezcla de Disolventes A: Agua HPLC, y disolvente B: acetoneitrilo, ambos adicionados con ácido fórmico 0.1%, según el siguiente Programa:

<b>PASOS</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>SOLVENTE A</b> <b>(%)</b>	<b>SOLVENTE B</b> <b>(%)</b>	<b>FLUJO</b> <b>(ml/min)</b>
1	1	90	10	1
2	40	74	26	1
3	70	35	65	1
4	71	0	100	1
5	75	0	100	1
6	80	90	10	1

La obtención del extracto flavonolico de esta invención se realiza mediante la extracción criogénica de las harinas de los residuos cítricos empleando disolventes polares como etanol, metanol o agua realizando una maceración con nieve seca de CO<sub>2</sub> y el solvente



indicado, el tiempo extracción varía en función de la cantidad de muestra tratada.

La extracción por difusión continua persigue maximizar la obtención de flavonoides a partir del subproducto de cítricos post-extracción industrial de jugo y aceite esencial, teniendo en cuenta que el porcentaje de flavonoides obtenidos procedentes de este subproducto varíe entre el 1.50 y 1.87% dependiendo del cítrico procesado. Para ello se utilizan los extractantes adecuados para la obtención de los distintos tipos de flavonoides. El proceso se lleva a cabo a una temperatura aproximada de entre -10 y -50°C, con una disolución etanol o metanol en agua al 50% durante un tiempo que varía de 1-3 horas, la relación de extracción subproducto/extractante va de 1:2-3:5. El extracto se recupera por filtración.

Se realiza un prensado del subproducto cítrico post-extracción y este residuo puede ser empleado en otro proceso como extracción de pectinas o sacarificación. La salida del subproducto post extracción criogenica, se da a una prensa en la que se recupera el jugo de prensado el cual se mezcla con el jugo recuperado por filtración. De esta forma se consigue aumentar el rendimiento del proceso entre un 10 y un 25%.

Una vez realizada la extracción y el prensado, y mezclados ambos jugos, el extracto resultante se depura mediante centrifugación y posterior filtración a 100 micras para la eliminación de los sólidos precipitados. De esta forma se obtiene un jugo clarificado rico en flavonoides glicosilados, con un poder antioxidante variable entre 3500 y 7000 mequivalentes de ácido gálico/L. Los sólidos totales obtenidos entre el prefiltrado a 100 micras y la centrifugación varían entre un 4 y un 7% del volumen de líquido tratado.

La concentración del extracto se lleva a cabo a vacío en un evaporador inclinado para reducción del volumen del jugo purificado en un 50%. Esto implica un tratamiento térmico a baja presión para evitar posibles degradaciones de los compuestos de interés. La temperatura se fija entre 50 y 70 °C,. El extracto final concentrado tiene un poder antioxidante variable entre 40.000 y 80.000 mequivalente de ácido gálico/L de jugo, y un contenido en alcohol entre un 5 y un 10%. Teniendo una reducción de volumen variable entre un 50 y un 70% respecto al volumen inicial. Este extracto final es el que se pone en contacto con la cepa de *Candida krusei* Y-50738 como sustrato para la conversión microbiana

EJEMPLO 2. Conversión microbiana del concentrado flavonolico a sus correspondientes agliconas

El extracto final obtenido en el ejemplo 1 mediante el ~~criogenico~~ es  
adicionado con una solución de fosfatos que permite ajustar el pH de  
la solución entre 5 y 7. La mezcla es esterilizada empleando dispositivos  
de filtración de presión positiva equipados con membranas estériles. La  
5 solución así esterilizada se deposita en frascos estériles de 250 ml con  
tapa rosca llenados entre 50 y 70 % de su capacidad. Los frascos son  
inoculados con un cultivo de *Candida krusei* con número de acceso  
NRRL- Y-50738.

Dicho cultivo ha sido preparado en medios tales como, pero no  
10 limitados a:

Medios

ATCC Medio: 200 YM medio (sólido o líquido)

Medio sólido

YM Agar (BD 271210).....41 g

15 agua.....1000 ml

Autoclave a 121°C.

Medio Líquido

YM liquido (BD 271120).....21.0 g



agua.....1000 ml

Autoclave a 121°C.

Para fabricar el medio en laboratorio se tiene la siguiente composición:

Extracto de levadura.....3.0 g

5 Extracto de malta.....3.0 g

Dextrosa.....10.0g

Peptona.....5.0 g

Agar (para medio solido).....20.0 g

Agua.....1000 ml

10 Ajustar pH 6.2 +/- 0.2

Después de la inoculación los frascos se mantienen en incubadora rotatoria a 100 rpm y temperatura controlada entre 30 y 36 °C durante un periodo que puede variar entre 6 y 48 hrs., en función del tipo de residuo empleado. Una vez realizada la conversión se procede a la

15 recuperación de las agliconas.

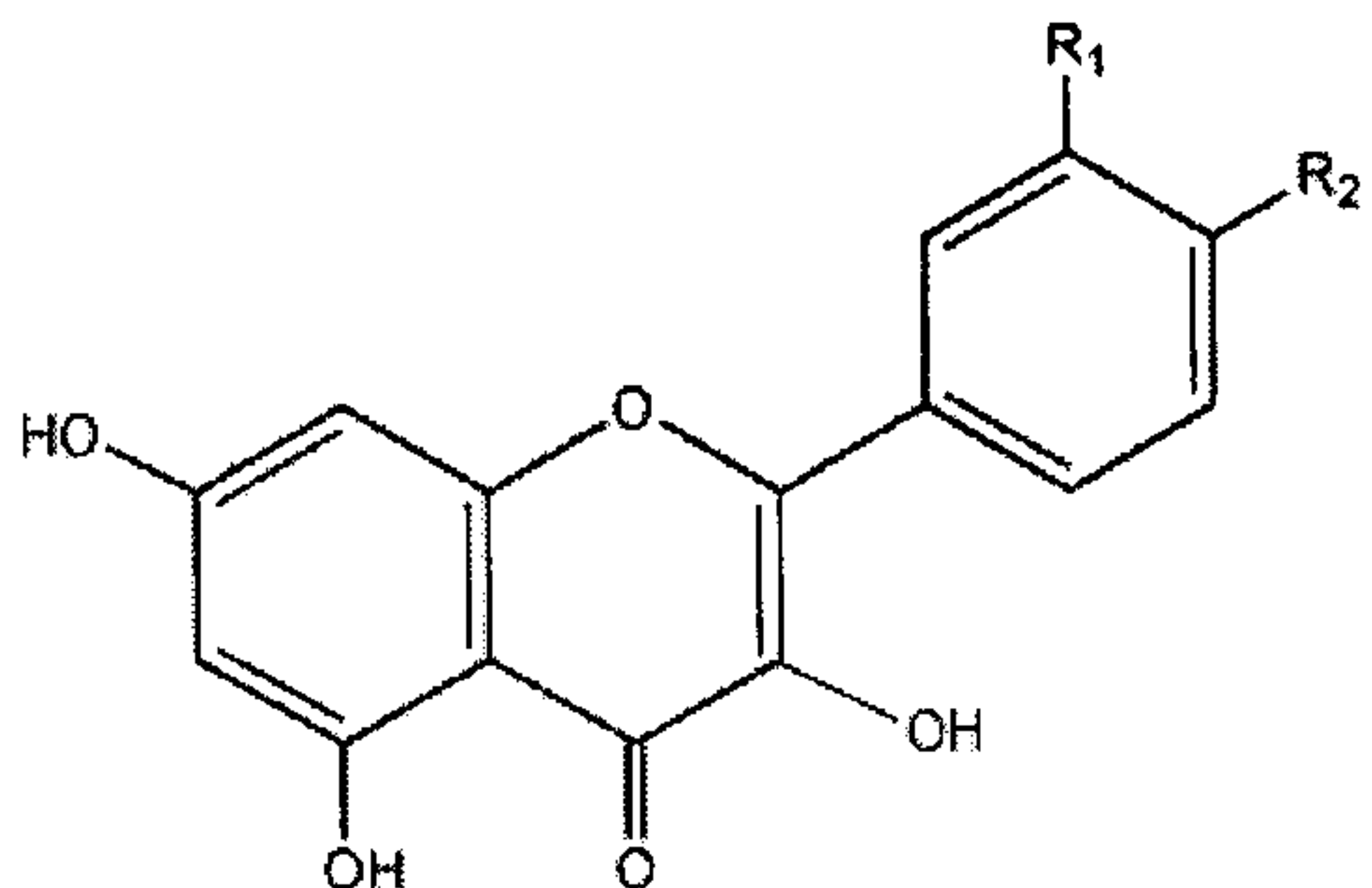
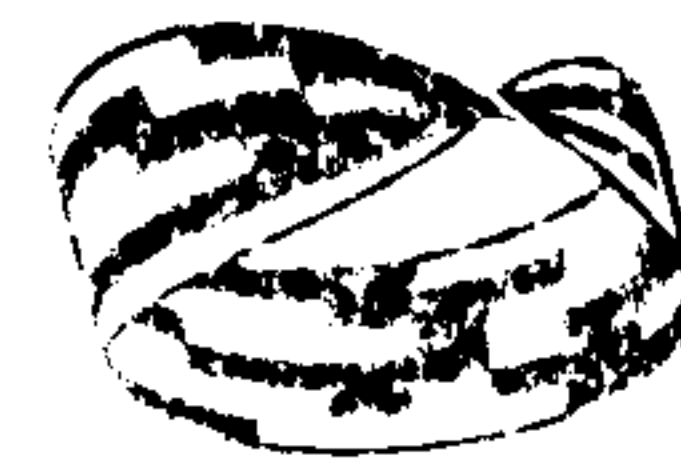
### EJEMPLO 3. Recuperación de agliconas de flavonoides cítricos.

La etapa de recuperación consiste en la separación de la fracción líquida de la fracción sólida mediante centrifugación, la fracción sólida

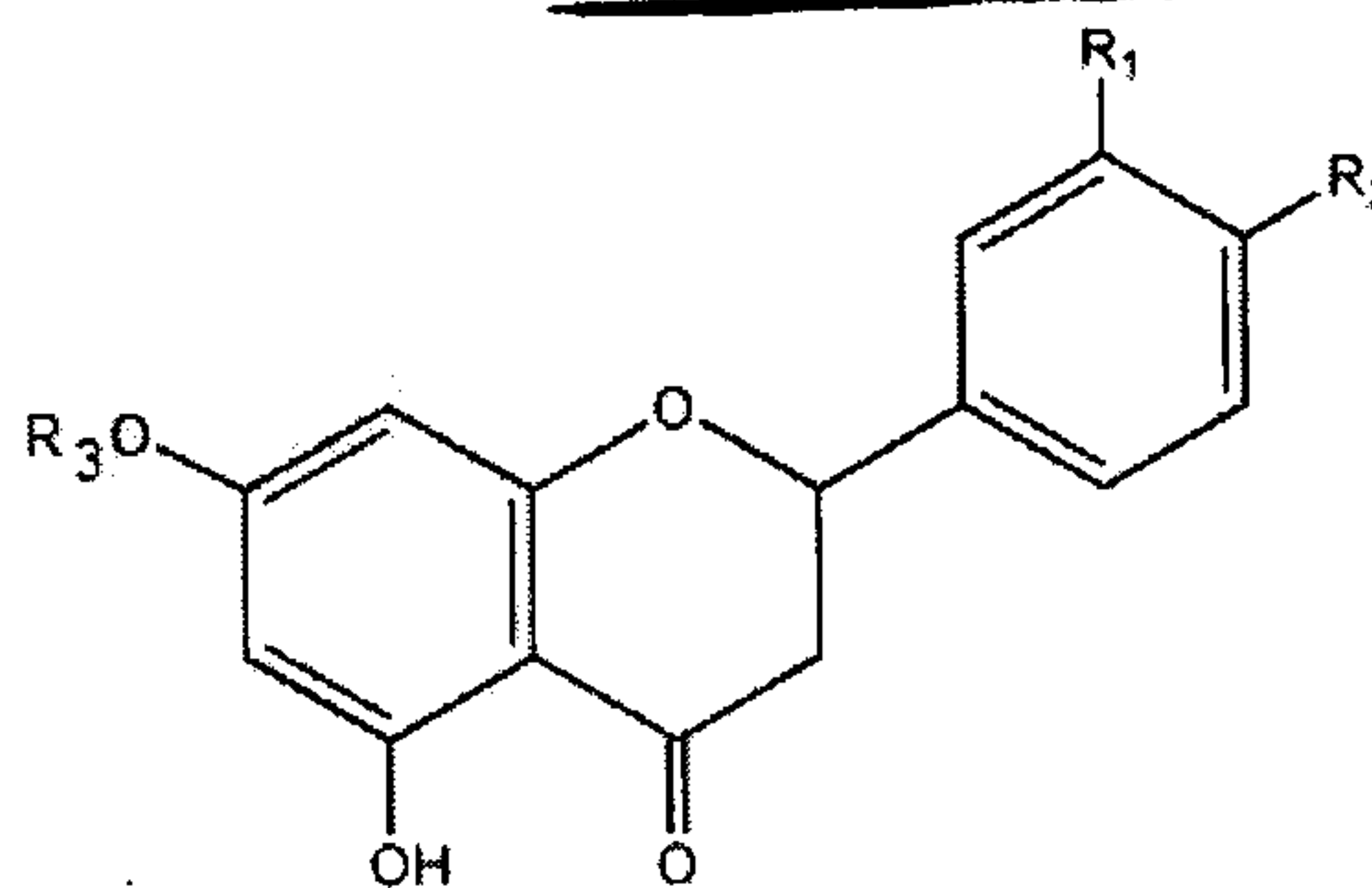
compuesta por células de *Candida krusei* y cristales de agliconas se  
lava con la MeOH y se centrifuga nuevamente, la fracción sólida se  
desecha y la fracción líquida se concentra evaporando por aspersion  
hasta obtener un polvo fino que contiene en su composición  
5 mayoritariamente agliconas de los principales flavonoides contenidos  
en cada residuo cítrico. En la fig 2 se muestra el cromatograma con los  
principales compuestos obtenidos en esta etapa empleando residuos  
de toronja. Los rendimientos netos varían dependiendo del residuo  
tratado de 1.8 -3.4 mg por cada 100 g de harina de residuos cítricos,  
10 con un poder antioxidante en un rango entre 150,000 y 250,000 mg  
equivalentes de ácido gálico por kg de harina de subproductos  
cítricos.

Ejemplos de compuestos obtenibles mediante el proceso de la  
presente invención se muestran en la Tabla 3 a continuación:

15 Tabla 3. Citroflavonoides obtenidos con extracción criogénica y  
convertidos a sus correspondientes agliconas



Flavonoles



Flavanonas

Flavanonas			
R1	R2	R3	Compuesto
OH	OH	H	Eriodictyol
OMe	OH	Ramnosa	Hesperedina
OMe	OH	H	Hesperetina
H	OH	Rutinosa	naringina
H	OH	H	naringenina
OH	OCH <sub>3</sub>	Rutinosa	Diosmina
OH	OCH <sub>3</sub>	H	Diosmetina
Flavonoles			
R1	R2	Compuesto	
OH	OH	Quercetina	
H	H	Kaemferol	

## REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Candida krusei* con capacidad de deglicolizar flavonoides a  
5 sus respectivas agliconas a partir de desechos agroindustriales cítricos,  
caracterizada porque tiene una secuencia de RNA ITS comprendida en la  
SEQ ID No.:1, y porque está depositada en el ARS culture collection (NRRL)  
bajo el No. de Acceso NRRL-Y-50738.
2. Un proceso para la extracción y purificación de agliconas a partir de  
10 residuos agroindustriales cítricos, caracterizado porque comprende los  
pasos de:
  - a) obtener un extracto flavonólico a partir de residuos agroindustriales  
cítricos;
  - b) poner en contacto una cepa de *Candida krusei* NRRL: Y-50738, tal y  
15 como la descrita en la reivindicación 1, con el extracto flavonólico  
obtenido en el paso (a); y
  - c) recuperar las agliconas producidas.
3. Proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además  
porque los residuos agroindustriales cítricos se seleccionan a partir del grupo  
20 que consiste de: cáscara, bagazo o semilla de diferentes especies de  
cítricos.
4. Proceso de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además  
porque las diferentes especies de cítricos incluyen: naranja, toronja, lima,  
mandarina o limón.



5. Proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque en el paso a), la obtención del extracto flavonólico se realiza por difusión utilizando un extractante.
6. Proceso de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque el extractante es una disolución de etanol o metanol en agua.
7. Proceso de conformidad con una de las reivindicaciones 5 y 6, en donde dicho extractante se encuentra en una proporción de 1:2-3:5 con respecto al extracto.
8. Proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque el paso a) se realiza a una temperatura de entre -10 y -50°C.
9. Proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque el paso a), se lleva a cabo en un tiempo de 1 a 3 horas.
10. Proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque el paso b), comprende incubar a la cepa de *Candida krusei* NRRL: Y-50738 como la descrita en la reivindicación 1, con el extracto final obtenido a partir del paso a).
11. Proceso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque la incubación se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 a 36°C.
12. Proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque el paso c), de recuperación de agliconas comprende la separación de la fracción líquida y sólida del producto de fermentación del paso b).



13. Proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque la fracción líquida es concentrada hasta obtener un polvo que comprende mayoritariamente agliconas.

5 14. Un extracto rico en flavonoides, obtenible a partir del proceso como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, caracterizado porque tiene un perfil cromatográfico como el que se muestra en la fig. 1.

15. Un extracto rico en agliconas, obtenible a partir del proceso como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, caracterizado porque tiene un perfil cromatográfico como el que se muestra en la fig. 2.

10

15

20

---

## RESUMEN

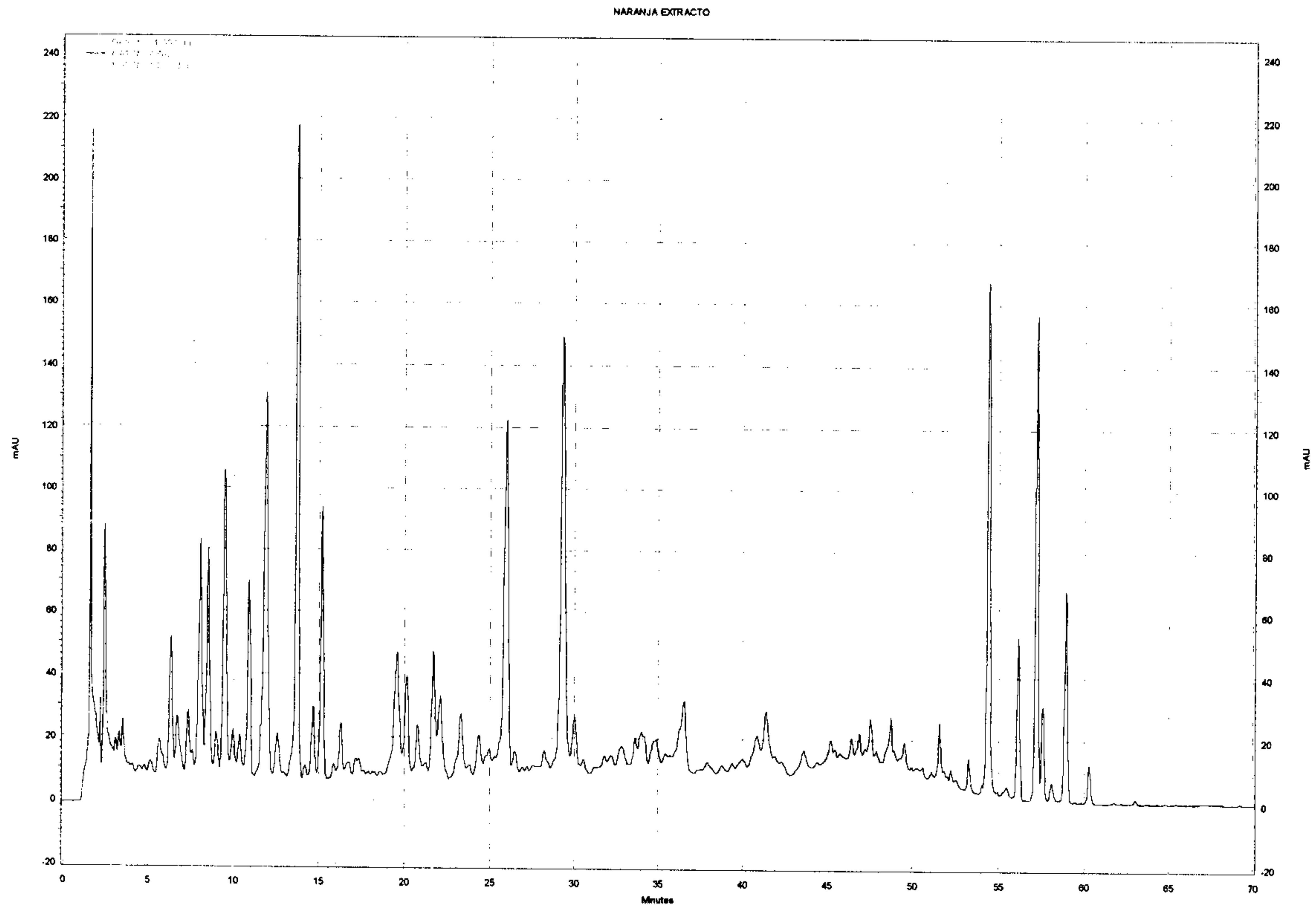


La presente invención describe y reclama una cepa de *Candida krusei*, útil para la obtención de agliconas a partir de residuos agroindustriales cítricos, así como un proceso para la extracción de dichas agliconas mediante el uso de dicha cepa.

LISTADO DE SECUENCIAS CANDIDA KRUSEI\_ST25  
 SEQUENCE LISTING

- <110> CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y DISEÑO  
 DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
- <120> CEPA DE Candida krusei Y USO PARA UN PROCESO DE RECUPERACIÓN DE  
 AGLICONAS DE ORIGEN VEGETAL
- <130> CIATEJ MERIDA 2
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1  
 <211> 499  
 <212> DNA  
 <213> Candida krusei
- <400> 1  
 acaagggttc cgtaggtgaa cctgcggaag gatcattact gtgatttagt actacactgc 60  
 gtgagcggaa cgaaaacaac aacacctaaa atgtggaata tagcatatag tcgacaagag 120  
 aatctacga aaaacaaca aaactttcaa caacggatct cttggttctc gcatcgatga 180  
 agagcgcagc gaaatgcat acctagtgtg aattgcagcc atcgtgaatc atcgagttct 240  
 tgaacgcaca ttgcgcccct cggcattccg gggggcatgc ctgtttgagc gtcgtttcca 300  
 tcttgcgctg gcgcagagtt gggggagcgg agcggacgac gtgtttgagc gtcgtttcca 360  
 gcgactcgcc tgaaaggag cgaagctggc cgagcgaact agactttttt tcagggacgc 420  
 ttggcggccg agagcgagtg ttgcgagaca acaaaaagct cgacctcaa tcaggtagga 480  
 atacccgctg aacttaagc 499

# FIGURA 1



Glicosilados Agliconas



# FIGURA 2

