



TÍTULO DE PATENTE No. 367125

Titular(es): INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Domicilio: Edificio de la Dirección General, Av. Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Colonia Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, 07738, Distrito Federal; MÉXICO

Denominación: PROCESO BIOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LODOS HIDROLIZADOS RESULTANTES DE LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDO TEREFTÁLICO MEDIANTE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS.

Clasificación: **CIP:** C12P23/00; C02F3/34; C07C403/24; C12P1/02; C12P1/04; C12R1/06; C12R1/645
CPC: C12P23/00; C02F3/34; C07C403/24; C12P1/02; C12P1/04; C12R1/06; C12R1/645
CSet1: A23V2002/00; A23V2250/211

Inventor(es): CLAUDIO GARIBAY ORIGEL; EDGAR SALGADO MANJARREZ; JUAN SILVESTRE ARANDA BARRADAS

SOLICITUD

Número:
MX/a/2012/014108

Fecha de Presentación:
4 de Diciembre de 2012

Hora:
12:07

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 4 de diciembre de 2032

Fecha de Expedición: 11 de julio 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 fracción III, 7º BIS 2 y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo, 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.

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; 30 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.

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

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000405397295|Servicio de Administración Tributaria|56||MX/2019/68664|MX/a/2012/014108|Título de patente normal|1223|GAGV|Pág(s) 1|B3IHCxpfKkeMpe7AiPdEBgi64Ts=

Sello Digital:
UXZcz54d11WP99tMuDeEaCieFbhT2QXCwgTXkc7XSrsmcEHAYVu6QLQvP90sDNueOiY0cbmHpNckejp2f59SrgbcG1CnG6QHhxeZiNyJt48seplfWTRdRbiloPGvQ3z9NTEqY30nApaBXV70dzw5HxU8i81Y+XbM3QkQkdzTKyWzSFLlbpimNZHOU2+ziAtx/2IDXtVEoCSpD7JyRJ7ZEsm+o5duxe9brQuM7Q96ftypHZI8nZz3JEbTRqkHtym+OeaXBAU3W4cXLPrlg5FKJL9Xnu5ghVMkZWCGdJD/b0CqvbHeBxRukcf3Yv9aP6qzezZv6SdDU68X6zKWUg==



**PROCESO BIOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE
LODOS HIDROLIZADOS RESULTANTES DE LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDO
TEREFTÁLICO MEDIANTE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS**

5 Campo de la invención

La presente invención se ubica en el campo de la degradación de compuestos tóxicos, que se encuentran en aguas residuales, mediante microorganismos. Específicamente la presente invención se refiere a la degradación de ácido tereftálico mediante bacterias del género *Rhodococcus sp*, *Arthrobacter sp.*, *Comamonas sp* así como la posterior obtención de
10 astaxantina utilizando *Xanthopyllomyces dendrorhous* a partir de lodos hidrolizados mediante un bacteriófago específico o un proceso físico.

Antecedentes de la invención

En México la industria usa 3.3 mil millones de metros cúbicos de agua al año, obteniendo la
15 mitad de acuíferos subterráneos y la otra mitad de cuerpos de agua superficiales. La contaminación de estos últimos es un problema oculto pero muy fuerte en el país, los cuerpos de agua superficial son explotados principalmente por las industrias tanto en la obtención de agua como en la descarga de aguas residuales a los ríos y lagos. La Comisión Nacional del Agua (CNA) reconoce al menos que el 31.6% de sus puntos de muestreo de agua superficial a nivel
20 nacional tienen una Demanda Química de Oxígeno (DQO) igual o superior a los 40 mg DQO/l y el 13.6% presentan una Demanda Biológica de Oxígeno DBO₅ de 30 mg DBO₅/l o mayor, lo cual los coloca como puntos contaminados o altamente contaminados según la normatividad nacional (NOM-001-ECOL-1996; CNA, 2010). Anualmente las descargas de aguas residuales no municipales incluyendo a la industria genera 6.01 mil millones m³/año de aguas residuales de
25 los cuales sólo se trata el 18% (1.07 mil millones m³/año), se generan 7 millones de toneladas de

DBO de las cuales sólo se remueven 1.15 millones de toneladas en las plantas de tratamiento. En el país existen 2082 plantas de tratamiento de aguas industriales distribuidas principalmente en el Estado de México, Baja California, Veracruz, Distrito Federal, Tabasco, Querétaro y Tlaxcala. Desafortunadamente, la NOM-001-ECOL-1996 sólo regula parámetros convencionales de la calidad del agua y como consecuencia muchas de las descargas industriales que deberían de ser catalogadas como tóxicas son descargadas al ambiente sin ninguna sanción. Dentro de las principales actividades industriales en el país, destaca la producción de ácido tereftálico (AT), ésta genera grandes volúmenes de efluentes contaminados. Estos efluentes son tratados satisfactoriamente mediante lagunas anaerobias, sin embargo el proceso debe de ser optimizado en cuanto a tiempo de degradación y concentración de AT.

El AT puro se utiliza principalmente en la fabricación de películas de audio, tubos de PVC, envasado de alimentos, fibras de poliéster, resinas de moldeo, productos sanitarios, tereftalato de polietileno (PET), etc. La producción de AT puro genera grandes cantidades de residuos, principalmente en forma de tereftalato de dimetilo (DMT) y AT de baja calidad. La generación de aguas residuales varía de 3 a 10 m³ por tonelada de producción de AT puro y es equivalente a 20.5 kg m³ DQO. Se han llevado a cabo estudios de los efectos de toxicidad del AT y DMT en animales y humanos, y se ha encontrado que provoca cálculos y tumores en la vejiga de ratas, daños en las células espermatogónicas y en la motilidad de los espermatozoides también en ratas y ratones y efectos leves en la función pulmonar de seres humanos.

Para la remoción del AT, contenido en las aguas residuales generadas en su producción, existen tratamientos fisicoquímicos los cuales se basan en su oxidación mediante ozono con ayuda de la luz UV, entre estas opciones se encuentra la opción de UV-H₂O₂-Fe, O₃, O₃/Fe, O₃/TiO₂, sin embargo la capacidad de remoción es muy pobre, por ejemplo: se descomponen 50 mg/L en 10

horas en el sistema de ozono y óxido de titanio (Thiruvengkatachari et al. 2007).

De igual forma se ha reportado la posibilidad de recuperar el ácido tereftálico mediante una mezcla de 70% de vapor y 30% de nitrógeno a temperaturas de 500°C (Masuda et al. 1997).

5 Además de las obvias desventajas energéticas y de costo, también se ha demostrado que se generan compuestos como benzoquinona, benceno, ácido málico y oxálico, sin mencionar que es necesario invertir en la disposición de los residuos obtenidos.

Sin embargo, los tratamientos biológicos surgen como una opción más útil que los procesos
10 fisicoquímicos, pues en estos no sólo se logra economía, sino la transformación del AT en productos más inocuos (biomasa y CO₂) e incluso energéticamente útiles, como el metano. Debido a la presencia y persistencia en el ambiente del AT y compuestos relacionados, los microorganismos han desarrollado y adaptado nuevas rutas metabólicas para degradar estos compuestos. Se han encontrado tanto microorganismos aerobios como anaerobios capaces de
15 degradar este ácido y sus esteres (Vamsee-Krishna and Phale 2008). Para el caso del tratamiento anaerobio de AT, se han empleado principalmente consorcios bacterianos. En estos, los microorganismos se desarrollan en sintrofia, en este tipo de interacción uno o más miembros del consorcio produce uno o mas metabolitos necesarios para otros grupos bacterianos miembros del consorcio.

20

La degradación de AT en condiciones metanogénicas se ha reportado para diferentes concentraciones y en general con cultivos mixtos. El caso de cultivos puros sólo se ha reportado para el género *Pelotolomaculum* (Qiu et al., 2006), en este caso los cultivos degradaron concentraciones de 2mM de tereftalato, isoftalato y orto-ftalato, en cultivos separados, donde los
25 microorganismos que se adaptaron a cada uno de los isómeros solo pudieron crecer en ese y en

ninguno de los otros, a pesar de ser la misma especie bacteriana. Dichos cultivos pudieron usar como aceptores de electrones sulfato, sulfito, tiosulfato, nitrato, fumarato, Fe^{+3} y 4-hidroxibenzoato.

- 5 En el caso de los cultivos mixtos existe un trabajo muy extenso de Kleerebezem y colaboradores, que inicia con pruebas de biodegradabilidad del ácido en botellas serológicas con una concentración de 2 mM (Kleerebezem et al. 1997), observando la acumulación de acetato y benzoato, así como determinando que los microorganismos metanogénicos acetoclásticos predominantes pertenecían al género *Methanosaeta*, mientras que en los microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos predominaban los *Methanobacterium* (Kleerebezem et al. 10 1999). Posteriormente en un reactor con un volumen de 1.5 L los microorganismos fueron capaces de degradar 0.5g de AT (Kleerebezem et al. 2005).

En la degradación de ácidos ftálicos en condiciones desnitrificantes se ha reportado la 15 degradación de 10 μ moles de ácido tereftálico con 50 μ moles de nitrato (Aftring et al. 1981) y la degradación de dimetiltereftalato (DMP) con una velocidad de degradación específica de 0.32 mM/g VSS h usando 8 mM de nitrato (Liang et al. 2007). El uso del nitrato como aceptor final de electrones en lugar del oxígeno tiene como ventajas la promoción de la biorremediación de hidrocarburos aromáticos, además a diferencia del oxígeno el nitrato es muy soluble, lo cual 20 provee una homogénea dispersión, evitando la limitación del proceso relacionada con un ineficiente mezclado (Baker and Herson, 1999).

Arthrobacter sp.

Muchos estudios han mostrado que las bacterias que pertenecen al género *Arthrobacter* forman 25 una fracción numéricamente importante en suelos de diferentes partes del mundo (Keddie and

Jones, 2006). Están bien adaptados a vivir en la tierra porque son muy resistentes a la desecación y al ayuno de nutrientes. Este género es de una flexibilidad nutricional inusitada, y puede degradar incluso algunos herbicidas y pesticidas (diazinón, fenoxiácéticos y m-clorobenzoato) (Brown et al., 1978).

5

El género *Arthrobacter*, pertenece a un grupo de bacterias cornoiformes de las cuales varias cepas son industrialmente usadas para la producción de ciertos aminoácidos (Le Marrec et al., 1996). Su característica peculiar es su ciclo de crecimiento bacilo-coco (Prescott et al., 2005), además de que pueden formar micelios cortos (Conn, 1948). Cuando *Arthrobacter* crece en fase exponencial, las bacterias son bacilos irregulares, ramificados, que se pueden reproducir por división crepitante. Cuando entran en la fase estacionaria las células cambian a una morfología cocoide. Al ser transferidas a un medio nuevo, las células cocoides producen brotes y de nuevo se observan como bacilos de crecimiento activo (Prescott et al., 2005). Existe ahora mucha evidencia de que especies de este género pueden utilizar un amplio y diverso rango de substratos orgánicos como única fuente de carbono y energía.

15

Rhodococcus sp

Rhodococcus es un género de bacterias aerobias Gram-positivas que no esporulan y no son móviles, genéticamente relacionadas con las *Mycobacteria* y las *Corynebacteria* (Van der Geize y Dijkhuizen, 2004), mientras algunas especies son patogénicas, la mayoría son inocuas. Algunas cepas de *Rhodococcus* tienen aplicaciones industriales importantes, tienen la capacidad de catabolizar una gran cantidad de compuestos y por otro lado pueden producir compuestos bioactivos, como acrilamida y ácido acrílico (McLeod et al., 2006). El género *Rhodococcus* ha sido reportado como un grupo bacteriano con alto potencial para biodegradar compuestos aromáticos, tales como quinolinas, derivados de piridinas, catecoles, benzoatos, etc. Para el

25

caso de AT, en los documentos JP 10-327848 y JP 10052256 se han protegido internacionalmente procesos en donde diferentes tipos de *Rhodococcus* han sido capaces de degradar este compuesto en condiciones aerobias.

5 *Comamonas sp*

El género *Comamonas* son proteobacterias gram-negativas de forma bacilar. Este género ha sido reportado como un potencial degradador de AT en condiciones aerobias. Se ha reportado su capacidad de degradación de isoftalato y tereftalato como únicas fuente de carbono y energía. El género *Comamonas* también ha sido utilizado durante procesos de biodegradación de compuestos aromáticos similares como por ejemplo, fenol, clorofenol y compuestos bifenilos policlorados.

Una alternativa que surge actualmente hacia la disposición de los lodos, es la utilización de bacteriófagos. La potencial aplicación de las técnicas con fagos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales puede reducir las emisiones de efluentes y lodos al ambiente (Withey et al., 2005). El tratamiento con fagos tiene el potencial de controlar los problemas en los procesos ambientales de tratamiento de aguas residuales tales como: espuma en plantas de lodos activados, bacterias patógenas y reducir la competencia entre bacterias no deseadas, y poblaciones microbianas funcionalmente importantes. La aplicación exitosa de la terapia fágica al tratamiento de aguas residuales requiere un completo entendimiento de las interacciones y dinámicas de las comunidades microbianas. Se deben desarrollar también estrategias para hacer frente a la especificidad del huésped y la resistencia de la célula huésped, al igual que consideraciones de seguridad en relación con la emergencia de patógenos (Withey et al., 2005).

La habilidad de los bacteriófagos (fagos) para lisar y/o lisogenizar sus bacterias huéspedes les permite ser usados como herramientas biológicas (Thomas et al., 2002). La alta frecuencia de

partículas virales en el medio ambiente tiene un efecto positivo a nivel ecológico, ya que la predación de bacterias constituye un factor de control y a la vez de estímulo para el crecimiento de las poblaciones bacterianas (Ashelford et al., 2003).

5 **Obtención de astaxantina mediante *Xanthophyllomyces dendrorhous***

Xanthophyllomyces dendrorhous es reconocida como un basidiomiceto basándose en su morfología, las paredes celulares, el modo de formación de yemas, la pigmentación y las propiedades metabólicas (Johnson 2003). Tiene un color entre rojo y anaranjado, es capaz de fermentar glucosa y producir carotenoides.

- 10 Debido a que pertenece a la familia de los basidiomicetos, estas son heterotálicas. La actividad sexual usualmente requiere el acoplamiento con una cepa compatible (Libkind et al., 2007). Golubev en 1995 encontró un ciclo sexual en cepas aisladas y, debido a esto, designó la cepa *Xanthophyllomyces dendrorhous* como el estado teleomorfo de la cepa *Phaffia Rhodozyma*; y aunque es común asumir que todas las cepas de esta levadura se puedan designar como *X.*
- 15 *dendrorhous*, son especies distintas (Johnson 2003).

- El principal carotenoide producido por *X. dendrorhous* es la astaxantina, un compuesto que no puede ser encontrado en otras especies de levaduras (Libkind et al., 2007). *Phaffia rhodozyma* o *Xanthophyllomyces dendrorhous* son los mejores candidatos para la producción natural de
- 20 astaxantina comparado con otros microorganismos como las bacterias *Agrobacterium auratim* por sus rendimientos y el alga *Haematococcus pluvialis* ya que esta supone la necesidad de amplias superficies marinas para su cultivo, la existencia de contaminaciones y la dificultad del control de los factores ambientales.

- 25 La astaxantina (3,3-dihidroxi- β -caroteno- 4,4-diona) es una xantofila roja, configurada con dos

funciones alcohol y dos cetonas, con un peso molecular de 596.86 uma y un punto de fusión de 217- 219°C. Es producida comercialmente como suplemento alimenticio, principalmente para la acuicultura de salmónidos y utilizada también en alimentos de aves de corral, crustáceos y aves exóticas (Goswami et al., 2010).

5

La astaxantina es una sustancia química fina, que tradicionalmente ha sido producida por síntesis química total, pero el proceso requiere de varios pasos, y aunque actualmente domina el mercado, la astaxantina que venden son una mezcla de cuatro isoformas quirales y por lo tanto no tienen el mismo efecto que la que es producida naturalmente (Schmidt, et al. 2011).

10

Referencias

- Afring RP, Chalker BE, Taylor BF (1981). Degradation of phthalic acids by denitrifying, mixed cultures of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 41:1177-1183.
- Ashelford KE, Day MJ, Fry JC (2003). Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol* 69:285–289.
- Baker KH, Herson DS (1999). Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens. *Water Environ Res* 71:530–551.
- Brown WC, Vellom D, Schnepf E, Greer C (1978). Purification of a surface-bound hexosaminidase from spores of *Bacillus cereus* T. *FEMS Microbiol Lett* 3:247-251.
- 20 Conn IJ (1948). The most abundant groups of bacteria in soil. *Bacteriol Rev* 12:257-273.
- El-Tarabily KA, Kurtböke ID, Hardy GE StJ (1995). Partial characterisation of *Streptomyces* phages isolated from the soils of jarrah forest in Western Australia. In: Locci R, Lechevalier H, Williams ST, eds, *Actinomycetes*. anno VI, no. 1, vol. 6. Gorizia, Italy: The International Center for Theoretical and Applied Ecology.
- 25 Golubev W (1995). Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (X. *dendrorhous*). *Yeast* 11:101-

110.

Goswami G, Chaudhuri S, Dutta S (2010). The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1925–1939.

Johnson EA (2003). *Phaffia rhodozyma*: Colorful odyssey. *Int Microbiol* 6:169-174.

- 5 Keddie RM, Jones D (2006). The genus *Arthrobacter*, p. 945–960. In Martin Dworkin (ed.), *Archaea, Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. The prokaryotes*, 3rd ed., vol. 3. Springer-Verlag, New York, NY.

Kleerebezem R, Beckers J, Hulshoff Pol LW, Lettinga G (2005) High rate treatment of terephthalic acid production wastewater in a two-stage anaerobic bioreactor. *Biotechnol. Bioeng*

10 91:169–179

Kleerebezem R, Mortier J, Pol LWH, Lettinga G 1997. Anaerobic pre-treatment of petrochemical effluents: terephthalic acid wastewater. *Water Sci Technol* 36:237–248.

Kleerebezem R, Pol LWH, Lettinga G 1999. Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. *Appl Environ Microb* 65:1152-1160.

- 15 Le Marrec C, Moreau S, Loury S, Blanco C, Trautwetter A (1996). Genetic characterization of site-specific functions of gAAU2 infecting ‘*Arthrobacter aureus*’ C70. *J Bacteriol* 178:1996-2004.

Liang DW, Zhang T, Fang HHP (2007). Anaerobic degradation of dimethyl phthalate in wastewater in a UASB reactor. *Water Res* 41:2879-2884.

- 20 Libkind D, Ruffini A, van Broock M, Alves L. Sampaio JP (2007). Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the Basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* 73:1120-1125.

Masuda T, Miwa Y, Tamagawa A, Mukai SR, Hashimoto K, Ikeda Y (1997). Degradation of waste poly(ethylene terephthalate) in a steam atmosphere to recover terephthalic acid and to

- 25 minimize carbonaceous residue. *Polym Degrad Stabil* 58:315-320.

- McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Myhre M, Fernandes C (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15582–15587.
- McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Myhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W,
 5 Lillquist AL, Wang D, Dosanjh M, Hara H, Petrescu A, Morin RD, Yang G, Stott JM, Schein
 JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJ, Hølt R, Brinkman FS, Miyauchi K,
 Fukuda M, Davies JE, Mohn WW, Eltis LD (October 17, 2006). The complete genome of
Rhodococcus sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *PNAS* 103: 15582–
 15587
- 10 Prescott LM, Harley JP, Klein DA 2005. *Microbiology*, 6th ed. McGraw-Hill, New York.
- Qiu YL, Sekiguchi Y, Hanada S, Imachi H, Tseng IC, Cheng SS, Ohashi A, Harada H,
 Kamagata Y (2006). *Pelotomaculum terephthalicum* sp. nov., and *Pelotomaculum*
isophthalicum sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic
 association with a hydrogenotrophic methanogens. *Arch. Microbiol* 185:172-182.
- 15 Schmidt J, Dissing BS, Ljungqvist MG, Frosch S, Ersbøll BK, Nielsen ME (2011).
 Multispectral imaging of the effects of β -glucans on wound healing in fish, 12th Scandinavian
 Symposium of Chemometrics, Billund, Denmark, June, 2011.
- Thiruvengkatachari R, Kwon T, Jun JC, Balaji S, Matheswaran M, Moon S (2007). Application
 of several advanced oxidation processes for the destruction of terephthalic acid (TPA). *J Hazard*
 20 *Mater* 142:308-314.
- Thomas JA, Soddell JA and Kurtboke DI (2002). Fighting foam with phages? *Wat Sci Tech*
 46:511-553.
- Vamsee-Krishna C, Prashant SP (2008). Bacterial degradation of phthalate isomers and their
 esters. *Indian J Microbiol* 48:19-34.
- 25 Van der Geize R, Dijkhuizen L (2004). Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for

environmental and biotechnological applications. *Microbiology* 7:255–261.

Withey AA, Marsden GL, Holden MT, Stabler RA, Husain SE, Vass JK, Butcher PD, Hinds J, Lindsay JA (2005). Design, validation, and application of a seven-strain *Staphylococcus aureus* PCR product microarray for comparative genomics. *Appl Environ Microbiol* 71:7504–7514.

5

Sumario de la invención

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención brindar un proceso que mediante la degradación de ácido tereftálico utilizando cultivos puros o mixtos (lodos) hidrolizados por un proceso físico o biológico, funcionen como sustrato para la obtención de astaxantina utilizando

10 *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Otro objetivo de la invención es, caracterizar un bacteriófago que sea específico de *Arthrobacter sp.* para inactivar a dicho microorganismo de manera biológica y permitir la descripción de astaxantina mediante *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

15

Breve Descripción de las Figuras de la Invención

Las figuras 1A y 1B se refieren a los perfiles observados para la degradación de AT (1A) y crecimiento de biomasa (1B).

20

La figura 2 se refiere al comportamiento de la levadura (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) en el medio propuesto.

La figura 3 se refiere al ensayo del contenido de ADN del bacteriófago que infecta la cepa *Arthrobacter sp.*

La figura 4 muestra placas de lisis producidas por el bacteriófago que infecta *Arthrobacter sp.* Dilución del stock 10^{-5} .

25 Las figuras 5A y 5B son micrografías electrónicas del bacteriófago que infecta la cepa de

Arthrobacter sp vistas en una escala de 100 nm (5A) y 20 nm (5B).

La figura 6 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la extracción.

La figura 7 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la purificación de ADN viral.

La figura 8 se refiere a la electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la digestión de ADN viral y el plásmido con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI.

La figura 9 se refiere a la electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la purificación de las digestiones con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a la obtención de astaxantina utilizando *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a partir de la biomasa generada durante la degradación de ácido tereftálico (AT) por bacterias del género *Rhodococcus sp*, *Comamonas sp* y *Arthrobacter sp*. Los microorganismos resultantes de la degradación de AT se conocen como lodos. La hidrólisis de dichos lodos se puede llevar a cabo tanto por un método físico como por un método biológico. A

15 continuación se describen detalladamente todas las etapas que involucra la presente invención:

A. Aislamiento de microorganismos capaces de degradar AT.

Con el fin de aislar microorganismos capaces de degradar el AT a partir de suelo contaminado con AT, el cual se introduce en un contenedor estéril previamente llenado con medio de cultivo que contiene AT, NH₄OH, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O y NaCl. Los contenedores se incuban a 28

20 °C y 200 rpm durante cinco días.

Posteriormente se extraen 5 mL para inocular 100 mL de medio fresco en las mismas condiciones. Repetir este procedimiento cinco veces antes del aislamiento en cajas Petri. Las

25 muestras del último cultivo se utilizan para el aislamiento por el método de dilución en serie

(entre uno y seis) en cajas Petri que contenían 500 mg L⁻¹ de AT puro, 200 mg L⁻¹ de NH₄OH, 10 mg L⁻¹ de KH₂PO₄, 7 mg L⁻¹ de MgSO₄ 7H₂O y 75 mg L⁻¹ de NaCl; y 1500 mg L⁻¹ agar bacteriológico. Después del aislamiento y varios pasos de propagación, se identifican tres morfologías diferentes. La identificación de las bacterias se realiza mediante amplificación por PCR del gen 16S ADNr.

Una colonia de cada una de las cepas aisladas se utiliza para la extracción de ADN empleando un kit de extracción de ADN (ChargeSwitch gDNA mini kit de bacterias, Invitrogen, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos del gen 16S ADNr extraídos a partir del ADN genómico fueron amplificados con la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) en un termociclador (Corbett Research Pty Ltd, Australia). Se utilizan los primers Bac 1F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), Bac910R (5'-CCTGGGGAGTACGGYCGCAAG-3'), 800F (5'-CGTGGACTACCAGGGTATCTA-3') y 1400R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCG-3') para el análisis de las cepas aisladas. La amplificación se inicia con la desnaturalización a 94°C durante 60 s, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 57°C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 60 s. Los productos de PCR son confirmados en un gel de agarosa al 0.7 (w/v) por electroforesis y purificados mediante el uso de un kit de purificación (GFX PCR DNA, GE Healthcare). Los fragmentos de las secuencias son alineadas con el software Mega 5 y se comparan con secuencias similares de los organismos de referencia con BLAST.

A partir del suelo contaminado con AT, tres bacterias fueron aisladas e identificadas, las cuales son *Arthrobacter sp*, *Comamonas sp*. y *Rhodococcus sp*. En una primera parte se utilizan cultivos puros y cultivos mixtos de *Comamonas sp*. y *Rhodococcus sp*. para llevar a cabo una caracterización cinética y estequiometrica del proceso de biodegradación del AT en condiciones

aerobias.

B. Degradación de ácido tereftálico

La degradación de AT con *Arthrobacter sp.*, *Comamonas sp.* y *Rhodococcus sp.* se lleva a cabo
 5 agregando agua contaminada con AT.

Para el caso de *Arthrobacter sp.* se llevaron a cabo ensayos de biodegradación en matraz agitado
 a una concentración de 2.750 g TOC L⁻¹ de AT. Los resultados indican que *Arthrobacter sp.* es
 capaz de llevar a cabo una mineralización completa del AT en condiciones aerobias.

10

Los resultados tal como se describe en la Tabla 1 muestran que los microorganismos son
 capaces de degradar completamente el agua contaminada con AT ya que se observó una total
 mineralización del AT. Una vez que se caracterizo el contenido de AT en el agua residual
 mediante análisis de Carbono Orgánico Total (COT), se hicieron diluciones del agua residual
 15 para obtener 5 diferentes concentraciones de AT como se aprecia en la Tabla 1. La tasa de
 degradación se incrementó conforme se incrementó la concentración de AT.

Tabla 1. Degradación de AT con cultivos puros de *Comamonas sp.*, *Rhodococcus sp.* y cultivo mixto, a diferentes VTO's

VTO _L	AT (g TOC L ⁻¹)				
	1.375	2.750	4.125	5.500	8.250
	Velocidad de remoción (g TOC L ⁻¹ h ⁻¹)				
<i>Rhodococcus sp.</i>	0.023 ±	0.033 ±	0.045 ±	0.038 ±	0.018 ±
	0.001	0.003	0.002	0.004	0.004

<i>Comamonas sp.</i>	0.031 ±	0.043 ±	0.053 ±	0.046 ±	0.024 ±
	0.002	0.004	0.003	0.004	0.004
Cultivo mixto	0.054 ±	0.084 ±	0.102 ±	0.060 ±	0.032 ±
	0.004	0.006	0.007	0.004	0.002
VTO_H	Velocidad de remoción (g TOC L⁻¹ h⁻¹)				
<i>Rhodococcus sp.</i>	0.034 ±	0.047 ±	0.062 ±	0.048 ±	0.027
	0.001	0.001	0.003	0.005	±0.003
<i>Comamonas sp.</i>	0.041 ±	0.055 ±	0.073 ±	0.056 ±	0.035 ±
	0.003	0.002	0.004	0.003	0.003
Cultivo mixto	0.082 ±	0.128 ±	0.159 ±	0.098 ±	0.075 ±
	0.006	0.009	0.011	0.007	0.005

Asimismo la Tabla 1 muestra que el cultivo mixto de *Comamonas sp.* y *Rhodococcus sp.* tiene una mayor tasa de degradación no importando las condiciones de la VTO. La caracterización cinética y estequiométrica de las cinco diferentes concentraciones iniciales de AT se llevó a cabo sólo con el cultivo mixto en las condiciones de VTO_H.

Las figuras 1A-1B muestran los perfiles observados para la degradación de AT (Figura 1A) y el crecimiento de la biomasa (Figura 1B) a 1.375, 2.75, 4.125 y 5.50 g TOC L⁻¹ para VTO_H y VTO_L. En la misma figura puede observarse que existe una fase lag en las pruebas, seguida de la fase log donde se observó el consumo de AT y crecimiento de la biomasa. La fase lag puede tomar varias horas y es atribuida principalmente a los cambios repentinos en el entorno como la temperatura, el tipo de sustrato o la concentración de sustrato. La duración de la fase de latencia (t_L) fue estimada con diferentes concentraciones iniciales de AT, la fase de latencia presenta un crecimiento exponencial a una velocidad proporcional a la concentración inicial de AT.

C. Hidrólisis de la biomasa resultante de la degradación de AT.

Este proceso se llevar a cabo por dos vías:

- 5 i) Hidrólisis física: Posterior a la degradación de AT, inactivar uno de los cultivos puros de *Rhodococcus* sp. mediante calor a $121^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 25 minutos.
- ii) Hidrólisis biológica:
 - a) Caracterización del fago.

10 En primer lugar se lleva a cabo la caracterización del ADN del bacteriófago. Para la inactivación de *Arthrobacter* sp se caracteriza un bacteriófago específico como se detalla a continuación:

15 I. Caracterizar con aireación en medio PYCa (peptona, extracto de levadura, nitrato de calcio) y medio de ácido tereftálico (ácido tereftálico 5 g/l, NaOH 2.41 g/L, NH_4NO_3 0.814 g/L, KH_2PO_4 0.150 g/L, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g/L y NaCl 0.075 g/L). Las diferentes cepas bacterianas utilizadas se mantienen viables a través de dos métodos. Por una parte se resiembran en los correspondientes medios sólidos cada 2 semanas y se guardan a 4°C . Por otra parte, también se mantienen a través de la congelación a -70°C . Para ello cultivos líquidos de 18 horas son centrifugados (4.000 xg, 10 minutos) y las células se resuspenden en glicerol 10 % hasta 1/5 del volumen de cultivo inicial. Esta

20 suspensión se guarda a -70°C .

25 II. Inocular medio PYCa líquido con una colonia de la cepa bacteriana, se incuba en agitación continua (200 rpm) por toda la noche a 30°C . Posteriormente, en un tubo estéril se adiciona el cultivo bacteriano, y el medio PYCa suave (previamente derretido). Se mezcla perfectamente en vortex, se vierte sobre una caja Petri preparada con medio

PYCa sólido para formar un ligero tapiz bacteriano. Se deja solidificar a temperatura ambiente y se incuba a 30 °C durante 16 horas.

5 III. Inocular en frascos que contienen el medio PYCa, con la suspensión de las bacterias huésped *Arthrobacter sp.* y la muestra de suelo a granel (EL-Tarabily et al., 1995). Estas son incubadas en un agitador (Orbital INO 650V-7) a 200 rpm durante 48 h a 30 °C. Tras la incubación, las suspensiones se centrifugan durante 20 minutos a 5000 x g y el sobrenadante se filtra a través de membranas estériles con un tamaño de poro de 0.22µm y se recolecta en tubos estériles. Se gotea el filtrado en cajas Petri con agar PYCa, en las
10 que previamente una suspensión de los huéspedes (overnight) ya se han esparcido en cajas Petri con medio PYCa, las cuales se secan durante 30 minutos en una campana de flujo laminar. Se incuban las cajas Petri a 30°C durante 24 h y se observan para ver calvas de lisis. Las calvas de lisis se retiran de las placas de agar y se resuspenden caldo de PYCa durante 24 horas. Una muestra de este caldo se filtra y se gotea en cajas Petri
15 con medio PYCa previamente inoculadas con los posibles huéspedes. Las calvas de lisis individuales que se desarrollaron en estas cajas se retiran, se resuspenden, se filtran y estas suspensiones de fagos purificados son almacenadas a 4 ° C.

20 IV. La concentración de partículas virales infecciosas en el stock se mide por ensayo en placa como se describe a continuación: se inocula en medio PYCa, una sola colonia bacteriana apropiada de *Arthrobacter sp.* y se deja crecer a 30° C con agitación a 200 rpm. Se funde agar por calentamiento. Las alícuotas de agar fundido o agarosa se almacenan sobre un bloque calefactor o un baño de agua a 47° C para mantener la solución fundida. Se preparan diluciones en series de 10, del stock de bacteriófagos, y se
25 mezcla cada dilución en vortex tapando el lado superior del tubo. Se reparte cultivo

overnight del paso 1 dentro de una serie de tubos estériles. Se adiciona cada dilución del stock de bacteriófago a un tubo que contiene la bacteria de interés y se mezclan las bacterias y los bacteriófagos por agitación suave en vortex. Se incuba la mezcla por 20 min a 30° C para permitir que las partículas del bacteriófago fuesen adsorbidas a la bacteria. Se adiciona una alícuota del agar fundido al primer tubo. Se mezcla suavemente el contenido en vortex por 5 segundos y, se vacía el contenido total del tubo sobre el centro de una placa con agar. Se repite el procedimiento hasta que el contenido de todos los tubos es transferido a placas separadas y etiquetadas. Se coloca nuevamente la tapa de la placa y se permite que la superficie de la placa con agar se solidificara por 5 minutos a temperatura ambiente. Se invierten las placas cerradas y se incuban a 30° C toda la noche. El título final del stock se determina aplicando la siguiente fórmula matemática: $\text{upf/mL} = (\text{No. de calvas/Vol. Goteado (mL)}) \cdot (\text{última dilución con calvas})$.

V. Extracción y purificación del ADN del bacteriófago. Se prepara una solución de DNasa pancreática I (1 µg/ml) como se menciona a continuación. Se diluye 1 µL de la solución de stock de DNasa I con 1 mL del buffer de dilución DNasa I puesto en hielo previamente. Se mezcla la solución. La solución se almacena en hielo hasta su uso. Se transfirieren 200 µL del stock del bacteriófago a un tubo para microcentrifuga (HERMLE Z233 MK-2). Se agregan 20 µL de la solución de trabajo de DNasa pancreática y la mezcla se incuba por 45 minutos a 37 °C. Se agregan 80 µL de una mezcla de colorante 2.5X SDS-EDTA y se incuba el tubo cerrado por 5 minutos a 65 °C. La muestra se carga en un gel con 0.7% de agarosa. Para reducir el deterioro del ADN se irradia el menor tiempo posible. Se corta del gel de agarosa el fragmento de interés y se transfiere la porción del gel cortada al tubo ya pesado y se registra el peso. Se agrega – solución de enlace a membrana- en una proporción de 10 µl de solución por cada 10 mg

de gel de agarosa. Se mezcla usando vortex y se incuba durante 10 minutos a 60°C. Se coloca una minicolumna SV en un tubo de colección y se transfiere la mezcla gel-solución de enlace a membrana a la minicolumna y se incuba por 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifuga a 16,000 x g (14 000 rpm) por 1 minuto. Se remueve la minicolumna SV y se desecha el líquido del tubo de colección. Se regresa la minicolumna SV al tubo de colección y se lava agregando 700 µl de –solución de lavado de membrana- a la minicolumna SV. Se centrifuga a 16,000 x g (14 000 rpm) por 1 minuto. Se vacía el tubo de colección y se coloca la minicolumna SV. El lavado se repite con 500 µL de solución de lavado de membrana y se centrifuga durante 5 minutos a 16,000 x g. Se remueve la minicolumna y se vacía el tubo de colección para recentrifugar durante un minuto a 16,000 x g. Se transfiere la minicolumna SV a un tubo limpio de microcentrifuga. Se aplican 50 µl de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna, se incuba a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifuga a 16,000 x g (14 000 rpm). Se desecha la minicolumna y el tubo de microcentrifuga conteniendo el ADN eluido se almacena a -20 °C.

VI. Digestión del ADN del fago y el plásmido con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción empleadas son *EcoRI*, *BamHI*, cuyas concentraciones se usan bajo las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante (Fermentas). Los volúmenes de reacción varían de los 50 a los 100 µL, pero siempre manteniendo la relación de concentraciones sugerida por los fabricantes. La cantidad de enzima empleada varía dependiendo del volumen de reacción, pero en su mayoría fue de 0.5 a 2 µl de enzima. La reacción de fosforilación se llevó a cabo con la enzima fosfatasa alcalina SAP (Shrimp alkaline phosphatase). La cantidad de enzima empleada fue de 1 µL y los volúmenes para la reacción de 10 µL. Las condiciones para las reacciones fueron 30

minutos a 37°C y 15 minutos a 65°C. La ligación de insertos en el interior del plásmido empleado se realiza con la enzima T4 DNA Ligasa de Fermentas. Los volúmenes de trabajo son de 25 µL y se siguen las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante. El volumen del buffer de reacción apropiado para la enzima fue de 2.5 µL. Los tubos de reacción son incubados de 16 a 18 h a 4°C.

5

VII. Preparación de las Células Calcio-Competentes. De una caja Petri con colonias aisladas de la cepa *E. coli* (DH5α), se pica una sola colonia y se siembra en 5 mL de medio LB y se incuba toda la noche a 200 rpm a 37 °C. Se transfiere 1 mL del inóculo a 50 mL de medio LB, el cuál es agitado a 200 rpm a 37 °C durante 5 h. Se transfiere el matraz a un recipiente con hielo y se deja incubar durante 15 min. Se transfiere el cultivo a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Se decanta el sobrenadante y las células se resuspenden en 20 mL de una solución fría y estéril de CaCl₂ [0.1 M]. Se deja en hielo 15 min y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se decanta el sobrenadante y las células se resuspenden en 10 mL de una solución fría y estéril de CaCl₂ [0.1 M]. Se deja en hielo 15 min y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se decanta el sobrenadante y las células se resuspenden en 7.5 mL de una solución fría y estéril de CaCl₂ [0.1 M]. Se deja en hielo 15 min y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se decanta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 2 mL de una solución fría de CaCl₂ [0.1 M]/glicerol al 15% Se congelan alícuotas en tubos de microcentrifuga estériles a -70 °C.

10

15

20

25

VIII. Transformación de *E. coli* DH5α. Alícuotas de 100 µL de células calcio competentes mantenidas en congelación se mezclan con 4 µL de DNA plasmídico y se incuban en hielo por 5 min. Transcurrido este tiempo se inoculan por extensión con varilla en cajas

- Petri preincubadas a 37°C con ampicilina. Posteriormente se adicionan 50 µL de IPTG 0.1 M y 70 µL de X-gal (20 mg/ml). Las cajas Petri se incuban a 37 °C hasta que el crecimiento de colonias fue el idóneo para su uso. Las colonias que llevan plásmidos de tipo silvestre o no recombinantes, contienen activa la β-galactosidasa. Estas colonias son de color azul pálido en el centro y de un color azul denso en la periferia. Por otro lado, las colonias que llevan plásmidos recombinantes no contienen activa la β-galactosidasa. Estas colonias son de color blanco cremoso o como cascara de huevo azul, algunas veces con un punto azul pálido en el centro.
- 5
- 10 IX. Extracción del plásmido. Se inoculan 2 mL de medio LB con ampicilina, con una colonia de bacteria transformada, y se incuban toda la noche a 37°C y 200 rpm. Se transfieren 1.5 mL del cultivo a un tubo para microcentrifuga. Se centrifuga a 14000 rpm durante 30 s a 4 °C. Cuando la centrifugación se completa, se remueve el medio por aspiración suave dejando el pellet tan seco como fuera posible. Se utiliza una bomba de vacío y una punta para micropipeta. Se resuspende el pellet bacterial en 100 µL de la solución de lisis alcalina I helada, utilizando vortex. Se agregan 200 µL de la solución de lisis alcalina II recién preparada a cada suspensión bacterial. Se cierra el tubo herméticamente y se invierte cinco veces rápidamente para mezclar el contenido. Se almacena en hielo. Se agregan 200 µL de la solución de lisis alcalina III helada. Se cierra el tubo y se dispersa la solución de lisis alcalina III a través del lisado bacterial viscoso invirtiendo el tubo varias veces. Se almacena el tubo en hielo durante 5 minutos. Se centrifuga el lisado bacterial a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C en microcentrifuga. Se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio.
- 15
- 20
- 25 X. Recuperación del ADN plasmidico. Se precipitan los ácidos nucleicos del sobrenadante

utilizando dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se mezcla la solución utilizando el vortex y se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se colectan los ácidos nucleicos precipitados por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se remueve el sobrenadante por aspiración suave. Las gotas en las paredes del tubo se remueven, utilizando una punta de micropipeta desechable. Se agrega 1 mL de etanol al 70% al pellet. El ADN se recupera por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se remueve el sobrenadante por aspiración suave, al igual que las gotas de etanol en las paredes del tubo. Los ácidos nucleicos se disuelven en 50 µl de TE (pH 8.0), el cual contiene 20 µg/ml de RNasa libre de DNasa. La solución se mezcla unos pocos segundos utilizando vortex y se almacena a -20°C.

XI. Secuenciación del inserto. El plásmido con el inserto ya extraído y purificado es secuenciado. Las secuencias se analizan y editan con los programas VECTOR y MEGA 5. Las secuencias son traducidas en sus seis marcos de lectura a proteína. Posteriormente son comparadas en “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en ingles, NCBI, disponible en red: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La figura 3 describe la carga de la muestra con gel de agarosa, los carriles 2 y 4 representan el ADN del bacteriófago ya que sólo estas dos muestras fueron sometidas al procedimiento descrito anteriormente. Asimismo en el carril 1 y 3 no se rompió la cápside, y en el carril 2 y 4 se rompió la cápside liberando el material genético del bacteriófago. El carril 5 representa el marcador de peso molecular.

A pesar de que el fago forma placas que fueron bastante uniformes en tamaño y apariencia como se aprecia en la Figura 4, fagos de diferentes grupos líticos muestran considerable diversidad en

la morfología de la placa, y estas diferencias en la morfología de la placa son de gran ayuda para distinguir a los bacteriófagos. Sin embargo, esto no es suficiente para poder asegurar la existencia de este. Las observaciones con el microscopio electrónico revelaron una cabeza hexagonal de 60 nm de ancho y 63 nm de largo, acoplado a una vaina (cola) de 110 nm de longitud y 9 nm de ancho. Este fago presenta una estructura entre la cápside y la cola parecida a un cuello de 34 nm de ancho. Una peculiar estructura al final de la cola parece ser evidencia de una placa basal. No se observaron fibras al final de la cola o la placa basal como se muestra en las figuras 5A y 5B.

La concentración de los fagos en Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/ml) es determinada mediante el conteo de placas. El resultado de un ensayo de placa realizado con la bacteria *Arthrobacter sp.* se obtiene de dos diluciones de los fagos, 10^{-7} y 10^{-8} , el número de placas multiplicado por el inverso de la dilución y se divide entre la cantidad de dilución añadida a la caja Petri. El promedio de las dos diluciones arroja una concentración del stock de 6.55×10^9 UFP/ml.

La figura 6 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la extracción; en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 el ADN del bacteriófago.

La figura 7 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la purificación del ADN viral; en el carril se observa muestra con ADN y en el carril 2 el marcador de peso molecular.

Las figuras 8 y 9 muestran que, tal como se describió en el procedimiento anterior, el ADN del bacteriófago y el ADN plasmidico fueron cortados con las de enzimas de restricción EcoRI y BamHI para obtener los fragmentos de diversos tamaños que se observan específicamente en la figura 8. La figura 9 muestra el gel obtenido después de la purificación. El grupo de bandas

generado por la acción de EcoRI se le identificó como inserto **B**. El grupo de bandas generado por la acción de BamHI se le identificó como inserto **A**. El que se generó por la acción simultánea de las enzimas EcoRI y BamH se le identificó como inserto **C**. De igual forma al cortar el plásmido con EcoRI y BamHI este fue nombrado como vector **D**. El plásmido cortado con EcoRI y BamHI por separado, se les denominó vector **E** y **F** respectivamente. La letra **M** fue el carril para el Marcador y la **P** para el Plásmido sin cortar.

Los insertos obtenidos de la digestión con las endonucleasas fueron ligados al vector. Se obtuvieron 12 clonas como resultado de la inserción de los distintos fragmentos genómicos del fago en el plásmido pBlueScript KS(-) II.

Los plásmidos con el inserto son secuenciados con los primers M13F y M13R (comerciales) para obtener fragmentos complementarios para que esto permitiera un mejor análisis de los mismos.

Estas secuencias de ADN son traducidas a proteínas en sus seis marcos de lectura, las secuencias proteicas son sometidas al alineamiento proteína-proteína con la base de datos en el BLAST, indicando en el mayor de los casos que no se encontraba similitud significativa a alguna proteína.

La comparación de las secuencias de las proteínas codificadas por los 6 diferentes marcos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) con las existentes en el banco de datos muestra que dos de ellas presentan una similitud con proteínas. Los resultados se muestran a continuación:

Ejemplo de proteínas que contiene el fago aislado:

ATCTGGACAGGCTTCGTAGGCCTGGTGCAGGGGATCGTCGCCGGCTTCGTGGGCTT
CCTATCCGAAGCCTTCCAAGGGGCGGTCAACACAGCAGTGTCTGTCTGGTCCGGGC
5 TTGGTGGATTCTTTTCCGGGCTCTGGGCGGAAATCGTCAACGGCGTTTCCACCGCGG
TGGGTAGCATCGGCGGCTTCTTCGAAGGGATTCCGGGCAAATCCAGGGCTTCTTC
GCCGGGGCAGGCTCTTGGCTGTACGGCTTCGGGCAGAACATCGTCCAAGGCCTTGG
CGATGGTGTGGCCTCAATGGCCGGCACCATCGGAAACTTCTTCCTCAACGCCCTCCC
GGACTTCATCCGCGAACCGTTCAAGCAGGCCCTCGGGATCGCTTCCTCGTCAAAGG
10 TCTTCGCCGGCTATGGACAGAACATCGGCGAAGGCGTGCTCGTCGGCGTCGGCCGC
ATGCAGTCCCGGATCGATGACCGGATGGCGAACCTGGTCACCGTCCCCGACTTTGC
CATGACCAGCGGTTTCGGCGGCAGCGCGTCAGGCAGCGGCACCCGGACCGGCTCCG
GCGGCGGGTCGATCGATGACCTGATCAGGGCCATCCGCGAACAGCGCCCGATCCAG
GTCAACGGAGCACCCGGCATGGACGAAGAAACCCTCGCGCGGGGCGACCGCCGAAC
15 AACTGCTGTGGAGAGGGTGA

La traducción a aminoácidos fue:

IWTGFVGLVQGIVAGFVGFLSEAFQGAVENTAVSVWSGLGGFFSGLWAEIVNGVSTAVG
20 SIGGFFEGIPGKIQGFFAGAGSWLYGFGQNIVQGLGDGVASMAGTIGNFFLNALPDFIRE
PFKQALGIASSKVFAGYGQNIGEGVLVGVGRMQSRIDDRMANLVTVPDFAMTSGFGG
SASGSGTRTGSGGGSIDDLIRAIREQRPIQVNGAPGMDEETLARATAEQLLWRG*

Secuencia 2:

GATCAGCTCCATGCAGCTCGCCAAGCTCAACGCCGGCGTCTGGCGCCCGGAGGATC
TGACCAACGGCCACATCCTCAACGACCTGAGAGGAGCCTGATGGACTCCTGCGACC
5 TGGGCTATGTGTACCGCACCGAGCTGCCTGATGGCAGGGTGCTGAAGCTGCCGTAC
CGAATCGCGCTCAAGCAGACCGCCTATCCAAACGCCTGCATCTTCCACGACGAGGA
GCCCATCCCGGCAGCGCCTGGCAGCCATCTCTGCCCCATGTGCGCGGAAGGACTTA
CCAAGAGCGTCACCGACATTGCCGAGTCTTGGTCTGACCTCGAAGACGCCATGCTT
CCTGGCGGACGTGCCACCAACTCCGAACCTGTCAGCGGCGGCAAGGATCTCTACCC
10 GCCGCTGCCGATCAACACCGACGTGGCCGACGTCCGGGCCCCGCGCCCTCGCCATCA
TCAGGACAATCATTGGCCAGCTGATCCTTGACCTGCCCCGACCGCCGTCTTCCCGCCG
ATCAGTCCGCCGGCCTGCTGGCCAGCTGGCTGGTCAACTGGCACGGCGCCTACCTC
ACCACCCACCCATCCGCCGGCCATGTACGCGCCATCTGCACTGAGCTGGCCGCCGT
CGCCTGGGACGTCCGAGGCGTGATCTACCGCAGCAAGCCAGTAGAGGTGAAGATCC
15 AGTCAGGCCAGTGCCACCAGCTGGTGGCCGGCCCCGGACCCGAAGACCAAGCTGCCC
TGCCGAGGGGAAGTGATCGCCGTCCAGACGCCGGACGGGAAGAAAGGTAGTCCGG
TGCAGCGTGGACATCACACACCGAGTGCCGGCGGACCAGTGGTTCTACACCCACGC
CAACCGGCGCCCCGGGCAGGGCAGCCACCGCACTCAAGAAGAAGTACATGAAGGTG
AGGCAGTGAAGATGTTTCATCAGTCAGTTGTTACCCATCGCCCCGACCCTGGAAACG
20 GATGTTTATCCGCAGCGTGCGACATGGGCTCGCGGACGTCCTCGAATGGCTTGGTG
GAGGAAGTTGGCCCCATGCCGGCGAGCAAATACACGCATCCTCGCCGCAGTCAGCT
GA

La traducción a proteína fue:

DQLHAARQAQRRRLAPGGSDQRPHPQRPERSLMDSCDLGYVYRTELPDGRVLKLPYRI
ALKQTAYPNACIFHDEEPIPAAPGSHLCPMCAEGLTKSVTDIAESWSDLEDAMLPGGRA
5 TNSEPVSGGKDLYPPLPINTDVADVRARALAIIRTIIGQLILDLPDRRLPADQSAGLLASW
LVNWHGAYLTTHPSAGHVRAICTELAAVAWDVIRGVIYRSKPVEVKIQSGQCHQLVAG
PDPKTKLPCRGEVIAVQTPDGKKGSPVQRGHHTPSAGGPVVLHPRQPAPGQGSHTQE
EVHEGEAVKMFISQLLPIAPTLETDVYPQRATWARGRPRMAWWRKLAPCRRANTRILA
AVS

10

b) Hidrólisis de los lodos.

Las pruebas para la hidrólisis de los lodos se realizan con las bacterias en un medio con ácido tereftálico. Tres matraces que contienen el medio ácido tereftálico se inoculan con 10% de un cultivo de bacterias almacenado en glicerol al 10%, y se incuban a 30 °C con agitación (200
15 rpm). Se toman muestras cada día y se mide la absorbancia a 570 nm. Después de 7 días de incubación, el cultivo de 100 mL se inocula con 200 µL de la suspensión del bacteriófago y se toman muestras cada hora para medir absorbancia. La hidrólisis completa de los lodos se puede apreciar después de un día de infección con el fago.

20 D. Obtención de astaxantina

Determinar el contenido de nitrógeno total a la biomasa obtenida y el contenido de carbono total (COT) por medio de un analizador COT; esto con el objeto de encontrar las relaciones C/N del medio.

25

La formulación del medio se realizó variando las relaciones C/N del medio. Teniendo en cuenta el hecho que a mayores relaciones, mayor será la obtención de astaxantina por parte de la levadura.

- 5 Evaluar el crecimiento de la levadura *X. dendrorhous*, mediante la cuantificación de biomasa en peso seco y turbidimetría, esto se puede apreciar en la figura 2. También se cuantifica la astaxantina por medio del método de carotenoides totales y glucosa por medio del método del DNS.
- 10 Se realiza la elección del medio realizando un análisis estadístico ANOVA para evaluar el efecto de las diferentes relaciones C/N en la obtención de astaxantina por parte de la levadura. La obtención de astaxantina es muy similar por el medio de hidrólisis física y biológica. A manera de ejemplo se describen los resultados obtenidos para la hidrólisis física.

15

Ejemplo 1.

- La obtención de Astaxantina se realizó a nivel matraz erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL de medio de cultivo. Adicionalmente se inoculo el matraz con 10 mL de un cultivo de *X. dendrorhous* en crecimiento exponencial. Las condiciones de operación fueron 250 rpm, a un
- 20 pH de 5.5 y 20 °C. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en cuanto contenido de nitrógeno y carbono de los componentes del medio YM utilizado como referencia para el crecimiento de la levadura *X. dendrorhous*, así como también de la bacteria *Rhodococcus sp.*

25

Tabla 2. Contenido de nitrógeno y carbono de los sustratos utilizados en el medio YM y en la bacteria *Rhodococcus sp.*

Sustrato	% Nitrógeno	% Nitrógeno Proteico	% Carbono
Extracto de Levadura	7.382	46.842	-
Extracto de <i>Rhodococcus sp.</i>	7.804	48.774	-
Extracto de Malta	0.404	2.525	-
Triptona	11.973	74.832	-

Tal como se describe en la Tabla 2 el contenido de nitrógeno del extracto de levadura y del extracto de la bacteria son muy cercanos, lo cual indica que es posible utilizar este extracto como sustituto del extracto de levadura.

La figura 2 muestra el comportamiento de la levadura en el medio propuesto y se puede observar que hay un crecimiento que alcanza 4.5 g/L de biomasa. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos de la fermentación.

10

Tabla 3. Resultados de la fermentación con los lodos hidrolizados por el método físico.

Biomasa (g/l)	4.5
Astaxantina ($\mu\text{g/L}$)	5020
Astaxantina ($\mu\text{g/g}_{\text{levadura}}$)	1150
$Y_{x/s}$ ($\text{g}_{\text{levadura}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$)	0.302
$Y_{p/x}$ ($\mu\text{g}_{\text{Astaxantina}}/\text{g}_{\text{levadura}}$)	1039
μ_{max} (h^{-1})	0.033

La obtención de Astaxantina es de 5.02 mg/L con el medio rodococcus- ER y 3.90 mg/L con el medio control típico para producir astax-YM. El rendimiento de obtención de Astaxantina con respecto a la generación de biomasa fue de 1.15 mg de Astaxantina por gramo de biomasa para el medio ER y 0.98 mg de Astaxantina por gramo de biomasa para el medio YM, con lo que se

5 demuestra la efectividad del proceso según la presente invención.

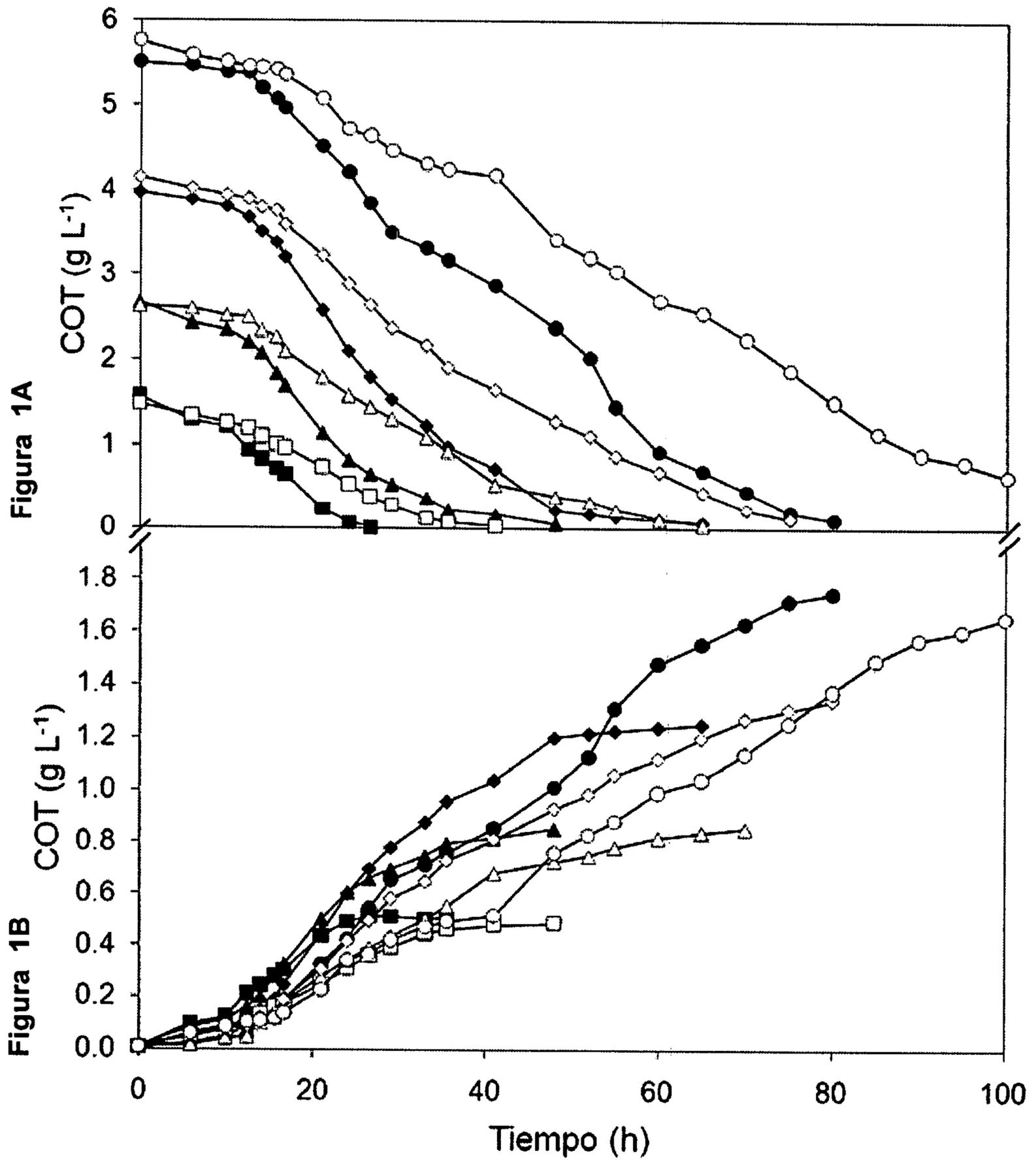
REIVINDICACIONES

1.-Un proceso biológico para la obtención de astaxantina a partir de lodos activados obtenidos de la degradación de ácido tereftálico con las bacterias *Rhodococcus* sp, *Comamonas* sp y *Arthrobacter* sp., caracterizado porque a los lodos activados se les realiza una hidrólisis térmica a $121 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 25 minutos o bien una hidrólisis mediante un bacteriófago específico cuyas secuencias son las siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, para inactivar dichas bacterias en los lodos activados y posteriormente usarlos como sustrato en la producción de astaxantina mediante la aplicación de una levadura en un ambiente de agitación en un pH de 5.5 y a una temperatura de 20°C .

2.-El proceso para la obtención de astaxantina según la reivindicación 1, caracterizado porque la levadura es *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso biológico para la obtención de astaxantina
5 utilizando la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* a partir de lodos hidrolizados
resultantes de la degradación de ácido tereftálico hidrolizados por método biológico con el
uso de un bacteriófago específico.



2 / 9

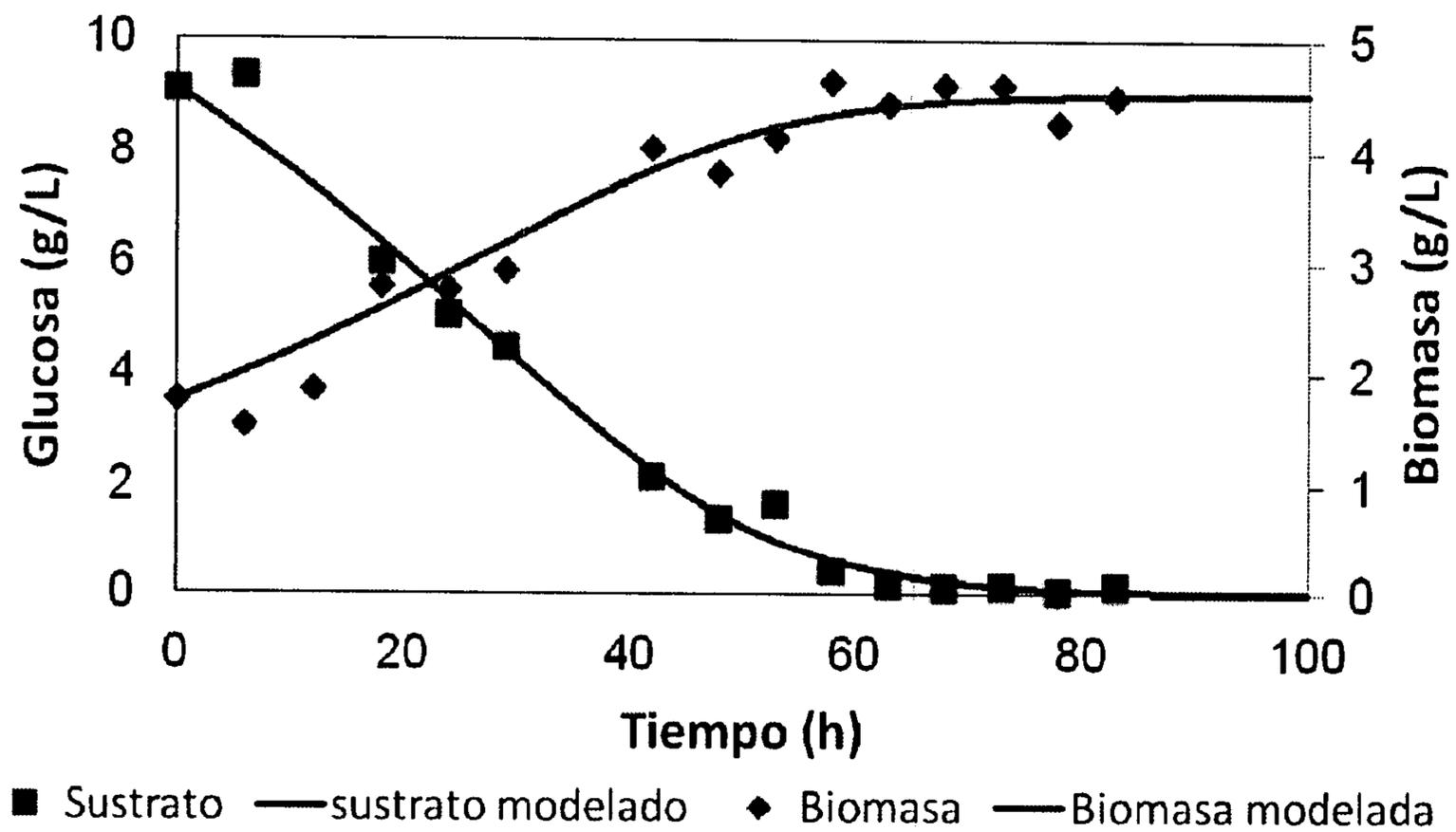


Figura 2

3 / 9

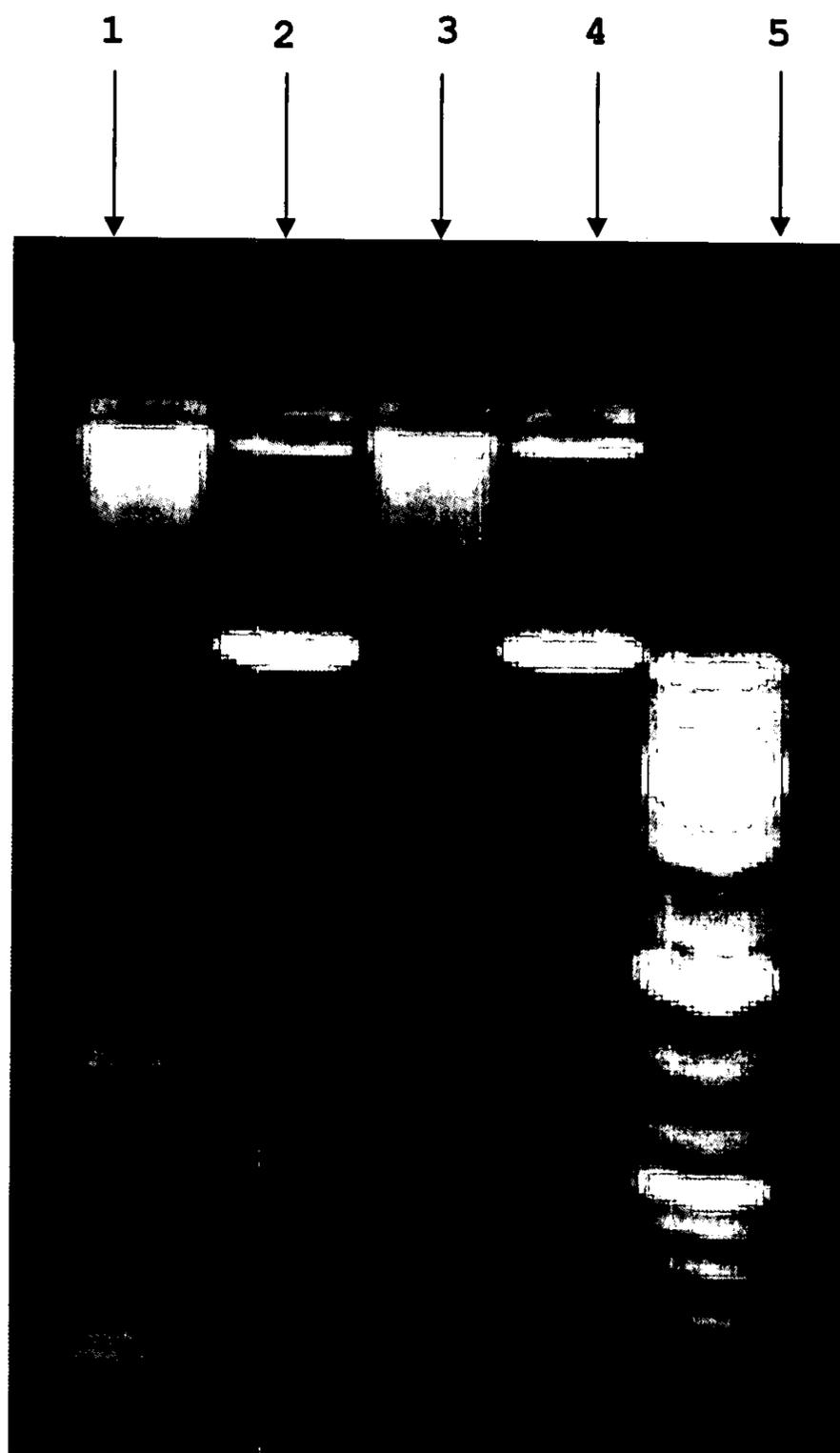


Figura 3

4 / 9

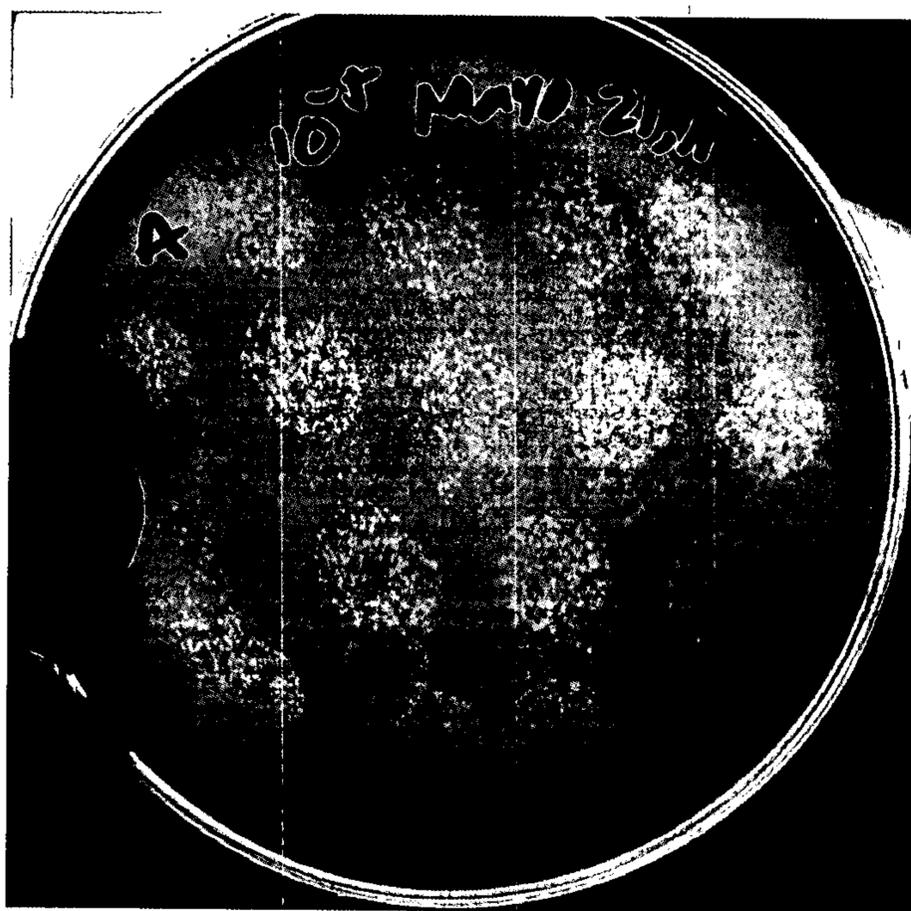


Figura 4

5 / 9

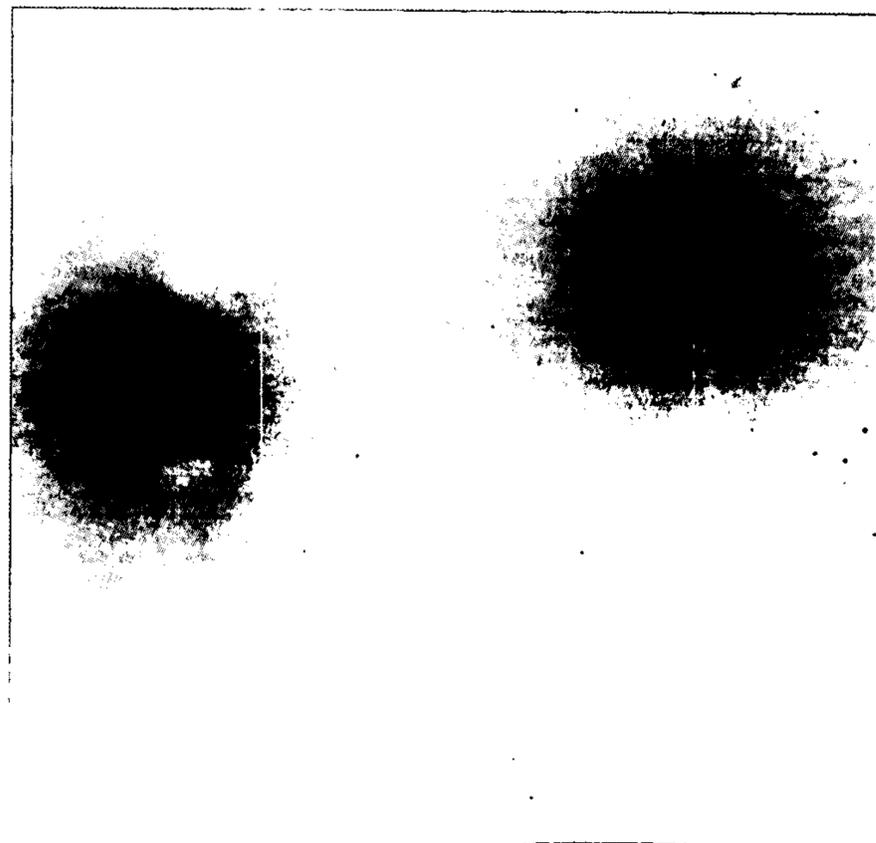


Figura 5A



Figura 5B

6 / 9

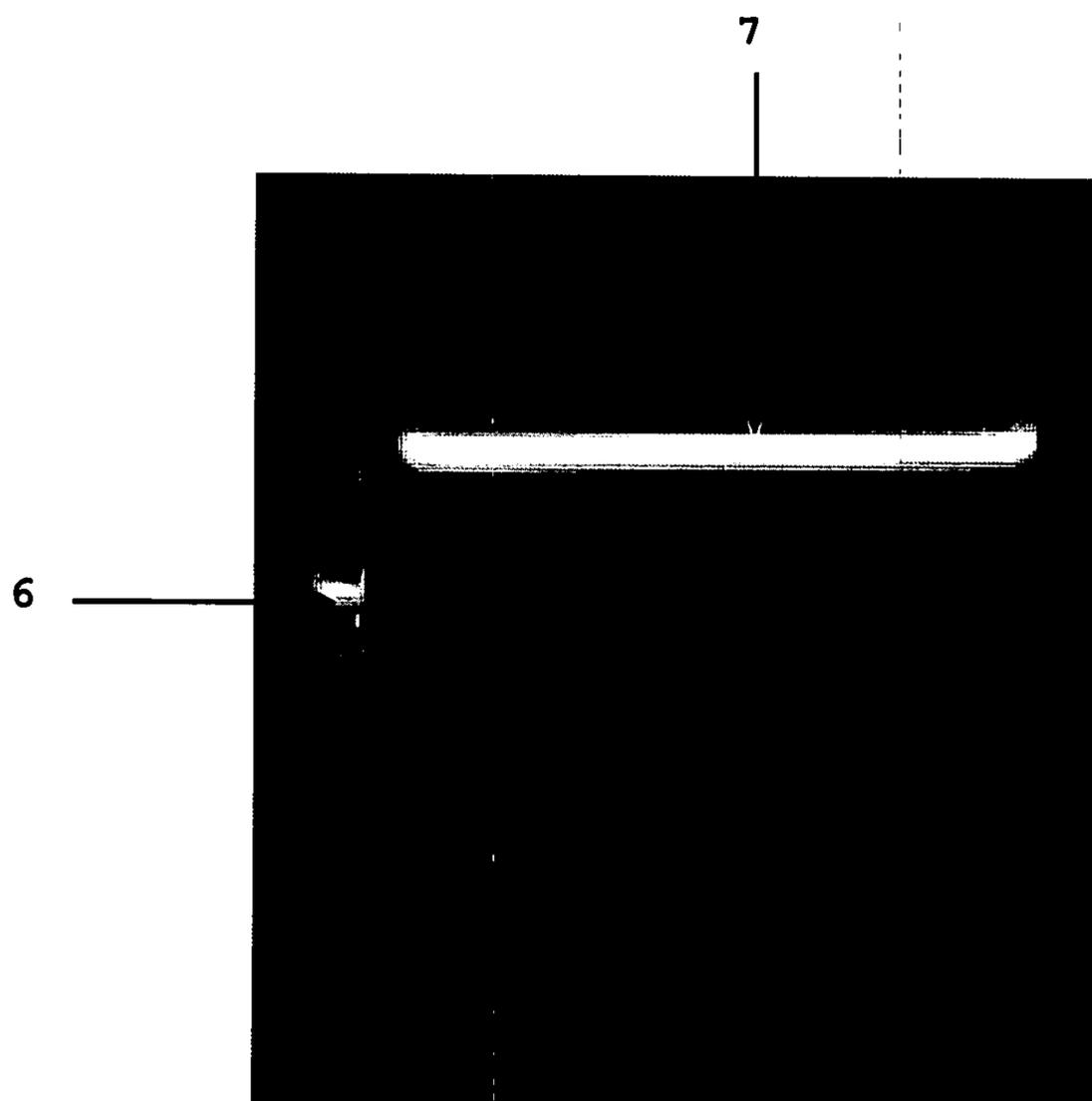


Figura 6

7 / 9

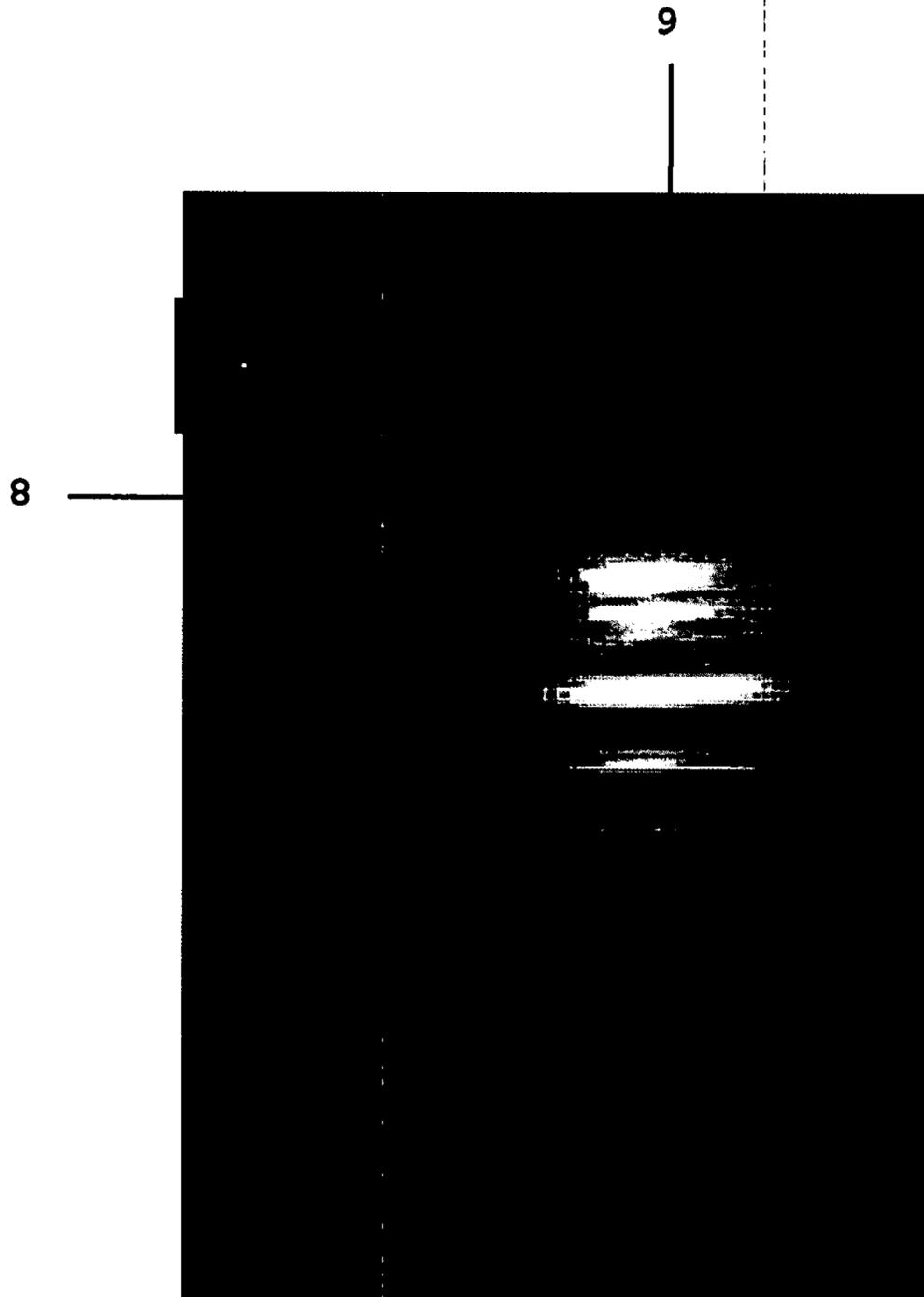


Figura 7

8 / 9

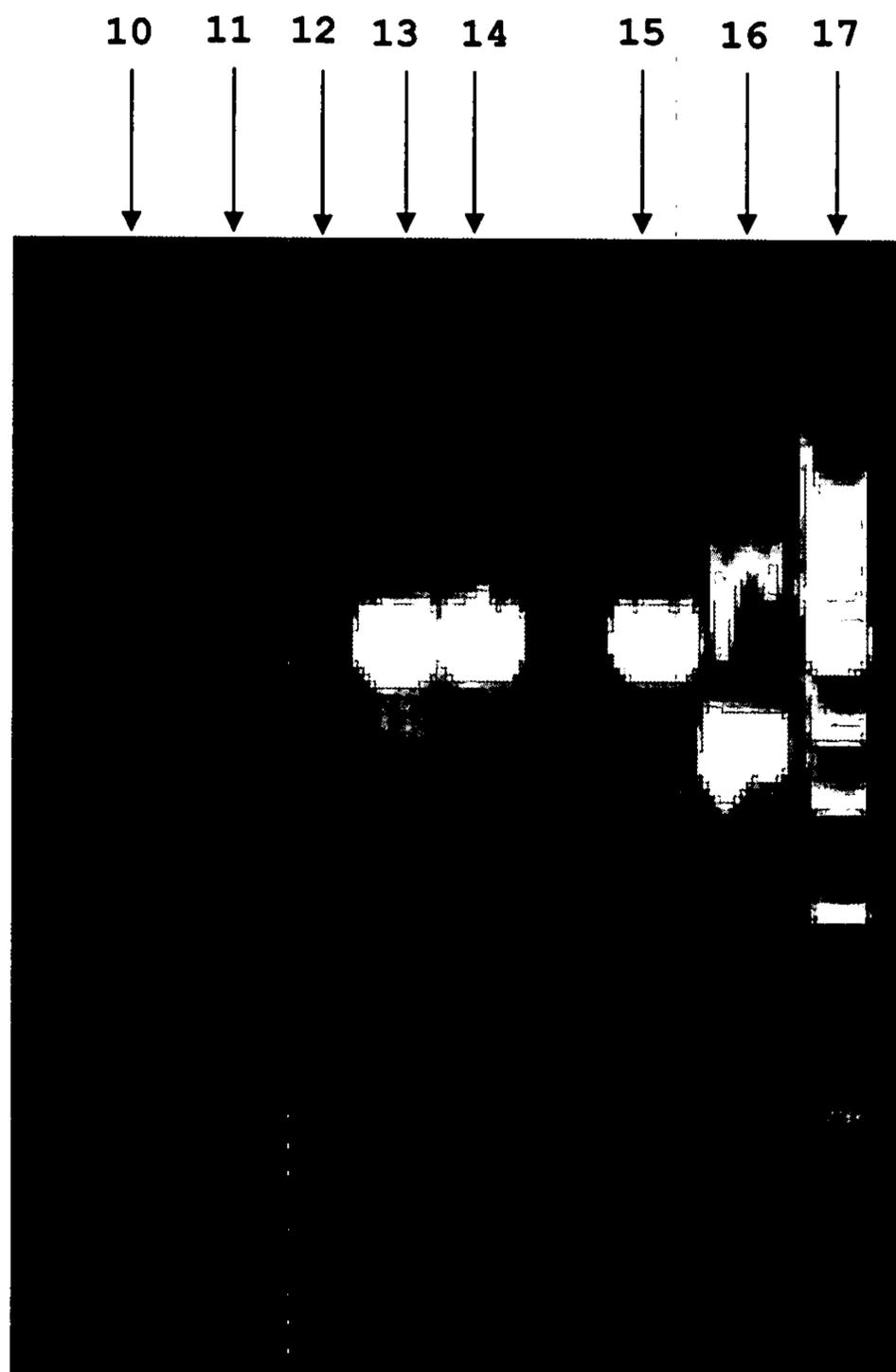


Figura 8

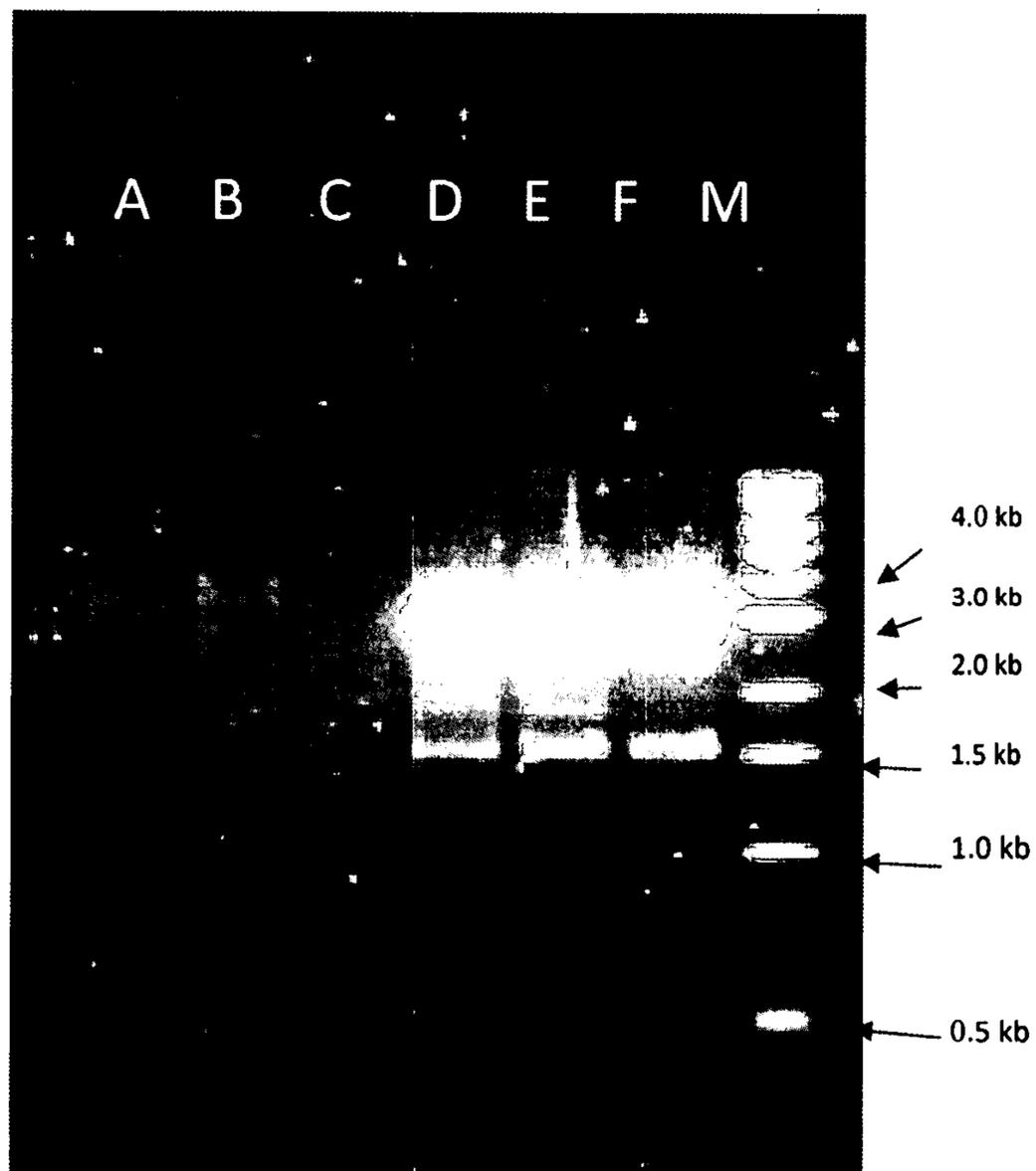


Figura 9

Listado de secuencias
SEQUENCE LISTING



<110> INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

<120> PROCESO BIOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR LODOS
HIDROLIZADOS RESULTANTES DE LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDO TEREFTÁLICO
MEDIANTE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS

<130> Mx/a/

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 693

<212> DNA

<213> NA

<400> 1

```
atctggacag gcttcgtagg cctggtgcag gggatcgtcg ccggcttcgt gggcttccta      60
tccgaagcct tccaaggggc ggtcaacaca gcagtgtctg tctggtccgg gcttggtgga      120
ttcttttccg ggctctgggc ggaaatcgtc aacggcgttt ccaccgcggt gggtagcatc      180
ggcggcttct tcgaagggat tccgggcaaa atccagggtt tcttcgccgg ggcaggctct      240
tggctgtacg gcttcgggca gaacatcgtc caaggccttg gcgatggtgt ggcctcaatg      300
gccggcacca tcggaaactt cttcctcaac gccctcccgg acttcatccg cgaaccgttc      360
aagcaggccc tcgggatcgc ttctcgtca aaggtcttcg ccggctatgg acagaacatc      420
ggcgaaggcg tgctcgtcgg cgtcggccgc atgcagtccc ggatcgatga ccggatggcg      480
aacctgggtca ccgtccccga ctttgccatg accagcggtt tcggcggcag cgcgtcaggc      540
agcggcaccc ggaccggctc cggcggcggg tcgatcgatg acctgatcag ggccatccgc      600
gaacagcggc cgatccaggt caacggagca cccggcatgg acgaagaaac cctcgcgcgg      660
gcgaccgccg aacaactgct gtggagaggg tga                                     693
```

<210> 2

<211> 1065

<212> DNA

<213> NA

<400> 2

```
gatcagctcc atgcagctcg ccaagctcaa cgccggcgtc tggcgcccgg aggatctgac      60
```

Listado de secuencias



caacggccac atcctcaacg acctgagagg agcctgatgg actcctgcga cctgggctat	
gtgtaccgca ccgagctgcc tgatggcagg gtgctgaagc tgccgtaccg aatcgcgctc	180
aagcagaccg cctatccaaa cgcctgcatc ttccacgacg aggagcccat cccggcagcg	240
cctggcagcc atctctgccc catgtgcgcg gaaggactta ccaagagcgt caccgacatt	300
gccgagtctt ggtctgacct cgaagacgcc atgcttcctg gcggacgtgc caccaactcc	360
gaacctgtca gcggcggcaa ggatctctac ccgccgctgc cgatcaacac cgacgtggcc	420
gacgtccggg cccgcgccct cgccatcatc aggacaatca ttggccagct gatccttgac	480
ctgcccgacc gccgtcttcc cgccgatcag tccgccggcc tgctggccag ctggctggtc	540
aactggcacg gcgcctacct caccaccac ccatccgccg gccatgtacg cgccatctgc	600
actgagctgg ccgccgtcgc ctgggacgtc cgaggcgtga tctaccgcag caagccagta	660
gaggtgaaga tccagtcagg ccagtgccac cagctggtgg ccggcccgga cccgaagacc	720
aagctgccct gccgagggga agtgatcgcc gtccagacgc cggacgggaa gaaaggtagt	780
ccggtgcagc gtggacatca cacaccgagt gccggcggac cagtggttct acaccacgc	840
caaccggcgc ccgggcaggg cagccaccgc actcaagaag aagtacatga aggtgaggca	900
gtgaagatgt tcatcagtca gttgttacc atcgccccga ccctggaaac ggatgtttat	960
ccgcagcgtg cgacatgggc tcgcggacgt cctcgaatgg cttggtggag gaagttggcc	1020
ccatgccggc gagcaaatac acgcatcctc gccgcagtca gctga	1065

<210> 3
 <211> 693
 <212> DNA
 <213> NA

<400> 3	
atctggacag gcttcgtagg cctggtgcag gggatcgtcg ccggcttcgt gggcttccta	60
tccgaagcct tccaaggggc ggtcaacaca gcagtgtctg tctggtccgg gcttgggtgga	120
ttcttttccg ggctctgggc ggaaatcgtc aacggcgttt ccaccgcggt gggtagcatc	180
ggcggcttct tcgaagggat tccgggcaaa atccagggct tcttcgccgg ggcaggctct	240
tggctgtacg gcttcgggca gaacatcgtc caaggccttg gcgatggtgt ggcctcaatg	300

Listado de secuencias



gccggcacca tcggaaactt cttcctcaac gccctcccgg acttcatccg cgaaccgttc
aagcaggccc tcgggatcgc ttcctcgtca aaggtcttcg ccggctatgg acagaacatc 420
ggcgaaggcg tgctcgtcgg cgtcggccgc atgcagtccc ggatcgatga ccggatggcg 480
aacctggtca ccgtccccga ctttgccatg accagcggtt tcggcggcag cgcgtcaggc 540
agcggcaccc ggaccggctc cggcggcggg tcgatcgatg acctgatcag ggccatccgc 600
gaacagcggc cgatccaggt caacggagca cccggcatgg acgaagaaac cctcgcgcgg 660
gcgaccgccg aacaactgct gtggagaggg tga 693

<210> 4
<211> 230
<212> PRT
<213> NA

<400> 4

Ile Trp Thr Gly Phe Val Gly Leu Val Gln Gly Ile Val Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Gly Phe Leu Ser Glu Ala Phe Gln Gly Ala Val Asn Thr Ala Val
20 25 30

Ser Val Trp Ser Gly Leu Gly Gly Phe Phe Ser Gly Leu Trp Ala Glu
35 40 45

Ile Val Asn Gly Val Ser Thr Ala Val Gly Ser Ile Gly Gly Phe Phe
50 55 60

Glu Gly Ile Pro Gly Lys Ile Gln Gly Phe Phe Ala Gly Ala Gly Ser
65 70 75 80

Trp Leu Tyr Gly Phe Gly Gln Asn Ile Val Gln Gly Leu Gly Asp Gly
85 90 95

Val Ala Ser Met Ala Gly Thr Ile Gly Asn Phe Phe Leu Asn Ala Leu
100 105 110

Pro Asp Phe Ile Arg Glu Pro Phe Lys Gln Ala Leu Gly Ile Ala Ser
115 120 125



Ser Ser Lys Val Phe Ala Gly Tyr Gly Gln Asn Ile Gly Glu Gly Val
 130 135 140

Leu Val Gly Val Gly Arg Met Gln Ser Arg Ile Asp Asp Arg Met Ala
 145 150 155 160

Asn Leu Val Thr Val Pro Asp Phe Ala Met Thr Ser Gly Phe Gly Gly
 165 170 175

Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Arg Thr Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile
 180 185 190

Asp Asp Leu Ile Arg Ala Ile Arg Glu Gln Arg Pro Ile Gln Val Asn
 195 200 205

Gly Ala Pro Gly Met Asp Glu Glu Thr Leu Ala Arg Ala Thr Ala Glu
 210 215 220

Gln Leu Leu Trp Arg Gly
 225 230

<210> 5
 <211> 1065
 <212> DNA
 <213> NA

<400> 5
 gatcagctcc atgcagctcg ccaagctcaa cgccggcgctc tggcgcccgg aggatctgac 60
 caacggccac atcctcaacg acctgagagg agcctgatgg actcctgcga cctgggctat 120
 gtgtaccgca ccgagctgcc tgatggcagg gtgctgaagc tgccgtaccg aatcgcgctc 180
 aagcagaccg cctatccaaa cgcctgcatc ttccacgacg aggagcccat cccggcagcg 240
 cctggcagcc atctctgccc catgtgcgcg gaaggactta ccaagagcgt caccgacatt 300
 gccgagtctt ggtctgacct cgaagacgcc atgcttctg gcggacgtgc caccaactcc 360
 gaacctgtca gcggcggcaa ggatctctac ccgccgctgc cgatcaacac cgacgtggcc 420
 gacgtccggg cccgcgccct cgccatcatc aggacaatca ttggccagct gatccttgac 480

Listado de secuencias



ctgccccgacc gccgtcttcc cgccgatcag tccgccggcc tgctggccag ctggctggtc
aactggcacg ggcctacct caccacccac ccatccgccg gccatgtacg cgccatctgc 600
actgagctgg ccgccgtcgc ctgggacgtc cgaggcgtga tctaccgcag caagccagta 660
gaggtgaaga tccagtcagg ccagtgccac cagctggtgg ccggcccgga cccgaagacc 720
aagctgccct gccgagggga agtgatcgcc gtccagacgc cggacgggaa gaaaggtagt 780
ccggtgcagc gtggacatca cacaccgagt gccggcggac cagtggttct acaccacgc 840
caaccggcgc ccgggcaggg cagccaccgc actcaagaag aagtacatga aggtgaggca 900
gtgaagatgt tcatcagtca gttgttacc atcgccccga ccctggaaac ggatgtttat 960
ccgcagcgtg cgacatgggc tcgaggacgt cctcgaatgg cttggtggag gaagttggcc 1020
ccatgccggc gagcaaatac acgcatcctc gccgcagtca gctga 1065

<210> 6
<211> 354
<212> PRT
<213> NA

<400> 6

Asp Gln Leu His Ala Ala Arg Gln Ala Gln Arg Arg Arg Leu Ala Pro
1 5 10 15

Gly Gly Ser Asp Gln Arg Pro His Pro Gln Arg Pro Glu Arg Ser Leu
20 25 30

Met Asp Ser Cys Asp Leu Gly Tyr Val Tyr Arg Thr Glu Leu Pro Asp
35 40 45

Gly Arg Val Leu Lys Leu Pro Tyr Arg Ile Ala Leu Lys Gln Thr Ala
50 55 60

Tyr Pro Asn Ala Cys Ile Phe His Asp Glu Glu Pro Ile Pro Ala Ala
65 70 75 80

Pro Gly Ser His Leu Cys Pro Met Cys Ala Glu Gly Leu Thr Lys Ser
85 90 95

Listado de secuencias



IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

367125

Val Thr Asp Ile Ala Glu Ser Trp Ser Asp Leu Glu Asp Ala Met Leu
100 105 110

Pro Gly Gly Arg Ala Thr Asn Ser Glu Pro Val Ser Gly Gly Lys Asp
115 120 125

Leu Tyr Pro Pro Leu Pro Ile Asn Thr Asp Val Ala Asp Val Arg Ala
130 135 140

Arg Ala Leu Ala Ile Ile Arg Thr Ile Ile Gly Gln Leu Ile Leu Asp
145 150 155 160

Leu Pro Asp Arg Arg Leu Pro Ala Asp Gln Ser Ala Gly Leu Leu Ala
165 170 175

Ser Trp Leu Val Asn Trp His Gly Ala Tyr Leu Thr Thr His Pro Ser
180 185 190

Ala Gly His Val Arg Ala Ile Cys Thr Glu Leu Ala Ala Val Ala Trp
195 200 205

Asp Val Arg Gly Val Ile Tyr Arg Ser Lys Pro Val Glu Val Lys Ile
210 215 220

Gln Ser Gly Gln Cys His Gln Leu Val Ala Gly Pro Asp Pro Lys Thr
225 230 235 240

Lys Leu Pro Cys Arg Gly Glu Val Ile Ala Val Gln Thr Pro Asp Gly
245 250 255

Lys Lys Gly Ser Pro Val Gln Arg Gly His His Thr Pro Ser Ala Gly
260 265 270

Gly Pro Val Val Leu His Pro Arg Gln Pro Ala Pro Gly Gln Gly Ser
275 280 285

His Arg Thr Gln Glu Glu Val His Glu Gly Glu Ala Val Lys Met Phe
290 295 300

Listado de secuencias

Ile Ser Gln Leu Leu Pro Ile Ala Pro Thr Leu Glu Thr Asp Val Tyr
305 310 315 320



Pro Gln Arg Ala Thr Trp Ala Arg Gly Arg Pro Arg Met Ala Trp Trp
325 330 335

Arg Lys Leu Ala Pro Cys Arg Arg Ala Asn Thr Arg Ile Leu Ala Ala
340 345 350

Val Ser