



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 002**

51 Int. Cl.:
C12N 1/16 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04733702 .7**
96 Fecha de presentación : **18.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1651753**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **Nueva *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) y método para producir xilitol utilizando la misma.**

30 Prioridad: **25.07.2003 KR 10-2003-0051593**
13.05.2004 KR 10-2004-0033733

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.07.2011

73 Titular/es: **CJ CHEILJEDANG CORPORATION**
500, Namdaemunro 5-ga
Jung-gu, Seoul 100-095, KR

72 Inventor/es: **Kim, Jung-Hoon;**
Sohn, Young-Rok;
Lee, Woon-Hwa;
Park, Seung-Won;
Park, Kang-June;
Lee, Ki-Chang y
Lim, Jae-Kag

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 363 002 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nueva *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) y método para producir xilitol utilizando la misma

Campo técnico

5 El presente invento se refiere a una nueva *Candida tropicalis* CJ-FID y a un método para producir xilitol utilizando la misma. Más particularmente, el presente invento se refiere a una nueva *Candida tropicalis* CJ-FID procedente de miel y a un método para producir xilitol de alta pureza con un rendimiento y una productividad elevadas, que incluye cultivar la propia *Candida tropicalis* CJ-FID, o una *Candida tropicalis* CJ-FID inmovilizada en alginato, en un medio de fermentación que contiene sacarosa y xilosa en alta concentración para obtener un cultivo que contiene xilitol, seguido de una purificación con una columna de carbón vegetal activado y una columna aniónica, para obtener finalmente xilitol en polvo.

Técnica fundamental

15 El xilitol es un alcohol de azúcar producido por la conversión de un grupo terminal reductor de xilosa, que es un azúcar con cinco átomos de carbono, en un grupo alcohol por hidrogenación, y se encuentra en pequeñas cantidades en plantas naturales tales como frutos, vegetales y setas. El xilitol es también conocido como un producto intermedio en el metabolismo de hidratos de carbono de los mamíferos. El xilitol es más estable que otros azúcares a causa de su estructura química, presenta una elevada afinidad por el agua y no experimenta una reacción de oscurecimiento.

20 El xilitol tiene un dulzor igual al de la sacarosa pero contiene pocas calorías y no causa elevación del nivel de azúcar sanguíneo ni caries dental. A este respecto, el xilitol ha llegado a ser muy popular como sustituto del azúcar [K. McNutt y A. Sentki, 1996, "Sugar replacers: a growing group of sweeteners in the United States", *Nutr. Today* 31 (6): 255-261]. El xilitol se absorbe en el tracto intestinal humano por difusión activa. Sin embargo, puesto que la velocidad de absorción es bastante pequeña, el xilitol resulta incompletamente absorbido por el tracto intestinal y es excretado del cuerpo. El xilitol absorbido es parcialmente descompuesto por microorganismos intestinales y sólo se utiliza una pequeña fracción en el cuerpo humano. A este respecto, el xilitol entra en la categoría de edulcorantes con pocas calorías.

30 En particular, puesto que no requiere insulina cuando está siendo absorbido por tejidos celulares, el xilitol se utiliza como sustituto del azúcar para pacientes diabéticos. Además, a causa de su dulzor equivalente al de la sacarosa y a su calor de disolución negativo, el xilitol imparte una sensación refrescante y fresca en la cavidad oral. Por lo tanto, el xilitol se utiliza en diversas industrias alimentarias, incluyendo productos de confitería y chicles. Además, el xilitol puede prevenir las caries al inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*, que es el responsable de la caries dental, y, por consiguiente, se utiliza como material de pasta dentífrica.

35 El xilitol se encuentra en vegetales y frutos, pero la extracción del xilitol de estas fuentes no resulta económica a causa de su baja concentración. A este respecto, se ha utilizado principalmente la producción química de xilitol. De acuerdo con el método de producción química, se produce xilitol por reducción química de la xilosa, que es un producto de hidrólisis de la hemicelulosa presente en maderas, paja de arroz, mijo, etc., bajo condiciones de alta temperatura y alta presión. Sin embargo, la separación y purificación de la xilosa o el xilitol a partir de productos de hidrólisis de otros azúcares polímeros derivados de fracciones de hemicelulosa son difíciles, y el rendimiento en xilosa o xilitol es tan pequeño como 50-60%. Además, surgen problemas tales como el riesgo de una reacción a alta temperatura y alta presión y la eliminación de residuos a causa del uso de ácido o álcali.

45 También se conoce la producción de xilitol utilizando un microorganismo como biocatalizador para la conversión de xilosa en xilitol en un medio que contiene xilosa. Es decir, en el microorganismo, la xilosa de un medio que contiene xilosa es transportada a través de la membrana celular y es luego convertida en xilitol por una xilosa reductasa (XR) dependiente de la coenzima NADPH. El xilitol abundantemente acumulado se libera de las células del microorganismo. La producción de xilitol utilizando un microorganismo presenta ventajas ya que no se requiere la separación del xilitol de la xilosa a causa del consumo completo de la xilosa después de la fermentación y se utilizan condiciones suaves tales como temperatura ambiental y presión atmosférica. Sin embargo, puesto que es difícil separar eficaz y selectivamente subproductos tales como ácidos orgánicos y glicerol, los ingredientes del medio y sustancias derivadas del microorganismo, que están generalmente contenidas en un medio de fermentación, es difícil la purificación de xilitol con alta pureza, lo que da lugar a un rendimiento bajo.

50 En la Publicación de Patente Coreana nº 10-2001-49918, expuesta a consulta por el público, se describe un método para producir xilitol a partir de arabitol utilizando *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. De acuerdo con la descripción del documento de patente, se purifica xilitol a partir de 200 ml de una disolución finalmente producida de 45 g/l de xilitol. Sin embargo, en este documento no se describe ningún resultado exacto del rendimiento de la purificación. Además, puesto que se produce xilitol a partir de una disolución de xilitol de baja concentración (50 g/l), no se asegura una producción de xilitol con concentración y eficacia elevadas, lo que hace difícil una producción masiva. Para

resolver estos problemas, se han realizado recientemente muchos estudios sobre la separación de una nueva cepa de levadura y sobre un método para producción de xilitol utilizando la nueva cepa de levadura.

DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

- 5 A la vista de estos problemas, la presente descripción proporciona una nueva *Candida tropicalis* CJ-FID. El presente invento también proporciona un método para producir xilitol de alta pureza con un rendimiento y una productividad elevadas.
- Los objetos anteriores y otros del presente invento pueden ser llevados a cabo mediante realizaciones del presente invento, como se describirán más adelante.
- 10 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona una *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) productora de xilitol.
- De acuerdo con otro aspecto del presente invento, se proporciona un glóbulo de alginato preparado al añadir *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) a una disolución acuosa de ácido alginico, con agitación para obtener una disolución uniforme, y hacer gotear la disolución uniforme sobre una sal de calcio.
- 15 De acuerdo con aún otro aspecto del presente invento, se proporciona un método para producir xilitol, que incluye preparar un medio de fermentación que contiene xilosa y sacarosa para producir xilitol, inocular un glóbulo de alginato que contiene *Candida tropicalis* CJ-FID al medio de fermentación, y hacer que fermente el medio de fermentación en un fermentador.
- 20 El método puede incluir además la purificación de un cultivo por fermentación que contiene xilitol, producido por la fermentación, con una columna de carbón vegetal activado, la purificación, con una columna aniónica, de una disolución de xilitol producida por la purificación con la columna de carbón vegetal activado, y la preparación de un polvo de xilitol a partir de una disolución de xilitol producida por la purificación con la columna aniónica.
- A continuación se describirá el presente invento con mayor detalle.
- 25 Separación de la cepa de levadura que produce xilitol
- Se tomó una muestra de miel natural procedente de una zona productora de miel doméstica y se diluyó apropiadamente en un tubo esterilizado. La muestra de miel diluida fue cultivada en un medio en placa que contenía 200-400 g/l de xilosa, 5 g/l de un extracto de levadura, 5 g/l de peptona y 15-20 g/l de agar, a 30 °C, para obtener colonias individuales formadas por cepas de levadura que crecían rápidamente bajo las anteriores condiciones de crecimiento.
- 30 Identificación de cepas de levadura que producen xilitol
- Entre estas colonias, se seleccionaron las cepas de levadura con tolerancia al azúcar y productividad de xilitol excelentes bajo las anteriores condiciones de crecimiento y se analizaron sus características morfológicas y fisiológicas.
- 35 Como resultado de la secuenciación del rRNA 26S, se halló que las cepas de levadura tienen una secuencia de nucleótidos como la expuesta en la ID. SEC. n° 1. Las cepas de levadura fueron denominadas *Candida tropicalis* CJ-FID y depositadas en el Gene Bank of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (N° de Acceso: KCTC 10457BP).
- 40 Evaluación de la productividad de xilitol
- Para evaluar la productividad de xilitol de las cepas de levadura seleccionadas, se inocularon las cepas de levadura seleccionadas a un medio de siembra de 50 ml que contenía 20 g/l de xilosa, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona y 2 g/l de sacarosa, en un matraz de 250 ml de capacidad, y luego se llevó a cabo un cultivo con sacudimiento a 200 rpm y 30 °C durante 12 horas. Luego se inoculó el 5% del cultivo de siembra a un medio principal de
- 45 100 ml que contenía 100 g/l de xilosa, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona y 10 g/l de sacarosa, en un matraz de 500 ml de capacidad, y luego se llevó a cabo un cultivo con sacudimiento a 150 rpm y 30 °C durante 42 horas. Se tomaron muestras de cultivo del cultivo resultante a intervalos predeterminados y luego se determinó la producción de xilitol en cada muestra de cultivo.

Análisis de la xilosa y el xilitol

5 Para el análisis de la xilosa y el xilitol, las muestras de cultivo tomadas en la Sección previa fueron centrifugadas a 12.000 rpm para separar las células. Los sobrenadantes fueron analizados en un equipo (Shimadzu, Japón) para cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC; del inglés, high performance liquid chromatography) provisto de una columna Kromasil 100-10 NH₂ (Dinamarca), utilizando un detector de índices de refracción (Shimadzu C-R6A, Japón). En este momento, el disolvente era acetonitrilo al 90% y el caudal era 2,0 ml/min. Se estimó la densidad de células de levadura midiendo la densidad óptica a 600 nm utilizando un turbidímetro y comparando el valor con una curva patrón previamente preparada en que se relaciona la densidad óptica con el peso de las células en estado seco.

10

Inmovilización de *Candida tropicalis* CJ-FID

15 Para preparar células inmovilizadas, se preparó una disolución de ácido algínico (3% en peso/volumen) utilizada en alimentos. Luego se añadió a la misma un concentrado celular con la misma concentración y se agitó la mezcla. La disolución resultante fue dejada gotear sobre una disolución 100 mM de cloruro cálcico en un generador de glóbulos para formar glóbulos de alginato. Los glóbulos de alginato así formados fueron almacenados a 4 °C durante 12 horas para aumentar la resistencia de los glóbulos de alginato para experimentos subsiguientes.

Fermentación de xilitol por *Candida tropicalis* CJ-FID

20 Se introdujo en un fermentador un medio de fermentación que contenía xilosa, 0,1-10 g/l de extracto de levadura, 0,1-10 g/l de peptona y 0,1-50 g/l de sacarosa. Luego se inoculó al medio de fermentación la propia *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) o la *Candida tropicalis* CJ-FID inmovilizada en alginato y se llevó a cabo un cultivo bajo aireación con un caudal de 0,5-2 vvm (volumen de gas por volumen de líquido por minuto) a 200-300 rpm y 25-35 °C durante un periodo de 60 a 100 horas. Después de la fermentación, se centrifugó el cultivo por fermentación para separar las células y se recuperó el xilitol de los sobrenadantes.

25 Preferiblemente, la xilosa está contenida en el medio de fermentación en una cantidad de 50 a 200 g/l y, más preferiblemente, en una cantidad de 80 a 150 g/l. Si el contenido de xilosa es inferior a 50 g/l, el rendimiento en xilitol puede verse reducido. Por otro lado, si excede de 200 g/l, la potenciación de la productividad puede resultar insignificante. Para la potenciación de la productividad, el medio de fermentación puede ser complementado con 0,1-5 g/l de fosfato potásico (KH₂PO₄) y 0,5-5 g/l de sulfato magnésico (MgSO₄).

30

Purificación del cultivo de xilitol por fermentación

35 Para producir polvos de xilitol de elevada pureza a partir del cultivo por fermentación obtenido en la Sección previa, se empaquetaron 300 g de un carbón vegetal activado en una columna (60 cm de altura x 10 cm de diámetro) y luego se dejó que el cultivo por fermentación atravesara la columna para obtener fracciones descoloradas y sin sabor que contenían xilitol. Se dejó que las fracciones obtenidas que contenían xilitol atravesaran una columna aniónica (60 cm de altura x 10 cm de diámetro) empaquetada con resina aniónica, para eliminar impurezas. Las fracciones que contenían xilitol resultantes fueron analizadas por HPLC. Como resultado, en las fracciones que contenían xilitol estaba presente xilitol puro.

40 Las fracciones que contenían xilitol fueron concentradas hasta más de 800 g/l en un concentrador y fueron cristalizadas a 4 °C, lo que fue seguido de la adición de un etanol alcohólico con agitación para obtener cristales de xilitol finos. Los cristales de xilitol fueron separados por filtración bajo vacío para eliminar parcialmente el etanol y el agua. Finalmente, se eliminaron el etanol y el agua residuales mediante un secador al vacío para obtener polvos de xilitol.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 es un gráfico que ilustra la productividad de xilitol con respecto a una concentración inicial de xilosa.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra la productividad de xilitol con respecto a una densidad celular inicial.

La Figura 3 es un gráfico que ilustra el rendimiento y la productividad de xilitol con respecto a la densidad de las células inmovilizadas en alginato.

50 La Figura 4 es un gráfico que ilustra el rendimiento y la productividad de xilitol con respecto a la masa de los glóbulos de alginato.

La Figura 5 es un gráfico que ilustra el rendimiento y la productividad de xilitol con respecto al tiempo de las células de levadura en el cultivo de siembra para ser inmovilizadas con alginato.

5 La Figura 6 es un gráfico que ilustra el rendimiento y la productividad de xilitol con el tiempo de fermentación de las células de levadura inmovilizadas en alginato, en un fermentador de 2 l de capacidad ajustado a las condiciones de fermentación óptimas.

La Figura 7 es un gráfico que ilustra el rendimiento y la productividad de xilitol con el tiempo de fermentación de las células de levadura inmovilizadas en alginato, en un fermentador de 17 l de capacidad ajustado a las condiciones de fermentación óptimas.

10 La Figura 8 es un gráfico que ilustra el cambio en la concentración de xilitol en las fracciones que contienen xilitol obtenidas por aplicación de un cultivo que contiene xilitol a una columna de carbón vegetal activado.

La Figura 9 es un gráfico que ilustra el cambio en la concentración de xilitol en las fracciones que contienen xilitol obtenidas por aplicación de las fracciones de la Figura 8 a una columna aniónica.

La Figura 10 es un cromatograma de la cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC) de las fracciones de la Figura 9.

15 La Figura 11 es un gráfico que ilustra el rendimiento en la cristalización de xilitol de las fracciones de la Figura 9 concentradas hasta concentraciones diferentes.

Mejor modo de llevar el invento a cabo

20 A continuación se describirá más específicamente el presente invento mediante ejemplos. Sin embargo, los ejemplos siguientes se proporcionan sólo para ilustraciones y, por lo tanto, el presente invento no se limita a ellos ni está limitado por ellos.

[Ejemplo 1] Productividad de xilitol con respecto a la concentración inicial de xilosa

25 Una vez llevado a cabo un cultivo de siembra de la manera anteriormente descrita, se inoculó el cultivo de siembra a un medio principal de 10 l para producir xilitol que contenía 0,5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona, 10-30 g/l de sacarosa y 100-300 g/l de xilosa y se llevó a cabo el cultivo en un fermentador de 15 l de capacidad (Korea Fermentation Co., Ltd.). Las condiciones de la fermentación fueron las siguientes: velocidad de agitación de 250 rpm, caudal de aireación de 1,0 vvm, y temperatura de cultivo de 30 °C. Se midió la productividad de xilitol con respecto a la concentración inicial de xilosa, y los resultados se muestran en la Figura 1.

30 Como se muestra en la Figura 1, la producción máxima de xilitol fue 187 g/l. En este momento, el rendimiento en la producción de xilitol era excelente, 93,5%. Se puede ver que la adición de sacarosa aumentó el rendimiento en xilitol.

[Ejemplo 2] Productividad de xilitol con respecto a la densidad celular inicial

35 Una vez llevado a cabo un cultivo de siembra del modo anteriormente descrito, se inoculó el cultivo de siembra a un medio principal de 10 l para producir xilitol que contenía 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona, 10 g/l de sacarosa y 100 g/l de xilosa y se llevó a cabo el cultivo en un fermentador de 15 l de capacidad (Korea Fermentation Co., Ltd.). Las condiciones de la fermentación fueron las siguientes: velocidad de agitación de 250 rpm, caudal de aireación de 1,0 vvm, y temperatura de cultivo de 30 °C. Se midió la productividad de xilitol con respecto a la densidad celular inicial, y los resultados se muestran en la Figura 2.

40 Como se muestra en la Figura 2, la producción máxima de xilitol fue 132 g/l. En este momento, la relación de xilitol producido a xilosa utilizada era excelente, 98%. Sin embargo, se puede ver que el uso de xilosa en elevada concentración retrasaba la velocidad de producción de xilitol.

45 [Ejemplo 3] Ensayo de tolerancia al azúcar para las cepas productoras de xilitol convencionales y para *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP)

Se evaluaron la *Candida tropicalis* CJ-FID de acuerdo con el presente invento y cepas productoras de xilitol convencionales en cuanto a la tolerancia al azúcar, y los resultados de la evaluación se presentan a continuación en la

Tabla 1.

Tabla 1: Resultados del ensayo de tolerancia al azúcar para cepas de levadura productoras de xilitol

Cepa de levadura	Concentración de xilosa (g/l)			
	100	200	300	400
<i>Candida tropicalis</i> KCTC 7101	+++	+++	+	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> KCTC 7128	+++	+++	-	-
<i>Candida tropicalis</i> KCTC 7212	+++	+++	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> KCTC 7653	+++	+++	-	-
<i>Candida tropicalis</i> KCTC 7725	+++	+++	+	-
<i>Candida tropicalis</i> KCTC 7901	+++	+++	-	-
<i>Candida</i> sp. KCTC 17041	+++	+++	-	-
<i>Candida shehata</i> KCCM 11895	+++	+++	+	-
<i>Candida guilliermondii</i> KCCM 50050	+++	+++	-	-
<i>Candida tropicalis</i> KCCM 50091	+++	+++	+	-
<i>Candida mogii</i> KCCM 50199	+++	+++	-	-
<i>Candida guilliermondii</i> KCCM 50631	+++	+++	-	-
<i>Candida utilis</i> KCCM 50667	+++	+++	-	-
<i>Candida tropicalis</i> CJ-FID KCTC 10457BP	+++	+++	++	+

5 (+++ : crecimiento excelente; ++ : buen crecimiento; + : ligero crecimiento; - : sin crecimiento)

10 Como se puede ver en la Tabla 1, la *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) del presente invento presentaba una excelente tolerancia a la xilosa en comparación con las cepas de levadura actualmente conocidas. Esto significa que la *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) del presente invento puede producir xilitol a gran escala en un medio que contenga xilosa en elevada concentración.

[Ejemplo 4] Evaluación de la productividad de xilitol con respecto a la densidad de las células inmovilizadas en alginato

15 Para evaluar la productividad de xilitol con respecto a la densidad de las células de levadura *Candida tropicalis* CJ-FID atrapadas en glóbulos de alginato, una vez llevado a cabo un cultivo de siembra de la manera anteriormente descrita, se prepararon glóbulos de alginato mezclando una disolución de alginato con el cultivo de siembra con variación de la densidad celular {de 10 a 100 [valor de densidad óptica (DO)]}. A continuación, se inocularon los glóbulos de alginato a un medio principal de 10 l para producir xilitol que contenía 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona y 100 g/l de xilosa y se llevó a cabo en cultivo en un fermentador de 15 l de capacidad (Korea Fermentation Co., Ltd.). Las condiciones de la fermentación fueron las siguientes: velocidad de agitación de 250 rpm, caudal de aireación de 1,0 vvm, y temperatura de cultivo de 30 °C. Se midió la productividad de xilitol con respecto a la densidad celular inicial, y los resultados se muestran en la Figura 3.

20

Como se muestra en la Figura 3, cuando la densidad celular era de 10 a 20 (valor de DO), la productividad de xilitol era aproximadamente 0,5 g/l-h. Con una densidad celular superior a 50 (valor de DO), la productividad de xilitol era superior a 1,25 g/l-h. Con una densidad celular de 100 (valor de DO), la productividad de xilitol era máxima, 1,65 g/l-h.

5

[Ejemplo 5] Evaluación de la productividad de xilitol con respecto a la masa de glóbulos de alginato

Se inocularon glóbulos de alginato preparados del mismo modo que en el Ejemplo 4, con masa variable (de 2,5 a 50 g), a un medio de fermentación para producir xilitol en un fermentador de 2 l de capacidad y se llevó a cabo el cultivo bajo las mismas condiciones de fermentación que en el Ejemplo 4. Se midió la productividad de xilitol con respecto a la masa de los glóbulos de alginato, y los resultados se muestran en la Figura 4.

10

Como se muestra en la Figura 4, la productividad de xilitol se mantuvo constante independientemente del cambio en la masa de los glóbulos de alginato.

[Ejemplo 6] Evaluación de la productividad de xilitol con respecto al tiempo del cultivo de siembra

Para evaluar la productividad de xilitol con respecto al tiempo de cultivo de siembra de las células del cultivo de siembra utilizadas para la preparación de los glóbulos de alginato, se cultivaron cepas de levadura en medios de siembra con variación del tiempo de cultivo (de 12 a 60 horas) y luego se llevó a cabo la fermentación bajo las mismas condiciones de fermentación que en el Ejemplo 4. Se midió la productividad de xilitol con respecto al tiempo de cultivo de siembra, y los resultados se muestran en la Figura 5.

15

Como se muestra en la Figura 5, la productividad de xilitol se mantuvo constante independientemente del tiempo de cultivo de siembra. Sin embargo, las cepas de levadura que habían sido cultivadas para siembra durante 24 horas presentaban la máxima productividad de xilitol.

20

[Ejemplo 7] Evaluación del rendimiento y la productividad de xilitol con respecto al uso repetitivo de células inmovilizadas

Se prepararon células de *Candida tropicalis* CJ-FID inmovilizadas en glóbulos de alginato y se llevó a cabo una fermentación de la misma manera que en el Ejemplo 4 salvo por que los glóbulos de alginato se utilizaron repetitivamente (de una a cinco veces). Se evaluaron los rendimientos y la productividad en xilitol de las células de *Candida tropicalis* CJ-FID inmovilizadas en glóbulos de alginato por comparación con los valores de la actualmente conocida *Candida guilliermondii* FTI 20037 inmovilizada en glóbulos de alginato, y los resultados se presentan a continuación en la Tabla 2.

25

30

Tabla 2: Rendimientos y productividad de xilitol con respecto al uso repetitivo de células de levadura inmovilizadas

Cepa	Sección	Número de repeticiones				
		1	2	3	4	5
<i>Candida tropicalis</i> CJ-FID (KCTC 10457BP)	Productividad (g/l·h)	3,31	2,95	3,04	3,11	2,99
	Rendimiento (%)	89,5	92,3	88,6	90,4	90,6
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	Productividad (g/l·h)	0,5	0,59	0,6	0,6	0,58
	Rendimiento (%)	53,2	59,5	62,6	62,4	61,4

5 Como se muestra en la Tabla 2, no se observó reducción alguna de los rendimientos ni la productividad de xilitol ni siquiera cuando las células inmovilizadas se utilizaron cinco veces. En particular, las células de *Candida tropicalis* CJ-FID presentaban un aumento de cinco órdenes de magnitud en la productividad de xilitol y un aumento superior al 45% en el rendimiento en xilitol, en comparación con las células de *Candida guilliermondii* FTI 20037.

10 [Ejemplo 8] Productividad de xilitol con respecto al tiempo de fermentación

Se prepararon células de *Candida tropicalis* CJ-FID inmovilizadas en glóbulos de alginato y se llevó a cabo una fermentación en fermentadores de 2 l y 17 l de capacidad de la misma manera que en el Ejemplo 4. Se midió la productividad de xilitol variando el tiempo de fermentación, y los resultados se muestran en las Figuras 6 y 7.

15 Como se muestra en las Figuras 6 y 7, la concentración de xilitol se vio aumentada a partir de las 6 horas de fermentación. Con respecto a la fermentación en el fermentador de 2 l de capacidad (Figura 6), la productividad de xilitol era máxima a las 24 horas de fermentación. Con respecto a la fermentación en el fermentador de 17 l de capacidad, la productividad de xilitol era máxima a las 36 horas de fermentación.

[Ejemplo 9] Purificación del cultivo de xilitol por fermentación

20 Se midieron las concentraciones de xilitol en las fracciones de un cultivo de xilitol por fermentación que había atravesado una columna de carbón vegetal activado y una columna aniónica. Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9. Se analizaron las fracciones de la Figura 9 por cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC), y los resultados se muestran en la Figura 10. Se concentraron las fracciones de la Figura 9 hasta diferentes concentraciones y se midieron los rendimientos en la cristalización de xilitol con respecto a las concentraciones. Los resultados se muestran en la Figura 11.

25 De acuerdo con los resultados de purificación al utilizar la columna de carbón vegetal activado, como se muestran en la Figura 8, la fracción 4 presentaba la mayor concentración de xilitol. De acuerdo con los resultados de purificación al utilizar la columna de carbón vegetal activado y la columna aniónica, como se muestran en la Figura 9, las fracciones 3 a 5 presentaban la mayor concentración de xilitol. En el cromatograma de la Figura 10 se puede ver que las fracciones que habían atravesado la columna de carbón vegetal activado y la columna aniónica contenían xilitol muy purificado. Las disoluciones de xilitol purificado fueron cristalizadas hasta diferentes concentraciones. Conforme aumentaba la concentración de las disoluciones de xilitol, aumentaba proporcionalmente el rendimiento en la cristalización de xilitol.

35 [Ejemplo 10] Rendimiento y concentración de xilitol de acuerdo con la fermentación y la purificación del xilitol

En la Tabla 3 siguiente se resumen las concentraciones de xilitol y los rendimientos medidos después de la fermentación y la purificación.

Tabla 3: Rendimientos de la purificación de acuerdo con los procesos de purificación del cultivo de xilitol por fermentación

Sección	Concentración de xilitol (g/l)	Rendimiento (%)
Cultivo de xilitol por fermentación (300 g/l)	270	90
Columna de carbón vegetal activado	270	90
Columna aniónica	262	87,3
Concentración	257	84,7
Cristalización	244	80,4
Formación del polvo	230	76,4
Rendimiento final de la purificación	77,4	

5 Como se muestra en la Tabla 3, el rendimiento final en xilitol después de la fermentación y la purificación era tan elevado como 77,4% y se observó muy poca pérdida de xilitol durante cada proceso de purificación.

Aplicabilidad industrial

10 Como resulta evidente a partir de la descripción anterior, la nueva *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) del presente invento y un método para producción de xilitol utilizando la misma pueden producir xilitol muy puro con rendimiento y productividad elevadas bajo unas condiciones de cultivo y una composición del medio optimizadas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110>CJ Corp.
KIM, Jung-hoon
5 SOHN, Young-rok
LEE, Woon-hwa
PARK, Seung-won
PARK, Kang-june
LEE, Ki-chang
10 LIM, Jae-kag
- <120>Nueva *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) y método de fabricación de xilitol mediante la misma
- <130>PP04-0114
15
- <150>KR10-2003-0051593
<151>2003-07-28
- <150>KR10-2004-0033733
20 <151>2004-05-13
- <160>1
- <170>KopatentIn 1.71
25
- <210>1
<211>576
<212>DNA
<213> *Candida tropicalis*
30
- <400>1

ataccaacag ggattgcctt agtagcggcg agtgaagcgg caaaagctca aatttgaat	60
ciggctcttt cagagtcgga gttgiaaait gaagaagga tctttgggtc tggctcttgt	120
ctatgtttct tggaacagaa cgtcacagag ggtgagaatc ccgtccgatg agatgatcca	180
ggcctaigta aagttccttc gaagagtcga gtgttttggg aatgcagctc taagtgggtg	240
glaaatcca tctaaagcta aatattggcg agagaccgat agcgaacaag tacagtgatg	300
gaaagatgaa aagaacttg aaaagagagt gaaaaagtac gtgaaattgt tgaaggga	360
gggcttgaga tcagacttg tattttgtat gttacttctt cgggggtggc cttacagtt	420
tatcggcca gcatcagitt gggcgttagg agaattcgt tggaaigtg cacggcttcg	480
gttgtgtgtt atagccttcg tcgatactgc cagcctagac tgaggactgc ggtttatacc	540
taggatgttg gcataatgat ctaagtgc ccgtct	576

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un glóbulo de alginato que comprende *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP), preparado al añadir la *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) a una disolución acuosa de ácido algínico con agitación para obtener una disolución uniforme, y hacer gotear la disolución uniforme sobre una sal de calcio.
- 10 2. Un método para producir xilitol a partir de xilosa, que comprende:
preparar un medio de fermentación para producir xilitol, que contenga xilosa y sacarosa;
inocular el glóbulo de alginato de la Reivindicación 1 al medio de fermentación; y
hacer que fermente el medio de fermentación en un fermentador.
- 15 3. El método de la Reivindicación 2, que comprende además:
purificar un cultivo de fermentación que contiene xilitol, producido por la fermentación, con una columna de carbón vegetal activado;
purificar, con una columna aniónica, una disolución de xilitol producida por la purificación con la columna de carbón vegetal activado; y
preparar un polvo de xilitol a partir de una disolución de xilitol producida por la purificación con la columna aniónica.

Figura 1

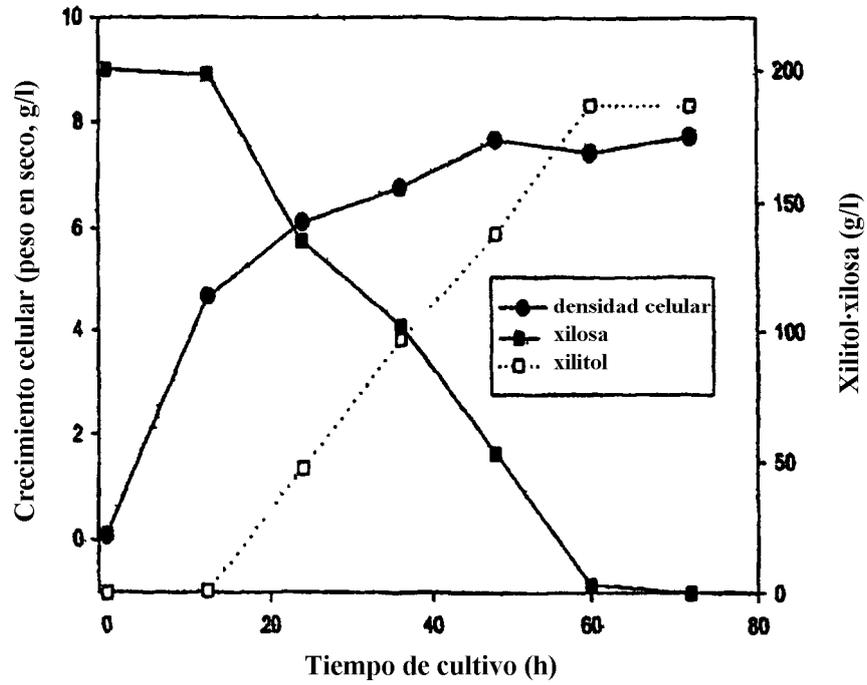


Figura 2

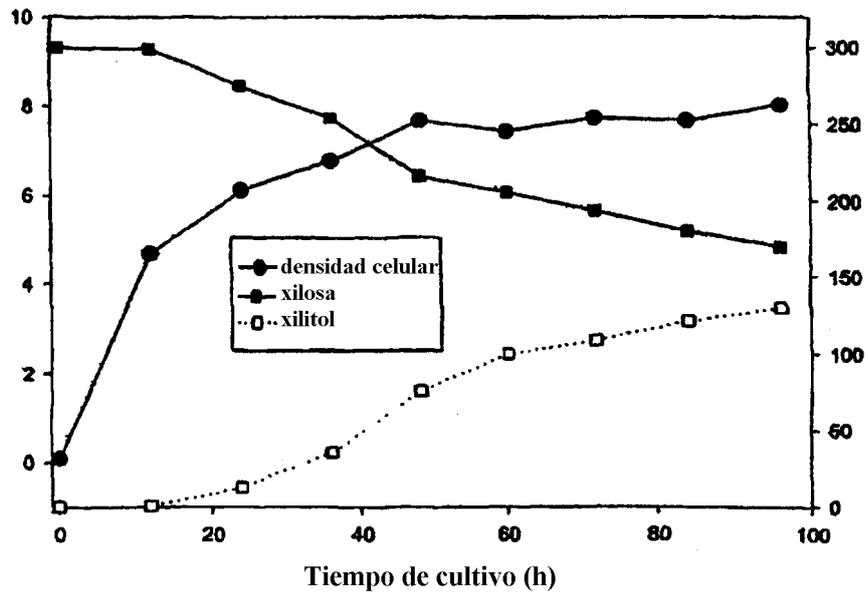


Figura 3

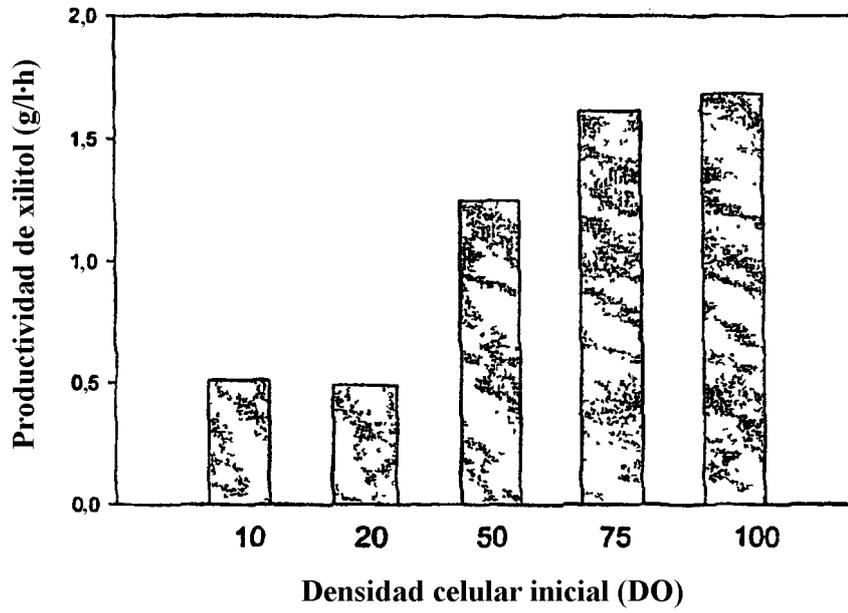


Figura 4

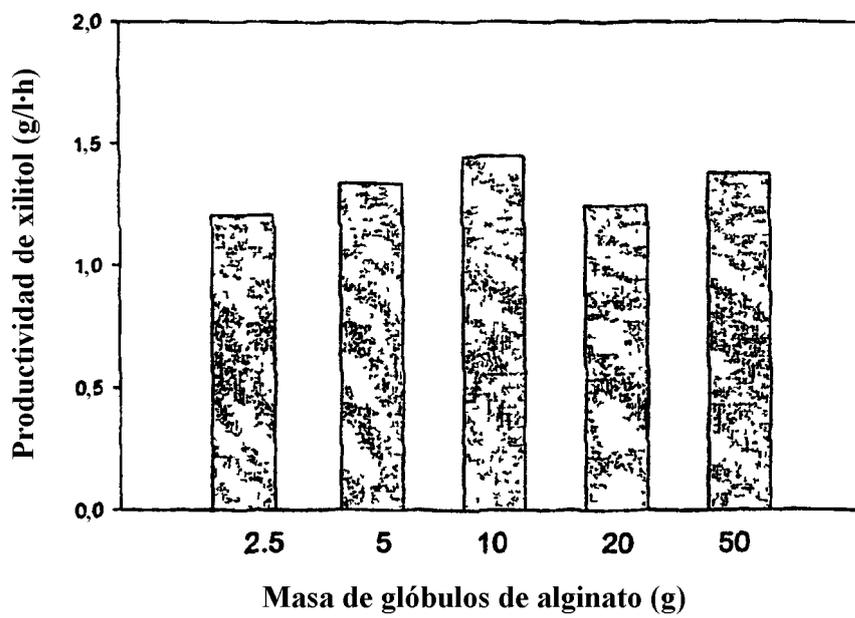


Figura 5

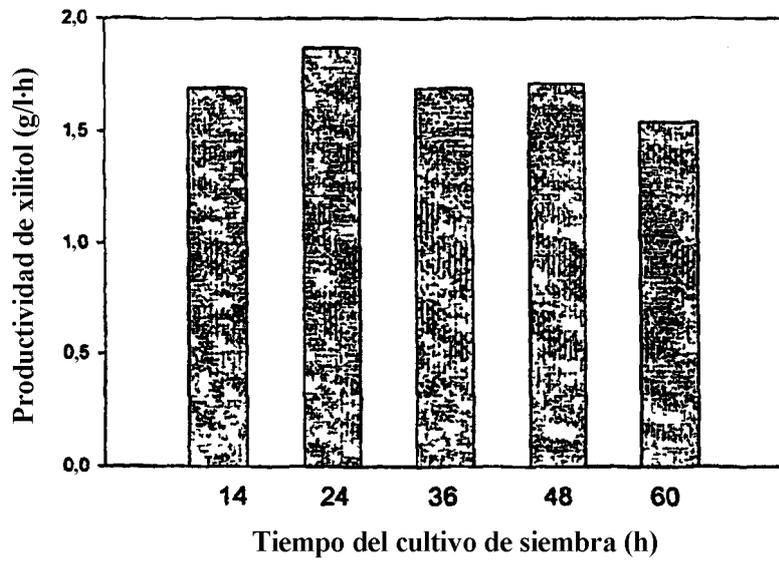


Figura 6

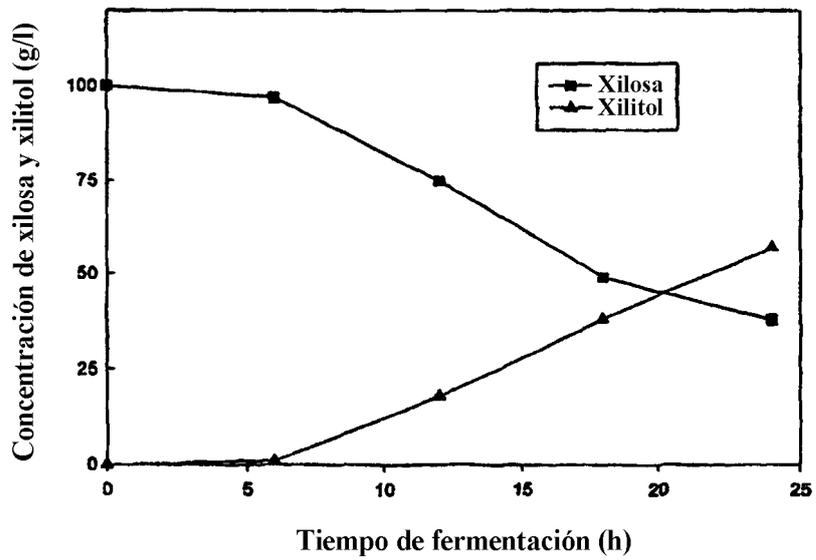


Figura 7

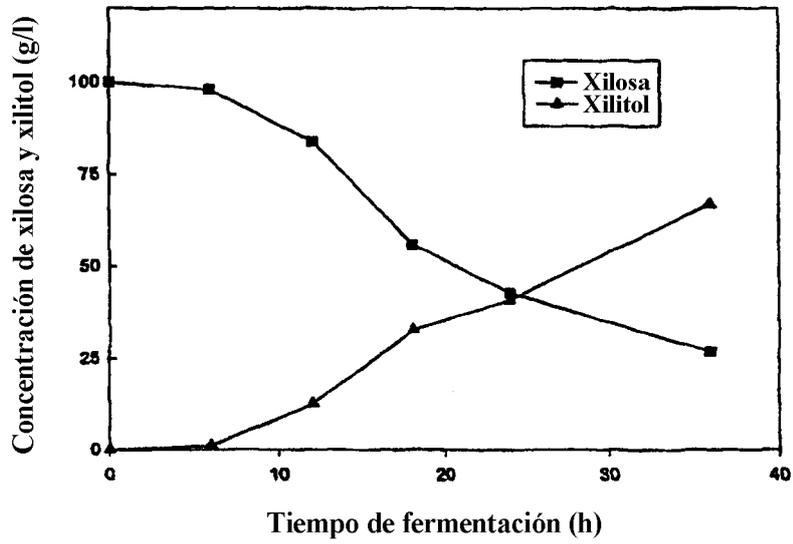


Figura 8

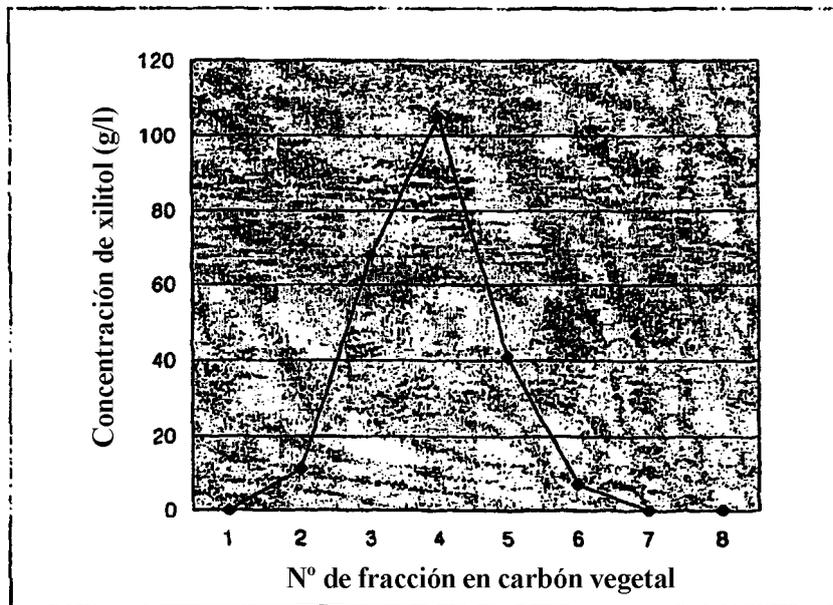


Figura 9

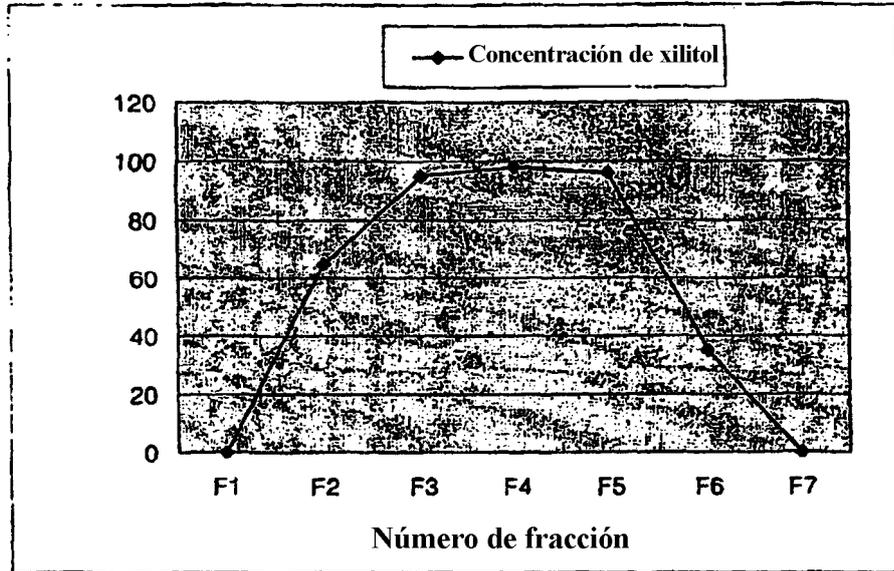


Figura 10

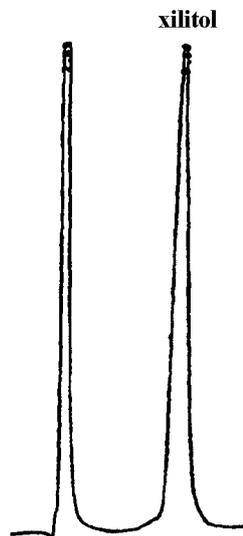


Figura 11

