

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 441**

51 Int. Cl.:

**C12P 1/02** (2006.01)

**C12P 19/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2009 PCT/IB2009/053189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2010 WO10013174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2009 E 09786678 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2321419**

54 Título: **Proceso para la coproducción de quitina, sus derivados y polímeros que contienen glucosa, manosa y/o galactosa, por la fermentación de la levadura pichia pastoris dsmz 70877**

30 Prioridad:

**30.07.2008 PT 10414908**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.03.2018**

73 Titular/es:

**73100 - SETENTA E TRÊS MIL E CEM, LDA  
(100.0%)**

**Praça Diogo Cão, n.º2  
5000-599 Vila Real, PT**

72 Inventor/es:

**CARVALHO FERNANDES DE MIRANDA REIS,  
MARIA D'ASCENÇÃO;  
FREITAS OLIVEIRA, RUI MANUEL;  
ANDRADE DE FREITAS, MARIA FILOMENA;  
FERREIRA CHAGAS, BÁRBARA;  
BRAGA DA CRUZ, ANA LUÍSA;  
PIO BARBOSA PEREIRA DA CUNHA, ANTÓNIO  
EDUARDO y  
VAZÃO MANO CLEMENTE, JOÃO JOSÉ**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 657 441 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

Proceso para la coproducción de quitina, sus derivados y polímeros que contienen glucosa, manosa y/o galactosa, por la fermentación de la levadura *pichia pastoris* dsmz 70877

## 5 Campo de la invención

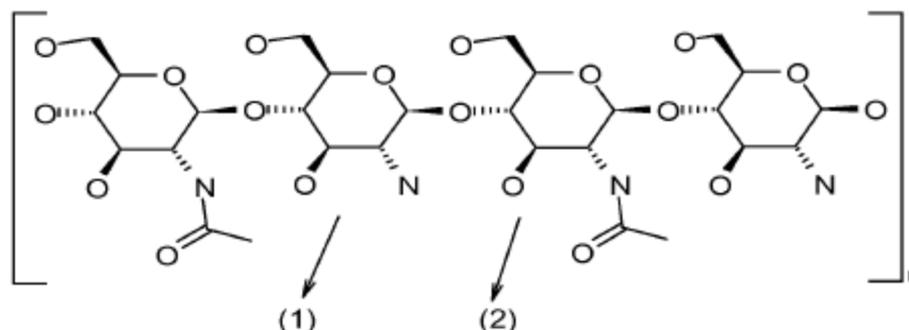
La presente invención se relaciona con un procedimiento para la producción microbiana, en gran cantidad, de quitina y polímeros que contienen glucosa, manosa y/o galactosa, y sus derivados, que usan materias primas de bajo costo. Por lo tanto, se describe un proceso de producción en base al cultivo de biorreactores de alta densidad celular de la levadura *P. pastoris*, que usa subproducto de glicerol de la producción de biodiesel como fuente de carbono preferencial.

Los biopolímeros referidos son ampliamente usados en la industria agroalimentaria, cosmética, biomédica, textiles, tratamiento de aguas residuales, entre otras aplicaciones industriales, de procesos y médicas.

## 15 Antecedentes de la invención

Los polímeros son moléculas de alto peso molecular, formadas a través de la polimerización de una o más unidades estructurales, llamados monómeros. Polímeros formados por monómeros de carbohidratos monosacáridos se denominan polisacáridos. Las moléculas más pequeñas (oligosacáridos) pueden derivarse de esta última mediante hidrólisis parcial química o enzimática.

La quitina es un polisacárido lineal compuesto por residuos de D-glucosamina (GlcN) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidos a través de enlaces  $\beta$ -(1-4) (véase esquemas, donde (1) y (2) representan GlcN y GlcNAc, respectivamente). Las moléculas de quitina forman enlaces de hidrógeno intermoleculares que dan como resultado tres formas cristalinas diferentes, dependiendo de su disposición. La  $\alpha$ -quitina, que es la forma más común y estable, se caracteriza por una disposición antiparalela de las cadenas, mientras que la  $\beta$ -quitina está formada por capas paralelas. La forma más rara,  $\beta$ -quitina, se caracteriza por una cadena antiparalela y dos cadenas paralelas.



Los enlaces de hidrógeno son responsables de la baja solubilidad de la quitina tanto en agua como en la mayoría de los solventes orgánicos. Las soluciones ácidas o alcalinas causan la hidrólisis y la desacetilación del polímero, y por lo tanto no son adecuadas para su solubilización. Los enlaces de hidrógeno también son responsables de la aparente ausencia de temperatura de fusión, así como de la alta rigidez del polímero y la baja permeabilidad de los materiales quitinosos.

Las propiedades fisicoquímicas de la quitina también están estrechamente relacionadas con la proporción de los dos monómeros estructurales. Cuando la fracción molar de GlcN en el polímero (referida como el grado de desacetilación, % DD) es mayor que 50%, el polímero se denomina quitosano, el derivado principal de la quitina. Debido a su menor contenido en radicales acetilo, el quitosano es soluble en ácidos débiles, tiene un carácter polielectrolito y una mayor reactividad. El quitosano generalmente se obtiene mediante la desacetilación de la quitina.

Debido a estas características, actualmente el quitosano tiene más aplicaciones que la quitina. Su alta capacidad de unión específica se usa para la eliminación de aceites, metales pesados, proteínas y partículas finas de aguas residuales (Hennen, 1996). La misma propiedad permite su uso en cromatografía de afinidad (Synowiecki et al., 2003) y para reducir la absorción de colesterol. El quitosano pasa por la vía digestiva humana y, al unirse al colesterol de baja densidad, restringe su absorción en el torrente sanguíneo (ICNHP, 1995; Hennen, 1996).

En la industria alimenticia, el quitosano se usa principalmente para recubrir huevos y frutas (Hennen, 1996; Kim et al., 2007), que actúa como una barrera para el dióxido de carbono y microorganismos patógenos, que aumenta así el tiempo de vida de los productos alimenticios. También se usa como emulsionante y agente conservante y clarificador de bebidas (Kim, 2004; Synowiecki et al., 2003). El quitosano también se usa en cosméticos, concretamente en productos para el cabello, debido a su alta estabilidad y menor carácter electrostático (Kim, 2004).

Las aplicaciones biomédicas de quitosano se han vuelto cada vez más relevantes debido a la biocompatibilidad y biodegradabilidad de sus derivados que permiten su uso en la cicatrización de heridas (Hamliyn et al., 2004; Tanabe et al., 2006; Singh et al., 2000), andamios tisulares (Tangsadhakun et al., 2007), sistemas de liberación de fármacos (Singh et al., 2000), entre otros.

Las principales aplicaciones de quitina incluyen su uso como material de sutura (Hamliyn et al., 2004; Okada et al., 2000; Singh et al., 2000), como antígeno en animales infectados por bacterias u hongos (Singh et al., 2000) o potenciador de la producción de quitinasa en suelos contaminados por organismos que tienen quitina en sus paredes celulares (Okada et al., 1999; Hallman et al., 1999). También se usa para la fabricación de textiles transpirables, como calcetines (ICNHP, 1995).

A diferencia de los polímeros sintéticos, la quitina y el quitosano son biodegradables, lo que hace que su uso sea un beneficio ambiental.

Además de quitosano, los derivados de quitina incluyen polisacáridos en los que el grupo hidroxilo GlcNAc C6 está sustituido por otros radicales, tales como, por ejemplo, grupos alquilo o carboxilo. La inserción de estos nuevos radicales aumenta las funcionalidades de los polímeros, lo que permite desarrollar nuevas aplicaciones, como nuevas fibras, geles, etc.

Junto a la celulosa, la quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza. Se encuentra principalmente en la cutícula y el exoesqueleto de organismos del Phylum Arthropoda y Crustacea, y en la pared celular de levaduras y hongos. En esos organismos, la quitina proporciona la rigidez celular y resistencia mecánica, y juega un papel importante durante la meiosis (Keller et al., 1970; Momany et al., 1997). La presencia de quitina o cualquiera de sus derivados aún no se ha detectado en bacterias ni en hongos Myxomycetes. La quitina extraída de crustáceos y artrópodos es más rígida y tiene un mayor grado de desacetilación que la quitina microbiana.

La mayoría de los derivados de quitina y quitina comercialmente disponibles se obtienen de las conchas de crustáceos, como cangrejos, camarones y langosta. El proceso de extracción generalmente incluye tres pasos: desmineralización, eliminación de proteínas y lípidos y blanqueamiento. El primer paso se realiza mezclando las conchas con ácido (generalmente, HCl), mientras que la eliminación de proteínas y lípidos se lleva a cabo en un medio alcalino (NaOH o KOH) en presencia de etanol.

La eliminación del pigmento (especialmente los carotenoides) se logra mediante el lavado con solventes orgánicos, tales como acetona, cloroformo o mezclas de etanol con éteres.

Sin embargo, el carácter estacional de esta materia prima y la variabilidad de la composición de las conchas en función de la especie y la edad del animal, hacen que este proceso sea bastante costoso y con baja reproducibilidad. La rigidez de los exoesqueletos de especies tales como langostas y cangrejos también dificulta la extracción y la encarece. Además, dado que la quitina extraída de las conchas de crustáceos es de origen animal, su uso para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas está muy restringido por las regulaciones de la administración de alimentos y medicamentos (FDA). Además, la presencia de proteínas y contaminantes absorbidos por el animal también dificulta la purificación de la quitina. Debido a la posibilidad de reacciones alérgicas, los polímeros extraídos de crustáceos son menos adecuados para aplicaciones biomédicas.

Mientras que en los artrópodos y crustáceos, la quitina se agrega a proteínas y minerales de las conchas (principalmente sales de calcio), en los microorganismos se asocia a otros polisacáridos de la pared celular. Sus terminaciones reductoras de cadena están ligadas a los extremos no reductores de  $\beta$ -(1,3)-glucanos (polímeros de glucosa), que están relacionados con  $\beta$ -(1,6)-glucanos, galactomananos (polímeros formados por residuos de galactosa y manosa) y glicoproteínas. La composición de la pared celular depende de la tensión y también es variable durante la fase de crecimiento del organismo. Cambiar las condiciones de fermentación, como composición y concentración del medio (por ejemplo, disponibilidad del sustrato), temperatura o concentración de oxígeno disuelto (Aguilar-Uscanga et al., 2003), puede dar como resultado una variación de la proporción relativa de cada uno de los componentes de la pared celular.

La producción microbiana de quitina permite el uso de materias primas baratas, con disponibilidad casi ilimitada, y para la optimización continua del proceso. La adaptación de la pared celular a las condiciones ambientales se puede usar con ventaja para optimizar el proceso. De hecho, ya se ha demostrado que la producción de quitina por fermentación puede mejorarse mediante la suplementación del medio con iones específicos y precursores para la síntesis enzimática de quitina (Camargo et al., 1967; Keller et al., 1970). Tanto la composición como las propiedades de los polímeros son también más estables que las obtenidas por el método tradicional de extracción de crustáceos.

Actualmente, no existe un protocolo optimizado para la producción de quitina utilizando microorganismos, excepto cuando se usan organismos manipulados genéticamente (Hammer et al., 2006). La mayoría de la quitina microbiana disponible comercialmente se extrae de *Saccharomyces carlsbergensis* de la industria cervecera o *Aspergillus niger*

de la producción de ácido cítrico (Versali et al., 2003). En el futuro, la quitina puede representar hasta el 42% de la pared celular del microorganismo. Sin embargo, los cultivos de *Aspergillus niger* sumergidos no alcanzan densidades celulares tan altas como las alcanzadas por algunas levaduras. Por otro lado, la producción de quitina por especies de *Saccharomyces* no supera el 8% del peso seco de las células. También se pueden usar residuos del cultivo de algunos hongos comestibles, como *Agaricus bisporus* y *A. campestris* (GB2259709), pero el contenido de quitina no es superior al 8% del peso seco del organismo.

*Pichia pastoris* es una levadura Hemiascomycetes/Saccharomycetes, comúnmente usada para la expresión de proteínas heterólogas. La principal ventaja de esta especie sobre otros microorganismos usados para la producción de quitina es el hecho de que alcanza altas densidades celulares durante su fermentación en una amplia variedad de sustratos, que incluyen glucosa, metanol o glicerol en bruto, mientras mantiene un alto porcentaje de quitina en su pared celular. Además, el glicerol es un subproducto de bajo costo de la industria del biodiesel, disponible en grandes cantidades y que se informa que se usa de manera eficiente para el crecimiento de *P. pastoris* (Çelik et al., 2008). Por lo tanto, el uso del subproducto de glicerol de la industria del biodiesel para la producción de quitina y quitosano por *P. pastoris* puede ser un proceso para su valorización. Además, los costos de operación se reducen ya que no es necesario usar altas concentraciones de oxígeno disuelto para que el cultivo crezca.

El documento WO 2004/092391 A2 describe un método de fermentación para la producción de cantidades comercialmente útiles de quitina y/o quitosano mediante un proceso biosintético. Adicionalmente, también se divulgan microorganismos genéticamente modificados útiles en dicho método y una biomasa microbiana que contiene quitina y/o quitosano producidos por dicho método. *Pichia pastoris* está indicado como una levadura que podría usarse para la ingeniería metabólica para aumentar el contenido de quitina y quitosano.

Sin embargo, en la presente invención, no se usan técnicas de ingeniería metabólica, es decir, la cepa de *Pichia pastoris* es de tipo silvestre. Además, el documento WO 2004/092391 A2 no se pronuncia con respecto de la producción de un complejo de quitina-glucano y el uso de fuentes de carbono alternativas en el proceso de fermentación.

En la actualidad, no hay informes disponibles sobre el uso de *Pichia pastoris* para la producción industrial de los biopolímeros que son el objetivo de la presente invención.

#### Descripción general de la invención

La presente invención describe el uso de levadura *Pichia pastoris* de tipo silvestre, es decir *P. pastoris* DSMZ 70877 como el organismo productor de polisacáridos de pared celular, tales como quitina, polímeros que contienen glucosa, manosa y/o galactosa, o sus productos de derivatización, que usan sustratos de bajo costo, como el subproducto de glicerol de la industria del biodiesel.

La productividad de estos polisacáridos está estrechamente relacionada con el crecimiento de células microbianas. Por lo tanto, el proceso se ha optimizado para obtener altas tasas de crecimiento celular y altas densidades celulares con el fin de hacer que la producción de quitina o quitosano por *P. pastoris* DSMZ 70877 sea económicamente viable.

En vista de esto, la presente invención describe un proceso para la producción de polisacáridos de pared celular que contienen glucosamina, glucosa, galactosa y/o manosa, mediante la fermentación aeróbica de *Pichia pastoris* DSMZ 70877 que usa como fuente de carbono preferencial subproducto de glicerol de la industria del biodiesel. Las fuentes de carbono alternativas incluyen glicerol puro, metanol y glucosa o mezclas de los mismos.

El uso de subproducto de glicerol de bajo costo como principal fuente de carbono es una ventaja importante ya que permite la reducción de los costos de producción en comparación con otros sustratos de alta pureza y más costoso. La productividad volumétrica del proceso puede maximizarse adoptando un proceso de fermentación operado en modo continuo y preferiblemente operado bajo presión para aumentar la capacidad de transferencia de oxígeno, permitiendo así una densidad celular más alta. Durante las fermentaciones de *P. pastoris* DSMZ 70877, la concentración de oxígeno disuelto se mantiene por encima del 5% de la concentración de saturación. Este parámetro está controlado por la adición de fuente de carbono, que puede realizarse de forma continua o semicontinua. De esta forma, se alcanzan altas densidades celulares, se evitan las condiciones anaeróbicas y se logra una actividad metabólica máxima.

La extracción de polisacáridos producidos durante la fermentación puede realizarse por cualquier método descrito en la literatura para la extracción de polímeros de la pared celular de hongos o levaduras (por ejemplo, Synowiecki et al., 2003). El proceso químico usado en la presente invención, además de generar una mezcla de polisacáridos rica en quitina, da como resultado la producción de diferentes fracciones de otros polisacáridos que contienen glucosa, manosa y/o galactosa, que pueden encontrar varias aplicaciones agroalimentarias y biomédicas.

Las operaciones de extracción química tienen cierto riesgo de degradación del polímero. Alternativamente, pueden adoptarse procedimientos de extracción enzimática que usan proteasas y lisozimas para degradar el material proteico

y el glucano de la pared celular, respectivamente. Aunque son métodos menos contaminantes, tienen la desventaja de costos relativamente más altos.

Figuras

5  
 Figura 1 - Perfil del peso seco celular de *Pichia pastoris* durante su fermentación usando glicerol puro (99%) o subproducto de glicerol (86%) de la industria del biodiesel, como fuentes de carbono.

Descripción detallada de la invención

10  
 1. Producción de polímeros  
 1.1. Microorganismo

15  
 La presente invención se relaciona con la producción de quitina y polímeros que contienen glucosa, manosa y/o galactosa, así como sus derivados, mediante la fermentación de la cepa de *Pichia pastoris* DSMZ 70877.

1.2. Medio de fermentación

20  
 La fermentación de *P. pastoris* DSMZ 70877 se realiza en un medio acuoso que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas.

25  
 La fuente de carbono es preferiblemente una mezcla rica en glicerol generada por la industria del biodiesel. También se pueden usar glicerol puro, metanol, glucosa o mezclas de los mismos. Alternativamente, *P. pastoris* puede crecer en muchos otros compuestos, que incluyen alcoholes, azúcares, ácidos orgánicos, ácidos grasos o aminoácidos, en sus formas monoméricas, diméricas u oligoméricas.

Todos estos sustratos pueden ser compuestos puros o, preferiblemente, se originan a partir de desechos o subproductos agroindustriales, tales como la industria del biodiesel.

30  
 La fuente de nitrógeno es, preferiblemente, amoníaco, pero pueden usarse sales de amonio o compuestos orgánicos nitrogenados (por ejemplo, extracto de levadura, urea o peptona).

35  
 El medio de fermentación también incluye sales que contienen iones (por ejemplo,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ) y metales traza, tales como cobalto, cobre, manganeso y hierro.

Los medios descritos son meramente ilustrativos de la gran diversidad de sustratos que se pueden usar para el crecimiento de *P. pastoris* DSMZ 70877 y no deben considerarse restrictivos.

1.3. Condiciones de fermentación

40  
 La presente invención se relaciona con cualquier procedimiento o protocolo para la producción de polisacáridos de pared celular, quitina, polímeros que contienen glucosa, manosa y/o galactosa, o sus productos de derivatización, que usan la fermentación de *Pichia pastoris*. Más específicamente, la presente invención describe algunas metodologías que favorecen el crecimiento de *P. pastoris* DSMZ 70877 para alcanzar altas densidades celulares y alto contenido de quitina/glucano en la pared celular del microorganismo.

50  
 La fermentación se realiza en un medio acuoso, bajo aireación con aire comprimido. La temperatura se controla entre 10 y 60°C, preferiblemente entre 20 y 40°C, y el pH se controla entre 1.0 y 10.0, preferiblemente entre 3.0 y 8.0, mediante la adición automática de un álcali (por ejemplo, NaOH, KOH o  $NH_3$ ). Cuando se usa amoníaco o hidróxido de amonio, también sirven como fuentes de nitrógeno.

55  
 La concentración de oxígeno disuelto en el caldo de fermentación disminuye gradualmente de forma concomitante con el crecimiento celular. Esta disminución está determinada por la tasa de crecimiento específica de la cepa. La limitación del oxígeno se evita mediante la manipulación de la tasa de agitación, la tasa del flujo de aire, la presión, la temperatura y/o la tasa de alimentación de la fuente de carbono limitante, de acuerdo con la capacidad y las limitaciones del biorreactor.

Para alcanzar altas densidades celulares, el modo de operación puede ser continuo o alimentado por lotes y puede tener una fase de lote inicial.

60  
 Cuando el proceso se inicia en modo discontinuo, la alimentación del caldo de fermentación se inicia cuando la fuente de carbono alcanza concentraciones limitantes de crecimiento, manteniéndose, preferiblemente, con una tasa de alimentación exponencial hasta que la concentración de oxígeno disuelto alcanza un valor umbral crítico, previamente definido sobre la base de las propiedades del reactor. La solución de alimentación está compuesta por la fuente de carbono y una solución salina al 2% (v/v). Si el pH se controla con una base distinta al amoníaco, la solución de

alimentación debe incluir la fuente de nitrógeno en la misma proporción carbono/nitrógeno presente en el medio de cultivo inicial (aproximadamente 3:1).

5 La producción de polisacáridos de la pared celular está asociada al crecimiento. Por lo tanto, la fermentación de alimentación por lote finaliza cuando el cultivo entra en la fase de crecimiento estacionario. Si el proceso se opera en modo continuo, la rata de dilución se mantiene cerca del valor umbral de lavado en tanto la concentración de oxígeno disuelto no caiga a 0%.

10 La producción de quitina y quitosano puede variar entre 10 y 40 g/L, y hasta 10 g/L, respectivamente. Estos valores varían de acuerdo con la densidad celular obtenida que generalmente es superior a 150 g/L. El contenido de quitina/quitosano en la biomasa se puede aumentar extendiendo la fermentación bajo condiciones que favorezcan su producción desacoplada del crecimiento celular. Tales condiciones incluyen aumentar la temperatura (hasta 30°C), el pH (entre 3 y 8) o la fuerza iónica durante la fase de crecimiento estacionario.

15 Asociado a la producción de quitina/quitosano, el proceso de la presente invención también prevé la coproducción de polisacáridos de pared celular que contienen glucosa, manosa y/o galactosa, que pueden representar hasta 45% del peso seco de la célula.

## 20 2. Extracción y purificación de los productos de fermentación

Los protocolos que pueden usarse para extraer y purificar los polisacáridos descritos en la presente invención son los siguientes.

25 Las células se separan del caldo de fermentación por filtración, decantación o centrifugación, siendo este último el método más eficiente.

Las células separadas preferiblemente por centrifugación se someten a tratamiento con una solución alcalina (pH superior a 10.0) para eliminar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

30 Las proteínas y ácidos nucleicos se degradan por reacción con altas concentraciones de una base fuerte (NaOH o KOH), mientras que los lípidos se eliminan por reacción con solventes orgánicos (por ejemplo, etanol, metanol, acetona) o detergentes. Esos procedimientos toman entre 30 minutos y 3 horas, dependiendo de la temperatura (65-90°C) y pueden realizarse consecutivamente o simultáneamente, lo que hace que el proceso sea menos costoso y aumenta su rendimiento.

35 El material insoluble así obtenido está compuesto principalmente por material inorgánico, quitina y sus derivados, y otros polisacáridos insolubles, tales como glucanos y mananos. Los polisacáridos solubles, es decir,  $\beta$ -glucanos muy ramificados y  $\alpha$ -1,3-glucanos y galactomananos (polímeros compuestos por residuos de manosa y galactosa) permanecen en el sobrenadante.

40 Después de la centrifugación y el lavado con agua y etanol (u otros solventes orgánicos, tales como metanol, éter dietílico o acetona), la quitina se separa de otros polisacáridos insolubles. Para ello, se realiza una hidrólisis parcial con ácido acético (u otro ácido débil), a una temperatura superior a 75°C, o con HCl diluido (u otro ácido inorgánico), a una temperatura de 50°C. Este procedimiento permite la solubilización de algunos  $\alpha$ -1,6-glucanos ramificados que no se extrajeron previamente. La mayoría de los glucanos se recuperan mediante extracción alcalina, seguida de centrifugación para recuperar la fracción insoluble en la que se incluye la quitina.

45 El material insoluble se suspende en un álcali fuerte y caliente (NaOH) para disolver los glucanos solubles en álcali. La temperatura debe estar por encima de 20°C pero por debajo de 75°C para evitar la degradación de la quitina.

50 El material insoluble se recupera por centrifugación y se lava a fondo con agua y etanol (u otro solvente orgánico). Después, el quitosano se extrae por solubilización en ácido acético al 2% (v/v) y se separa por centrifugación. El quitosano permanece en el sobrenadante, mientras que el gránulo contiene quitina y otros polímeros insolubles. El quitosano se precipita ajustando el pH a 6.0 y se recupera por centrifugación.

55 La pella que contiene quitina y otros polímeros insolubles (complejo de quitina/glucano) se disuelve en una solución de cloruro de litio al 5% en dimetilacetamida (DMAC) o en dimetilsulfóxido (DMSO). La solución se mantiene bajo agitación constante durante al menos 12 horas, para la disolución completa de los polímeros. Después de la centrifugación para eliminar el material que no se solubilizó, el complejo de quitina/glucano se precipita mediante la adición de agua. La solución DMAC (o DMSO) se mezcla con agua varias veces, hasta que no haya más formación de precipitado. El complejo de quitina/glucano extraído se lava a fondo con agua para eliminar todo el solvente. El paso final consiste en secar a temperaturas de hasta 60°C o liofilizar.

60

Alternativamente, se pueden usar condiciones más duras mientras se trata con un álcali fuerte, obteniendo así una desacetilación completa de quitina a quitosano. Esas condiciones extremas incluyen aumentar la temperatura hasta 128°C, usar una concentración alcalina de 15 N o aumentar el tiempo de reacción hasta 7 horas.

5 Los procedimientos de extracción y purificación descritos anteriormente dan como resultado la generación de varias fracciones de otros polímeros, además del complejo de quitina/glucano. Esos polímeros son principalmente polisacáridos compuestos por residuos de glucosa, manosa y/o galactosa.

10 Los glucanos de pared celular solubles alcalinos se componen principalmente de enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1,3) y  $\beta$ -(1,6). Se extraen disolviéndolos en una solución alcalina, seguido de su recuperación por precipitación en solventes inmiscibles o por diálisis que resulta en aproximadamente 4% de glucanos solubles alcalinos.

### Ejemplos

#### 15 **Ejemplo 1: fermentación de *Pichia pastoris* en glicerol**

Se inocularon 14.25 L de medio de fermentación con la composición descrita en la Tabla 1 con 750 mL de un cultivo de *Pichia pastoris* DSMZ 70877. La fermentación se realizó en un biorreactor a escala piloto (LP351, 50 L, BioEngineering, Suiza) con temperatura y pH controlados (30°C y 5.0, respectivamente). La rata de flujo de aire se mantuvo en 30 L/min y la presión se mantuvo a 0.10 bar durante toda la ejecución. El pH se controló mediante la adición de hidróxido de amonio. La rata de agitación inicial fue 300 rpm.

Después de 30 h de fermentación, la concentración de oxígeno disuelto (pO<sub>2</sub>) cayó al 50%. A partir de ese momento, se controló el 20%, aumentando la rata de agitación hasta 1000 rpm. Cuando la velocidad de agitación alcanzó 440 rpm, el biorreactor comenzó a alimentarse con una solución que contiene glicerol (990 g/L) y 24 g/L de la solución mineral descrita en la Tabla 1. La rata de alimentación fue exponencial y se calculó de acuerdo con la rata de crecimiento celular

Tabla 1: Composición del medio de fermentación.

Componente	Concentración (g/L)
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.93
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.20
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	14.90
KOH	4.13
Glicerol (99%)	40.00
Antiespumante	0.40
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85%)	26.70 mL
Solución mineral*	4.35 mL
(*composición de la solución mineral: 6.0 g/L CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, 0.08 g/L NaI, 3.0 g/L MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O, 0.2 g/L Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, 0.02 g/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0.5 g/L CoCl <sub>2</sub> , 20.0 g/L ZnCl, 65.0 g/L FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0.2 g/L biotina 5.0 mL/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .)	

35 Cuando se alcanzó la rata máxima de agitación (1000 rpm) (alrededor de 44 h de fermentación), la pO<sub>2</sub> se controló al 20% por la limitación del sustrato. La rata de adición de la solución de alimentación se ajustó continuamente para evitar que la pO<sub>2</sub> caiga por debajo del 20%.

Dentro de las 70 h de la fermentación, el cultivo ingresó a la fase de crecimiento estacionario y la ejecución finalizó. Las células se recuperaron por centrifugación del caldo de fermentación (8000 rpm, 45 min) y se liofilizaron. Se obtuvieron 237 g de células por cada litro de caldo de fermentación.

#### 40 **Ejemplo 2: producción de complejo de quitina/glucano por fermentación de *Pichia pastoris* en subproducto de glicerol de la industria del biodiesel**

45 El protocolo descrito en el ejemplo 1 se usó para cultivar *Pichia pastoris* DSMZ 70877. El glicerol puro se reemplazó por subproducto de glicerol de la industria del biodiesel, que contiene 86% de glicerol. Las ratas de flujo de la solución de alimentación se corrigieron teniendo en cuenta la nueva composición de sustrato. La evolución del peso seco de la celda para ambas corridas se presenta en la Figura 1.

Al final de la fermentación, se obtuvieron 224 g/L de biomasa. La fase de crecimiento estacionario se alcanzó aproximadamente 6 h antes que en la fermentación con glicerol puro.

5 Mediante el uso del procedimiento de extracción propuesto por Synowiecki et al. (2003), se obtuvieron 0.352 g de complejo de quitina/glucano, que corresponde al 11.7% de la biomasa de *P. pastoris*. Considerando la densidad celular obtenida al final de la fermentación, la productividad del polímero fue 8.99 kg/m<sup>3</sup>.día.

10 Mediante el uso un kit enzimático para el análisis de glucano (K-YBG, Megazyme), el contenido de biomasa en glucanos fue del 14%, mientras que el complejo de quitina/glucano extraído contenía 38.2% de glucanos. La glucosa y la glucosamina fueron los únicos monómeros de azúcar detectados por cromatografía líquida, después de la hidrólisis ácida. Por lo tanto, el complejo de quitina/glucano extraído tenía 9% de quitina, 1% de humedad, 4% de cenizas y 6% de proteínas.

15 Teniendo en cuenta estos resultados, se concluyó que la biomasa obtenida en el ejemplo 2 tenía un contenido de quitina del 3%.

#### Referencias

- 20 Aguilar-Uscanga B, François J (2003) *Lett Appl Microb*, 37, 268-274.
- Camargo E, Dietrich C, Sonnenborn D, Strominger J (1967) *J Biol Chem*, 242(13), 3121-3128.
- Çelik E, Ozbay N, Oktar N, Çalik P (2008), *Ind Eng Chem Res*, 47(9), 2985-2990.
- 25 Freimund S, Janett S, Arrigoni E, Amadò R (2005) *European Food Research and Technology*, 220(1), 101-105.
- Hallmann J, Rodríguez-Kábana R, Kloepper J (1999) *Soil Biol Biochem*, 31, 551-560.
- 30 Hamlyn F, Schmidt R (1994) *Mycologist*, 8(4), 147-152.
- Hennen W (1996) *Woodland Publishing Inc*, Utah, EUA.
- ICNHP (1995) *International Commission on Natural Health Products*, Georgia, EUA.
- 35 Keller F, Cabib E (1970) *J Biol Chem*, 246(1), 160-166.
- Kim S (2004) *Department of Food Science, Louisiana State University*, EUA.
- 40 Kim S, No H, Prinyawiwatkul W (2007) *J Food Sci*, 72(1), 44-48.
- MacMurrough I, Rose A (1967) *Biochem J*, 105, 189-203.
- Momany M, Hamer J (1997) *Cell Mot Cytoskel*, 38, 373-384.
- 45 Singh D, Ray A (2000) *Polymer Reviews*, 40(1), 69-83.
- Synowiecki J, Al-Khateeb N (2003) *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(2), 145-171.
- 50 Tanabe S, Okada M, Jikumaru Y, Yamane H, Kaku H, Shibuya N, Minami E (2006) *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, 1599-1605.
- Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, Pichyangkura R, Banaprasert T, Tabata Y, Damrongsakkul S(2007) *J Biomater Sci Polymer Edn*, (18)2, 147-163.
- 55 Vetter J (2007) *Food Chemistry*, 102(1), 6-9.

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para la producción de
- 5 - un complejo de quitina/glucano que comprende quitina/quitosano y glucano; y
- polímeros que contienen glucosa, manosa y/ galactosa, donde el proceso comprende los siguientes pasos:
- fermentación de *Pichia pastoris* DSMZ70877 en un medio de cultivo que comprende una fuente de nitrógeno y que comprende además como fuente de carbono:
- 10 • un subproducto rico en glicerol generado por la industria del biodiesel, una mezcla que contiene glicerol, un alcohol, un azúcar, un ácido orgánico, un poliol, un ácido graso o aminoácido, en sus formas monoméricas, diméricas u oligoméricas; y
- un desperdicio o subproducto alimenticio o industrial, que contiene uno o más de glicerol, un alcohol, un azúcar, un ácido orgánico, un ácido graso o un aminoácido, en sus formas monoméricas, diméricas u oligoméricas; y
- control del pH durante la fermentación.
- 15 2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el subproducto generado por la industria del biodiesel es al menos 86% de glicerol.
3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el subproducto generado por la industria del biodiesel es al menos 99% de glicerol.
- 20 4. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura durante la fermentación se controla entre 20°C a 40°C.
5. Proceso de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que la temperatura durante la fermentación se controla a 30°C.
- 25 6. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH durante la fermentación se controla mediante la adición de un álcali, amoníaco o una sal de amonio.
- 30 7. Proceso de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que el pH durante la fermentación varía entre pH de 5.0 y pH de 7.0.
8. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-7 en el que el pH durante la fermentación se controla a pH de 5.0.
- 35 9. Proceso de acuerdo la reivindicación anterior, en el que los polímeros obtenidos durante la fermentación comprenden glucosa, manosa y/o polisacáridos de galactosa hasta en un 45% del peso seco de la célula.

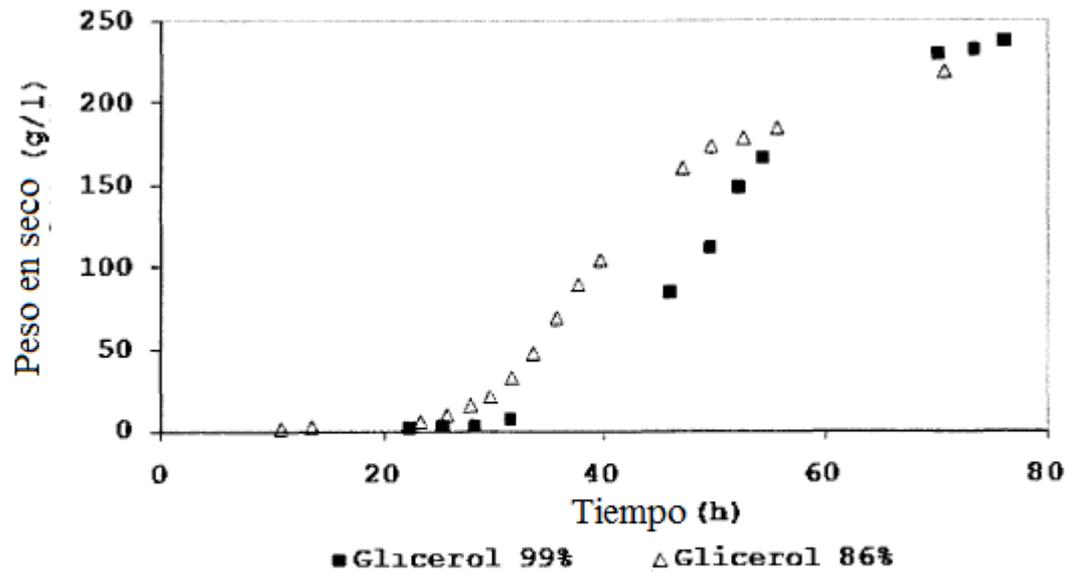


Figura 1