



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 387**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/24** (2006.01)

**C12P 7/22** (2006.01)

**C12P 7/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02759795 .4**

96 Fecha de presentación : **05.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1379675**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2004**

54 Título: **Método para la oxidación de compuestos aromáticos.**

30 Prioridad: **06.04.2001 DE 101 17 359**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2009**

73 Titular/es: **BASF SE**  
**67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es: **Hauer, Bernhard;**  
**Zelinski, Thomas;**  
**Witholt, Bernhard;**  
**Schmid, Andreas y**  
**Bühler, Bruno**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 315 387 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

Método para la oxidación de compuestos aromáticos.

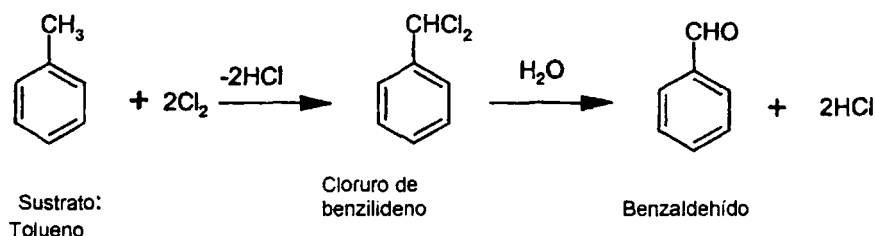
5 La invención se refiere a un método para la oxidación bio-catalítica de compuestos aromáticos.

Los compuestos aromáticos, tales como aldehídos, son ingredientes importantes en perfumes y sustancias de fragancias y aromas (Wittcoff und Reuben 1996). Así mismo, son válidas como sustancias de partida para diferentes polímeros, fármacos y productos químicos finos.

10 La ruta de síntesis química más importante para la preparación de un aldehído aromático típico, a saber del benzaldehído, se efectúa a partir de tolueno (Wittcoff y Reuben 1996). Mediante la dicloración de tolueno se genera el cloruro de benzilideno, el cual se transforma en benzaldehído mediante hidrólisis (esquema 1).

Esquema 1

Preparación de benzaldehído a partir de tolueno



30 La oxidación específica de un solo grupo metilo o el aislamiento a partir de mezclas de producto representan la gran dificultad en síntesis química. Además, las reacciones deben realizarse con mucha frecuencia con ayuda de sustancias extremadamente venenosas o en condiciones extremas de reacción. Además, los productos secundarios formados durante la síntesis química representan un problema. Por las razones expuestas arriba, la preparación de 3,4-dimetilbenzaldehído por medio de síntesis química es muy difícil, por ejemplo.

35 La preparación biocatalítica de compuestos aromáticos, tales como aldehídos, representa una alternativa a la preparación química descrita arriba.

40 Para la producción de aldehídos aromáticos se usan principalmente las clases de enzima de las transferasas, liasas (Simmonds and Robinson 1997; Simmonds and Robinson 1998) y oxidoreductasas (Legoy, Kim *et al.* 1985; Molinari, Villa *et al.* 1995; Molinari, Aragozzini *et al.* 1997; Molinari, Gandolfi *et al.* 1999). Las oxido-reductasas son de interés especial ya que están en la capacidad de oxidar solo un grupo metilo de manera estereo- o región-selectiva de xilenos, por ejemplo. Los xilenos son válidos como sustratos económicos y pueden convertirse en los respectivos aldehídos en una reacción de dos pasos.

45 El TOL-plásmido pWWO de pseudomonas putida mt-2 hace posible el catabolismo de toluenos y xilenos. Las rutas catabólicas de degradación superior y meta-degradación están codificadas en dos operones separados en el plásmido. Las enzimas de la ruta catabólica superior catalizan la oxidación de toluenos o xilenos hasta los ácidos benzoicos respectivos y las enzimas de la ruta catabólica de meta-degradación aquellas reacciones que degradan el ácido benzoico hasta sustratos del ciclo de ácido cítrico (Harayama, Reikik *et al.* 1989; Harayama, Kok *et al.* 1992; Ramos, Marqués *et al.* 1997; Williams, Shaw *et al.* 1997). La ruta catabólica superior para la preparación es de interés particular para la preparación de aldehídos aromáticos. El operón de la ruta catabólica superior contiene 5 genes (Harayama, Leppik *et al.* 1986). Tal como puede verse en el esquema 2, la primera enzima es la xileno monooxigenasa (XMO), que transforma toluenos o xilenos en los respectivos alcoholes bencílicos.

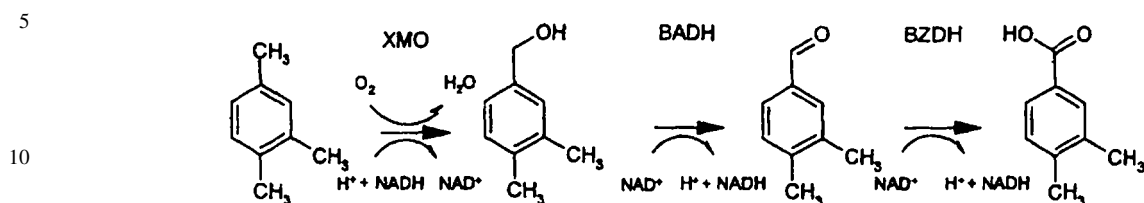
60

65

## ES 2 315 387 T3

### Esquema 2

#### Ruta catabólica superior de *Pseudomonas putida*-mt2



15 XMO: Xilenomonooxigenasa

BADH: Dehidrogenasa de alcohol bencílico BZDH: Dehidrogenasa de benzaldehído

BZDH: Bensaldehído-dehidrogenasa

20 La segunda enzima es la dehidrogenasa de alcohol bencílico (BADH), la cual es capaz de catalizar la reacción de alcoholes bencílicos hasta benzaldehídos. En el caso de las reacciones descritas, NADH se consume por la xileno monooxigenasa y se re-sintetiza por la alcohol dehidrogenasa. Si se usaran estas dos enzimas para la producción de benzaldehídos resultaría un balance equilibrado de NADH.

25 Cuando se usaron conjuntamente XMO y BADH en la *E. coli* recombinante para convertir tolueno hasta los benzaldehídos correspondientes, los benzaldehídos se formaron solo en cantidades pequeñas. Se observó más bien una re-síntesis de los benzaldehídos hacia los alcoholes bencílicos correspondientes (Bühler, Schmid *et al.* 2000). Se ha demostrado que el equilibrio de las reacciones catalizadas por BADH se inclinaba predominantemente hacia los alcoholes.

30

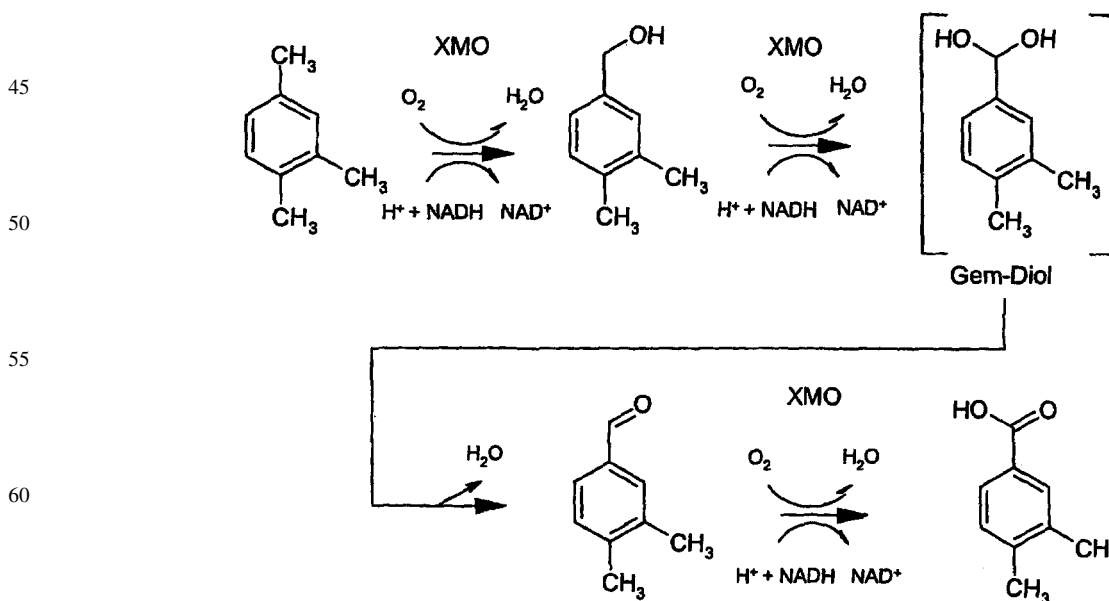
Según Bühler, Schmid *et al.* (2000), sin embargo, la xileno-monooxigenasa por sí misma es capaz de catalizar la oxidación de pasos múltiples de un grupo metilo de toluenos o xilenos hasta un alcohol bencílico, benzaldehído y ácido benzoico, incluso en ausencia de BADH. Esto se efectúa introduciendo un átomo de alcohol de oxígeno molecular, es decir mediante mono-oxigenaciones (Bühler, Schmid *et al.* 2000). En el esquema 3 muestra las reacciones catalizadas por XMO. Debe notarse que, en contraste con las reacciones de dehidrogenación, las reacciones de mono-oxigenación son irreversibles.

35

### Esquema 3

#### Rutas de reacción catalizadas por xileno monooxigenasa (XMO)

40



Para controlar la expresión de XMO en *E. Coli* recombinante, se usó el sistema de regulación alk el cual puede inducirse mediante n-octano (Panke, Meyer *et al.* 1999) (véase la figura 1).

## ES 2 315 387 T3

La producción biotecnológica de aromáticos oxidados selectivamente, tales como 3,4-dimetilbenzaldehído, a partir de sustratos baratos, es de gran interés puesto que la oxidación regioespecífica de un solo grupo metilo mediante síntesis química es muy difícil. La baja solubilidad en agua y la toxicidad de los sustratos y los productos para las células son de importancia crucial. Por ejemplo, a una concentración de 1-4 mM los toluenos ya tienen un efecto tóxico sobre *E. coli* (Schmid 1997). Esto limita la aplicabilidad del sistema monofásico acuoso.

En la anterior solicitud alemana de patente DE-A-199 51 768.1 se describe un método para la producción biocatalítica de aldehídos aromáticos y/o ácidos carboxílicos en un medio de reacción monofásico usando organismos que expresan XMO.

### Descripción breve de la invención

Es un propósito de la presente invención proporcionar un proceso biocatalítico mejorado para la oxidación de compuestos aromáticos con la ayuda de microorganismos que producen XMO. En particular, el método novedoso está dirigido a llevarse a cabo a escala más grande, semi-industrial o industrial.

Sorprendentemente pudo demostrarse por medio del sistema modelo de la oxidación microbiológica de pseudocumeno hasta los productos de oxidación correspondientes (alcohol, aldehído, ácido carboxílico) que este objeto se logra usando un medio de reacción bifásico acuoso/orgánico. El sistema bifásico de acuerdo con la invención se distingue frente a un sistema monofásico acuoso convencional por varias ventajas importantes (tabla 1).

TABLA 1

#### *Ventajas de sistemas multifásicos*

- concentración elevada de sustratos/productos que son levemente solubles en agua;
- procesamiento de producto facilitado en la fase de separación;
- reducción de inhibiciones de sustratos o de producto;
- desplazamiento del equilibrio de reacción hacia velocidades de conversión más altas mediante extracción de producto;
- reversión de una reacción hidrolítica reduciendo la actividad de agua;
- pequeños volúmenes de reactor y flujos de volumen
- riesgo bajo de contaminación microbiana
- riesgo bajo de escisión de sustratos o productos inestables.

### Descripción detallada de la invención

En particular, la presente invención se refiere a un proceso para la oxidación biocatalítica de compuestos aromáticos el cual comprende

a) cultivar en condiciones aeróbicas un microorganismo que expresa una enzima con actividad de xileno monooxigenasa (XMO) en un medio de cultivo bifásico, acuoso-orgánico el cual comprende un sustrato aromático de la fórmula II



en la cual

Ar representa un anillo aromático mononuclear insustituido o mono- o poli-sustituido; y

R<sup>2</sup> representa -(CH<sub>2</sub>)<sub>n+1</sub>R<sup>3</sup>, donde n es un problema entero de 0 hasta 15, como por ejemplo 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y

R<sup>3</sup> representa H; y

b) aislar del medio de cultivo al menos un producto formado en la reacción de oxidación catalizada por XMO, en donde el residuo R<sup>2</sup> ha sido oxidado hasta el residuo hidroxilo, carbonilo o carboxilo correspondiente; y donde el grado de oxidación del sustrato usado es controlable mediante el ajuste de la concentración de sustrato.

## ES 2 315 387 T3

### a) *Eductos (sustancias de partida) empleados*

Las reacciones según la invención pueden efectuarse usando la misma enzima (XMO) en uno o más pasos. El compuesto aromático alquilado, el alcohol correspondiente o el aldehído correspondiente pueden emplearse como sustrato. El grado deseado de oxidación del sustrato empleado puede controlarse tal como será ilustrado en gran detalle de aquí en adelante.

El sistema de anillo aromático Ar en los compuestos de las fórmulas I y II que se preparan de acuerdo con la invención o se emplean como sustratos pueden ser mono- o poli-sustituídos. La posición del/de los sustituyente(s) del anillo puede seleccionarse como se desee. Sin embargo, se prefiere la posición meta y/o para hacia el lado de la cadena a oxidarse.

Sustituyentes adecuados en el compuesto aromático comprenden alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, tal como metilo, etilo, n- y i-propilo y n-butilo, en especial metilo y etilo, alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, en especial metoxi y etoxi, halógeno, tal como F, Cl, Br y I, en especial Cl, y nitro.

Ejemplos concretos no limitantes de los sustratos de la fórmula II oxidables mediante XMO de acuerdo con la invención son tolueno, xilenos, meta y/o para metil-, etil-, metoxi-, nitro-, y cloro-toluenos sustituidos, así como m-bromo tolueno sustituido y pseudocumeno (es decir, trimetilbencenos).

### b) *Fase orgánica*

La selección de la fase orgánica es importante para el sistema bifásico usado de acuerdo con la invención y depende de diversos parámetros:

- el efecto tóxico o inhibitorio de la fase orgánica en las células
- la solubilidad de los sustratos y productos en la fase orgánica
- los coeficientes de distribución de sustrato y producto
- inflamabilidad y toxicidad de la fase orgánica
- diferencia en la densidad de la fase orgánica y agua
- el punto de ebullición de la fase orgánica

Como fase orgánica del medio de reacción bifásica se usa preferiblemente un compuesto orgánico apolar que tiene un coeficiente de distribución de  $> 10^4$  en un sistema bifásico n-octanol/agua.

Además se prefiere el uso de aquellas fases orgánicas que tienen un punto de ebullición o rango de ebullición a 1 atmósfera que excede el punto de ebullición del(de los) producto(s) de oxidación en aproximadamente 50 hasta 200°C, en particular del producto de oxidación a aislarse con el punto de ebullición más alto. Una fase orgánica que se usa de manera particularmente preferible es di-(C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>-alquil)-ftalato o una mezcla de tales ftalatos. De manera particularmente preferible se usan dioctilo ftalatos (bis-etil-hexil-ftalato) y aquellos que pueden actuar simultáneamente como antiespumantes durante la fermentación.

De acuerdo con una variante preferida del proceso de acuerdo con la invención se obtiene el producto de reacción separando la fase orgánica y retirando el/los productos(s) de oxidación disueltos allí mediante destilación.

### c) *Biocatalizador empleado y constructos de expresión*

Los métodos de acuerdo con la invención se llevan a cabo preferiblemente usando XMO, codificado por los genes xylA y xylB según el acceso a xylMA GENBANK No. M37480 y las isoenzimas correspondientes. XMO proviene preferiblemente de bacterias del tipo Pseudomonas, en especial de la especie Pseudomonas putida, preferiblemente cepa mt-2 (ATCC 33015).

De acuerdo con la invención también se abarca el uso de "equivalentes funcionales" de XMOs divulgadas concretamente.

"Equivalentes funcionales" o análogos de las monooxigenasas divulgadas concretamente son, para los propósitos de la presente invención enzimas que difieren de ellas pero continúan mostrando la reacción deseada y son útiles para la preparación de alcoholes, aldehídos y/o ácidos carboxílicos de la fórmula I de arriba.

## ES 2 315 387 T3

Por “equivalentes funcionales” se entienden de acuerdo con la invención especialmente mutantes de enzima que en al menos una posición de secuencia tienen un amino ácido distinto del amino ácido original, pero aún cataliza una de las reacciones de oxidación arriba mencionadas. De esta manera, “equivalentes funcionales” abarcan los mutantes obtenibles mediante una o más adiciones, sustituciones, de amino ácido, sustituciones, deleciones y/o inversiones de amino ácido, y es posible que ocurran las modificaciones arriba mencionadas en cualquier posición de secuencia siempre que den origen a un mutante con la actividad catalítica de acuerdo con la invención. La equivalencia funcional existe también en particular cuando los patrones de reactividad entre mutante y enzima inmodificada están de acuerdo en términos de calidad; es decir, cuando, por ejemplo, se convierten sustratos idénticos a velocidades diferentes.

Por supuesto, “equivalentes funcionales” comprenden también monooxigenasas que son accesibles de otros organismos, por ejemplo otras bacterias diferentes de aquellas mencionadas específicamente aquí, y variantes o isoenzimas que se dan naturalmente. Por ejemplo, regiones de secuencias homólogas pueden identificarse mediante una comparación de secuencia y pueden determinarse enzimas equivalentes de conformidad con las tareas específicas de la invención.

De acuerdo con la invención también se abarca el uso de otras secuencias de ácido nucleico (secuencias de ADN y ARN de una o dos cuerdas) diferentes de las nombradas concretamente, las cuales codifican una de las monooxigenasas de arriba y sus equivalentes funcionales. Otras secuencias de ácido nucleico útiles de acuerdo con la invención se diferencian de las secuencias empleadas concretamente por adición, sustitución, inserción o deleción de uno o más nucleótidos, pero continúan codificando una monooxigenasa con el perfil deseado de propiedades.

De acuerdo con la invención se abarca también el uso de aquellas secuencias de ácido nucleico que comprenden lo que se conoce como mutaciones silentes o que se modifican en comparación con una secuencia mencionada específicamente de acuerdo con la utilización de codón de un organismo u organismo huésped de fuente específica tal como variantes que se dan naturalmente como, por ejemplo, variantes de empalme de las mismas. La invención también se refiere a secuencias que pueden obtenerse mediante sustituciones nucleótidas de conservación (es decir, el aminoácido en cuestión se reemplaza por un aminoácido de la misma carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

La secuencia de XMO que codifica es un componente de constructos de expresión que comprende, bajo el control genético de las secuencias regulatorias de ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima monooxigenasa que puede usarse de conformidad con la invención. Tales constructos de acuerdo con la invención comprenden preferiblemente un promotor corriente arriba 5' de la secuencia codificante respectiva y una secuencia terminadora corriente abajo 3' y, opcionalmente, otros elementos reguladores, en cada caso enlazados de manera operativa con la secuencia codificante. Por un “enlace operativo” se entiende la disposición secuencial de promotor, secuencia codificante, terminador y, opcionalmente, otros elementos reguladores de tal manera que cada uno de los elementos reguladores puede efectuar su función en la expresión de la secuencia codificante. Ejemplos de secuencias que pueden enlazarse de manera operativa son secuencias de focalización así como reforzadores de translación, otros reforzadores, señales de poliadenilación y similares. Otros elementos regulatorios comprenden marcadores seleccionables, señales de amplificación, orígenes de replicación y similares.

La secuencia regulatoria natural puede estar presente aún antes del propio gene estructural, en adición a las secuencias regulatorias artificiales. Mediante modificación genética esta regulación natural puede eliminarse opcionalmente y la expresión del gen puede elevarse o reducirse. Sin embargo, el constructo génico puede ser simple en estructura, es decir no se insertan señales regulatorias adicionales antes del gen estructural, y no se retira el promotor natural junto con su regulación. En vez de eso, la secuencia regulatoria natural se muta de tal manera que la regulación ya no tiene lugar y la expresión del gen se incrementa o se reduce.

En el constructo génico pueden estar presentes las secuencias de ácido nucleico en una o varias copias.

Ejemplos de promotores útiles son: promotores *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacIq*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara*, *SP6*, *I-PR* o *I-PL*, que se usan ventajosamente en bacterias gram-negativas; así como los promotores gram positivos *amy* y *SPO2*, los promotores de levadura *ADC1*, *MFa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH* o los promotores de vegetales *CaMV/35S*, *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, not o el promotor ubiquitina o phaseolina. Se prefiere particularmente el uso de promotores inducibles como, por ejemplo, promotores inducibles por luz o temperatura, como el promotor *P<sub>i</sub>P<sub>i</sub>*.

En principio pueden usarse todos los promotores naturales junto con sus secuencias regulatorias. Adicionalmente también pueden usarse de manera ventajosa los promotores sintéticos.

Las secuencias regulatorias mencionadas deben hacer posible la expresión dirigida de las secuencias de amino ácidos. Dependiendo del organismo huésped esto puede significar, por ejemplo, que el gen se expresa o se sobreexpresa solo después de inducción, o que se expresa y/o sobreexpresa inmediatamente.

Estas secuencias o factores regulatorios pueden tener preferiblemente un efecto positivo sobre la expresión, de tal modo que lo aumente o lo disminuya. De esta manera los elementos regulatorios pueden reforzarse ventajosamente al nivel de transcripción usando fuertes señales de transcripción tales como promotores y/o “reforzadores”. Además, también es posible un refuerzo de translación, mejorando la estabilidad del mARN, por ejemplo.

## ES 2 315 387 T3

La preparación de un casete de expresión de acuerdo con la invención se efectúa mediante fusión de un promotor adecuado con una secuencia nucleótida-monooxigenasa adecuada y con una señal de un terminador o de poliadenilación. Para esto se usan técnicas habituales de recombinación y clonación, tal como se describe en Sambrook *et al*, por ejemplo.

Para expresión en un organismo huésped adecuado, el constructo recombinante de ácido nucleico o de gen se inserta ventajosamente en un vector específico al huésped el cual hace posible la expresión óptima de los genes en el huésped. Para el técnico en la materia son bien conocidos los vectores y pueden encontrarse, por ejemplo, en "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. *et al.*).

Además de plásmidos, por vectores se entienden todos los otros vectores conocidos para la persona técnica en la materia tales como, por ejemplo, fagos, virus tales como SV40, CMV, CaMV, baculovirus y adenovirus, transposones, elementos IS, fasmidas, cosmidas, y ADN lineales o circulares. Estos vectores pueden replicarse autónomamente en el organismo huésped o se replica cromosomalmente.

Con ayuda de tales vectores de acuerdo con la invención pueden producirse microorganismos recombinantes que se transforman por ejemplo con al menos un vector de acuerdo con la invención y que puede emplearse en el proceso de acuerdo con la invención. Los constructos recombinantes descritos arriba de acuerdo con la invención se introducen a, y se expresan en, ventajosamente un sistema huésped adecuado. Se prefiere usar métodos de clonación y transfección, que son familiares para el técnico en la materia, tales como por ejemplo coprecipitación, fusión de protoplasto, electroporación, transfección retroviral y similares para expresar los ácidos nucleicos mencionados en el sistema de expresión respectivo. Se describen sistemas adecuados, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel *et al.*

### d) *Microorganismos*

Como organismos huésped son adecuados, en principio, todos los organismos que hacen posible la expresión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, o sus variantes alélicas de sus equivalentes funcionales o sus derivados, y que pueden emplearse para llevar a cabo la reacción de oxidación microbiológica de acuerdo con la invención. Se entiende por organismos huésped, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras, células vegetales o células animales. Los organismos preferidos son las bacterias.

Sin embargo, un microorganismo que expresa XMO usado preferiblemente es uno que no tiene esencialmente actividad de dehidrogenasa de alcohol bencílico (BADH) ni actividad de dehidrogenasa de benzaldehído (BZDH). Se usa de manera especialmente preferible un microorganismo transformado con el plásmido de expresión pSPZ3.

Los microorganismos que se usan preferiblemente de acuerdo con la invención son bacterias del tipo *Escherichia*, en especial *E. coli*, como por ejemplo la cepa JM101.

La transformación de microorganismos con un vector se lleva a cabo de acuerdo con la invención usando técnicas estándares establecidas y por lo tanto no requiere una descripción detallada.

La selección de organismos transformados exitosamente puede efectuarse mediante genes marcadores que también están presentes en el vector o en casete de expresión. Ejemplos de tales genes marcadores son genes para resistencia a antibióticos y genes para enzimas que catalizan una reacción de color que ocasiona un tinturado de las células transformadas. Estas células pueden seleccionarse entonces por medio de una selección automática de células. Los microorganismos transformados exitosamente con un vector que lleva un gen adecuado para resistencia a antibióticos (por ejemplo G418 o higromicina) pueden seleccionarse mediante medios líquidos o sólidos que comprenden antibióticos. Las proteínas marcadores que se presentan en la superficie de la célula pueden usarse para selección por cromatografía de afinidad.

La combinación de los organismos huésped y los vectores que se ajustan a los organismos, tales como plásmidos, virus o fagos, tales como por ejemplo plásmidos con el sistema polimerasa de ARN/promotor, fagos  $\lambda$  o  $\mu$  u otros fagos temperentes o transposones y/u otras secuencias regulatorias ventajosas forma un sistema de expresión.

De acuerdo con una realización especialmente preferida se usa un microorganismo recombinante que se transforma con un vector de expresión que lleva los genes codificantes XMO *xylM* y *xylA*, por ejemplo bajo el control genético del sistema regulatorio *alk* de *Pseudomonas oleovorans* GPo1.

Se prefiere especialmente el microorganismo transformado con el plásmido de expresión pSPZ3 que codifica *xylMA*.

El sistema regulatorio *alk* de *Pseudomonas oleovorans* GPo1 se conoce de por sí. La expresión del primero de los dos clusters de gen *alk* mencionados arriba está bajo el control de *alkBp*, el promotor *alk*, y comienza en la presencia de la proteína regulatoria funcional *alkS*, la cual se codifica por el segundo cluster de gen *alk*, y en la presencia de un inductor tal como, por ejemplo, un alcano, por ejemplo *n*-octano, o un compuesto que está relacionado íntimamente con éstos, tales como, por ejemplo, dicitopopil cetona (DCPK) (8, 22, 23). El uso del sistema regulatorio *alk* en *E. coli* tiene la ventaja de que no tiene lugar una represión de catabolito.

## ES 2 315 387 T3

### e) Realización del proceso

El proceso de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo discontinuamente, semi-continuamente o continuamente en bio-reactores convencionales. Se prefiere especialmente hacer uso de un proceso semi-continuo en cultivos. Una vez ha finalizado la reacción se retira del reactor el medio de cultivo con excepción de un pequeño residuo tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1 hasta 5% en volumen. El residuo actúa luego como inóculo para el cultivo que sigue.

La selección de la concentración óptima parámetro de proceso, tal como la velocidad de aireación y entrada de oxígeno, la concentración de materiales iniciales, el pH, la temperatura, la composición del medio de reacción con respecto a la fase orgánica y el medio nutriente, el tiempo de alimentación y la velocidad de alimentación y similares puede realizarse por parte del técnico en la materia sin esfuerzo indebido tomando en consideración la revelación en la parte experimental que sigue. Así, por ejemplo, el pH del medio de reacción puede usarse como un parámetro para la productividad del biocatalizador.

En el proceso de acuerdo con la invención se prefiere usar n-octano como inductor, especialmente en una cantidad de 0,001 hasta 0,5% (v/v).

En otra variante preferida del proceso, la reacción de acuerdo con la invención se lleva a cabo en un medio de reacción esencialmente libre de antibiótico. Esto es sorprendentemente ventajoso puesto que en las condiciones de reacción imperantes en realidad debería esperarse que el microorganismo recombinante usado perdiera el plásmido introducido. El hecho de prescindir de antibióticos, posible de acuerdo con la invención, significa un ahorro significativo en los costes, ya que puede prescindirse de antibióticos y, además, no tienen que retirarse antibióticos residuales del medio de reacción procesado.

El grado de oxidación de los sustratos empleados de acuerdo con la invención puede controlarse de diferentes maneras. Por ejemplo, se toman muestras del medio de cultivo a intervalos regulares y el contenido de los derivados correspondientes de alcohol, aldehído y/o ácido carboxílico se analiza mediante cromatografía de gases, cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS) o cromatografía líquida de alto desempeño. Dependiendo de cual derivado oxidado se desea o de cuando se ha establecido una proporción deseada de mezcla, se suspende la incubación. Esto puede efectuarse, por ejemplo, retirando o matando los microorganismos, por ejemplo por centrifugación y decantación y/o mediante tratamiento con ácido, por ejemplo ácido tricloroacético, o mediante tratamiento con calor.

El componente aromático oxidado puede entonces aislarse del medio de cultivo, en particular la fase orgánica, con la ayuda de métodos habituales de separación, por ejemplo mediante destilación simple, destilación fraccionada, rectificación, opcionalmente al vacío, o aplicando métodos cromatográficos adecuados, pero preferiblemente mediante destilación.

### f) Preparación de 3,4-dimetilbenzaldehído

Según una forma preferida de realización de la invención se seleccionó bis-(2-etilhexil)ftalato (dioctilftalato) como fase orgánica de acuerdo con los criterios de arriba para la fase orgánica para oxidación de compuestos aromáticos según la invención, y en particular para la preparación de 3,4-dimetilbenzaldehído a partir de pseudocumeno en un proceso bifásico de fed-batch. El sustrato y el producto de disuelven muy bien en dioctilftalato. Además, esta sustancia orgánica no costosa es altamente retardante de llama y es una segunda fase no tóxica para *E. coli*. El alto punto de ebullición del dioctilftalato (380°C a presión normal) permite la separación de los productos por medio de una destilación.

En la tabla 2 pueden verse los coeficientes de distribución de pseudocumeno, 3,4-dimetilbencilalcohol, 3,4-dimetilbenzaldehído y ácido 3,4-dimetilbenzoico entre dioctilftalato y medio M9 como fase acuosa.

TABLA 2

*Coefficientes de distribución en sistema bifásico DOF/M9 (glucosa)*

Sustancia	Coeficiente de distribución	
Pseudocumeno	24300	± 1500
Alcohol 3,4-dimetilbencílico	50	± 3
3,4-dimetilbenzaldehído	906	± 20
Ácido 3,4-dimetilbenzoico	0,188	± 0,005

## ES 2 315 387 T3

La cinética de este proceso de múltiples etapas desempeña un papel decisivo en el proceso bifásico de fed-batch, preferido de acuerdo con la invención para la preparación de 3,4-dimetilbenzaldehído por medio de *E. coli* recombinante que expresa XMO. De este modo, se ha observado que el ácido 3,4-dimetilbenzoico (DBA) se forma solo cuando la concentración del sustrato remanente es muy baja ( $< 90$  mM en la fase orgánica; corresponde a aproximadamente  $3,7 \mu\text{M}$  en la fase acuosa). Además de la mayor afinidad de la xilomonooxigenasa por pseudocumeno que por el aldehído correspondiente, un factor que probablemente también contribuye con este fenómeno es la inhibición no competitiva del tercer paso de oxidación por parte del pseudocumeno. En el caso de concentraciones de pseudocumeno por encima de  $150$  mM en la fase orgánica (correspondiente a aproximadamente  $6,2 \mu\text{M}$  en la fase acuosa) pudo observarse simultáneamente una formación de alcohol 3,4-dimetilbenzílico y una de 3,4-dimetilbenzaldehído. Sin embargo, a una concentración de pseudocumeno de  $150$  se forma ante todo 3,4-dimetilbenzaldehído. La formación de ácido 3,4-dimetilbenzoico también se inhibe cuando la concentración del alcohol en la fase acuosa excede la concentración del aldehído.

Cuando *E. coli* recombinante carecía de actividad XMO se observó la reacción inversa de 3,4-dimetilbenzaldehído hasta alcohol 3,4-dimetilbenzílico. Esto puede atribuirse a actividades de dehidrogenasa no específicas para alcohol en la cepa usada de *E. coli*. Tal como en el caso de BADH, en esta reacción el equilibrio también está del lado del alcohol (Bühler, Schmid *et al.* 2000).

La actividad enzimática depende también de la concentración de glucosa en el medio. De esta manera, no solo las altas concentraciones de glucosa en el medio sino también la limitación de glucosa y la limitación de oxígeno tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática.

Según una forma preferida de realización de la invención, la cual se describe más detalladamente en los siguientes ejemplos, se produjo 3,4-dimetilbenzaldehído a partir de pseudocumeno en una reacción de múltiples etapas, controlada cinéticamente, usando *E. coli*, en la que se usaron recombinantemente los genes de la xilomonooxigenasa de *Pseudomonas putida* mt-2. Esto se hace posible por la habilidad de la xilomonooxigenasa para catalizar la oxidación de los xilenos hasta los ácidos correspondientes pasando por los alcoholes y aldehídos correspondientes. La cinética de esta reacción de varios pasos pudo utilizarse para concentrar el aldehído específicamente. Usando un proceso bifásico de fed-batch en el que el material de partida se adiciona por una fase orgánica, se produjeron  $484$  ml ( $96,5\%$ ) de 3,4-dimetilbenzaldehído a partir de un cultivo de  $30$  litros a una escala piloto y se aislaron mediante centrifugación y destilación.

Además, de acuerdo con la invención el medio de cultivo usado para la conversión ha sido optimizado exitosamente aún más y se han determinado y optimizado exitosamente parámetros relevantes al proceso. También se demostró que el plásmido y los genes de XMO quedaban estables por  $60$  horas y  $14$  generaciones son presión de selección.

A partir de los resultados de arriba para la conversión de pseudocumeno, el técnico en la materia puede, sin un esfuerzo inaceptable, aplicar la enseñanza general de la invención a la conversión biocatalítica de otros materiales de partida de la fórmula I de arriba, usando opcionalmente otros microorganismos. En este caso se toman en consideración especialmente modificaciones en la calidad del medio de reacción (por ejemplo, búfer, nutrientes, fase orgánica) y las condiciones de proceso (por ejemplo, concentración de sustrato, condiciones de operación, tipo de reactor, aireación, duración de la reacción), procesamiento de la mezcla de reacción y similares.

La invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos, no limitantes, de realización y haciendo referencia a las figuras adjuntas. En ellas se muestra:

Figura 1: plásmido pSZP3, regulado por el sistema regulatorio *alk*; *alkBp*, promotor del operón *alk*; *alkS*, gen para el regulador positivo *AlkS*; *xilM\** y *xilA*, genes codificantes para la xilomonooxigenasa (\* significa que se ha retirado un sitio de corte *NdeI* en *xilM*); *Km* gen de resistencia contra kanamicina; *T4t*, terminador transcripcional de fago T4.

Figura 2: peso seco de célula (CDW), concentración de glucosa y de ácido acético en la fermentación con solución de alimentación I con extracto de levadura.

Figura 3: concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante la fermentación con solución de alimentación I con extracto de levadura.

Figura 4: a) peso seco de célula, concentración de glucosa y de ácido acético durante la fermentación con solución de alimentación I sin extracto de levadura;

b) concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante la fermentación con solución de alimentación I sin extracto de levadura.

Figura 5: peso seco de células, concentración de glucosa y ácido acético durante la fermentación con concentración elevada de sustrato.

## ES 2 315 387 T3

Figura 6: Concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante la fermentación con elevada concentración de sustrato; la flecha indica la reducción simultánea en las ratas de alimentación y aireación.

5      Figura 7: peso seco de células (CDW, por sus siglas en inglés), concentración de glucosa y ácido acético durante el registro de la curva de crecimiento de *E. coli* JM101 con el medio de Riesenberg.

Figura 8: peso seco de células, concentración de celulosa y ácido acético durante la fermentación con alta densidad de células al iniciar el proceso de fed-batch.

10

Figura 9: Concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante la fermentación con alta densidad de célula al inicio del proceso de fed-batch; la flecha marca adición de 1% (v/v) de pseudocumeno.

15      Figura 10: peso seco de células, concentración de glucosa y ácido acético durante la fermentación con densidad normal de células al inicio del proceso fed-batch.

Figura 11: Concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante la fermentación con densidad normal de células al inicio del proceso de fed-batch.

20

Figura 12: peso seco de células, concentración de glicerina y ácido acético durante la fermentación con glicerina como fuente de carbono.

25      Figura 13: concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante la fermentación con glicerina como fuente de carbono.

Figura 14: Peso seco de células, concentraciones de glicerina y ácido acético durante la fermentación con glicerina como fuente de carbono y una mayor concentración de sustrato.

30

Figura 15: Concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico

y octano en la fase acuosa y orgánica durante la fermentación con glicerina como fuente de carbono y mayor concentración de pseudocumeno.

35

Figura 16: peso seco de células, concentración de glucosa y ácido acético durante un cultivo repetitivo de fed-batch, día 1.

40      Figura 17: concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante un cultivo repetitivo de fed-batch, día 1.

Figura 18: peso seco de células, concentración de glucosa y ácido acético durante un cultivo repetitivo de fed-batch, día 2.

45

Figura 19: concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante el cultivo repetitivo de fed-batch, día 2.

Figura 20: peso seco de células, concentración de glucosa y ácido acético durante la fermentación a escala piloto a pH 6.6; la flecha marca el ajuste del pH a 6.6.

50

Figura 21: concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante la fermentación en la escala piloto.

Figura 22: peso seco de células, concentración de glucosa y ácido acético durante la fermentación en la escala piloto a pH 7.4.

55

Figura 23: Concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico, 3,4-dimetilbenzaldehído, ácido 3,4-dimetilbenzoico y octano en la fase acuosa y orgánica durante la fermentación a escala piloto con pH 7.4.

60

Figura 24: Actividad específica y rata de formación de aldehído durante la fermentación a escala pila con pH 7.4; la flecha muestra la elevación del valor del pH a 7.4.

Figura 25: influencias de parámetros relevantes para el proceso sobre el bioproceso P: pseudocumeno, DBAlk: alcohol 3,4-dimetilbenzílico, DBAlde: 3,4-dimetilbenzaldehído, DBÁcido: ácido 3,4-dimetilbenzoico + efecto promotor; - efecto inhibidor.

65

**Abreviaturas empleadas**

- CDW Peso seco de células
- 5 DBAlk alcohol 3,4-dimetilbencílico
- DBAlD 3,4-dimetilbenzaldehído
- 10 DBÁcido ácido 3,4-dimetilbenzoico
- DOP dioctilftalato
- NAD+  $\beta$ -nicotinamida adeninad nucleotido, forma oxidada
- 15 NADH  $\beta$ -nicotinamida adeninad nucleotido, forma reducida
- P pseudocumeno (trimetilbenceno)
- ppm partes por millón
- 20 rpm revoluciones por minuto
- v/v volumen por volumen
- 25 w/v peso por volumen
- XMO xilenomonooxigenasa

30 **Materiales y métodos**

1. *Aparatos*

35 a) *instrumentos analíticos*

- GC Fisons Instruments HRCG Mega 2 Series
- Machery-Nagel, Önsingen, (CH)
- 40 Columna: columna capilar de silicona OPTIMA-5 (25 m; diámetro interno, 0,32 mm, espesor de película 0,25  $\mu$ m)
- GC HP 5890 Serie 2 GC Plus
- 45 Columna: columna capilar CARBOWAX 20M 25 m \* 0.25 mm \* 0.25 mm (Macherey-Nagel)
- Espectrofotómetro Novaspec II
- Pharmacia LKB

50

b) *Instrumentos para la biotransformación*

- Reactor con agitación, de 3 litros Case, RU Groningen, (NL)
- 55 Reactor con agitación, de 42 litros New MBR, Zürich (CH)
- Control: pH, temperatura, rata de agitación
- Sistema operativo: OS/9
- 60 Registro de datos: Caroline II (PCS, Wetzikon CH)

65

## ES 2 315 387 T3

### c) Instrumentos de down-stream

Centrífugas Cryofuge 8000

5 Heraeus Christ, Zürich (CH)

Bomba de vacío Typ D8B

Leybold-Heraeus, Zürich CH)

10 Aparatos refrigerantes 2219 Multitemp II Thermomatic Circulator

LKB Broma Multitemp 11

Aparato para vacío TypTR 216

15 Leybold Bakuum GmbH, Köln (De)

### 2. Reactivos químicos

20 Los reactivos químicos usados para los experimentos eran de grado analítico.

Para la determinación de las concentraciones de glucosa, de glicerina, y del ácido acético se emplearon los siguientes kits enzimáticos de prueba y se aplicaron según indicaciones del fabricante (Sigma Diagnostics, Boehringer Mannheim):

25 Kit de glucosa Sigma Diagnostics Glucosa (Methode 315)

Glicerina prueba UV Boehringer Mannheim Glicerina (Art. Nr. 148270)

30 Ácido acético prueba UV Boehringer Mannheim ácido acético (Art. Nr. 148 261)

Glucosa prueba UV Boehringer Mannheim Lactosa/D-glucosa (Art. Nr. 986 119)

### 35 3. Material biológico

#### a) Bacterias

40 La siguiente cepa de bacterias se usó para los experimentos de acuerdo con la invención:

*E. coli* JM101 F, [traD26 proAB+ lacIq, Δ(lacZ)M 15] pro AB/s upE, thi-1, Δ(lac proAB) (Sambrook, Fritsch *et al.* 1989)

#### 45 b) Plásmido

El siguiente plásmido se usó para los experimentos de acuerdo con la invención (Figura 1): pSPZ3 alkS, AlkBp, xylMA, ori pMB1; Kmr (Panke 1999)

50

### 4. Medios y soluciones

#### a) Solución de elementos de trazas US\* (Panke, 1999)

55 En 1 litro: ácido clorhídrico a 1 M

1.5 g MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O

60

En 1 litro: ácido clorhídrico a 1M

1.05 g ZnSO<sub>4</sub>

65

0.3 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

0.25 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O

## ES 2 315 387 T3

0.15 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.84 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

4.12 g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

4.87 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

---

(al usar medio Riesenbergr 8.87 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

---

### b) *LB-Medium (Luria Bertani Medium)*

En 1 litro: 10 g de triptona

5 g de extracto de levadura

5 g de NaCl

### c) *M9\* Medium*

En 1 litro: 25.5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

9 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$

1 g NaCl

El pH se ajustó con NaOH a 7.4

Completado con: 0.5% (w/v) de glucosa

2 ml  $\text{MgSO}_4$  (1M)

1 ml tiamina (1% w/v)

1 ml kanamicina (50 mg/ml)

1 ml solución de elementos de traza US\*

### d) *M9 Medium*

En 1 litro: 8.82 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

10.85 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

8.82 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

11.06 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$

0.5 g NaCl

El pH se ajustó con NaOH a 7,1

Completado con: 0.5% (v/v) glucosa

2 ml  $\text{MgSO}_4$  (1M)

1 ml tiamina (1% w/v)

1 ml kanamicina (50 mg/ml)

1 ml solución de elementos de traza

## ES 2 315 387 T3

### e) Medio de Riesenberg:

En 1 litro 13.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

5 4.0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

1.7 g ácido cítrico

El pH se ajustó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 6,8 y con  $\text{NaOH}$  a 7,1

10 Completado con: 0.7-2.5% (v/v) glucosa

o 0.7% (v/v) glicerina

5 ml  $\text{MgSO}_4$  (1M)

15 1 ml kanamicina (50 mg/ml)

1 ml tiamina (1% w/v)

20 5 ml-10 ml solución de elementos de traza

Los medios, así como las soluciones stock de sulfato de magnesio y glucosa se autoclavaron. Las soluciones stock de kanamicina y tiamina se esterilizaron por filtración.

### 25 f) Solución de alimentación I para el medio M9

En 1 litro glucosa al 45% (w/v)

9 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

30 (50 g de extracto de levadura)

El pH se ajustó con  $\text{HCl}$  a 3. No se usó extracto de levadura en todos los ensayos.

### 35 g) Solución de alimentación II para medio de Riesenberg

En 1 litro: glucosa al 73% (w/v)

19.6 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

40 La solución de alimentación se esterilizó y se filtró

### h) Fase orgánica para la reacción de pseudocumeno

45 En 1 litro dioctilftalato

20-40 ml pseudocumeno

10 ml octano

50

### i) Solución 1

En 100 ml 333  $\mu\text{l}$   $\text{NaAc}$  de 3 M pH 5,8

55 2 ml  $\text{MnCl}_2$  de 2.5 M

100  $\mu\text{l}$   $\text{NaCl}$  de 5 M

### 60 k) Solución 2

En 50 ml 167  $\mu\text{l}$   $\text{NaAc}$  de 3 M pH 5,8

8.3 ml glicerina al 30% (w/v)

65 3.5 ml  $\text{CaCl}_2$  de 1 M

200  $\mu\text{l}$   $\text{MnCl}_2$  de 2,5 M

## ES 2 315 387 T3

### 5. Métodos de biología molecular

#### 5.1 Células competentes

5 Un matraz de agitación que contenía 50 ml de medio LB se inoculó con 500  $\mu$ l de precultivo y se incubó por una noche. Después de que se ha alcanzado un OD<sub>450</sub> de 0,4, el líquido de cultivo se distribuyó en tubos SS34 (40M) y se centrifugó por 8 minutos a 8000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante. Las células se re-suspendieron en 8 ml de la solución 1 de arriba y se incubó sobre hielo por 20 minutos. Luego, se separaron las células de la solución 1 mediante centrifugación por 8 minutos a 8000 rpm. A continuación se resuspendieron en 800  $\mu$ l de la solución 2 de arriba sobre hielo y se dividieron en tubos Eppendorf de a 100  $\mu$ l. Se almacenaron a -80°C.

#### 5.2 Aislamiento de plásmido

15 Para el aislamiento de plásmido se empleó el E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plásmido Miniprep Kit I (peQLab Biotechnologie GmbH). 20 ml de medio LB que contenía 1% (w/v) de glucosa y 20  $\mu$ l de kanamicina (50 mg/ml) se inoculó con una colonia de *E. coli* JM101 transformada y se incubó por una noche a 37°C. Después de la incubación, el líquido de cultivo se dividió en 4 tubos de 15 ml y se centrifugó. Los siguientes pasos de proceso se llevaron a cabo tal como se especifica en el protocolo del Miniprep Kit I. La cantidad del plásmido obtenido se estimó cuantitativamente mediante electroforesis de gel.

#### 5.3 Transformación de las células

25 La transformación de *E. coli* JM101 con el plásmido pSPZ3 se logró mediante un choque de calor. Se descongelaron 100  $\mu$ l de células competentes congeladas por 20 minutos. Después de la adición de 3  $\mu$ l de plásmido se incubaron las células sobre hielo por 10-20 minutos. Luego, se sometieron a un choque de calor a 37°C por 3 minutos y, una vez ha transcurrido el tiempo, se devuelve inmediatamente al hielo por 5-10 minutos. Después de la adición de 1 ml de medio LB, las células se incubaron por 1 hora a 37°C. Finalmente, las células se pusieron en placas de agar LB que contenían 20  $\mu$ l de kanamicina (50 mg/ml) y se incubaron a 37°C por una noche.

### 6. Biotransformaciones a escala de laboratorio

35 El reactor con agitador usado para la biotransformación comprende un volumen de 3 litros. La temperatura, el pH y la velocidad de agitación pueden controlarse automáticamente. El oxígeno disuelto en el medio (DOT) se midió por medio de un electrodo de oxígeno y se graficó en dependencia del tiempo.

#### 40 6.1 Pre-cultivos

Pre-cultivo 1: 4 ml de medio LB, el cual contenía 1% (w/v) de glucosa y 4  $\mu$ l de kanamicina (50 mg/ml), se inocularon con una colonia de *E. coli* JM101 (pSPZ3) recientemente transformada y se incubó por una noche a 30°C agitándose.

45 Pre-cultivo 2: Se adicionó el precultivo 1 a 100 ml de medio M9\* que contiene 0,5% (w/v) de glucosa o glicerina, 200  $\mu$ l de sulfato de magnesio (1 M), 100  $\mu$ l de solución de elementos de traza US\*, 100  $\mu$ l de tiamina (1% w/v) y 100  $\mu$ l de kanamicina (50 mg/ml) y se incubó durante 10-12 horas a 30°C agitándose.

#### 50 6.2 Cultivo (batch)

900 ml de medio (M9 o medio de Riesenbergl), que había sido esterilizado junto con el bioreactor y completado con tiamina, elementos de traza, glucosa o glicerina, sulfato de magnesio y, cuando se indique, con antibióticos, se inocularon con 100 ml de pre-cultivo. La rata de agitación fue de 1500 rpm. También se ajustó la temperatura a 30°C y el pH a 7,1 mediante adición de NH<sub>4</sub>OH al 25% y ácido fosfórico al 25%. La rata de aireación fue de 1 l/min.

#### 60 6.3 Fed-batch (proceso semicontinuo)

Después del consumo de la glucosa adicionada y la utilización del ácido acético producido por el metabolismo bacteriano (aproximadamente 9-12 horas), se adicionó al medio una solución de glucosa/- o glicerina/sulfato de magnesio a la que en algunos casos se había adicionado extracto de levadura. En los diferentes experimentos la introducción de glucosa varió entre 4.5 g/h hasta 11.25 g/h. También se adicionaron 4 ml de la solución stock de tiamina y 4 ml de la solución de elementos de traza US\*.

## ES 2 315 387 T3

### 6.4 Biotransformación

Una hora después de iniciar el *fed-batch* (proceso semicontinuo) fue adicionada la fase orgánica (que contenía 10 ml de n-octano como inductor y 20-40 ml de pseudocumeno). Simultáneamente, se elevó la velocidad de agitación a 2000 rpm. La alimentación de aire se elevó a 1,7 litros/ minuto al aparecer una limitación de oxígeno (DOT < 10%) de las bacterias. De necesitarse se elevaba la velocidad de agitación a 2500 rpm. La biotransformación duró cerca de 15-30 horas. Después de iniciar el proceso semicontinuo (*fedbatch*) se tomaron y se analizaron muestras periódicamente.

### 7. Biotransformación a escala piloto

Para la transformación a escala piloto se empleó el reactor con agitador de 42 litros que se había indicado arriba. La velocidad de agitación, la temperatura, el valor de pH y la sobre-presión en el reactor se controlaron automáticamente en el reactor. El reactor se controló automáticamente por el sistema de operación OS/9 con el programa Caroline II (PCS, Wetzikon, Suiza).

#### 7.1 Pre-cultivos

Precultivo 1: 4 ml de medio LB que contenía 1% (w/v) de glucosa y 4  $\mu$ l de kanamicina (50 mg/ml) se inoculó con una colonia *E. coli* JM101 (pSPZ3) recientemente transformada y se incubó por una noche a 30°C agitándose.

Precultivo 2: El precultivo 1 se incubó en 100 ml y durante 10-12 horas a 30°C agitándose.

Precultivo 3: El precultivo 2 se adicionó a 2 l de medio M9\* que comprendía glucosa o glicerina al 0,5% (w/v), 200  $\mu$ l de sulfato de magnesio (1 M), 100  $\mu$ l de solución de elemento de traza US\*, 100  $\mu$ l de tiamina (1% w/v) y 100  $\mu$ l de kanamicina (50 mg/ml).

#### 7.2 Cultivo (batch)

14 litros de medio Riesenberg se esterilizaron en un reactor. Después de la esterilización, el medio se complementó con elementos de traza, sulfato de magnesio, tiamina y 0,7% (w/v) de glucosa. Se prescindió de la adición de kanamicina. El reactor con agitación se inoculó con 1-1,5 litros de precultivo. La rata de agitación fue de 400-600 rpm. La rata de aireación fue de 20 l/min.

#### 7.3 *Fed-batch* (Proceso semicontinuo)

Después del consumo de la glucosa adicionada y del ácido acético producido por las bacterias, se introdujo la solución de alimentación II. La rata de alimentación fue de 180 g/h al inicio pero se incrementó cuando se limitó la glucosa. Además, se adicionaron 60 ml de tiamina (1% w/v), 60 ml de solución de elementos de traza US\* y 15 ml de n-octano para inducción de células.

#### 7.4 Biotransformación

Después de una hora se adicionaron 15 litros de dioctilftalato que comprendía 4,3% (v/v) de pseudocumeno y 1% (v/v) de n-octano como fase orgánica. La rata de agitación se incrementó a 1000 rpm. Así mismo, la rata de aireación se incrementó a 40 l/min. Se tomaron muestras periódicamente y se analizaron en su contenido de sustrato, producto, producto secundario y octano. Así mismo, se determinaron el peso seco de célula, la concentración de glucosa y la concentración de ácido acético. La figura 7 muestra el transcurso del proceso de manera esquemática.

### 8. Determinación de coeficientes de distribución en el sistema bifásico

El coeficiente de distribución se define como la concentración de la sustancias en la fase orgánica relativa a la concentración de la sustancia en la fase acuosa. Para determinar los coeficientes de distribución del medio Riesenberg con glicerina y dioctilftalato se adicionaron diversas concentraciones de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbencílico, 3,4-dimetilbenzaldehído y ácido 3,4-dimetilbenzoico a mezclas 1 : 1 de dioctilftalato y medio de Riesenberg. El equilibrio de distribución se estableció mediante agitación vigorosa e incubación por una noche.

Las fases acuosa y orgánica se separaron mediante centrifugación. Las fases orgánicas se diluyeron con éter y la fase acuosa se extrajo y se analizó mediante GC. La concentración en las 2 fases se determinó sobre la base de las mediciones y se calcularon los coeficientes de distribución. En cada caso la determinación se llevó a cabo por triplicado.

## ES 2 315 387 T3

### 9. Análisis de muestras

#### 9.1 Análisis de GC

5 Las fases acuosa y orgánica se separaron mediante centrifugación a 20°C. Luego, a las muestras se adicionó éter  
enfriado con hielo con dodecano al 0,1 mM en calidad de estándar interno. Después de la adición de una concentración  
saturante de cloruro de sodio, se extrajo la fase acuosa mediante agitación vigorosa por 1 minuto y a continuación se  
separaron las fases mediante centrifugación. La fase orgánica se seca mediante adición de sulfato de sodio y se analizó.  
10 El contenido de sustrato, producto, productos secundarios y octano se determinó mediante GC (Nagel, Oensingen,  
Suiza). Las muestras se inyectaron sin división de flujo. Se usó hidrógeno como el gas portador. Para la medición se  
empleó el siguiente programa de temperatura: 2 min a 40°C; de 40 a 70°C en una rata de calentamiento de 15°C/min;  
de 70 a 105°C a una rata de calentamiento de 5°C/min y de 105°C a 280°C a una rata de calentamiento de 20°C/min; 5  
15 min a 280°C. Los compuestos químicos se midieron usando un detector de ionización de llama. Los datos de sustrato,  
producto y productos secundarios se representaron en un diagrama. Así mismo, la actividad específica y la rata de  
formación de aldehído se representaron en un diagrama. Para este fin se llevaron a cabo los siguientes cálculos:

Actividad específica = unidad/g de peso seco de célula

20 Una unidad es la actividad producida por 1  $\mu\text{mol}$  del producto total (DBAlk, DBAlD, DBÁcido) en 1 minuto.

Rata de formación de aldehído = 1  $\mu\text{mol}$  de aldehído formado por minuto/g de peso seco de célula

#### 25 9.2 Determinación de la densidad óptica

Las células se separaron mediante centrifugación a 4°C. El volumen de la fase acuosa se registró en el tubo de  
muestra y a continuación se quitó y se descartó el sobrenadante. La pastilla de células se llevó a un volumen del  
medio equivalente a la fase acuosa y se resuspendió allí. La densidad óptica se midió a 450 nm con la ayuda de un  
30 espectrofotómetro.

#### 9.3 Determinación de glucosa, glicerina y ácido acético.

35 a) Las concentraciones de glucosa, glicerina y ácido acético en la fase acuosa se determinaron con la ayuda de los  
kits de ensayo de enzima indicados arriba.

#### b) Determinación de ácido acético mediante GC

40 50  $\mu\text{l}$  de fase acuosa se trataron con 350  $\mu\text{l}$  de agua, 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%) y 50  $\mu\text{l}$  de butirato de sodio de 100 mM  
como estándar interno. Este último se analizó usando un HP 5890 Series 2 GC. El programa de temperatura usado  
fue como sigue: 0.5 min a 85°C, de 85-100°C a una rata de calentamiento de 12°C/min, de 110-200°C en una rata de  
calentamiento de 79°C/min, 2.5 min a 200°C. Como gas portador se usó helio.

#### 45 9.4 Determinación de la estabilidad del plásmido

Las muestras se centrifugaron y la fase intermedia de las fases acuosa y orgánica se marcó sobre el tubo. Se  
descartó el sobrenadante y la pastilla de células se re-suspendió en un volumen de medio que era equivalente a la fase  
50 acuosa. La muestra se diluyó y la solución se cultivó en placas de agar LB, placas de agar LB con 20  $\mu\text{l}$  de kanamicina  
(50 mg/ml) y placas LB con 20  $\mu\text{l}$  kanamicina (50 mg/ml) y 20  $\mu\text{l}$  de indol. Si las células expresan los genes XMO,  
las colonias en las placas de agar indol LB se vuelven azules. Esto puede explicarse por el hecho de que los genes  
XMO catalizan la oxidación de indol a índigo. Las placas se incubaron por una noche a 30°C y luego se contaron. Se  
compararon los números de gérmenes vivos unos con otros.

55

### 10. Procesamiento (Proceso down-stream o adicional)

#### 10.1 Centrifugación

60 Después de cosechar el contenido de reactor, se separaron la fase orgánica de la fase acuosa por 15 minutos a 5000  
rpm y 4°C usando una centrífuga Heraeus. La fase acuosa se descartó mientras que la fase orgánica se secó con sulfato  
de sodio (1 kg/15 l de fase orgánica) y se almacenó a 5°C. El sulfato de sodio se filtró (con papel filtro) antes del paso  
de destilación.

65

## 10.2 Destilación

La fase orgánica en el matraz se calentó a 200°C a un vacío medio de entre 0.08 mbar y 0.15 mbar. El destilado se dividió en tres fracciones; en una mezcla inicial (110°C-125°C), una mezcla principal (120°C -170°C) y una mezcla de cola (170°C-200°C). El vacío y la temperatura se controlaron automáticamente.

## I. Ensayos para la biotransformación de pseudocumeno a escala de laboratorio

Las biotransformaciones a escala de laboratorio (ejemplos 1, 2 y 3) sirvieron por una parte para determinar y optimizar los parámetros relevantes para el proceso y, por otra parte, con el fin de optimizar el medio. El objetivo era incrementar la cantidad de producción de 3,4-dimetilbenzaldehído (DBAlD) durante la biotransformación.

Además, se investigó la formación de ácido acético que se produce por parte de las células como metabolito y que se libera al medio. Esto inhibe el crecimiento de la biomasa en el caso de una concentración demasiado alta. El uso de un nuevo medio (medio de Riesenberg) estaba destinado para lograr mayor densidad de células y de este modo una mayor actividad enzimática por volumen. La variación de la solución de alimentación también cuenta como una medida para optimizar el medio. Se emprendieron biotransformaciones en las que no se adiciona extracto de levadura a la solución de alimentación, puesto que éste contiene entre otros ingredientes indefinidos que hacen difícil la reproducibilidad de la biotransformación. Así mismo se ensayó el efecto de las dos fuentes de carbono, glucosa y glicerina, en la actividad enzimática y la formación de ácido acético.

Adicionalmente se investigó la estabilidad del plásmido y del gene XMO sin presión de selección. De esa manera se llevaron a cabo biotransformaciones sin kanamicina.

Para la producción de DBAlD se ensayó un proceso bifásico semicontinuo (*fed-batch*). Aquí el proceso semicontinuo se inició después de un cultivo (batch), seguido por la adición de la fase orgánica que comprendía el sustrato y el inductor. Las figuras muestran los resultados obtenidos desde el inicio del proceso semicontinuo. En las gráficas que muestran las concentraciones de sustrato, producto, producto secundario y octano, se adicionaron juntas las concentraciones de las sustancias en las fases acuosa y orgánica. La actividad específica se define como 1  $\mu\text{mol}$  del producto total formado (DBAlk, DBAlD y DBÁcido) en un minuto por gramo de peso seco de célula.

## Ejemplo 1

35 *Biotransformaciones con medio M9*

## Experimento 1.1

40 *Fermentación con solución de alimentación I con extracto de levadura*

La biotransformación se llevó a cabo usando el proceso de fermentación arriba descrito. Antes de la inoculación se adicionó 0,5% (w/v) glucosa al medio. Después de cultivo (batch) la biomasa alcanzó un peso seco de célula de 3.1 g/l. La rata de alimentación fue de 10 g/h al comienzo del proceso semicontinuo, correspondiente a una rata de alimentación de glucosa de 4,5 g/h. Para prevenir una limitación de glucosa demasiado fuerte se incrementó la rata de alimentación por pasos. La rata de aireación se incrementó de 1 l/min hasta 1,7 l/min después de 3 horas para evitar una limitación de oxígeno.

En la figura 2 pueden verse los valores de concentración de ácido acético y de glucosa y del peso seco de células. El peso seco de células fue de 19 g/l después de alcanzar la fase estacionaria. Para el momento cuando se detuvo el crecimiento de bacterias, después de 8 horas, la concentración de ácido acético fue de 10 g/l mientras que la concentración de glucosa fue de 9 g/h.

En la figura 3 se muestran los cambios en las concentraciones de pseudocumeno, 3,4-dimetilbenzaldehído (DBAlk), alcohol 3,4-dimetilbenzílico (DBAlk), ácido 3,4-dimetilbenzoico (DBÁcido) y octano. La concentración de pseudocumeno al adicionar la fase orgánica fue de 1.6% (v/v). Después de una fase de inducción de 1.5 horas se formó ante todo 3,4-dimetilbenzaldehído. Al alcanzar una concentración de sustrato de 90 mM comenzó a formarse DBÁcido. Después de 10 horas se alcanzó una concentración de ácido de 22 mM la cual permaneció constante por el resto de la biotransformación. Sólo después de 10 horas se formó DBAlk. Al final de la biotransformación después de 30 horas, la concentración de DBAlD fue de 43 mM y la de DBAlk fue de 20 mM.

Después de 4 horas la actividad específica así como la rata de formación de aldehído alcanzaron valores máximos de 12.6 U/g CDW y 9.8 U/g CDW, respectivamente. Después, la rata de formación de aldehído disminuyó fuertemente 5.5 horas después del inicio del proceso semicontinuo; esto correspondió al punto en el tiempo en el cual se inició la formación del ácido 3,4-dimetilbenzoico. Después de 8 horas la rata de formación de aldehído volvió a aumentar.

Por medio de los resultados obtenidos puede confirmarse que la formación de ácido 3,4-dimetilbenzoico se inicia a una concentración de pseudocumeno de 90 mM.

## ES 2 315 387 T3

### Experimento 1.2

#### *Fermentación con solución de alimentación I sin extracto de levadura*

5 El objetivo de esta fermentación fue investigar los efectos de la solución de alimentación I sin extracto de levadura sobre la biotransformación.

En la figura 4a se representan los desarrollos de la concentración de glucosa y de ácido acético y del peso seco de células. La concentración de glucosa en el medio antes de la inoculación fue de 0.5% (w/v). Al comienzo del proceso semicontinuo el peso seco de células tenía una concentración de 3 g/l. La solución de alimentación sin extracto de levadura se introdujo a una rata constante de 10 g/h. Esto corresponde a una rata de alimentación de glucosa de 4.5 g/h. Después de 7 horas la rata de agitación se incrementó de 2000 rpm a 2500 rpm para evitar una limitación de oxígeno (DOT >10%).

15 Incluso bajas concentraciones de glucosa tuvieron como consecuencia una formación de ácido acético. De esta manera, la concentración de ácido acético se mantuvo constante a un valor de 1 g/l. Al elevar la concentración de glucosa en el medio, la concentración de ácido acético aumentó continuamente hasta 26.6 g/l. Al final de la biotransformación, la concentración de biomasa llegó a 12 g/l.

20 La concentración de sustrato en la fase orgánica llegó a 1.6% (v/v) (figura 4b). 2 horas después de la adición de la fase orgánica se inició la formación de 3,4-dimetilbenzaldehído. A partir de una concentración de sustrato de 90 mM se formó principalmente DBÁcido, mientras que la concentración de 3,4-dimetilbenzaldehído se mantuvo constante. Sólo después de transcurridas 10 horas se inició la formación de DBAld y alcanzó una concentración de 41 mM. Cuando la actividad enzimática fue menor en la segunda parte de la biotransformación (desde las 15 horas) se formó DBAlk.

La actividad específica alcanzó 3 horas después del inicio del proceso semicontinuo un valor máximo de 10 U/g CDW, pero se derrumbó después de esto. Después de un aumento menor, la actividad específica disminuyó continuamente después del inicio del proceso semicontinuo de cultivo (*fed-batch*). La rata de formación de aldehído alcanzó también un valor máximo de 7.1 U/g CDW después de 3 horas. Tal como en el experimento descrito antes, se observó una caída en la formación de aldehído al inicio de la formación de ácido 3,4-dimetilbenzoico.

Esta fermentación muestra que la omisión del extracto de levadura tiene un efecto importante en el crecimiento de la biomasa y la actividad enzimática. De esta manera, se logró una concentración más baja de materia seca de célula durante el proceso semicontinuo (*fed-batch*) que en el experimento precedente. De manera similar se observaron una actividad específica y una rata de formación de aldehído más bajas. En comparación con el experimento precedente se observó una disminución más lenta en la actividad específica. Así mismo, las concentraciones de ácido acético en el medio fueron menores que en el experimento precedente.

### 40 Experimento 1.3

#### *Fermentación con concentración de sustrato elevada*

En experimentos previos pudo establecerse que un incremento en la concentración de sustrato tiene un efecto positivo en la formación de 3,4-dimetilbenzaldehído. Así, la concentración de sustrato se aumentó de 1.6% (v/v) a 3.1% (v/v). Además, se ensayó mantener baja la concentración de glucosa y con esto también la concentración de ácido acético en el medio. En la segunda parte de la biotransformación, 15 horas después del inicio del proceso semicontinuo de cultivo (*fed-batch*) se investigó el efecto de una fuerte limitación simultánea de glucosa y oxígeno. De esta manera se redujeron simultáneamente el suministro de alimentación y la aireación.

50 Antes de la inoculación se adicionó 0.5% (w/v) de glucosa al medio. A partir de un peso seco de células de 3 g/l la biomasa aumentó durante el proceso semicontinuo (*fed-batch*) hasta una concentración de 27 g/l. Al comienzo del proceso semicontinuo (*fed-batch*) la solución de alimentación con extracto de levadura fue introducida a una rata de 10 g/h (rata de introducción de glucosa 4.5 g/h). La rata de alimentación se incrementó a continuación por etapas aunque se obtuvo limitación de glucosa para prevenir una alta concentración de ácido acético en el medio por un período prolongado. Esto incluso dio lugar a un aprovechamiento del ácido acético (figura 5). Para prevenir limitación de oxígeno se aumentó la rata de aireación desde 1 l/min hasta 1.5 l/min y la velocidad de agitación de 2000 rpm hasta 2500 rpm. Después de 16 horas se redujeron simultáneamente la rata de alimentación y la rata de aireación lo que dio lugar a una fuerte limitación de glucosa y oxígeno y a un aumento en la concentración de ácido acético.

60 La biotransformación se inició con una concentración de sustrato de 3.1% (v/v). Una hora después de la inducción de las células se inició la formación de 3,4-dimetilbenzaldehído (BDAld) y alcohol 3,4-dimetilbenzílico (DBAlk). 16 horas después del inicio del proceso semicontinuo (*fed-batch*), después de la reducción de la rata de alimentación y de la rata de aireación, pudo establecerse una formación inversa del DBAld a DBAlk mediante alcoholdehidrogenasas no específicas de *E. coli* (figura 6). La concentración de DBAlk después de 30 horas fue de 130 mM mientras que la concentración de DBAld solo estuvo en 30 mM. Durante la biotransformación pudo establecerse una formación baja de ácido 3,4-dimetilbenzoico.

## ES 2 315 387 T3

Después de alcanzar el valor máximo de la actividad específica de 18.6 U/g CDW 8 horas después del inicio del proceso semicontinuo, la actividad específica disminuyó. Esto puede atribuirse en primer lugar a la detención del crecimiento de las células en este punto de tiempo, por otra parte a la disminución en la concentración de sustrato. La  
5      de alimentación I con extracto de levadura y la fermentación en la que la solución de alimentación I no se había  
complementado con extracto de levadura, no se observó disminución en la actividad después de 5 horas.

La fermentación realizada ha demostrado que concentraciones mayores de sustrato dan lugar a actividad enzi-  
10      mática mayor. Puesto que fue posible mantener baja la formación de ácido acético durante la biotransformación, se  
alcanzó una densidad mayor de células durante el proceso semicontinuo (*fedbatch*). Debido a los resultados obtenidos  
puede decirse que una limitación de glucosa y oxígeno que ocurra simultáneamente da lugar a una pérdida en la ac-  
tividad de xileno monooxigenasa. Las alcohol-dehidrogenasas no específicas de *E. coli* convirtieron de vuelta el 3,4-  
dimetilbenzaldehído en alcohol 3,4-dimetilbencílico.

### 15      Ejemplo 2

#### *Biotransformación con el medio Riesenberg*

20      Para obtener una densidad mayor de células y con esto una mayor actividad volumétrica se usó un nuevo medio  
denominado en la literatura medio de alta densidad de células (Riesenberg 1991). Este medio tiene menos sales de  
fosfato en comparación con el medio M9 usado hasta ahora. Además, contiene más nitrógeno ya que se usa amoníaco  
acuoso para ajustar el pH. La solución de alimentación II que se usó junto con el medio Riesenberg no contenía  
25      extracto de levadura en comparación con la solución de alimentación I.

#### Experimento 2.1

##### *Curva de crecimiento de E. coli JM101 (PSZP3) con medio Riesenberg*

30      Para investigar la conducta de crecimiento de *E. coli* JM101(pSZP3) y la formación del metabolito ácido acético  
usando medio de Riesenberg se registró primero una curva de crecimiento. La estabilidad del plásmido y de los genes  
de XMO se verificó usando placas de agar indol y placas de agar kanamicina. De este modo, es posible ensayar si el  
plásmido se pasa a las siguientes generaciones y se expresa.

35      El medio de cultivo del lote (batch) contenía 2.5% (w/v) de glucosa. El cultivo duró 15 horas con la degradación del  
ácido acético producido (figura 7). Después de la inoculación el peso seco de células llegó a 0.18 g/l y se incrementó  
a 15 g/l a una tasa de crecimiento de 0.4 h<sup>-1</sup>. Durante el cultivo del lote se produjo 1 g/l de ácido acético.

40      El comportamiento de crecimiento de las células al usar medio Riesenberg fue similar al caso cuando se usó medio  
M9. Se observó una formación de ácido acético durante el cultivo del lote. También, el período durante el cual el ácido  
acético fue reutilizado por las bacterias fue relativamente corto. Por medio de los números de colonias sobre las placas  
de agar LB, las placas de agar LB con kanamicina y placas de agar LB con indol y kanamicina, puede decirse que  
45      el plásmido y los genes de XMO permanecieron estables. De este modo no se ha encontrado diferencia significativa  
entre las colonias crecidas sobre diversas placas de agar LB. Así mismo, fue positiva la reacción de color sobre placas  
de agar LB con indol.

#### Experimento 2.2

##### *Fermentación con densidad mayor de células al inicio del proceso semicontinuo (fed-batch)*

50      Después del registro de la curva de crecimiento se empleó medio Riesenberg en la biotransformación. Esto se hizo  
con énfasis particular en el crecimiento de biomasa y en este contexto también la formación de ácido acético.

55      El objetivo de la fermentación fue lograr una mayor concentración de biomasa al final de la biotransformación  
iniciando el cultivo en proceso semicontinuo (*fed-batch*) con una densidad inicial alta de células. Esto conduciría a  
un incremento en la actividad por volumen durante la biotransformación.

60      Para lograr una densidad relativamente alta de células después del lote de cultivo se complementó con 2.5%/w/v en  
lugar de 0.5% (w/v) de glucosa. Al inicio del cultivo semicontinuo (*fedbatch*) la biomasa no continuó incrementándose  
de manera fuerte y alcanzó una concentración máxima de 24.7 g/l.

65      Durante el cultivo semicontinuo (*fedbatch*), se introdujeron constantemente 12.5 g/h de solución de alimentación.  
Esto corresponde a una tasa de alimentación de glucosa de 9 g/h. Ya que las células ya se habían sometido a limitación  
de oxígeno después de 2 horas y la velocidad de agitación así como la tasa de aireación ya se habían ajustado al  
máximo, se aireó el reactor con oxígeno en lugar de aire. Con esta medida fue posible mantener el oxígeno disuelto en  
el medio (DOT) por encima de un valor de 10%. A partir de la hora 5 en adelante las células ya no estuvieron sometidas

## ES 2 315 387 T3

a limitación de glucosa. La concentración de glucosa permaneció constante a 2 g/l entre la hora 5 después del inicio del cultivo semi-continuo (*fedbatch*) y la hora 15, pero aumentó después hasta 25 g/l. Puesto que la concentración de glucosa en el medio era relativamente alta, la concentración de ácido acético en el medio aumentó continuamente y alcanzó un valor de 30 g/l al final del cultivo semi-continuo (*fedbatch*).

5

Al comienzo del cultivo semi-continuo al medio se adicionó 1 litro de fase orgánica con una concentración de sustrato de 3.4% (v/v).

En la figura 9 puede verse que la formación de alcohol 3,4-dimetilbenzílico inició inmediatamente. La formación de 3,4-dimetilbenzaldehído inició después de 2 horas. 11 horas después del inicio del cultivo semi-continuo (*fedbatch*) se adicionó 1% (v/v) más de pseudocumeno. Sin embargo, este pudo reaccionar solo parcialmente. La concentración final de 3,4-dimetilbenzaldehído alcanzó 113 mM. El pseudocumeno y el alcohol 3,4-dimetilbenzílico tuvieron una concentración de 65 mM al suspenderse la biotransformación. El ácido 3,4-dimetilbenzoico apenas se formó.

3 horas después del inicio del cultivo semi-continuo (*fedbatch*) se indujeron completamente las células. La actividad específica (valor máximo 13 U/g CDW) y la tasa de formación de aldehído (valor máximo 10 U/g CDW) fueron bajas. La actividad específica disminuyó 4 horas después del final del crecimiento de las células. Después de la adición de sustrato se observó un aumento a 6 U/g CDW. La tasa de formación de aldehído también disminuyó fuertemente 4 horas después del final del crecimiento y se mantuvo baja.

20

El inicio del cultivo semicontinuo (*fedbatch*) con densidad inicial más alta de células no condujo a densidad de células más alta en las condiciones seleccionadas durante el cultivo semicontinuo. La biomasa solo creció durante 3 horas. También pudo observarse una pérdida de actividad enzimática. Durante el cultivo semi-continuo (*fedbatch*) se formó mucho ácido acético.

25

### Experimento 2.3

#### *Fermentación con densidad normal de células al inicio del cultivo demicontinuo (fedbatch)*

En la fermentación precedente, a pesar de las altas densidades de células al inicio del cultivo semicontinuo (*fedbatch*), no pudo lograrse una densidad de células más alta. La alta densidad inicial de células tuvo más bien influencia negativa sobre la biotransformación. De esa manera la actividad específica fue baja. También se registro un corto tiempo de formación de aldehído. Por esta razón se inició el cultivo semicontinuo (*fedbatch*) con pequeña densidad de células.

35

En lugar de 2.5% (w/v) de glucosa solo se adicionaron 0.7% (w/v) de glucosa. A partir de una concentración de biomasa de 4.1 g/l el peso seco de células alcanzó al final del cultivo semi-continuo 22 g/l. La glucosa se introdujo al bioreactor con una velocidad constante de 9 g/h. La concentración de ácido acético llegó a cerca de 7 g/l después de 9 horas. A este punto de tiempo las bacterias se encontraron en la fase estacionaria (figura 10).

40

Simultáneamente con el inicio del cultivo semi-continuo (*fedbatch*) se adicionaron al medio 0.1% (v/v) de octano. 1 hora más tarde se adicionó la fase orgánica de con 4% (v/v) de pseudocumeno y 1% (v/v) de n-octano. 2 horas después del inicio del cultivo semi-continuo (*fedbatch*) las células se indujeron completamente y comenzaron a acumularse alcohol 3,4-dimetilbenzílico- y 3,4-dimetilbenzaldehído en la fase orgánica. Mientras que el alcohol se acumulaba inicialmente más rápido que el aldehído, el 3,4-dimetilbenzaldehído se producía a partir de una concentración de sustrato de 150 mM. A concentraciones bajas de pseudocumeno el alcohol 3,4-dimetilbenzílico se convertía en 3,4-dimetilbenzaldehído. La concentración final de 3,4-dimetilbenzaldehído llegó al final de la biotransformación a 200 mM. A concentración más baja de pseudocumeno y alcohol 3,4-dimetilbenzílico se inició la formación de ácido 3,4-dimetilbenzoico (figura 11).

50

La actividad específica llegó a 26 U/g CDW 3 horas después del inicio del cultivo semi-continuo. Después descendió en paralelo con la concentración de sustrato. Después de 5 horas la tasa de formación de aldehído alcanzó el valor máximo de 14 U/g CDW. Después disminuyó continuamente.

La concentración de sustrato y la densidad inicial de células se seleccionaron de manera óptima para lograr una conversión completa a 3,4-dimetilbenzaldehído. Una densidad inicial de célula más baja dio lugar a una tasa de formación de aldehído de más tiempo. El medio Riesenber, que no contiene extracto de levadura en la solución de alimentación, permite lograr la misma actividad específica y tasa de formación de aldehído que solo es posible al usar el medio M9 con extracto de levadura en la solución de alimentación.

60

### Experimento 2.4

#### *Fermentación con glicerina como fuente de carbono*

Es posible que el uso de glicerina como fuente de carbono tenga algunas ventajas sobre la glucosa como fuente de carbono. Así, puede esperarse una formación más baja de ácido acético y una actividad enzimática mayor. Por esto es que se investigó el efecto de glicerina como fuente de carbono en la biotransformación.

65

## ES 2 315 387 T3

Antes de la inoculación se adicionaron 0.7% (v/v) de glicerina al medio. Al final del cultivo por lote la biomasa tenía una concentración de 4.2 g/l. Tal como se esperaba se observó un crecimiento más lento de la biomasa que al usar glucosa como fuente de carbono. Después de que se haya alcanzado la fase estacionaria el peso seco de célula fue de 19 g/l. Justo al comienzo del cultivo semicontinuo (*fedbatch*) se adicionaron 0.1% (v/v) de octano al medio. Después de una rata de alimentación inicial de 7.7 g/h (rata de alimentación de glicerina de 7.2 g/h), la rata de alimentación se incrementó por pasos para prevenir la limitación de glicerina. La formación de ácido acético comenzó solo durante la fase estacionaria después de 9.5 horas y alcanzó un valor de 18 g/l al final del cultivo semi-continuo (*fedbatch*) (figura 12).

La concentración de sustrato llegó a 4% (v/v) al adicionar la fase orgánica. Se produjo alcohol 3,4-dimetilbenzílico justo desde el comienzo. A partir de una concentración de pseudocumeno de 240 mM se produjo exclusivamente 3,4-dimetilbenzaldehído. El alcohol 3,4-dimetilbenzílico se convirtió directamente a aldehído. La formación de ácido comenzó a una concentración de sustrato alrededor de 150 mM. Como puede verse de la figura 13, la concentración final de 3,4-dimetilbenzaldehído fue de 144 mM.

La rata máxima de formación de 3,4-dimetilbenzaldehído fue muy alta (32.7 U/g CDW). La actividad específica total alcanzó un valor de 33 U/g CDW. Sin embargo, las altas actividades no se mantuvieron por mucho tiempo. Ya después de 11 horas la rata específica de formación de aldehído aún era de 2.5 U/g CDW.

De estos resultados se concluye que usar glicerina como fuente de carbono dio como resultado que se lograron actividades enzimáticas más altas desde 30 U/g CDW. No obstante, la actividad se mantuvo solamente durante el crecimiento de la biomasa.

Además de la actividad enzimática más alta se observó otra cinética en comparación con el caso cuando se usó glucosa como fuente de carbono. De este modo, la sola acumulación de 3,4-dimetilbenzaldehído en el medio se establece ya a una concentración de pseudocumeno de 240 mM en contraposición a la concentración de 150 mM al usar glucosa como fuente de carbono. La formación de ácido 3,4-dimetilbenzoico comienza también a una concentración de 150 mM, la cual comenzó solo a 90 mM cuando se usó glucosa como fuente de carbono.

### Experimento 2.5

*Fermentación con glicerina como fuente de carbono y concentración más alta de sustrato*

En la fermentación de acuerdo con el experimento 2.4 pudo observarse que ya a una concentración de pseudocumeno de 240 mM se presentaba una detención en la acumulación de alcohol 3,4-dimetilbenzílico en el líquido de cultivo. De esta manera parecía posible iniciar la biotransformación a una concentración de pseudocumeno más alta y alcanzar una concentración final más alta de 3,4-dimetilbenzaldehído (DBAld).

La concentración de glicerina al inicio del cultivo de lote fue de 0.7% (v/v). Al inicio el peso seco de células llegó a 4.4 g/l y al final del cultivo semicontinuo (*fedbatch*) 25 g/l (figura 14). Se alimentó glicerina a una rata de 3.7 g/l al inicio del cultivo semicontinuo (*fedbatch*). La rata se elevó después por etapas. No se formó ácido acético hasta la hora 10. Sin embargo, esta sustancia se acumuló hasta el final del experimento hasta una concentración de 26.7 g/l en el medio.

La concentración de pseudocumeno (en la fase orgánica) fue de 5.3% (v/v). Al principio se observó la formación simultánea de alcohol 3,4-dimetilbenzílico (DBAlk) y 3,4-dimetilbenzaldehído (DBAld). A partir de una concentración de pseudocumeno de 300 mM hasta 150 mM se formó y se anuló ante todo DBAld. La formación de ácido 3,4-dimetilbenzoico (DBÁcido) comenzó a partir de una concentración de pseudocumeno de 150 mM. La concentración final de DBAlk fue de 80 mM mientras que la concentración final de DBAld fue de 212 mM (figura 15).

Las actividades enzimáticas fueron altas como en la primera fermentación con glicerina. La actividad específica (1  $\mu$ mol de producto total (DBAlk, DBAld y DBÁcido) que se forma en 1 minuto/g de CDW) alcanzó un valor de 46 U/g de CDW. La rata de formación específica de 3,4-dimetilbenzaldehído fue, después de 5 horas, de 22 U/g CDW. La actividad pudo mantenerse también en esta fermentación solo durante el crecimiento de la biomasa.

La elevación de la concentración de sustrato no tiene ninguna influencia sobre la concentración final de 3,4-dimetilbenzaldehído ya que la duración de actividad no puede mantenerse por tiempo prolongado. La concentración de alcohol 3,4-dimetilbenzílico fue alta al final del cultivo semicontinuo (*fedbatch*).

### Ejemplo 3

*Cultivo semi-continuo (fedbatch) repetitivo*

Para vigilar la actividad de las células en ausencia de kanamicina por un período prolongado se llevaron a cabo dos experimentos de cultivo semi-continuos (*fedbatch*) consecutivos; 10 ml del primer cultivo semi-continuo actuaron como inóculo para el segundo cultivo semi-continuo. El propósito era estudiar la estabilidad del plásmido y de los genes XMO por varias generaciones sin presión de selección. Se usó glucosa como fuente de carbono. Al inicio de la alimentación se adicionaron 4 ml de la solución stock de tiamina (1% w/v) y 4 ml de la solución de elemento de traza US\*.

## ES 2 315 387 T3

Precultivo 1: se inoculan 4 ml de medio LB (1% de glucosa (w/v), 4  $\mu$ l de kanamicina (50 mg/ml)) con células recientemente transformadas y se incuban a 37°C por una noche.

5 Precultivo 2: se inoculan 100 ml de medio M9\* (0.5% glucosa (w/v), 200  $\mu$ l de sulfato de magnesio, 100  $\mu$ l de solución de elementos de traza US\*, 100  $\mu$ l de tiamina (1% w/v), 100  $\mu$ l de kanamicina (50 mg/ml)) con 4 ml de precultivo 1 y se incuban a 30°C por 10-12 horas.

10 Se inoculan 900 ml de medio que están contenidos en el bioreactor con 100 ml de precultivo. Después del cultivo de lote (9-12 h) se inicia el cultivo semicontinuo (*fed-batch*) introduciendo continuamente una solución de alimentación. 1 hora más tarde se adiciona al bio-reactor 1 l de fase orgánica (DOP), en la cual está contenido el sustrato (P) y el inductor (octano). Después de 15 horas se recolecta el líquido de cultivo hasta un volumen de 10 ml, el cual sirve como inóculo para el segundo cultivo semicontinuo (*fedbatch*). Se adicionan 900 ml de medio al bio-reactor. De nuevo, se lleva a cabo una biotransformación exactamente como se describió para el primer cultivo semicontinuo (*fedbatch*).

### 15 Experimento 3.1

#### *Cultivo semicontinuo (fedbatch), día 1*

20 Antes de la inoculación la concentración de glucosa fue de 0.7% (w/v). Al inicio del cultivo semi-continuo (*fed-batch*) se adicionaron 0.1% (v/v) de octano al medio para inducir las células. Al inicio del cultivo semi-continuo se adicionaron 0.1% (v/v) de octano al medio para la inducción de las células. Antes del inicio del cultivo semicontinuo (*fedbatch*) la biomasa fue de 4.5 g/l y creció durante el cultivo semicontinuo (*fedbatch*) hasta 28 g/l (figura 16). La rata de alimentación de glucosa al comienzo del cultivo semi-continuo fue de 9 g/h y se elevó a continuación por etapas. La concentración de ácido acético al final del cultivo semicontinuo fue de 25 g/l.

25 La biotransformación se inició con una concentración de sustrato de 4% (v/v). El desarrollo de concentración de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbencílico (DBAlk), 3,4-dimetilbenzaldehído (DBAld), ácido 3,4-dimetilbenzoico (DBÁcido) y octano se representan en la figura 17. Primero, se observó una formación de 3,4-dimetilbenzaldehído y una formación de alcohol 3,4-dimetilbencílico. Después de 6.5 horas después del inicio del cultivo semi-continuo a una concentración de sustrato de 150 mM se formó ante todo DBAld. La formación de ácido empezó después de 12.5 horas. La concentración de 3,4-dimetilbenzaldehído al final de la biotransformación fue de 220 mM y la de DBAlk fue de 14 mM. Durante el cultivo semi-continuo el pseudocumeno pudo utilizarse hasta una concentración de 13 mM.

35 3 horas después del inicio del cultivo semicontinuo la actividad específica llegó a 27 U/g CDW. La rata de formación de aldehído después de 5 horas alcanzó un valor máximo de 16 U/g CDW. La actividad enzimática pudo mantenerse la misma por 15 horas.

### Experimento 3.2

#### 40 *Cultivo semi-continuo (fed-batch), día 2*

La concentración de glucosa antes de la inoculación fue de 0.7% (v/v). Después del cultivo la biomasa fue de 4.5 g/l y al final del cultivo semicontinuo alcanzó una concentración de 28 g/l. La rata de alimentación de glucosa era al inicio de 9 g/h, aunque se elevó en el caso de una limitación de glucosa demasiado fuerte. La concentración de ácido acético al final de la biotransformación fue de 44 g/l (figura 18).

50 1 hora después del inicio del cultivo semi-continuo se adicionó al medio la fase orgánica en la que había una concentración de sustrato de 4% (v/v). El desarrollo de concentración de pseudocumeno, DBAld, DBAlk y DBÁcido fue similar al del cultivo semicontinuo en el día 1 (experimento 3.1). Por encima de una concentración de pseudocumeno de 150 mM pudo establecerse una formación simultánea de DBAld y DBAlk. Si las concentraciones de sustrato estaban por debajo de un valor de 150 mM ante todo se formaba DBAld hasta una concentración final de 220 mM. La formación de DBÁcido se inició después de 12.5 horas. La concentración final de DBAlk fue de 30 mM y la del DBÁcido 13 mM (figura 19).

55 La actividad específica en el segundo cultivo semi-continuo alcanzó un valor máximo idéntico al del cultivo semi-continuo del día 1 (experimento 3.1) de 27 U/g CDW. Así mismo la rata de formación de aldehído alcanzó un valor máximo idéntico de 16 U/g CDW. La actividad enzimática pudo mantenerse por 15 horas.

60 Ambas biotransformaciones proporcionaron resultados similares cuando no incluso idénticos. De este modo pudieron establecerse actividades específicas y ratas de formación de aldehído altas en ambos cultivos semicontinuos (*fedbatch*). Así mismo, pudieron alcanzarse concentraciones idénticas de 3,4-dimetilbenzaldehído al final de ambas biotransformaciones. La actividad enzimática pudo mantenerse igual en el caso de ambos cultivos semi-continuos por 15 horas. La estabilidad del plásmido era muy alta. Así permaneció por 60 horas y 14 generaciones también sin presión de selección. No pudieron establecerse diferencias significativas del número de colonias sobre las placas de agar LB y las placas de agar LB con kanamicina.

65

## ES 2 315 387 T3

### II. Experimentos para la biotransformación a escala piloto

La biotransformación se llevó a cabo a escala piloto después de la finalización de los experimentos a escala de laboratorio (ejemplos 4, 5). Para esto se empleó un reactor con agitación de 42 litros. El volumen de la mezcla que estaba compuesta de partes iguales del medio Riesenberg y de fase orgánica con una concentración de sustrato de 4.3% (v/v) era de 30 litros. Antes de la inoculación al medio se adicionaron 0.7% (w/v) de glucosa. Se prescindió de la adición de kanamicina como ya se había hecho en el cultivo semi-continuo (*fedbatch*) repetitivo.

#### 10 Ejemplo 4

##### *Fermentación a escala piloto con pH 6.6*

15 Antes del inicio del cultivo semicontinuo el peso seco de células era de 4 g/l. La concentración final fue sin embargo de solo 14.5 g/l. 2 horas después de la inducción tenía el valor de pH era de solo 6.6 en lugar de 7.1, debido a un error en el control de pH. En este punto de tiempo se observó que el crecimiento de células se había detenido. La rata de alimentación de glucosa fue de 135 g/h (w/v). Las células no se sometieron a limitación de glucosa durante la biotransformación. La concentración de ácido acético se incrementó constantemente hasta una concentración final de 47 g/l (figura 20).

20 La concentración de sustrato en los 15 litros de fase orgánica fue de 4.3% (v/v). La formación de alcohol 3,4-dimetilbenzílico (DBAlk) se inició 2 horas después de inducción de las células (figura 21). La formación de 3,4-dimetilbenzaldehído comenzó solo 4 horas después de la inducción de las células. Después de 26 horas la concentración de 3,4-dimetilbenzaldehído fue de 130 mM y la del alcohol 3,4-dimetilbenzílico fue de 100 mM. La formación de ácido 25 3,4-dimetilbenzoico fue muy baja. De esta manera la concentración final fue solo de 2 mM.

El bajo valor de pH influyó no solo el crecimiento de células sino también la actividad enzimática. Debido a la reducción de pH la rata específica de formación de aldehído era baja al principio de la biotransformación. Sin embargo, después de 4 horas a pH 7,1 se recuperó y alcanzó un valor de 12 U/g CDW. La actividad total específica alcanzó el valor máximo de 32 U/g CDW después de 7 horas después del inicio del cultivo semicontinuo.

30 La reducción temporal de pH tuvo un efecto potente sobre el crecimiento de biomasa y actividad enzimática. En comparación con las fermentaciones precedentes la biomasa alcanzó una baja concentración. La actividad volumétrica (U/l) era correspondientemente baja durante la biotransformación.

35 La cinética del proceso de múltiples etapas era sin embargo la misma que en el caso de las biotransformaciones a escala de laboratorio. De este modo, a una concentración de pseudocumeno de 150 mM también se formó alcohol 3,4-dimetilbenzílico.

#### 40 Ejemplo 5

##### *Fermentación a escala piloto con pH 7.4*

45 Puesto que la fermentación precedente no produjo el rendimiento esperado de 3,4-dimetilbenzaldehído se repitió el experimento. Durante la biotransformación se elevó el valor de pH a 7.4. Con esto también fue posible verificar la influencia de un valor de pH elevado sobre la biotransformación.

50 Después del cultivo el peso seco de células fue de 3.5 g/l. La densidad de células se incrementó durante el cultivo semi-continuo (*fedbatch*) hasta un valor de 20 g/l. Puesto que la glucosa no fue nunca limitante en el medio, la concentración de ácido acético aumentó continuamente en el medio (figura 22). La concentración de ácido acético después de la biotransformación fue de 45 g/l. Ya una hora después de la adición de la fase orgánica se mezcló oxígeno al suministro de aire para prevenir limitación de oxígeno. Hasta la hora 6 de biotransformación, el DOT se mantuvo a un valor de entre 15% y 25%. Después el contenido de oxígeno disuelto en el medio fue de entre 25% y 55 40%.

El desarrollo de la concentración de pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzílico (DBAlk), 3,4-dimetilbenzaldehído (DBAlD) y ácido 3,4-dimetilbenzoico (DBÁcido) durante la biotransformación pueden compararse con el desarrollo los desarrollos de las fermentaciones a escala de laboratorio. A una concentración de pseudocumeno de 150 mM en el líquido de cultivo ante todo se acumula 3,4-dimetilbenzaldehído. A partir de una concentración de sustrato de 4.8% (v/v) la concentración de pseudocumeno al final de la fermentación fue de 3 mM. La concentración final de DBAlk fue de 4 mM y la del DBÁcido fue de 12 mM. La formación de ácido 3,4-dimetilbenzoico inicio apenas después de 9 horas. DBAlD se produjo durante la biotransformación hasta una concentración final de 275 mM. 78.6% del sustrato 65 adicionado se convirtió en DBAlD (figura 23). Sin embargo, se registró una pérdida de 16% de pseudocumeno durante el cultivo semicontinuo. De esta manera, cuando se recolectaron finalmente los contenidos del reactor los porcentajes mostrados en la tabla 3 estaban presentes en la fase orgánica.

## ES 2 315 387 T3

TABLA 3

*Porcentaje de pseudocumeno, DBAlk, DBAlD y DBÁcido en la fase orgánica después de la biotransformación*

Sustancia	[%] en la fase orgánica
Pseudocumeno	1
DBAlk	1,3
DBAlD	93.6
DBÁcido	4.1

Los altos valores de la actividad específica (51 U/g CDW) así como la rata de formación de aldehído (30 U/g CDW) fueron logrados aumentando el pH de 7.1 a 7.4 tres horas después de la adición de la fase orgánica. La figura 24 es una representación gráfica de los desarrollos de la actividad total específica y la rata de formación de aldehído. Así, cuando el pH aumentó, después de 3 horas se observó un incremento marcado en la actividad específica y la formación específica de aldehído.

El sustrato adicionado se convirtió en un alto porcentaje en 3,4-dimetilbenzaldehído mientras que solo se formaban pequeñas cantidades de los productos secundarios alcohol 3,4-dimetilbencílico y ácido 3,4-dimetilbenzoico. El aumento del valor pH tuvo en efecto positivo en la actividad enzimática. De este modo, después de aumentar el pH se alcanzaron valores de actividad específica y de ratas de formación de aldehído marcadamente más altas.

El proceso bifásico semicontinuo (*fedbatch*) desarrollado a escala de laboratorio se aplicó con éxito a las condiciones a escala de piloto.

### Ejemplo 6

#### *Procesamiento de 3,4-dimetilbenzaldehído de fermentación a escala piloto con pH 7.4*

Después de finalizar la biotransformación a escala piloto se recolectó el contenido del bioreactor. La fase acuosa y la fase orgánica se separaron mediante centrifugación. A continuación la fase orgánica se secó adicionando sulfato de sodio y luego se separó. Para separar el 3,4-dimetilbenzaldehído del ftalato de dioctilo se empleó destilación a medio vacío. El vacío se controló entre 0.08 mbar y 0.15 mbar. A una temperatura del ftalato de dioctilo de 110°C-120°C comenzó a destilarse el 3,4-dimetilbenzaldehído.

Pudieron obtenerse 484 ml del destilado durante la destilación de 14 litros de ftalato de dioctilo. El destilado estaba compuesto en su 96.5% de 3,4-dimetilbenzaldehído, 0.3% de alcohol 3,4-dimetilbencílico, 2.8% de ftalato de dioctilo, 0.3% de pseudocumeno y 0.04% de octano.

#### *Resumen de los resultados experimentales*

##### *1. Optimización de los parámetros relevantes al proceso*

###### *1.1 Influencia de oxígeno y glucosa*

Un parámetro importante en la producción de 3,4-dimetilbenzaldehído por medio de un proceso biocatalítico es la actividad de la enzima. El nivel y la duración de la actividad enzimática son de un significado decisivo en este caso.

Como ya se mostró, la concentración de glucosa y el suministro de oxígeno de las células tienen una influencia en la actividad de la enzima. De este modo, una concentración de glucosa por encima de 10 g/l en el medio tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática. Sin embargo, una limitación demasiado fuerte de glucosa tiene un efecto negativo sobre la productividad del catalizador.

En este trabajo se ha mostrado que en el caso de una limitación simultánea de glucosa y oxígeno la xileno monooxigenasa suspende la catálisis y alcohol-dehidrogenasas no específicas de *E. coli* hacen que el 3,4-dimetilbenzaldehído se convierta de nuevo en alcohol 3,4-dimetilbencílico (figura 6).

Cuando ocurrieron limitaciones de oxígeno o glucosa individualmente y no fueron demasiado fuertes, no se observaron influencias negativas en la actividad (figuras 16 y 18).

### 1.2 La influencia de la concentración de sustrato

La concentración de sustrato tiene también una influencia en la actividad de la enzima y, a una concentración de pseudocumeno por debajo de 150 mM en la fase orgánica, también sobre la formación de 3,4-dimetilbenzaldehído. Así, una baja concentración de pseudocumeno da lugar a una baja actividad enzimática. A una concentración de pseudocumeno por encima de 150 mM, solo el primer paso del proceso de múltiples etapas, la formación de alcohol 3,4-dimetilbenzílico (DBAlk), depende de la concentración de sustrato.

A una concentración inicial de pseudocumeno de menos de 150 mM pudo observarse ante todo una formación de 3,4-dimetilbenzaldehído (DBAlD). Esta es la razón por la cual no se acumuló alcohol 3,4-dimetilbenzílico en el líquido de cultivo (figura 3). Por esta razón se formó ácido 3,4-dimetilbenzoico (DBÁcido) de manera aumentada a partir de una concentración de pseudocumeno de 90 mM. La formación de alcohol 3,4-dimetilbenzílico que comenzó más tarde puede atribuirse al hecho de que la actividad de la enzima era muy baja en ese punto del tiempo.

Sin embargo, si la concentración inicial excedía 150 mM, al principio se podía observar la acumulación simultánea de alcohol 3,4-dimetilbenzílico y de 3,4-dimetilbenzaldehído en la fase orgánica. Si la concentración de pseudocumeno caía a 150 mM se formaba ante todo DBAlD. La formación de DBÁcido iniciaba al final de la biotransformación cuando el DBAlk prácticamente ya se había convertido completamente en DBAlD (figuras 11, 23). Esto confirma el efecto inhibitorio de DBAlk sobre la formación de ácido 3,4-dimetilbenzoico.

Concentraciones iniciales de pseudocumeno aún más altas pueden conducir a una acumulación pronunciada de alcohol 3,4-dimetilbenzílico en la fase acuosa. Si la concentración de alcohol 3,4-dimetilbenzílico en la fase acuosa excede un valor de 100 mM, éste tiene un efecto tóxico en las células.

### 1.3 Influencia de la fuente de carbono

Si bien al usar glicerina como fuente de carbono las actividades fueron un poco más altas, no se formó más producto al final (figura 12 y figura 15). Además, en la fase orgánica se acumularon más altas de productos secundarios. Esto puede atribuirse a la corta duración de la actividad, entre otras. De esta manera, se observó actividad enzimática solo durante el crecimiento de la biomasa. Cuando se alcanzó la fase estacionaria se observó que la actividad se caía inmediatamente. Por el contrario, al usar glucosa como fuente de carbono, se observó actividad de la enzima hasta en la fase estacionaria. Además se observó que al usar glicerina como fuente de carbono el alcohol 3,4-dimetilbenzílico formado inhibe menos la formación de ácido 3,4-dimetilbenzoico que en el caso de usar glucosa como fuente de carbono (figura 15).

### 1.4 La influencia del valor de pH

Un aumento del valor de pH tiene una influencia positiva en la actividad enzimática. De esta manera se logró un incremento marcado en la actividad específica y en la tasa de formación de aldehído al llevar a cabo la fermentación a un pH de 7.4 en lugar de 7.1 (figura 24). Cuando se ajustó el pH a 7.1 en las fermentaciones en las que se usó glucosa como fuente de carbono, la tasa máxima de formación de aldehído fue de 16 U/g CDW. A un pH de 7.4 se logró una tasa de formación de aldehído marcadamente superior de 30 U/g CDW. Un pH de 6.6 tuvo un efecto marcadamente negativo sobre la actividad (productividad) de la enzima.

## 2. Estabilidad del plásmido

3,4-dimetilbenzaldehído se produce de acuerdo con la invención por *E. coli* JM101 (pSZP3) recombinante. El plásmido pSZP3 se desarrolló por Panke (1999). Para garantizar que el plásmido se mantenga en las bacterias éste lleva un gen de resistencia que le confiere resistencia frente al antibiótico kanamicina. La adición de antibiótico no es deseable en los procesos a escala industrial por razones comerciales y ambientales. Esta es la razón por la cual se llevaron a cabo experimentos en los que la estabilidad de plásmido se verificaba sin presión de selección por kanamicina. Tal como se ha demostrado por el cultivo repetitivo, el plásmido y los genes XMO se mantienen estables por 60 horas. Esto significa que el plásmido se mantiene y los genes XMO se expresan por 14 generaciones.

## 3. Optimización del medio

Si un proceso biológico va a ser explotado comercialmente, el medio debe cumplir con ciertos requisitos. De esta manera, el medio debe ser lo más definido posible. Es decir, no debe comprender componentes cuyas concentraciones no puedan determinarse exactamente y que puedan constituir un riesgo para la pureza del producto. Así, debe prescindirse en lo posible de componentes indefinidos tales como extracto de levadura o peptona.

La obtención de densidades altas de células en bioprocesos tiene una gran influencia en la rentabilidad del proceso. Así, un proceso con alta densidad de células puede tener las siguientes ventajas: volumen menor del reactor, preparación y procesamiento menos complicados, y una actividad volumétrica considerablemente más alta. Sin embargo, un proceso que involucra altas densidades de células también se ve afectado con problemas. Deben adicionarse altas cantidades de nutrientes y el suministro de oxígeno es difícil debido a la alta densidad de células. Además, cultivos con alta densidad de células pueden inhibirse por parte de productos secundarios metabólicos tales como etanol, acetato y lactato, los cuales se forman en condiciones anaeróbicas, por ejemplo. En condiciones de cultivo aeróbico también,

## ES 2 315 387 T3

*E. coli* puede formar ácidos y otros productos secundarios metabólicos que se acumulan en el edio. A un pH de 7, el ácido acético tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células ya a una concentración de 5 g/l. Esta es la razón por la que en un bioproceso debe evitarse una formación demasiado grande de ácido.

- 5 Riesenberg (1991) desarrolló un medio definido que no comprende glucosa ni sulfato de magnesio en una etapa inicial. Se distingue por una baja formación de ácido acético en condiciones ilimitadas de cultivo aeróbico. Usando este medio con *E. coli* se alcanzaron densidades de células de 110 g/l (Riesenberg 1991).

### 3.1 La influencia del medio de Riesenberg

- 10 Puesto que al usar medio M9 solo se alcanzaron densidades de célula de 20-27 g/l con extracto de levadura en la solución de alimentación, la biotransformación se llevó a cabo usando medio de Riesenberg. Tal como se muestra en la figura 8, puede lograrse una alta densidad de célula en el cultivo con una concentración adecuada de glucosa. La formación de ácido acético era idéntica a concentraciones obtenidas por Riesenberg, Schulz *et al.* (1991). De esta  
15 manera se formó aproximadamente 1 g/l de ácido acético. Se llevó a cabo una biotransformación a partir de un peso seco de célula de 16 g/l. A pesar de la abundancia de oxígeno se observó una pronunciada formación de ácido acético lo que finalmente tuvo un efecto sobre el crecimiento de la biomasa. Así, se obtuvo un peso seco de célula de sólo 24.7 g/l (figura 8). Se observó formación de ácido acético incluso a bajas concentraciones de glucosa (figura 4). Esto puede ser atribuible a la formación de xileno monooxigenasa, la cual inhibe el crecimiento de *E. coli* (Bühler, Schmid  
20 *et al.* 2000).

Al usar glicerina como fuente de carbono en lugar de glucosa se acumuló menos ácido acético en la fase acuosa (figuras 10 y 12).

- 25 El suministro de oxígeno de las células en un cultivo con alta densidad de célula es problemático. A esto se le suma el hecho de que la enzima usada para la biotransformación, es decir la xileno monooxigenasa, requiere oxígeno para la catálisis de las sustancias (Bühler, Schmid *et al.* 2000). El sistema de reactor se usó a capacidad plena con respecto a la rata de agitación y aireación incluso cuando en las fermentaciones se obtuvo el peso seco de célula de menos de 30 g/l. Esta es la razón por la que debió usarse una mezcla de oxígeno-aire para la aireación a escala piloto para poder  
30 suministrar suficiente oxígeno a las células.

### 3.2 Composición de alimentación

- 35 El medio de Riesenberg se distingue del medio M9 por su composición menos costosa. Además, se prescindió del extracto de levadura en la solución de alimentación y los problemas relacionados con el mismo durante el proceso en el caso de la purificación de producto (formación de espuma, separación de fases).

- 40 Cuando se prescindió de extracto de levadura en la solución de alimentación y se usó medio M9 se observaron efectos adversos en la biomasa. Así, el peso seco de célula al final del cultivo semicontinuo (*fedbatch*) fue solo de 12 g/l (figura 4). Por lo contrario, se lograron densidades de células de 25 -30 g/l con el medio Riesenberg. La rata más lenta de crecimiento de la biomasa que se obtuvo al usar medio M9 puede atribuirse a la concentración más baja de amonio en comparación con el medio de Riesenberg.

## 4. Influencia combinada de diversos parámetros

- 45 En el marco de la invención se determinaron y se mejoraron parámetros relevantes para el proceso. En la figura 25 se encuentran representados esquemáticamente los diferentes parámetros y sus influencias en el proceso total.

- 50 Como ya se ha descrito, el oxígeno disuelto y la concentración de glucosa en el medio tienen un efecto sustancial sobre el nivel y la duración de la actividad. Las concentraciones de sustrato y producto tienen un efecto tóxico sobre la biomasa, dependiendo de la sustancia. Así, el DBÁcido inhibe crecimiento de biomasa ya a una concentración de 16 mM en la fase acuosa. La concentración de DBAlk que inhibe el crecimiento de biomasa se encuentra en una concentración de 100 mM en la fase acuosa y la de DBAlD a 1812 mM. Si la concentración de pseudocumeno excede de 15-25% en la fase acuosa actúa también de manera tóxica para las células. Así mismo, la concentración de ácido  
55 acético tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de biomasa.

## 5. Purificación de producto

### 5.1 Separación de fases

- 60 El primer paso después de que el contenido del reactor se ha recolectado es la separación de fases mediante centrifugación. Como ya se ha mencionado, se ha encontrado que la adición de extracto de levadura y glicerina al medio tuvo efectos adversos en el proceso de separación. De este modo se ha formado una fase intermedia que constituía hasta un tercio del volumen por separarse. Un efecto comparable se observó cuando la rata de agitación excedió de 2000 rpm. Este fenómeno puede atribuirse a las proteínas presentes en el extracto de levadura o a la  
65 destrucción de las células debido a una rata de agitación demasiado alta.

## 5.2 Destilación

3,4-Dimetilbenzaldehído es una sustancia con un alto punto de ebullición. El punto de ebullición a presión atmosférica es de 220-223°C. La fase orgánica usada de acuerdo con la invención, ftalato de dioctilo, tiene un punto de ebullición de 380°C. Esta gran diferencia en los puntos de ebullición de las dos sustancias hizo posible purificar 3,4-dimetilbenzaldehído mediante destilación.

Para retirar el 3,4-dimetilbenzaldehído de la fase orgánica mediante destilación, la solución debería calentarse a sustancialmente más arriba de 223°C. Esta es la razón por la que el método adecuado pareció ser destilación a vacío medio.

## 6. Biotransformación a escala piloto

Tal como se ha demostrado de acuerdo con la invención, el proceso bifásico semicontinuo (*fedbatch*) desarrollado para la producción de 3,4-dimetilbenzaldehído puede escalarse sin mayores problemas. Después de la optimización de los parámetros relevantes al proceso y el medio a escala de laboratorio, el proceso fue aplicado a escala piloto. El único aspecto que resultó ser un problema durante la biotransformación fue el suministro de oxígeno a las células. Así, el oxígeno tuvo que ser mezclado con el suministro de aire ya a partir de 2 horas después de la inducción de las células.

## Referencias bibliográficas

- F. Ausubel *et al.*, (1997) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York
- Bühler, B., A. Schmid, *et al.* (2000). "Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehydes, and acids in *Escherichia coli* JM101". (Xileno monooxigenasa cataliza la oxigenación de múltiples etapas de tolueno y pseudocumeno hasta los alcoholes, aldehído y ácidos correspondientes en *Escherichia coli* JM101) *The Journal of Biological Chemistry* 275(14): 10085-10092.
- Harayama, S., M. Kok, *et al.* (1992). "Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases". (Relaciones funcionales y evolutivas entre varias oxigenasas) *Ann. Rev. Microbiol.* 46: 565-601.
- Harayama, S., R. A. Leppik, *et al.* (1986). "Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the xylA product". (Orden genético de operón de la ruta superior de plásmido catabólico TOL y oxidación de tanto tolueno como de alcohol bencílico por parte del producto xylA) *Journal of Bacteriology* 167(2): 455-461.
- Harayama, S., M. Rekik, *et al.* (1989). "Characterization of five genes in the upper pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products". (Caracterización de cinco genes en el operón de ruta superior de plásmido TOL pWW0 a partir de *Pseudomonas putida* e identificación de los productos de gene) *Journal of Bacteriology* 171(9): 5048-5055.
- Legoy, M. D., H. S. Kim, *et al.* (1985). "Use of alcohol dehydrogenase for flavoraldehyde production". (Uso de alcohol dehidrogenasa para producción de aldehído de sabor) *Process Biochemistry* 20: 145-148.
- Molinari, F., F. Aragozzini, *et al.* (1997). "Continuous production of isovaleraldehyde through extractive bioconversion in a hollow-fiber membrane bioreactor". (Producción continua de isovaleraldehído mediante bioconversión extractiva en un bio-reactor de membrana con fibra hueca) *Enzyme and Microbial Technology* 20: 604-611.
- Molinari, F., R. Gandolfi, *et al.* (1999). "Biotransformations in two-liquid-phase systems. Production of phenylacetaldehyde by oxidation of 2-phenylethanol with acetic acid bacteria". (Biotransformaciones en sistemas bifásicos líquidos. Producción de fenilacetaldehído mediante oxidación de 2-feniletanol con bacterias de ácido acético) *Enzyme and Microbial Technology* 25: 729-735.
- Molinari, F., R. Villa, *et al.* (1995). "Aldehyde production by alcohol oxidation with *Gluconobacter oxidans*". (Producción de aldehído por oxidación de alcohol con *Gluconobacter oxidans*) *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 989-994.
- Panke, S. (1999). Production of (S)-styrene oxide with recombinant bacteria. (Producción de (S)-estireno con bacterias recombinantes) Institute of Biotechnology, Zurich, Swiss Federal *Institute of Technology*: 208.
- Pouwels P. H. *et al.*, (1985) "Cloning Vectors" (Vectores clonantes), Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford.
- Ramos, J. L., S. Marqués, *et al.* (1997). "Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators". (Control de transcripción de los operones catabólicos de plásmido TOL de *Pseudomonas* logrado por una interacción de factores huésped y reguladores codificados de plásmido). *Annual Reviews in Microbiology* 51: 341-373.

## ES 2 315 387 T3

**Riesenberg, D.** (1991). "High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*". (Cultivo con alta densidad de célula de *Escherichia coli*) *Current Opinion in Biotechnology* 2: 380-384.

5 **Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (Clonación molecular: un manual de laboratorio), 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y., *Cold Spring Harbor Laboratory*.

**Schmid, A.** (1997). Der Metabolismus de ortho-Hydroxybiphenylen in *Pseudomonas azeleica* (El metabolismo de orto-hidroxibifenilos en *Pseudomonas azeleica*) HBP1, Universität Stuttgart.

10 **Simmonds, J. and G. K. Robinson** (1997). "Novel biotransformations to produce aromatic and heterocyclic aldehydes". (Biotransformaciones novedosas para producir aldehídos aromáticos y heterocíclicos) *Enzyme and Microbial Technology* 21: 367-374.

15 **Simmonds, J. and G. K. Robinson** (1998). "Formation of benzaldehyde by *Pseudomonas putida* ATCC 12633". (Formación de benzaldehído por *Pseudomonas putida* ATCC 12633) *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 353-358. Williams, P. A., L. M. Shaw, *et al.* (1997). "xy1UW, two genes at the start of the upper pathway operon of TOL plasmid pWW0, appear to play no essential part in determining its catabolic potential". *Microbiology* 143: 101-107.

20 **Wittcoff, H. A. and B. G. Reuben** (1996). Industrial Organic Chemicals. New-York, *John Wiley & Sons. Inc.*

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Método para la oxidación biocatalítica de una o varias etapas de compuestos aromáticos según el cual

a) en un medio de cultivo de dos fases, acuoso-orgánico, el cual contiene un sustrato aromático de la fórmula II



En la cual

Ar representa un anillo aromático mononuclear opcionalmente mono- o poli-sustituido; y

R<sup>2</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_{n+1}\text{R}^3$ , donde

n representa un valor de número entero de 0 hasta 15; y

R<sup>3</sup> representa H;

se cultiva un microorganismo en condiciones aeróbicas el cual expresa una enzima con actividad de xilenomonooxigenasa (XMO); y

b) al menos un producto formado durante la reacción de oxidación, donde el residuo R<sup>2</sup> se oxidó hasta el residuo hidroxilo, carbonilo o carboxilo correspondiente, se aísla del medio de cultivo;

y según el cual el grado de oxidación del sustrato empleado es controlable mediante el ajuste de la concentración de sustrato.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque para la fase orgánica se usa un compuesto orgánico apolar que tiene un coeficiente de distribución  $>10^4$  en un sistema bifásico n-octanol/agua.

3. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque a 1 atm la base orgánica tiene un punto o rango de ebullición que se encuentra alrededor de 50 hasta 200°C por encima del punto de ebullición del producto de oxidación (de los productos de oxidación).

4. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque como fase orgánica se usa ftalato de di-(alquilo de C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>) o una mezcla de tales ftalatos.

5. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se separa la fase orgánica y se destila(n) el o los producto(s) de oxidación disuelto(s) en la misma.

6. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el microorganismo que expresa actividad XMO en esencia no posee actividad de dehidrogenasa de alcohol bencílico (BADH) y/o dehidrogenasa de benzaldehído (BZDH).

7. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se usa un microorganismo recombinante que se transforma con un vector de expresión el cual contiene en conexión operativa los genes xylM y xylA que codifican para XMO bajo el control genético del alk-sistema de pseudomonas oleovorans GPo1.

8. Método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el microorganismo se transforma con el plásmido de expresión pSPZ3.

9. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el microorganismo es una bacteria del género Escherichia.

10. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se inicia la expresión de la enzima mediante la adición de un inductor al medio de cultivo.

11. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se expresa xilenomonooxigenasa de pseudomonas putida mt-2.

12. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se usa un medio de reacción que en esencia no contine antibiótico.

13. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la reacción se lleva a cabo en un procedimiento semi-continuo de lotes.

## ES 2 315 387 T3

14. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se usa pseudocumeno como material de partida.

5 15. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se utiliza el valor de pH del medio de reacción como magnitud de control de la productividad del biocatalizador.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

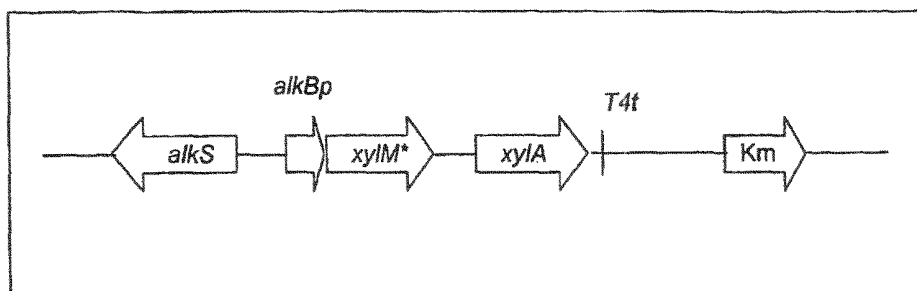


Fig. 2

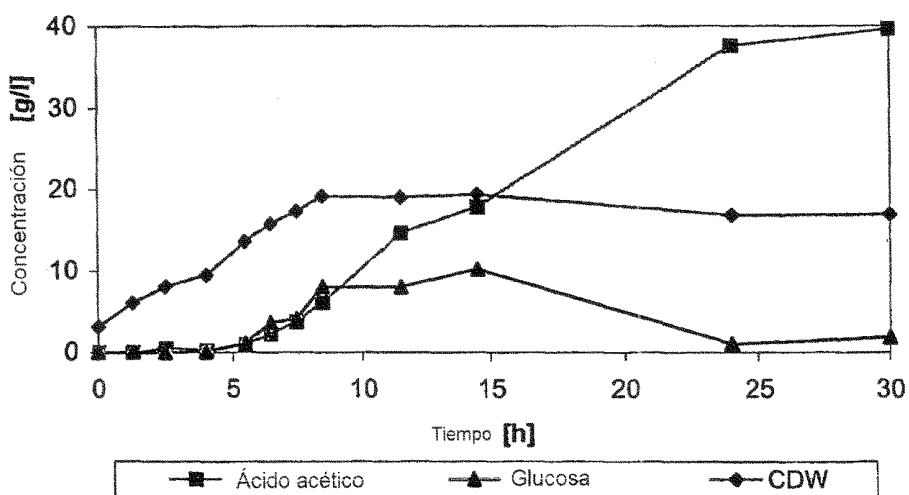


Fig. 3

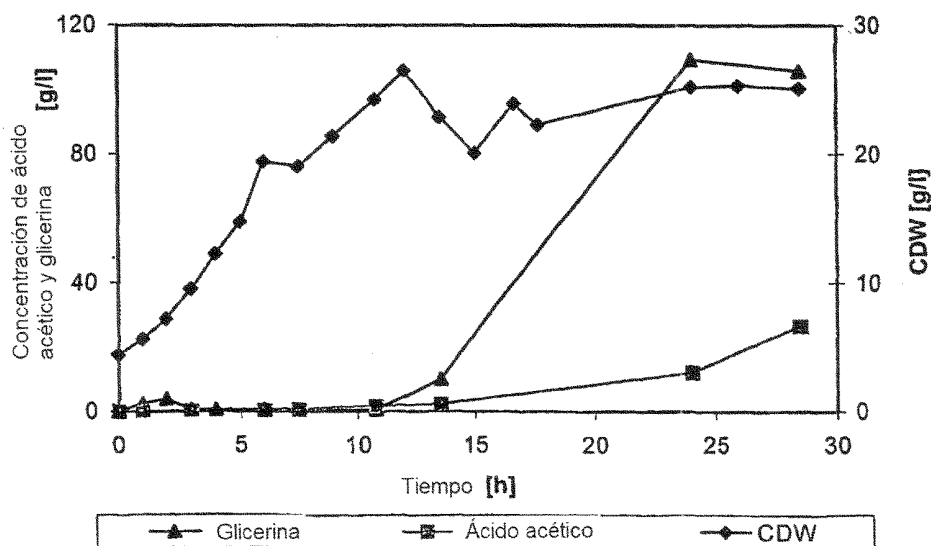


Fig. 4a

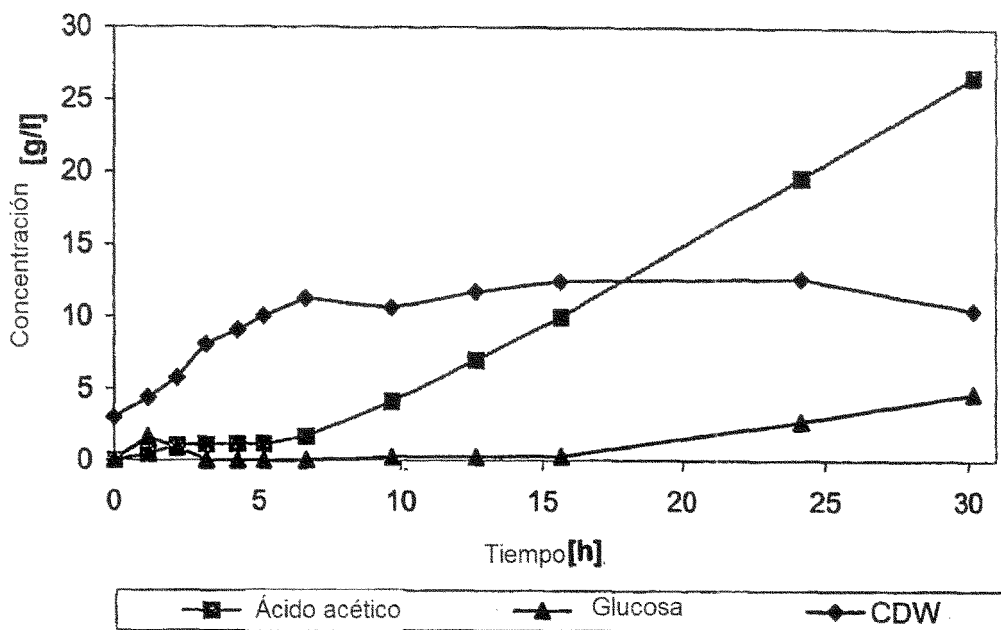
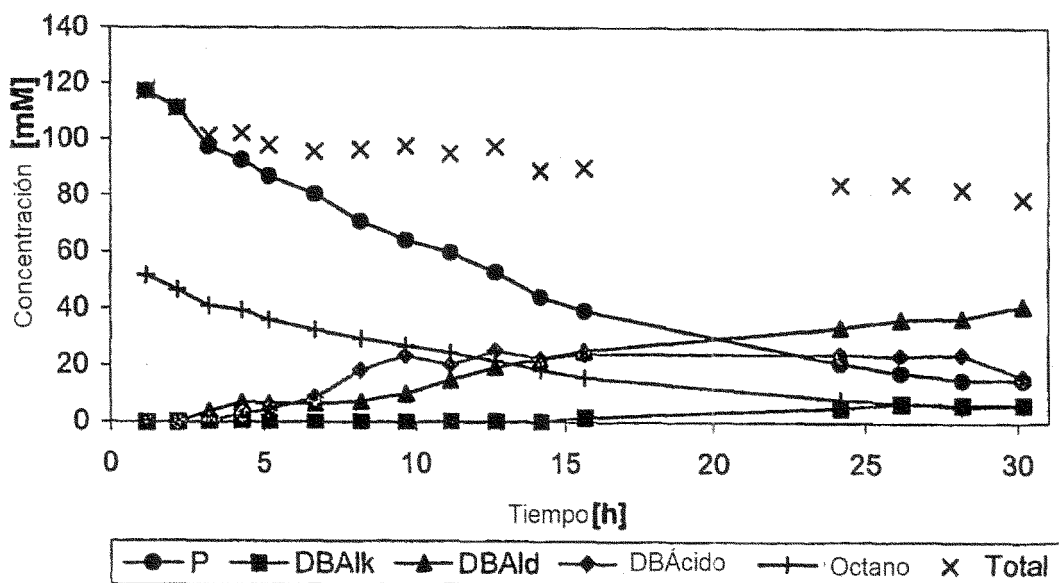
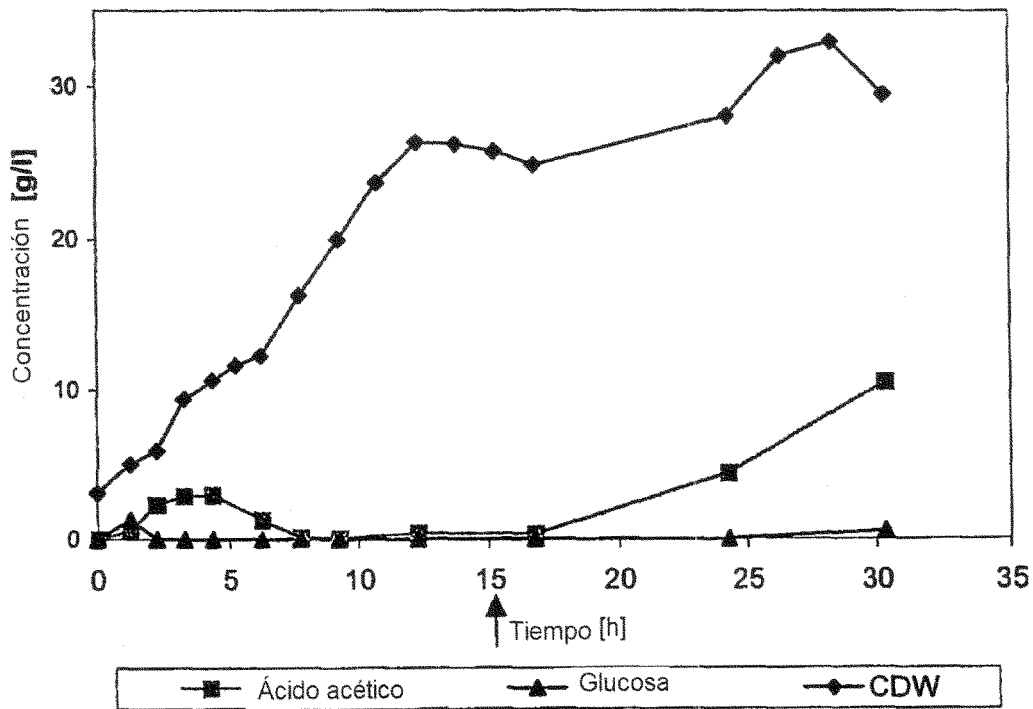


Fig. 4b



**Fig. 5**



**Fig. 6**

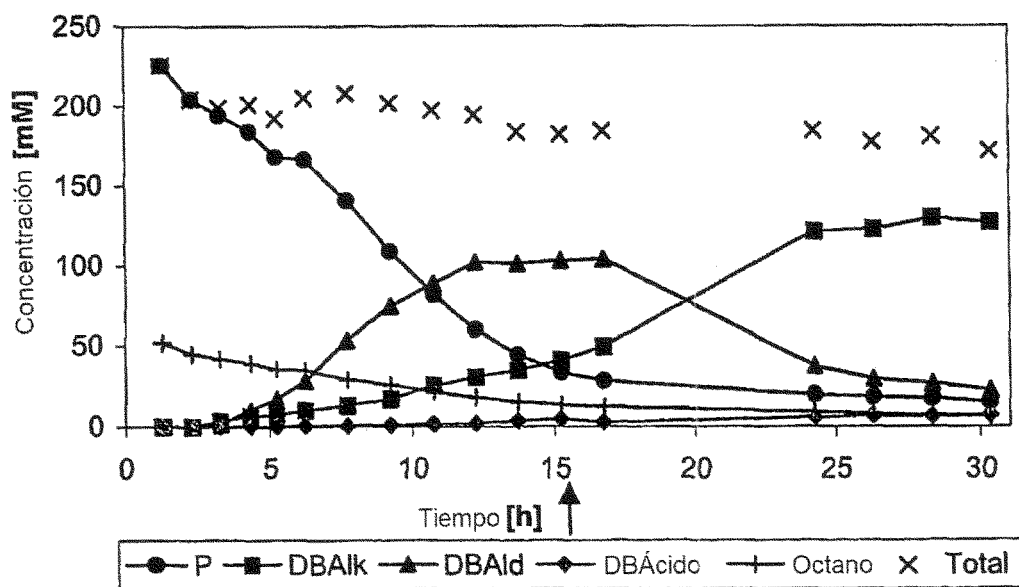


Fig. 7

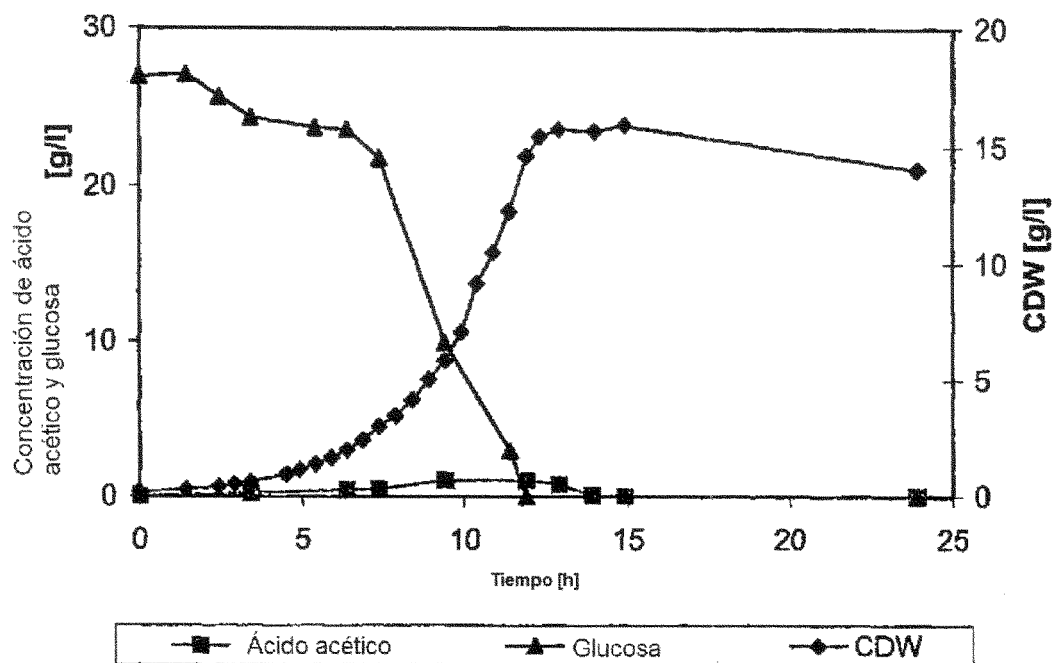


Fig. 8

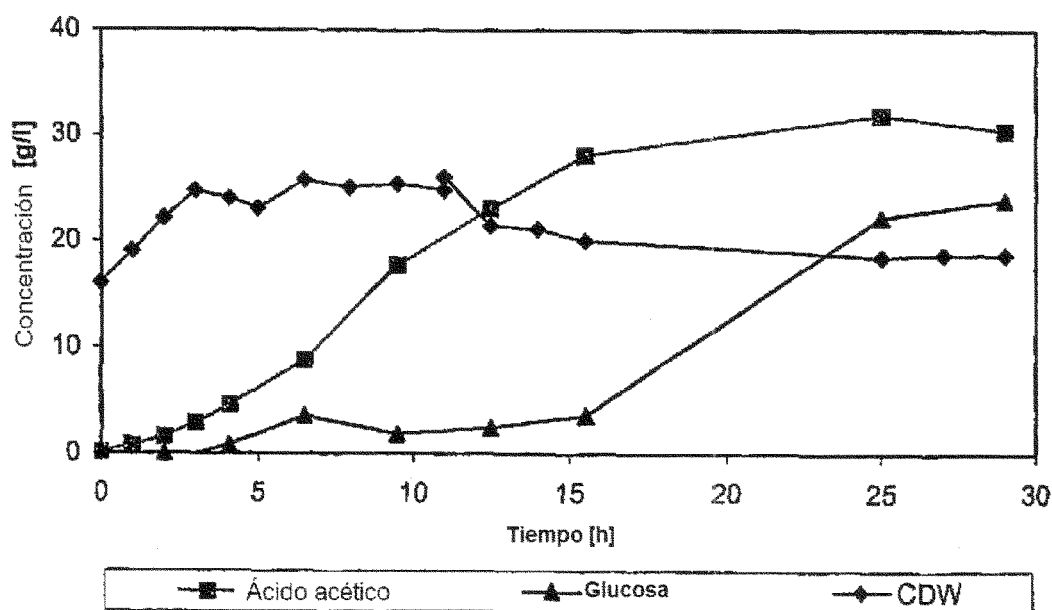


Fig. 9

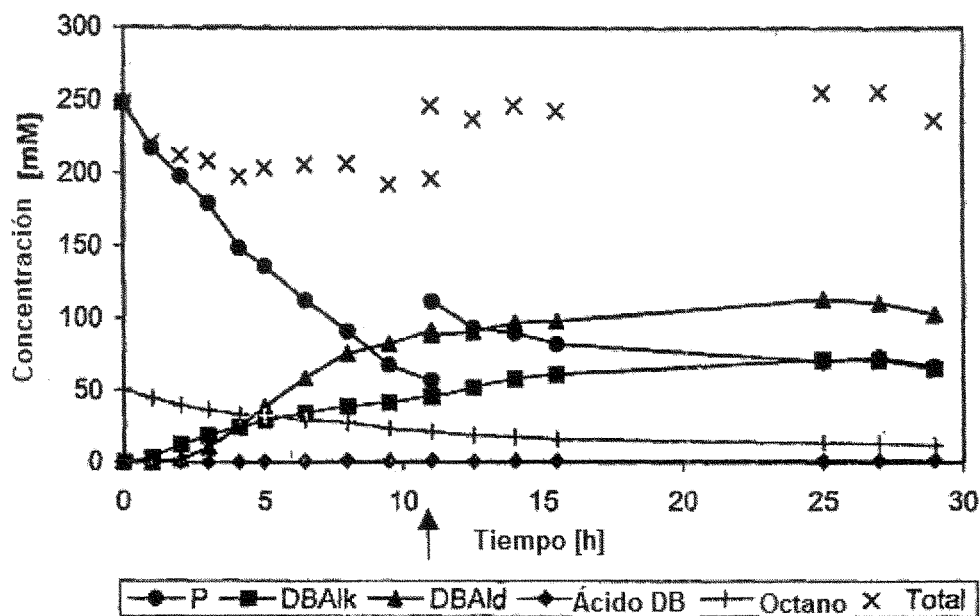


Fig. 10

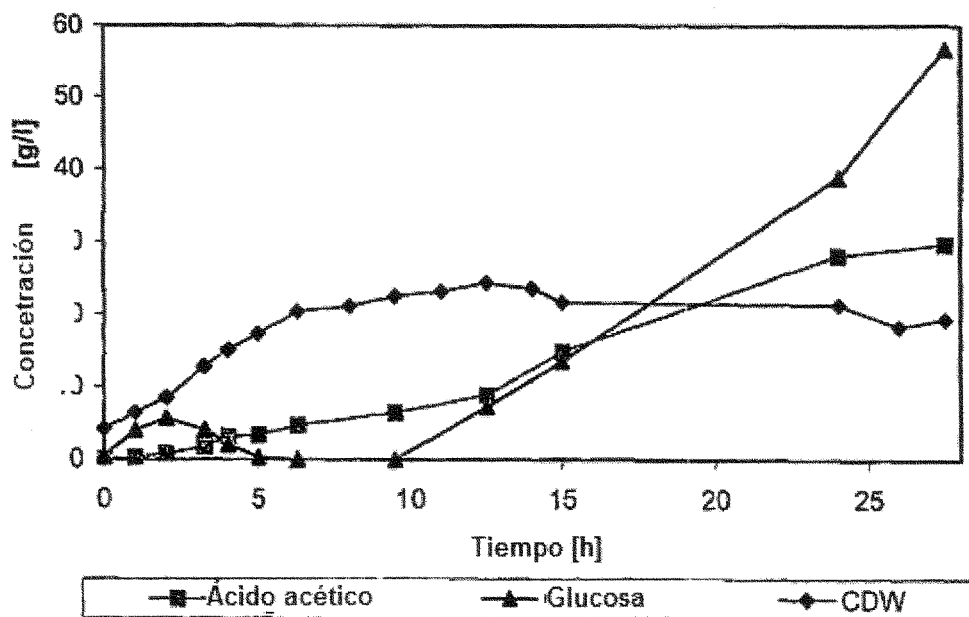


Fig. 11

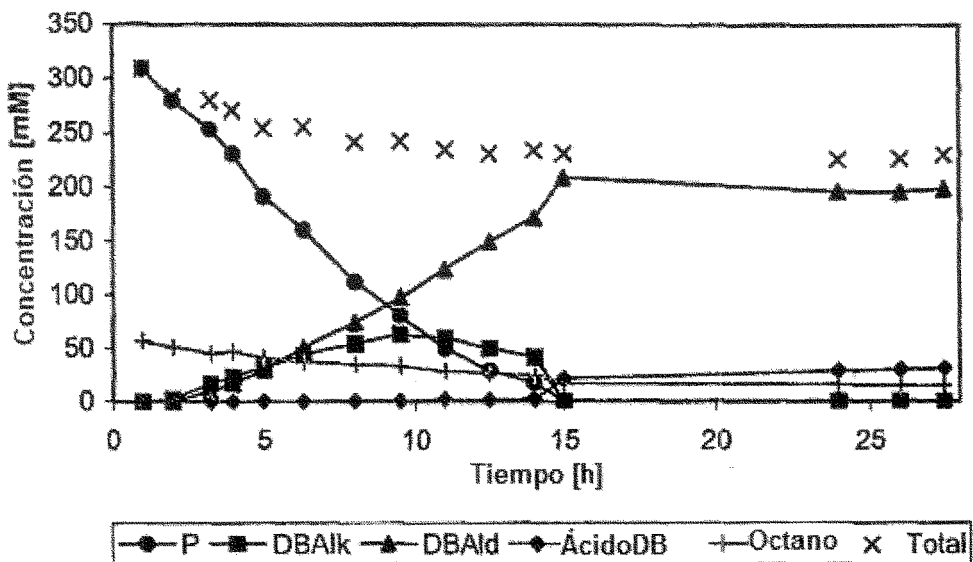


Fig. 12

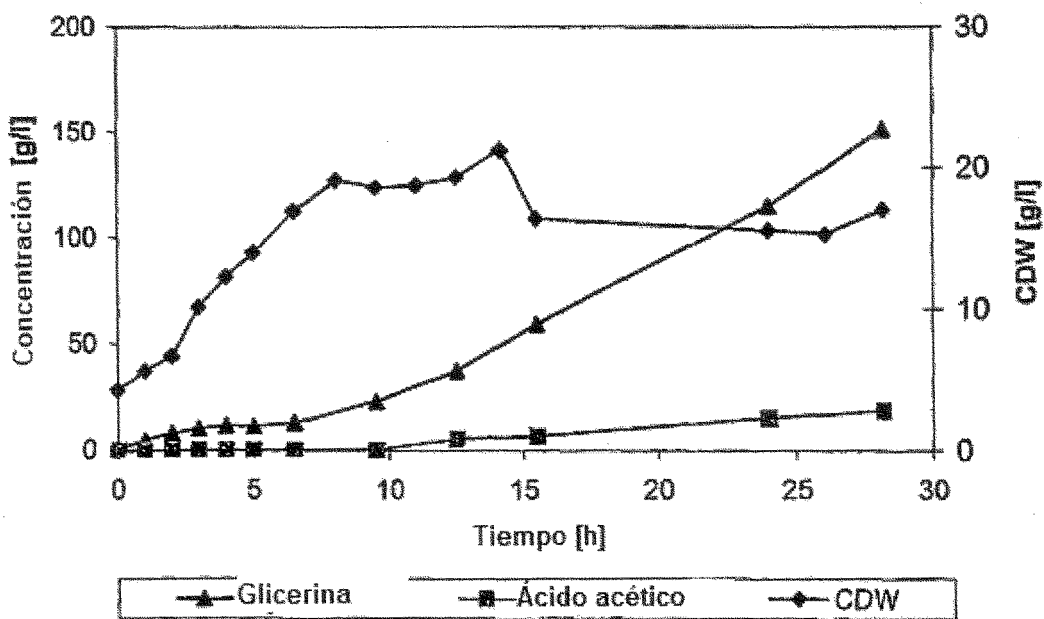


Fig. 13

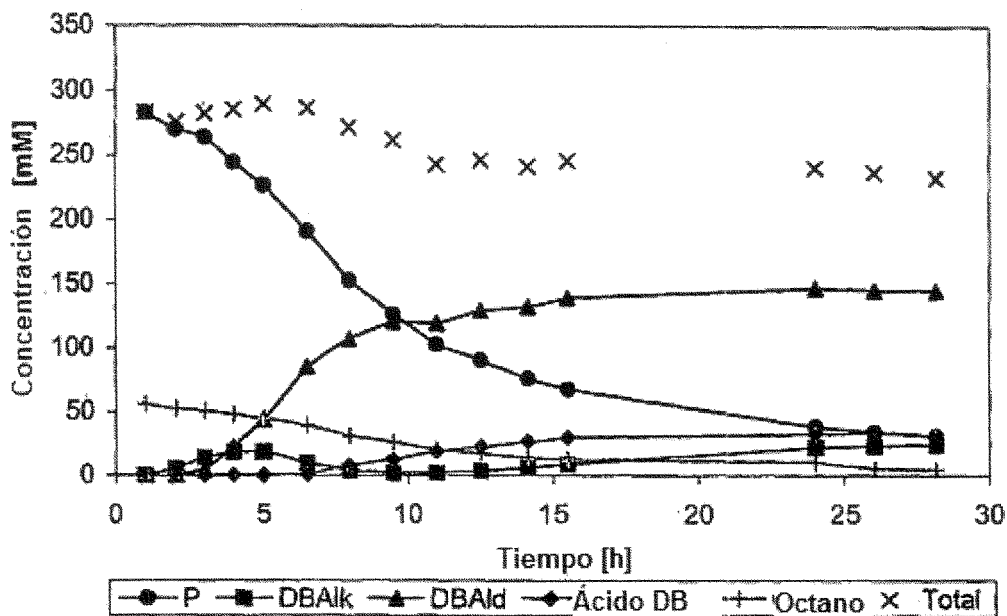


Fig. 14

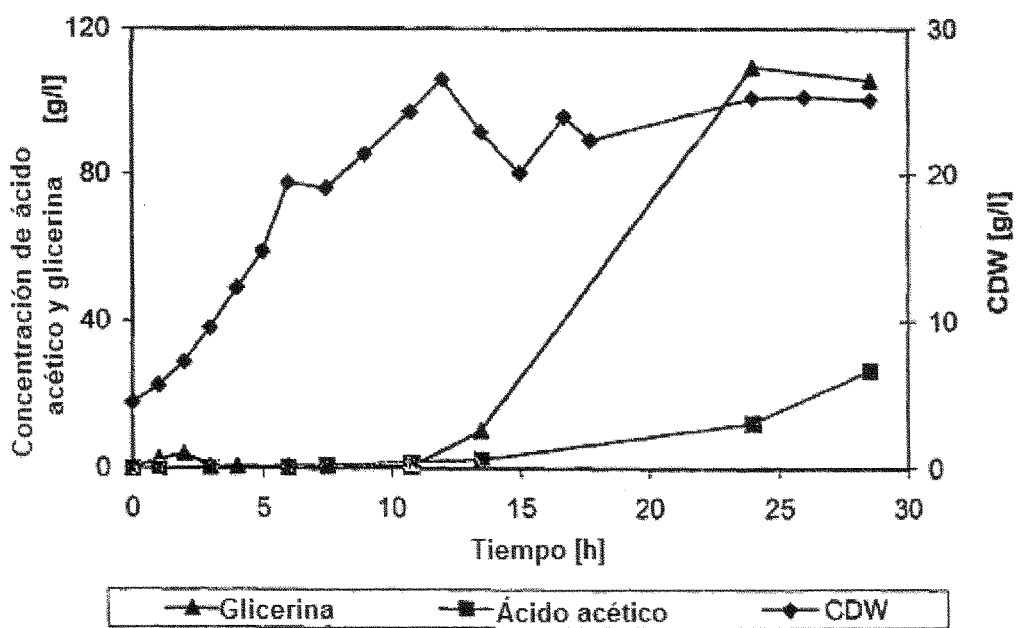


Fig. 15

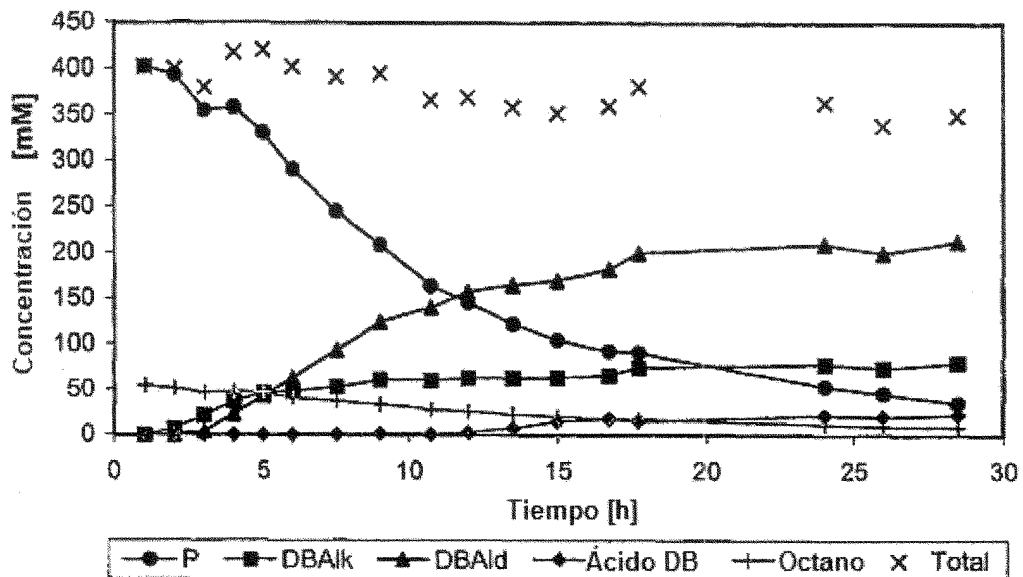


Fig. 16

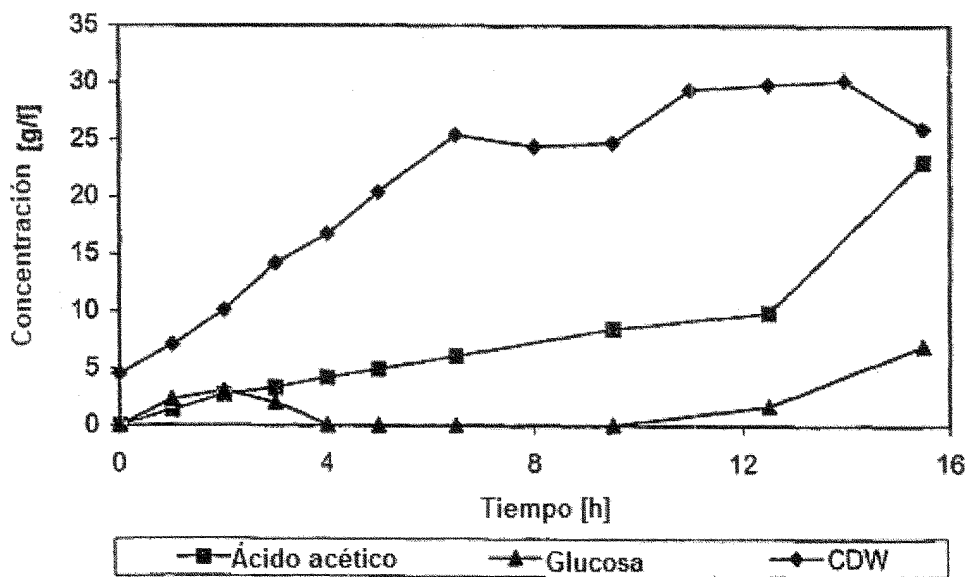


Fig. 17

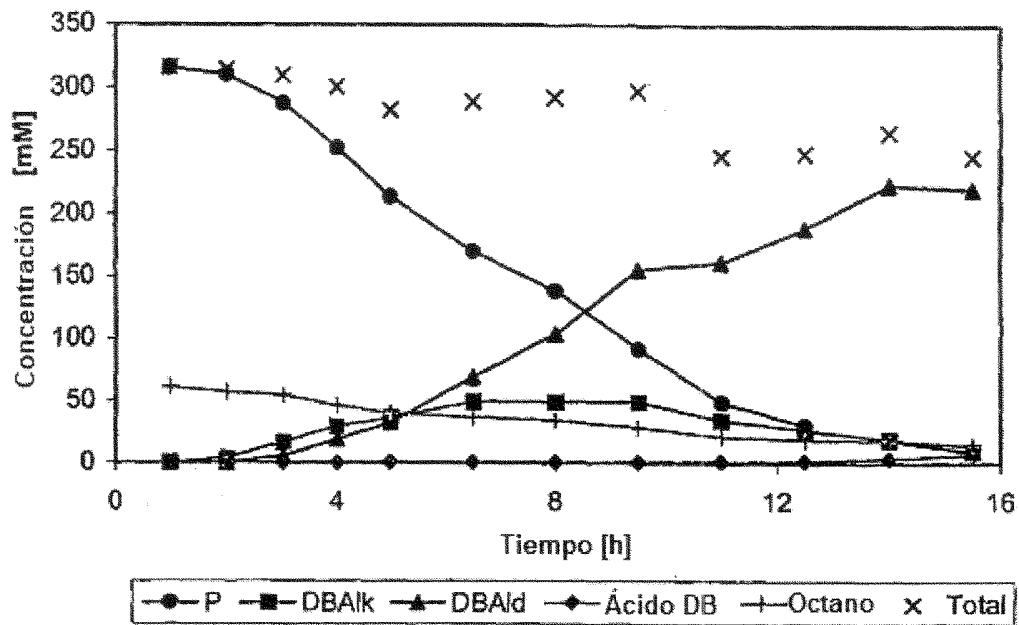


Fig. 18

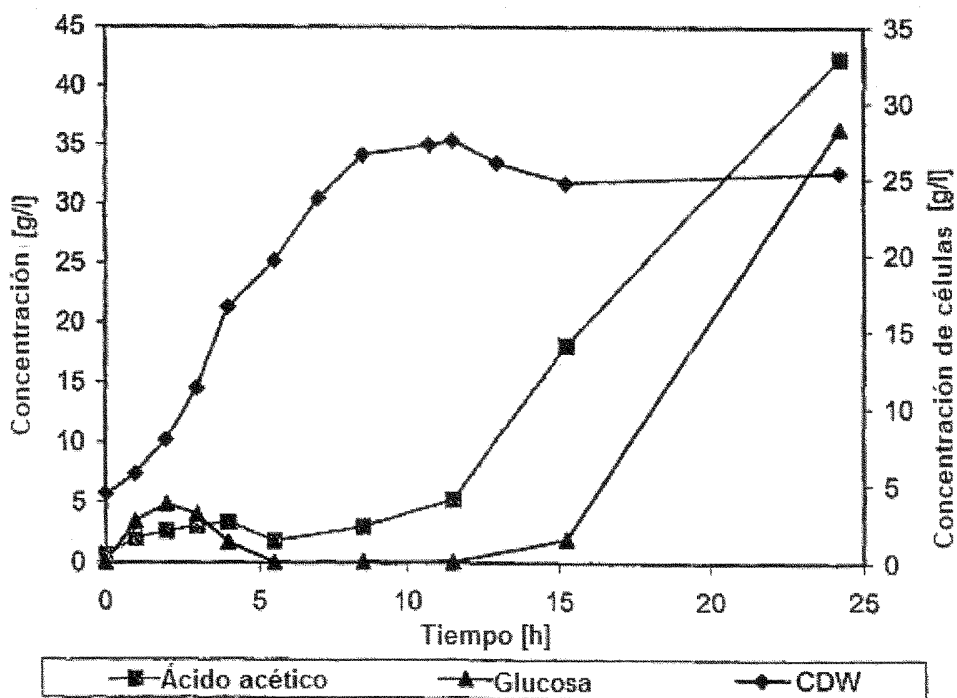


Fig. 19

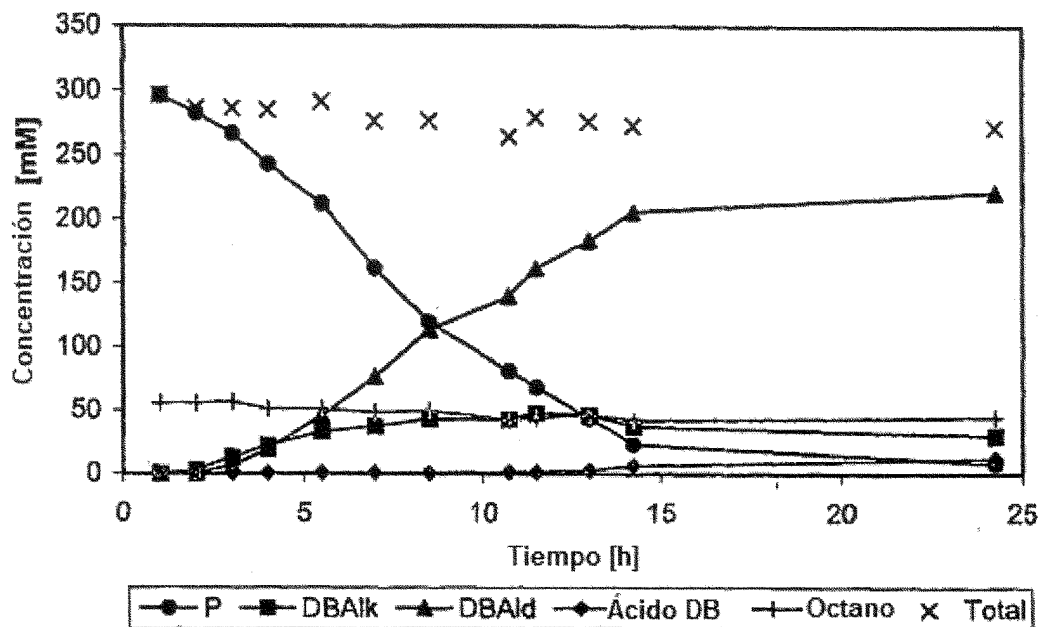


Fig. 20

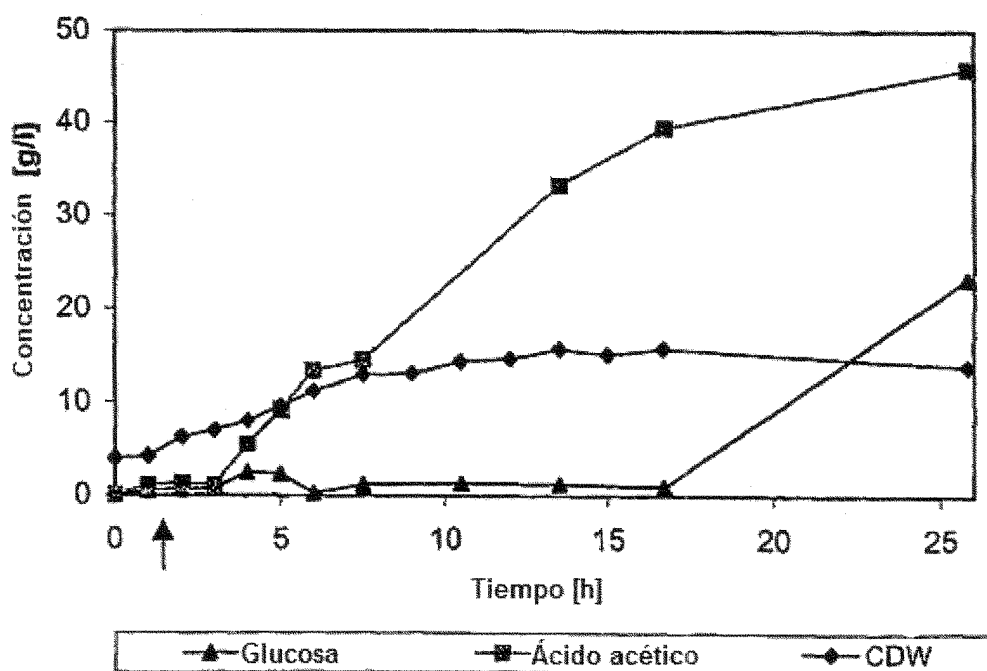


Fig. 21

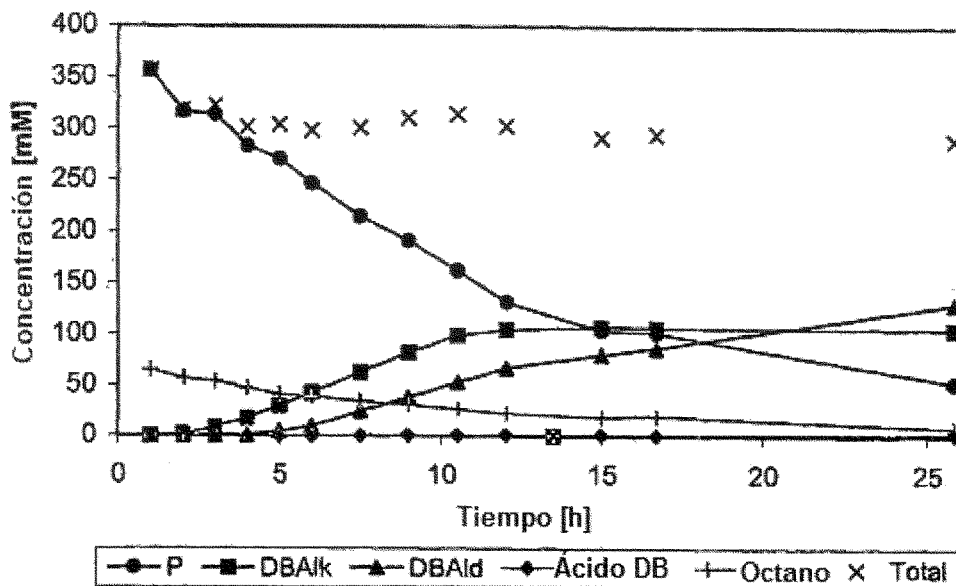


Fig. 22

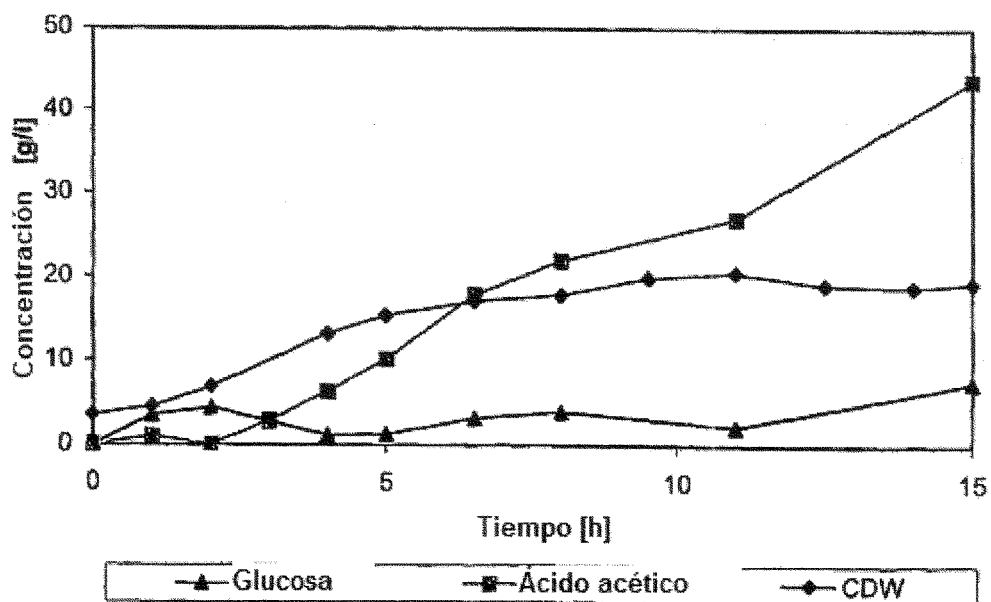


Fig. 23

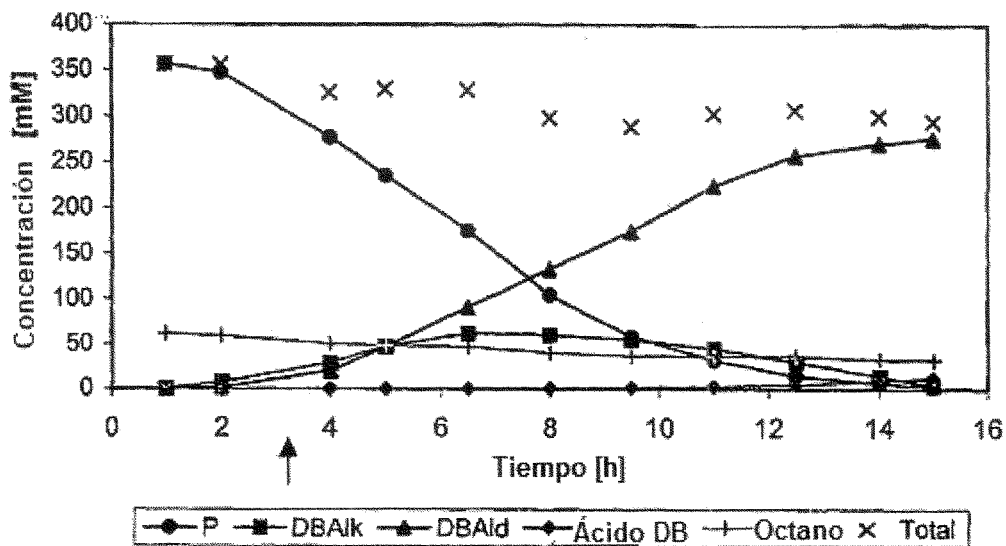


Fig. 24

