

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 637**

51 Int. Cl.:

C12P 13/00 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2016 PCT/EP2016/081021**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17102853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2016 E 16809826 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2023 EP 3390649**

54 Título: **Procedimiento para la producción de ácido orto-aminobenzoico y/o anilina mediante levadura recombinante**

30 Prioridad:

18.12.2015 EP 15201326

29.02.2016 EP 16157777

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

16.04.2024

73 Titular/es:

COVESTRO INTELLECTUAL PROPERTY GMBH & CO. KG (100.0%)

Kaiser-Wilhelm-Allee 60

51373 Leverkusen, DE

72 Inventor/es:

**JÄGER, GERNOT;
MOUSSA, AMGAD, SALAH;
KLAFFL, SIMON;
HAMEDINGER, THOMAS;
KLOECKNER, WOLF y
BEHNKEN, SWANTJE**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 965 637 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

Procedimiento para la producción de ácido orto-aminobenzoico y/o anilina mediante levadura recombinante

5 La presente invención se refiere a la producción de ácido o-aminobenzoico a partir de sustratos fermentables utilizando células de levadura a un pH inferior a 7,0.

10 Actualmente, no hay ninguna fuente renovable o biológicamente derivada de o-aminobenzoato o del ácido correspondiente disponible comercialmente. El O-aminobenzoato es un intermediario natural de la vía del ácido shikimato y un precursor de la biosíntesis del aminoácido aromático L-triptófano. Una conversión química de o-aminobenzoato a anilina se ha descrito en el documento WO 2015/124687.

15 Los procedimientos actuales de producción de anilina se basan en la síntesis química a partir de materias primas derivadas del petróleo. Estas materias primas derivadas del petróleo no son renovables, a diferencia de las materias primas que sí lo son, tal como el recurso renovable "biomasa". La síntesis química de la anilina es un procedimiento que consta de varias etapas. Las diversas etapas de reacción que intervienen en la producción de anilina dan lugar a elevados costes de producción. Además, la síntesis convencional, es decir, química, de la anilina está asociada a productos intermedios peligrosos, disolventes y residuos que pueden tener un impacto sustancial en el medio ambiente. Las reacciones laterales no específicas en el anillo aromático reducen el rendimiento del producto, lo que aumenta aún más los costes de producción. Las materias primas derivadas del petróleo se ven influidas por las fluctuaciones de costes derivadas del precio mundial del petróleo.

20 El documento WO 2015/124687 divulga un concepto de producción de o-aminobenzoato y anilina de origen biológico. Se aplican dos pasos de conversión: (1) la producción fermentativa de o-aminobenzoato y (2) la posterior conversión catalítica del ácido o-aminobenzoico en anilina. El concepto general del procedimiento comprende los siguientes pasos de elaboración:

30 a) producir o-aminobenzoato por fermentación de una materia prima que comprenda al menos un sustrato de carbono fermentable utilizando una célula huésped bacteriana recombinante que sea capaz de convertir biológicamente dicha materia prima que comprenda al menos un sustrato de carbono fermentable en o-aminobenzoato, en el que dicho o-aminobenzoato comprenda anión antranilato, (seguido de la eliminación de la célula),

35 b) convertir dicho o-aminobenzoato de dicho anión antranilato en el caldo de fermentación acuoso libre de células en ácido antranílico por protonación ácida,

c) recuperar dicho ácido antranílico por precipitación o disolución en un disolvente orgánico, y

40 d) convertir dicho ácido antranílico en anilina mediante descarboxilación térmica en un disolvente orgánico.

Las bacterias recombinantes utilizadas en dicho procedimiento pertenecen a la familia de las *Corynebacterium* o *Pseudomonas*. Ambas bacterias producen o-aminobenzoato a pH 7, en condiciones óxicas y normalmente durante la fase exponencial. Estas características de las bacterias descritas en los documentos WO 2015/124687 dan lugar a varios problemas:

45 (i) Debido a la producción fermentativa de o-aminobenzoato a pH 7 (paso a), es necesario añadir una base, por ejemplo, NaOH, para garantizar un pH neutro estable. Durante el paso posterior b), es necesario añadir un ácido, por ejemplo, HCl, para convertir el o-aminobenzoato en ácido o-aminobenzoico. Por lo tanto, como subproducto se forma, por ejemplo, NaCl. El uso de NaOH, HCl y el tratamiento de aguas residuales de la solución salina de NaCl resultante conllevan un aumento de los costes de producción del ácido o-aminobenzoico producido mediante el procedimiento biotecnológico descrito en el estado de la técnica.

50 (ii) Además, el o-aminobenzoato es tóxico para las células microbianas. Si las células microbianas muestran una mayor resistencia al o-aminobenzoato, muchos de los mecanismos subyacentes a dicha resistencia requieren un gasto energético. Así, una cierta proporción del sustrato fermentable se consume para el metabolismo de mantenimiento, lo que conduce a una disminución de los rendimientos de o-aminobenzoato. Por esta razón, los altos títulos de o-aminobenzoato que se requieren para un rendimiento espacio-temporal razonable del procedimiento disminuyen concomitantemente el rendimiento del producto.

60 (iii) Dado que la fermentación se realiza en condiciones óxicas, es necesario airear y agitar el recipiente de fermentación, lo que supone un aumento de los costes de inversión y funcionamiento de la unidad de fermentación.

65 (iv) Además, el o-aminobenzoato se produce normalmente durante la fase exponencial y junto con el crecimiento microbiano. Este hecho disminuye aún más el rendimiento global de la producción de o-aminobenzoato.

Aunque la producción biotecnológica de o-aminobenzoato a partir de fuentes renovables como precursor para la producción de anilina ofrece beneficios potenciales, todos los factores descritos anteriormente disminuyen los beneficios potenciales de este procedimiento si se utilizan bacterias en la fermentación.

- 5 Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos alternativos para producir o-aminobenzoato y anilina a partir de fuentes renovables.

Este problema se resuelve mediante las realizaciones definidas en las reivindicaciones y en la descripción.

- 10 En una primera realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir ácido o-aminobenzoico que comprende los pasos de

- 15 a) fermentar al menos un sustrato fermentable en un recipiente de fermentación a un pH inferior a 7 utilizando una célula de levadura capaz de convertir al menos un sustrato fermentable en ácido o-aminobenzoico; y
- b) separar el ácido o-aminobenzoico producido del caldo de fermentación.

Célula de levadura capaz de convertir un sustrato fermentable en ácido o-aminobenzoico

- 20 Una célula de levadura capaz de convertir un sustrato fermentable en ácido o-aminobenzoico es una célula de levadura que convierte al menos una parte del sustrato fermentable en ácido o-aminobenzoico y libera al menos una parte del ácido o-aminobenzoico producido en el caldo de fermentación. Dado que el ácido o-aminobenzoico es un intermediario en la vía bioquímica que conduce a la producción del aminoácido aromático triptófano, las células de levadura de tipo silvestre no liberan normalmente ácido o-aminobenzoico. Por lo tanto, la célula de levadura capaz de convertir al
- 25 menos un sustrato fermentable en ácido o-aminobenzoico es, preferentemente, una célula de levadura cuyas vías bioquímicas se modifican de tal manera que no todo el ácido o-aminobenzoico producido se utiliza en reacciones bioquímicas posteriores, sino que se acumula en la célula y finalmente se libera en el caldo de fermentación.

- 30 En principio, existen dos enfoques para obtener una célula de este tipo. (i) El flujo de carbono a través de la vía que conduce al ácido o-aminobenzoico puede aumentarse de modo que la tasa de producción de o-aminobenzoico supere la tasa de consumo por las reacciones posteriores que conducen a la síntesis de triptófano. (ii) La capacidad de las vías que convierten el ácido o-aminobenzoico en metabolitos o productos subsiguientes, por ejemplo, triptófano, puede disminuir de modo que incluso la tasa de producción de ácido o-aminobenzoico encontrada en las cepas de tipo silvestre provoque la acumulación de este compuesto. En una realización preferida de la invención, al menos una vía bioquímica que consume ácido o-aminobenzoico está completamente bloqueada. Se obtienen resultados particularmente ventajosos si se combinan ambos enfoques, de modo que la célula de levadura tenga una tasa de producción de ácido o-aminobenzoico aumentada en comparación con una célula de tipo silvestre y, al mismo tiempo, un consumo de ácido o-aminobenzoico disminuido.

- 40 Los procedimientos para obtener células de levadura con las propiedades descritas anteriormente son bien conocidos en la técnica. Las células adecuadas pueden seleccionarse simplemente buscando mutantes que liberen ácido o-aminobenzoico en el medio. La frecuencia de mutantes en un experimento de este tipo puede incrementarse por medios comunes tal como la radiación ionizante o los mutágenos químicos. Sin embargo, como este procedimiento depende del azar, es más preferible dirigir las enzimas clave de las vías pertinentes mediante ingeniería genética.
- 45 Mediante los procedimientos habituales de ingeniería genética, la expresión de los genes y la actividad enzimática pueden aumentarse, disminuirse o incluso suprimirse a voluntad.

- 50 Las especies de levadura preferidas para el procedimiento de la presente invención son *Ashbya gossypii*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Lo más preferible es que la levadura sea *Saccharomyces cerevisiae*.

- 55 Preferentemente, la célula de levadura capaz de convertir un sustrato fermentable en ácido o-aminobenzoico comprende una modificación de la actividad de la antranilato fosforribosiltransferasa que disminuye dicha actividad enzimática. Mediante esta modificación, el flujo de o-aminobenzoato a N-(5-fosfo-D-ribosil)-antranilato disminuye o desaparece por completo. Por lo tanto, dicha modificación conduce a la acumulación de o-aminobenzoato.

- 60 El término actividad antranilato fosforribosiltransferasa se refiere a una actividad enzimática que cataliza la conversión de o-aminobenzoato en N-(5-fosfo-D-ribosil)-antranilato. En la levadura, la actividad antranilato fosforribosiltransferasa está mediada por Trp4 (YDR354W).

- 65 La disminución descrita anteriormente de la actividad de la antranilato fosforribosiltransferasa puede lograrse de tres maneras principales: (i) La regulación de la expresión del gen *trp4* en la levadura puede modificarse de modo que la transcripción del gen disminuya o desaparezca. (ii) La secuencia de ácido nucleico del gen *trp4* puede modificarse para que la enzima codificada por el gen modificado tenga una actividad específica menor. (iii) El gen *trp4* puede sustituirse por un gen derivado de un organismo distinto de la levadura y que codifique una enzima con una actividad antranilato fosforribosiltransferasa específica inferior a la de Trp4.

En una realización especialmente preferida de la presente invención, la célula de levadura no tiene actividad residual de antranilato fosforribosiltransferasa. Preferentemente, esto se consigue aboliendo la expresión del gen *trp4* en la célula de levadura o modificando la secuencia de ácido nucleico del gen *trp4* de tal manera que resulte una proteína sin actividad antranilato fosforribosiltransferasa. Una cepa resultante de tal modificación también se conoce en la técnica como "cepa desactivada". Obviamente, tal cepa es auxotrófica para el L-triptófano.

Ácido O-aminobenzoico

El término "ácido o-aminobenzoico" mencionado en la presente solicitud se refiere al ácido 2-aminobenzoico. Este compuesto también se conoce como ácido antranílico. El experto en la técnica sabe que un ácido puede estar presente en su forma protonada como sustancia neutra o desprotonada como anión. En solución acuosa, una parte del ácido está protonada y otra parte está presente como anión. La relación entre el ácido protonado y el anión depende del pH de la solución y de la constante de disociación K_a del ácido en cuestión. A menos que se indique lo contrario, el término "ácido o-aminobenzoico" utilizado en esta solicitud se refiere siempre tanto al ácido protonado como al anión correspondiente.

Caldo de fermentación

Al comienzo de la fermentación, el caldo de fermentación comprende las células de levadura recombinante y al menos un sustrato fermentable. Preferentemente, el caldo de fermentación comprende además al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sistemas tampón, nutrientes inorgánicos, aminoácidos, vitaminas y otros compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento y/o mantenimiento de la célula de levadura recombinante. El caldo de fermentación es a base de agua. Tras un tiempo suficiente de fermentación, el caldo de fermentación también contiene ácido o-aminobenzoico, el producto de fermentación deseado.

Sustrato fermentable

Un sustrato fermentable, tal como se entiende en la presente solicitud, es cualquier compuesto orgánico o mezcla de compuestos orgánicos que puede ser utilizado por la célula de levadura recombinante para producir ácido o-aminobenzoico en presencia o ausencia de oxígeno. Dado que una realización preferida del procedimiento de la presente invención se refiere a la producción de ácido o-aminobenzoico en condiciones anóxicas, el sustrato fermentable es preferentemente un compuesto orgánico o mezcla de compuestos orgánicos que pueden convertirse en condiciones anóxicas en ácido o-aminobenzoico. Los sustratos fermentables preferidos sirven además como fuentes de energía y carbono para el crecimiento de las células de levadura recombinante. Los sustratos fermentables preferidos son la remolacha azucarera procesada, la caña de azúcar, las plantas que contienen almidón y la lignocelulosa. También se prefieren como sustrato fermentable el glicerol y los compuestos C1, preferentemente CO, y los azúcares fermentables.

Los azúcares fermentables preferidos son monosacáridos C-5, monosacáridos C-6, disacáridos y trisacáridos. Los monosacáridos C-5 preferidos son la xilosa y la arabinosa. Los monosacáridos C-6 preferidos son la glucosa, la fructosa y la manosa. Un disacárido preferido es la sacarosa y un trisacárido preferido es la cactosa. Las plantas que contienen almidón preferidas son el maíz, el trigo y el centeno. La lignocelulosa se selecciona preferentemente del grupo que consiste en la paja, la madera y el bagazo.

Caldo de fermentación, otros componentes

Además del sustrato fermentable, el caldo de fermentación también comprende nutrientes inorgánicos, aminoácidos, vitaminas y otros compuestos orgánicos que son necesarios para el crecimiento y/o el metabolismo de mantenimiento de la célula de levadura recombinante. El experto en la técnica conoce los tipos y cantidades de nutrientes inorgánicos que deben suministrarse al medio para alcanzar la concentración de biomasa deseada. Las distintas cepas de levadura pueden diferir en cuanto a su necesidad de vitaminas, aminoácidos y otros compuestos orgánicos. Si el proveedor de la cepa no facilita esta información, puede obtenerse mediante experimentos sencillos de crecimiento que son rutinarios para el experto en la técnica.

La modificación genética de la célula de levadura que la hace capaz de acumular y liberar ácido o-aminobenzoico puede interrumpir o disminuir el flujo de carbono a través de vías bioquímicas que proporcionan compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento y/o mantenimiento de la célula de levadura recombinante. Las células recombinantes de levadura con tales modificaciones genéticas tienen, por tanto, auxotrofias particulares. La composición del medio debe tener en cuenta estas auxotrofias. Si la célula de levadura no tiene actividad antranilato fosforribosiltransferasa como en una realización preferida de la presente invención, es auxotrófica para el L-triptófano y este aminoácido tiene que añadirse al caldo de fermentación.

Preferentemente, el caldo de fermentación comprende además al menos un sistema tampón. El sistema tampón comprende un ácido débil y su base conjugada o *viceversa*. Como efecto del tampón, la adición de un ácido o una base fuertes al caldo de fermentación modifica su valor de pH considerablemente menos que en ausencia de tampón.

Para cada intervalo de pH deseado existe al menos un sistema tampón adecuado. Tales tampones son conocidos por el experto en la técnica. Un tampón preferido es el de citrato.

5 Sin embargo, en una aplicación industrial del procedimiento de la presente invención se preferirá ajustar el pH añadiendo un ácido o una base al caldo de fermentación, ya que las sustancias tampón suponen un coste adicional.

Recipiente de fermentación

10 El término "recipiente de fermentación" se refiere a cualquier recipiente que pueda utilizarse para llevar a cabo la fermentación del sustrato fermentable a ácido o-aminobenzoico. Preferentemente, dicho recipiente de fermentación comprende medios para medir parámetros relevantes del procedimiento, tales como la temperatura, el pH, la concentración de sustrato, la concentración de producto, el oxígeno disuelto y la densidad celular del caldo de fermentación. Preferentemente, el recipiente de fermentación comprende además medios para ajustar al menos uno de dichos parámetros de procedimiento.

15 En general, el experto en la técnica sabe cómo diseñar recipientes de fermentación adecuados para un procedimiento de fermentación determinado. En particular, el diseño del recipiente de fermentación debe adaptarse al modo deseado del procedimiento de fermentación (lote, lote alimentado o fermentación continua). Los recipientes de fermentación incluyen reactores de tanque agitado, reactores de membrana, reactores de flujo tapón o reactores de bucle (Bioprozesstechnik, Horst Chmiel, ISBN-10: 3827424763, Spektrum Akademischer Verlag). Los recipientes reactores preferidos para la fermentación aeróbica y anaeróbica son los reactores de tanque agitado o los reactores de bucle (especialmente los de aerotransporte).

20 La presente invención se refiere a un procedimiento integrado de producción de ácido o-aminobenzoico en el paso a) del procedimiento y de separación del ácido o-aminobenzoico producido en el paso b) del procedimiento. En la presente solicitud se divulgan varias formas de llevar a cabo el paso b) del procedimiento. Algunos de ellos requieren recipientes de fermentación especializados. Dichos recipientes particularmente preferidos se describen más adelante en relación con el paso b) de separación.

30 Lote/lote alimentado/cultivo continuo

Existen tres modos principales de realizar una fermentación: por lotes, por lotes alimentados y fermentación continua.

35 En una fermentación por lotes, se prepara un caldo de fermentación que comprende células de levadura recombinante, al menos un sustrato fermentable y otros componentes necesarios según lo descrito anteriormente. A continuación, el caldo de fermentación se incuba en un recipiente de fermentación en condiciones adecuadas para que las células de levadura recombinantes produzcan ácido o-aminobenzoico. Una fermentación por lotes también puede implicar el crecimiento de la biomasa. Sin embargo, en principio es posible incubar las células de levadura recombinante en condiciones que no permitan el crecimiento, ya que la formación del producto en las células de levadura recombinante de la presente invención no va unida al crecimiento. Durante la fermentación no se añade ningún sustrato fermentable adicional. Sin embargo, puede ser ventajoso añadir ácidos o bases inorgánicos al caldo de fermentación para mantener o alcanzar un valor de pH deseado. Una vez que la concentración del sustrato fermentable desciende por debajo de un nivel definido, se produce una determinada cantidad de ácido o-aminobenzoico o la tasa de producción de ácido o-aminobenzoico desciende por debajo de un nivel definido, se detiene la fermentación y el ácido o-aminobenzoico se separa del caldo de fermentación.

45 En una fermentación por lotes alimentada, se prepara un caldo de fermentación que comprende células de levadura recombinante, al menos un sustrato fermentable y otros componentes necesarios según lo descrito anteriormente. A continuación, el caldo de fermentación se incuba en un recipiente de fermentación en condiciones adecuadas para que las células de levadura recombinantes produzcan ácido o-aminobenzoico. Una fermentación por lotes alimentada también puede implicar el crecimiento de la biomasa. Tras el inicio de la fermentación, se añade sustrato fermentable adicional al menos una vez al caldo de fermentación. Así, una fermentación por lotes alimentada típica se caracteriza por un periodo de crecimiento de la biomasa y/o de formación de productos hasta que la concentración del sustrato fermentable desciende por debajo de un determinado umbral. Una vez que esto ocurre, se añade sustrato fermentable adicional y se reanuda la fermentación. Este procedimiento puede repetirse varias veces. En el procedimiento de la presente invención se repite preferentemente al menos una vez, al menos dos veces, al menos tres veces o al menos cuatro veces. Tras el número de repeticiones deseado, el ácido o-aminobenzoico se separa del caldo de fermentación. Pueden añadirse compuestos distintos del sustrato fermentable, en particular ácidos o bases inorgánicos, tantas veces como sea necesario.

50 En una fermentación continua, el sustrato fermentable se añade continuamente al caldo de fermentación. Normalmente, el caldo de fermentación que contiene células de levadura y, opcionalmente, ácido o-aminobenzoico, se retira continuamente del recipiente de fermentación y se sustituye por caldo de fermentación fresco. En una fermentación continua típica, las concentraciones de biomasa, producto fermentable y ácido o-aminobenzoico se encuentran en un estado estacionario. Las células de levadura en un sistema de este tipo nunca alcanzan su fase estacionaria de crecimiento porque las células se eliminan continuamente y la adición de caldo de fermentación fresco

y sustrato fermentable mantiene las condiciones que permiten la proliferación celular. Si las células se retiran del flujo de producto y se vuelven a introducir en el recipiente de fermentación de funcionamiento continuo, se puede reducir el consumo de sustrato para la proliferación celular.

- 5 La capacidad total de fermentación puede dividirse entre varios fermentadores, y pueden utilizarse tanques de ruptura para permitir un suministro continuo de material de fermentación a la sección posterior que comprende los pasos.

Condiciones anóxicas

- 10 Las "condiciones anóxicas" a las que se hace referencia en la presente solicitud son condiciones caracterizadas por una saturación de oxígeno del caldo de fermentación inferior a la que estaría presente sin consumo de oxígeno en el medio a la presión parcial de oxígeno presente en el recipiente de fermentación. Las condiciones anóxicas prevalecen en el caldo de fermentación si el consumo de oxígeno de las células de levadura supera la velocidad de transporte de oxígeno del aire al caldo de fermentación. Este desequilibrio entre el suministro y el consumo de oxígeno provoca una disminución de la concentración de oxígeno en el caldo de fermentación. Dado que la levadura es capaz de vivir e incluso crecer anaeróbicamente, las condiciones anóxicas en el caldo de fermentación son aceptables. Por lo tanto, el recipiente de fermentación no necesita necesariamente estar equipado con dispositivos de aireación, lo que resulta en un aparato más sencillo y barato.

- 20 Para garantizar un crecimiento suficiente en condiciones anóxicas, se deben suministrar al menos cantidades muy pequeñas de oxígeno para apoyar las reacciones enzimáticas que son esenciales para el crecimiento y dependen de la presencia de oxígeno, por ejemplo, las monooxigenasas implicadas en la biosíntesis del ergostyrol.

- 25 Preferentemente, el término "condiciones anóxicas" se refiere a 5 a 90 %, más preferentemente 5 a 80 %, aún más preferentemente 5 a 60 % y más preferentemente 5 a 40 % de la saturación de oxígeno que estaría presente en el caldo de fermentación bajo presión parcial de oxígeno atmosférico a la temperatura dada sin consumo de oxígeno.

Producción durante la fase estacionaria de crecimiento

- 30 Se ha encontrado sorprendentemente en el estudio subyacente a la presente invención que la producción de ácido o-aminobenzoico por la levadura no está acoplada al crecimiento. Por lo tanto, en una realización preferida del procedimiento de la presente invención una cantidad considerable del ácido o-aminobenzoico producido en el paso a) del procedimiento se produce durante la fase estacionaria de crecimiento. Esta característica de la levadura se utiliza preferentemente en fermentaciones por lotes o alimentadas por lotes, que pueden adaptarse para durar durante la fase estacionaria de crecimiento de las células. Además, la capacidad de la levadura para producir ácido o-aminobenzoico durante la fase estacionaria de crecimiento permite reciclar las células de levadura separadas de la fermentación para fermentaciones posteriores. Generalmente, la disociación del crecimiento de la biomasa y la formación del producto en las células de levadura conduce a una utilización más económica del sustrato porque se consume menos sustrato para la acumulación de biomasa y, por tanto, una mayor proporción se canaliza hacia la producción de ácido o-aminobenzoico.

- 45 El término "fase estacionaria de crecimiento" al que se hace referencia en la presente solicitud es una fase durante el cultivo caracterizada por una estabilidad en la biomasa, es decir, ni aumento ni disminución de la biomasa, que puede ser desencadenada por las condiciones de fermentación o se basa en límites de capacidad de nutriente(s) y/o espacio. Está precedida por una fase de crecimiento. Preferentemente, la biomasa durante la fase estacionaria de crecimiento no cambia por proliferación o muerte celular en más de un 30 %, más preferentemente no más de un 20 % y más preferentemente no más de un 10 % cada 5 horas.

pH del procedimiento

- 50 La levadura es capaz de crecer a valores de pH inferiores a 7,0. Por lo tanto, el paso a) del procedimiento se realiza a un pH ácido, es decir, a un pH inferior a 7,0. Se prefiere realizar el paso a) del procedimiento al pH más bajo posible que esté cerca del punto isoeléctrico del ácido aminobenzoico y que aún permita el crecimiento de las células de levadura o al menos la producción de o-aminobenzoico durante la fase estacionaria de crecimiento. Dado que la proporción de ácido o-aminobenzoico que está presente en la forma neutra protonada aumenta con la disminución del pH, la solubilidad del ácido o-aminobenzoico disminuye con el pH con un mínimo de solubilidad en el punto isoeléctrico del ácido o-aminobenzoico. Una menor concentración de ácido o-aminobenzoico disuelto en el caldo de fermentación significa una menor toxicidad para las células de levadura. Además, una mayor proporción de ácido o-aminobenzoico neutro protonado con baja solubilidad en agua facilita su separación del caldo de fermentación en el paso b) del procedimiento.

- El valor de pH durante el paso a) del procedimiento oscila preferentemente entre 2,0 y 6,0, aún más preferentemente entre 2,5 y 5,5, aún más preferentemente entre 3,0 y 5,5 y lo más preferentemente entre 3,5 y 4,0.

- 65 En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, se añaden cristales de ácido o-aminobenzoico al caldo de fermentación como semillas de cristal para facilitar la cristalización. Preferentemente, los cristales se

añaden en la última mitad, el último tercio o el último cuarto de una fermentación por lotes. También es preferible que los cristales se añadan en la última mitad, el último tercio o el último cuarto de una fermentación por lotes alimentada. Los cristales de ácido o-aminobenzoico pueden obtenerse de proveedores comerciales o pueden ser producto de una producción anterior del procedimiento de la presente invención.

5

Separación del ácido o-aminobenzoico del caldo de fermentación

En el paso b) del procedimiento puede utilizarse cualquier procedimiento para la separación de partículas sólidas de una fase líquida. Los procedimientos preferidos son la filtración, la decantación, los hidrociclones y la centrifugación. Dado que el ácido o-aminobenzoico protonado es más soluble en disolventes orgánicos tales como dodecanol, undecilamina, dicitclohexilamina, 2,6-dietilanilina, octiléster de ácido butánico, dodeciléster de ácido acético, dimetilftalato, bencilhexiléter, dietilelglicol di-n-butiléter que, en agua, la extracción del ácido o-aminobenzoico con uno o más de los disolventes mencionados es otra realización preferida del paso b) del procedimiento.

10

Dado que la solubilidad del ácido o-aminobenzoico en agua disminuye con el pH, se prefiere realizar la separación a un pH inferior a 7,0. Preferentemente, en el paso b) del procedimiento el pH es inferior a 6,0, más preferentemente inferior a 5,0 y más preferentemente entre 3,4 y 4,0. Si se disminuye el valor del pH antes o durante el paso b) del procedimiento, se prefiere el uso de ácidos minerales fuertes tales como HCl o H₃PO₄. Como muestra la Figura 7, la solubilidad del ácido ortoaminobenzoico (oAB) en agua es especialmente baja en el intervalo entre pH 3,0 y pH 4,0. De ahí que también se prefiera esta gama.

15

20

El caldo de fermentación puede acidificarse en cualquier momento antes o durante el paso de separación b). Sin embargo, debido a la tolerancia ácida inherente de las células de levadura, se prefiere realizar el procedimiento de fermentación completo, incluyendo los pasos a) y b) del procedimiento, a un pH comprendido entre 3,0 y 5,0, más preferentemente entre 3,0 y 4,0, y más preferentemente entre 3,4 y 4,0.

25

En una realización preferida de la invención, el pH se estabiliza en el intervalo definido anteriormente mediante la adición subestequiométrica de un tampón alcalino. En una realización más preferida, el pH se estabiliza en el intervalo definido anteriormente sin utilizar un sistema tampón.

30

Si la fermentación en el paso a) del procedimiento se realiza a un pH entre 3,0 y 4,0, se prefiere que el paso b) del procedimiento se realice al mismo pH sin acidificación adicional porque la solubilidad del ácido o-aminobenzoico en agua en este intervalo de pH es suficientemente baja.

35

En el caldo de fermentación están presentes dos tipos de partículas: cristales de ácido o-aminobenzoico y células de levadura.

En una realización preferida, el ácido o-aminobenzoico cristalizado se separa del caldo de fermentación sin separar las células de levadura del caldo de fermentación. Preferentemente, esto se consigue mediante procedimientos que utilizan la diferente densidad de las células de levadura y el ácido o-aminobenzoico cristalizado. La velocidad de rotación del agitador en el recipiente de fermentación puede ajustarse de modo que sólo las células de levadura se mantengan en suspensión, mientras que el oAB cristalizado, que tiene una densidad superior a la de las células de levadura, se deposita en el fondo del recipiente de fermentación. A continuación, el oAB sólido sedimentado puede retirarse y seguir procesándose, por ejemplo, mediante filtración y secado. De este modo, la separación de oAB de las células de levadura y del caldo de fermentación puede realizarse sin retirar el caldo de fermentación del recipiente de fermentación.

40

45

La densidad de la levadura es del orden de 1,08-1,1 g/cm³ según el ciclo celular. La densidad de oAB a granel es de 1,41g/cm³. El tamaño de las partículas también es un parámetro influyente. Las células de levadura tienen una distribución de tamaños que corresponde a una longitud característica inferior a 10 micrómetros. En la bibliografía (P. Jorgensen et al. Science 297: 395, 2002).

50

Las diferencias de tamaño y densidad conducen a diferencias en la velocidad de sedimentación/flotación, como puede representarse para el caso simplificado de la ley de Stokes mediante la siguiente ecuación:

55

$$v_s = \frac{g(\rho_s - \rho_l)d_p^2}{18 \mu}$$

Ecuación 1

- v_s la velocidad de sedimentación
- g aceleración de la gravedad
- μ viscosidad del medio líquido
- ρ_s densidad sólida

60

ρ_l densidad del líquido
 d_p diámetro de la partícula

5 Para un sistema agitado, la velocidad de rotación mínima para suspender una partícula también depende del tamaño y de la densidad de la partícula, como se representa con la ecuación de Zwietering; de acuerdo con la cual la relación entre la velocidad de rotación para suspender dos partículas con densidades y tamaños diferentes puede representarse como en

$$\frac{rps_c}{rps_y} = \left[\frac{\rho_c - \rho_l}{\rho_y - \rho_l} \right]^{0,45} \left(\frac{d_{pc}}{d_{py}} \right)^{0,2}$$

Ecuación 2

10 rps_c la velocidad crítica de rotación de los cristales
 rps_y la velocidad de rotación crítica para la levadura
 ρ_c densidad de los cristales
 ρ_y densidad de la levadura
 15 ρ_l densidad del líquido
 d_{pc} diámetro de los cristales
 d_{py} diámetro de la levadura

20 Un procedimiento preferido para separar oAB del caldo de fermentación en el paso b) del procedimiento se basa en estos fenómenos. En la Figura 3 se muestra una representación esquemática de esta realización. A los cristales nacientes de oAB en el fermentador se les da tiempo suficiente para que crezcan por encima de un tamaño determinado, preferentemente por encima de 100 micrómetros, más preferentemente por encima de 500 micrómetros. El tamaño se selecciona definiendo el radio de corte del filtro utilizado en la filtración F aguas abajo del fermentador. Alcanzar tales tamaños facilita (i) su separación de las células y (ii) la deshidratación de oAB para su posterior procesamiento.

25 El filtrado puede reciclarse al recipiente de fermentación, para permitir un mayor tiempo de residencia e introducir un efecto de elutriación. La velocidad de rotación del agitador se ajusta de modo que esté por encima de la velocidad mínima para mantener suspendidas las células de levadura y por debajo de la velocidad mínima para mantener suspendidos los cristales con el tamaño de corte seleccionado. Las relaciones de velocidades mínimas de suspensión para diversas combinaciones de tamaño y densidad figuran en la Tabla 1, que muestra que existe una amplia gama de velocidades de rotación para satisfacer este criterio.

Tabla 1

ρ_c	1410	kg/m ³	
ρ_y	1080	kg/m ³	
d_{py} micrómetros	d_{pc} micrómetros	ρ_l Kg/m ³	relaciones de velocidades mínimas de suspensión rps_c/rps_y
5	100	1000	4
40	100	1010	3
5	500	1020	6
40	500	1030	4
5	200	1040	6
40	200	1050	4

35 Este procedimiento de recuperación puede realizarse en paralelo con la fermentación o en un paso de recolección posterior a la fermentación. En una realización preferida de la presente invención, dicho paso de recolección se lleva a cabo a valores de pH más bajos, preferentemente por debajo de 5,0, más preferentemente entre pH 3,0 y 4,0, más preferentemente entre pH 3,4 y 4,0 para maximizar la recuperación de cristales de oAB. La fermentación y la recolección pueden realizarse de forma continua, semilenta o discontinua. En una realización especialmente preferida de la invención, el procedimiento de separación descrito anteriormente se utiliza en combinación con un modo de fermentación continua.

45 Si la fermentación se realiza como un procedimiento por lotes o por lotes alimentados, se prefiere aislar el oAB sólido formado durante el procedimiento de fermentación como se ha descrito anteriormente y aislar el oAB soluble restante en el caldo de fermentación al final de la fermentación mediante adsorción y desorción como se describe más adelante en esta solicitud.

En otra realización preferida de la presente invención, tanto el ácido o-aminobenzoico como las células de levadura se separan del caldo de fermentación en un solo paso o en dos pasos separados. Si las células de levadura y el ácido o-aminobenzoico se separan del caldo de fermentación en un paso, es preferible añadir al procedimiento un paso adicional de separación del ácido o-aminobenzoico de las células de levadura. En esta realización, la separación se lleva a cabo fuera del recipiente de fermentación, es decir, el caldo de fermentación que contiene células de levadura y oAB se extrae del recipiente de fermentación y se somete a separación de oAB de las células de levadura y de los constituyentes líquidos del caldo de fermentación.

Para ello puede implementarse cualquier operación unitaria basada en las diferencias de movimiento de las partículas en el flujo, en el campo gravitatorio o centrífugo. Por ejemplo, las balsas de decantación, las centrifugadoras, los hidrociclones, etc. La filtración también puede diseñarse, como por ejemplo en Perry's Chemical Engineers' Handbook, octava edición

La Figura 4 representa esquemáticamente el procedimiento. El caldo de fermentación que contiene células de levadura y oAB se retira del procedimiento de fermentación B y se somete a una separación D que emplea al menos uno de los medios descritos anteriormente. Para recuperar más oAB disuelto en el caldo de fermentación y que no puede separarse por los medios y procedimientos descritos, el caldo de fermentación puede someterse a otro paso de adsorción y desorción E. Alternativamente, el caldo de fermentación resultante de la separación D puede devolverse al recipiente de fermentación.

Incluso en el mínimo de solubilidad del oAB a un pH comprendido entre pH 3,0 y pH 4,0, aproximadamente 5 g/l de oAB permanecen disueltos en el caldo de fermentación. El oAB sólido sólo se forma en presencia de concentraciones más elevadas de oAB. Así pues, los procedimientos de separación sólido/líquido no pueden utilizarse para recuperar oAB en concentraciones inferiores a 5,0 g/l, lo que conlleva una pérdida potencial de oAB en el caldo de fermentación desechado. Para recuperar el oAB disuelto, la adsorción a una fase sólida adecuada seguida de desorción es un procedimiento de aislamiento que puede utilizarse solo o en combinación con otros procedimientos en diversas realizaciones de la presente invención.

En cualquier realización del paso b) del procedimiento que dé lugar a la separación de las células de levadura del caldo de fermentación por separación líquido/sólido o sólido/sólido/líquido, se prefiere devolver al menos una parte de las células de levadura separadas al caldo de fermentación original o añadirlas a caldo de fermentación fresco. Dado que las células de levadura son capaces de producir o-aminobenzoico desacoplado del crecimiento de la biomasa, las células de levadura existentes pueden utilizarse en fermentaciones posteriores sin necesidad de gastar sustrato para la producción de nueva biomasa.

En otra realización preferida del paso b) del procedimiento de la presente invención, la separación de oAB de las células de levadura y del caldo de fermentación en el paso b) del procedimiento se realiza mediante extracción con un disolvente adecuado. Este procedimiento también se denomina extracción líquida de oAB.

Los disolventes adecuados son aquellos que no son solubles en agua, tienen una gran diferencia de densidad con el agua y tienen un punto de fusión por debajo de 25 °C. Preferentemente, un disolvente adecuado tiene además un punto de ebullición superior al de la anilina. Los disolventes preferidos son el dodecanol, la undecilamina, la dicitlohexilamina, la 2,6-dietilamina, el octiléster del ácido butánico, el dodeciléster del ácido acético, el éter hexílico de bencilo, el dietilenglicol, el éter di-n-butílico. Se prefiere especialmente el dodecanol.

En una realización preferida del procedimiento de extracción, la extracción se realiza añadiendo el disolvente al recipiente de fermentación. El disolvente puede añadirse y retirarse continuamente del recipiente de fermentación para que siempre haya una cantidad constante de disolvente. Dado que el disolvente que transporta los oAB disueltos se sustituye continuamente por disolvente fresco, el disolvente presente en el recipiente de fermentación nunca se satura de oAB, lo que mantiene bajos los niveles de oAB en la fase acuosa. Esto mitiga el problema de la toxicidad del oAB para las células de levadura. Sin embargo, las células de levadura deben ser capaces de tolerar el disolvente utilizado. Esta realización es especialmente adecuada para un procedimiento de fermentación continua.

Este procedimiento se representa esquemáticamente en la Figura 5. El oAB que lleva disolvente se retira de la fermentación B a través de la corriente 19 y se somete a descarboxilación G. Opcionalmente, en un procedimiento continuo o por lotes alimentados, el caldo de fermentación sin disolvente se retira de la fermentación a través de la corriente 7 y se somete a separación líquido/sólido para obtener caldo de fermentación puro. Dicho caldo de fermentación puro se somete preferentemente a adsorción y desorción E para recuperar el oAB que permanece disuelto en la fase acuosa.

En otra realización preferida del procedimiento de extracción, el disolvente se añade al caldo de fermentación que se ha retirado del recipiente de fermentación. Las células de levadura pueden retirarse del caldo de fermentación antes de añadir el disolvente. Sin embargo, es igualmente preferible realizar la extracción líquida de oAB con el caldo de fermentación que incluye las células de levadura.

En la Figura 6 se representa esquemáticamente una realización preferida de este procedimiento. El caldo de

5 fermentación que contiene células de levadura y oAB se retira de la fermentación B. La biomasa (corriente 17) se separa de la fase líquida y la fase líquida se somete a extracción líquida L. La fase acuosa resultante de la extracción líquida, es decir, el caldo de fermentación sin células y con una cantidad residual de oAB disuelta, se somete preferentemente a adsorción y desorción E para recuperar el oAB residual. Cabe señalar que la separación de la biomasa D también puede omitirse, de modo que todo el caldo de fermentación se someta a extracción líquida.

El uso de levaduras en lugar de bacterias aerobias para la producción de ácido o-aminobenzoico a partir de sustratos fermentables tiene varias ventajas:

10 (i) La levadura sobrevive e incluso prolifera en condiciones anóxicas. Así, la disminución de las concentraciones de oxígeno durante el procedimiento de fermentación no disminuye el rendimiento del producto, por lo que pueden omitirse o reducirse los medios de aireación del caldo de fermentación. Esto reduce el coste y la complejidad del recipiente de fermentación.

15 (ii) La levadura sobrevive e incluso prolifera en condiciones ácidas. Esto disminuye la solubilidad del ácido o-aminobenzoico en el agua, por lo que las células están expuestas a concentraciones más bajas de ácido o-aminobenzoico disuelto que a pH neutro. Esto mitiga el problema de la toxicidad del producto. Además, la cantidad de base que hay que añadir para mantener estable el pH del caldo de fermentación es menor, lo que disminuye la cantidad de sal producida en el procedimiento.

20 (iii) Si el procedimiento se realiza a pH ácido, lo que sólo es posible con levadura, se facilita el paso de separación b). Dado que la solubilidad del ácido o-aminobenzoico disminuye con el pH, debe añadirse menos ácido, o incluso ninguno, antes del paso b) del procedimiento, disminuyendo así aún más la cantidad de sal producida por el procedimiento. Además, si se alcanzan concentraciones suficientes de producto, se forma ácido o-aminobenzoico cristalizado durante el paso de fermentación a) y puede eliminarse del caldo de fermentación mientras continúa el paso de fermentación a). Esto permite la integración de fermentaciones basadas en levaduras en varios conceptos de procedimiento ventajosos que se describen más adelante en esta aplicación.

25 (iv) Se ha descubierto sorprendentemente que la formación de ácido o-aminobenzoico por la levadura no está acoplada al crecimiento de la biomasa y, por lo tanto, continúa con tasas aceptables durante la fase estacionaria de crecimiento. Los conceptos de procedimiento que implican el uso de células de levadura durante la fase de crecimiento estacionario tienen la ventaja de que una menor proporción del sustrato fermentable se desvía al crecimiento de la biomasa en comparación con los conceptos de procedimiento que utilizan células sólo en la fase de crecimiento exponencial. Esta es una ventaja particular del procedimiento de la presente invención sobre los procedimientos basados en bacterias conocidos en la técnica anterior.

35 En una realización preferida, la presente invención se refiere a la transformación posterior del ácido o-aminobenzoico producido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en anilina. Así, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir ácido o-aminobenzoico o anilina, en el que el ácido o-aminobenzoico se produce como se ha expuesto anteriormente en esta solicitud y la conversión del ácido o-aminobenzoico en anilina se lleva a cabo mediante los pasos adicionales del procedimiento que se definen a continuación.

40 Preferentemente, el ácido o-aminobenzoico se convierte en anilina por procedimientos puramente químicos, es decir, sin utilizar microorganismos o enzimas como catalizadores. Un procedimiento químico preferido es la descarboxilación térmica del ácido o-aminobenzoico.

45 La descarboxilación térmica se realiza preferentemente en presencia de un catalizador. Un catalizador es un catalizador de zeolita, en el que dicho catalizador de zeolita es preferentemente zeolita H-Y (por ejemplo, la obtenida de Zeolyst International, número de catálogo CBV600). La zeolita catalizadora ácida H-Y ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ puede estar comprendido entre 5 y 7, preferentemente es 5,5) posee un carácter ácido especialmente elevado y tiene un tamaño de poro más amplio (0,7-0,8 nm) que, por ejemplo, ZSM5-27 (por ejemplo, tal como se obtiene de Clariant SuedChemie, número de catálogo MFI-27, $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 27$), que también posee un fuerte carácter ácido, pero que tiene un tamaño de poro más pequeño (0,5 nm), de modo que las moléculas de ácido o-aminobenzoico no pueden penetrar eficazmente en ellos y, en consecuencia, no tienen fácil acceso a los sitios activos del catalizador ácido, lo que reduce su eficacia.

55 Preferentemente, la descarboxilación térmica se realiza en un disolvente orgánico. El ácido O-aminobenzoico, por ejemplo, en forma de cristales, con o sin humedad residual, se descarboxila térmicamente, preferentemente alimentando el ácido a un reactor de descarboxilación. La descarboxilación térmica puede realizarse a una temperatura entre 150 °C y 250 °C, preferentemente entre 160 °C y 220 °C, más preferentemente entre 180 °C y 200 °C. La descarboxilación térmica puede realizarse durante el tiempo suficiente para que el ácido o-aminobenzoico reaccione con la anilina. Preferentemente, la descarboxilación térmica se realiza durante 0,5 horas a 3 horas.

60 La descarboxilación térmica puede realizarse en presencia de un catalizador ácido para acelerar la descarboxilación térmica.

65 La descarboxilación térmica puede realizarse en un disolvente tal como agua, anilina, o en 1-dodecanol, preferentemente en 1-dodecanol, o en una mezcla de 1-dodecanol y anilina.

Además, la descarboxilación térmica puede realizarse en un reactor, en el que la presión en el reactor puede seleccionarse en función de la cantidad de fase líquida que se permite evaporar durante la reacción y salir del reactor con el dióxido de carbono (CO₂) que es un producto de la descarboxilación.

5 En otra realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la descarboxilación térmica va seguida de otro paso de purificación de la anilina, preferentemente por destilación.

En otra realización, la presente invención se refiere a una célula de levadura recombinante que comprende una modificación de la actividad de la antranilato fosforribosiltransferasa que disminuye dicha actividad enzimática.

10 Las especies de levadura preferidas para el procedimiento de la presente invención son *Ashbya gossypii*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Lo más preferible es que la levadura sea *Saccharomyces cerevisiae*.

15 El término actividad antranilato fosforribosiltransferasa se refiere a una actividad enzimática que cataliza la conversión de o-aminobenzoato en N-(5-fosfo-D-ribosil)-antranilato. En una realización preferida de la presente invención, la actividad antranilato fosforribosiltransferasa está mediada por Trp4 (YDR354W).

20 La disminución descrita anteriormente de la actividad de la antranilato fosforribosiltransferasa puede lograrse de tres maneras principales: (i) La regulación de la expresión del gen *trp4* en la levadura puede modificarse de modo que la transcripción del gen disminuya o desaparezca. (ii) La secuencia de ácido nucleico del gen *trp4* puede modificarse para que la enzima codificada por el gen modificado tenga una actividad específica menor. (iii) El gen *trp4* puede sustituirse por un gen derivado de un organismo distinto de la levadura y que tenga una actividad antranilato fosforribosiltransferasa específica inferior a la de Trp4.

25 En una realización especialmente preferida de la presente invención, la célula de levadura no tiene actividad residual de antranilato fosforribosiltransferasa. Preferentemente, esto se consigue aboliendo la expresión del gen *trp4* en la célula de levadura o modificando la secuencia de ácido nucleico del gen *trp4* de tal manera que resulte una proteína sin actividad antranilato fosforribosiltransferasa. Una cepa resultante de tal modificación también se conoce en la técnica como "cepa desactivada". Obviamente, tal cepa es auxotrófica para el L-triptófano.

30 La célula de levadura recombinante puede incluir otras modificaciones genéticas que aumenten la disponibilidad de precursores para la síntesis del ácido o-aminobenzoico.

35 En otra realización, la presente invención se refiere al uso de la célula de levadura recombinante para producir ácido o-aminobenzoico a partir de al menos un sustrato fermentable.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, la célula de levadura recombinante se utiliza en el procedimiento descrito anteriormente.

40 **Breve descripción de las cifras**

Figura 1: Resultados de una fermentación por lotes alimentada aeróbicamente con levadura como la descrita en el ejemplo 1.

Figura 2: Resultados de una fermentación anaeróbica por lotes con levadura como la descrita en el ejemplo 1.

Figura 3: Representación esquemática de la separación de oAB sólido en el recipiente de fermentación. A: esterilización; B: fermentación; C: compresión de aire; D: separación de biomasa; E1 y E2: adsorción y desorción; F: filtración; G: descarboxilación; H: destilación; I: filtración; J: cristalización.

50 1: fuente de carbono (por ejemplo, azúcar); 2: fuentes de nitrógeno (por ejemplo, NH₃); 3: solución tampón (por ejemplo, NaOH); 4: aire; 5A y 5B: puntos de alimentación de HCl, pueden utilizarse alternativamente o combinados; 6: aire de escape; 7: suspensión de biomasa; 8: suspensión de cristales de OAB; 9: eluyente, por ejemplo, NaOH diluido; 10: HCl; 11: aguas residuales; 12: aguas residuales; 13: CO₂; 14: residuo; 15: residuo; 16: producto de anilina; 17: biomasa

Figura 4: Representación esquemática de la separación de oAB sólido del caldo de fermentación fuera del recipiente de fermentación. A: esterilización; B: fermentación; C: compresión de aire; D: separación sólido/sólido/líquido; E1 y E2: adsorción y desorción; F: filtración; G: descarboxilación; H: destilación; I: filtración; J: cristalización.

60 1: fuente de carbono (por ejemplo, azúcar); 2: fuentes de nitrógeno (por ejemplo, NH₃); 3: solución tampón (por ejemplo, NaOH); 4: aire; 5 A y 5B y 5C: puntos de alimentación de HCl, pueden utilizarse alternativamente o combinados; 6: aire de escape; 7: caldo de fermentación (biomasa, agua, oAB); 8: suspensión de cristales de oAB; 9: eluyente, por ejemplo, NaOH diluido; 10: HCl; 11: aguas residuales; 12: aguas residuales; 13: CO₂; 14: residuo; 15: residuo; 16: producto de anilina; 17: biomasa

65

Figura 5: Representación esquemática de la extracción líquida de oAB realizada en el interior del recipiente de fermentación. A: esterilización; B: fermentación; C: compresión de aire; D: separación de biomasa; E1 y E2: adsorción y desorción; G: descarboxilación; H: destilación; I: filtración; J: cristalización.

1: fuente de carbono (por ejemplo, azúcar); 2: fuentes de nitrógeno (por ejemplo, NH_3); 3: solución tampón (por ejemplo, NaOH); 4: aire; 5A y 5B: puntos de alimentación para HCl, pueden utilizarse alternativamente o combinados; 6: aire de escape; 7: suspensión de biomasa; 9: eluyente, por ejemplo, NaOH diluido; 10: HCl; 11: aguas residuales; 12: aguas residuales; 13: CO_2 ; 16: producto de anilina; 17: biomasa; 18: disolvente; 19: solución oAB en disolvente para alimentar la reacción; 20: purga de disolvente; 21: reposición de disolvente.

Figura 6: Representación esquemática de la extracción líquida de oAB realizada fuera del recipiente de fermentación. A: esterilización; B: fermentación; C: compresión de aire; D: separación de biomasa; E1 y E2: adsorción y desorción; G: descarboxilación; H: destilación; I: filtración; J: cristalización; L: extracción de líquidos.

1: fuente de carbono (por ejemplo, azúcar); 2: fuentes de nitrógeno (por ejemplo, NH_3); 3: solución tampón (por ejemplo, NaOH); 4: aire; 5A y 5B y 5C y 5D y 5E: puntos de alimentación para HCl, pueden utilizarse alternativamente o combinados; 6: aire de escape; 7: caldo de fermentación (biomasa, agua, oAB); 9: eluyente, por ejemplo, NaOH diluido; 10: HCl; 11: aguas residuales; 12: aguas residuales; 13: CO_2 ; 16: producto de anilina; 17: biomasa; 18: alimentación de disolvente al extractor; 19: solución de oAB en disolvente para alimentar la reacción; 20: purga de disolvente; 21: reposición de disolvente

Figura 7: Diagrama que muestra la solubilidad de la oAB en el agua en función del pH. Se observa que la solubilidad alcanza su mínimo entre pH 3 y pH 4.

Los siguientes ejemplos sólo pretenden ilustrar la invención. No limitarán en modo alguno el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1 (inventivo): Producción de ácido o-aminobenzoico con levadura

Cepas, medios y condiciones de crecimiento.

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* TRP4 desactivada se adquirió a GE Healthcare Dharmacon Inc. Si no se indica lo contrario, todos los productos químicos se adquirieron a Sigma-Aldrich (Sternheim). *Saccharomyces cerevisiae* se cultivó en condiciones estériles a 30 °C en caldo YPD (peptona bacteriológica, 20 g/L, extracto de levadura, 10 g/L, glucosa, 20 g/L) suplementado con G418 (200 µg/mL) o en Base Nitrogenada de Levadura (YNB) definida sin Medio Mineral de Aminoácidos (sulfato de amonio, 5,0 g/L, biotina, 2,0 µg/L, pantotenato de calcio, 400 µg/L, ácido fólico, 2,0 µg/L, inositol, 2,0 mg/L, ácido nicotínico, 400 µg/L, p-aminobenzoico ácido, 200 µg/L, piridoxina HCl, 400 µg/L, riboflavina, 200 µg/L, tiamina HCl, 400 µg/L, ácido cítrico, 0,1 g/L, ácido bórico, 500 µg/L, sulfato de cobre, 40 µg/L, yoduro de potasio, 100 µg/L, cloruro férrico, 200 µg/L, sulfato de magnesio, 400 µg/L, molibdato de sodio, 200 µg/L, sulfato de zinc, 400 µg/L, fosfato monobásico de potasio, 1,0 g/L, sulfato de magnesio, 0,5 g/L, cloruro de sodio, 0,1 g/L, cloruro de calcio, 0,1 g/L) suplementado con suplementos de medio de abandono sintético de levadura sin triptófano (adenina, 18 mg/L, mioinositol, 76 mg/L, ácido p-aminobenzoico, 8 mg/L, uracilo, 76 mg/L, L-leucina, 380 mg/L, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-cisteína, L-histidina, L-isoleucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina, L-valina, 76 mg/L, cada uno), G418 (200 µg/ml), α-D-glucosa (20 g/L) y cantidades límite de L-triptófano (5 mg/L para condiciones aeróbicas y 1,5 mg/L para condiciones anaeróbicas, respectivamente). La cepa se caracterizó en fermentadores (alimentación)-lote (OmniFerm, HiTec Zang, Herzogenrath, Alemania) con un volumen de cultivo de 1 L. Los precultivos se inocularon a partir de un caldo de glicerol [15 % (v/v) de glicerol] almacenado a -80 °C. El tren de siembra comprende un cultivo YPD de 3 ml en un tubo de ensayo a agitación constante a 200 rpm durante 12 h (precultivo I), un cultivo YPD de 50 ml en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml en un agitador rotatorio a agitación constante a 200 rpm durante 8 h (precultivo II) y un cultivo YNB de 50 ml en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml en un agitador rotatorio a agitación constante a 200 rpm durante 12 h (precultivo III). El precultivo II se inoculó transfiriendo 1 ml del precultivo I al medio YPD estéril fresco del precultivo II. El precultivo III se inoculó hasta una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 1 transfiriendo una cantidad adecuada de células a un tubo de centrifuga cónico estéril. Tras la centrifugación ($1.500 \times g$, 5 min, RT), las células se suspendieron en 1 ml de solución salina estéril (9 g/L de cloruro sódico) y se transfirieron al medio YNB estéril del precultivo III. El procedimiento para inocular el fermentador a un OD_{600} de 1 a partir del precultivo III fue el mismo que el descrito para la inoculación del precultivo III. Para el cultivo de levaduras en condiciones aeróbicas, la velocidad inicial de agitación se fijó en 500 rpm y se suministró aire a 0,2 L/min. Para las condiciones anaeróbicas se utilizó una velocidad de agitación constante de 300 rpm y se suministró N_2 a 0,2 L/min. Los niveles de oxígeno y dióxido de carbono en los gases de escape de los fermentadores se controlaron continuamente en línea mediante un analizador de gases de escape (HiSense, HiTec Zang, Herzogenrath, Alemania). Para las condiciones aerobias, el oxígeno disuelto se mantuvo en >30 % de saturación de aire mediante el ajuste automático de la velocidad de agitación. Para cada condición se midió el pH (Easyferm Plus VP 225, Hamilton Höchst, Alemania) y se mantuvo a 4,0 mediante la adición automática de 1,0 M $(\text{NH}_4)\text{OH}$ y 1 M HCl. Para cada condición se mantuvo la temperatura a 30 °C. Durante la fermentación se tomaron muestras de 1,5 ml. Para las mediciones de densidad óptica se utilizó un Biofotómetro Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo). Se centrifugó una alícuota de 1 mL de cada muestra durante 5 min a $16.000 \times g$ (5415R; Eppendorf, Hamburgo). La concentración

de glucosa, o-aminobenzoato y etanol en el sobrenadante se determinó con un analizador bioquímico CuBiAn XC (tecnología Optocell), HPLC-DAD (1100; Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.), y GC-FID (7890A Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.), respectivamente.

5 Cromatografía líquida de alta resolución

Se utilizó un sistema HPLC-DAD Agilent serie 1100 [con detector de matriz de diodos; Agilent Technologies, Santa Clara (EE. UU.)] para cuantificar la concentración de o-aminobenzoato en los sobrenadantes de cultivo. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 Luna HPLC-column (4,6 × 250 mm; 3 µm; Phenomenex) a 20 °C con un sistema de disolventes binario consistente en metanol (disolvente B) y agua con un 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (disolvente A). Se aplicaron 10 µl de sobrenadante de cultivo diluido. La separación se logró mediante el siguiente gradiente a un caudal de 0,5 mL/min: 0-1 min, 2 % B; 1-2 min, 2-10 % B; 2-12 min, 10-70 % B; 12-23 min, 70-90 % B; 23-25 min, 90 -98 % B, 25-27 min, 98 % B; 27-27,5 min, 98 %-2 % B; 27,5-30 min, 2 % B. La concentración de o-aminobenzoato se determinó por integración de pico a 254 nm (tiempo de retención: 18,9 min) y comparando con una curva de calibración externa.

Cromatografía de gases

Se utilizó un sistema GC Agilent 7890A [Agilent Technologies, Santa Clara (EE. UU.)] para cuantificar la concentración de etanol en los sobrenadantes de cultivo. Se utilizó una columna Stabiwax-DB (30 m × 0,32 mm, ID 1 µm, Restek). La separación se logró mediante el siguiente programa de horno: 0-3 min, 30 °C; 3-6 min, 40-150 °C; 6-8,4 min, 150-220 °C. Se aplicó 1 µl de sobrenadante de cultivo diluido. El inyector se ajustó a 250 °C con un flujo total de 787,43 mL/min y una relación de división de 100:1, lo que resulta en un flujo de 7,7666 ml/min. Las señales se detectaron mediante FID ajustado a 300 °C.

Resultados y debate

La cepa de levadura desactivada *Saccharomyces cerevisiae* TRP4 produjo 320 mg/L de ácido o-aminobenzoico en condiciones aeróbicas después de 75 h de cultivo según se determinó por HPLC-DAD (254 nm). En condiciones anaerobias produjo 92 mg/L de ácido o-aminobenzoico tras 73 h de cultivo. La producción no parece estar acoplada al crecimiento, ya que se observó una acumulación constante de o-aminobenzoato durante el crecimiento, así como en la fase estacionaria. Asumiendo que un OD₆₀₀ de 1 se correlaciona con un peso seco de 0,45 g/L, la productividad específica del ácido o-aminobenzoico en la fase estacionaria fue de aproximadamente 1,0 y 1,3 mg gDW⁻¹ h⁻¹, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente. Como era de esperar, en condiciones anaeróbicas se produjo una cantidad significativa de etanol, tal y como determinó la GC-FID.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir ácido o-aminobenzoico que comprende los pasos de
 - 5 a) fermentar al menos un sustrato fermentable en un recipiente de fermentación a un pH inferior a 7,0 utilizando una célula de levadura capaz de convertir el al menos un sustrato fermentable en ácido o-aminobenzoico; y
 - b) separar el ácido o-aminobenzoico producido del caldo de fermentación.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la separación del ácido o-aminobenzoico en el paso b) del procedimiento se realiza después de bajar el pH del caldo de fermentación
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la separación del ácido o-aminobenzoico sólido producido en el paso b) del procedimiento se realiza ajustando la velocidad de rotación de un agitador en el recipiente de fermentación.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la separación del ácido o-aminobenzoico sólido producido en el paso b) del procedimiento se realiza por filtración, sedimentación, hidrociclones y centrifugación
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la separación del ácido o-aminobenzoico producido en el paso b) del procedimiento se realiza mediante extracción con un disolvente adecuado
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el ácido o-aminobenzoico se extrae del caldo de fermentación que se ha retirado del recipiente de fermentación.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el disolvente se añade al caldo de fermentación en el recipiente de fermentación.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fermentación en el paso a) del procedimiento se realiza en condiciones anóxicas.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la fermentación en el paso a) del procedimiento se realiza a un pH entre 2,0 y 6,0.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que una parte del ácido o-aminobenzoico se produce durante la fase estacionaria de crecimiento de las células de levadura.

BMS 15.1.158. Países Extranjeros

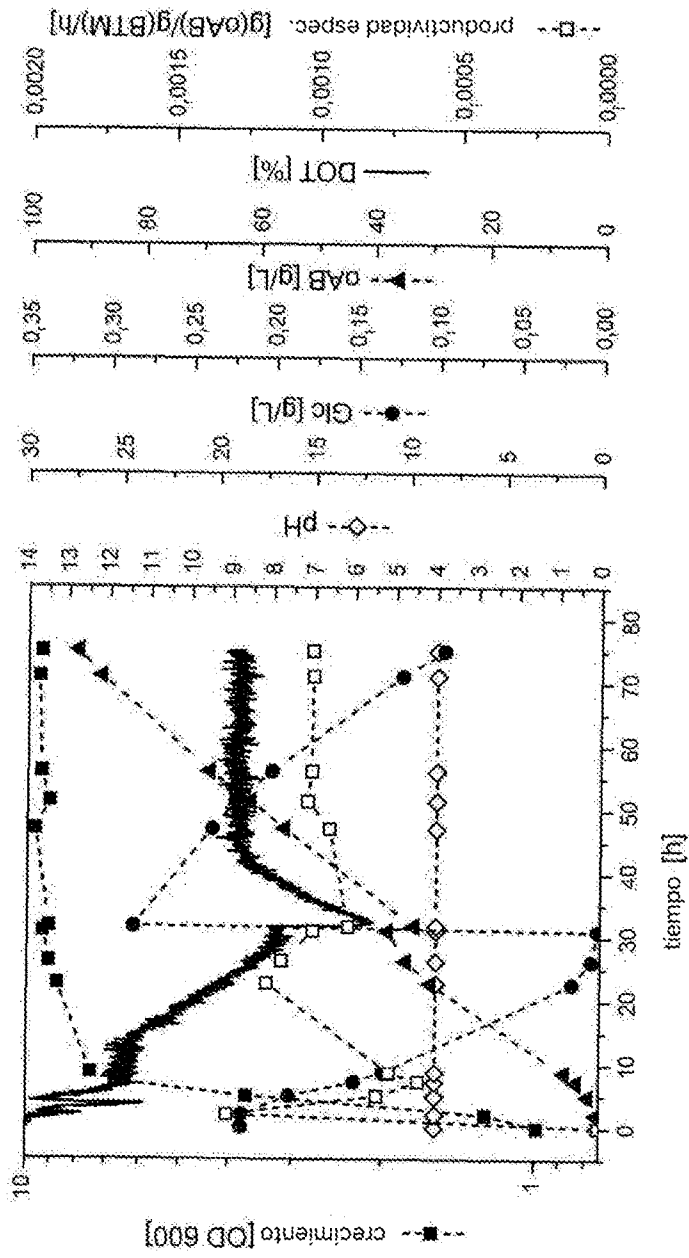


Figura 1/7

BMS 15.1.158. Países Extranjeros

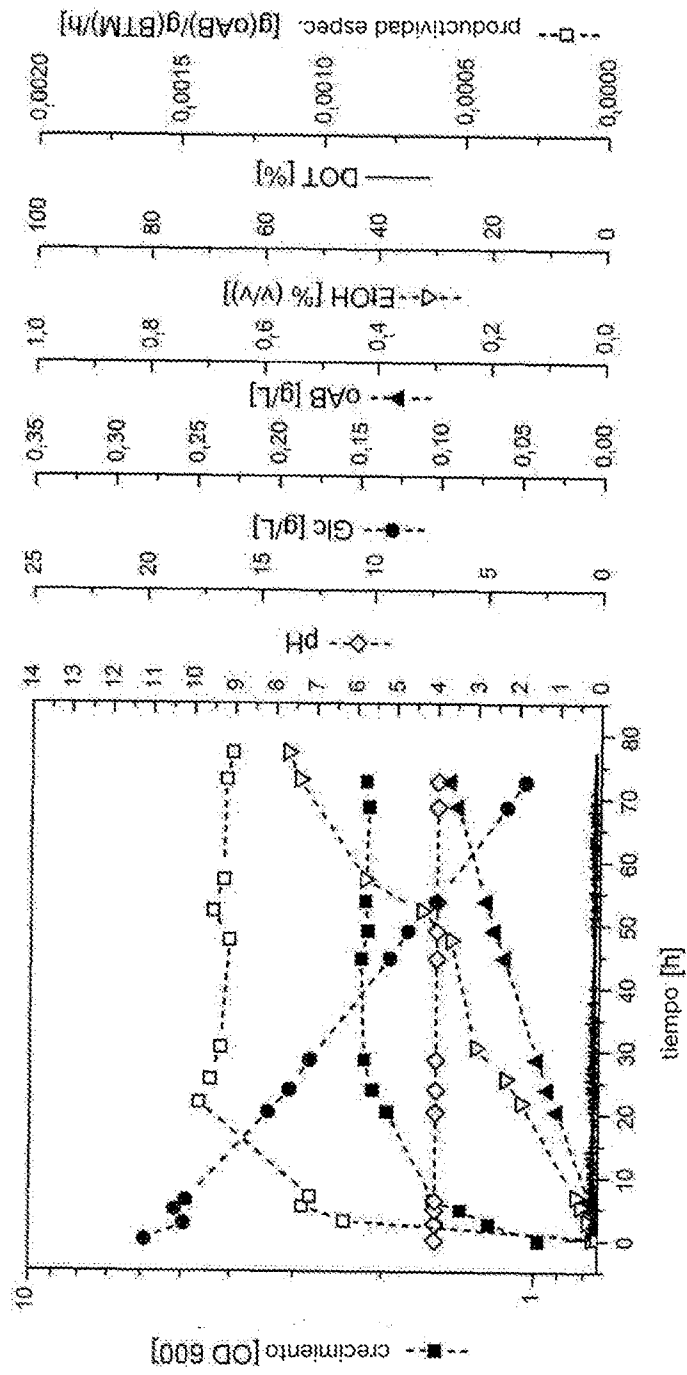


Figura 2/7

BMS 15.1.158- Países Extranjeros

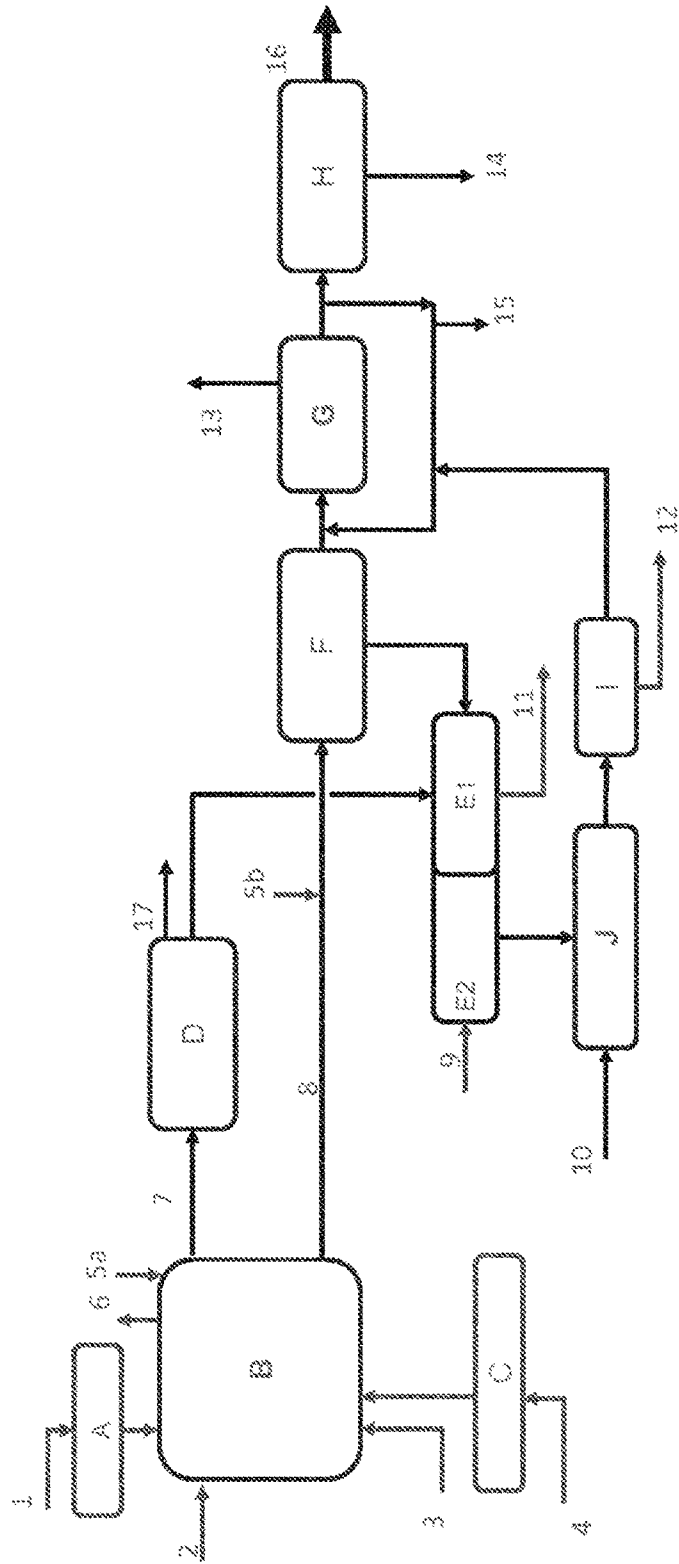


Figura 3/7

BMS 15.1.158. Países Extranjeros

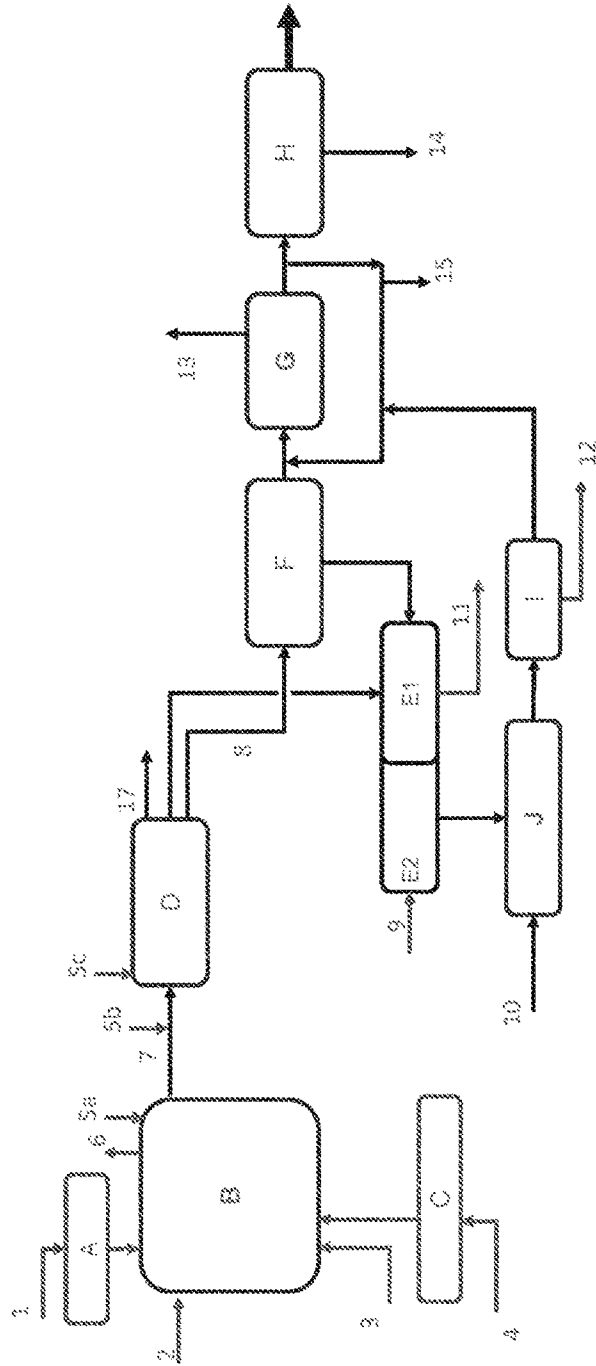


Figura 4/7

BMS 15.1.158. Países Extranjeros

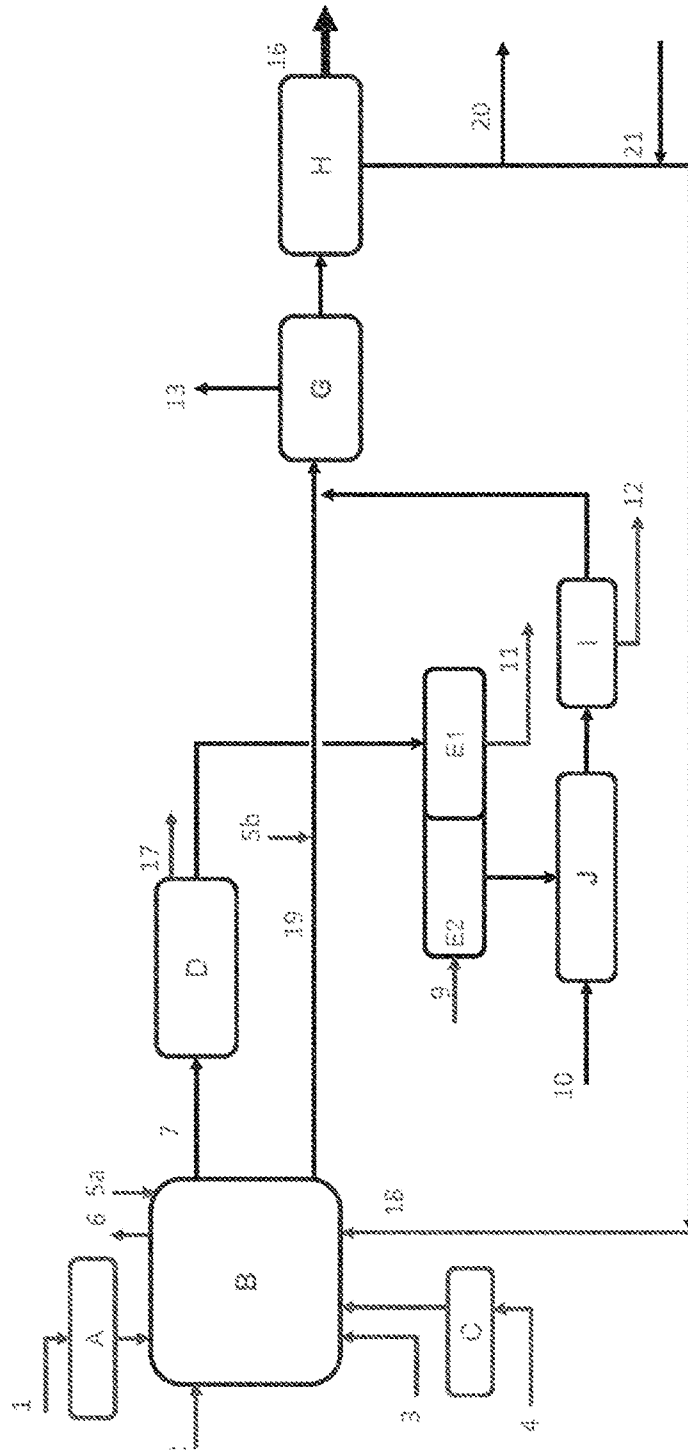


Figura 5/7

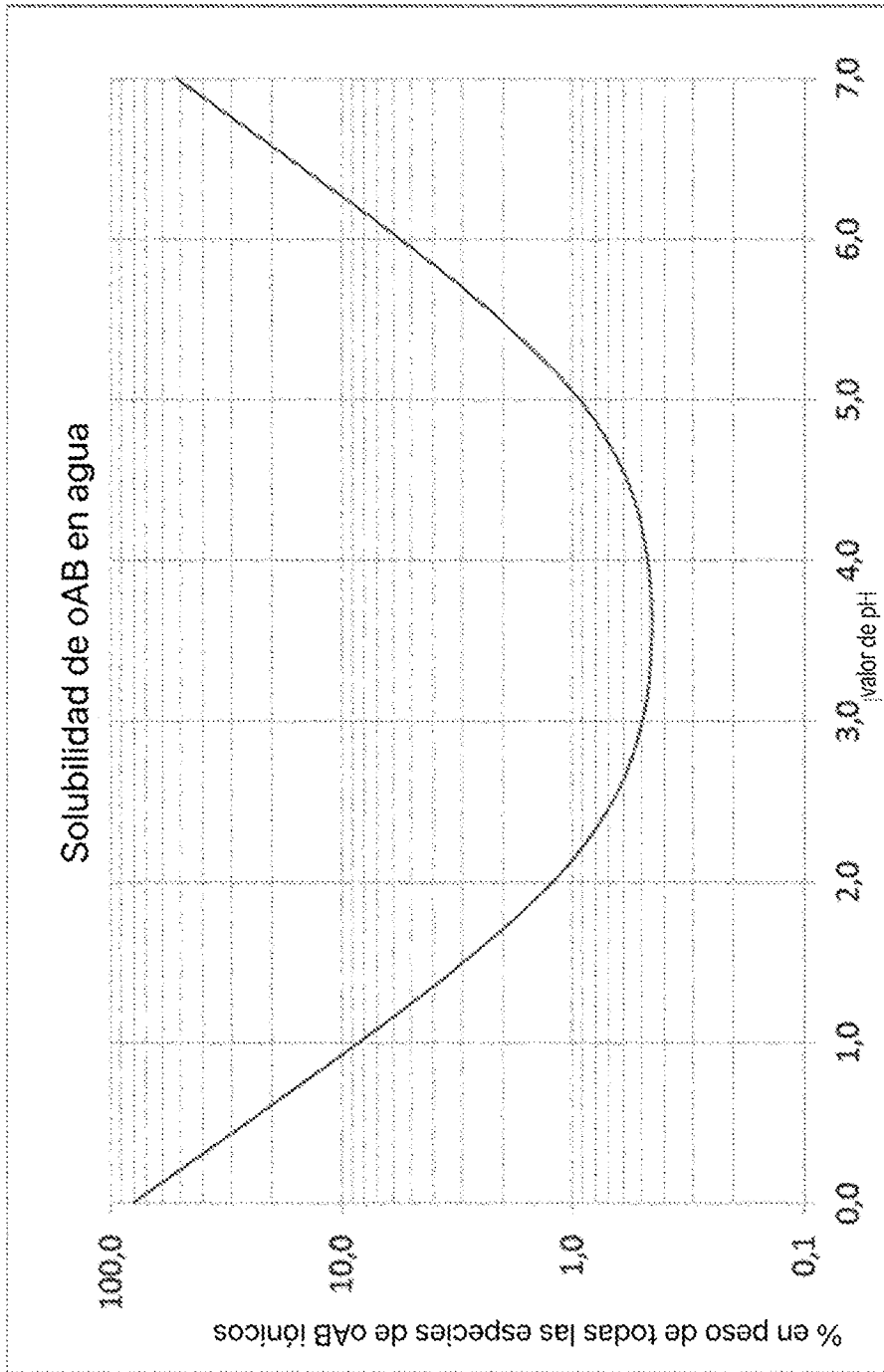


Figura 7/7