



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 304 738**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **06000642 .6**

86 Fecha de presentación : **26.10.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1645638**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Método microbiológico para la preparación de aldehídos y/o ácidos carboxílicos aromáticos.**

30 Prioridad: **27.10.1999 DE 199 51 768**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

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

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

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

ES 2 304 738 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).

ES 2 304 738 T3

DESCRIPCIÓN

Método microbiológico para la preparación de aldehídos y/o ácidos carboxílicos aromáticos.

5 La invención se refiere a un método microbiológico oxidativo para la preparación de derivados de aldehídos y/o ácidos carboxílicos aromáticos usando microorganismos recombinantes que expresan alcano-monooxigenasa.

10 La xileno monooxigenasa (XMO), tal como se codifica por ejemplo por el plásmido TOL de *Pseudomonas putida* mt-2, es un sistema enzimático que desempeña un papel clave en la descomposición de tolueno y xilenos. XMO pertenece a la familia de las alquilo hidrolasas e hidroxila selectivamente un grupo metilo en el anillo aromático. Éste es el primer paso de una ruta metabólica (compárese Figura 1(A)) que conduce a la formación de derivados de ácido carboxílico, los cuales luego se transforman en substratos para el ciclo de Krebs mediante la llamada ruta de meta-descomposición.

15 XMO está compuesta de dos subunidades polipeptídicas XilM y XilA, que se codifican por los genes xilM y xilA (número de acceso xilMA GENBANK M37480) XilA es una reductasa aceptadora de NADH; es decir, una proteína transportadora de electrones que transfiere equivalentes de reducción desde NADH a XilM, una hidroxilasa localizada en la membrana.

20 La actividad de XilM depende de la presencia de fosfolípidos y de iones de hierro (II) tiene un pH óptimo de 7. La secuencia de aminoácidos de XilM es homóloga en un 25% con la secuencia de aminoácidos del componente de hidroxilasa AlkB de la alcano-hidroxilasa de *P. oleovorans* GPo1.

25 La alcano-hidroxilasa es la primera enzima de una ruta de descomposición para alcanos con longitud media de cadena en la que participa una composición de enzimas que se codifica por dos alc-clústeres de genes en el plásmido OCT catabólica.

30 La segunda enzima en la ruta de metabolismo representada en la figura 1(A) es la deshidrogenasa de alcohol bencílico (BADH, por su sigla en el idioma original), un miembro homodimérico de una familia de deshidrogenasa que contiene cinc, cuyos sustratos son alcoholes de cadena larga. Esta enzima se codifica por el gen xilB. La tercera enzima en la vía metabólica representada en la figura 1 (A) es la benzaldehidodeshidrogenasa (BZDH), que también es un homodímero que se codifica por el gen xilC.

35 Otras particularidades de las funciones y propiedades de los genes y enzimas mencionados se encuentran en las fuentes de bibliografía (1) hasta (18). La fuente de bibliografía (36) describe la sobre-expresión de AlkB en *Escherichia coli* que contiene alc-sistema.

40 Pudo demostrarse que las *Escherichia coli*, que se recombinaron mediante ingeniería genética de tal manera que expresan XMO, son no solamente capaces de oxidar tolueno y xilenos, sino también m- y p- etilo-, -metoxi-, -nitro- y cloro- toluenos substituidos y m-bromo-tolueno substituido para poder dar los derivados correspondientes de alcohol bencílico (19, 20). El estireno se oxida hasta óxido de estireno (ee 95%). Además, se sospechó que el XMO también cataliza *in vivo* (es decir, en experimentos sobre células vivas completas) el segundo paso de la vía metabólica representada en la figura 1 (A), precisamente la oxidación de alcoholes bencílico hasta los aldehídos correspondientes (2, 21). La transformación de benzaldehído en benzoato también puede observarse ya después del tercer paso en la vía metabólica representada en la figura 1 (A), aunque se atribuyó a deshidrogenasas en *E.coli* (2). Otras investigaciones realizadas *in vitro* con XilMA (en esta descripción se usa también sinónimo para XMO, es decir, para la enzima funcional que consta de dos subunidades polipeptídicas, a saber XilM y XilA) parcialmente purificada han mostrado por el contrario que ésta no tiene actividad con respecto al alcohol de bencilo (9). Las razones para esta discrepancia aún no han sido aclaradas.

50 Debido a la pronunciada homología entre la xilomonooxigenasa y alcanomonooxigenasa (AMO, también denominada como alcanohidroxilasa; GENBANK No. de acceso: AJ245436) el experto técnico habría esperado limitaciones con respecto al tipo y alcance de las reacciones catalizadas para ambos sistemas.

55 Los métodos biocatalíticos hasta ahora conocidos en el estado de la técnica para la preparación de aldehídos o ácidos carboxílicos aromáticos no habían sido aún satisfactorios en cuanto a que parecía necesitarse una variedad de enzimas para llevar a cabo estos procesos. También la síntesis química demuestra es difícil debido a la regioselectividad y quimioselectividad requeridas.

60 Por eso, un objetivo de la invención es suministrar un proceso simplificado para preparar aldehídos y/o ácidos carboxílicos aromáticos.

65 De acuerdo con la invención pudo suministrarse de manera sorprendente un proceso de preparación microbiológico simplificado. La invención se basa especialmente en el conocimiento sorprendente de que AMO está en la capacidad de catalizar cada paso individual de la vía de reacción representada en la figura 1(A) o 1(B); es decir la oxidación de aromáticos substituidos con alquilo hasta el derivado de ácido carboxílico mediante el derivado correspondiente de alcohol y el derivado correspondiente de aldehído como etapas intermedias.

ES 2 304 738 T3

Un primer objeto de la invención se refiere de esta manera a un proceso para la producción de aldehídos y/o ácidos carboxílicos aromáticos de la fórmula I



En la cual

Ar representa un anillo aromático de un núcleo sustituido opcionalmente una o más veces;

R¹ representa un grupo que contiene oxígeno -CHO o -COOH; y

n representa un valor de número entero desde 0 hasta 15, como por ejemplo de 0 hasta 12, 1 hasta 6 ó 6 hasta 12, el cual se caracteriza porque un microorganismo, en particular aeróbico,

a) se cultiva en un medio de cultivo que contiene un sustrato aromático de la fórmula II



En la cual

Ar posee los significados arriba indicados y

R² representa -CH=CH₂ o -(CH₂)_{n+1}R³, en donde n se define tal como se indica arriba y

R³ representa H o OH;

o, si R¹ representa -COOH, R² también puede representar -(CH₂)_nR⁴, donde n se define tal como se indica arriba y R⁴ representa -CHO,

el dicho microorganismo expresa alcano-monooxigenasa (AMO); y

b) el o los compuestos de la fórmula I se aísla del medio de cultivo.

Entonces, la reacción según la invención puede llevarse a cabo con la misma enzima en una o más etapas. En calidad de sustrato puede utilizarse el aromático alquilado, el alcohol correspondiente o el aldehído correspondiente. El grado de oxidación del sustrato utilizado puede, tal como se describe abajo, controlarse de una manera más simple.

Sin querer enlazarse con una teoría determinada, los experimentos de incorporación de ¹⁸O en conjunto con patrones de fragmentación obtenidos por espectroscopia de masas sugieren que el mecanismo más posible de la oxidación de alcohol catalizada por XMO procede mediante la formación de un diol germinal en calidad de intermedio que luego se des-hidrogeniza, probablemente de una manera no estereoespecífica, dando lugar a la obtención de aldehído (comparar Fig. 6).

El sistema de anillo aromático Ar en los compuestos producidos o usados como sustratos de acuerdo con la invención, de las fórmulas I y II puede sustituirse una o varias veces. La posición del o de los sustitutos de anillo es seleccionable de cualquier manera. Para la cadena lateral por oxidarse se prefiere sin embargo la posición meta y/o para.

Ejemplos concretos no limitantes de los sustratos oxidables por AMO según el método de la invención de la fórmula II son tolueno, etilbenceno, n- e i-propilbenceno, n-butilbenceno, así como los análogos sustituidos por m- y/o p- metil, etil-, metoxi-, nitro- y cloro de estos compuestos; y los alcoholes y aldehídos correspondientes de estos compuestos.

Los procesos de acuerdo con la invención se llevan a cabo preferiblemente empleando las siguientes enzimas:

AMO, codificado por los genes alkB, alkG y alkT de acuerdo con el GENBANK- Nr. De acceso AJ245436 y las isoenzimas correspondientes (por ejemplo, isoenzimas en alkB). AMO proviene preferiblemente de bacterias del tipo Pseudomonas, particularmente de la especie *Pseudomonas oleovorans*, preferiblemente la cepa GPol (ATCC 29347).

Según la invención se abarca preferiblemente la utilización de "equivalentes funcionales" de las AMOs concretamente divulgadas.

"Equivalentes funcionales" o análogos de las monooxigenasas concretamente divulgadas son, en el contexto de la presente invención, enzimas que difieren de las mismas, las cuales muestran además la reacción deseada y son útiles para la preparación de aldehídos y/o ácidos carboxílicos de la fórmula I de arriba.

Por "equivalentes funcionales" se entienden en particular mutantes de enzima que tienen un amino ácido diferente del amino ácido original en al menos una posición de secuencia pero sin embargo cataliza una de las reacciones de oxidación arriba mencionadas. Así, "equivalentes funcionales" abarcan los mutantes obtenibles por una o más adicio-

nes, sustituciones, eliminaciones, y/o inversiones de aminoácidos y es posible que las modificaciones mencionadas ocurran en cualquier posición de la secuencia siempre que conduzcan a un mutante con la actividad catalítica de acuerdo con la invención. Los equivalentes funcionales existen en particular también cuando los patrones de reactividad entre el mutante y la enzima inmodificada coinciden en términos de calidad; es decir, por ejemplo, cuando sustratos idénticos se convierten a diferentes velocidades.

“Equivalentes funcionales” abarcan por supuesto también monooxigenasas que puedan obtenerse de otros organismos como, por ejemplo, de bacterias diferentes de aquellas mencionadas específicamente aquí, y las variantes o isoenzimas que se producen naturalmente. Por ejemplo, pueden establecerse sectores de regiones de secuencias homólogas mediante alineamiento de secuencias y determinarse enzimas equivalentes en referencia a las especificaciones específicas de la invención.

De acuerdo con la invención se abarca también el uso de secuencias de ácido nucleico diferentes de aquellas mencionadas específicamente (secuencias de ARN y ADN mono- y bicatenario) que codifican una de las monooxigenasas de arriba y sus equivalentes funcionales. Otras secuencias útiles de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención se diferencian por consiguiente de las secuencias empleadas concretamente mediante adición, sustitución, inserción o delección de uno o varios nucleótidos, pero que codifican además para una monooxigenasa con el perfil deseado de propiedades.

De acuerdo con la invención se abarca también el uso de tales secuencias de aminoácidos que comprenden las llamadas mutaciones silentes o que han sido modificadas de acuerdo con la utilidad del codón de un organismo específico de origen, u organismo anfitrión, en comparación con una secuencia mencionada específicamente, como son las variantes que se producen naturalmente, por ejemplo las variantes de empalme de las mismas. Otro objeto son también las secuencias que pueden obtenerse mediante sustituciones nucleotídicas de conservación (es decir que el aminoácido en cuestión se reemplaza por un aminoácido de carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad idénticas).

Objeto de la invención son además vectores de expresión para el uso en el método de la invención los cuales contienen, bajo el control genético de secuencias reguladoras de ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima monooxigenasa que es útil de acuerdo con la invención; y vectores que comprenden al menos uno de estos vectores de expresión. Preferiblemente, tales vectores de la invención comprenden un promotor 5'-arriba de la secuencia respectiva codificadora y una secuencia terminal 3'-abajo así como opcionalmente otros vectores reguladores usuales, ligados en cada caso de manera operativa a la secuencia codificadora. Por una “conexión operativa” se entiende la disposición secuencial de promotor, secuencia codificadora, terminal y, si es apropiado, otros vectores reguladores de tal manera que cada uno de los vectores reguladores pueda cumplir su función cuando se expresa la secuencia codificadora. Ejemplos de secuencias que pueden ligarse operativamente son secuencias *targeting* (de selección) y reforzadores de translación, *enhancer* (promotores), señales de poliadenilización y similares. Otros vectores reguladores comprenden marcadores seleccionables, señales de amplificación, orígenes de replicación y similares.

En adición a las secuencias reguladoras artificiales, aún puede estar presente la secuencia de regulación natural ante el propio gen de estructura. Si es apropiado, esta regulación natural puede desconectarse por medio de modificación genética y puede aumentarse o reducirse la expresión de los genes. Sin embargo, el vector de gen puede tener también un estructura más simple; es decir que no se insertan señales reguladoras adicionales ante el gen estructural y no se retira el promotor natural con su regulación. En vez de eso, la secuencia reguladora natural se muta de tal manera que no tiene lugar la regulación y la expresión del gen se aumenta o se reduce. En el vector de gen pueden estar presentes una o más copias de las secuencias de ácido nucleico.

Ejemplos de promotores útiles son: *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacIq-*, T7-, T5-, T3-, *gal-*, *trc-*, *ara-*, SP6-, 1-PR- o promotor 1-PL, que ventajosamente encuentran aplicación en bacterias gram-negativas; y los promotores gram-positivos *amy* y *SPO2*, los promotores de levadura *ADC1*, *MFa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH* o los promotores de plantas *CaMV/35S*, *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, not o los promotores de ubiquitina o faseolina. Se prefiere especialmente el uso de promotores inducibles tales como, por ejemplo, promotores inducibles por la luz o la temperatura, tales como el promotor *PrP1*.

Por principio, se usan todos los promotores naturales con sus secuencias de regulación. Además, también se usan promotores sintéticos de manera ventajosa.

Las secuencias reguladoras mencionadas deben hacer posibles la expresión objetivo de la secuencias de ácido nucleico y de la expresión de proteína. Por ejemplo, dependiendo del organismo anfitrión esto puede significar que el gen se expresa o se sobre-exprea solo después de inducción, o que se expresa y/o sobreexpresa inmediatamente.

Las secuencias o factores reguladores pueden tener preferiblemente un efecto positivo sobre una expresión, incrementándolo o reduciéndolo así. Así, los vectores reguladores pueden promoverse ventajosamente al nivel transcripcional usando fuertes señales de transcripción tales como promotores y/o “enhancers”. Sin embargo, también es posible un reforzamiento de la translación mejorando, por ejemplo, la estabilidad del mRNA.

La preparación de un cassette de expresión para el uso en el método de la invención se lleva a cabo por la fusión de un promotor adecuado con una secuencia monooxigenasa-nucleótido y una señal terminal o señal de poliadenilación. Para este propósito se usan técnicas de recombinación y clonación habituales, tal como se describen, por ejemplo, en T. Maniatis *et al* (24) como también en T.J. Silhavy *et al.* (32) y en Ausubel, F.M. *et al.* (33).

ES 2 304 738 T3

El vector de ácido nucleico recombinante o el vector de gen se insertan ventajosamente en un vector específico de anfitrión que hace posible la expresión óptima de los genes en el anfitrión. Los vectores son bien conocidos por el técnico en la materia pueden encontrarse, por ejemplo, en "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. *et al.* (34)).

5 Por vectores se entienden, además de las plásmidos, todos los otros vectores que son conocidos por el técnico en la materia tales como, por ejemplo, fagos, virus tales como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposons, IS-vectores, fasmidas, cosmidas, y ADN lineales o circulares.

Estos vectores pueden replicarse autónomamente en el organismo anfitrión o cromosomáticamente.

10 Con ayuda de tales vectores según la invención también es posible generar microorganismos recombinantes que se transforman por ejemplo con al menos un vector de acuerdo con la invención que pueden emplearse en el proceso de acuerdo con la invención. Los vectores recombinantes descritos arriba de acuerdo con la invención se introducen ventajosamente, y se expresan en un sistema anfitrión adecuado. Para hacer esto se prefiere usar métodos de clonación
15 y de transfección corrientes conocidos por el técnico en la materia tales como, por ejemplo, coprecipitación, fusión de protoplastos, electroporación, transfección retroviral y similares, con el fin de expresar los ácidos nucleicos arriba mencionados en el sistema de expresión en cuestión. Se describen sistemas adecuados en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel *et al.* (35).

20 Organismos anfitriones adecuados son, en principio, todos los organismos que hacen posible una expresión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, de sus variantes alélicas, de sus equivalentes funcionales o sus derivados, y que pueden emplearse para llevar a cabo la reacción de oxidación microbiológica se acuerdo con la invención. Por organismos anfitriones se entienden, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras, células vegetales o animales. Los organismos preferidos son bacterias.

25 Además, se prefiere usar tales microorganismos que expresan AMO que no poseen esencialmente actividad de alcanoldeshidrogenasa (AODH) ni alcanaldeshidrogenasa (AADH), las cuales se codifican por los genes alkJ o alkH. Por ejemplo, un microorganismo que puede usarse es una bacteria de la especie *Escherichia* tales como, por ejemplo, *E. coli*; por ejemplo de la cepa W3110 y una de las cepas K12, como JM101 y DH5 α , o una de las cepas *Pseudomonas putida*, como la cepa KT 2440. Las características de algunas cepas preferidas *E. coli* se indican en la tabla I.
30

La transformación de microorganismos con un vector se lleva a cabo de acuerdo con la invención usando técnicas estándar establecidas (24) y no necesitan por lo tanto una discusión detallada.

35 La selección de organismos transformados exitosamente puede llevarse a cabo por medio de genes marcadores, que también están presentes en el vector o en el cartucho de expresión. Ejemplos de tales genes marcadores son genes para resistencia a antibióticos y genes para enzimas que catalizan una reacción que da color, la cual causa que la célula transformada se manche. Estas células pueden luego seleccionarse por medio de una clasificación automática de células. Los microorganismos que se han transformado exitosamente con un vector y que llevan un gen adecuado para resistencia a antibióticos (por ejemplo G418 o higromicina) pueden seleccionarse mediante un medio sólido o
40 líquido adecuado que contiene antibióticos. Las proteínas marcadoras presentes en la superficie de la célula pueden usarse para selección por medio de cromatografía de afinidad.

45 La combinación de los organismos anfitriones y los vectores que se adaptan a los organismos, tales como plásmidos, virus o fagos, por ejemplo plásmidos con el sistema polimerasa de ARN/promotor, los fagos λ o μ u otros fagos temperantes o transposons y/u otras secuencias reguladoras ventajosas forma un sistema de expresión.

Según una forma de realización especialmente preferida se usa un microorganismo recombinante que se transforma con un vector de expresión que contiene, por ejemplo, los genes codificadoras de XMO xylM y xylA o los genes codificadoras AMO alkB, alkG y alkT, enlazados operativamente y bajo control genético del sistema alk-regulador de
50 *Pseudomonas oleovorans* GPo1.

Especialmente se prefiere que el microorganismo se transforme con el plásmido de expresión pSPZ3 que codifica xylMA.

55 El sistema de alk-regulación de *Pseudomonas oleovorans* GPo1 es conocido *per se*. La expresión del primero de los dos clústeres de alk genes enunciados arriba está bajo el control de alkBp, el alk promotor, e inicia en la presencia de la proteína reguladora funcional alkS que se codifica por el segundo clúster de alk gen y en la presencia de un inductor tal como, por ejemplo, un alcano (n-octano, por ejemplo) o un compuesto que muestra pequeña relación con el mismo, tal como cetona dicitlopropilo (DCPK, por sus siglas en inglés) (8, 22, 23). El uso del sistema alk regulador
60 es *E. coli* tiene la ventaja de que no tiene lugar una represión catabólica.

En el proceso según la invención se usan preferentemente n-octano y DCPK en calidad de inductores, especialmente preferible en una cantidad de 0,001 hasta 0,5% (V/V) en el caso de n-octano y en una cantidad de 0,005 hasta 0,05% (V/V) en el caso de DCPK. Por supuesto, también pueden usarse mezclas de n-octano y DCPK. Si se usan estos
65 rangos de concentraciones se logra el máximo de inducción.

La invención se refiere además a un proceso microbiológico para la oxidación de compuestos orgánicos del tipo de arriba con ayuda de los microorganismos recombinantes ya descritos. El microorganismo recombinante usado según

ES 2 304 738 T3

la invención puede cultivarse y fermentarse según métodos conocidos. Por ejemplo, las bacterias pueden reproducirse en medio TB o LB y a una temperatura de 20 hasta 40°C y un valor pH de 6 hasta 9. Las condiciones específicas adecuadas de cultivo se describen, por ejemplo, en T. Maniatis *et al.*, a.a.0.

5 En la oxidación microbiológica de acuerdo con la invención usando microorganismos recombinantes arriba descritos, los microorganismos se cultivan primero preferiblemente en la presencia de oxígeno y en un medio complejo tal como, por ejemplo, medio TB o LB, a una temperatura de cultivo de alrededor de 20 hasta 40°C o más y un valor de pH de cerca de 6 hasta 9, hasta alcanzar una densidad de célula suficiente. Para poder controlar mejor una reacción de oxidación se prefiere el uso de un promotor inducible. El cultivo se continúa en presencia de oxígeno, por ejemplo por
10 una u hora hasta 3 días, después de que la producción de la monooxigenasa ha sido inducida. El producto de oxidación, o la mezcla de producto de oxidación, formado puede luego separarse del medio y purificarse de la manera habitual tal como, por ejemplo, mediante extracción o cromatografía.

15 Las reacciones de acuerdo con la invención también pueden llevarse a cabo de manera ventajosa en biorreactores que contiene el microorganismo recombinante de acuerdo con la invención, en forma inmovilizada por ejemplo.

20 El grado de oxidación de los sustratos empleados de acuerdo con la invención puede controlarse de una manera simple. Por ejemplo, las muestras se toman regularmente del medio de cultivo y se examinan para su contenido de derivados correspondientes de alcohol, derivados de aldehído y/o derivados de ácido carboxílico mediante cromatografía de gas, usando una cromatografía de gas acoplada a un sistema de espectrómetro de masa (GC-MS) o cromatografía líquida de alto rendimiento. Dependiendo de qué derivado oxidado se desee o de si se ha establecido una relación de mezcla deseada, se detiene la incubación. Esto puede hacerse, por ejemplo, retirando los microorganismos del medio de cultivo o destruyéndolos, por ejemplo mediante centrifugación y decantación y/o mediante tratamiento con ácido, ácido tricloroacético por ejemplo, o mediante tratamiento térmico. También puede inhibirse la formación ácida
25 dosificando un sustrato oxidado (tal como tolueno o p-sudocumeno, por ejemplo).

30 El aromático oxidado puede entonces aislarse del medio de cultivo con la ayuda de métodos de separación habituales, mediante destilación simple, destilación fraccionaria, rectificación, si es apropiado en vacío, o mediante métodos cromatográficos adecuados, por ejemplo; preferiblemente, mediante destilación. Las células de microorganismos se retiran convenientemente del medio de cultivo antes de que estos productos se aislen.

35 La construcción del vector de expresión pSPZ3 que se prefiere de acuerdo con la invención se describe en (31) Panke, *et al.*, Applied and Environmental Microbiology (1999) 2324-2332, a la cual con esto se hace expresamente referencia.

40 En el contexto de las investigaciones para la transformación de los microorganismos se usó también un vector que además de los genes XMO xylM y xylA contenía adicionalmente también el gen bencilalcoholdehidrogenasa (BADH) xilB de *Pseudomonas putida* mt-2 en forma capaz de expresarse. Para introducir el gen de bencilalcoholdehidrogenasa xilB a el plásmido pSPZ3 directamente en dirección inversa en relación al gen xilA, el fragmento XhoI/FspI de 2,3 kb de largo de el plásmido pCK04 (25), que contiene el gen xylB, se introdujo primero al vector XhoI y el vector digerido SmaI - pGEM-7Zf(+) (Promega, Zurich, Suiza) obteniéndose pGEMAB. El fragmento de 2,3 kb de largo se cortó de este vector con XhoI y BamHI y se ligó a el plásmido XhoI y digerida BamHI - pSPZ3. El plásmido resultante se denominó pRMAB (figura 2).

45 Los ensayos con pRMAB mostraron, sin embargo, que no sólo se oxida alcohol bencílico en benzaldehído con una actividad más baja si está presente BADH además de XMO, sino que en realidad tiene lugar la acción reversa y se forma alcohol bencílico.

50 En el contexto de las investigaciones de acuerdo con la invención, el plásmido pRS, que no contiene genes xyl, se construyó como control negativo. pRMAB se digirió con BamHI y SmaI y se trató con enzima Klenow. El fragmento más grande se aisló y el vector se relegó.

De aquí en adelante el método de la invención se ilustrará con referencia a ejemplos no limitantes y a las figuras.

55 La figura 1 muestra (A) la oxidación por etapas de tolueno hasta alcohol bencílico, benzaldehído y ácido benzóico por las enzimas de la ruta metabólica superior TOL, y la organización de los genes xyl del operón superior TOL. BADH y BZDH representan deshidrogenasa de alcohol bencílico y deshidrogenasa de benzaldehído, respectivamente. P_u indica el promotor operón superior TOL, xylW un gen con función desconocida, xylC el gen codificadora BZDH, xylM el gen que codifica el componente de hidroxilasa terminal de XMO, xylA el gen que codifica el componente reductasa NADH:aceptador de XMO, xylB el gen codificadora de BADH y xylN un gen con función desconocida; (B) muestra la oxidación por etapas de un alcano sustituto de arilo vía alcano y alcanal correspondientes para producir el ácido alcanocarboxílico, catalizada por las enzimas alcano hidroxilasa (AMO), alcano deshidrogenasa (AODH) y alcanal deshidrogenasa (AADH).

65 La figura 2 muestra los esquemas de construcción de los plásmidos de construcción pSPZ3 y pRMAB con los genes xilMA y xilMAB bajo el control el sistema de alk-regulación. alkBp significa el promotor del alk-operón, alkS es el gen para el regulador positivo AlkS. Los genes xilM* y xilA codifican la xileno-monooxigenasa (el * significa que en el gen xilM se ha retirado un sitio NdeI). El gen xilB codifica BADH. Km indica el gen para la resistencia a kanamicina y T4t es el terminal de transcripción del fago T4.

ES 2 304 738 T3

La figura 3 muestra la oxidación de tolueno por *E. coli* JM101 (pSPZ3) (A) y *E. coli* JM101 (pRMAB) (B). Se adicionó tolueno (1.37 mM) a una suspensión de células en reposo de *E. coli* JM101 (pSPZ3/pBRMAB) (2.07-2.14 g*1⁻¹ PSC) en búfer de fosfato de potasio (50 mM) pH 7.4, 1% (p/v) de glucosa. Círculos: tolueno, cuadrados: alcohol bencílico, triángulos: benzaldehído, rombos: ácido benzóico, cruces: suma de las cuatro concentraciones.

5

La figura 4 muestra la oxidación de pseudocumeno, al alcohol correspondiente y al aldehído correspondiente por *E. coli* JM101 (pSPZ3) (A,C,E) y *E. coli* JM101 (pRMAB) (B,D). Los sustratos (0.46 mM) se adicionaron a la suspensión de células (0.86-0.92 g*1⁻¹ PSC) en reposo de *E. coli* JM101 (pSPZ3/pBRMAB) en búfer de fosfato de potasio (50 mM) pH 7.4, 1% (p/v) de glucosa. Los gráficos (A) y (B) muestran la oxidación de pseudocumeno, los gráficos (C) y (D) la oxidación de alcohol 3,4-dimetilbencílico y el gráfico (E) muestra la oxidación de 3,4-dimetilbenzaldehído. círculos: pseudocumeno, cuadrados: alcohol 3,4-dimetilbencílico, triángulos: 3,4-dimetilbenzaldehído, rombos: ácido 3,4-dimetilbenzóico, cruces: suma de todas las concentraciones.

10

La figura 5 muestra la cinética de crecimiento e inducción de XMO en *E. coli* JM101 (pSPZ3). El gráfico (A) muestra la actividad de xilenomonooxigenasa y el peso seco de células (PSC) en los diferentes puntos de tiempo después de la inducción por n-octano, mientras que los gráficos (B) y (C) indican los mismos valores 3,5 horas después de la inducción con diferentes cantidades de n-octano y dicitlopropilcetona (DCPC). Cada determinación de actividad proviene de un cultivo independiente. Pseudocumeno (1.37 mM) se adicionó a una suspensión de células en reposo (2.04-2.44 g*1⁻¹ PSC) de *E. coli* JM101 (pSPZ3) en búfer de fosfato de potasio (50 mM) pH 7.4, 1% (p/v) de glucosa. Las actividades específicas se basan en la formación de producto durante los primeros 5 minutos de la reacción. La flecha en el gráfico (A) indica cuando se adicionó 0,1% (v/v) de n-octano para inducir la síntesis de XilMA. Círculos llenos: PSC de los cultivos no inducidos, círculos abiertos: PSC de cultivos inducidos, cruces: actividades específicas de cultivos inducidos.

15

20

25

La figura 6 muestra una explicación mecanicista posible para la formación catalítica de XMO de benzaldehído a partir de alcohol bencílico.

Métodos generales y materiales usados

30

a) Bacterias y plásmidos

35

Cepas de bacterias y plásmidos		
Cepa o plásmido	Propiedades	Fuentes o sitio bibliográfico
Cepas <i>E. Coli</i>		
DH5 α	supE44 \square lacU169 (\emptyset 80lacZ \square M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	(30)
JM101	supE thi-1 \square (lac-proAB) F'[traD26 pro AB ⁺ lacI ^q lacZDM15]	(24)
Plásmidos		
pSPZ3		Invencción
pRMAB	alkS Palk xylMA ori pMB1; Km ^f	Invencción
pRS	pBRMA; xylB; Km ^f	Invencción
pCK04	pBRMA; Δ xylMA	(25)
pGEM7Zf(+)	lacZa Pu xylWCMABN; pSC101 oriV; Cm ^f	Promega
pGEMAB	ColEI fl ori lacZa; Ap ^f pGEM7Zf(+); xylA*B; Ap ^f	Invencción
A*: el plásmido contiene solo una parte del gen xylA		

65

ES 2 304 738 T3

b) *Químicos y enzimas*

5 Todos los químicos y las enzimas usadas se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo de Boehringer Mannheim (Rotkreuz, Suiza), NEB (Schwalbach, Alemania), Gibco (Basel, Suiza), AGS (Heidelberg, Alemania), Promega (Zurich, Suiza), Fluka (Buchs, Suiza), Aldrich (Buchs, Suiza) y Lancaster (Mühlheim, Alemania). Para la preparación de plásmido - ADN a pequeña escala se usó el kit QIAprep-Spin-Miniprep de Quiagen (Basel, Suiza) según los datos del productor.

c) *Métodos de ingeniería genética*

10 Para la construcción de los vectores/plásmidos usados y para la transfección o transformación de las bacterias se usaron métodos estándares de la ingeniería genética, los cuales están descritos en detalle, por ejemplo, en el libro de Sambrook, Fritsch y Maniatis (24). Además, se hace referencia a las secciones "Materiales y métodos" en los artículos originales indicados en el listado de la bibliografía. Por lo tanto, es innecesaria una discusión más profunda.

d) *Cultivo de las bacterias*

15 Las bacterias se cultivaron en un caldo de Luria-Bertani (LB) (Difco, Detroit, Mich.) o en un medio mínimo M9 (24), que contenía tres veces la concentración de sales fosfato (M9*) y 0,5% (P/V) de glucosa como única fuente de carbono. Opcionalmente, los cultivos se complementaron con kanamicina (concentración final: 50 mg/litro), ampicilina (100 mg/litro), cloramfenicol (30 mg/litro), tiamina (10-3%, P/V), 1 mM de indol y 0,5 mM IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosida). Los medios sólidos contenían 1,5% (P/V) de agar. Los cultivos líquidos se dejaron crecer de la manera rutinaria a 30 o 37°C sobre agitadores horizontales a 200 rpm.

e) *Determinación de la actividad enzimática*

20 En aras de la simplicidad la determinación de las actividades de la enzima se realizó usando células intactas.

25 Una unidad (U) se define como la actividad que resulta en 1 μ mol de producto total en 1 minuto. La actividad específica se expresa aquí como la actividad por g de peso seco de célula (PSC) ($U\ g^{-1}\ PSC$) (de aquí en adelante denominada simplemente actividad). El cálculo como actividad promedio con respecto a la cantidad de productos por g de PSC, que se forman en los primeros 5 minutos de la reacción. Los experimentos se repitieron al menos tres veces independientemente unos de otros.

30 El ensayo se llevó a cabo tal como sigue. *E. Coli* JM101 que había sido recombinada con los vectores en cuestión se incubaron en 40 ó 100 ml de medio en la presencia de kanamicina. Cuando la densidad óptica a 450 nm fue de cerca de 0,3, las células se indujeron adicionando 0,05% (V/V) de DCPK- o 0,1% (V/V) de n-octano y se incubaron 3 hasta 3,5 horas más, hasta que la densidad óptica OD_{450} subió de manera típica a 0,8-0,9. Las células se cosecharon entonces y se resuspendieron hasta un peso seco de célula de 2,5 g/l en 50 mM de búfer de fosfato de potasio, pH 7,4, que comprendía 1% (P/V) de glucosa. Se introdujeron porciones de 1 ó 2 ml en tubos Pyrex sellados con tapones e incubados horizontalmente en un agitador de rotación a 30°C y 250 rpm. Después de 5 minutos se adicionó el sustrato en cuestión hasta una concentración final de 1,5 mM en forma de una solución madre (stock) en etanol, concentrada 20 veces. En los experimentos en los que se determinó la formación de ácido 3,4-dimetilbenzóico el peso seco de célula se redujo a 1 g/l, y los sustratos respectivos se adicionaron hasta una concentración final de 0,5 mM ya que este compuesto tiene una ínfima solubilidad en agua. La reacción se llevó a cabo durante 5 minutos sobre el agitador y luego se terminó poniendo las muestras sobre hielo e inmediatamente tratándolas con 40 u 80 μ l de solución madre de ácido perclórico (10% V/V) de modo que el pH de la suspensión fue de 2.

f) *Determinación de formación de producto como una función del tiempo*

35 Para investigar la formación de producto como una función del tiempo las células se cultivaron, se indujeron, se recolectaron, se resuspendieron e incubaron por diferentes períodos, a saber 5, 10, 20, 30, 40 y 80 minutos, con el sustrato respectivo. Después las reacciones se terminaron tal como se describe arriba, se retiraron las células mediante centrifugación (7 800 g, 8 min) y se analizaron los sobrenadantes.

40 Se usó cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la separación de alcohol bencílico, bencilaldehído y ácido benzóico. La columna usada fue Nucleosil C18 (tamaño de poro 100 Å, tamaño de partícula 5 μ m, longitud 25 cm, diámetro interno 4 mm) (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza) y la fase móvil fue 69,9% H_2O -30% acetonitrilo-0,1% H_3PO_4 a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min. Para separar alcohol 3,4-dimetilbencílico, 3,4-dimetilbenzaldehído y ácido 3,4-dimetilbenzóico se usó la misma columna pero con 64,9% H_2O -35% acetonitrilo-0,1% H_3PO_4 como fase móvil con la misma velocidad de flujo. Para la detección se empleó la absorción UV a 210 nm. Los compuestos separados se identificaron comparando los tiempos de retención con aquellos de los estándares disponibles en el mercado.

45 En el caso de tolueno/pseudocumeno y de los alcoholes, aldehídos y ácidos correspondientes, la separación se realizó mediante cromatografía de gas. El cromatógrafo de gas (Fisons Instruments, Inglaterra) estaba equipado con una columna capilar de cuarzo del tipo OPTIMA-5 (longitud 25 m, diámetro interno 0,32 mm, grosor de película 0,25

ES 2 304 738 T3

5 μm) de Macherey-Nagel (Oensingen, Suiza). Como gas transportador se usó hidrógeno y la inyección se realizó sin separación. Se usó el siguiente perfil de temperatura: de 40°C a 70°C con 15°C/min, de 70°C a 105°C con 5°C/min y de 105°C a 240°C con 20°C/min. La detección de los compuestos se realizó con un detector de ionización con llama. Los compuestos separados se identificaron comparando el tiempo de retención con aquellos de los estándares disponibles comercialmente. DE manera alterna, la detección puede realizarse usando un espectrómetro de masas (sistema acoplado GC-MS). Este último tiene la ventaja de que, para la determinación cualitativa y cuantitativa de los productos de reacción, pueden usarse no sólo el tiempo de retención cromatográfico específico sino también el patrón de fragmentación y la distribución de intensidad de los picos individuales.

10 El acoplamiento GC-MS consistió de un espectrómetro de masas del tipo Fisons MD-800 y un cromatógrafo de gas (Fisons Instruments, Inglaterra), el cual estaba equipado con una columna CP-Sil-5CB (Chrompack, Holanda). El gas transportador que se usó era helio. La inyección se separó (20:1). El programa de temperatura era el mismo que en la separación por cromatografía de gas que se describió arriba.

15 A las muestras se adicionó un volumen igual de éter frío de hielo que comprendía 0,1 M dodecano en calidad de estándar interno, tanto en la cromatografía de gas como el sistema acoplado GC-MS. Luego, se adicionó cloruro de sodio hasta la saturación y se extrajo la fase acuosa a 30°C mediante agitación vigorosa por 5 minutos, después de lo cual se separaron las fases mediante centrifugación. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego se analizó.

20 Los siguientes ejemplos no son el objeto del alcance propuesto de protección de la presente invención.

Ejemplo 1

25 *Oxidación de tolueno y derivados de los mismos con xilomonooxigenasa*

En los experimentos siguientes todas las células se cultivaron hasta una densidad de célula de 0,09 g PSC/l y se indujeron de una manera rutinaria con 0,1% (V/V) n-octano. Después, los cultivos se incubaron por otras 3 hasta 3,5 horas y se dejaron crecer hasta una densidad de célula de 0,23 hasta 0,27 g PSC/l.

30 La tabla II muestra que XMO oxida el tolueno hasta alcohol bencílico, alcohol bencílico hasta bencilaldehído y bencilaldehído hasta ácido benzóico. Se encontraron actividades de hasta 95-100 U/g PSC en el caso de las primeras dos reacciones de oxidación, mientras que el bencilaldehído se oxidó solo a una actividad más baja de 10 U/g PSC.

35 En el caso del pseudocumeno se obtuvieron resultados similares. El pseudocumeno se oxidó hasta alcohol 3,4-dimetilbencílico, el alcohol 3,4-dimetilbencílico hasta 3,4-dimetilbencilaldehído y el 3,4-dimetilbencilaldehído hasta ácido 3,4-dimetilbenzóico. Para la oxidación de pseudocumeno se encontró una actividad de 100 U/g PSC, mientras que el 3,4-dimetilbencilaldehído se formó más lentamente con una actividad de 50 U/g PSC y se oxidó hasta ácido 3,4-dimetilbenzóico con una actividad marcadamente más alta (55 U/g PSC) que el bencilaldehído.

40 Si los ácidos se adicionaran como sustratos, no se detectaría ni los productos de reacción ni un decrecimiento en los ácidos.

45 Como controles sirvieron *E. coli* JM101 no inducidas que contenían el plásmido pSPZ3 y las *E. coli* JM101 inducidas que no tenían plásmido. En calidad de controles adicionales se usaron *E. coli* JM101 que contenían el plásmido pRS para excluir cualesquiera efectos sobre *E. coli* por parte del sistema alk regulador. El plásmido pRS contiene aún el gen alkS pero no los genes xyl. La tabla II demuestra que no se detectaron productos de transformación en los experimentos de control cuando se usaron como sustratos tolueno, pseudocumeno y los alcoholes correspondientes.

50 La siguiente tabla III muestra que, no obstante, los aldehídos adicionados como sustratos en este experimento se redujeron con actividad constante hasta los alcoholes. También se identificó la formación de ácido 3,4-dimetilbenzóico pero con una actividad muy ínfima de 2 hasta 2,5 U/g PSC. Esto permite la conclusión de que la mayor parte del ácido formado por *E. coli* JM101 inducida (pSPZ3) (esta abreviatura significa en este contexto que los microorganismos contienen el plásmido declarado) puede atribuirse a la presencia de XMO.

55 En este punto debe mencionarse que no se encontraron diferencias significativas con respecto a los productos formados y las actividades, o a las velocidades de formación, entre el inductor usado rutinariamente de n-octano al 0,1% (V/V) y el inductor de DCPC al 0,05% (V/V) que se usó como alternativa.

60

65

ES 2 304 738 T3

TABLA II

Oxidación de tolueno y derivados por XMO

Sustrato	Actividad específica (U g ⁻¹ PSC)		
	E. coli JM101 (pSPZ3) inducida ^b	E. coli JM101 (pSPZ3) no inducida	E. coli JM101 (pRS) inducida ^b
Tolueno	100	0	0
Alcohol bencílico	95	0	0
Benzaldehído	10	s.b. ^c	s.b. ^c
Pseudocumeno	100	0	0
Alcohol 3,4 - dimetilbencílico	50	0	0
3,4- dimetilbenzaldehído	55	s.b. ^c	s.b. ^c

a El experimento para determinar la actividad se llevó a cabo tal como se describe arriba. La unidad (U) es tal como se define arriba y la actividad específica se calculó tal como se describe arriba.

b Las células se indujeron por adición de 0,1% (V/V) n-octano.

c s.b., ver abajo (Tabla III)

TABLA III

	Actividad específica ^a (U g ⁻¹ PSC)			
	Benzaldehído como sustrato		3,4-dimetilbenzaldehído como sustrato	
Tipo de producto formado	E. coli JM101 (pSPZ3) inducida	E. coli JM101 (pRS) inducida ^b	E. coli JM101 (pSPZ3) no inducida	E. coli JM101 (pRS) inducida ^b
Formación de alcohol	19	15		
Formación de ácido	0,5	0		

a, b véase Tabla II

La reducción de los aldehídos a los alcoholes que se encontró en estos experimentos de control usando *E. coli* JM101 (pSPZ3) no inducida y *E. coli* JM101 (pRS) inducida puede explicarse por la acción de deshidrogenasas de alcohol de *E. coli* que catalizan una reacción cuyo equilibrio se encuentra del lado del alcohol, por razones termodinámicas. La formación revertida de alcohol bencílico al final de la biotransformación de tolueno por *E. coli* JM101 (pSPZ3) (véase Fig 5A) puede atribuirse también a las deshidrogenasas de *E. coli*, cuya actividad se vuelve significativa ya que la actividad de XMO disminuye con el tiempo.

Ejemplo 2

Determinación del transcurso en el tiempo de la oxidación de diversos sustratos

El transcurso en el tiempo de la oxidación de tolueno, pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbencílico y 3,4-dimetilbenzaldehído se muestra en las figuras 3 y 4. Los experimentos se llevaron a cabo tal como se describe arriba. El sustrato respectivo se adicionó en cada caso a una suspensión de las células respectivas en reposo en búfer de fosfato de potasio a 50 mM, pH 7,4, que comprende glucosa al 1% (p/v).

Si se adicionaran tolueno o pseudocumeno como sustratos se establecería una formación subsiguiente de los alcoholes, aldehídos y ácidos correspondientes (figuras 3A y 4A). Tal como ya se estableció en los experimentos de actividad, las actividades con las que el alcohol bencílico, el alcohol 3,4-dimetilbencílico y el benzaldehído se forma-

ES 2 304 738 T3

ron fueron altas. Las actividades con las que se formaron 3,4-dimetilbenzaldehído y ácido 3,4-dimetilbenzóico fueron medianamente altas y el ácido benzóico se formó con una actividad pequeña. En los primeros 5 minutos se formaron los productos de los dos sustratos pseudocumeno y tolueno con una actividad específica de 100 U/g PSC (compárese también la tabla II). En el intervalo entre los minutos 5 y 10 se formó benzaldehído con una actividad de 80 U/g PSC, mientras que 3,4-dimetilbenzaldehído se formó más lentamente (37 U/g PSC). La formación de ácido se inició cuando el consumo de tolueno o pseudocumeno fue completo con una actividad de 3,2 U/g o 21 U/g PSC en el caso de ácido benzóico o ácido 3,4-dimetilbenzóico en el intervalo entre los 10 y 30 minutos. Siempre quedó una pequeña concentración restante de alcohol benzóico. La concentración de alcohol benzóico aumentaba de nuevo entre 40 y 80 minutos mientras que la concentración de benzaldehído disminuía (figura 3). Pseudocumeno, alcohol 3,4-dimetilbenzóico y 3,4-dimetilbenzaldehído se consumieron completamente formando ácido 3,4-dimetilbenzóico (figura 4A).

Cuando se adicionó alcohol 3,4-dimetilbenzóico como sustrato, la actividad con la cual se formó 3,4-dimetilbenzaldehído fue de 50 U/g PSC (tabla II), mientras que la actividad con la cual se formó ácido 3,4-dimetilbenzóico fue de 23 U/g PSC, y todo durante el período entre 10 y 30 minutos (figura 4C). Cuando se usó alcohol benzóico como sustrato, la actividad con la cual se formó benzaldehído fue de 95 U/g PSC y la actividad con la cual se formó ácido benzóico fue una constante de 2,9 U/g PSC (no se muestran los resultados). En contraste con el alcohol benzóico, durante el período de prueba todo el alcohol 3,4-dimetilbenzóico se convirtió completamente en ácido,

Cuando se adicionó 3,4-dimetilbenzaldehído como sustrato (figura 4E) se formó ácido 3,4-dimetilbenzóico con una actividad de 55 U/g PSC y ya después de 20 minutos era la especie predominante. Cuando se usó benzaldehído como sustrato, se estableció una formación lenta y constante de ácido benzóico (3 U/g PSC) (no se muestran los resultados). Aquí, la actividad inicial durante los primeros 5 minutos fue de 10 U/g PSC (tabla II).

Ejemplo 3

Transformación de tolueno y pseudocumeno por E. coli JM101 (pRMAB)

Estos experimentos estuvieron destinados a clarificar si la actividad con la cual se forma el aldehído a partir de tolueno y pseudocumeno aumenta o disminuye con la presencia simultánea de BADH y XMO. Puesto que algo de la deshidrogenasa de alcohol cataliza una reacción cuyo equilibrio está del lado del alcohol a un pH fisiológico, la posibilidad mencionada de último puede realmente existir y BADH reduciría así la velocidad a la que se forma aldehído.

Realmente se observaron claras diferencias con respecto a la actividad de biotransformación en comparación con *E. coli* JM101 (pSPZ3). Tolueno se transformó en sus productos de oxidación correspondientes con una actividad específica inicial de 87 U/g PSC. Las actividades correspondientes para alcohol benzóico, pseudocumeno y alcohol 3,4-dimetilbenzóico fueron 66, 73 y 42 U/g PSC. La presencia de BADH parece también causar una reducción en la actividad de biotransformación de *E. coli* JM101 recombinantes como biocatalizadores.

La adición de tolueno resultó en la formación consecutiva de alcohol benzóico, benzaldehído y ácido benzóico (figura 3B). Durante el período entre los minutos 5 y 10 se formó alcohol benzóico con una actividad de 34 U/g PSC y el ácido se formó con una actividad de 1 U/g PSC durante un período entre 10 y 40 minutos. Después de aproximadamente 20 minutos la concentración de alcohol benzóico comenzó a crecer de nuevo (probablemente debido al inicio de la reacción inversa). Después de 80 minutos virtualmente no quedaba benzaldehído y se formó solo una muy pequeña cantidad de ácido benzóico.

Cuando se agregó alcohol benzóico como sustrato los resultados fueron muy similares (no se muestran). De nuevo, la concentración de aldehído cayó durante la formación de alcohol después de aproximadamente 20 minutos. Así, la introducción del gen *xyIB* causa una reducción considerable del aldehído para producir alcohol, lo cual sugiere que la formación de aldehído no aumenta por la adición de BADH.

Cuando se agregó pseudocumeno como sustrato, de nuevo, se estableció una formación consecutiva de alcohol 3,4-dimetilbenzóico, 3,4-dimetilbenzaldehído y ácido 3,4-dimetilbenzóico (figura 4B). En el período durante los minutos 5 y 10 se formó 3,4-dimetilbenzaldehído con una actividad de 15 U/g PSC. Durante el período entre 30 y 40 minutos se formó el ácido aproximadamente con la misma actividad (13 U/g PSC). Después de la rápida formación del alcohol, la concentración de aldehído permaneció relativamente alta por 20 minutos. Sin embargo, todo el alcohol y el aldehído se transformaron en el ácido al final de la reacción.

Cuando se adicionó alcohol 3,4-dimetilbenzóico como sustrato se formaron 3,4-dimetilbenzaldehído y ácido 3,4-dimetilbenzóico (figura 5B). En el período entre 20 y 30 minutos se formó el ácido con una actividad específica de 8 U/g PSC. La concentración de aldehído nunca excedió la concentración de alcohol. La presencia más larga de alcohol 3,4-dimetilbenzóico indica que, además de la oxidación, el aldehído se reduce de nuevo hasta alcohol, de lo cual parece ser responsable BADH.

Ejemplo 4

Cinética de crecimiento e inducción de E. coli JM101 (pSPZ3)

5 Se hizo crecer un cultivo individual para cada punto de actividad. El experimento de actividad se llevó a cabo tal como se describe arriba. En el caso de la figura 5^a se adicionó pseudocumeno (1,37 mM) a una suspensión de *E. coli* JM101 (pSPZ3) en reposo (2,04-2,26 g l⁻¹ PSC) en búfer de fosfato de potasio de 50 mM, pH 7,4, que contenía glucosa al 1% (p/v). Las actividades específicas se calcularon con la ayuda de las cantidades que se formaron durante los primeros 5 minutos de la conversión, los cuales se determinaron por cromatografía de gas. La flecha indica el punto en el tiempo en el que se adicionó n-octano al 0,1% (v/v) para inducir la síntesis de xylMA. Los círculos llenos indican el peso seco de célula (PSC) de los cultivos no inducidos, mientras que los círculos abiertos indican el peso seco de célula de los cultivos inducidos y las cruces las actividades específicas de los cultivos inducidos.

15 Las figuras 5(B) y (C) se obtuvieron tal como se describió para la figura 5(A), excepto que la densidad de la célula fue de 2,26-2,44 g l⁻¹ PSC. La figura 5(B) muestra el efecto de cantidades diferentes de n-octano, y la figura 5(C) aquellas de DCPC. Los círculos indican el peso seco de célula 3,5 horas después de la inducción y las cruces las actividades específicas de los cultivos inducidos.

20 La actividad de XMO se monitoreó después de la inducción con n-octano al 0,1% (v/v) (figura 5(A)) o DCPC al 0,05% (v/v). La actividad de XMO se indujo rápidamente por ambos compuestos y alcanzó un valor constante de aproximadamente 115 o 105 U7g PSC en el caso de n-octano y DCPC, respectivamente, después de 3 hasta 3,5 horas. Las velocidades de crecimiento de las células inducidas fueron notablemente más bajas en comparación con células no inducidas.

25 La dependencia de la actividad de XMO de las concentraciones del inductor [en el rango de 0,00001- 1% (v/v)] se determinó haciendo crecer *E. coli* JM101 (pSPZ3) hasta una concentración de 0,09 g PSC por litro e induciendo las células con diferentes cantidades de n-octano y DCPC. Después de otras 3,5 horas de cultivo, se determinaron el peso seco de célula y la actividad de XMO para cada concentración de inductor (figura 5(B) y (C)). Cuando se adicionó n-octano menos de 0,0001% (v/v) o DCPC menos de 0,001% (v/v) al medio de cultivo, las actividades de XMO resultantes fueron muy bajas. Los máximos de inducción se encontraron en concentraciones de DCPC de 0,005 hasta 0,01% (v/v) y a concentraciones de n-octano entre 0,001 y 0,004% (v/v). La actividad de XMO se mantuvo constante a concentraciones más altas de inductor. Debido a la alta presión de vapor del n-octano se usaron frascos sellados para la agitación, pero incluso entonces sólo algo de n-octano se disuelve en el medio acuoso. La solubilidad de n-octano en agua destilada es muy baja y es de 0,7 mg/l o 0,0001% (v/v).

35 Las densidades de célula disminuyeron en los intervalos de concentración de los inductores, en los cuales las actividades de enzima aumentaron hasta su máximo. La actividad de enzima permanece constante a concentraciones más altas de n-octano. Por contraste, las concentraciones de DCPC más altas causaron una disminución más en la densidad de célula (figura 5 (B) y (C)) En adición, se examinó el efecto directo de las diversas concentraciones de inductor sobre el crecimiento de *E. coli* JM101 sin plásmido. Altas concentraciones de n-octano no tuvieron efecto sobre el crecimiento de las células. En contraste, las concentraciones de DCPC por arriba de 0,01% (v/v) dieron lugar a una velocidad de crecimiento disminuida. A una concentración de DCPC de 0,5% (v/v), se determinó un peso seco de célula de solo 0,073 g/l 3,5 horas después de la inducción. Obviamente, las altas concentraciones de DCPC tienen un efecto tóxico sobre las células. Así, n-octano es el mejor inductor.

45 En resumen se puede afirmar lo siguiente. Hay dos diferencias significativas en la oxidación a pasos de tolueno y pseudocumeno. El alcohol 3,4-dimetilbencílico se oxida más lentamente que al alcohol bencílico y el ácido 3,4-dimetilbenzoico se forma con una actividad notablemente mayor que el ácido benzoico. Esto sugiere que la variación de sustituyentes tiene otros efectos en las actividades específicas de XMO para sustratos oxidados (alcoholes, aldehídos) que en la actividad específica para sustratos no oxidados tales como tolueno y pseudocumeno, para cuyos sustratos XMO muestra actividades muy similares. Otro resultado importante es que no se forman ácidos hasta que el tolueno o el pseudocumeno no se hayan consumido más o menos. En el evento que esto sea un hecho general, XMO tiene claramente una afinidad más alta para tolueno y pseudocumeno que para los aldehídos correspondientes. La presencia de BADH da lugar a actividades más bajas para la formación del producto e incluso en la reformación de alcohol bencílico. Las células que contienen BADH acumulan claramente los aldehídos más lentamente. BADH parece incrementar el efecto de las deshidrogenasas de *E. coli* drásticamente y parece que el equilibrio de esta reacción de deshidrogenasa está del lado del alcohol. Esto se confirma mediante cálculos termodinámicos mediante métodos conocidos en el estado de la técnica (16-18).

60 **Bibliografía**

1. Harayama, S., Kok, M. y Neidle, E.L. (1992), *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 565-601
2. Harayama, S., Rekik, M., Wubbolts, M., Rose, K., Leppik, R.A. y Timmis, K.N. (1989), *J. Bacteriol.* 171 (9), 5048-5055
3. Abril, M.-A., Michan., C., Timmis, K.N. y Ramos, J.L. (1989), *J. Bacteriol.* 171(12), 6782-6790

ES 2 304 738 T3

4. Williams, P.A., Shaw, L.M., Pitt, C.W. y Vrecl, M. (1997), *Microbiology* 143, 101-107
5. Ramos, J.L., Marqués, S. y Timmis, K.N. (1997), *Ann. Rev. Microbiol.* 51, 341-373
- 5 6. Suzuki, M., Hayakawa, T., Shaw, J.P., Rekik, M. y Harayama, S. (1991), *J. Bacteriol.* 173(5), 1690-1695
7. Shaw, J.P. y Harayama, S. (1992), *Eur. J. Biochem.* 209, 51-61
8. Wubbolts, M. (1994), Dissertation, Rijksuniversiteit Groningen
- 10 9. Shaw, J.P. y Harayama, S. (1995), *J. Ferm. Bioeng.* 79(3), 195-199
10. Baptist, J.N., Gholson, R.K. y Coon, M.J. (1963), *Bioch. Biophys. Acta* 69, 40-47
- 15 11. Chakrabarty, A.M., Chou, G. y Gunsalus, L.G. (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70(4), 1137-1140
12. Kok, M., Oldenhuis, R., v.d. Linden, M.P.G., Raatjes, P., Kingma, J., v. Lelyveld, P.H. y Witholt, B. (1989), *J. Biol. Chem.* 264(10), 5435-5441
- 20 13. van Beilen, J.B., Wubbolts, M.G. y Witholt, B. (1994), *Biodegradation* 5, 161-174
14. Shanklin, J., Whittle, E. y Fox, B.G. (1994), *Biochemistry* 33, 12787-12794
15. Shanklin, J. Achim, C., Schmidt, H., Fox, B.G. y Münck, E. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2981-2986
- 25 16. Shaw, J.P. y Harayama, S. (1990), *Eur. J. Biochem.* 191, 705-714
17. Shaw, J.P., Schwager, F. y Harayama, S. (1992), *Biochemical Journal* 283, 789-794
- 30 18. Shaw, J.P., Rekik, M., Schwager, F. y Harayama, S. (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 10842-10850
19. Kunz, D.A. y Chapman, P.J. (1981), *J. Bacteriol.* 146(1), 179-191
- 35 20. Wubbolts, M.G., Reuvekamp, P. y Witholt, B. (1994), *Enzyme Microb. Technol.* 16, 608-615
21. Harayama, S., Leppik, R.A., Rekik, M., Mermod, N., Lehrbach, P.R., Reineke, W. y Timmis, K.N. (1986), *J. Bacteriol.* 167(2), 455-461
- 40 22. Gry, A., Shapiro, J., Fennewald, M., Bacha, P., Leahi, J., Markbreiter, K., Nieder, M. y Toepfer, M. (1975), *J. Bacteriol.* 123, 546-556
23. Yuste, L., Canosa, I. y Rojo, F. (1998), *J. Bacteriol.* 180(19), 5218-5226
- 45 24. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
25. Panke, S., Witholt, B., Schmid, A. y Wubbolts, M.G. (1998), *Appl. Environ. Microbiol.* 64(6), 2032-2043
- 50 26. Mavrovouniotis, M.L. (1990), *Biotechnol. Bioeng.* 36, 1070-1082
27. Mavrovouniotis, M.L. (1991) *The Journal of Biological Chemistry* 266(22), 14440-14445
28. Dean, J.A. (Hrsg.) (1985), *Lange's Handbook of Chemistry*, 13. Auflage, McGraw-Hill Book Company
- 55 29. Leonardo, M.R., Dailly, Y. y Clark, D.P. (1996), *J. Bacteriol.* 178(20), 6013-6018
30. Hanahan, D. (1983), *J. Mol. Biol.* 166, 557-580
- 60 31. Panke, et al., (1999) *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2324-2332
32. T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984)
- 65 33. Ausubel, F.M. et al., (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience
34. Pouwels P. H. et al, (1985) "Cloning Vectors", Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford

35. F. Ausubel *et al.*, (1997) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York

36. Nieboer, M., Vis, A.-J. y Witholt, B. (1996), *Euro. J. Biochem.* 241, 691-696

5

Documentos indicados en la descripción

Esta lista de documentos indicados por el solicitante se registró exclusivamente para la información del lector y no es parte componente del documento europeo de patente. Se compiló con el mayor esmero; La OEP no asume ninguna responsabilidad por errores u omisiones que se encontraren.

10

Literatura no patentes indicada en la descripción

- 15 • F. AUSUBEL. *Current Protocols in Molecular Biology* [0035]
- PANKE *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 2324-2332 [0050]
- HARAYAMA, S.; KOK, M.; NEIDLE, E.L. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1992, vol. 46, 565-601 [0098]
- 20 • HARAYAMA, S.; REKIK, M.; WUBBOLTS, M.; ROSE, K.; LEPPIK, R.A.; TIMMIS, K.N. *J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171 (9), 5048-5055 [0098]
- ABRIL, M.-A.; MICHAN., C.; TIMMIS, K.N.; RAMOS, J.L. *J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171 (12), 6782-6790 [0098]
- 25 • WILLIAMS, P.A.; SHAW, L.M.; PITT, C.W.; VRECL, M. *Microbiology*, 1997, vol. 143, 101-107 [0098]
- RAMOS, J.L.; MARQUÉS, S.; TIMMIS, K.N. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1997, vol. 51, 341-373 [0098]
- 30 • SUZUKI, M.; HAYAKAWA, T.; SHAW, J.P.; REKIK, M.; HARAYAMA, S. *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173 (5), 1690-1695 [0098]
- SHAW, J.P.; HARAYAMA, S. *Eur. J. Biochem.*, 1992, vol. 209, 51-61 [0098]
- 35 • WUBBOLTS, M. Dissertation, Rijksuniversiteit Groningen, 1994 [0098]
- SHAW, J.P.; HARAYAMA, S. *J. Ferm. Bioeng.*, 1995, vol. 79 (3), 195-199 [0098]
- 40 • BAPTIST, J.N.; GHOLSON, R.K.; COON, M.J. *Bioch. Biophys. Acta*, 1963, vol. 69, 40-47 [0098]
- CHAKRABARTY, A.M.; CHOU, G.; GUNSALUS, L.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, vol. 70 (4), 1137-1140 [0098]
- 45 • KOK, M.; OLDENHUIS, R.; V.D. LINDEN, M.P.G.; RAATJES, P.; KINGMA, J.; V. LELYVELD, P.H.; WITHOLT, B. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264 (10), 5435-5441 [0098]
- VAN BEILEN, J.B.; WUBBOLTS, M.G.; WITHOLT, B. *Biodegradation*, 1994, vol. 5, 161-174 [0098]
- 50 • SHANKLIN, J.; WHITTLE, E.; FOX, B.G. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 12787-12794 [0098]
- SHANKLIN, J.; ACHIM, C.; SCHMIDT, H.; FOX, B.G.; MÜNCK, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 2981-2986 [0098]
- 55 • SHAW, J.P.; HARAYAMA, S. *Eur. J. Biochem.*, 1990, vol. 191, 705-714 [0098]
- SHAW, J.P.; SCHWAGER, F.; HARAYAMA, S. *Biochemical Journal*, 1992, vol. 283, 789-794 [0098]
- 60 • SHAW, J.P.; REKIK, M.; SCHWAGER, F.; HARAYAMA, S. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 10842-10850 [0098]
- KUNZ, D.A.; CHAPMAN, P.J. *J. Bacteriol.*, 1981, vol. 146 (1), 179-191 [0098]
- WUBBOLTS, M.G.; REUVEKAMP, P.; WITHOLT, B. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, vol. 16, 608-615
- 65 • HARAYAMA, S.; LEPPIK, R.A.; REKIK, M.; MERMOD, N.; LEHRBACH, P.R.; REINEKE, W.; TIMMIS, K.N. *J. Bacteriol.*, 1986, vol. 167 (2), 455-461

ES 2 304 738 T3

• **GRY, A.; SHAPIRO, J.; FENNEWALD, M.; BACHA, P.; LEAHI, J.; MARKBREITER, K.; NIEDER, M.; TOEPFER, M.** *J. Bacteriol.*, 1975, vol. 123, 546-556 [0098]

• **YUSTE, L.; CANOSA, I.; ROJO, F.** *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180 (19), 5218-5226 [0098]

• **SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.** *Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1989 [0098]

• **PANKE, S.; WITHOLT, B.; SCHMID, A.; WUBBOLTS, M.G.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64 (6), 2032-2043 [0098]

• **MAVROVOUNIOTIS, M.L.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, vol. 36, 1070-1082 [0098]

• **MAVROVOUNIOTIS, M.L.** *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266 (22), 14440-14445 [0098]

• *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill Book Company, 1985 [0098]

• **LEONARDO, M.R.; DAILLY, Y.; CLARK, D.P.** *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178 (20), 6013-6018 [0098]

• **HANAHAN, D.** *J. Mol. Biol.*, 1983, vol. 166, 557-580 [0098]

• **PANKE et al.** *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, 2324-2332 [0098]

• **T.J. SILHAVY; M.L. BERMAN; L.W. ENQUIST.** *Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1984 [0098]

• **AUSUBEL, F.M. et al.** *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, 1987 [0098]

• **POUWELS P. H. et al.** *Cloning Vectors*. Elsevier, 1985 [0098]

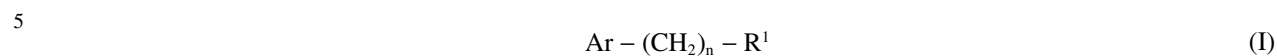
• **F. AUSUBEL et al.** *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, 1997 [0098]

• **NIEBOER, M.; VIS, A.-J.; WITHOLT, B.** *Euro. J. Biochem.*, 1996, vol. 241, 691-696 [0098]

ES 2 304 738 T3

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la preparación aldehídos y/o ácidos carboxílicos aromáticos de la fórmula general (I)



en la cual

10 Ar representa un anillo aromático de un núcleo sustituido opcionalmente una o varias veces;

R¹ representa un grupo que contiene oxígeno -CHO o -COOH; y

15 n representa una valor de número entero de 0 hasta 15,

caracterizado porque comprende

a) cultivar un microorganismo en un medio de cultivo, el cual contiene un sustrato aromático de la fórmula II



En la cual

25 Ar tiene los significados indicados arriba, y

R² representa -CH=CH₂ o -(CH₂)_n+1R³, en la cual

30 n se define tal como se indicó arriba y

R³ representa H o OH;

35 o, si R¹ representa -COOH, R² puede representar también -(CH₂)_nR⁴, en la cual n se define tal como se indicó arriba y R⁴ representa -CHO;

dicho microorganismo expresa alcanmonooxigenasa (AMO), y la AMO expresada cataliza la oxidación del sustrato de la fórmula II hasta un compuesto de la fórmula I;

40 b) El o los compuestos de la fórmula (I) se aíslan del medio de cultivo.

2. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el microorganismo que expresa AMO no tiene esencialmente actividad de alcanoldeshidrogenasa ni/o de alcanaldeshidrogenasa (AADH).

45 3. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se usa un microorganismo recombinante el cual se transforma con un vector de expresión el cual contiene a los genes alkB, alkG y alkT que codifican en enlace operativo para AMO bajo el control genético del alk-sistema regulador a partir de *Pseudomonas oleovorans* GPoI.

50 4. Proceso según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el microorganismo se transforma con el plásmido de expresión pSPZ3.

5. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el microorganismo es una bacteria del tipo Escherichia.

55 6. Proceso según una de las reivindicaciones 3 hasta 5, **caracterizado** porque la expresión de la enzima se inicia por la adición de un inductor al medio de cultivo.

60 7. Proceso según una de las reivindicaciones 1 hasta 6, **caracterizado** porque se hace reaccionar un compuesto de la fórmula II en la que R² representa -(CH₂)_m-R³, en la que R³ es tal como se define arriba y m representa un valor de número entero de 6 hasta 13, con un microorganismo que expresa actividad de AMO.

65 8. Uso de un microorganismo recombinante que contiene un vector de expresión, el cual contiene los genes alkB, alkG y alkT en enlace operativo codificadoras para AMO bajo el control genético del sistema alk-regulador de *Pseudomonas oleovorans* GPoI, para la preparación microbiológica de compuestos aromáticos de la fórmula general I.

9. Uso según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el microorganismo se selecciona de entre las bacterias del tipo Escherichia y Pseudomonas.

ES 2 304 738 T3

10. Uso según la reivindicación 8 ó 9, **caracterizado** porque el microorganismo se transforma con el plásmido pSPZ3.

5 11. Uso de un elemento de expresión que que contiene los genes alkB, alkG y alkT en enlace operativo que codifican para AMO bajo el control genético del alk-sistema regulador de *Pseudomonas oleovorans* GPo1 para la preparación microbiológica de compuestos aromáticos de la fórmula I.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

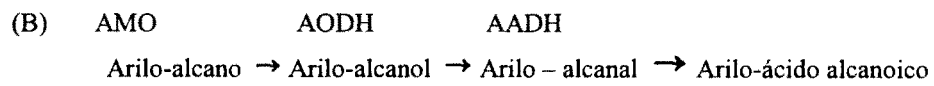
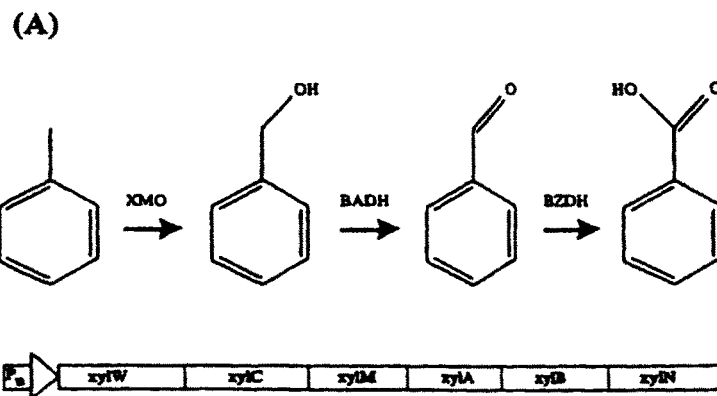


Fig. 1

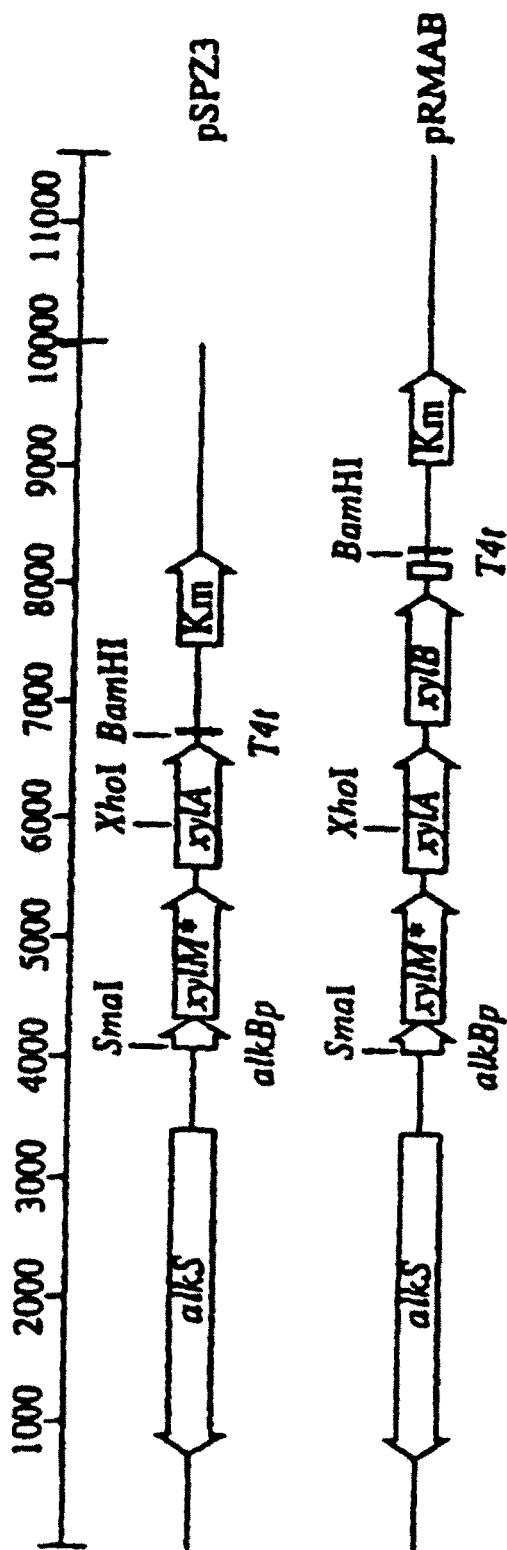


Fig. 2

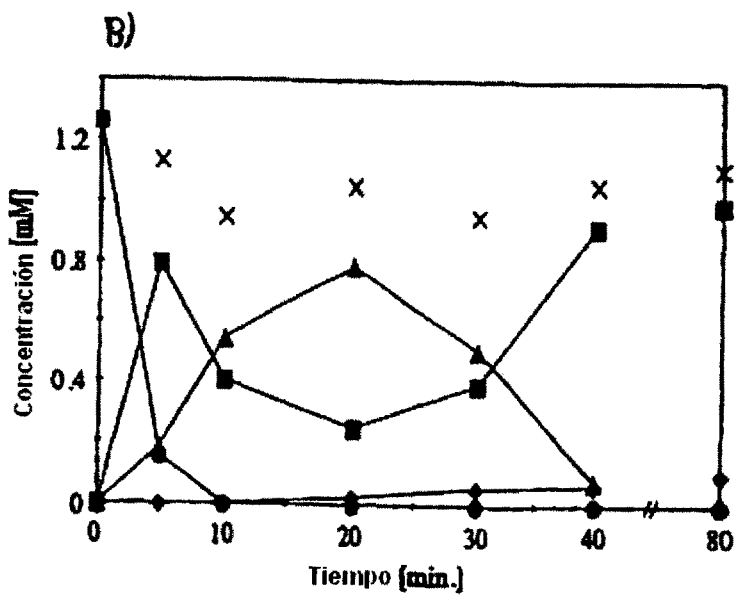
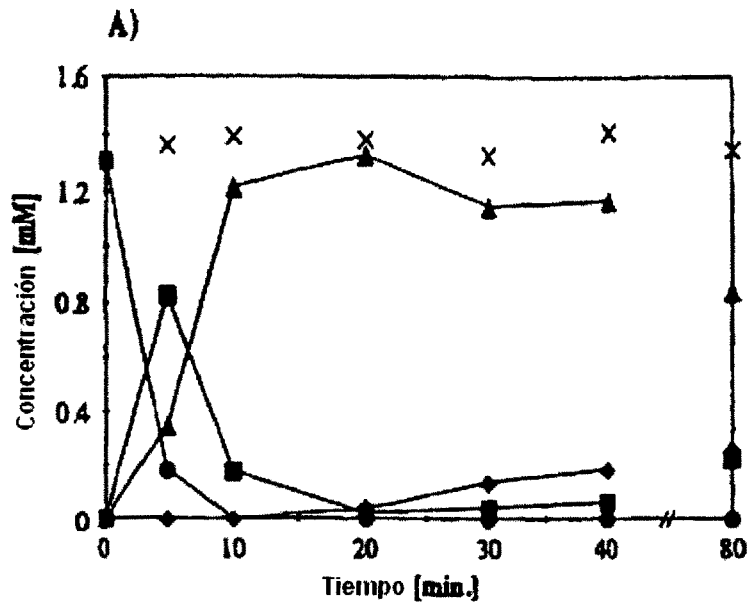


Fig. 3

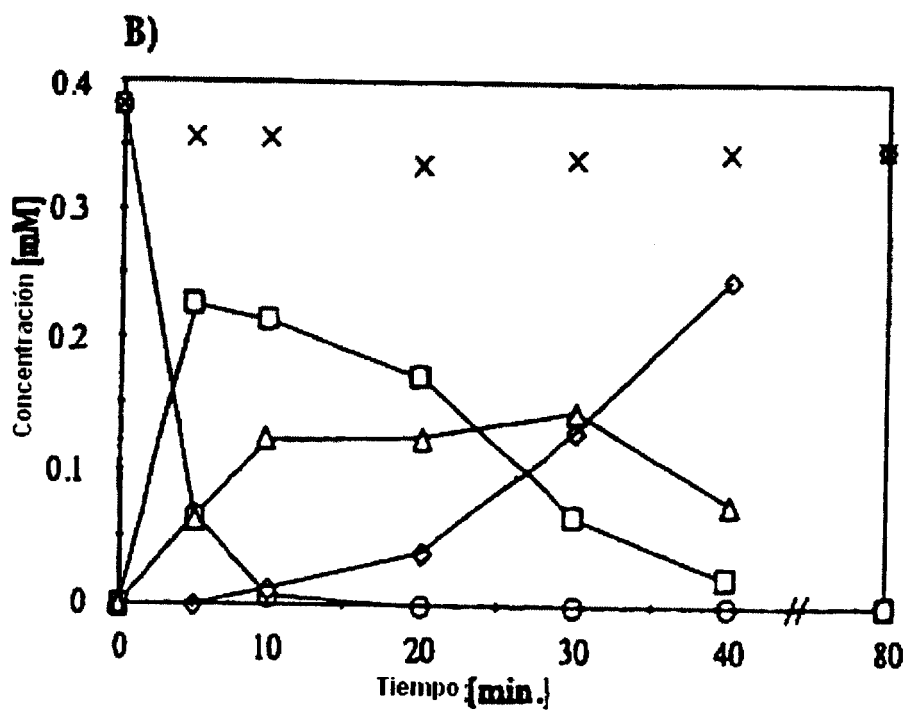
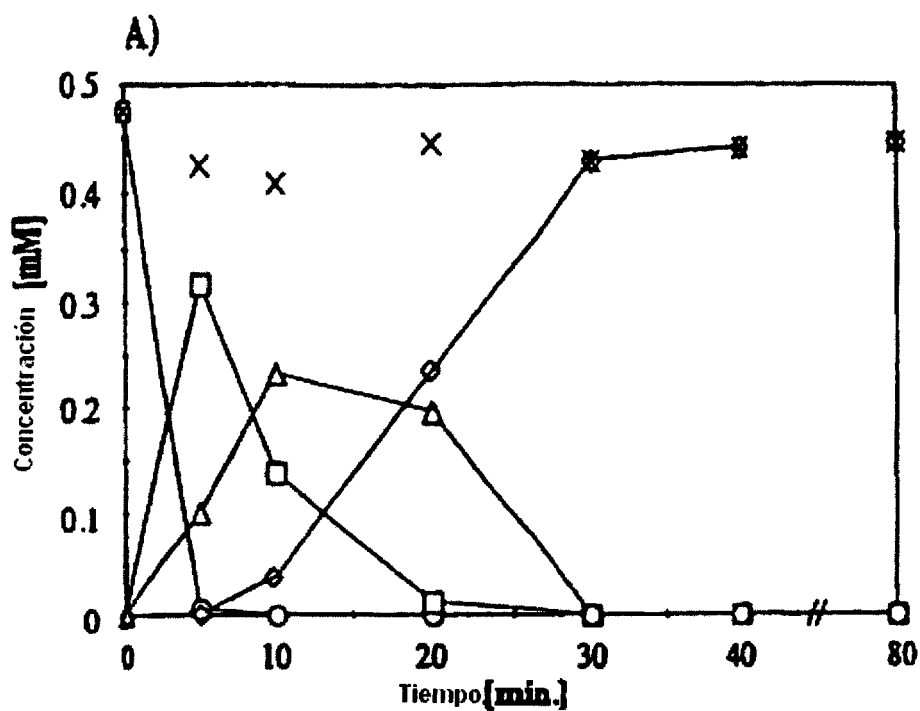


Fig. 4

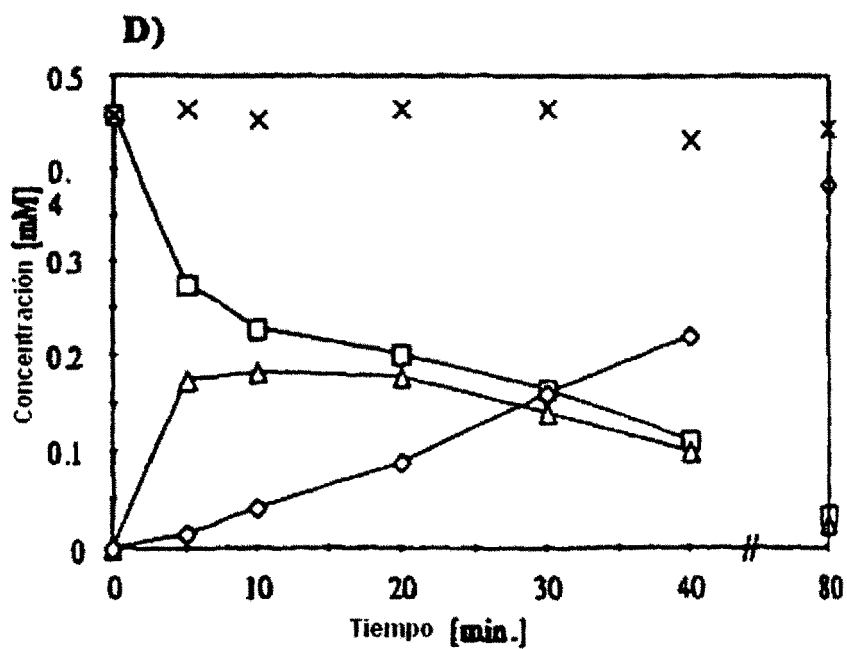
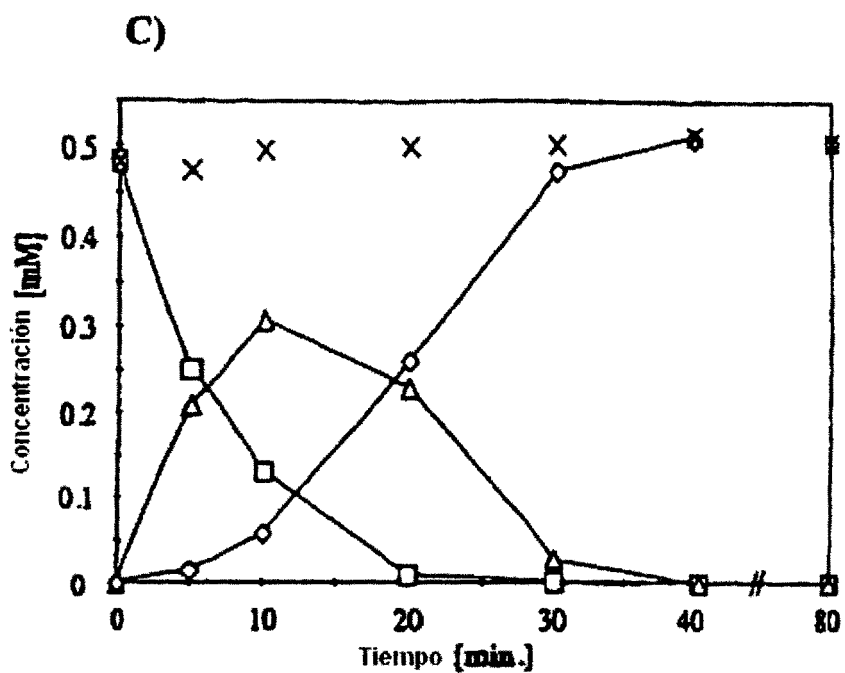


Fig. 4 (Cont.)

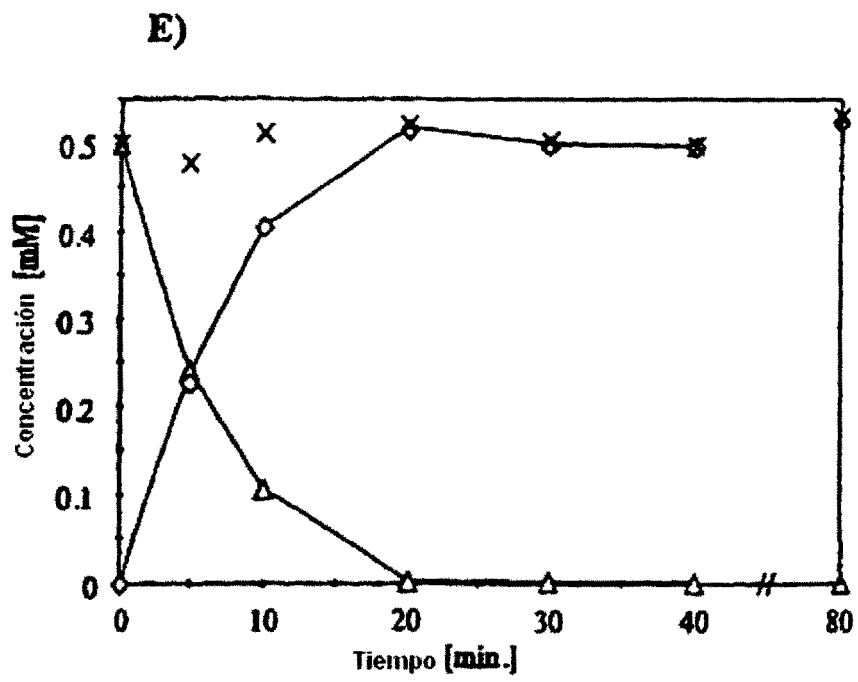


Fig. 4 (Cont.)

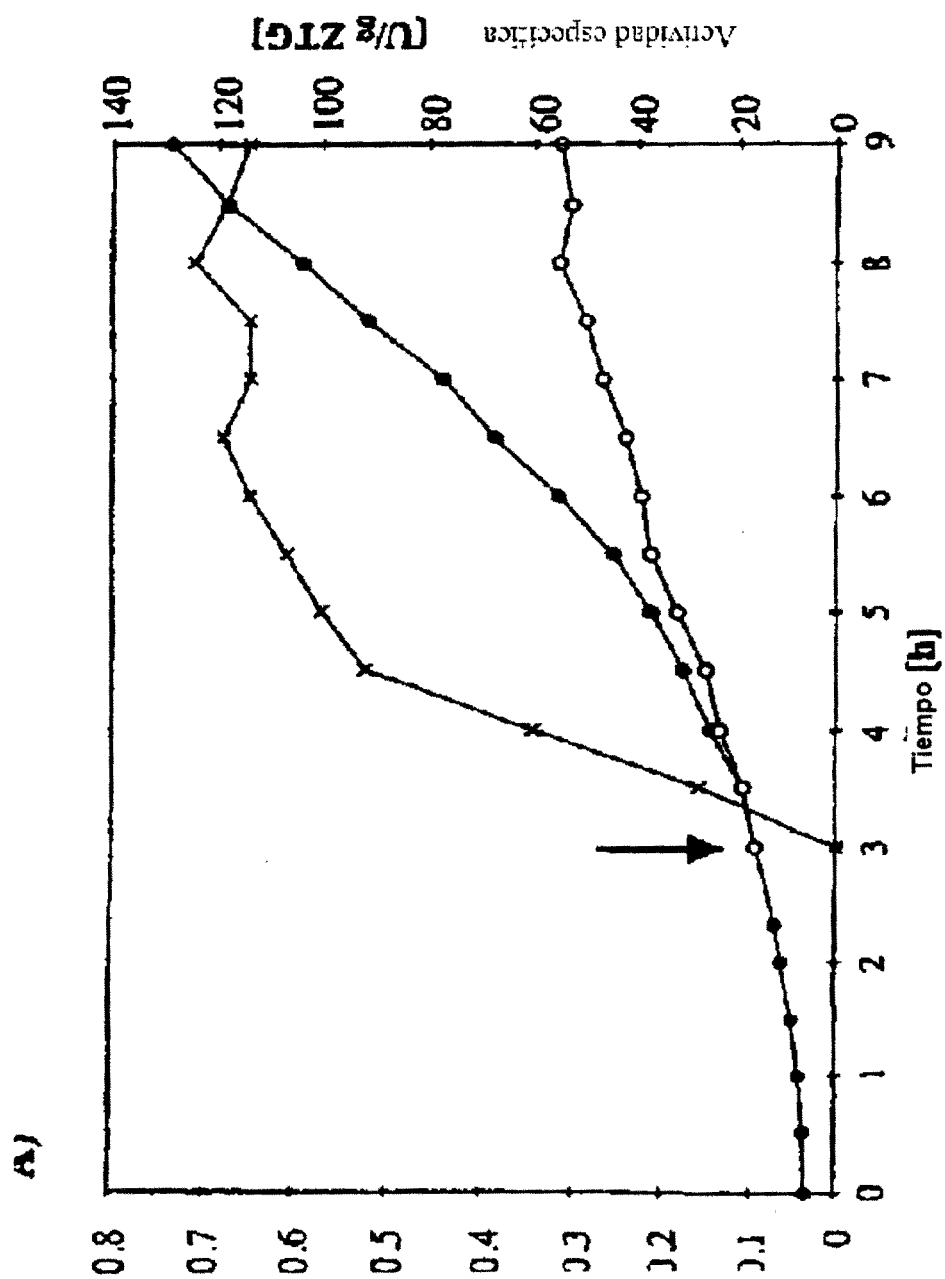


Fig. 5

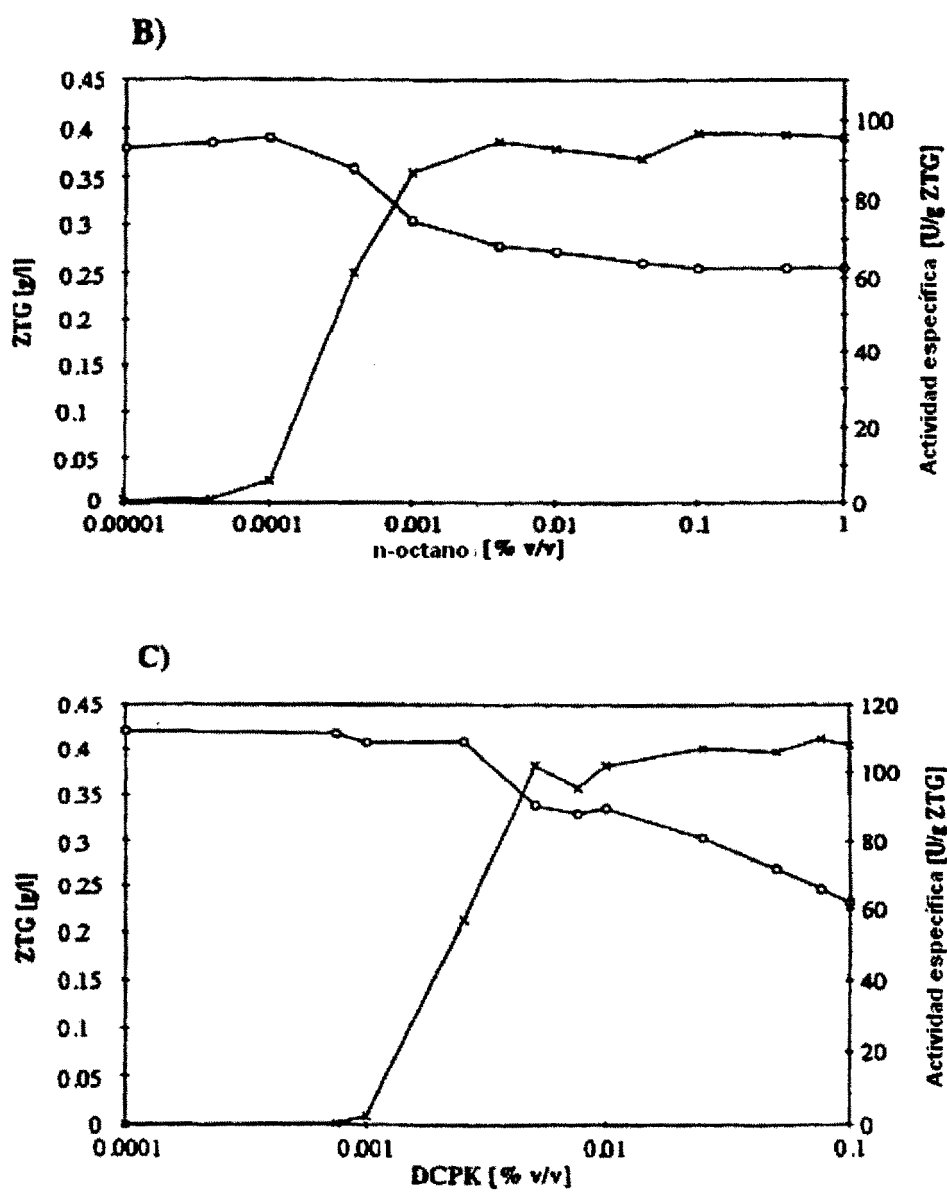


Fig. 5 (Cont.)

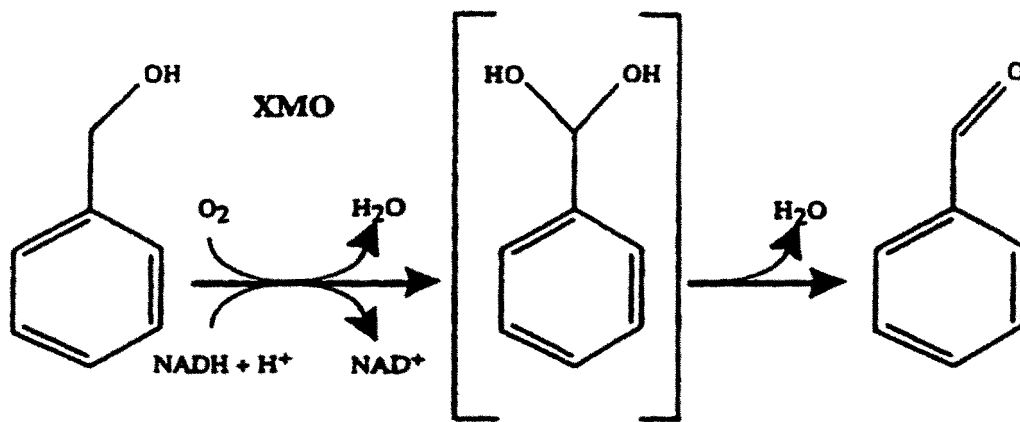


Fig. 6