



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 486**

51 Int. Cl.:
C12P 17/12 (2006.01)
C07D 239/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02735162 .6**
96 Fecha de presentación : **22.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1409707**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de sustancias útiles de los organismos.**

30 Prioridad: **23.03.2001 DE 101 14 189**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2009

73 Titular/es: **Bitop Aktiengesellschaft für
Biotechnische Optimierung
Stockumer Strasse 28
58453 Witten, DE**

72 Inventor/es: **Kunte, Hans, Jörg;
Galinski, Erwin, A.;
Grammann, Katrin;
Volke, Angela y
Bestvater, Thorsten**

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

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 obtención de sustancias útiles de los organismos.

5 La presente invención hace referencia a un procedimiento para la producción permanente de sustancias útiles en organismos, que dispongan de información genética para la producción de las sustancias útiles y de mecanismos de regulación para el control de la producción. Por “sustancias útiles” se entiende conforme a la presente invención ectoína y/o hidroxiectoína.

10 Los mecanismos de regulación para la limitación de la biosíntesis son, por una parte, sistemas de transporte y captación, y por otra, por los llamados “cuellos de botella” metabólicos. Los sistemas de transporte y captación conducen la sustancia útil ya producida de nuevo a la célula y presentan, por tanto, la señal para la parada de la biosíntesis. Para evitar este mecanismo, o bien se deshabilitan estos sistemas “naturales” de transporte y captación o se introduce el gen necesario para la síntesis en un organismo extraño sin sistemas de transporte y captación o, al menos, con un sistema de transporte defectuoso. En organismos extraños existen, sin embargo, eventualmente “cuellos de botella” metabólicos, que limitan también la biosíntesis.

Bajo el término “producción permanente” se entiende la extracción continua de las sustancias útiles de las células, produciendo en las células de nuevo, independientemente de su crecimiento y multiplicación, nuevas sustancias útiles debido a pérdidas. La producción permanente puede efectuarse tanto en células crecientes y/o que se multiplican como también en células no crecientes y/o que no se multiplican.

25 La producción biotecnológica de sustancias útiles tiende a obtener estas sustancias útiles en alta concentración en las células o en el medio mediante autosíntesis (y/o bioconversión de las etapas previas) o mediante la expresión recombinante de vías metabólicas en las cepas de producción. Si los productos se encuentran enriquecidos en las células, el estado actual de la técnica para la obtención consiste en abrir las células, permeabilizarlas o inducir las de otro modo (ver, “ordeñado de bacterias”) a la emisión de las sustancias útiles. Resulta desventajosa la baja concentración final de sustancias útiles en la disolución de producto y los altos costes asociados para la purificación del producto (“downstream processing”).

30 La DE 199 25 615 A describe un procedimiento para la producción de ectoína en organismos no-halófilos. Para habilitar estos organismos para la producción de ectoína, se extraen genes de ectoína de organismos halófilos y se transfieren a los microorganismos productores. En los microorganismos productores faltan totalmente los cuellos de botella metabólicos o están deshabilitados.

35 K. Graminon, A. Volke y H. J. Kunte, Revista de Bacteriología, vol. 184, n° 11, junio 2002, pág. 3078-3085 describen por primera vez un transportador de tetrahidropirimidina de una bacteria halófila y un sistema de captación osmoregulado, que se relaciona con la familia de transportadores de TRAP.

40 R. Rabus *et al.*, Microbiología (Reading), vol. 145, n° 12, diciembre 1999, pág. 3431-3445 describen el transporte de C₄-dicarboxilatos mediante transportadores de TRAP y supresiones en los transportadores.

El objeto de la presente invención consiste en un procedimiento conforme a la Reivindicación 1, que posibilite la obtención de sustancias útiles deshabilitando o dañando en su función los sistemas de captación altamente afines para estas sustancias útiles y/o empleando cepas de producción, a las que les falten los citados sistemas de captación. El descubrimiento sorprendente, consiste en que el gradiente de concentración observado a lo largo de la membrana celular no se mantiene sólo porque las membranas sean impermeables a la sustancia útil, sino también gracias a que los sistemas de captación altamente afines que transportan rápidamente las sustancias útiles son “fugadas” de nuevo a la célula. De este modo se origina una situación sólo aparentemente estacionaria, pues en realidad se trata de un reciclado constante de sustancias útiles “evacuadas”. La idea de la presente invención consiste en deshabilitar o dañar estos sistemas de recaptación, de forma que las sustancias útiles producidas salgan al medio circundante de manera continua siguiendo el gradiente de concentración. Debido a los mecanismos propios de regulación, se restituyen las sustancias evacuadas. Esta regeneración de las sustancias útiles perdidas es independiente del crecimiento y multiplicación de las células y puede efectuarse también con células que no crecen y/o que no se multiplican. En las condiciones apropiadas, se trata de una conversión del sustrato en la sustancia útil deseada y corresponde al proceso de una biocatálisis. Dependiendo de si la nueva síntesis puede o no mantenerse con la velocidad del paso de liberación, se ajusta en las células una concentración de la sustancia útil, que corresponda a la concentración natural o sea inferior a ella. El rendimiento de biosíntesis corresponde, en estado de equilibrio, a la velocidad de obtención del producto. El procedimiento conforme a la invención puede aplicarse también, por ejemplo, a la producción de sustancias útiles osmóticamente inducidas en las condiciones poco osmóticas (medios pobres en sales). La máxima concentración alcanzable en el medio corresponde a la concentración máxima alcanzable en la célula (en las condiciones dadas). Se puede lograr, en el caso más favorable, dimensiones moleculares con técnicas habituales de fermentación.

65 De cara a un rendimiento espacio-temporal lo más alto posible, el procedimiento conforme a la invención se complementa con medidas apropiadas, que refuerzan la autobiosíntesis de las sustancias útiles y/o (en caso de transferencia de una vía metabólica a una cepa productora apropiada) eliminen los posibles cuellos de botella metabólicos. Esto puede realizarse, por ejemplo, modificando las condiciones del medio y de crecimiento y/o combinando las vías

metabólicas transferidas con otros genes (genes colaboradores), que eliminen los cuellos de botella reguladores o funcionales.

De los productos, que pueden obtenerse por el procedimiento conforme a la invención, han de citarse los solutos compatibles del grupo de las ectoínas, que, o bien como sustancia pura o en combinación con otras sustancias, estabilicen a las biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos), estructuras complejas “self assembly” (por ejemplo, ribosomas; complejos proteína-ADN, proteína-proteína y proteína-azúcar; películas lipídicas, membranas, etc.) o también células completas [da Costa *et al.* 1997]. Otras posibilidades de aplicaciones se encuentran en el empleo como sustancia hidroligante (moisturizer) y principio activo en agentes para el cuidado de la piel y del cuerpo, como probióticos, nutracéuticos y en formulaciones farmacéuticas.

La eliminación y/o influencia de los sistemas de transporte conformes a la invención para la producción de sustancias útiles puede realizarse de diferentes maneras:

- a) mediante mutación de los genes codificadores en los organismos productores
- b) mediante inhibición/desactivación del sistema de transporte a nivel proteínico
- c) mediante obtención de los genes para una vía de biosíntesis determinada y transferencia a una cepa de producción que, o bien, no tiene naturalmente ningún sistema de transporte apropiado o lo tiene deshabilitado.

Los genes que codifican el transportador específico de la sustancia útil pueden mutarse con ayuda de diferentes métodos genéticos, por ejemplo, mutagenesis de transposón o mutación selectiva (por ejemplo, supresiones) mediante técnica de PCR. Como cepa de producción para la obtención de sustancias útiles debería seleccionarse un organismo que posea la menor cantidad de transportador posible para la sustancia a producir. Este trasfondo genético ofrece la ventaja de que posiblemente sólo tenga que deshabilitarse un transportador y, por tanto, se construya una cepa de producción, que no pueda reabsorber y metabolizar la sustancia útil en ninguna de las condiciones de cultivo seleccionadas. Esto amplía las posibilidades de cultivo y técnicas de producción del procedimiento de la invención.

Alternativamente es posible una modificación de los sistemas de transporte añadiendo antimetabolitos al medio que se ligen al transportador (sin transportarse) y originar de éste u otro modo una modificación de la proteína de transporte, de forma que ya no sea capaz, o sólo en pequeña medida, de asumir la función del transporte de sustancias útiles.

La transferencia de genes para la producción de la sustancia útil se efectúa para poder emplear cepas productoras conocidas, como por ejemplo, *E. coli*, *Bacilo subtilis* y *Corynebacterium glutamicum*, e independizarlas de este modo de las cepas productoras naturales, que son muy malas de cultivar o exigen condiciones de cultivo inusuales.

En el caso de la producción de ectoína se desea una transferencia de los genes codificadores para las enzimas de síntesis de la ectoína a cepas de producción no-halófilas (como por ejemplo, *E. coli*), para resolver los problemas de corrosión y de eliminación justificados en el empleo de medios que contengan sales. Durante la transferencia genética de una vía metabólica completa hay que considerar, sin embargo, la regulación compleja en el organismo receptor. Así se pueden extraer también los genes de ectoína en organismos no-halófilos [Galinski & Louis 1997, Louis & Galinski 1997], aunque la velocidad de producción se regule también allí osmóticamente y se limite mediante un cuello de botella metabólico (por ejemplo, en la etapa de la aspartatoquinasa).

Para la ejecución del procedimiento conforme a la invención resulta favorable el cultivo en un fermentador. Además, las condiciones del entorno han de seleccionarse de forma que el cultivo permanezca el mayor tiempo posible en la fase de crecimiento y/o se alcancen altas densidades celulares (por ejemplo, fermentación de alta densidad celular) o las células se impidan en su crecimiento mediante limitación de nutrientes, de forma que la fuente de C (fuente de carbono) ofrecida se transforme lo más completamente posible en sustancia útil. En el caso de una transferencia de una vía de biosíntesis para la sustancia útil a una cepa productora, tienen que producirse adicionalmente las condiciones apropiadas para inducir a los genes (si fuera necesario, en combinación con genes colaboradores). La estrategia de producción descrita se puede modificar también, de forma que las células se separen de la disolución de producción mediante inmovilización o mediante una membrana (por ejemplo, tubo de diálisis). Después de alcanzar la concentración máxima de producto, podría transferirse la masa celular a un nuevo medio (“principio de la bolsita de té”) y continuar así el proceso en continuo. El procedimiento descrito se presenta particularmente cuando la sustancia útil se haya formado a través de una vía de síntesis energéticamente independiente (por ejemplo, el derivado de aminoácido ectoína). En este caso es posible transformar completamente la fuente de C (fuente de carbono) ofrecida en sustancia útil (“bioconversión”), de forma que el organismo asuma la función de un biocatalizador.

Si se seleccionara y/o construyera una variedad de producción óptima, sería posible, con las técnicas de producción descritas, enriquecer la sustancia útil en alta concentración (hasta 0.5 M y más) fuera de la célula, sin que las células tuvieran que cosecharse y abrirse del medio, permeabilizarse temporalmente o inducirse de otro modo (por ejemplo, por tensión de dilución) a la emisión de las sustancias. Las células de producción permanecen idealmente en el medio hasta que los componentes del medio (por ejemplo, una fuente de C -una fuente de carbono-) se hayan consumido completamente, para simplificar la posterior purificación.

Para el caso de que la sustancia útil sólo saliera insuficiente a través de la membrana, se puede modificar también el procedimiento para organismos, por ejemplo, osmófilos o halófilos, de forma que las células se expongan a una tensión de dilución. Este “choque hipoosmótico” induce la emisión de las sustancias útiles al medio. El procedimiento aquí descrito tiene la ventaja, frente al “ordeñado de bacterias” habitual, de que las células de producción y el producto no tienen que seguirse separando tras la emisión del producto, ya que las células han perdido la capacidad de absorber nuevamente las sustancias útiles. Antes bien, directamente después de la tensión de dilución osmótica puede elevarse de nuevo la concentración de sustancias disueltas (por ejemplo, NaCl, PEG, etc.) (“choque hiperosmótico”) e introducirse la nueva producción de sustancias útiles. Este proceso puede configurarse también en continuo, de manera similar al “ordeñado de bacterias” clásico.

El principio fisiológico que sirve de base a la invención y posibilita obtener sustancias útiles mediante el cambio y/o modificación de transportadores de soluto, debería aclararse en base al transportador de TRAP (TRAP-T) conforme a la invención con el nombre TeaABC de la *Halomonas elongata*.

Los sistemas TRAP-T son transportadores, que adquieren su energía para el transporte de sustancias del propio potencial de la membrana de la célula y se diseñan, por tanto, como un transportador secundario. Los sistemas TRAP-T cuentan con una proteína ligante del sustrato, que se localiza fuera de la célula, y un dominio de membrana. El dominio de membrana del sistema TRAP-T consiste o bien en una proteína transmembranaria pequeña y una grande o en una proteína de fusión de ambas proteínas membranas. El transportador TeaABC de la *H. elongata* es un sistema TRAP-T con dos proteínas de membrana. El TeaABC transporta los solutos compatibles ectoína y hidroxiectoína (sustancias útiles) con tensión osmótica al interior de la célula (citoplasma) y posibilita el enriquecimiento de estas sustancias en altas concentraciones molares, para preparar un equilibrio osmótico entre la célula y el medio externo. El TeaABC se activa por tensión osmótica, se trata de un sistema de transporte osmoregulado. El objetivo principal del TeaABC no consiste ahora en absorber del medio la ectoína extraña a la célula. Esto se explica, por un lado, por el hecho de que la ectoína no figure naturalmente en el medio en alta concentración. Se ha demostrado adicionalmente que la destrucción del transportador conlleva una pérdida continua de ectoína. Obviamente, el TeaABC se emplea principalmente para transportar la ectoína propia de la célula de nuevo a la célula. La pérdida de ectoína no es ahora, sin embargo, ninguna operación no específica. Más bien parece que el soluto abandona la célula a través de un poro especial, es decir, cuando haya suficiente ectoína en el interior de la célula por autosíntesis. Respecto al exterior de la célula (periplasma), la ectoína es combinada por la proteína ligante del sustrato TeaA del transportador TeaABC y se transporta de nuevo a la célula. El transporte de ectoína de nuevo a la célula sirve como señal de que se ha sintetizado suficiente soluto compatible ectoína y acto seguido se ajusta la síntesis de ectoína de la célula. Como intermediario entre el transportador activo y la síntesis de ectoína resulta apropiada una proteína reguladora con el nombre TeaD. La TeaD es codificada por un gen, que se encuentra junto a los genes del transportador TeaABC y probablemente se sintetiza junto con estos. La TeaD tiene que interactuar con el transportador TeaABC y reconocer que el sistema de transporte recibe ectoína. Esta actividad se transmite probablemente mediante fosforilación y conlleva la regulación negativa apropiada de la síntesis de ectoína. La importancia de la TeaD como regulador se ha confirmado mediante experimentos de mutación. La destrucción de la TeaD conlleva, en el caso de un transportador activo TeaABC, que la ectoína salga de la célula. Aunque el TeaABC transporte ectoína, puede no transmitirse esta señal y que la síntesis de ectoína permanezca a un nivel demasiado alto. Una destrucción y/o modificación de TeaABC conlleva, por tanto, no sólo que la ectoína abandone la célula, sino también que la pérdida se compense mediante síntesis creciente, ya que la célula no ha obtenido ninguna señal negativa del TeaABC y TeaD. Los mutantes, tal y como se representan en el ejemplo procedimental 1, son, por tanto, tanto los mutantes de soporte crónico como también los sobreproductores para sustancias útiles.

El objetivo de obtener sustancias útiles por medio de sistemas de transporte modificados y/o dañados puede alcanzarse también sintetizando los genes de la biosíntesis para las sustancias útiles deseadas en cepas productoras con sistemas de transporte correspondientemente modificados o totalmente ausentes. La ventaja consiste en que una variedad productora apropiada sólo se tiene que producir una vez (por ejemplo, una variedad de *E. coli*, a la que le falten todos los sistemas de transporte osmoregulados), en la que puede producirse entonces diferentes sustancias útiles.

Mientras que la expresión recombinante está controlada, en principio, por los genes extraños individuales en las cepas productoras, surge siempre el problema durante la transferencia de las vías metabólicas completas de que también tengan que incluirse aspectos de regulación de la cascada enzimática (por ejemplo, las regulaciones de la concentración citoplasmática de etapas previas). Para el caso de la transferencia del grupo de genes para la biosíntesis de ectoína, esto significa que el cuello de botella biosintético (una aspartoquinasa estrictamente regulada) para esta vía de biosíntesis (“cuello de botella”) sólo puede abrirse introduciendo otro gen, o sea, una aspartoquinasa desregulada.

Ejemplo de ejecución 1

Obtención de la sustancia útil ectoína a partir de la eubacteria Halomonas elongata DSM2581T mediante mutación del transportador de ectoína TeaABC

(A) construcción de un mutante de transporte de ectoína de Halomonas elongata

El gen *teaC*, codificado para la gran subunidad transmembranaria del transportador osmoregulado de ectoína TeaABC de la familia TRAP-T [Forward *et al.* 1997], se suprime con ayuda de la técnica SOE-PCR (splicing by overlap extension). El fragmento de ADN resultante con las secuencias conectadas ahora aguas arriba y abajo del

teaC se introduce con ayuda del plásmido conjugado pK18mobsacB [Schäfer *et al.*] en el tipo natural de *H. elongata*. Mediante recombinación homóloga se lleva a cabo un intercambio del AND de tipo natural por el del fragmento de supresión. El mutante de supresión *H. elongata* KB2 ($\Delta teaC$) resultante de ello deja de ser capaz de acoger ectoínas con tensión osmótica.

(B) Medio de Cultivo

Medio glucosa-sal mineral (VVM): NaCl (100 g/l); KCl (1 g/l); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (6,5 g/l); NH_4Cl (3 g/l); K_2HPO_4 (0,5 g/l); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,01); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01); D-glucosa (H_2O) (11 g/l), extracto de levadura (0,1 g/l), disolución de elemento de traza (TES; Claus *et al.* 1983) (1 ml/l); disolución de vitaminas-VA (Imhoff & Trüper 1977) (1 ml/l).

(C) Condiciones de Cultivo

El *H. elongata* KB2 ($\Delta teaC$) se introduce en un fermentador en V Biostat con un volumen activo de 4 l a 30°C en un proceso fed-batch. La concentración de glucosa en la disolución de cultivo se mantiene añadiendo entre 5 g/L y 15 g/L de una disolución fed-batch concentrada (594,6 g/l de glucosa-monohidrato; 133,6 g/l de NH_4Cl ; 87 g/l de K_2HPO_4 ; 100 g/L de NaCl). El cultivo se ventila con aire comprimido (3 l/min), el número de revoluciones del agitador asciende a 250 rpm. La regulación del valor del pH a pH 7,2 se lleva a cabo mediante la adición estéril de HCl (1 M) o NaOH (5 M) a través de bombas peristálticas. El aumento del número de células se observa determinando el contenido de proteínas celulares y midiendo la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}).

(D) Toma de Muestras, Analítica

Las muestras para la determinación del contenido de glucosa en el medio, del contenido de proteínas celulares, de la OD_{600} y del contenido de ectoína en el medio se extraen a través de una cánula en la tapa del fermentador. Para la determinación del contenido de ectoína en el medio se centrifugan las células y se miden los sobrenadantes del medio sobre un HPLC isocrático con detección de UV.

(F) Enriquecimiento de Ectoína en el Medio

La ectoína (pero no la hidroxiectoína) se enriquece en el medio en el transcurso del proceso global de fermentación. Al alcanzar la OD_{600} máxima de 54,0, el organismo pierde aprox. 8,2 g de ectoína. De este modo, aprox. un 60% de toda la ectoína se encuentra en el medio. También en fase estacionaria, la *H. elongata* KB2 sintetiza ectoína, y la concentración final del ectoína externa asciende a 15 g/l (aprox. 100 mM). De este modo se libera al medio aprox. un 90% de la ectoína formada. La *H. elongata* ajusta la producción de ectoína con consumo de la glucosa como fuente de C (como fuente de carbono).

Ejemplo de ejecución 2

Obtención de la sustancia útil ectoína mediante construcción de un vector, que combine genes de síntesis de ectoína con un gen colaborador (aspartatoquinasa desregulada) para la transferencia a cepas de producción defectuosas en el transporte

El documento de patente DE 199 25 615 A1 (7.12.2000) muestra un procedimiento apropiado para transferir la vía de biosíntesis de ectoína completa con apertura simultánea de los posibles cuellos de botella metabólicos a otros organismos (por ejemplo, *E. coli* DH5 α) y producir, de este modo, ectoína en medios pobres en sales. Sin embargo, en contra de las expectativas, no se obtuvo de este modo ninguna sobreproducción, probablemente porque a los genes de ectoína les faltaba un promotor apropiado y porque a nivel proteínico existe una regulación feed-back de los genes de ectoína. Este ejemplo procedimental describe la construcción de un vector pAKECT1, en el que los genes de ectoína están bajo el control del promotor propio (ectUP) y están combinados con el gen colaborador *lysC* (de la *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B). De este modo puede obtenerse, con una apertura de los cuellos de botella metabólicos en la *E. coli*, una biosíntesis de ectoína, que conlleva en las cepas productoras defectuosas en el transporte la sobreproducción deseada en un entorno de baja salinidad.

(A) Construcción del Vector pAKECT1

Un fragmento de ácido nucleico de la bacteria Gram-positiva halófila *Marino-coccus halophilus*, que porta los genes para la síntesis del soluto ectoína compatible (*ectA*, *ectB*, *ectC*), y un fragmento de ácido nucleico de la bacteria Gram-positiva *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B [Cremer *et al.* 1991], que porta el gen para una enzima aspartatoquinasa (*lysC*) resistente a la inhibición "feed-back", se ligaron por medio de procedimientos estándar de biología molecular a partir de los plásmidos pOSM12 y/o pRK1 en el vector pHSG575. Al contrario que el plásmido pAKECT2, en el que el grupo de genes de la ectoína se encuentran bajo el control del promotor *lac* y el gen para la aspartatoquinasa bajo el control del promotor *tac*, los genes de la ectoína están controlados en plásmido pAKECT1 por las secuencias reguladoras propias ectUP.

(B) *Transferencia del Vector a E. coli DH5α*

La construcción se transfirió a la *Escherichia coli* DH5α mediante transformación de CaCl₂ [Hanahan 1983]. La identificación de los clones con ADN extraño se efectuó por vías genéticas por medio del aislamiento de plásmidos, la digestión restrictiva y electroforesis en gel de agarosa por métodos biomoleculares conocidos [Ausubel *et al.* 1992].

(C) *Determinación del Contenido Intracelular de Ectoína en la E. coli DH5α*

El organismo receptor *Escherichia coli* DH5α que contiene el plásmido recombinante se cultivó en medio glucosal mineral MM63 según Larsen *et al.* [1987] con diferentes concentraciones de sal (1-5% - NaCl). El cultivo se efectuó en un matraz de Erlenmeyer de 250-ml con traba en 100 ml de medio (agitador rotatorio Innova 4232 del Fab. New Brunswick, Edison; 150 rpm, 37°C). El material celular obtenido se separó por centrifugación (4°C, 2.800 g, 15 min, centrífuga Universal R16, Hettich, Tuttlingen), se secó a 70°C y se extrajo para la obtención del soluto compatible presente en el interior de las células [Galinski 1986]. El análisis del espectro de soluto intracelular se efectuó por medio de HPLC isocrática [Galinski 1986]. Se comparó además la producción de ectoína de las construcciones AKECT2 y AKECT1, es decir, sin y con inducción de IPTG (1 mM).

El contenido intracelular de ectoína depende de la salinidad del medio. Mediante la inducción de IPTG del gen colaborador *lysC* en pAKECT1 se subsana el cuello de botella metabólico y se obtienen concentraciones de ectoína claramente mayores. Sorprendentemente, las concentraciones de ectoína obtenidas con pAKECT1 son casi idénticas a las obtenidas de la variedad de control pHSG575, cuando haya ectoína en el medio. Allí se aclara que el sistema de transporte para la ectoína (y no el rendimiento de biosíntesis de las células) determina la concentración interna. Como la concentración máxima se alcanza ya casi al 2% de NaCl, el objetivo de un tejido celular de ectoína recombinante para medios pobres en sales se lleva a cabo transfiriendo el vector pAKECT1 acorde al procedimiento conforme a la invención a organismos receptores, a los que les falten los sistemas de transporte para la ectoína o cuyos sistemas de transporte están deshabilitados o dañados en su función.

Bibliografía

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds.) (1992) Short protocols in Molecular biology, 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York.
- Claus D., Fahmy F., Rolf H. J., Tosunoglu N. (1983) *Sporosarcina halophila* sp. nov., an obligate, slightly halophilic bacterium from salt marsh soils. *Syst Appl Microbiol* 4:496-506.
- Cremer J, Eggeling L, Sahm H (1991) Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl Environ Microbiol* 57: 1746-1752.
- Da Costa MS, Santos H, Galinski EA (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 61: 117-153.
- Forward, J. A., Behrendt M. C., Wybom N. R., Cross R., and Kelly D.J. (1997) TRAP Transporter: a New Family of Periplasmic Solute Transport Systems Encoded by the dctPQM Genes of *Rhodobacter capsulatus* and by Homologs in Diverse Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology* 179:5482-5493.
- Galinski EA (1986) Salzadaptation durch compatible Solute bei halophilen phototrophen Bakterien. *Dissertation*, Universität Bonn.
- Galinski EA, Louis P (1997) Verfahren zur Übertragung der Fähigkeit zur Bio-synthese kompatibler Solute und der damit verbundenen Streßtoleranz auf Organismen. OS DE 196 10 972 A1.
- Hanahan D (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Mol Biol* 166: 557-580.
- Imhoff J. F., Trüper H. G. (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b: *Arch Microbiol* 114:115-121.
- Larsen PI, Sydnes LK, Landfald B, Strom AR (1987) Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid and trehalose. *Arch Microbiol* 147: 1-7.
- Louis P, Galinski EA (1997) Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 143: 1141-1149.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Pühler. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción permanente de ectoína y/o hidroxiectoína en organismos, que dispongan de información genética para la producción de ectoína y/o hidroxiectoína y de mecanismos de regulación para el control de la producción, **caracterizado** porque se suprime, se deshabilita y/o queda afectado en su función un mecanismo de regulación existente para la limitación de la biosíntesis en las células, siendo el mecanismo de regulación el transportador de TRAP TeaABC.
- 10 2. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque las cepas de producción son cultivos celulares vegetales y/o animales y levaduras, hongos o microorganismos eucarióticos.
3. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque las cepas de producción son procariotas, particularmente arqueobacterias y bacterias.
- 15 4. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque las cepas de producción son enterobacterias, particularmente *E. coli*, especies de bacilo, corinebacterias y microorganismos de la familia Halomonadaceae, preferentemente del tipo Halomonas, Marinococcus y bacterias afines y Rhodothermus.
- 20 5. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la síntesis se induce elevando o reduciendo la temperatura o reduciendo la actividad del agua.
6. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la síntesis se efectúa sin inducción a temperatura constantemente alta o baja o a una actividad constantemente baja del agua.
- 25 7. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la síntesis se lleva a cabo mediante células crecientes metabólicamente activas.
8. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la síntesis se efectúa en forma de bioconversión con células en reposo y/o inmovilizadas.
- 30 9. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque las sustancias útiles se separan por medio de membranas permeables, preferentemente por medio de fermentadores de diálisis, de las células de producción.
- 35 10. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la influencia y/o modificación del sistema de transporte y captación se lleva a cabo mediante mutaciones por medio de supresión, mutación puntual, inserciones, influencia y/o inversiones en los genes codificadores.
- 40 11. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la influencia y/o modificación del sistema de transporte y captación mediante inhibición y/o bloqueo del transporte a nivel proteínico se lleva a cabo empleando antimetabolitos o productos químicos.
12. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la influencia y/o modificación del sistema de transporte y captación se efectúa manipulando del suministro energético de las células productoras.
- 45 13. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque se trata de TeaABC de la familia de las Halomonadaceae, preferentemente de especies de Halomonas.
- 50 14. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque al TeaABC se le asigna un regulador TeaD, deshabilitándose éste cuando sea necesario.
15. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque los sistemas de transporte y captación no se activan, o sólo parcialmente, debido a las condiciones de cultivo y producción de los organismos.
- 55 16. Procedimiento conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la transferencia de los ácidos nucleicos, particularmente genes y/o secuencias/promotores de regulación se lleva a cabo por medio de vectores, porque se replica autónomamente en el organismo receptor o se inserta permanentemente en el genoma, siendo el organismo receptor microorganismos, sin sistemas osmoregulados de transporte y captación o cuyos sistemas de transporte y captación están influenciados.
- 60 17. Procedimiento conforme a la Reivindicación 16, **caracterizado** porque se utilizan preferentemente cepas de *E. Coli* sin transportador PorP y PorU, especies de bacilo sin OpuD y/o OpuE y especies de corinebacterias sin EctP y/o PröP como organismos receptores.
- 65 18. Procedimiento conforme a la Reivindicación 16, **caracterizado** porque trata de los genes para la diamino-butiratacetilasa (*ectA*), diaminobutirato transaminasa (*ectB*) y ectoína sintasa (*ectC*) de *Marinococcus* y/o de bacterias de la familia Halomonadaceae, particularmente de especies de *Halomonas*, o de otros microorganismos halófilos/halotolerantes.

ES 2 321 486 T3

19. Procedimiento conforme a la Reivindicación 18, **caracterizado** porque los genes de ectoína se emplean con promotores, particularmente lac, tac, T7, que pueden inducirse también sin señal osmótica o tienen una alta expresión de genes.

5 20. Procedimiento conforme a la Reivindicación 16, **caracterizado** porque el vector es un plásmido de baja copia.

21. Procedimiento conforme a la Reivindicación 16, **caracterizado** porque, para la prevención de cuellos de botella metabólicos, se transfieren adicionalmente uno o varios genes a las cepas de producción apropiadas para abrir el cuello de botella metabólico.

10 22. Procedimiento conforme a la Reivindicación 21, **caracterizado** porque los genes para la apertura de los cuellos de botella metabólicos son genes de aspartoquinasa, procedentes de organismos halófilos sintetizadores de ectoína o mutados o desregulados.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65