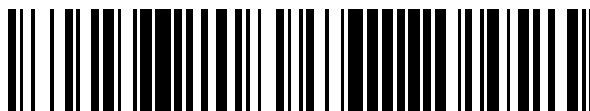


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 873 367**

51 Int. Cl.:

C12P 7/42

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2013** **PCT/IN2013/000525**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014** **WO14045298**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2013** **E 13815583 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2021** **EP 2890801**

54 Título: **Biotransformación microbiana de ácidos aromáticos a sus ácidos aromáticos de carbono reducido**

30 Prioridad:

28.08.2012 IN 2496MU2012

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

03.11.2021

73 Titular/es:

PRIVI BIOTECHNOLOGIES PVT. LTD. (100.0%)
Privi House, A-71, TTC, Thane Belapur Road,
Near Kopar Khairane RLY. Station
Navi Mumbai 400709 MAH, IN

72 Inventor/es:

YEOLE, MAHENDRA, M.;
GALA, APARNA y
LALI, ARVIND, M.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 873 367 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biotransformación microbiana de ácidos aromáticos a sus ácidos aromáticos de carbono reducido

5 Campo técnico de invención

La presente invención se refiere a un método para la fermentación microbiana y biotransformación de ácidos aromáticos en ácidos aromáticos con átomos de carbono reducidos de amplia importancia comercial usando un cultivo de especies de actinomicetos, concretamente *Amycolatopsis mediterranei* NCIM 5008 como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

La biodegradación de los fenilpropanoides es importante para el ciclo global del carbono desde un punto de vista medioambiental, ya que estos compuestos se liberan de los desechos vegetales como productos de degradación de la lignina. Con la mejora de las condiciones de vida, ha aumentado la demanda de productos naturales o ecológicos. En contraste con la síntesis química, los métodos biológicos tienen las ventajas tales como condiciones de reacción suaves, menos subproductos, menos contaminación ambiental, selectividad y procesamiento posterior más simple. Sin embargo, en la mayoría de los casos reportados, los rendimientos de transformación son muy bajos y solo algunos de ellos son rentables para la producción comercial. Gran parte del interés científico se ha centrado en la capacidad de los microorganismos para metabolizar los ácidos hidroxicinámicos como el ácido ferúlico, el ácido p-cumárico, el ácido cafeico y el ácido sinápico en derivados de hidroxibenzoato que son de importancia comercial.

El ácido parahidroxibenzoico y sus derivados se utilizan ampliamente como conservantes por las industrias cosmética y farmacéutica. Por ejemplo, el ácido parahidroxibenzoico es un conservante eficaz en muchos tipos de fórmulas. Estos compuestos, y sus sales, se utilizan principalmente por sus propiedades bactericidas y fungicidas. Se pueden encontrar en champús, humectantes comerciales, geles de afeitar, lubricantes personales, productos farmacéuticos tópicos/parenterales, soluciones bronceadoras en aerosol, maquillaje y pasta de dientes. También se utilizan como aditivos alimentarios.

En los cultivos de *S. sannanensis* cuando se hacen crecer en un medio mínimo que contenga ácido ferúlico como única fuente de carbono, se observó una acumulación de ácido vainílico en el medio como principal producto biotransformado junto con una formación transitoria de vainillina. Se observó una cantidad máxima de acumulación de ácido vainílico de 400 mg/L cuando los cultivos se hicieron crecer con ácido ferúlico 5 mM a 28°C. Se encontró que esta acumulación de ácido vainílico era estable en los medios de cultivo durante un largo período de tiempo, lo que facilita su recuperación (Transformación microbiana de ácido ferúlico en ácido vainílico por *Streptomyces sannanensis*, MTCC 6637 J Ind Microbiol Biotechnol (2007) 34:131-138).

El *Sporotrichum thermophile* es capaz de promover la formación de ácido vainílico durante la degradación del ácido ferúlico. El metabolismo del ácido ferúlico por *S. thermophile* aparentemente ocurre a través de la degradación de la cadena propenoica y se observó la formación de 4-hidroxi-3-metoxiestireno(4-vinilguayacol) que presumiblemente se metabolizó a ácido vainílico (Bioconversión de ácido ferúlico en ácido vainílico por el hongo termófilo *Sporotrichum thermophile*, Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 36 (2003) 561-565). Se detectó guayacol además de los intermediarios mencionados anteriormente, normalmente como resultado de la descarboxilación no oxidativa del ácido vainílico. En condiciones óptimas, la producción de ácido vainílico a partir del ácido ferúlico por *S. thermophile* alcanzó niveles tan elevados como 4798 mg/L con un rendimiento molar del 35%.

Se han estudiado las biotransformaciones de ácido cinámico y ferúlico catalizadas por actinomicetos. La cepa GE 107678, identificada como *Streptomyces halstedii*, convirtió ácido cinámico en cinamamida (95% de conversión molar a partir de 2 g/L de sustrato) y ácido ferúlico en ácido vainílico (80% de conversión molar a partir de 1 g/L de sustrato) con formación transitoria de bajas cantidades de vainillina (0,10-0,15 g/L). La cepa GE 107678 resultó la más prometedora, ya que era capaz de convertir el ácido cinámico en la amida correspondiente con un elevado rendimiento (Biotransformaciones de ácido cinámico y ferúlico con actinomicetos, Enzyme and Microbial Technology 34 (2004) 3-9).

Se ha detectado la formación enzimática de ácido p-hidroxibenzoico a partir de ácido p-cumárico en extractos libres de células de cultivos de células de *Lithospermum erythrorhizon*. En ausencia de NAD, se forma p-hidroxibenzaldehído en lugar de ácido p-hidroxibenzoico. La reacción es específica del ácido p-cumárico. Además, también se encuentra una actividad deshidrogenasa del p-hidroxibenzaldehído. Los resultados sugieren que el mecanismo de reacción no es oxidativo (Formación de ácido p-hidroxibenzoico a partir de ácido p-cumárico mediante un extracto libre de células de cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon*, Phytochemistry, volumen 30, número 7, 1991, páginas 2233-2236).

Las suspensiones celulares de las cepas DSM 586 y DSM 590 de *Acinetobacter calcoaceticus* pudieron crecer en ácido benzoico, p-hidroxibenzoico y vainílico como única fuente de carbono. Las células inducidas con ácido trans-ferúlico fueron capaces de oxidar el ácido trans-ferúlico, p-cumárico, vainílico, p-hidroxibenzoico y protocatecuico a

velocidades más altas que el cultivo no inducido. La misma actividad se encontró en el cultivo inducido con ácido p-coumarínico. Se aislaron dos compuestos aromáticos, ácido vanílico y p-hidroxibenzoico, de los filtrados del cultivo de células cultivadas con ácido trans-ferúlico y p-cumárico, respectivamente (Degradación de ácido trans-ferúlico y ácido p-cumárico. Biochim Biophys Acta. 9 de junio de 1995; 1244 (2-3):363-7).

La cepa 75Vi2 de *Streptomyces setonii* se cultivó a 45°C en medio líquido que contenía extracto de levadura y ácido transcinámico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico o vainillina. El ácido cinámico se catabolizó a través de benzaldehído, ácido benzoico y catecol; el ácido p-cumárico se catabolizó a través de p-hidroxibenzaldehído, ácido p-hidroxibenzoico y ácido protocatecuico; el ácido ferúlico se catabolizó a través de vainillina, ácido vanílico y ácido protocatecuico. Cuando se usó vainillina como sustrato de crecimiento inicial, se catabolizó a través de ácido vainílico, guayacol y catecol (Can J Microbiol. 1983 Oct; 29 (10):1253-7).

El documento US6844019 describe el uso de *Pseudomonas putida* para convertir ácido ferúlico en ácido vainílico, en el que el proceso de la invención convirtió 28,5 g/L de ácido ferúlico en 19,05 g/L de ácido vainílico con un rendimiento global del 91,48% y una tasa de conversión de 84,38% después de 160 h por el método de alimentación por lotes.

Otra patente de Estados Unidos nº 6844019 describe el uso de *Rhodotorula glutens* para convertir el ácido p-cumárico en ácido p-hidroxibenzoico. Se obtuvieron 2,1 g/L de ácido p-hidroxibenzoico a partir de 4 g/L de ácido p-cumárico. También se obtuvo ácido 3,4-dihidroxibenzoico como subproducto a una concentración de 0,47 g/L. El proceso dio un rendimiento del 62,39% y una conversión del 97%.

El documento US5866380 emplea *Aspergillus niger* MIC 373, en el que se añadió ácido ferúlico de forma continua en dosis de 0,430 g/L por 24 horas. Después de 15 días, se consumieron 5,05 g/L de ácido ferúlico, se produjeron 3,6 g/L de ácido vainílico y 0,109 g/L de MHQ. El rendimiento de ácido vainílico fue del 82%.

Otra patente nº US5866380 también empleó el *Actinomyces streptomyces setonii* ATCC 25497, en el que se añadió ácido ferúlico en una concentración de 1 g/L. Después de 100 horas, se consumieron 0,88 g/L de ácido ferúlico y se produjeron 0,332 g/L de ácido vainílico. El rendimiento molar de ácido vainílico fue del 43%.

El documento US20060292676 emplea *Aspergillus niger* CGMCC 0774 para convertir ácido ferúlico en ácido vanílico. Se añadió una solución de aceite de salvado de arroz en una proporción de 10 g/100 mL de cultivo. La concentración de ácido ferúlico en el cultivo fue de 2,02 g/100 mL, se sometió a hidrólisis por fermentación a una temperatura de 37°C durante 24 h. La concentración final de ácido ferúlico y de ácido vainílico fue de 1,22 g/100 mL y 0,68 g/100 mL, respectivamente.

Resumen de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para la fermentación microbiana y la biotransformación de ácidos aromáticos en ácidos aromáticos selectivos con átomos de carbono reducidos sin afectar a otros grupos funcionales utilizando un cultivo de especies de actinomicetos.

Otro objeto de la invención es proporcionar un proceso para la biotransformación de ácidos aromáticos naturales y/o sintéticos como los ácidos fenilpropénicos sustituidos, en los que los grupos sustituidos, R, R1, R2 pueden ser hidrógeno y/o amino, y/o hidroxilo, y/o grupo alcoxi, y/o cualquier otra sustitución, y todos los sustratos similares que son ácidos aromáticos con una cadena lateral de ácido propénico y con diferentes sustituyentes en varias posiciones en el anillo aromático.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un proceso para la biotransformación del precursor de ácido aromático, en el que la concentración inicial de sustrato se mantiene en el medio de biotransformación, mostrando así una alta tolerancia del organismo al sustrato, lo que da como resultado una mayor tasa de conversión del sustrato.

Otro objeto de la invención es proporcionar un proceso con aumento de la productividad de ácido aromático de carbono reducido y simplificando el procesamiento posterior del producto.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para la recuperación y reciclaje de células de manera continua y con múltiples ciclos de biotransformación que resulte rentable al ahorrar coste de los medios, y tiempo y energía para el crecimiento del organismo.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un proceso para la producción microbiana de ácido aromático de carbono reducido a partir de ácido aromático con unas condiciones de reacción suaves y benignas desde el punto de vista ambiental.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un proceso para la biotransformación de ácidos aromáticos en sus ácidos aromáticos de carbono reducido que comprende:

a) cultivar o hacer crecer *Amycolatopsis mediterranei* NCIM 5008 en un fermentador a una temperatura en el intervalo

de 37-46°C durante 16-24 horas;

b) añadir la solución alcalina de sustrato que contiene ácido aromático al medio de fermentación de la etapa (a) para obtener una concentración final de 1-15 g/L de ácido aromático; en la que el ácido aromático se convierte durante 24-50 horas y se obtiene un líquido convertido que contiene el ácido aromático de carbono reducido;

c) centrifugar o filtrar el líquido convertido de la etapa (b) para obtener un retenido que comprende las células de cultivo y un permeado que comprende el líquido convertido con ácido aromático de carbono reducido;

d) precipitar opcionalmente el líquido convertido obtenido en la etapa (c) para aislar el ácido aromático de carbono reducido en bruto en forma sólida; y

e) opcionalmente recrystalizar el ácido aromático de carbono reducido en bruto de (d) para obtener un ácido aromático de carbono reducido puro.

Breve descripción de la figura

Figura 1: es una vista que ilustra el proceso de biotransformación de los ácidos aromáticos naturales y/o sintéticos, por ejemplo ácidos fenilpropénicos sustituidos, en los que los grupos sustituidos, R, R1, R2 pueden ser hidrógeno, y/o grupo amino, y/o hidroxilo, y/o alcoxi, y/o cualquier otra sustitución, y todos los sustratos similares que son ácidos aromáticos con cadena lateral de ácido propénico, y con diferentes sustituyentes en varias posiciones en el anillo aromático.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un proceso en el que se emplean microbios para producir ácidos aromáticos de carbono reducido de utilidad industrial que son productos intermediarios farmacéuticos, aditivos alimentarios, aromatizantes, etc. a partir de ácidos aromáticos naturales y sintéticos. Las condiciones de reacción empleadas en el método descrito son suaves y benignas desde el punto de vista ambiental. La presente invención también describe un proceso eficaz para la producción selectiva de ácidos aromáticos con átomos de carbono reducidos sin afectar a otros grupos funcionales en el anillo aromático utilizando el organismo de la especie de actinomicetos, *Amycolatopsis mediterranei* NCIM 5008.

Uno de los aspectos de la presente invención es proporcionar un proceso para la fermentación microbiana y biotransformación de ácidos aromáticos en ácidos aromáticos selectivos con átomos de carbono reducidos sin afectar a otros grupos funcionales utilizando un cultivo de especies de actinomicetos, *Amycolatopsis mediterranei* NCIM 5008, en el que el proceso comprende cultivar o hacer crecer las células microbianas de *Amycolatopsis* en una única fuente de carbono, como glucosa, y/o almidón, y/o melaza, y/o hidrolizado de azúcar a partir de biomasa de madera y otras lignocelulosas. En este proceso, los sustratos en el medio de crecimiento no se utilizan como fuente de carbono y/o como inductores para el organismo, y por lo tanto todo el sustrato se dirige a la formación de producto sin afectar al rendimiento del producto.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un proceso para la biotransformación de ácidos aromáticos a sus ácidos aromáticos de carbono reducido, en el que el proceso comprende: cultivar o hacer crecer *Amycolatopsis mediterranei* NCIM 5008 en un fermentador a una temperatura en el rango de 37-46°C durante 16-24 horas; añadir la solución alcalina de sustrato que contiene el ácido aromático al medio de fermentación para obtener una concentración final de 1-15 g/L de ácido aromático; en el que el ácido aromático se convierte durante 24-50 horas y se obtiene un líquido convertido que contiene el ácido aromático de carbono reducido; centrifugar o filtrar el líquido convertido para obtener un retenido que comprende las células de cultivo, y un permeado que comprende el líquido convertido con el ácido aromático de carbono reducido; precipitar el líquido convertido obtenido en la etapa anterior para aislar el ácido aromático de carbono reducido en bruto en forma sólida; y recrystalizar el ácido aromático de carbono reducido en bruto para obtener el ácido aromático de carbono reducido puro.

En una de las realizaciones de la presente invención se proporciona un proceso para la biotransformación de ácidos aromáticos naturales y/o sintéticos, en donde dicho proceso comprende: cultivar o hacer crecer *Amycolatopsis mediterranei* NCIM 5008 en un fermentador a una temperatura en el rango de 37-46°C durante 16-24 horas; añadir la solución alcalina de sustrato que contiene el ácido aromático al medio de fermentación para obtener una concentración final de 1-15 g/L del ácido aromático; en el que el ácido aromático se convierte durante 24-50 horas y se obtiene un líquido convertido que contiene el ácido aromático de carbono reducido; centrifugar o filtrar el líquido convertido para obtener un retenido que comprende las células de cultivo y un permeado que comprende líquido convertido con el ácido aromático de carbono reducido; precipitar el líquido convertido obtenido en la etapa anterior para aislar el ácido aromático de carbono reducido en bruto en forma sólida; y recrystalizar el ácido aromático de carbono reducido en bruto para obtener el ácido aromático de carbono reducido puro.

En otra realización de la presente invención se proporciona un proceso para la biotransformación de ácidos aromáticos naturales y/o sintéticos en su ácido aromático de carbono reducido, en el que dicho ácido natural y/o sintético se

selecciona del grupo que consiste en ácido cinámico, 3-ácido metoxi-4-hidroxicinámico, ácido 4-hidroxicinámico, ácido 3-hidroxicinámico, ácido cafeico, ácido sinapínico, hidrolizado de lignina, hidrolizado de ácido fenolato, más preferiblemente ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico o ácido cafeico o ácido p-cumárico.

En otra realización de la invención se proporciona un proceso para la biotransformación de ácidos aromáticos naturales y/o sintéticos a ácidos aromáticos de carbono reducido, en el que dicho ácido aromático de carbono reducido se selecciona del grupo que consiste en ácido benzoico, ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 3-hidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxi benzoico, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico, más preferiblemente ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico, o ácido protocatecuico o ácido p-hidroxibenzoico.

En una de las realizaciones más preferibles de la presente invención, se proporciona un proceso para la biotransformación de ácidos aromáticos naturales y/o sintéticos como los ácidos fenilpropénicos sustituidos, en el que los grupos R, R1, R2 sustituidos pueden ser hidrógeno y/o amino, y/o grupo hidroxilo, y/o alcoxi, y/o cualquier otra sustitución, y todos los sustratos similares que son ácidos aromáticos con cadena lateral de ácido propénico y con un sustituyente diferente en varias posiciones en el anillo aromático.

En otra realización más de la presente invención, en la que el proceso descrito no se limita a los ácidos aromáticos mencionados anteriormente, sino que se puede aplicar a otros ácidos aromáticos similares con diferentes sustituyentes, pero una cadena lateral de ácido propénico similar.

Otra realización de la presente invención, en la que el cultivo solo puede reducir la cadena lateral propénica sin afectar a otro sustituyente en diferentes posiciones como los grupos amino, hidroxilo, metoxi o cualquier otra sustitución.

Otra realización de la presente invención, en la que los sustratos de ácidos aromáticos usados para la biotransformación pueden ser ácidos aromáticos con una cadena lateral de ácido propénico y con diferentes sustituyentes como se muestra en la Figura 1.

Otra realización de la presente invención, en la que el crecimiento del cultivo celular por el microorganismo puede llevarse a cabo en una fuente de carbono y nitrógeno, en donde la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, melaza, almidón, hidrolizado de azúcar, licor de maíz fermentado, más preferiblemente glucosa.

En otra realización de la presente invención, en la que la glucosa usada puede estar en el rango de concentración de 1 a 40 g/L, más preferiblemente en el rango de 5 a 20 g/L.

Otra realización de la presente invención en la que la fuente de nitrógeno utilizada puede ser una fuente orgánica y/o inorgánica, en donde la fuente orgánica se selecciona del grupo que consiste en extracto de levadura, extracto de malta, peptona, extracto de carne de res, extracto de proteína de soja, extracto de proteína de gluten de maíz y/o la fuente inorgánica se selecciona de entre el grupo que consiste en sulfato de amonio, urea y nitrato de sodio.

En otra realización de la presente invención, en la que la fuente de nitrógeno utilizada puede estar en el intervalo de concentración de 5 a 50 g/L, más preferiblemente en el intervalo de 5 a 20 g/L.

Otra realización de la presente invención, en la que la concentración de sustrato utilizada para la biotransformación puede estar en el intervalo de 1 a 20 g/L, más preferiblemente de 5 a 12 g/L.

En otra realización más de la presente invención, en la que el pH alcalino de la solución de sustrato se puede ajustar en el intervalo de 6 a 9, más preferiblemente de 8 a 9.

En otra realización de la presente invención, en la que el pH del medio de crecimiento puede formularse en el intervalo de 6 a 9, más preferiblemente de 7 a 8,5.

Otra forma de realización de la presente invención, en la que la adición de la solución de sustrato se puede realizar en una etapa o de manera escalonada.

Otra realización de la presente invención, en la que la conversión de ácido aromático en su ácido aromático de carbono reducido se puede llevar a cabo en 30-40 horas a una temperatura en el intervalo de 39 a 45°C en un medio de fermentación.

Otra realización de la presente invención, en la que los sustratos de ácidos aromáticos en el medio de crecimiento pueden no usarse como fuente de carbono y/o como inductor de su crecimiento y metabolismo por parte del organismo.

En la realización más preferible de la presente invención, la biotransformación de ácidos aromáticos naturales y/o sintéticos puede llevarse a cabo en ácido aromático de carbono reducido, en el que los ácidos aromáticos naturales y/o sintéticos son ácidos fenilpropénicos sustituidos, en los que los grupos sustituidos, R, R1, R2 pueden ser hidrógeno, y/o grupo amino, y/o hidroxilo, y/o alcoxi, y/o cualquier otra sustitución, y todos los sustratos similares que son ácidos aromáticos con cadena lateral de ácido propénico y con diferentes sustituyentes en varias posiciones en el anillo

aromático.

En otra realización de la presente invención, en la que la acumulación de producto en el medio de biotransformación a elevada concentración puede indicar una tasa más rápida de conversión del sustrato y una tasa más lenta de degradación del producto, lo que resulta en un aumento del rendimiento de ácido aromático de carbono reducido en el rango del 70 a 80%.

En otra realización de la presente invención, en la que la adición de la solución alcalina de sustrato que contiene ácido aromático al medio de fermentación se puede llevar a cabo de manera escalonada o continua, para obtener una concentración final de 1-15 g/L de ácido aromático; donde el ácido aromático se convierte durante 24-50 horas, más preferiblemente dentro de 30-40 horas, y se obtiene un líquido convertido que contiene ácido aromático de carbono reducido.

En otra realización de la presente invención, en la que el medio de fermentación se puede recolectar eliminando el cultivo celular mediante filtración o centrifugación, que se puede realizar usando un sistema de membrana.

En otra realización más de la presente invención, en la que la precipitación de ácido aromático de carbono reducido se puede llevar a cabo utilizando ácido para obtener un producto bruto en forma sólida. Todavía en la realización más preferida de la presente invención, en la que se puede realizar la recristalización del producto de ácido aromático reducido en bruto para obtener un sólido puro de ácido aromático de carbono reducido que también se puede usar para una biotransformación adicional para obtener otros metabolitos tales como aldehídos y/o alcoholes de valor comercial o amplias aplicaciones.

En la realización preferible, puede usarse *Amycolatopsis mediterranei* NCIM 5008 para convertir ácidos aromáticos naturales, así como sintéticos, en ácidos aromáticos de carbono reducido con amplias aplicaciones.

En otra realización de la presente invención, en la que el cultivo celular puede adaptarse para crecer a 37-46°C para lograr la biotransformación de ácido aromático en ácido aromático de carbono reducido, que se logra a 37-46°C para obtener un mayor rendimiento del producto.

En la realización más preferible de la presente invención, se proporciona un proceso para la biotransformación de ácido aromático en ácido aromático con carbono reducido, en el que la recuperación y el reciclado del cultivo celular se puede llevar a cabo para una biotransformación posterior, haciendo que el proceso sea continuo con múltiples biotransformaciones utilizando el mismo cultivo celular.

Otra realización de la presente invención, en la que los cultivos celulares se pueden usar/reciclar durante 10-15 ciclos de biotransformación sin perder la actividad del organismo para la biotransformación.

En la realización aún más preferible de la presente invención se proporciona un proceso para la biotransformación de ácidos aromáticos de carbono reducido mediante la fermentación microbiana y biotransformación de ácidos aromáticos naturales, en el que dicho microbio puede ser *Amycolatopsis mediterranei* NCIM 5008, de las especies de actinomicetos que se han depositado con NCIM 5008.

En otra realización de la presente invención se proporciona un proceso para la transformación microbiana de ácido aromático en ácido aromático de carbono reducido, en el que el precursor de ácido aromático puede solubilizarse primero en una solución alcalina y luego añadirse al medio de fermentación durante 24-40 horas. a un pH de 7-9 y a una temperatura en el rango de 40-45°C para convertirse en su ácido aromático de carbono reducido.

Ventajas de la tecnología:

1) La presente invención proporciona una acumulación de producto en alta concentración en el medio, lo que simplifica el procesamiento posterior.

2) La presente invención también proporciona un proceso en el que no se forma ningún otro metabolito, por lo que el producto obtenido requiere solo algunos pasos para su aislamiento y la purificación finales.

3) Por tanto, la presente invención proporciona una transformación microbiana de ácido aromático en ácido de carbono reducido que puede usarse directamente para la biotransformación posterior para obtener productos de amplio valor comercial.

4) La presente invención proporciona el reciclado del cultivo celular para biotransformación, lo que hace que el proceso continuo resulte rentable ya que ahorra el coste del medio, y el tiempo y energía para el crecimiento del organismo.

Ejemplos

La descripción se ilustrará ahora con ejemplos prácticos, que pretenden ilustrar el funcionamiento de la descripción.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta descripción. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de los métodos y composiciones descritos, ejemplos de los métodos, dispositivos y materiales se describen en el presente documento.

Ejemplo 1

Cultivo inclinado de *A. mediterranei* NCIM 5008: Se formuló un medio de cultivo que contiene un 0,4% de glucosa, 0,4% de extracto de levadura y 1% de extracto de malta y 2,2% de agar, a pH 7,2. Todos los contenidos de los constituyentes son en porcentaje de peso por volumen, es decir, g/100 mL (de manera similar en lo sucesivo). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos y se hicieron inclinaciones después de enfriarse. La cepa *A. mediterranei* se inoculó en las inclinaciones y se incubó a 43°C durante 7 días.

Ejemplo 2

Preparación del cultivo preliminar: Se formularon 100 mL de medio que contiene 10 g/L de extracto de malta, 4 g/L de glucosa, 4 g/L de extracto de levadura y 0,1 g/L de sulfato de magnesio, pH 7,2. Luego se añaden 50 mL del medio de cultivo anterior a cada uno de los matraces cónicos de 250 mL y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La cepa *A. mediterranei* se inocula en el medio de cultivo en una cantidad de 1-2,5%. La fermentación en matraz de agitación se realiza a 43°C, 200 rpm durante 48 horas. Los cultivos resultantes se utilizan como cultivos de siembra para la biotransformación.

Ejemplo 3

Se formularon 2000 mL del medio de producción que contiene 10 g/L de extracto de malta, 4 g/L de glucosa, 4 g/L de extracto de levadura y 0,1 g/L de sulfato de magnesio, a pH 7,2 en un fermentador de 5L. Después de enfriarse, se inoculó con 100 mL del medio de cultivo de siembra anterior como en el Ejemplo 2. Las condiciones de cultivo fueron 43°C, 400 rpm y 0,5 L de aire por minuto. Después de 20 horas de crecimiento, se agregó la solución alcalina de sustrato de ácido aromático, ácido ferúlico a una concentración de 10 g/L y la reacción continúa en las mismas condiciones. La solución de ácido ferúlico se prepara disolviéndola en una solución alcalina y el pH se ajusta a 8.5 usando HCl 6M antes de agregarla al fermentador. Después de 40 horas de adición del sustrato, se termina la fermentación y el medio se recolecta por centrifugación para eliminar las células y obtener el sobrenadante, que contiene el ácido aromático de carbono reducido, ácido vainílico. El sobrenadante que contiene 7 g/L de ácido vainílico se obtiene con un 100% de conversión de ácido ferúlico y un 80% de rendimiento.

Ejemplo 4

Las células de *Amycolatopsis* se cultivan como en el ejemplo 3 durante 20 horas en las mismas condiciones de reacción de 43°C, 400 rpm y 0,5 L de aire por minuto. El precursor adecuado que contiene ácido aromático como el ácido p-cumárico, a una concentración de 10 g/L, se disuelve en una solución alcalina y el pH de la solución se ajusta a 8,5 usando HCl concentrado, antes de la adición en el fermentador. Luego, esta solución se agrega al medio y se incuba a 43°C durante 40 horas. La concentración final de ácido p-hidroxibenzoico en el medio fue de 6,6 g/L con una conversión del 100% de ácido p-cumárico y un rendimiento final de ácido p-hidroxibenzoico del 78%.

Ejemplo 5

Las células de *Amycolatopsis* se cultivan como en el ejemplo 3 durante 20 horas en las mismas condiciones de reacción de 43°C, 400 rpm y 0,5 L de aire por minuto. El precursor adecuado que contiene ácido aromático, como ácido cafeico a una concentración de 10 g/L, se disuelve en una solución alcalina y el pH de la solución se ajusta a 8,5 usando HCl concentrado, antes de la adición en el fermentador. Luego, esta solución se agrega al medio y se incuba a 43°C durante 40 horas. La concentración final de ácido protocatecuico en el medio fue de 6 g/L, con una conversión del 100% de ácido p-cumárico y un rendimiento final de ácido protocatecuico del 70%.

Ejemplo 6

Biotransformación de las células en reposo: Las células de *Amycolatopsis* se cultivaron como en el ejemplo 3 en un fermentador durante 20 horas en las mismas condiciones de reacción de 43°C, 400 rpm y 0,5 L de aire por minuto. Las células se recogieron por centrifugación en condiciones asépticas y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. A continuación, estas células se resuspendieron directamente en la solución de ácido ferúlico a una concentración de 10 g/L en el fermentador. La biotransformación se realizó en las siguientes condiciones: pH 8,5, 43°C, 400 rpm y 0,5 L de aire por minuto. Después del consumo completo del ácido ferúlico, el medio se filtró usando el sistema de membranas y las células se reciclaron para una biotransformación adicional, con la adición de una segunda dosis de ácido ferúlico a 10 g/L. Este proceso de adición repetida de sustrato fresco y eliminación simultánea de producto se realizó 10 veces. El rendimiento de ácido vainílico obtenido para cada dosis fue del 80% con una concentración final de ácido vainílico de 7 g/L.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la biotransformación de ácidos aromáticos en sus ácidos aromáticos de carbono reducido que comprende:

a) cultivar o hacer crecer *Amycolatopsis mediterranei* NCIM 5008 en un fermentador a una temperatura en el intervalo de 37-46°C durante 16-24 horas;

b) añadir la solución alcalina de sustrato que contiene el ácido aromático al medio de fermentación de la etapa (a) para obtener la concentración final de 1-15 g/L de ácido aromático; en el que el ácido aromático se convierte durante 24-50 horas y se obtiene un líquido convertido que contiene el ácido aromático de carbono reducido;

c) centrifugar o filtrar el líquido convertido de la etapa (b) para obtener un retenido que comprende las células de cultivo, y un permeado que comprende el líquido convertido con ácido aromático de carbono reducido;

d) precipitar opcionalmente el líquido convertido obtenido de la etapa (c) para aislar el ácido aromático de carbono reducido en bruto en forma sólida; y

e) opcionalmente recrystalizar el ácido aromático de carbono reducido en bruto de (d) para obtener el ácido aromático de carbono reducido puro.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido aromático se selecciona de entre el grupo formado por ácido cinámico, ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico, ácido 4-hidroxicinámico, ácido 3-hidroxicinámico, ácido cafeico, ácido sinapínico, hidrolizado de lignina, hidrolizado de ácido fenolato, y/o ácidos aromáticos con diferentes sustituyentes, pero cadena lateral similar de ácido propénico, más preferiblemente ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico o ácido cafeico o ácido p-cumárico.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido aromático de carbono reducido se selecciona del grupo que consiste en ácido benzoico, ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 3-hidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico, más preferiblemente ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico o ácido protocatecuico ácido p-hidroxibenzoico.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el crecimiento del cultivo por parte del organismo se lleva a cabo en (i) una fuente de carbono que se selecciona de entre el grupo que consiste en glucosa, melaza, almidón, hidrolizado de azúcar, licor de maíz fermentado, más preferiblemente glucosa, y (ii) una fuente de nitrógeno que es una fuente orgánica y/o inorgánica, y en la que la fuente orgánica se selecciona de entre el grupo que consiste en extracto de levadura, extracto de malta, peptona, extracto de carne de res, extracto de proteína de soja y extracto de proteína de gluten de maíz, y la fuente inorgánica se selecciona de entre el grupo que consiste en sulfato de amonio, urea, nitrato de sodio y mezclas de los mismos.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la glucosa se usa en el rango de concentración de 1 a 40 g/L, más preferiblemente en el rango de 5 a 20 g/L, y/o en el que la fuente de nitrógeno se usa a una concentración de 5-50 g/L, más preferiblemente en el rango de 5-20 g/L.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración de sustrato usada para la biotransformación está en el intervalo de 1 a 20 g/L, más preferiblemente de 5 a 12 g/L.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH alcalino de la solución de sustrato se ajusta en el intervalo de 6-9, más preferiblemente de 8-9.

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH del medio de cultivo se mantiene en el intervalo de 6-9, más preferiblemente de 7-8,5;

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la adición de la solución de sustrato se realiza en un solo paso o por etapas.

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la conversión de ácido aromático en su ácido aromático de carbono reducido se lleva a cabo dentro de 30-40 horas a una temperatura en el intervalo de 39 a 45°C en un medio de fermentación.

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células de cultivo obtenidas en la etapa (c) se reutilizan/reciclan durante 10-15 ciclos de biotransformación sin perder la actividad del organismo para la biotransformación.

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cultivo utilizado para la biotransformación es de una

especie de actinomicetos.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido aromático como sustrato no se utiliza como fuente de carbono y/o como inductor de la biotransformación por parte del organismo.

5 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cultivo reduce la cadena lateral propénica sin afectar a otros sustituyentes en diferentes posiciones.

10 15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el rendimiento de dicho ácido aromático de carbono reducido está en el intervalo de 70 a 80%.

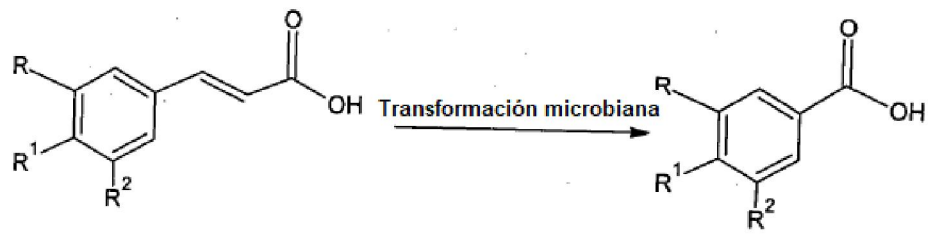


Figura 1