



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 232 290**

② Número de solicitud: 200301677

⑤ Int. Cl.

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 1/38** (2006.01)

**C12S 1/02** (2006.01)

**C10G 32/00** (2006.01)

**C12P 7/22** (2006.01)

**C12R 1/40** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **16.07.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2005**

Fecha de la concesión: **19.01.2006**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2006**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2006**

⑦ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid  
Rectorado - Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **García-Ochoa Soria, Félix;  
García Calvo, Eloy;  
García López, José Luis;  
Santos Mazorra, Victoria E.;  
Alcón Martín, Almudena;  
Martín Ezquerro, Ana Belén;  
Hernández del Olmo, Carolina y  
Gómez Castro, Emilio**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de cultivo de la *Pseudomonas putida* recombinante (CECT 5279) para su utilización en la desulfuración de dibenzotiofeno.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de cultivo de la *Pseudomonas putida* recombinante (CECT 5279) para su utilización en la desulfuración de dibenzotiofeno.

La invención consiste en un procedimiento para producir en un fermentador la cepa recombinante de *Pseudomonas putida* CECT5279 que se utiliza como biocatalizador para desulfurar dibenzotiofeno. Se realiza la preparación de un preinóculo en medio LB (Luria - Bertani) y la producción en bioreactor comercial aireado empleando medio basal salino (BSM) con 20 g/L de ácido glutámico a una temperatura de 30°C. La expresión de los genes de la ruta de desulfuración 4S se induce al cabo de 4 horas de haber comenzado la producción del microorganismo, empleando para ello IPTG.

Esta invención indica, por tanto, el medio de cultivo y las condiciones de operación adecuadas para conseguir mejorar y aumentar la escala de producción de este biocatalizador con vistas a su utilización a nivel industrial.

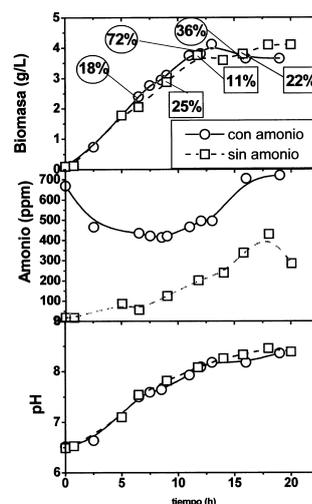


FIGURA 1

ES 2 232 290 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de cultivo de la *Pseudomonas putida* recombinante (CECT 5279) para su utilización en la desulfuración de dibenzotiofeno.

## Sector de la técnica

La invención reivindica un procedimiento de producción de cantidades elevadas de un biocatalizador con capacidad desulfurante que utiliza ácido glutámico como fuente de carbono en un medio de crecimiento mínimo (BSM, Basal Salino Medio). En ella se describe el método experimental para llevar a cabo la citada producción empleando unas condiciones de operación óptimas. Este proceso presenta considerables ventajas respecto a otros procesos de obtención de células con la citada capacidad de eliminación selectiva de azufre de moléculas orgánicas previamente descritos.

## Estado de la técnica

La desulfuración del petróleo mediante el uso de microorganismos ha sido objeto de estudio durante la última parte del siglo pasado (McFarland y col. (1998) Crit. Rev. Microbiol. 4, 99; McFarland (1999) Curr. Opin. Microbiol. 2, 257). Las investigaciones que se han llevado a cabo han servido para desarrollar métodos biotecnológicos para eliminar el azufre del petróleo antes de su combustión. Las estrictas regulaciones que han impuesto los gobiernos sobre la emisión de azufre a la atmósfera han sido las verdaderas impulsoras de este desarrollo (McFarland y col. (1998) Crit. Rev. Microbiol. 4, 99).

El gran avance en el campo de la biodesulfuración del petróleo se produjo con el aislamiento y caracterización de la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (ATCC53968) una bacteria *Gram-positiva* obtenida por el Institute of Gas Technology de Chicago que ha sido la fuente de inspiración para el desarrollo de muchos biocatalizadores y procesos (Patentes USA 5.356.801, 5.358.870, 5.358.813, 5.198.341, 5.132.219, 5.344.778, 5.104.801, 5.002.888, 5.804.433, 5.846.813, 5.879.914, 5.733.773). Este microorganismo posee una ruta metabólica denominada ruta "4S" capaz de transformar la molécula de dibenzotiofeno (DBT) en 2-hidroxibifenilo (2HBP) y sulfito (McFarland y col. (1998) Crit. Rev. Microbiol. 4, 99; McFarland (1999) Curr. Opin. Microbiol. 2, 257), produciendo así la eliminación del átomo de azufre del DBT sin pérdida de átomos de carbono en su estructura, lo que es de gran interés para la industria petrolera y petroquímica. Hay que señalar que el DBT es la molécula que con mayor profusión se ha utilizado como compuesto modelo para determinar la capacidad desulfurante de un microorganismo y, por ello, se ha elegido para los estudios que se describen en esta patente. La ruta de desulfuración "4S" de *R. erythropolis* IGTS8 está constituida por cuatro enzimas denominadas DszA, DszB, DszC y DszD (Gray y col. (1996) Nature Biotechnol. 14, 1705). Acerca de la función de estas enzimas se sabe que las proteínas DszA y DszC son monooxigenasas dependientes de FMNH<sub>2</sub> que oxidan el DBT, la enzima DszB es una desulfinasas que libera el átomo de azufre de la estructura del DBT oxidado, y la enzima DszD es una flavin: NADPH reductasa que proporciona el FMNH<sub>2</sub> que necesitan las enzimas DszA y DszC. También se sabe que los genes *dszABC*, que codifican las enzimas DszA, DszB y DszC, respectivamente, se encuentran formando un operón localizado en un plásmido, en tanto que el gen *dszD*, que codifica la reductasa DszD, se encuentra localizado en el cromosoma de la bacteria (Denome y col. (1994) J. Bacteriol. 176, 6707).

Aunque casi todos los procesos de biodesulfuración descritos hasta la fecha se han realizado con microorganismos salvajes, recientemente se han descrito unos pocos casos en los que se ha utilizado para la biodesulfuración de DBT bacterias recombinantes de *R. erythropolis* IGTS8 (Patentes USA 5.733.773, 5.789.914, 5.804.433). En estos casos, se ha tratado de incrementar la capacidad desulfurante de la bacteria salvaje de *R. erythropolis* IGTS8 mediante la adición de genes por técnicas de ingeniería genética. Es decir, se ha tratado de mejorar un microorganismo que ya tenía la capacidad de desulfuración. Sin embargo, resulta interesante que no se hayan realizado muchos estudios para intentar desarrollar microorganismos recombinantes capaces de desulfurar DBT a partir de bacterias que no poseían inicialmente dicha capacidad. La primera descripción de uno de estos casos fue realizada cuando se donaron los genes *dszABC* de *R. erythropolis* IGTS8 en una cepa de *Escherichia coli* (Denome y col. (1994) J. Bacteriol. 176, 6707), si bien sólo se constató la capacidad desulfurante por el hecho de que las cepas eran capaces de crecer en un medio mínimo de cultivo que contenía DBT como única fuente de azufre. Aparentemente, los pocos datos aportados en este trabajo sugieren que la capacidad desulfurante de DBT de estas cepas de *E. coli* recombinantes era escasa. Más recientemente, se ha descrito la construcción de varias cepas recombinantes del género *Pseudomonas* que portaban los genes *dszABC* de *R. erythropolis* IGTS8 y que eran capaces de crecer en un medio mínimo de cultivo que contenía como única fuente de azufre DBT (Gallardo y col. (1997) J. Bacteriol. 179, 7156). En este caso, se pudo constatar que como consecuencia de la desulfuración del DBT se liberaba al medio de cultivo 2HBP y que las *Pseudomonas* recombinantes crecían más rápidamente en este medio mínimo que la cepa *R. erythropolis* IGTS8. A la vista de estos resultados se podía afirmar que las cepas de *Pseudomonas* recombinantes eran más eficaces que *R. erythropolis* IGTS8 en la desulfuración de DBT en las condiciones de cultivo ensayadas. Sin embargo, no se constató si estas cepas de *Pseudomonas* recombinantes eran capaces de desulfurar DBT en un reactor en condiciones de células en reposo (*resting cells*), el proceso de biodesulfuración de petróleo más utilizado a escala industrial (McFarland y col. (1998) Crit. Rev. Microbiol. 4, 99). Por otro lado, también hay que señalar que en estas cepas de *Pseudomonas* recombinantes sólo se habían introducido los genes de desulfuración, *dszA*, *dszB*, y *dszC* pero no el gen *dszD* cuyo producto también participa en el proceso. Se suponía que las *Pseudomonas* recombinantes podrían aportar una flavin: NADPH reductasa endógena que proporcionaría FMNH<sub>2</sub> a las enzimas DszA y DszC, sin embargo los ensayos llevados a cabo con estas cepas indicaron que la desulfuración era menos eficiente de lo esperado. Por este motivo, recientemente se describió un procedimiento mediante el cual se pueden obtener organismos capaces de desulfurar eficazmente DBT tras donar

## ES 2 232 290 B1

los genes *dszABC* implicados en la desulfuración de este compuesto, procedentes de la bacteria *R. erythropolis* IGTS8, junto con el gen *hpaC* que codifica la flavin: NADH reductasa HpaC de *E. coli* W (Galán y col. (2000) J. Bacteriol. 182, 627), en una bacteria del género *Pseudomonas* (Solicitud de Patente Española 200000661).

5 En la presente patente se ha desarrollado un método para obtener células de *Pseudomonas putida* KTH2 (pESOX3) (en lo sucesivo denominada *Pseudomonas putida* CECT5279) con capacidad desulfurante máxima. Para ello se han determinado las condiciones de operación óptimas (temperatura, pH, oxígeno disuelto, concentración inicial de fuente de nitrógeno) cuando se emplea un medio de crecimiento mínimo en el que la fuente de carbono es ácido glutámico.

### 10 Descripción de la invención

*Procedimiento de cultivo de la Pseudomonas putida recombinante (CECT 5279) para su utilización en la desulfuración de dibenzotiofeno*

15 La presente invención describe un procedimiento mediante el cual se lleva a cabo el cultivo y crecimiento de la bacteria modificada genéticamente *Pseudomonas putida* CECT5279 en las condiciones de operación idóneas (preparación de inóculo, medio de cultivo, pH, temperatura, oxígeno disuelto) para obtener la mayor capacidad desulfurante del compuesto modelo (dibenzotiofeno), empleando para ello un periodo de tiempo corto con relación a los empleados con células de otros microorganismos con la citada capacidad natural.

20 El proceso de producción de un biocatalizador de dibenzotiofeno está basado en la mejora de la capacidad de eliminación selectiva de azufre de moléculas órgano-sulfuradas empleando como modelo el dibenzotiofeno que tiene la bacteria recombinante *Pseudomonas putida* KTH2 (pESOX3) obtenida mediante Ingeniería Genética y depositada en la Colección Española de Cultivos tipo (CECT) como *Pseudomonas putida* CECT5279.

25 En el origen de esta invención se pensó que las condiciones de operación empleadas durante el crecimiento de la citada bacteria debían presentar una elevada influencia sobre la capacidad de desulfuración de la misma. Para demostrar que las citadas condiciones de operación presentan elevada influencia en la obtención de 2HBP a partir de dibenzotiofeno cuando se emplea *P. putida* CECT5279 crecida sobre ácido glutámico, se procedió en primer lugar a determinar la influencia de la presencia de amonio en el medio de cultivo. En segundo lugar se determinó la influencia de la temperatura. En tercer lugar, se procedió a la determinación de la influencia de la transferencia de oxígeno. Los resultados obtenidos permitieron establecer las condiciones de operación óptimas en un sistema de fermentación en matraz para mejorar tanto el rendimiento en la producción del catalizador como su capacidad catalítica, y, por lo tanto, supone un avance significativo en el desarrollo del proceso de desulfuración.

35 A continuación, se examina la posibilidad de aplicar estos conocimientos al desarrollo de la producción del biocatalizador *P. putida* CECT5279 mediante su fermentación en un bioreactor. Por eso la última etapa de esta invención consistió en optimizar las condiciones de operación en un bioreactor para obtener los mejores rendimientos del biocatalizador tanto en cuanto a su biomasa como en cuanto a su poder de desulfuración. Para ello fue necesario no sólo utilizar un medio de cultivo optimizado como se había descrito más arriba, sino también encontrar el equilibrio justo entre la producción de biomasa, la inducción del sistema de desulfuración y la cantidad de oxígeno suministrado al bioreactor. Los resultados obtenidos demuestran que en las condiciones desarrolladas en el bioreactor es posible obtener una considerable mejora en la producción con respecto al procedimiento inicialmente desarrollado para la producción en matraz.

### 45 Descripción de las figuras

Para facilitar la comprensión de la invención y formando parte de esta memoria descriptiva se acompañan una serie de figuras.

50 La figura 1 muestra los resultados experimentales obtenidos en los experimentos realizados a 30°C en matraz utilizando una incubadora orbital (250 r.p.m.) empleando medio BSM (ver Ejemplo 1) para realizar los experimentos con 20 g/L de ácido glutámico como fuente de carbono adicionando o no amonio al medio de cultivo. La concentración inicial de partida es de 0,1 g/l de biomasa obtenida según se especifica en el Ejemplo 1. El seguimiento de biomasa, pH, amonio y capacidad desulfurante en las muestras se ha llevado a cabo según se especifica en el Ejemplo 1. Se observan los resultados experimentales referentes a la capacidad de desulfuración en valores numéricos porcentuales para cada uno de los experimentos representados.

60 En la figura 2 se representan los resultados experimentales obtenidos en los experimentos realizados a diferentes temperaturas (28, 30 y 32°C) en matraz utilizando una incubadora orbital (250 r.p.m.) empleando medio BSM (ver Ejemplo 1) para realizar los experimentos con 20 g/L de ácido glutámico como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno al medio de cultivo. La concentración inicial de partida es de 0,1 g/l de biomasa obtenida según se especifica en el Ejemplo 1. El seguimiento de biomasa, pH y capacidad desulfurante en las muestras se ha llevado a cabo según se especifica en el Ejemplo 1. Se observan los resultados experimentales referentes a la capacidad de desulfuración en valores numéricos porcentuales para cada uno de los experimentos representados.

65 La figura 3 muestra los resultados experimentales obtenidos en los experimentos realizados a 30°C en matraz utilizando una incubadora orbital (250 r.p.m.) y en fermentador comercial de 2 L de volumen de trabajo - con IPTG

## ES 2 232 290 B1

desde el inicio del experimento e IPTG adicionado a las 4 horas -, empleando medio BSM (ver Ejemplo 1) para realizar los experimentos con 20 g/L de ácido glutámico como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. La concentración inicial de partida es de 0,1 g/l de biomasa obtenida según se especifica en el Ejemplo 1. El seguimiento de biomasa, pH y capacidad desulfurante en las muestras se ha llevado a cabo según se especifica en el Ejemplo 1. Se observan los resultados experimentales referentes a la capacidad de desulfuración en valores numéricos porcentuales para cada uno de los experimentos representados.

### Modo de realización de la invención

A la presente invención referida a un procedimiento de producción de un biocatalizador, se acompañan los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1

*Análisis de la capacidad desulfurante de DBT de Pseudomonas putida CECT5279 crecida en matraz e incubadora orbital en presencia y ausencia de amonio en el medio de cultivo realizado en las siguientes etapas*

##### *Preparación del medio de cultivo*

Para los estudios sobre el crecimiento del microorganismo *Pseudomonas putida* CECT5279 descritos en esta patente se ha utilizado como medio de cultivo básico el medio mínimo denominado BSM (Medio Basal Salino) formado por los siguientes compuestos en las siguientes concentraciones: fosfato monosódico monohidrato 4 g/L; fosfato dipotásico trihidrato 4 g/L; cloruro de magnesio hexahidrato 0,0245 g/L; cloruro de calcio dihidrato 0,001 g/L; cloruro de hierro (III) hexahidrato 0,001 g/L; tetraciclina 25 µg/mL; sulfato de magnesio 2 mM; Glicerol 2%; ácido glutámico 20 g/L. Ajustar a pH 7 con NaOH. Además, a este medio se le añade cloruro de amonio 2 g/L como fuente de nitrógeno, a excepción del ensayo en el que se estudia la ausencia de este compuesto (ejemplo 1). El inductor de la capacidad desulfurante: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 2 µL/mL se adiciona siempre pero puede llevarse a cabo el ensayo con IPTG desde el comienzo (ejemplos 1, 2 y 3) o ser adicionado tras 4 horas de haber iniciado el crecimiento (ejemplo 3).

##### *Preparación del preinóculo*

En todos los casos se ha empleado un método previamente estandarizado de preparación del inóculo, lo que proporciona total reproducibilidad de los resultados experimentales. Para la preparación del preinóculo se ha utilizado la bacteria *P. putida* CECT5279, que se ha conservado en tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidad con una solución de medio LB (Extracto de levadura 5 g/L; triptona 10 g/L; cloruro sódico 10 g/L) y glicerina al 50% a una temperatura de -18°C durante un tiempo máximo de tres semanas. El preinóculo se prepara en medio LB inoculando matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio LB, con 50 µL del contenido del Eppendorf e incubándolos en incubadora orbital a 30°C y 250 r.p.m. durante 12 horas. Este preinóculo se emplea como se describe en cada ejemplo.

### Técnicas analíticas utilizadas

#### *Análisis de biomasa*

Para el seguimiento del crecimiento del microorganismo empleado se ha utilizado un método de análisis de la concentración de biomasa (g/L) basado en la medida de la turbidez del caldo, es decir un método óptico que relaciona la absorbancia que presentan las bacterias, en longitudes de onda del espectro visible, con el peso seco del microorganismo. Consiste, por lo tanto, en medir la absorbancia de la muestra a una cierta longitud de onda, frente a un blanco. La longitud de onda empleada para este análisis fue de 600 nm y el blanco utilizado, agua destilada. El análisis de la biomasa durante los experimentos se realiza según el siguiente protocolo experimental: Se toma una muestra del bioreactor o incubadora orbital y se diluye con agua destilada, de modo que la absorbancia medida entre dentro de la región lineal de la curva de calibrado. El valor de absorbancia obtenido a 600 nm es convertido en concentración mediante la ecuación:

$$C_{\text{biomasa}} \text{ (g/L)} = 0,621 \text{ Abs}_{600\text{nm}}$$

#### *Medida de la concentración de sustrato nitrogenado*

La concentración de nitrógeno (en forma de sal de amonio) ha sido medida empleando un electrodo de membrana semipermeable de la casa ORIÓN, modelo 720A. El procedimiento seguido para el análisis del amonio ha sido el siguiente: Se toma una muestra y se diluye si es necesario hasta un volumen de 10 mL y se adiciona una disolución compuesta por: NaOH 5 M, EDTA 0,5 M, metanol 10% y azul de timol, hasta alcanzar valores de pH superiores a 10 (momento en el que el indicador azul de timo) vira de incoloro a azulado). Para asegurar que la reacción se lleva a cabo correctamente, siempre se adicionan 10 gotas de la disolución, agitando la muestra constantemente. El calibrado se realiza introduciendo dos patrones de concentración conocida (10 y 100 p.p.m.). El intervalo de concentración de calibrado es de 0 a 100 p.p.m. Los patrones son analizados del modo 5 indicado y la pendiente es calculada y almacenada por el equipo de modo que, una vez realizado el calibrado, la concentración es leída directamente.

## ES 2 232 290 B1

### Análisis de los compuestos de la ruta de desulfuración 4S

Se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución. El cromatógrafo empleado para este fin es de la marca HEWLETT PACKARD, serie 1100, con detector "diode array". La columna empleada es del tipo C-8 de 3  $\mu\text{m}$  (150 x 4,6 mm); como eluyente se ha usado una mezcla acetonitrilo/agua Mili Q (50:50), con un caudal de 1 L/min y a 25°C de temperatura, midiendo en el detector a una longitud de onda de 240 nm. En estas condiciones se identifican: DBT, a un tiempo de elución de 14,9 minutos, el 2HBP, a 5,9 minutos, el dibenzotiofeno sulfona (DBTO<sub>2</sub>), que aparece a los 4 minutos y el dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO) a 2,7 minutos. Las ecuaciones de calibrado obtenidas son las siguientes:

$$C_{\text{DBT}}(\mu\text{M}) = 0,00478 \cdot \text{Área}_{14,9\text{min}} - 0,283$$

$$C_{\text{HBP}}(\mu\text{M}) = 0,03536 \cdot \text{Área}_{5,9\text{min}} - 0,621$$

$$C_{\text{DBTO}_2}(\mu\text{M}) = 0,0095 \cdot \text{Área}_{4\text{min}} - 0,41$$

$$C_{\text{DBTO}}(\mu\text{M}) = 0,03 \cdot A_{2,7\text{min}} - 0,06$$

El otro compuesto de la ruta 4S, el hidroxibifenilsulfinato (HBPSi) se analiza a pH entre 1 y 2 para ser detectado con el detector UV-VIS en forma cerrada - denominada sustine -. Se analiza empleando una columna C18 de 3  $\mu\text{m}$  (150 x 4,6 mm), como eluyente se ha usado una mezcla acetonitrilolagua Mili Q (50:50), con un caudal de 1 mL/min a una temperatura de 25°C. El compuesto se detecta a 1,99 minutos en una longitud de onda de 210 nm, siendo la ecuación de calibrado de la concentración en función del área obtenida del pico:

$$C_{\text{HBPSi}}(\mu\text{M}) = 0,021 \cdot \text{Área}_{1,99\text{min}} - 0,6$$

En resumen, el protocolo para la preparación de las muestras para el seguimiento de la desulfuración es el siguiente: se toman 0,5 mL de muestra a cada tiempo de ensayo de células en reposo (*resting cells*). Se añade 0,5 mL de acetonitrilo y, a continuación, se centrifuga a 9000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Se toma una alícuota del sobrenadante para ser analizada mediante HPLC y detectar DBT, 2HBP, DBTO<sub>2</sub> y DBTO. El área de cada pico correspondiente a cada compuesto permite calcular su concentración usando la ecuación de calibrado correspondiente. Posteriormente se acidifican con HCl (10  $\mu\text{L}$ ) el contenido de los viales para alcanzar un pH entre 1 y 2 y se analizan con la columna C18 para detectar el HBPSi.

### Análisis de la capacidad de desulfuración

El análisis de la desulfuración se realiza mediante el sistema de células en reposo (*resting cells*). El protocolo de realización es el siguiente: se parte de una muestra cuyas células han sido tomadas durante el crecimiento en el medio BSM y conservadas en glicerol al 50% a -18°C. Las muestras se descongelan y se mide su concentración de biomasa, para conocer el volumen de inóculo necesario para realizar el ensayo de desulfuración con una concentración de 0,75 g/L de dicha biomasa. Paralelamente se añade DBT al tampón HEPES a pH 8 (40 mL en Erlenmeyer de 250 mL), para tener una concentración inicial de DBT de 25  $\mu\text{M}$ . Se deja en incubadora el tampón con el DBT durante 15 minutos a 30°C de temperatura y 250 r.p.m. A continuación se inocula en el Erlenmeyer la cantidad antes fijada de biomasa. El seguimiento de la desulfuración se realiza tomando muestras cada 30 minutos durante 3 horas. Estas muestras se analizarán posteriormente mediante HPLC, tal como se ha indicado. El parámetro indicador de la capacidad desulfurante es el que se ha denominado porcentaje de desulfuración, cuyo valor se obtiene de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{BDS} = \frac{C_{\text{HBP}}}{C_{\text{DBT}}} \times 100$$

El objetivo de estos experimentos era conocer la influencia que la introducción de amonio en el medio de cultivo presenta sobre la capacidad de desulfuración *P. putida* CECT5279 durante las distintas etapas del crecimiento cuando se utiliza como fuente de carbono un aminoácido como el ácido glutámico. Para observar dicha influencia se realizaron dos experimentos. En el primero de ellos se utilizó cloruro amónico 34 mM más ácido glutámico 136 mM como fuente de nitrógeno. En el segundo de ellos se utilizó el ácido glutámico 136 mM como única fuente de nitrógeno.

Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente manera. Se reparten 50 mL del medio BSM (sales y ácido glutámico) en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente se introduce el IPTG (100  $\mu\text{L}$ ), para tener una concentración de 0,2 mM, y la tetraciclina (50  $\mu\text{L}$ ), para que la concentración sea de 50  $\mu\text{L}$ . En la mitad de los matraces se añade también cloruro amónico. Los matraces se inoculan con el preinóculo preparado según se ha explicado previa-

## ES 2 232 290 B1

mente, para que la concentración de partida en ellos sea de 0,1 g/L de biomasa. Se introducen los matraces Erlenmeyer inoculados en la incubadora orbital con una agitación de 250 r.p.m. y una temperatura de 30°C. Se toman muestras (un matraz Erlenmeyer por punto) y se procesan, como se indicará más adelante, con el fin de realizar el seguimiento del proceso y para la posterior realización del test de desulfuración (*resting cells*).

Durante el desarrollo de los cultivos se llevaron a cabo el análisis y seguimiento de la biomasa, amonio, ácido glutámico, pH y capacidad de desulfuración. El volumen del Erlenmeyer (50 mL) se centrifuga a 9000 r.p.m. durante 10 min a 4°C, con el fin de separar el caldo de las células, y de esta forma parar el crecimiento y la evolución de las muestras. El caldo es conservado en tubos estériles e introducido en congelador para su conservación hasta el análisis de los diferentes componentes del caldo. El sedimento con las células es lavado con 50 ml de suero salino y centrifugado nuevamente en las condiciones comentadas anteriormente. El sobrenadante será eliminado y el sedimento será resuspendido en 10 mL de glicerol al 50% para su conservación hasta la realización del test de desulfuración (*resting cells*).

En la Figura 1 se recogen los resultados obtenidos a partir de los citados experimentos, observándose que no se presentan diferencias en las evoluciones de la biomasa y del pH a lo largo del experimento (20 horas) entre los cultivos que contienen cloruro amónico y los que no lo contienen. En los cultivos que no contienen cloruro amónico se produce una acumulación progresiva de amonio debido a que el microorganismo debe emplear en mayor medida la parte hidrocarbonada de la molécula del ácido glutámico y le sobra amonio, que deja en el caldo. Sin embargo, cuando se introduce ión amonio en el caldo, se produce un descenso en su concentración durante las 10 primeras horas de fermentación, produciéndose después un aumento del amonio a la misma velocidad que en el caso anterior.

La capacidad desulfurante del microorganismo obtenido en estas condiciones se realiza y calcula como se ha indicado anteriormente. Mientras que las células crecidas en presencia de amonio llegan a presentar un máximo de desulfuración de alrededor del 70%, las obtenidas sin amonio no superan en ningún caso el 25% de desulfuración. Este resultado indica la importancia del amonio para obtener células con capacidad desulfurante.

### Ejemplo 2

*Análisis de la capacidad desulfurante de DBT de Pseudomonas putida CECT5279 crecida en matraz e incubadora orbital a diferentes temperaturas*

Se desarrolla como en el ejemplo 1 donde para comprobar la influencia de la temperatura de operación en la capacidad de desulfuración desarrollada por las células de *P. putida* CECT5279 se procedió a la realización de experimentos a distintas temperaturas en un medio de cultivo que contiene cloruro amónico. Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente manera. Para cada experimento realizado a una temperatura determinada, se prepararon matraces Erlenmeyer con medio de cultivo conteniendo cloruro amónico como se describe en el ejemplo 1. Los matraces Erlenmeyer inoculados se introdujeron en la incubadora orbital con una agitación de 250 r.p.m. a las temperaturas objeto de estudio, es decir 28°C, 30°C, y 32°C. Se tomaron muestras (un matraz Erlenmeyer por punto) y se procesaron y analizaron como se indicó en el ejemplo 1.

En la Figura 2 se recogen los resultados comparativos de los tres experimentos comentados, observándose que el máximo nivel de desulfuración se obtiene cuando las células se cultivan a una temperatura de 30°C.

### Ejemplo 3

*Análisis de la capacidad desulfurante de DBT de Pseudomonas putida CECT5279 en un reactor de 2 L de volumen de trabajo*

Como en el ejemplo 1, para determinar la influencia del transporte de oxígeno (o de la cantidad de oxígeno disuelto al que puede acceder el microorganismo) en la preparación de células con capacidad de desulfuración de DBT, se realizó un experimento empleando un reactor comercial tipo tanque agitado de la marca Braun Biotech (actualmente *Sartorius*), modelo Biostat B, empleando una cuba de un volumen de trabajo de 2 L, con sensores de medida de pH, oxígeno disuelto y temperatura.

En el reactor se puede controlar la cantidad de aire (caudal) y la velocidad de agitación de forma programada para evitar la existencia de daño celular causado por estrés hidrodinámico. De este modo, es posible mantener el oxígeno disuelto en el sistema en valores no limitantes para el crecimiento de un microorganismo aerobio como es el empleado. Otro objetivo de este experimento, es la determinación del impacto del estrés oxidativo en la producción del biocatalizador.

El procedimiento experimental utilizado en los experimentos realizados en fermentador comercial se describe a continuación. En primer lugar la composición del medio de cultivo es similar a la utilizada en el Ejemplo 1, empleando un volumen de 2 L, siendo esterilizada de forma separada las sales del medio BSM (cuyo pH se ha ajustado a 7) y la fuente de carbono (ácido glutámico). La fuente de carbono se introduce de forma estéril (empleando una bomba peristáltica del equipo para ello) una vez que la temperatura de la vasija ha bajado a valores cercanos a 50°C. Una vez mezcladas las sales y la fuente de carbono, y con el reactor precalentado a una temperatura a 30°C se introduce el antibiótico tetraciclina. De forma paralela se prepara el inóculo como se ha comentado previamente en el Ejemplo

## ES 2 232 290 B1

1, y conocida la concentración de biomasa presente en el mismo, se procede a la inoculación en el fermentador con el volumen del mismo necesario (no superior a 200 mL) para que la concentración inicial de biomasa sea de 0,1 g/L. En un primer experimento, manteniendo el reactor precalentado a una temperatura a 30°C (ejemplo 2) se introduce a continuación el IPTG (0,2 mM) que actúa como inductor del sistema de desulfuración. En un segundo experimento el IPTG se introdujo en el reactor después de las 4 horas de fermentación.

En el reactor se introduce un caudal de aire (L aire/L medio/min) al caldo de cultivo, aumentando durante el experimento la agitación desde unavvalor inicial de 100 r.p.m. hasta un máximo de 350 r.p.m. para evitar la existencia de daño celular causado por estrés hidrodinámico. Este aumento se realiza para compensar el consumo de oxígeno disuelto e intentar mantener el valor de su cantidad en disolución en valores ligeramente superiores al 0% de saturación.

Para llevar a cabo el seguimiento de la evolución de este sistema durante el proceso, se realiza la toma de las muestras a distintos tiempos, así como el análisis de las mismas. Se realizaron análisis de la biomasa, pH y capacidad de desulfuración. En cada toma de muestra se extrae un volumen de 50 mL del reactor. Cada muestra se procesa y analiza según se describe en el ejemplo 1.

En la Figura 3 se representan los resultados obtenidos en condiciones de limitación de oxígeno disuelto (matraz en incubadora orbital) y en el caso de mantener la citada variable en valores lejanos a una posible limitación (reactor tipo tanque agitado y aireado). En este segundo caso se muestran los resultados obtenidos cuando se adiciona el inductor IPTG al comienzo de la fermentación y después de 4 horas de fermentación.

En primer lugar, en la Figura 3 se muestra que cuando el inductor IPTG se añade desde el comienzo de la fermentación se observa que tanto el crecimiento del microorganismo como la capacidad de eliminar el azufre de la molécula de DBT es menor cuando no existe limitación de oxígeno. Esto es debido al estrés oxidativo que sufre este microorganismo por la hiperproducción de la enzima HpaC oxidorreductasa. Como el inductor IPTG se ha introducido desde el principio del crecimiento del microorganismo se produce una gran cantidad de la enzima HpaC, la cual genera desde el comienzo demasiado FMNH<sub>2</sub> quien a su vez en presencia de oxígeno genera mucho peróxido de hidrógeno que al no poder ser eliminado por la bacteria le produce un daño celular grave que disminuye su capacidad de desulfuración.

A la vista del resultado del experimento anterior, se pensó que el método a emplear para producir células con elevada capacidad de desulfuración en un reactor consistiría en realizar un crecimiento inicial de la bacteria en ausencia del inductor IPTG, para que a las 4 horas de haberse iniciado el mismo, cuando la cantidad de biomasa es más elevada, se pueda introducir el IPTG en el reactor. Realizado este experimento, los resultados se muestran en la Figura 3. En esta figura se puede observar como el hecho de introducir el IPTG a las 4 horas influye de forma destacada en la capacidad de desulfuración que esas células desarrollan, consiguiéndose valores de desulfuración mayores que los obtenidos hasta la fecha con cualquier otro procedimiento, ya sea en reactor o en incubadora orbital.

Por tanto, tras los ejemplos 1, 2 y 3 que se han venido exponiendo, los pasos a seguir para obtener un cultivo de *Pseudomonas putida* CECT5279 con elevada capacidad desulfurante son los siguientes:

- a) Partiendo de un stock congelado del microorganismo se realiza un primer preinóculo en medio de cultivo LB contenido en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Este cultivo se incuba a 30°C durante 12 horas en Incubadora Orbital. A continuación, con las células crecidas en esta etapa, se realiza un segundo cultivo en medio LB en las mismas condiciones que antes pero fijando la concentración inicial de biomasa en 0,1 g/L.
- b) Una vez obtenido el preinóculo se transfiere al bioreactor de 2 L que contiene un medio de cultivo sintético BSM cuya composición es: fosfato monosódico monohidrato 4 g/L; fosfato dipotásico trihidrato 4 g/L; cloruro de amonio 2 g/L; cloruro de magnesio hexahidrato 0,0245 g/L; cloruro de calcio dihidrato 0,001 g/L; cloruro de hierro (III) hexahidrato 0,001 g/L; tetraciclina 25 µg/mL; sulfato de magnesio 2 mM; Glicerol 2%; ácido glutámico 20 g/L; isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 2 µUmL. pH 7 con NaOH.). La concentración inicial de biomasa en el reactor se fija en 0.1 g/L. Las condiciones de operación en el bioreactor aireado son 28-32°C de temperatura y agitación, que irá aumentando desde 100 rpm hasta 350 rpm. El inductor de la capacidad desulfurante IPTG se debe adicionar a las 4 horas de haber realizado el inóculo en el reactor.
- c) Mediante este procedimiento se obtendrán células con elevada capacidad de desulfuración a partir de las 10 horas del crecimiento en el medio y en las condiciones descritas.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de cultivo de la *Pseudomonas putida* recombinante (CECT 5279) para su utilización en la desulfuración de dibenzotiofeno, **caracterizado** porque el cultivo de dicha bacteria incluye las siguientes operaciones:

- 10 a) Utilización de un preinóculo obtenido a partir de células de stocks congelados y empleando medio de cultivo LB (Extracto de levadura 5 g/L; triptona 10 g/L; cloruro sódico 10 g/L) para realizar los preinóculos.
- 10 b) Utilización de un medio de cultivo sintético y mínimo BSM: fosfato monosódico monohidrato 4 g/L; fosfato dipotásico trihidrato 4 g/L; cloruro de amonio 2 g/L; cloruro de magnesio hexahidrato 0,0245 g/L; cloruro de calcio dihidrato 0,001 g/L; cloruro de hierro (III) hexahidrato 0,001 g/L; tetraciclina 25 µg/mL; sulfato de magnesio 2 mM; Glicerol 2%; ácido glutámico 20 g/L; isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 2 µ/mL. pH 7 con NaOH).

15 2. Procedimiento de cultivo de la *Pseudomonas putida* recombinante (CECT 5279) para su utilización en la desulfuración de dibenzotiofeno, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la temperatura de operación empleada es entre 26 y 34°C, presentando mayor capacidad de desulfuración a 30°C.

20 3. Procedimiento de cultivo de un biocatalizador para la desulfuración de dibenzotiofeno utilizando una bacteria recombinante de *Pseudomonas putida*, según reivindicación 1, **caracterizado** porque se introduce el inductor IPTG después de 4 horas de haber realizado el inóculo en el medio de crecimiento.

25 4. Proceso de producción de un biocatalizador para la desulfuración de dibenzotiofeno utilizando una bacteria recombinante de *Pseudomonas putida*, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se lleva a cabo en un bioreactor o en una incubadora orbital.

30

35

40

45

50

55

60

65

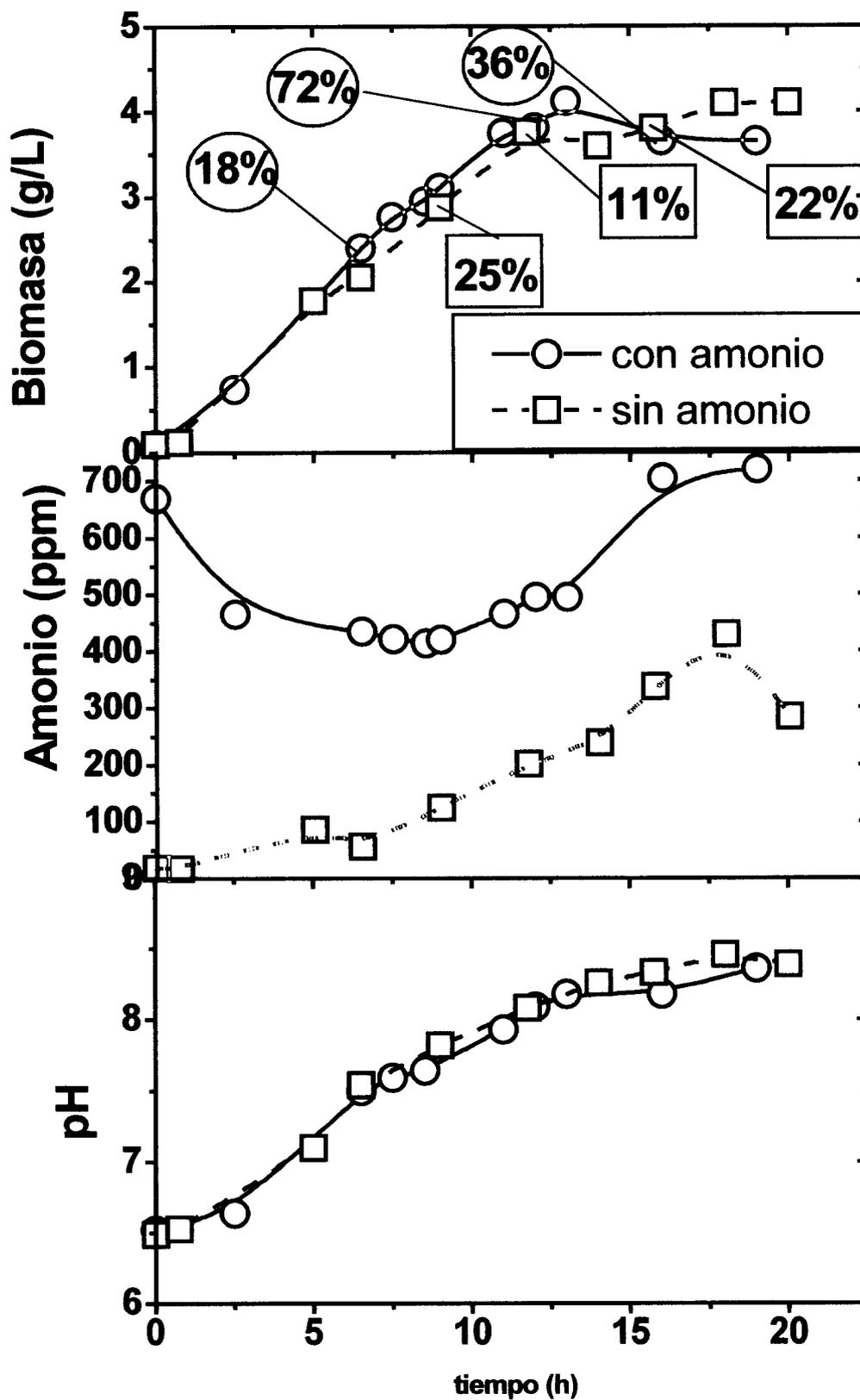


FIGURA 1

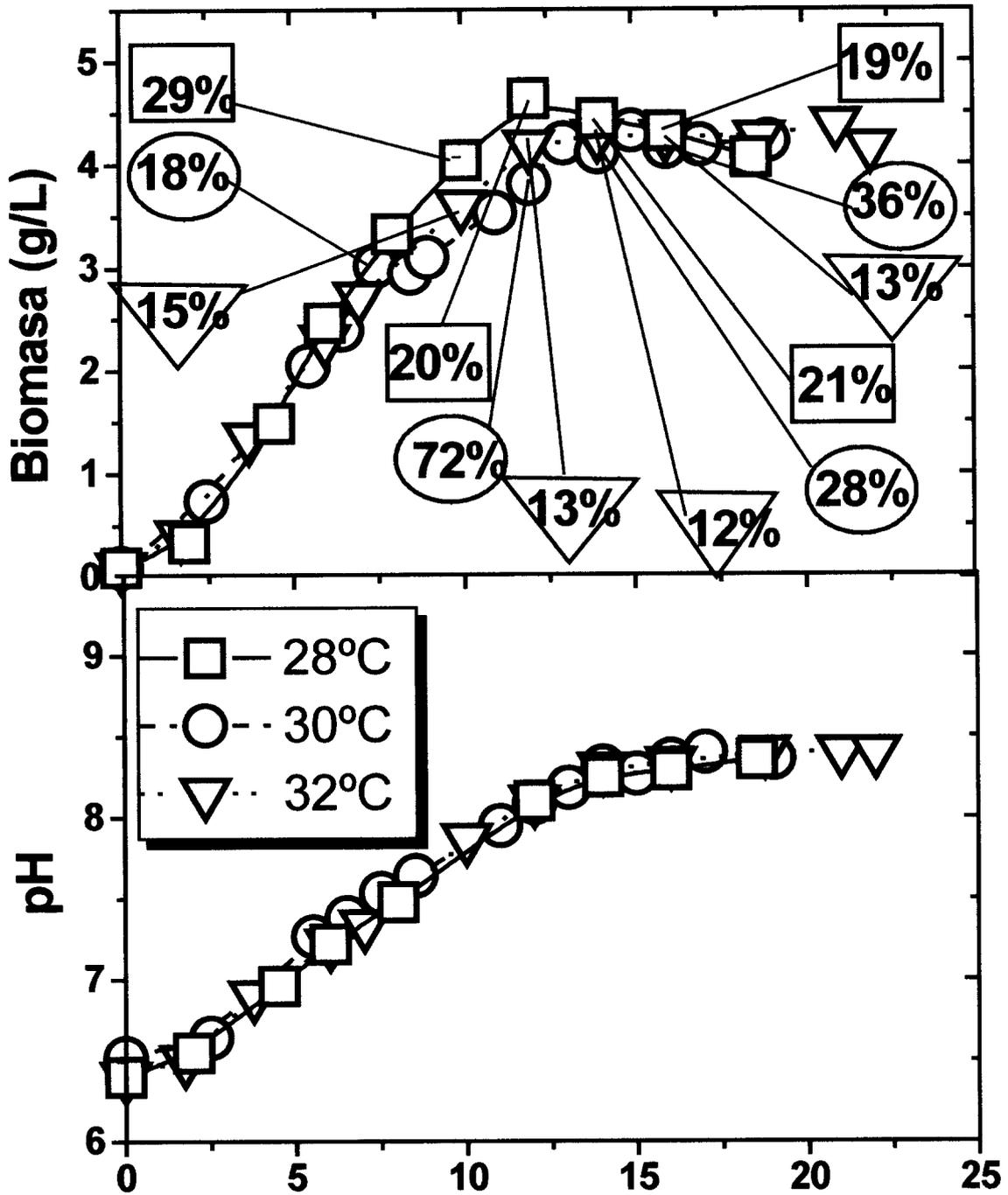


FIGURA 2

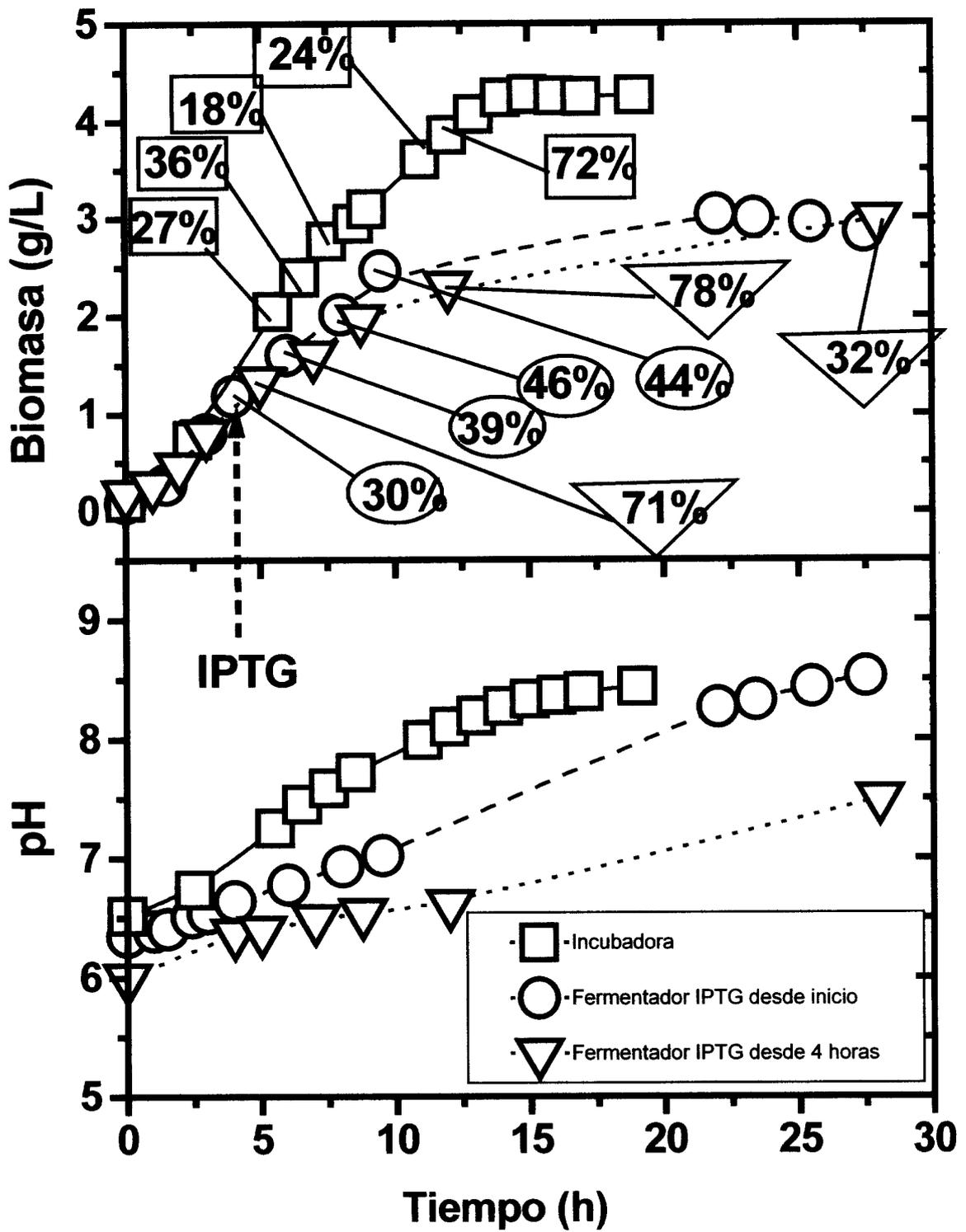


FIGURA 3



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 232 290

② Nº de solicitud: 200301677

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.07.2003

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 1/21, 1/38, C12S 1/02, C10G 32/00, C12P 7/22 // (C12N 1/21, C12R 1:40)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2168945 A1 (C.S.I.C.) 16.06.2002, ejemplo 4.	1,2,4
X	GALÁN, B. et al. Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. Environmental Microbiology, 2000, Vol. 2 (6), páginas 687-694.	1,2,4
A	US 5674678 A (SHIMIZU et al.) 07.10.1997	3
A	US 5952208 A (DARZINS et al.) 14.09.1999	
A	CONSTANTÍ et al. Degradation of dibenzothiophene by Pseudomonas putida. Letters in Applied Microbiology, 1994, Vol. 18, páginas 107-111.	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
22.04.2005

Examinador  
A. Polo Díez

Página  
1/1