

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 225**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 13/06 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2013 PCT/EP2013/056190**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13149864**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2013 E 13715159 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2834347**

54 Título: **Procedimiento para la producción aerobia de alanina**

30 Prioridad:

02.04.2012 EP 12162846

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

24.05.2018

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**HENNEMANN, HANS-GEORG;
SCHAFFER, STEFFEN;
WESSEL, MIRJA;
PÖTTER, MARKUS;
PFEFFER, JAN CHRISTOPH;
HAAS, THOMAS;
CORTHALS, JASMIN;
ECKL, EVA-MARIA;
ROEDER, SILVANA;
KROUTIL, WOLFGANG y
SKERRA, ARNE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 669 225 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción aerobia de alanina

5 La invención se refiere a un procedimiento para la producción de alanina, que comprende (a) la puesta a disposición de una célula que expresa una alanina-deshidrogenasa recombinante, (b) el cultivo de la célula bajo condiciones aerobias en presencia de una fuente de nitrógeno inorgánica en una fase acuosa, y (c) la puesta en contacto de la célula con una fase hidrófoba orgánica, tratándose de una célula procariota o eucariota inferior en el caso de la célula.

10 Además de la función como aminoácido proteinógeno, es decir, como aminoácido que representa un componente esencial de numerosas proteínas, la alanina se emplea como donador de amina ampliamente extendido para procedimientos biotecnológicos y síntesis químicas. En el caso de síntesis biotecnológica industrial, la alanina requerida se puede añadir a las células activas biosintéticamente en forma de alanina sintetizada químicamente o en forma de extractos de levadura. No obstante, en relación con aspectos económicos y eventualmente con la pureza de un producto a purificar a partir del medio de cultivo, es más conveniente que las células activas biosintéticamente produzcan la alanina requerida en sí mismas en cantidad suficiente. En este sentido, existe un interés elevado en microorganismos empleables en biotecnología, que produzcan continuamente una cantidad de alanina lo más elevada posible, que se encuentra a disposición entonces para pasos de síntesis sucesivos dentro o fuera de la célula. El estado de la técnica enseña que se forma una cantidad especialmente grande de alanina si se mantiene una célula que expresa alanina-deshidrogenasa bajo condiciones anaerobias ("Production of L-alanine by metabolically engineered Escherichia coli" Appl Microbiol Biotechnol (2007), 77:355-366). No obstante, tales condiciones ocasionan un crecimiento claramente reducido de las células, un rendimiento metabólico reducido y la digestión de sustratos costosos, como glucosa, para dar productos secundarios no deseados de metabolismo primario a costa de la eficiencia y del rendimiento en productos del proceso total. Geoffrey M Smith (2006), Biotechnology letters, 28(20): 1695-1700 y M Lee et al. (2004), Applied Microbiology and Biotechnology, 65(1): 56-60 enseñan que se forma alanina si se mantiene una célula que expresa alanina-deshidrogenasa bajo condiciones aerobias.

No obstante, la producción es reducida. Por lo tanto, para el desarrollo de procesos biotecnológicos rentables a escala industrial, es esencial la posibilidad de llevar esto a cabo bajo condiciones aerobias.

A la vista de lo expuesto existe una necesidad de procedimientos que sean apropiados para aumentar la cantidad de alanina disponible para síntesis en una célula biotecnológicamente *bajo condiciones aerobias*.

30 Además existe la necesidad de procedimientos para la producción biotecnológica de ácidos ω -aminocarboxílicos bajo adición reducida, o en lo posible solo opcional o solo temporal de alanina, poniéndose a disposición el nitrógeno necesario para la producción de ácido ω -aminocarboxílico en forma de sales de nitrógeno inorgánicas, y/o procedimientos en los que se mejora el rendimiento de ácido ω -aminocarboxílico en un modo de reacción sin adición de alanina.

35 Estas y otras tareas se solucionan mediante el objeto de la presente invención, en especial también mediante el objeto de las reivindicaciones adjuntas, resultando formas de realización de las reivindicaciones subordinadas.

El problema que motiva la invención se soluciona en un primer aspecto mediante un procedimiento para la producción de alanina, que comprende

a) la puesta a disposición de una célula que expresa alanina-deshidrogenasa recombinante,

40 b) el cultivo bajo condiciones aerobias en presencia de una fuente de nitrógeno inorgánica en una fase acuosa, y

c) la puesta en contacto de la célula con una fase hidrófoba orgánica,

tratándose de una célula procariota o eucariota inferior en el caso de la célula.

45 En una primera forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento, presentando la célula un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para un alCL-polipéptido, preferentemente el AlCL de *Pseudomonas putida* (código de banco de datos AJ245436) o una variante del mismo, y/o el alCL-polipéptido o una variante del mismo.

- En una segunda forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, siendo heterólogo el alcL-polipéptido o la variante del mismo, y sobreexpimiéndose preferentemente.
- 5 En una tercera forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera a la segunda forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, realizándose el paso c) al realizarse el paso b) en presencia de la fase orgánica.
- En una cuarta forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera al tercera forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, comprendiendo la fase orgánica un éster de ácido graso hidrófobo, preferentemente laurato de metilo.
- 10 En una quinta forma de realización, que también representa una forma de realización de la cuarta forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, comprendiendo la fase orgánica, además del éster de ácido graso hidrófobo, un ácido graso hidrófobo.
- En una sexta forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera a la quinta forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, comprendiendo la fase orgánica al menos un disolvente hidrófobo a partir del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, arilos, heteroarilos, dialquiléteres, alcoholes grasos, triglicéridos e hidrocarburos halogenados no sustituidos, sustituidos, ramificados y no ramificados.
- 15 En una séptima forma de realización, que también representa una forma de realización de la sexta forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, siendo el ácido graso hidrófobo un ácido graso insaturado, preferentemente ácido oleico.
- 20 En una octava forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera a la séptima forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, presentando la célula una transaminasa heteróloga, que reconoce alanina como sustrato, y seleccionándose la transaminasa preferentemente a partir del grupo que comprende transaminasas de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695), así como variantes del mismo.
- 25 En una novena forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera a la octava forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, presentando la célula, adicionalmente a la transaminasa heteróloga, una o más monooxigenasas, que catalizan por separado o secuencialmente la oxidación de un ácido graso o de un éster de ácido graso para dar el ácido ω -oxograso o para dar el ácido ω -oxograso.
- 30 En una décima forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera a la novena forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, siendo heterólogas la o las monooxigenasas, y seleccionándose a partir del grupo que comprende monooxigenasas de la familia AlcB y citocromo P450-monooxigenasas de la familia CYP153, y variantes de las mismas.
- 35 En una undécima forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera a la décima forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, tratándose de una célula bacteriana en el caso de la célula, preferentemente *Escherichia coli*.
- En una duodécima forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera a la undécima forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, durando el paso c) al menos 60 minutos.
- 40 En una decimotercera forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera a la duodécima forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, comprendiendo la fase acuosa menos de 10 mM, preferentemente menos de 5 mM, de modo aún más preferente aún menos de 1 mM de alanina.
- 45 En una decimocuarta forma de realización, que también representa una forma de realización de la primera a la decimotercera forma de realización, el problema se soluciona mediante un procedimiento, constituyendo la fase orgánica al menos un 5 por ciento en volumen, preferentemente más de un 20 por ciento en volumen de la suma de volúmenes de fase acuosa y orgánica. En un segundo aspecto, el problema que motiva la presente invención se soluciona mediante un empleo de una célula heteróloga que expresa alanina-deshidrogenasa para la producción de

alanina bajo condiciones aerobias en presencia de una fase hidrófoba orgánica, tratándose de una célula procariota o eucariota inferior en el caso de la célula, y comprendiendo la fase orgánica preferentemente un éster de ácido graso hidrófobo y un ácido graso hidrófobo, de modo aún más preferente laurato de metilo y ácido oleico. En un tercer aspecto, el problema que motiva la presente invención se soluciona mediante el empleo de una fase hidrófoba orgánica para el aumento del rendimiento de alanina, que comprende puesta en contacto de una célula procariota o eucariota inferior que produce alanina con la fase hidrófoba orgánica, comprendiendo la fase orgánica preferentemente un éster de ácido graso hidrófobo y un ácido graso hidrófobo, de modo aún más preferente laurato de metilo y ácido oleico. En otra forma de realización del primer, segundo o tercer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento o un empleo, presentándose la célula en una disolución acuosa a una densidad óptica de al menos 0,5, preferentemente al menos 1, de modo aún más preferente al menos 5, del modo más preferente al menos 10. En otra forma de realización del primer, segundo o tercer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento o un empleo, tratándose en el caso de la alanina-deshidrogenasa de la alanina-deshidrogenasa a partir de *Bacillus subtilis* (código de banco de datos P_391071), o de una variante de la misma. Los inventores han descubierto que la producción de alanina se aumenta claramente de modo inesperado mediante una célula huésped procariota, que exprime alanina-deshidrogenasa, bajo condiciones aerobias, y en presencia de una fuente de nitrógeno inorgánica, si la célula se pone en contacto con una disolución hidrófoba orgánica.

La enseñanza según la invención se puede emplear para la mejora de todos los procedimientos biotecnológicos, que comprenden la obtención de productos, como productos químicos finos, bajo consumo de alanina, y, en el caso de empleo de una célula activa metabólicamente, su cultivo en un medio acuoso y la elaboración del producto. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "célula", como se emplea en este caso, se entiende una célula viva con actividad metabólica, preferentemente un catalizador de célula completa, que exprime, o de modo aún más preferente sobreexpone una enzima relevante para la obtención biotecnológica del producto interesante en forma activa. En el caso de la célula se puede tratar de una procariota, incluyendo arqueas, o de una eucariota, en el caso de una procariota preferentemente del grupo de especies que comprenden *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y *Escherichia*. En una forma de realización aún más preferente, en el caso de la célula se trata de una célula bacteriana, de modo aún más preferente de una célula bacteriana gram-negativa, del modo más preferente de *E. coli*. En otra forma de realización preferente se trata de una célula eucariota, de modo más preferente de una célula eucariota inferior, o bien una célula fúngica, de modo aún más preferente de una célula de levadura, del modo más preferente de *Saccharomyces* o *Candida*, *Pichia*, en especial *Candida tropicalis*. En una forma de realización preferente, el concepto "eucariota inferior", como se emplea en este caso, significa una eucariota unicelular en todas las fases de su existencia, en contrapartida a eucariotas superiores, que pasan la mayor parte de su vida en forma de un organismo pluricelular con tejidos que comprenden células diferenciadas. En una forma de realización especial, el concepto "célula" se emplea de manera equivalente e intercambiable con el concepto "microorganismo". Además, en el caso de la célula se puede tratar de una célula aislada o de una mezcla de diversas células.

Es condición para la utilización de la enseñanza según la invención la presencia de una fase acuosa, es decir, de un cultivo – o medio de reacción acuoso, que es apropiado para la obtención al menos temporal o el cultivo de la célula. Para el especialista son conocidos numerosos medios de cultivo acuosos, que son apropiados para la obtención o el cultivo de células, en especial células significativas desde el punto de vista biotecnológico. A éstas corresponden igualmente medios completos, como medios LB, medios mínimos, como medios M9, así como medios selectivos, por ejemplo aquellos que contienen una concentración de sales elevada y, por lo tanto, posibilitan solo el crecimiento de organismos halófilos o al menos halotolerantes. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "fase acuosa"; como se emplea en este caso, se entiende un medio de reacción o cultivo de base acuosa sensiblemente no miscible con disolventes hidrófobos, que está constituido respecto a todos los factores relevantes, en especial valor de pH, contenido en sales y temperatura, de tal manera que adquiera o fomente al menos temporalmente la viabilidad de células contenidas en el mismo, preferentemente microorganismos, y tanto el medio de cultivo acuoso como también la fase hidrófoba orgánica se presentan en forma líquida a temperaturas de incubación habituales para organismos útiles biotecnológicamente, preferentemente a 25°C. Los requisitos de temperatura de diversas células significativas biotecnológicamente se pueden extraer de libros de texto de microbiología y biología molecular, por ejemplo Fuchs/Schlegel, 2008. En una forma de realización preferente, el valor de pH del medio de cultivo acuoso en el momento de la puesta en contacto se sitúa entre 4 y 9, preferentemente entre 4,5 y 8,5, del modo más preferente entre 6,5 y 7,5. En otra forma de realización preferente, la temperatura se sitúa entre 5 y 42 °C, de modo más preferente entre 15 y 40 °C, del modo más preferente entre 20 y 37 °C.

La enseñanza según la invención prevé que la célula exprime una alanina-deshidrogenasa recombinante. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "alanina-deshidrogenasa", como se emplea en este caso, se entiende una enzima que cataliza la transformación de piruvato, amoníaco y NADH o sus sales para dar L-alanina, agua y NAD⁺. En el caso de la alanina-deshidrogenasa se trata preferentemente de una alanina-deshidrogenasa intracelular, de modo aún más preferente de una alanina-deshidrogenasa recombinante intracelular, o de un catalizador de célula completa bacteriano. En una forma de realización especialmente preferente, en el caso de la enzima se trata de *Bacillus subtilis* (código de banco de datos P_391071), o variantes de la misma. Otros ejemplos

comprenden las enzimas de *Rhizobium leguminosarum* (código de banco de datos YP_002975437), *Bacillus megaterium* (código de banco de datos YP_003565624), *Rhodobacter capsulatus* (código de banco de datos ADE84249.1) y *Bacillus subtilis* (código de banco de datos NP_391071), y variantes de los mismos.

5 Para la síntesis de alanina es esencial que los eductos se presenten en cantidad suficiente, en especial una fuente de nitrógeno inorgánica. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "fuente de nitrógeno inorgánica", como se emplea en este caso, se entiende una sal inorgánica nitrogenada, que comprende amonio o se puede transformar en el metabolismo de la célula para dar amonio. Los ejemplos comprenden cloruro amónico, nitrato amónico, sulfato amónico, hidróxido amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y similares. En una forma de realización preferente, la concentración de amonio en el medio asciende a 0,05 hasta 5, preferentemente 0,1 a 3, del modo más preferente 0,5 a 3 g/L. Según la invención, la fuente de nitrógeno inorgánica de la célula se pone a disposición preferentemente añadiéndose el compuesto correspondiente a la fase acuosa en cantidad suficiente.

15 En una forma de realización preferente, la célula presenta, además de la alanina-deshidrogenasa recombinante, al menos otra enzima recombinante. En una forma de realización preferente, en este caso se trata de la enzima que reduce NAD(P)^+ para dar NAD(P)H , a modo de ejemplo una monooxigenasa de citotromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153, o de la familia AlcBGT, o una alcohol-deshidrogenasa. Por lo tanto, es especialmente ventajoso el empleo de un sistema en el que la enzima que reduce NAD(P)^+ y la deshidrogenasa de aminoácido transforman el mismo cofactor redox, preferentemente NAD(H) o NADP(H) . Las alanina-deshidrogenasas dependientes de NADP comprenden la enzima de *Rhodobacter capsulatus* (código de banco de datos ADE84249.1), y variantes del mismo. Las alanina-deshidrogenasas dependientes de NAD comprenden la alanina-deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (código de banco de datos NP_391071), y variantes del mismo.

20 En una forma de realización especialmente preferente, en el caso de la monooxigenasa se trata de una monooxigenasa de la familia AlcB. AlcB representa una oxidoreductasa del sistema AlcBGT de *Pseudomonas putida*, que es conocida por su actividad de hidroxilasa. Ésta es dependiente de otros dos polipéptidos, AlcG y AlcT. AlcT se caracteriza como rubredoxina-reductasa dependiente de FAD, que transfiere electrones de NADH a AlcG. AlcG es una rubredoxina, una proteína redox que contiene hierro, que actúa como donador de electrones directo para AlcB. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "monooxigenasa de la familia alcB", como se emplea en este caso, se entiende una alcanohidroxilasa en posición de membrana. En otra forma de realización preferente, bajo el mismo concepto "alcanohidroxilasa de tipo alcB" se entiende un polipéptido con una homología de secuencia preferentemente al menos un 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98 o un 99 % respecto a la secuencia de AlcB de *Pseudomonas putida* Gpo1 (código de banco de datos: CAB54050.1, este código de banco de datos y todos los demás códigos de banco de datos empleados en este documento proceden del banco de datos de proteínas de banco genético de NCBI en la edición disponible el 9 de Noviembre de 2011). El concepto "secuencia", como se emplea en este caso, se puede referir a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido y/o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la misma.

35 En una forma de realización especialmente preferente, en el caso de la monooxigenasa se trata de citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153" se entiende una oxidasa citosólica, que comprende además una ferredoxina y una ferredoxina-reductasa, con un punto de enlace de alcano y la capacidad de hidrolizar alcanos. En una forma de realización especialmente preferente se trata de una enzima que presenta en al menos un 80, preferentemente un 90, del modo más preferente un 95 o un 99 por ciento de identidad de secuencia con la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de banco de datos YP_691921), o de una enzima que presenta una secuencia de polipéptidos que presenta al menos un 80, preferentemente un 90, del modo más preferente un 95 o un 99 por ciento de identidad de secuencia respecto a la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de banco de datos YP_691921), y además actividad de alcanohidroxilasa. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "actividad de alcanohidroxilasa", como se emplea en este caso, se debe entender la capacidad de catalizar la hidroxilación de alcanos o restos alquilo no sustituidos, que comprenden al menos cinco, preferentemente doce restos hidrocarburo. En otra forma de realización preferente, bajo el concepto "citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153" se entiende una oxidasa no unida a membrana, que comprende un punto de enlace para alcanos, restos alquilo lineales no sustituidos que comprenden al menos cinco, preferentemente doce restos hidrocarburo, o alcanos monohidroxilados, y cuya cadena polipeptídica comprende el motivo LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN. En una forma de realización preferente, en el caso de una "citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153", como se emplea en este caso, se trata de una citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de banco de datos YP_691921), o de una variante, que presenta preferentemente reactividad de alcanohidroxilasa.

El empleo de citocromo P450-monooxigenasas de la familia CYP153 para la hidroxilación de alcanos se describe en el estado de la técnica, así como ensayos enzimáticos para la determinación de la actividad enzimática y

- procedimientos para la expresión y purificación (Scheeps, D., Malca, H., Hoffmann, B., Nestl, B. M, und Hauer, B. (2011) *Org. Biomol. Chem.*, 9, 6727). Además de los restos hidrocarburo, al menos cinco, preferentemente doce, que comprenden un alcano a oxidar o resto alquilo lineal no sustituido, los sustratos contenidos para la reacción de la enzima comprenden oxígeno y electrones, que se transfieren a la oxidasa en forma de NADH preferentemente a través de los otros dos componentes, ferredoxina y una ferredosina-reductasa. Scheeps *et al.* (2011), así como Roome, P. W., Jr., Phillely, J. C., und Peterson (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2593, Roome, P.W., and Peterson, J. A. (1988), *Arch. Biochem. Biophys.*, 266, 41 y Peterson, J. A., Lorence, M. C., y Amarnah, B. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 6066 dan a conocer también procedimientos para la obtención de ferredoxina y ferredoxina-reductasa en forma funcional.
- 5
- 10 Como célula se selecciona generalmente una célula que se puede producir un producto de especial interés bajo consumo de alanina. A tal efecto es especialmente ventajoso el empleo de una célula recombinante. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "recombinante", como se emplea en este caso, se entiende que la molécula de ácido nucleico denominada recombinante, introducida en la "célula recombinante", no se presenta en la naturaleza en esta forma, sino que es una molécula de ácido nucleico producida bajo empleo de procedimientos de biología molecular o de síntesis química, o bien que la célula denominada recombinante comprende una molécula de ácido nucleico recombinante o un polipéptido codificado por la misma, en especial un polipéptido con actividad de alanina-deshidrogenasa. Los procedimientos rutinarios de biología molecular para la producción de moléculas de ácido nucleico y células recombinantes se describen en el estado de la técnica, a modo de ejemplo en Sambrook *et al.* (1989) o Schlegl & Fuchs (2007).
- 15
- 20 Según la invención, la célula genera un producto de especial interés. En una forma de realización preferente, para esta obtención la alanina es indispensable como educto en alguna etapa de producción, a modo de ejemplo para la producción de un polipéptido que contiene alanina, en contrapartida con la obtención de un producto para cuya síntesis son necesarios átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, como los de alanina, aunque éstos pueden proceder igualmente de otras fuentes. La cantidad de alanina consumida o consumible para la síntesis aumenta preferentemente la cantidad que puede producir naturalmente la célula empleada y, de modo especialmente preferente el factor, o al menos un factor que limita el rendimiento en producto interesante.
- 25
- Además es especialmente ventajoso que la célula sobreexpresa la alanina-deshidrogenasa y/o al menos otro enzima. Esto se puede conseguir incluyéndose en la célula un vector que comprende una molécula de ácido nucleico codificante para la enzima, mediante transformación o similares, o incorporándose la molécula de ácido nucleico codificante para la enzima en la composición genética de la célula, a modo de ejemplo un cromosoma. Para numerosos tipos de células significativos desde el punto de vista biotecnológico, por ejemplo *E. coli*, son conocidos procedimientos y vectores apropiados que se pueden emplear para la expresión o superexpresión de una molécula de ácido nucleico, a modo de ejemplo los vectores de tipo pET o pGEX, y células apropiadas para su expresión (Moffatt & Studier (1986), Rosenberg *et al.* (1987) y Studier *et al.* (1990).
- 30
- 35 La enseñanza de la presente invención se puede realizar, o bien aplicar no solo bajo empleo de las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos exactas de las macromoléculas biológicas descritas en este caso, a modo de ejemplo una alanina-deshidrogenasa, a modo de ejemplo mediante eliminación de un gen que codifica para una enzima que cataliza las reacciones de β -oxidación, sino también bajo empleo de variantes de tales macromoléculas, que se pueden obtener mediante delección, adición o sustitución de uno o más de un aminoácido o ácido nucleico. En una forma de realización preferente, el concepto "variante" de una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos, a continuación utilizado de manera equivalente e intercambiable con el concepto "homólogo", como se emplea en este caso, significa otra secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que presenta, respecto a la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de tipo salvaje original, una homología, en este caso equivalente a identidad, de un 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98, 99 % o más, estando eliminados o sustituidos preferentemente aminoácidos diferentes a los que forman el centro activo catalíticamente o esenciales para la estructura o el plegamiento, o estando éstos únicamente sustituidos a modo de conservación, por ejemplo un glutamato en lugar de un aspartato, o leucina en lugar de una valina. El estado de la técnica describe algoritmos que se pueden emplear para calcular la medida de la homología de dos secuencias, por ejemplo Arthur Lesk (2008), *Introduction to bioinformatics*, 3ª edición. En otra forma más preferente de realización de la presente invención, la variante de una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos, de modo preferente adicionalmente a la homología de secuencia citada con anterioridad, presenta esencialmente la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje, o bien de la molécula original. Por ejemplo, una variante de un polipéptido con actividad enzimática como proteasa presenta la misma, o esencialmente la misma actividad proteolítica que la enzima polipeptídica, es decir, la capacidad de catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico. En una forma de realización especial, el concepto "esencialmente la misma actividad enzimática" significa una actividad respecto a los sustratos del polipéptido de tipo salvaje, que se sitúa claramente sobre la actividad básica y/o se diferencia en menos de 3, preferentemente 2, de modo aún más preferente en un orden de magnitud, de los valores K_M y/o k_{cat} , que presenta el polipéptido de tipo salvaje respecto a los mismos sustratos. En otra forma de realización preferente, el concepto "variante" de una
- 40
- 45
- 50
- 55

secuencia de ácido nucleicos o de aminoácidos comprende al menos una parte activa y/o fragmento de la secuencia de ácidos nucleicos, o bien aminoácidos. En otra forma de realización preferente, el concepto "parte activa", como se emplea en este caso, significa una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una longitud más reducida que la longitud total de la secuencia de aminoácidos, o bien codifica para una longitud menor que la longitud total de la secuencia de aminoácidos, presentando la secuencia de aminoácidos o la secuencia de aminoácidos codificante con menor longitud que la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje, esencialmente la misma actividad enzimática que el polipéptido de tipo salvaje, o una variante del mismo, a modo de ejemplo que la alcohol dehidrogenasa, monooxigenasa o transaminasa. En una forma de realización especial, el concepto "variante" de un ácido nucleico significa un ácido nucleico cuya hebra complementaria, preferentemente bajo condiciones restrictivas, se une al ácido nucleico de tipo salvaje. La restricción de la reacción de hibridación es fácilmente determinable por el especialista, y depende generalmente de la longitud de la sonda, las temperaturas en el lavado y la concentración de sales. Sonditas más largas requieren generalmente temperaturas más elevadas para la hibridación, mientras que muestras más cortas tienen suficiente con bajas temperaturas. Que tenga lugar una hibridación depende en general de la capacidad del ADN desnaturalizado de condensarse en hebras complementarias, que están presentes en su entorno, y precisamente por debajo de la temperatura de fusión. La restricción de la reacción de hibridación y condiciones correspondientes se describen más minuciosamente en Ausubel *et al.* 1995. El especialista encuentra instrucciones para la identificación de secuencias de ADN por medio de hibridación, entre otros, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de la firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl *et al.* (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). En una forma de realización preferente, la hibridación tiene lugar bajo condiciones restrictivas, es decir, se forman solo híbridos en los que sonda y secuencia objetivo, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda son idénticos al menos en un 70 %. Es sabido que la restricción de la hibridación, incluyendo los pasos de lavado, se pueden influenciar, o bien determinar mediante variación de la composición del tampón, la temperatura y la concentración de sales. La reacción de hibridación se lleva a cabo generalmente con restricción relativamente reducida en comparación con los pasos de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996). Para la reacción de hibridación se puede emplear, a modo de ejemplo, un tampón correspondiente a tampón 5x SSC a una temperatura de aproximadamente 50°C-68°C. En este caso, las sondas se pueden hibridar también con polinucleótidos que presentan menos de un 70 % de identidad respecto a la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y se eliminan mediante lavado bajo condiciones restrictivas. Las condiciones de lavado restrictivas se pueden conseguir, a modo de ejemplo, mediante reducción de la concentración de sales a 2 x SSC, y en caso dado a continuación 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995) en el tampón de lavado, ajustándose una temperatura de preferencia creciente en el orden aprox. 50°C - 68°C, aprox. 52°C - 68°C, aprox. 54°C - 68°C, aprox. 56°C - 68°C, aprox. 58°C - 68°C, aprox. 60°C - 68°C, aprox. 62°C - 68°C, aprox. 64°C - 68°C, aprox. 66°C - 68°C. Son preferentes los intervalos de temperatura de aprox. 64°C - 68°C o aprox. 66°C - 68°C. En caso dado es posible reducir la concentración de sales a una concentración correspondiente a 0,2 x SSC o 0,1 x SSC. Mediante aumento gradual de la temperatura de hibridación en pasos de aprox. 1 - 2°C de 50°C a 68°C se pueden aislar fragmentos de polinucleótido que presentan identidad respecto a la secuencia de la molécula de aminoácido empleada, a modo de ejemplo en el orden de preferencia creciente de al menos un 70 % o al menos un 80 % o al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad respecto a la secuencia de la molécula de ácido nucleico empleada. Otras instrucciones respecto a la hibridación se encuentran disponibles en el mercado en forma de los denominados kits (por ejemplo DIG Easy Hyb de la firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Nº de catálogo 1603558). En una forma de realización preferente, el concepto "variante" de un ácido nucleico, como se emplea en este caso, comprende cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la misma secuencia de aminoácidos que el ácido nucleico original u otra variante de esta secuencia de aminoácidos en el ámbito de la degenerabilidad del código genético.

En el paso c) del procedimiento según la invención se llega a la puesta en contacto del medio de cultivo acuoso con una disolución hidrófoba orgánica. En una forma preferente de realización de la presente invención, el concepto "puesta en contacto", como se emplea en este caso, significa que se ponen en contacto directamente medio de cultivo acuoso y disolución orgánica sin intercalar una barrera mecánica, insuperable para un medio de cultivo acuoso y/o una disolución hidrófoba orgánica, a modo de ejemplo una membrana inorgánica. A modo de ejemplo, el medio de cultivo acuoso se puede disponer en un fermentador, y la disolución orgánica se añade al medio de cultivo en el mismo fermentador, de modo que se pueden mezclar ambos líquidos. En una forma de realización preferente, la puesta en contacto tiene lugar al menos parcialmente bajo agitación, la afluencia de gas o medidas similares, que son apropiadas para aumentar la superficie de contacto de ambas fases.

En la puesta en contacto se debe procurar que el paso c) sea suficientemente largo y se efectúe con superficie límite de las dos fases de dimensiones suficientes, para que las células puedan entrar en contacto suficiente con la fase hidrófoba c). En una forma de realización preferente, la puesta en contacto dura al menos 10, 20, 30, 60 minutos o 2, 4, 6, 12, 18 o 24 horas. El paso c) se puede llevar a cabo inmediatamente al comienzo del paso b), es decir, la puesta en contacto se efectúa durante el cultivo, o estar preconectado al paso b), es decir, la disolución orgánica se

elimina al comienzo del paso b), a modo de ejemplo mediante decantación o centrifugado, y extracción de la fase acuosa.

- 5 Para la enseñanza según la invención que el paso b) se efectúe bajo condiciones aerobias. En una forma de realización preferente, se entiende por "condiciones aerobias", como se emplea en este caso, que la fase acuosa está en contacto con oxígeno molecular, a modo de ejemplo en forma de aire atmosférico, y preferentemente no se adoptan medidas para reducir la concentración de oxígeno en la fase acuosa, a modo de ejemplo el cierre del recipiente de reacción contra el intercambio de gases con el aire ambiental que contiene oxígeno. En una forma de realización especialmente preferente se introduce oxígeno en la fase acuosa de manera activa, por ejemplo en forma de aire, a modo de ejemplo mediante ventilación y agitación.
- 10 En algunos sustratos, la entrada de la molécula en el interior del catalizador de célula completa puede ser limitante para la producción de la sustancia deseada. En el caso de alcanos de cadena más larga y derivados de los mismos es preferente que el catalizador de célula completa presente un polipéptido AlCL. En una forma de realización preferente, en el caso de un "polipéptido AlCL", como se emplea en este caso, se trata de un polipéptido que presenta, en una longitud de 230 aminoácidos sucesivos, una identidad de secuencia de al menos un 80,
- 15 preferentemente un 90, de modo aún más preferente un 90 % respecto a AlCL de *Pseudomonas putida* (código de banco de datos CAB69081), y presenta preferentemente la capacidad de apoyar la importación de alcanos de cadena larga al interior de una célula. En otra forma de realización, en el caso de un "polipéptido de la familia AlCL", como se emplea en este caso, se trata de un polipéptido localizado en la membrana externa de una bacteria gram-negativa, que presenta el motivo secuencial DXWAPAXQ(V/A)GXR, representando X un aminoácido proteínogeno, y
- 20 siendo de modo preferente, adicionalmente a AlCL de *Pseudomonas putida* (código de banco de datos CAB69081), o una variante del mismo. Miembros ejemplares de la familia AlCL comprenden AlCL de *Pseudomonas putida* (código de banco de datos CAB69081), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (código de banco de datos YP_957722), *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633 (código de banco de datos ZP_00953584), *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9 (código de banco de datos ZP_09158756), *Caulobacter* sp. K31 (código de banco de datos YP_001672217), *Pseudomonas oleovorans* (código de banco de datos Q00595), y variantes de los mismos.
- 25

- El procedimiento según la invención se puede llevar a cabo bajo empleo de disolventes hidrófobos orgánicos habituales, que comprenden alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos, sustituidos y no sustituidos. Para el especialista son conocidos numerosos disolventes que se pueden emplear para obtener una disolución hidrófoba orgánica. En una
- 30 forma de realización preferente, bajo el concepto "hidrófobo"; como se emplea en este caso, se entiende la propiedad de un líquido de formar en estado líquido una fase líquida propia, limitada claramente por la fase acuosa, en presencia de una fase líquida acuosa. En el caso de esta última se puede tratar de una fase líquida cohesiva o de una emulsión. En otra forma de realización preferente, con el concepto "hidrófobo", como se emplea en este caso, se entiende la propiedad de un compuesto de no disolverse esencialmente en agua. Finalmente, en otra forma de realización preferente, el concepto, como se emplea en este caso, se entiende de modo que un compuesto designado de tal modo presenta un valor de P (J. Sangster, Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, Vol. 2 of Wiley Series in Solution Chemistry, John Wiley & Sons, Chichester, 1997), cuyo
- 35 logaritmo decimal es mayor que 0, preferentemente mayor que 0,5, de modo aún más preferente mayor que 1, y del modo más preferente mayor que 2. Los disolventes orgánicos preferentes comprenden, pero no están limitados a disolventes del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos, líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos. La disolución hidrófoba orgánica puede ser también una mezcla que comprende más de un disolvente hidrófobo orgánico. También son apropiados los disolventes hidrófobos orgánicos, que no son líquidos de por sí, en tanto sean parte de una mezcla de disolventes, que es líquida en su totalidad.
- 40
- 45 En este caso, bajo ciertas circunstancias se debe considerar que numerosos disolventes presentan acción más o menos tóxica sobre células activas metabólicamente. Si la célula debe mantener al menos parcialmente su actividad metabólica, se deben emplear concentraciones de disolvente hidrófobo orgánico correspondientemente moderadas, o incluso de acción no tóxica. En una forma de realización especialmente preferente, en el caso del disolvente se trata de un ácido graso saturado o insaturado con al menos ocho, preferentemente al menos doce átomos de carbono, a modo de ejemplo de ácido láurico, ácido oleico o ácido erúxico, o los ésteres metílicos de los mismos. En otra forma de realización preferente, en el caso del disolvente se trata de un ácido graso de la fórmula $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \text{COOH}$, pudiendo ser x 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o más. En otra forma de realización preferente, en el caso de un ácido graso insaturado con un doble enlace se trata, de modo especialmente preferente, de un ácido en la posición 9, de modo especialmente preferente ácido oleico. En otra forma de
- 50 realización especialmente preferente, en el caso del disolvente se trata de ácido hexanoico.
- 55

Si la célula se debe cultivar bajo condiciones aerobias durante un intervalo de tiempo más largo en presencia de la fase orgánica, se recomienda el empleo de una fase orgánica a partir de disolventes biocompatibles hidrófobos. Como tales es apropiada preferentemente la mezcla de éster metílico de un ácido graso saturado con un ácido

graso insaturado, especialmente de una mezcla de laurato de metilo y ácido oleico. En este caso, la proporción volumétrica o, en el caso de empleo de al menos un ácido graso sólido en forma pura, la proporción ponderal asciende preferentemente a 20 a 80 hasta 80 a 20, de modo especialmente preferente 30 a 70 hasta 70 a 30, del modo más preferente 40 a 60 hasta 60 a 40.

5 El volumen de la disolución hidrófoba orgánica se debía dimensionar de modo que la fase orgánica se pueda separar y ascienda, en una forma de realización preferente, a un 2 hasta un 98, preferentemente un 5 a un 95, de modo aún más preferente un 10 a un 40, del modo más preferente un 20 a un 30 por ciento del volumen total de medio de cultivo acuoso y disolución hidrófoba orgánica. El especialista está familiarizado con numerosos procedimientos para la separación de una fase orgánica de una fase acuosa, a modo de ejemplo decantación,
10 eliminación por medio de embudo de separación, centrifugado y similares.

El procedimiento se puede emplear oxidando en primer lugar y aminando a continuación ácidos grasos o sus ésteres. A tal efecto, por ejemplo es apropiado un sistema enzimático como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2009/077461. En el caso de la célula activa metabólicamente, en esta ocasión se trata de una célula que presenta una alcohol-deshidrogenasa recombinante y una transaminasa, preferentemente además al menos
15 una enzima del grupo que comprende alcohol-deshidrogenasa, alanina-deshidrogenasa y lactama-deshidrogenasa. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "transaminasa", como se emplea en este caso, se entiende una enzima que cataliza la transferencia de grupos α -amino de una molécula de donador, preferentemente un aminoácido, a una molécula de aceptor. A modo de ejemplo se puede emplear la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695) y variantes de la misma. En una
20 forma de realización preferente, bajo el concepto "lactama-hidrolasa", como se emplea en este caso, se entiende una enzima que cataliza intramolecularmente la condensación de un grupo carboxilo con un grupo amina de la misma molécula. Se describen un sistema ejemplar y enzimas apropiados en el documento EP11004029.

Adicionalmente a una, o en lugar de una monooxigenasa, la célula apropiada para el procedimiento según la invención puede presentar también una alcohol-deshidrogenasa. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "alcohol-deshidrogenasa", como se emplea en este caso, se entiende una enzima que oxida un aldehído, o bien una cetona, para dar el correspondiente alcohol primario, o bien secundario. Los ejemplos comprenden las alcohol-deshidrogenasas de *Ralstonia eutropha* (ACB78191.1), *Lactobacillus brevis* (YP_795183.1), *Lactobacillus kefirii* (ACF95832.1), de Pferdeleber, de *Paracoccus pantotrophus* (ACB78182.1) y *Sphingobium yanoikuyae* (EU427523.1), así como las respectivas variantes de las mismas.
25

30 La Fig. 1 muestra de manera comparativa la producción de alanina a través de cuatro cepas de *E. coli*, que se diferencian en que dos cepas exprimen AlcL, en presencia y ausencia de fase orgánica, como se describe en el ejemplo 1.

La presente invención se ilustra además mediante las siguientes figuras y los siguientes ejemplos no limitantes, cuyas características, formas de realización, aspectos y ventajas adicionales se pueden extraer de la presente invención.
35

Ejemplo: obtención de alanina mediante catalizador de célula completa de *E. coli* con o sin expresión de AlcL en presencia y ausencia de una fase orgánica en comparación

La producción elevada de alanina bajo las condiciones especiales de esta invención se investigó en un sistema de fermentación paralelo de 8 veces de la firma DASGIP con las cepas W3110 [alaDH_Bs] y W3110 [alaDH_Bs-TA-alkL]. En el caso de W3110 [alaDH_Bs] se trata de una cepa de *E. coli* W3110, que comprende un plásmido basado en pJ294 de la firma DNA2.0, con el gen de alanina-deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*. W3110 [alaDH_Bs-TA-alcL] es una cepa que contiene un plásmido basado en pJ281, en origen igualmente de la firma DNA2.0, con los genes de alanina-deshidrogenasa citados anteriormente y una transaminasa, así como otro plásmido basado en pJ294 con el gen de porina alcL (PCT/EP2011/053834, DE102011110945).
40

45 Para la fermentación se emplearon reactores de 1 L. Las sondas de pH se calibraron por medio de un calibrado de dos puntos con disoluciones de medida de pH 4,0 y pH 7,0. Los reactores se cargaron con 300 mL de agua potable y se trataron en autoclave 20 min a 121°C para garantizar la esterilidad. A continuación, las sondas de pO₂ se polarizaron durante la noche (al menos durante 6 h) en el sistema DASGIP. A la mañana siguiente se extrajo el agua bajo la vitrina y se substituyó por 300 mL de medio de alta densidad celular con 100 mg/L de ampicilina. A
50 continuación se calibraron las sondas de pO₂ con una calibración de un punto (agitador: 400 rpm/gasificación 10 sL/h de aire), y se purificaron los tramos medios de alimentación, agente de corrección e inducción por medio de limpieza in situ. A tal efecto se lavaron los tubos flexibles con un 70 % de etanol, a continuación con NaOH 1 M, después con agua VE estéril, y en último lugar se cargaron con el respectivo medio.

ES 2 669 225 T3

- 5 En primer lugar se cultivaron cepas *E. Coli* productoras de alanina a partir de los respectivos criocultivos en medio LB (25 mL en un matraz con deflectores de 100 mL) con 100 mg/L de ampicilina durante la noche a 37°C y 200 rpm durante aproximadamente 18 h. A continuación se sobreinocularon respectivamente 2 mL de los cultivos en medio de alta densidad celular (glucosa 15 g/L (30 mL / L de una disolución madre tratada en autoclave por separado de 500 g/L con un 1 % de MgSO₄*7H₂O y un 2,2 % de NH₄Cl), (NH₄)₂SO₄ 1,76 g/L, K₂HPO₄ 19,08 g/L, KH₂PO₄ 12,5 g/L, extracto de levadura 6,66 g/L, citrato trisódico dihidrato 2,24 g/L, disolución de citrato de hierro amónico 17 mL/L de una disolución madre al 1 % tratada en autoclave por separado, disolución de oligoelementos 5 mL/L de disolución madre tratada en autoclave por separado (HCl (37 %) 36,50 g/L, MnCl₂*4H₂O 1,91 g/L, ZnSO₄*7H₂O 1,87 g/L, ácido etilendiaminotetraacético dihidrato 0,84 g/L, H₃BO₃ 0,30 g/L, Na₂MoO₄*2H₂O 0,25 g/L, CaCl₂*2H₂O 4,70 g/L, FeSO₄*7H₂O 17,80 g/L, CuCl₂*2H₂O 0,15 g/L)) (tres veces respectivamente 25mL en un matraz con deflectores de 100 mL) con 100 mg/L de ampicilina y se incubaron a 37°C / 200 rpm durante 5,5 h más.

La densidad óptica de los cultivos se determinó en 600 nm. Para inocular los reactores con una densidad óptica de 0,1 se recogieron cantidades correspondientes de cultivo previo en una jeringa de 5 mL bajo condiciones estériles, y se inocularon los reactores por medio de una cánula a través de un séptum cubierto con un 70 % de etanol.

- 15 Se empleó el siguiente programa estándar:

Regulador de DO				Regulador de pH				
Preset	0%			Preset	0 ml/h			
P	0,1			P	5			
Ti	300 s			Ti	200 s			
Min	0%			Min	0 mL/h			
Max	100%			Max	40 mL/h			
N (rotación)	de	a	XO ₂ (mezcla de gases)	de	a	F (flujo gaseoso)	de	a
	0%	30%		0%	100%		15%	80%
Durante el proceso total	400 rpm	1500 rpm	Durante el proceso total	21 %	21%	Durante el proceso total	6 sL/h	72 sL/h
Secuencia								
Desencadenante fuerte				31% DO (1/60h)				
Inducción IPTG				2 h tras inicio de alimentación				
Desencadenante de alimentación				50% DO				
Tasa de alimentación				3 [mL/h]				

El experimento llevado a cabo se puede dividir en dos fases, el cultivo, en el que las células deben alcanzar una determinada densidad óptica, y la subsiguiente producción de alanina, en la que, tras adición de la fase orgánica

constituida por un 25 % (w/w) de laurato de metilo y un 75 % (w/w) de ácido oleico, debe tener lugar la producción de alanina por las enzimas formadas en la expresión. En este caso, ensayos correspondientes sin fase orgánica sirvieron como controles. Los valores de pH se regularon por una parte con amoníaco (12,5 %) a pH 6,8. Durante el cultivo y la biotransformación se reguló el oxígeno disuelto (DO, dissolved oxygen) en el cultivo en un 30 % a través del índice de revoluciones del agitador y la tasa de gasificación. La fermentación se llevó a cabo como carga de alimentación, desencadenándose el inicio de la alimentación, 5 g/Lh de alimentación de glucosa (500 g/L de glucosa con un 1 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y un 2,2% de NH_4Cl), a través de un pico de DO. Con el inicio de la alimentación se redujo también la temperatura de 37°C previamente a 30°C. La expresión de la alanina-deshidrogenasa (y de otras proteínas introducidas mediante técnica recombinante) se indujo 2 h tras el inicio de la alimentación mediante la adición automática de IPTG (concentración final 1 mM). Antes del comienzo de la producción de alanina inducida por la fase orgánica se determinó la densidad óptica de los caldos de cultivo.

El inicio de la producción de alanina se efectuó 14 h después del comienzo de la alimentación. A tal efecto se añadieron 150 mL de una mezcla de laurato de metilo y ácido oleico (al 90 % técnico) como carga al caldo de fermentación. Para disponer de suficientes iones amonio para la producción de alanina se añadieron 5 mL de una disolución de sulfato amónico 3 M al caldo de fermentación media hora antes de la adición de compuestos orgánicos. Para la toma de muestras se extrajeron de la caldera 2 mL de caldo de fermentación, y se mezclaron inmediatamente con la disolución de extinción (40% (v/v) de etanol; 0,8% (w/v) de NaCl; -20°C). A continuación se centrifugaron las muestras a 0°C / 5100 rpm durante 10 minutos. Se desechó el exceso y el aglomerado celular se resuspendió con 2 mL de metanol (-20°C). Con ayuda de estas muestras se determinó la concentración de alanina dentro de las células.

La determinación de alanina se efectúa por medio de medida por HPLC/UV, tras derivatización por medio dialdehído orto-ftálico. Se midió el exceso metanólico. Los parámetros cromatográficos más importantes se reúnen en la siguiente tabla.

Columna	Luna 5u C8, 100 A, 150 X 4.60 mm , firma Phenomenex
Instalación de HPLC	Agilent 1200
Eluyente A	2,5 mL de ácido acético (100 %) a 1 L de agua bidest., ajuste de pH con hidróxido sódico a pH 6,0
Eluyente B	Metanol
Tra. de columna	40 °C
Flujo	1 mL/min
Gradiente	0,0-1 min: 30,0% B, 1,0-17,0 min: 90,0% B, 17-19,5 min: 90,0% B, 19,6-20,5 min: 30,0% B
Detector	DAD, 334 nm
Derivatización/volumen de inyección	Derivatización automática por medio de programa de inyección, se hace reaccionar 1 µL de muestra con 9 µL de reactivo de derivatización; composición de reactivo de derivatización: 10 g/L de dialdehído o-ftálico en tampón borato (0,4 mol/L), bajo adición de mercaptoetanol (5 mL/L) y metanol (100 mL/L)
Calibrado	Calibrado externo, intervalo de medida 50-2000 mg/L, calibrado de 5 puntos, calibrado antes y después de la serie de muestras, promedio a través de ambas series de calibrado, regresión cuadrática

Las muestras se tomaron en todos los reactores 15 minutos antes de la adición de compuestos orgánicos, así como 2 h, 3,5 h, 20,5 h y 22,5 h tras adición de compuestos orgánicos. Las tasas de conversión de oxígeno (OTR =

oxygen transfer rate) y carbono (CTR = carbon dioxide transfer rate) se determinaron durante la fermentación a través de análisis de gases de escape en los sistemas DASGIP. La fermentación se concluyó 23 h tras el inicio de la biotransformación. Se desconectaron el agitador, la gasificación, la regulación de temperatura y la regulación de pH, y se dejó reposar la caldera 5 – 10 minutos.

- 5 Resultados:
Tras adición de la fase orgánica, en ambos casos analizados se muestra un claro aumento de la concentración de alanina de las células empleadas con o sin expresión de AlcL. En los experimentos comparativos sin adición de compuestos orgánicos se miden en cada caso concentraciones de alanina claramente menores, que tampoco presentan una tendencia ascendente (véase la Fig. 1).

10

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la producción de alanina, que comprende
- a) la puesta a disposición de una célula que expresa alanina-deshidrogenasa recombinante,
- b) el cultivo bajo condiciones aerobias en presencia de una fuente de nitrógeno inorgánica en una fase acuosa, y
- 5 c) la puesta en contacto de la célula con una fase hidrófoba orgánica,
- tratándose de una célula procariota o eucariota inferior en el caso de la célula.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, presentando la célula un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para un alcL-polipéptido, preferentemente el AlcL de *Pseudomonas putida* (código de banco de datos AJ245436) o una variante del mismo, y/o el alcL-polipéptido o una variante del mismo.
- 10 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, siendo heterólogo el alcL-polipéptido o la variante del mismo y sobreexpresándose preferentemente.
- 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, llevándose a cabo el paso c) al realizarse el paso b) en presencia de la fase orgánica.
- 15 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo la fase orgánica un éster de ácido graso hidrófobo, preferentemente laurato de metilo.
- 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, comprendiendo la fase orgánica, además del éster de ácido graso hidrófobo, un ácido graso hidrófobo.
- 20 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, comprendiendo la fase orgánica al menos un disolvente hidrófobo a partir del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, arilos, heteroarilos, dialquiléteres, alcoholes grasos, triglicéridos e hidrocarburos halogenados no sustituidos, sustituidos, ramificados y no ramificados.
- 8.- Procedimiento según la reivindicación 6, siendo el ácido graso hidrófobo un ácido graso insaturado, preferentemente ácido oleico.
- 25 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, presentando la célula una transaminasa heteróloga, que reconoce alanina como sustrato, y seleccionándose la transaminasa preferentemente a partir del grupo que comprende transaminasas de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695), así como variantes del mismo.
- 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, presentando la célula, adicionalmente a la transaminasa heteróloga, una o más monooxigenasas, que catalizan por separado o secuencialmente la oxidación de un ácido graso o de un éster de ácido graso para dar el ácido ω -oxograso o para dar el ácido ω -oxograso.
- 30 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, siendo heterólogas la o las monooxigenasas, y seleccionándose preferentemente a partir del grupo que comprende monooxigenasas de la familia AlcB y citocromo P450-monooxigenasas de la familia CYP153, y variantes de las mismas.
- 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, tratándose de una célula bacteriana en el caso de la célula, preferentemente *Escherichia coli*.
- 35 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, durando el paso c) al menos 60 minutos.
- 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, comprendiendo la fase acuosa menos de 10 mM, preferentemente menos de 5 mM, de modo aún más preferente aún menos de 1 mM de alanina.

- 15.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, constituyendo la fase orgánica al menos un 5 por ciento en volumen, preferentemente más de un 20 por ciento en volumen de la suma de volúmenes de fase acuosa y orgánica.
- 5 16.- Empleo de una célula que exprime una alanina-deshidrogenasa heteróloga para la producción de alanina bajo condiciones aerobias en presencia de una fase hidrófoba orgánica, tratándose de una célula procariota o eucariota inferior en el caso de la célula, y comprendiendo la fase orgánica preferentemente un éster de ácido graso hidrófobo y un ácido graso hidrófobo, de modo aún más preferente laurato de metilo y ácido oleico.
- 10 17.- Empleo de una fase hidrófoba orgánica para el aumento del rendimiento en alanina, que comprende puesta en contacto de una célula procariota o eucariota inferior que produce alanina con la fase orgánica, comprendiendo la fase orgánica preferentemente un éster de ácido graso hidrófobo y un ácido graso hidrófobo, de modo aún más preferente laurato de metilo y ácido oleico.
- 18.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, presentándose la célula en una disolución acuosa en una densidad óptica de al menos 0,5, de modo más preferente al menos 1, de modo aún más preferente al menos 5, del modo más preferente al menos 10.
- 15 19.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, tratándose de la alanina-deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (código de banco de datos P_391071), o de una variante de la misma, en el caso de la alanina-deshidrogenasa.

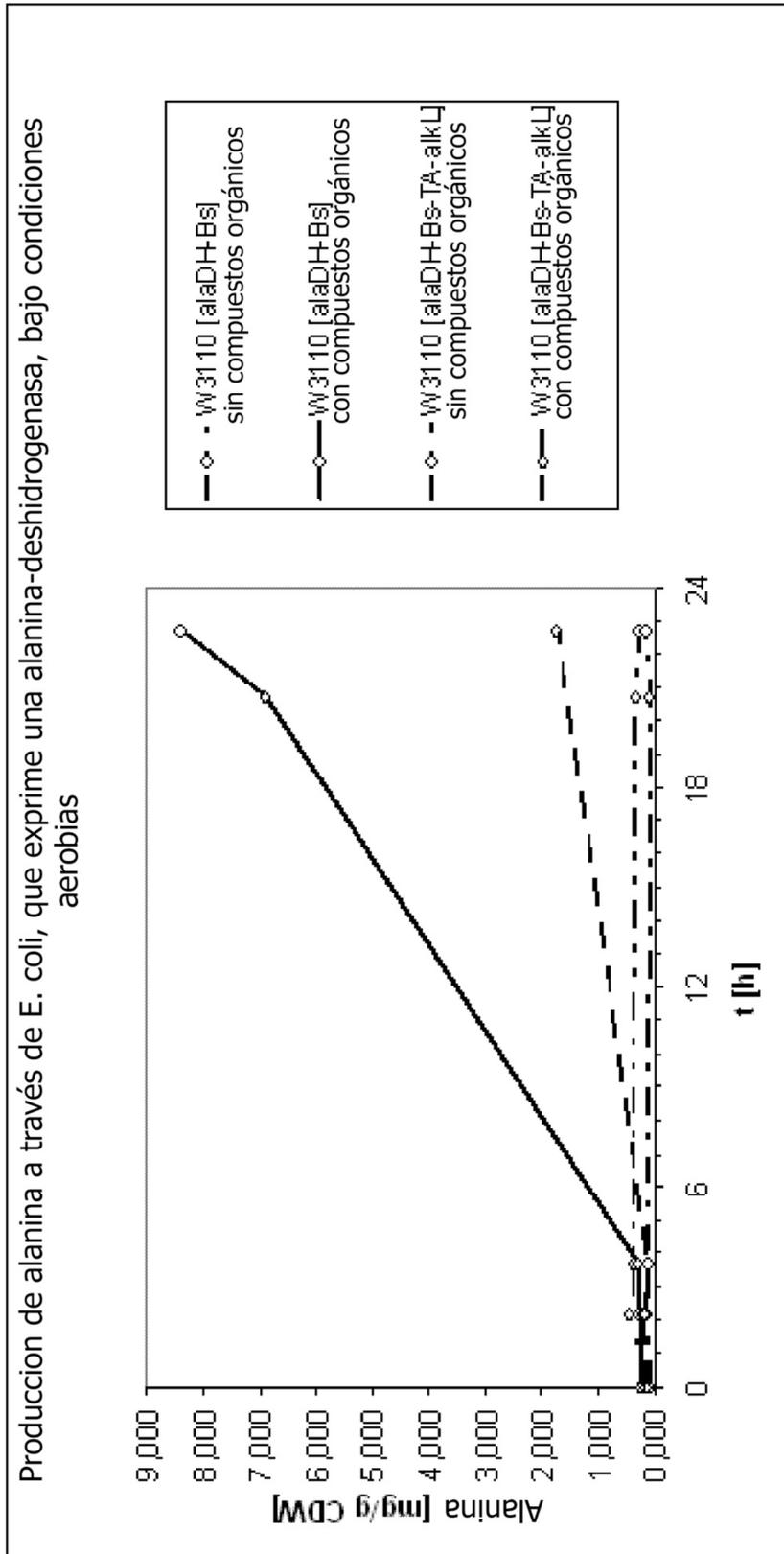


Fig.1