



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: **ES 2 093 984**

⑤① Int. Cl.⁶: C12P 7/42

C12N 1/14

//(C12N 1/14

C12R 1:645)

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **93920774.2**

⑧⑥ Fecha de presentación : **20.09.93**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 663 957**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.95**

⑤④ Título: **Procedimiento para la obtención fermentativa de ácido 2-hidroxifenilacético.**

③⑩ Prioridad: **29.09.92 DE 42 32 522**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.01.97

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.01.97

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

⑦② Inventor/es: **Staudenmaier, Horst, Ralf;
Hauer, Bernhard;
Ladner, Wolfgang;
Müller, Ursula;
Pressler, Uwe y
Meyer, Joachim**

⑦④ Agente: **Hernández Covarrubias, Arturo**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Procedimiento para la obtención fermentativa de ácido 2-hidroxifenilacético.

La invención se refiere a un nuevo procedimiento para la obtención de ácido 2 - hidroxifenilacético a partir de ácido fenilacético.

Es sabido que la degradación de compuestos aromáticos por medio de microorganismos transcurre frecuentemente a través de productos intermedios aromáticos hidroxilados, cuyo anillo se disocia a continuación bajo introducción de otros átomos de oxígeno.

Una vía metabólica del ácido fenilacético, que se encuentra en una serie de hongos y bacterias, transcurre para dar ácido 2-hidroxifenilacético como primer producto. En una segunda monohidroxilación se introduce entonces otro grupo OH en posición 5 o 6 del anillo aromático. Esta secuencia de reacción se encontró, por ejemplo, en el caso de *Aspergillus niger* y *Pseudomonas fluorescens* (Grazia Baggi et al., *Styrene Catabolism by a Strain of Pseudomonas fluorescens*, *System. Appl. Microbiol.* 4, 141 - 147, (1983); J. K. Faulkner and D. Woodcock, *The Metabolism of Phenylacetic Acid by Aspergillus niger*, *Phytochemistry* 7, 1741 - 1742, (1968); Fumiki Yoshizako et al., *The Metabolism of Phenylacetic Acid by Aspergillus fumigatus ATCC 28282: Identification of 2,6-dihydroxyphenylacetic Acid*, *Can. J. Microbiol.* 23, 1140 - 1142 (1977)).

Estos microorganismos no son apropiados para un procedimiento de obtención económico para ácido 2 - hidroxifenilacético a partir de ácido fenilacético, ya que forman ácido 2 - hidroxifenilacético solo como producto metabólico intermedio en pequeñas cantidades, e inmediatamente lo continúan degradando.

Por lo tanto existía la tarea de poner a disposición microorganismos que no poseyeran los inconvenientes mencionados anteriormente, y facilitar un procedimiento de obtención fermentativo para ácido 2-hidroxifenilacético a partir de ácido fenilacético bajo empleo de estos microorganismos.

Se encontró que para el procedimiento descrito al inicio son apropiados microorganismos que poseen por una parte la capacidad de hidroxilar en posición orto el ácido fenilacético, y que por otra parte no transformen ulteriormente el ácido 2-hidroxifenilacético formado utilizándolo a modo de ejemplo, como fuente de carbono.

Tales microorganismos se obtienen convenientemente mediante mutación de cepas salvajes, que poseen la capacidad para la degradación de ácido fenilacético a través de ácido 2 - hidroxifenilacético. Como cepas salvajes son apropiadas bacterias, actinomicetes y hongos. Representantes especialmente apropiados se encuentran, a modo de ejemplo, en las siguientes especies:

Bacillus, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botryodiplodia*, *Botrytis*, *Byssoschlamys*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Dactylium*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gibberella*, *Gleophyllum*, *Gliocladium*, *Helminthosporium*, *Humicola*, *Hyphozyma*, *Metarrhizium*, *Microascus*, *Mucor*,

Neurospora, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phycomyces*, *Phyllosticta*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Sep-toria*, *Sphaceloma*, *Trichoderma*, *Trichosporon*, *Trichurus*, *Verticillium*.

Microorganismos apropiados se pueden identificar fácilmente mediante el ensayo sencillo descrito en el ejemplo 1.

De los microorganismos apropiados se generan o aislan convenientemente mutantes que ya no son capaces de degradar el ácido 2-hidroxifenilacético.

Para la generación de tales mutantes se pueden emplear técnicas microbiológicas conocidas. Para el desencadenamiento de mutaciones se pueden emplear todos los métodos usuales, como la aplicación de sustancias mutagénicas, por ejemplo nitrosoguanidina, sulfonato de etilmetano, nitrito sódico, o la acción de radiación electromagnética, como radiación UV, rayos gamma o X. Para el aislamiento de los mutantes se puede utilizar, por ejemplo, la propiedad de ya no crecer con ácido fenilacético como única fuente de C.

Se encontró un nuevo hongo de la especie *Humicola* o *Chaetomium*, que se depositó en la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares GmbH, Braunschweig, bajo el número de depósito DSM 7047.

Además se encontró que el hongo DSM 7047 se puede emplear especialmente bien para la hidroxilación de compuestos aromáticos, en especial de ácidos y derivados de ácidos aromáticos. Además se encontró que mediante cultivo del hongo DSM 7047 en presencia de ácido fenilacético, resulta un procedimiento de obtención especialmente ventajoso para ácido 2-hidroxifenilacético.

El hongo DSM 7047 se determinó por CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande) como *Humicola fuscoatra* Traaen, mientras que por DSM se clasificó como *Chaetomium*, presumiblemente *Chaetomium seminudum*. Actualmente no es posible una clasificación definitiva de la especie *Humicola* o *Chaetomium*. La cepa DSM 7047 se distingue porque hidroxila ácido fenilacético en posición orto, pero no metaboliza el ácido 2-hidroxifenilacético producido.

Para verificar si esta es una característica general de las especies *Humicola* o *Chaetomium*, se analizaron diversas cepas de estas especies análogamente al ejemplo 1:

	<i>Humicola</i>	<i>brevispora</i>	ATCC 28403
50	"	<i>brunnea</i>	ATCC 22629
	"	<i>fuscoatra</i>	ATCC 22723
	<i>Humicola</i>	<i>fuscoatra</i>	ATCC 22721
	"	"	Li 664
55	"	<i>grisea</i>	ATCC 22724
	"	"	Li 193
	"	<i>parvispora</i>	ATCC 22715
	<i>Chaetomium</i>	<i>alba-avenulum</i>	Li 69
60	"	<i>globosum</i>	ATCC 6205
	"	"	Li 70
	"	"	Li 444

Las cepas designadas con Li proceden de la colección de cepas de la estación de ensayos agrícola de BASF Aktiengesellschaft in Limburgerhof.

En todas estas cepas se pudo identificar ácido 2-hidroxifenilacético en pequeñas cantidades. No

obstante, de nuevo este se degradó siempre completamente.

Mediante mutagénesis con luz UV, a partir de DSM 7047 se pudieron obtener en un paso revertantes que degradaban el ácido fenilacético tanto como las cepas salvajes modelo Humicola y Chaetomium registradas en la lista. De esta manera se mostró que en el caso de DSM 7047 se trata de un mutante de un degradador de ácido fenilacético.

El procedimiento según la invención para la obtención de ácido 2-hidroxifenilacético a partir de ácido fenilacético comprende el cultivo de los microorganismos apropiados en un medio nutriente usual. Son usuales medios nutrientes que contienen fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, y, en caso dado, cantidades reducidas de oligoelementos y vitaminas.

Como fuentes de carbono se pueden emplear compuestos de nitrógeno inorgánicos, o bien orgánicos, o materiales que contienen estos compuestos. Son ejemplos sales de amonio, nitratos, agua de manantial de maíz, autolizado de levadura de cerveza, harina de habas de soja, gluten de trigo, extracto de levadura, levadura, urea y proteína de patata.

Como fuentes de carbono se pueden emplear, a modo de ejemplo, azúcar, como glucosa, polioles, como glicerina, o grasas, como aceite de soja. Ejemplos de sales inorgánicas son las sales de calcio, magnesio, manganeso, cinc, cobre, hierro y otros metales. Como anión de las sales se debe citar especialmente el ión fosfato. En caso dado, al medio nutriente se adicionan factores de crecimiento, como biotina, riboflavina y otras vitaminas.

Un medio nutriente especialmente apropiado es el medio 2, que se describe en el ejemplo 2.

Al medio nutriente se adiciona ácido fenilacético. Acido fenilacético se puede adicionar al medio como ácido libre o como sal, preferentemente como sal alcalina o de amonio. Ya que la solubilidad de sales en medios nutrientes acuosos es generalmente mayor que la del ácido libre, preferentemente se emplea la sal sódica o amónica del ácido fenilacético. La sal correspondiente se puede obtener "in situ", convenientemente mediante titración del ácido fenilacético con una base.

El ácido fenilacético se adiciona por regla general en cantidades tales que se ajusta una concentración de 0,5 a 30 g, preferentemente de 1 a 20 g por litro de medio nutriente.

El ácido fenilacético se puede adicionar al medio nutriente al inicio del cultivo del microorganismo, o durante el cultivo, en varias porciones o continuamente.

Además es posible guardar el microorganismo cultivado una vez concluida la conversión, y continuar cultivándolo con ácido fenilacético en medio nutriente fresco.

Esta forma de reutilización de la biomasa es un acondicionamiento especialmente ventajoso del procedimiento según la invención, ya que en este caso se ahorra, a modo de ejemplo, el tiempo de cultivo inicial para la biomasa.

El cultivo del microorganismo no requiere ninguna otra condición especial. De esta manera, la temperatura de cultivo se puede situar por regla general entre 20 y 40°C, preferentemente se es-

coge una temperatura de entre 25 y 35°C.

El valor de pH del medio de fermentación se mantiene durante la fermentación entre 3 y 9. Son ventajosos valores de pH de entre 4 y 7. Una acidulación del medio durante la fermentación puede compensarse, a modo de ejemplo, mediante adición de una base como amoniaco.

Los tiempos de fermentación ascienden habitualmente a entre 1 y 10 días para alcanzar un enriquecimiento máximo del producto en el medio de fermentación.

La conversión de la reacción se puede verificar fácilmente mediante extracción de muestras y, a modo de ejemplo, análisis por cromatografía de gases. El aislamiento y purificación del ácido 2-hidroxifenilacético a partir del medio nutriente se puede efectuar según métodos en sí conocidos. Convenientemente la biomasa sólida se separa del medio nutriente, se extrae la substancia de valor, por ejemplo con un disolvente orgánico, en caso dado tras acidulación previa del medio, y se aísla la substancia de valor de la fase extraída.

La invención se ilustra ulteriormente mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

Ensayo de microorganismos sobre orto - hidroxilación de ácido fenilacético

Cultivos puros de microorganismos de colecciones de cepas públicas, o de aislados del suelo (Drews: Mikrobiologisches Praktikum, 3ª edición, editorial Springer 1976, páginas 47-48), se analizaron sobre si podían hidroxilar específicamente ácido fenilacético en posición orto.

A tal efecto se inocularon las cepas de placas de agar en medio líquido con ácido fenilacético. Se empleó el medio siguiente (medio M1):

10	g/l de glucosa
5	g/l de extracto de levadura (Difco)
5	g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,5	g/l de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
0,05	g/l de $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$
2	ml/l de disolución de oligoelementos
1,5	g/l de KH_2PO_4
3,6	g/l de K_2HPO_4

Disolución de oligoelementos:

200	mg/l de sulfato de hierro (II)-1-hidrato
10	mg/l de sulfato de cinc (II)-4-hidrato
3	mg/l de cloruro de manganeso-4-hidrato
30	mg/l de ácido bórico
20	mg/l de cloruro de cobalto (II)-6-hidrato
1	mg/l de cloruro de cobre (II)-2-hidrato
2	mg/l de cloruro de níquel (II)-6-hidrato
3	mg/l de molibdato sódico-2-hidrato
500	mg/l de ácido etilendiaminotetraacético (AEDT).

El ácido fenilacético se preparó como disolución al 25%, se titró con NaOH a pH 7, se trató en autoclave, y se adicionó al medio preparado por separado.

Matraces Erlenmeyer de 250 ml se llenaron con 30 ml de medio M1 con 1 g/l de ácido fenilacético, se inocularon respectivamente con una cepa de microorganismos de placas de agar, y se incubaron bajo vibración a 25°C con 180

rpm. Después de 3, 7 y 10 días se extrajo 1 ml de exceso de cultivo, se mezcló con 100 μ m de ácido clorhídrico 5 N y 800 μ m de acetato de etilo, y se mezcló vigorosamente 15 s. 700 μ l de la fase de acetato de etilo se extrajeron y se concentraron por evaporación a 50°C bajo una ligera corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió en 70 μ l de acetato de etilo, y 50 μ l de éste se transvasaron a un cristalito de muestra para la cromatografía de gases. Para ello se añadieron y mezclaron 50 μ l de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA). Las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases. Como comparación sirvió una muestra auténtica de ácido 2-hidroxifenilacético.

Se observó la formación de ácido 2 - hidroxifenilacético con cepas de las especies siguientes:

Hongo:

Absidia
 Alternaria
 Aspergillus
 Beauveria
 Botryodiplodia
 Botrytis
 Byssochlamys
 Candida
 Cephalosporium
 Chaetomium
 Cunninghamella
 Curvularia
 Dactylium
 Drechslera
 Epicoccum
 Fusarium
 Geotrichum
 Gibberella
 Gleophyllum
 Gliocladium
 Helminthosporium
 Humicola
 Hypozyma
 Metarrhizium
 Microascus
 Mucor
 Neurospora
 Paecilomyces
 Penicillium
 Phycomyces
 Phyllosticta
 Pythium
 Rhizopus
 Septoria
 Sphaceloma
 Trichoderma
 Trichosporon
 Trichurus
 Verticillium

Streptomiteces:

Streptomyces aureofaciens
 Streptomyces hygroscopicus

Streptomyces kasugaensis
 Streptomyces niveus
 Streptomyces roseochromogenus
 Streptomyces viridifaciens

5 *Bacterias:*

Bacillus
 Rhodococcus

Ejemplo 2

Reacción de ácido fenilacético con DSM 7047

10 Medio 2:

50 g/l de glucosa
 10 g/l de extracto de levadura (Difco)
 10 g/l de (NH₄)₂SO₄
 0,5 g/l de MgSO₄ x 7H₂O
 15 3,6 g/l de K₂HPO₄
 1,5 g/l de KH₂PO₄

10 ml/l de disolución de oligoelementos

20 Precultivo: DSM 7047 se inoculó de una placa de agar en 150 ml de medio 2 con 1 g/l de ácido fenilacético, y adicionalmente 3 g/l de Carbopol® 946 en un matraz Erlenmeyer de 1 l, y se agitó 3 días a 30°C y 180 rpm.

25 Con este precultivo se inoculó un fermentador de 1,5 l con medio 2 y 5 g/l de ácido fenilacético. Adicionalmente se añadió 1 ml/l de Pluriol P 2000 para impedir el desarrollo de espuma.

30 El fermentador se temperó a 30°C, se gasificó con 1 l de aire por minuto (= 0,66 vvm), y se agitó con 600 rpm.

Después de 5 días el ácido fenilacético había reaccionado completamente para dar ácido 2-hidroxifenilacético.

35 Las células se separaron mediante filtración con algodón, y se lavaron posteriormente con 100 ml de agua. El caldo de cultivo exento de células y el agua de lavado se reunieron, se ajustaron a pH 2 con HCl, y se extrajeron dos veces con el mismo volumen de éter terc-butil-metílico.

40 Tras la evaporación de la fase orgánica hasta sequedad se obtuvo un residuo de 8,2 g, que estaba constituido en un 98% (determinado a través de análisis de CG) por ácido 2-hidroxifenilacético. La estructura del producto se confirmó mediante RMN.

45 Ejemplo 3

Fermentación mejorada de DSM 7047

50 Precultivo e inoculación del fermentador se llevaron a cabo como en el ejemplo 2; el valor de pH del medio de reacción descendió durante la fermentación de 6,8 a 5,6. Una acidulación ulterior se compensó mediante adición de amoníaco. Tan pronto se había reducido la concentración de ácido fenilacético a un valor de entre 2,5 y 55 1 g/l se dosificó cuatro veces 1 g/l de ácido fenilacético. Después de 7 días el ácido fenilacético había reaccionado completamente para dar ácido 2-hidroxifenilacético.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de ácido 2-hidroxifenilacético a partir de ácido fenilacético, **caracterizado** porque se cultiva un microorganismo en presencia de ácido fenilacético, el ácido fenilacético se hidroxila en posición orto, y el ácido 2-hidroxifenilacético no se hace reaccionar ulteriormente.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como microorganismo se

emplea un hongo de la especie *Humicola* o *Chaetomium*.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como microorganismo se emplea el hongo DSM 7074.

4. Hongo de la especie *Humicola* o *Chaetomium*, el cual está depositado bajo el número de depósito DSM 7074.

5. Empleo de un hongo según la reivindicación 4 para la hidroxilación de compuestos aromáticos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

65

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.
