(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 168 945**

(21) Número de solicitud: 200000661

(51) Int. Cl.[7]: C12N 15/53, C12N 15/52
C12S 1/02, C10G 32/00
C12N 1/21, C12N 9/02
//(C12N 1/21, C12R 1:01
C12R 1:19, C12R 1:40)

(12) PATENTE DE INVENCION B1

(22) Fecha de presentación: **20.03.2000**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2002**

Fecha de concesión: **29.10.2003**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.2003**

(45) Fecha de publicación del folleto de patente: **01.12.2003**

(73) Titular/es:
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Complutense de Madrid y
Universidad de Alcalá de Henares

(72) Inventor/es: **Galán Sicilia, Beatriz;**
Díaz Fernández, Eduardo;
Ferrández Barca, Abel;
Prieto Jiménez, María Auxiliadora;
García-Ochoa Soria, Félix;
García Calvo, Eloy y
García López, José Luis

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Un procedimiento para desulfurar dibenzotiofeno utilizando como biocatalizador una cepa de *Pseudomonas putida* recombinante.**

(57) Resumen:
Un procedimiento para desulfurar dibenzotiofeno utilizando como biocatalizador una cepa de *Pseudomonas putida* recombinante.
La invención consiste en el diseño y realización de un procedimiento para desulfurar dibenzotiofeno en el que se utiliza como biocatalizador una cepa recombinante de *Pseudomonas putida* KT2442 en la que se han clonado, mediante la construcción de un plásmido de amplio espectro de huésped denominado pBG8, los genes de desulfurización *dszA*, *dszC* y *dszB* aislados de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 ATCC53968 que codifican dos monooxigenasas y una desulfinasa, respectivamente, y el gen *hpaC* de *Escherichia coli* W ATCC11105 que codifica una flavin:NADH reductasa. Con el procedimiento se incrementa notablemente la velocidad de desulfuración de DBT del biocatalizador lo que mejora su rendimiento con vistas a su utilización en procesos de biodesulfuración de petróleo y/o fracciones petrolíferas.

ES 2 168 945 B1

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 – 28036 Madrid

DESCRIPCION

Un procedimiento para desulfurar dibenzotiofeno utilizando como biocatalizador una cepa de *Pseudomonas putida* recombinante.

Sector de la técnica

La invención reivindica un procedimiento de biodesulfuración que utiliza como biocatalizador una cepa recombinante de *Pseudomonas* y, por tanto, se incluye en el área de Biotecnología y Biología Molecular de Microorganismos. En ella se describe la utilización de genes y enzimas de origen bacteriano para llevar a cabo la conversión, con microorganismos recombinantes, de dibenzotiofeno en 2-hidroxifibenilo y sulfito. Este proceso presenta considerables ventajas respecto a otros procesos de biodesulfuración previamente descritos.

Estado de la técnica

La desulfuración del petróleo mediante el uso de microorganismos ha sido objeto de estudio durante la última parte de este siglo (McFarland y col, (1998) Crit. Rey Microbiol. 4, 99-147; McFarland (1999) Curr. Opin. Microbiol. 2, 257-264). 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, 99-147).

El gran avance en el campo de la biodesulfuración del petróleo se produjo con el aislamiento y caracterización de la bacteria *Rhodoccocus erythropolis* IGTS8 (ATCC53968) una bacteria gram-positiva obtenida por el Institute of Gas Technology de Chicago que ha sido la fuente de inspiracion 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-hidroxifbifenilo (2HBP) y sulfito (McFarland y col. (1998) Crit. Rev. Microbiol. 4, 99-147; McFarland (1999) Curr. Opin Microbiol. 2, 257-264), 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 petroleoquímica. 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, 1705-1709). Acerca de la función de estas enzimas se sabe que las proteínas DszA y DszC son monooxigenasas dependientes de $FMNH_2$ que oxidan el DBT, la enzima DszB es una desulfinasa que libera el átomo de azufre de la estructura del DBT oxidado, y la enzima DszD es una flavin:NADPH reductasa que proporciona el $FMNH_2$ 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, 6707-6716).

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 clonaron los genes *dszABC* de R. erythropolis IGTS8 en una cepa de *Escherichia coli* (Denome y col. (1994) J. Bacteriol. 176, 6707-6716), si bien solo 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, 7156-7160). 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 col. (1998) Crit. Rev. Microbiol. 4, 99-147). 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 $FMNH_2$ 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, se ha pensado en mejorar la eficiencia de desulfuración de DBT de las bacterias recombinantes del género *Pseudomonas*, introduciendo en éstas un nuevo gen heterólogo que codifique una flavin:NADPH reductasa y que se exprese simultáneamente con los genes *dszABC* con alta eficiencia. Para ello, se ha pensado en diseñar un nuevo operón artificial con los genes *dszABC* de *R. erythropolis* IGTS8 y el gen *hpaC* de *E. coli* W ATCC11105, el cual codifica una flavin:NADH reductasa (Galán y col. (2000) J. Bacteriol., 182, 627 -636), y que esté contenido en un plásmido de amplio espectro de huésped capaz de replicar en *Pseudomonas*. Este es el objeto de esta patente.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención describe un procedimiento mediante el cual se pueden obtener organismos capaces de desulfurar eficazmente DBT tras clonar 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 en una bacteria del género *Pseudomonas*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está basada en el empleo de una nueva enzima denominada HpaC flavin:NADH reductasa de *E. coli* W ATCC11105 (Galan y col. (2000) J. Bacteriol., 182, 627-636.). Esta enzima cataliza la reacción:

$$FMN + NADH + H^+ = FMNH_2 + NAD^+$$

En el origen de esta invención se pensó que la enzima HpaC podría ser útil para incrementar la eficiencia de un biocatalizador para la desulfuración de DBT transfiriendo equivalentes reductores de $FMNH_2$ desde el NADH a las monooxigenasas DszA y DszC, que forman parte de la ruta de desulfuración del biocatalizador que previamente se había diseñado (Gallardo y col. (1997) J. Bacteriol. 179, 7156-7160).

Para demostrar que la enzima HpaC era capaz de incrementar *in vitro* la desulfuración del DBT, se procedió en primer lugar a su purificación, según se ha descrito recientemente (Galán y col. (2000) J. Bacteriol., 182, 627-636.). En segundo lugar, se obtuvo un extracto proteico soluble de un cultivo de la cepa de *Pseudomonas putida* KT2442 transformada con el plásmido pESOX3 que porta y expresa los genes *dszABC* (Gallardo y col. (1997) J. Bacteriol., 179, 7156-7160). En tercer lugar, se estudió la capacidad que poseía el extracto de *P. putida* KT2442 (pESOX3) para desulfurar DBT *in vitro* tras incubación en las condiciones adecuadas y analizando la aparición de 2HBP con una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Mediante estos ensayos se pudo comprobar que la adición de la reductasa HpaC purificada mejoraba significativamente la actividad desulfurante de DBT del extracto. Los resultados obtenidos *in vitro* con la enzima HpaC purificada hacían prever que la expresión de esta enzima *in vivo* en una cepa de *Pseudomonas* transformada con los genes *dszABC* podría mejorar la capacidad desulfurante de DBT de dicho biocatalizador, y, por lo tanto, supondría un avance significativo en el desarrollo de biocatalizadores más eficaces en procesos de biodesulfuración.

A continuación, se estudió si era factible producir la flavin:NADH reductasa HpaC de *E. coli* W en una forma activa en una cepa de *Pseudomonas*. Para ello, se clonó el gen *hpaC* bajo el control del promotor, *Ptac* en el vector de amplio espectro de huésped pVLT31 (confiere resistencia a tetraciclina) (de Lorenzo y col. (1993) Gene 123, 17-24) originando así el plásmido recombinante pBG1. Para construir el plásmido pBG1 se extrajo mediante corte con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Pst*I un fragmento de DNA que contenía el gen *hpaC* a partir del plásmido pAJ28 (Prieto y García (1994) J. Biol. Chem. 269, 22823-22829), y se ligó al plásmido pVLT31 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. A partir de un clon de *E. coli* transformante resistente a tetraciclina se aisló el plásmido pBG1. Mediante

técnicas clásicas de conjugación triparental (de Lorenzo y Timmis (1994) Meth. Enzymol. 235, 386-405) se introdujo el plásmido pBG1 en la cepa *P. putida* KT2442. Se obtuvo así una cepa recombinante de *P. putida* KT2442 portadora del plásmido pBG1. la cual, una vez cultivada en un medio adecuado, producía una elevada actividad flavin:NADH reductasa. Con este experimento se demostraba que la enzima HpaC reductasa de *E. coli* W podía producirse en forma activa y funcional en un huésped heterólogo como *Pseudomonas*.

La última etapa de esta invención consistió en la construcción de una bacteria recombinante de *Pseudomonas* que expresara simultáneamente los genes *dszABC* de *R. erythropolis* y el gen *hpaC* de *E. coli* W. Para ello, se construyó un operón sintético formado por los genes *hpaC-dszA-dszB-dszC* que se insertó en un plásmido de amplio espectro de huésped y bajo el control del promotor *Ptac*, el cual es funcional en una gran variedad de bacterias gram -negativas. Para llevar a cabo esta construcción, primero se amplificó el gen *hpaC* mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) a partir del plásmido pAJ28 antes mencionado. El fragmento de DNA procedente de la amplificación se digirió con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xba*I y, se ligó con el plásmido pESOX1, un derivado del plásmido pUC18 (Amersham-Pharmacia) que contiene los genes *dszABC* y confiere resistencia a ampicilina (Gallardo y col. (1997) J. Bacteriol. 179, 7156 -7160), previamente digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pBG7 de uno de los clones de *E. coli* transformantes resistentes a ampicilina. Aunque el plásmido pBG7 contiene los genes *hpaC-dszA-dszB-dszC* en forma de un operón, al ser un derivado de pUC18 sólo puede replicarse en *E. coli* y no puede ser utilizado en *Pseudomonas*. Por ello, fue necesario subclonar el operón artificial *hpaC-dszA-dszB-dszC* en el plásmido promiscuo pVLT31. Para ello se digirió el plásmido pBG7 con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Hind*III, y el fragmento de DNA de 4.3-kb resultante se ligó al plásmido pVLT31 digerido con las mismas enzimas de restricción. De uno de los transformantes de *E. coli* resistentes a tetraciclina se obtuvo el plásmido pBG8, que expresa el operón *hpaC-dszA-dszB-dszC* bajo el control del promotor *Ptac* en un replicón promiscuo, que se transfirió mediante conjugación triparental a *P. Putida* KT2442. La cepa em P. putida KT2442 (pBG8) fue utilizada para determinar, mediante un ensayo de células en reposo su capacidad desulfurante de DBT en comparación con la de la cepa *P. putida* KT2442 (pESOX3) (Gallardo y col. (1997) J. Bacteriol. 179, 7156-7160), la cual expresa los genes *dszABC* en ausencia del gen *hpaC*. Los resultados demostraron que la cepa *P. putida* KT2442 (pBG8) poseía una capacidad desulfurante de DBT muy superior a la de la cepa *P. putida* KT2442 (pESOX3).

Ejemplos de realización de la invención

En los ejemplos detallados a continuación, se exponen las investigaciones realizadas para desarrollar esta patente.

Ejemplo 1

Análisis in vitro de la actividad desulfurante de DBT de los extractos proteicos solubles de la cepa de P. putida KT2442 (pESOX3) en presencia y en ausencia de la enzima flavin:NADH reductasa HpaC de E. coli W.

El objetivo de este experimento era determinar si la enzima flavin: NADH reductasa HpaC de *E. coli* W podía aumentar la capacidad desulfurante de DBT que poseían los extractos proteicos solubles obtenidos a partir de la cepa de *P. putida* KT2442 (pESOX3) previamente descrita (Gallardo y col. (1997) J. Bacteriol. 179, 7156-7160).

La flavin:NADH reductasa HpaC de *E. coli* W se purificó a partir de un cultivo de *E. coli* (pAJ28) productor de la enzima, de acuerdo con los protocolos previamente publicados (Galán y col. (2000) J. Bacteriol. 182. 627-636.), y se comprobó que poseía una actividad de FMN:NADH reductasa de 17,5 μmol/min mg de proteína. Esta preparación de enzima HpaC pura Fue utilizada para los ensayos posteriores.

Para preparar los extractos proteicos para el ensayo de la desulfuración de DBT *in vitro* las células de *P. putida* KT2442 (pESOX3) recombinantes fueron cultivadas 12 horas a 30°C con agitación (200 rpm, New Brunswick Incubator Model G25) en un matraz erlenmeyer de 100 ml conteniendo 25 ml de un medio de Luria-Bertani conteniendo tetraciclina (0,025 mg/ml) e isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,2 mM. Una vez terminada la fermentación, las células se recogieron por centrifugación a 6.000 x g durante 10 min. a 4°C y se lavaron dos veces con dos volúmenes de NaCl 0.9 %. A continuación, estas células se resuspendieron en tampón A (fosfato sódico 25 mM, pH 7,0, conteniendo NaCl 100 mM, y ditiotreitol 0.5 mM) y se rompieron con una prensa French de tal forma que la fracción soluble (extracto enzimático), separada de los restos celulares por centrifugación a 30.000 x g durante 10 min a 4°C,

contuviera aproximadamente 5 mg proteína/ml.

Para determinar la actividad desulfurante de DBT de los extractos enzimáticos se incubaron en un volumen final de 1 ml conteniendo DBT 0,2 mM, Triton X-100 0,02 %. FMN 0,01 mM, NADH 3 mM, glucosa 50 mM, 0,5 U de glucosa deshidrogenasa, 160 U de catalasa, y extracto enzimático (aproximadamente 4 mg de proteína total). La mezcla se incubó a 22°C con agitación (250 rpm, New Brunswick Incubator Model G25) con y sin la adición 0,08 U de la enzima HpaC (1U = 1 μmol/min mg proteína). A distintos intervalos de tiempo se tomaron muestras de 0,1 ml, se precipitaron las proteínas del extracto con 5 % de ácido tricloroacético y se extrajeron las muestras en un tubo *eppendorf* con 0,1 ml de etanol. Después de 5 min de centrifugación en una microcentrífuga, el sobrenadante se recolectó y analizó por HPLC. Para ello, las muestras de 20 μl del extracto etanólico se analizaron en un HPLC Gilson equipado con una columna Lichrosphere 5 RP-8 (150 x 4.6 mm) utilizando una fase móvil isocrática de 50 % acetonitrilo-agua con un flujo de 1 ml/min. Los picos de DBT y 2HBP coincidentes con los tiempos de retención correspondientes a los patrones de DBT y 2HBP fueron monitorizados con un espectrofotómetro UV a 248 nm. Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Desulfuración de DBT de un extracto celular soluble obtenido de la cepa de P. putida KT2442 (pESOX3) incubado en las condiciones antes descritas y en presencia y en ausencia de la enzima flavin:NADH reductasa HpaC de E. coli W.

EXTRACTO	ADICIÓN DE HpaC	INCUBACIÓN TIEMPO (MIN)	%DESAPARICIÓN DE DBT	%APARICIÓN DE 2HBP
NO	NO	30	0	0
NO	SI	30	0	0
SI	NO	15	7	7
SI	NO	30	12	12
SI	SI	15	75	19
SI	SI	30	100	42

Ejemplo 2

Expresión del gen hpaC de E. coli W en la cepa P. putida KT2442.

Para determinar si era posible expresar el gen *hpaC* de *E. coli* en la cepa *P. putida* KT2442 se procedió a clonar dicho gen en un plásmido que pudiera replicarse en *P. putida*, para lo cual se construyó el plásmido pBG1 procediendo de la siguiente manera. En primer lugar, se digirió el plásmido pAJ28 (referencia) con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Pst*I, y se aisló el fragmento *Eco*RI -*Pst*I de 0,5 kb portador del gen *hpaC*. A continuación, este fragmento se ligó con el plásmido pVLT31 de 10 kb (de Lorenzo y col. (1993) Gene 123. 17-24) previamente digerido con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Pst*I. Los productos de la ligación se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* DH5α y se aisló un transformante resistente a tetraciclina que portaba el plásmido recombinante pBG1 de 10,5 kb que contiene insertado el fragmento de DNA *Eco*RI-*Pst*I de 0,5 kb portador del gen *hpaC* en el plásmido pVLT31. El plásmido pBG1 así construido expresa el gen *hpaC* bajo el control del promotor *Ptac*. A continuación el plásmido pBGI se aisló de una cepa de *E. coli* DH5α (pBG1) portadora de dicho plásmido y se transfirió a la cepa de *P. putida* KT2442 mediante técnicas clásicas de conjugación triparental (de Lorenzo y Timmis (1994) Meth. Enzymol. 235, 386-405). De esta manera se obtuvo la cepa *P. putida* KT2442 (pBG1).

Todas las técnicas de manipulación de DNA empleadas para construir el plásmido pBG1 de este Ejemplo están descritas en textos generales (p. ej., Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Las células de *P. putida* KT2442 (pBG1) se cultivaron a 30°C durante 12 horas en 5 ml de medio Luria-Bertani conteniendo tetraciclina (0,025 mg/ml) e IPTG 0,2 mM. Las células se recogieron por centrifugación a 6,000 x g durante 10 min a 4°C, se resuspendieron en 0,5 ml de tampón HEPES 50 mM, pH 8.0 y se rompieron por sonicación. La fracción soluble (extracto enzimático) fue separada de los restos celulares por centrifugación a 30.000 x g durante 10 min a 4°C. La actividad FMN:NADH reductasa del extracto fue determinada espectrofotométricamente midiendo la desaparición del color amarillo, debido a la reducción del FMN por NADH a 450 nm (ε = 12.200 M^{-1} cm^{-1}). La cubeta en la que se realizó el ensayo contenía FMN 0,06 mM, NADH 5 mM en tampón HEPES 50 mM, pH 8.0, en un volumen final

de 0,5 ml. El ensayo se inició mediante la adición de 0,05 ml del extracto enzimático y se desarrolló a 22°C. Como resultado de estos análisis, se pudo concluir que la cepa *P. putida* KT2442 (pBG1) producía una actividad FMN:NADH reductasa de 1,17 μmol/min mg proteína. Cuando los mismos análisis se realizaron con la cepa salvaje *P. putida* KT2442, los niveles de actividad FMN:NADH reductasa fueron indetectables en nuestras condiciones de ensayo.

Con este resultado se demostraba que la cepa P. putida KT2442 (pBG1) era capaz de expresar la actividad HpaC reductasa procedente de *E. coli* W.

Ejemplo 3

Construcción de la cepa P. putida KT2442 (pBG8) CECT 5279 y análisis de su actividad flavin:NADH reductasa.

Para poder construir el plásmido pBG8 lo primero que se hizo fue obtener un fragmento de DNA que portara la información genética correspondiente al gen *hpaC* de *E. coli* W ATCC11105 y, para ello, se recurrió a la técnica de PCR. Para amplificar mediante PCR el gen *hpaC* se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos hpaC5' (5'-CCGAATTCTAAGGAGGTTAAGATGCAATTAGAT-3'; se subraya el sitio de restricción *EcoR*I) y hpaC3' (5'-CCTCTAGATTAAATCGCAGCTTCCATTTCAG -3'; se subraya el sitio de restricción *Xba*I) y como molde el plásmido pAJ28 antes descrito (Prieto y García (1994) J. Biol. Chem. 269. 22823-22829). El fragmento de DNA amplificado de 0,5 kb portador del gen *hpaC* se aisló y se digirió con las enzimas de restricción *Xba*I y *Eco*RI y el producto resultante se ligó con el plásmido pESOX1 de 6,5 kb, que confiere resistencia a ampicilina ya que es un derivado del plásmido pUC18 (Amersham-Pharmacia) que contiene los genes *dszABC* (Gallardo y col. (1997) J. Bacteriol. 179, 7156-7160), previamente digerido con las mismas enzimas. Los productos de la ligación se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* HB101 y de los transformantes resistentes a ampicilina se seleccionó tino que portaban el plásmido pBG7 de 7 kb que contiene insertado el fragmento *Eco*RI -*Xba*I portador del gen *hpaC* en el plásmido pESOX1. El plásmido pBG7 así construido contiene los genes *hpaC-dszA-dszB-dszC* en forma de un operón pero, como el plásmido pUC18 del que deriva sólo puede replicarse en *E. coli* y no en *Pseudomonas*, no puede utilizarse para expresar dicho operón en *Pseudomonas*. Para poder expresar el operón *hpaC-dszA-dszB-dszC* en *Pseudomonas* fue necesario construir otro nuevo plásmido denominado pBG8. Para realizar esta nueva construcción, se aisló el plásmido pBG7 de *E. coli* HB101 (pBG7) y se digirió con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Hin*dIII. A continuación se aisló el fragmento de DNA *Eco*RI-*Hin*dIII de 4,3 kb portador del operón *hpaC-dszA-dszB-dszC* Este fragmento se ligó con el plásmido pVLT31 de 10 kb (de Lorenzo y col. (1993) Gene 123, 17-24) previamente digerido con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Hin*dIII. Los productos de la ligación se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* HB101 y de los transformantes resistentes a tetraciclina se aisló uno que portaba el plásmido pBG8 de 14,3 kb que contiene insertado el fragmento *Eco*RI-*Hin*dIIII portador del operón *hpaC-dszA-dszB-dszC* en el plásmido pVLT31. El plásmido pBG8 así construido expresa el operón *hpaC-dszA-dszB-dszC* bajo el control del promotor *Ptac*. A continuación. el plásmido pBG8 se aisló de *E. coli* HB101 (pBG8) portadora de dicho plásmido y se trasfirió a una cepa de *P. putida* KT2442 se transfirió a la cepa de *P. putida* KT2442 mediante técnicas clásicas de conjugación triparental (de Lorenzo y Timmis (1994) Meth. Enzymol. 235, 386-405). De esta manera se obtuvo la cepa *P. putida* KT2442 (pBG8) en lo sucesivo denominada CECT 5279.

Todas las técnicas de manipulación de DNA empleadas para construir los plásmidos pBG7 y pBG8 de este ejemplo están descritas en textos generales (p. ej., Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

La cepa de *P. putida* KT2442 (pBG8) CECT 5279 fue utilizada para determinar mediante un ensayo de células en reposo su capacidad desulfurante de DBT en comparación con la capacidad desulfurante de la cepa *P. putida* KT2442 (pESOX3).

Para determinar la actividad HpaC reductasa producida por las células de *P. putida* KT2442 (pBG8) CECT 5279, éstas se cultivaron a 30°C durante 12 horas en 5 ml de medio Luria-Bertani conteniendo tetracicilina (0.025 mg/ml) e IPTG 0,2 mM. Las células se recogieron por centrifugación a 6.000 x g durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 0,5 ml tampón HEPES 50 mM, pH 8.0 y se rompieron por sonicación. La fracción soluble (extracto enzimático) fue separada de los restos celulares por centrifugación a 30.000 x g durante 10 min a 4°C. La actividad FMN:NADH reductasa del extracto fue determinada espectro-fotométricamente midiendo la desaparición del color amarillo debido a la reducción del FMN por NADH a 450 nm ($\varepsilon = 12.200\ M^{-1}\ cm^{-1}$). La cubeta en la que se realizó el ensayo contenía FMN 0.06 mM, NADH 5 mM en tampón HEPES 50 mM, pH 8.0, en un volumen final de 0.5 ml. El

ensayo se inició mediante la adición de 0,05 ml del extracto enzimático y se desarrolló a 220°C. Como resultado de estos análisis, se pudo concluir que la cepa *P. putida* KT2442 (pBG8) producía una actividad FMN:NADH reductasa de 1,5 μmol/min mg proteína.

Ejemplo 4

Análisis de la actividad desulfurante de las cepas P. putida KT2442 (pBG8) CECT 5279 y P. putida KT2442 (pESOX3) en un sistema de células en reposo.

Los análisis de la actividad desulfurante de las cepas *P. putida* KT2442 (pBG8) y *P. putida* KT2442 (pESOX3) se hicieron determinando la capacidad de desulfurar DBT en un sistema de células en reposo.

Para iniciar la preparación de las células en reposo de *P. putida* KT2442 recombinantes para el ensayo de la desulfuración de DBT se parte de un preinóculo celular. Para preparar dicho preinóculo, las células de *P. putida* KT2442 recombinantes fueron cultivadas 12 horas a 30°C con agitación (200 rpm, New Brunswick Incubator Model G25) en un matraz erlenmeyer de 100 ml, conteniendo 25 ml de un medio de Luria-Bertani con tetracicilina (0,025 mg/ml). Una vez terminada la fermentación las células, se recogieron por centrifugación a 6.000 x g durante 10 min a 4°C y se lavaron dos veces con dos volúmenes de NaCl 0.9 %. A continuación estas células se inocularon a una densidad óptica de 0.1 medida a 600 nm en un matraz erlemneyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio mínimo BSM (NaH_2PO_4-H_2O 4 g/l, K_2HPO_4-$3H_2O$ 4 g/l, NH_4Cl 2 g/l, $MgCl_2$ 0,2 g/l, $CaCl_2$ 1 mg/l, $FeCl_3$, 1 mg/l) y Mg_2SO_4 2 mM como fuente de azufre y 20 g/l de glutamato como fuente de carbono. El pH final se ajustó a 7,0 con NaOH. El medio de cultivo también contenía tetraciclina (0,025 mg/ml) para asegurar la estabilidad del plásmido e IPTG 0,2 mM para inducir el promotor *Ptac*. Las células se incubaron a 30°C con agitación (200 rpm, New Brunswick Incubator Model G25) hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 a 600 nm. Las células se separaron del cultivo por centrifugación a temperatura ambiente en una centrífuga Sorval (8500 rpm, 5 min, rotor SS34). Las células se lavaron dos veces con NaCl 0.9 % y el sedimento celular se resuspendió en tampón HEPES 50 mM, pH 8.0 para que la suspensión presentara una densidad óptica de 1 a 600 nm. Esta preparación constituye la suspensión de células en reposo que se utilizan para el ensayo de desulfuración de DBT.

Para determinar la actividad desulfurante de DBT de las células en reposo, 40 ml de estas células se colocaron en un erlenmeyer de 100 ml junto con 50 μl de DBT 20 mM preparado en 2-propanol. La mezcla se incubó a 30°C con agitación (250 rpm, New Brunswick Incubator Model G25). A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras de 0,1 ml y se extrajeron en un tubo *eppendorf* con 0.1 ml de etanol. Después de 5 min de centrifugación en una microcentrífuga, el sobrenadante se recolectó y analizó por HPLC. Para ello, las muestras de 20 μl del extracto etanólico se analizaron en un HPLC Gilson equipado con una columna Lichrosphere 5 RP-8 (150 x 4,6 mm) utilizando una fase móvil isocrática de 50 % acetonitrilo-agua con un flujo de 1 ml/min. Los picos de DBT y 2HBP coincidentes con los tiempos de retención correspondientes a los patrones de DBT y 2HBP fueron monitorizados con un espectrofotómetro UV a 248 nm.

Los ensayos llevados a cabo con las células en reposo de *P. putida* KT2442 (pESOX3) y *P. putida* KT2442 (pBG8) CECT 5279 recombinantes mostrados en la Tabla 2 indican que la cepa portadora del plásmido pBG8 es mucho más eficiente en la desulfuración del DBT que la cepa portadora del plásmido pESOX3 lo que se demuestra la ventaja y enorme utilidad de esta invención.

TABLA 2

Ensayo de desulfuración de DBT a distintos tiempos de reacción utilizando células en reposo de P. putida KT2442 (pESOX3) y P. putida KT2442 (pBG8) CECT 5279

CEPA	TIEMPO (MIN)	%DESAPARACIÓN DE DBT	%APARICIÓN DE2HBP
P. putida KT2442 (pESOX3)	15	7	0
	30	20	0
	45	20	0
	60	30	4
P. putida KT2442 (pBG8)	15	56	8
	30	75	15
	45	92	22
	60	100	27

Ejemplo 5

Transferencia del plásmido pBG8 a otras bacterias.

Para determinar la posibilidad de que el plásmido pBG8 pueda transferir a otras bacterias la capacidad de desulfurar DBT y utilizar este compuesto como única fuente de azufre para su crecimiento se transformaron con el plásmido pBG8, que porta los genes *hpaC-dszA-dszB-dszC*, dos bacterias diferentes, una cepa de *E. coli* DH5α y una cepa de *Ralstonia eutropha* JMP289.

La cepa de *E. coli* DH5α se transformó mediante un procedimiento convencional utilizando células competentes preparadas con RbCl (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Los transformantes de *E. coli* DH5α que portan el plásmido pBG8 se seleccionaron en un medio Luria-Bertani conteniendo tetraciclina (0,010 mg/ml). Por otro lado la cepa *E. coli* DH5α se transformó con el plásmido pESOX3 que expresa los genes *dszA-dszB-dszC* pero que carece del gen *hpaC*. Los transformantes de *E. coli* DH5α que portan el plásmido pESOX3 también se seleccionaron en un medio de Luria-Bertani conteniendo tetraciclina (0,012 mg/ml). A continuación las cepas *E. coli* DH5α (pBG8). *E. coli* DH5α (pESOX3) y la propia cepa parental no recombinante *E. coli* DH5α se inocularon independientemente en medio mínimo BSM conteniendo tetraciclina (0,010 mg/ml), IPTG 0,2 mM, DBT 0,2 mM como fuente de azufre y glicerol al 0,2 % como fuente de carbono. Sólo la cepa de *E. coli* DH5α (pBG8) fue capaz de crecer en este medio (Tabla 3).

La cepa de *R. eutropha* JMP289 se transformó con el plásmido pBG8 mediante técnicas clásicas de conjugación triparental (de Lorenzo y Timmis (1994) Meth. Enzymol. 235, 386-405). Los transformantes de *R. eurotropha* JMP289 que portan el plásmido pBG8 se seleccionaron en un medio Luria-Bertani conteniendo tetraciclina (0,010 mg/ml). Como control la misma cepa de *R. eutropha* JMP289 se trasformó por el mismo procedimiento con el plásmido parental pVLT31. A continuación las cepas *R. eutropha* JMP289 (pBG8), *R. eutropha* JMP289 (pVLT31) y la propia cepa parental no recombinante *R. eutropha* JMP289 se inocularon independientemente en medio mínimo BSM conteniendo tetraciclina (0,010 mg/ml), IPTG 0,2 mM, DBT 0,2 mM como fuente de azufre y fructosa al 0,2 % como fuente de carbono. Sólo la cepa de *R. eutropha* JMP289 (pBG8) fue capaz de crecer en este medio (Tabla 3).

Con esto se demuestra que el plásmido pBG8 es capaz de transferir la capacidad de desulfurar el DBT a otras bacterias distintas de *P. putida* donde sea capaz de replicarse, como es el caso de *E. coli* o *R. eutropha* para que estas utilicen el azufre de este compuesto para su crecimiento, y que esta capacidad va ligada a la presencia de los cuatro genes *hpaC-dszA-dszB-dszC*.

TABLA 3

Ensayo de utilización del DBT como única fuente de azufre para el crecimiento de distintas bacterias transformadas con distintos plásmidos

CEPA	PLASMIDO	GENOTIPO RELEVANTE	CRECIMIENTO
E. coli DH5α		—	NEGATIVO
E. coli DH5α	pESOX3	*dszABC*	NEGATIVO
E. coli DH5α	pBG8	*hpaC dszABC*	POSITIVO
R. eutropha		—	NEGATIVO
R. eutropha	pVLT31	—	NEGATIVO
R. eutropha	pBG8	*hpaC dszABC*	POSITIVO

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para desulfurar dibenzotiofeno utilizando una bacteria recombinante de *Pseudomonas putida* en contacto con el dibenzotiofeno **caracterizado** porque dicha bacteria recombinante se obtiene de la siguiente forma:

a) Aislar el fragmento de DNA que codifica las enzimas DszA, DszB y DsC de la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y que son necesarias para la desulfuración del dibenzotiofeno,

b) Aislar el fragmento de DNA que codifica en *Escherichia coli* W ATCC11105 la enzima flavin:NADH reductasa HpaC que proporciona el $FMNH_2$ necesario para la desulfuración del dibenzotiofeno,

c) Construcción de un plásmido de amplio espectro de huésped conteniendo un operón que porta las secuencias que codifican DszA, DszB, DszC y HpaC bajo el control de un promotor regulable y funcional en un gran número de bacterias gram-negativas, e

d) Introducción de dicho plásmido en las células *Pseudomonas*.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque en la obtención de la bacteria recombinante:

a) El operón contiene los genes dsza, dszb, DszC que codifican las monooxigenasas DszA y DszC y la desulfinasa DszB de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y el gen hpac que codifica una flavin:NADH reductasa de *Escherichia coli* W ATCC11105,

b) El plásmido construido es pBG8, y

c) La introducción de dicho plásmido se realiza en células de *P. putida* KT2442 y que se corresponde con la bacteria CECT 5279.

3. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque la flavin:NADH reductasa utilizada es homóloga a la flavin:NADH reductasa HpaC de *Escherichia coli* W ATCC11105.

4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque la bacteria recombinante se cultiva en un medio que permita la desulfuración del dibenzotiofeno.

5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque la bacteria recombinante se cultiva en medios que permitan la expresión de las proteínas DszA, DszB, DszC y HpaC y porque estas proteínas se utilizan, tanto dentro de células en crecimiento como dentro de células en reposo, para la desulfuración del dibenzotiofeno.

6. Un procedimiento para desulfurar dibenzotiofeno utilizando una bacteria recombinante distinta de *Pseudomonas putida* **caracterizado** porque la bacteria transformada y utilizada para desulfurar dibenzotiofeno porta el plásmido pBG8 descrito en las reivindicaciones 1 y 2.

7. Un procedimiento según la reivindicacion 6 **caracterizado** porque la flavin:NADH reductasa utilizada es homóloga a la flavin:NADH reductasa HpaC de *Escherichia coli* W ATCC11105.

8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7 **caracterizado** porque las células transformadas se cultivan en un medio que permita la desulfuración del dibenzotiofeno.

9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a la 8 **caracterizado** porque las células transformadas se cultivan en medios que permitan la expresión de las proteínas DszA, DszB, DszC y HpaC y porque estas proteínas se utilizan, tanto dentro de células en crecimiento como dentro de células en reposo, para la desulfuración del dibenzotiofeno.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 168 945

(21) N.° solicitud: 200000661

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **20.03.2000**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.^{7}:** C12N 15/53, 15/52, C12S 1/02, C10G 32/00, C12N 1/21, 9/02
//(C12N 1/21, C12R 1:01, 1:19, 1:40)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 9711185 A (ENERGY BIOSYSTEMS CORPORATION) 27.03.1997, página 12, línea 25 - página 15, línea 15.	1-9
Y	PRIETO M. et al. "Molecular characterization of 4-hidroxiphenilacetate 3-hidroxilase of Escherichia coli". J. Biol. Chem., 1994, Vol. 269 (36), páginas 22823-29.	1-3,5,7,9
Y	GALLARDO M. et al. "Designing Recombinant Pseudomonas Strains to Enhance Biodesulfurization". J. Bacteriol., 1997, páginas 7156-7160.	1,2,4,6,8
A	GALÁN B. et al. "Funtional Analysis of the small component of 4-hidroxiphenil acetate 3-monooxigenase of Escherichia coli w: a prototype of a new Flavin: NAD(P)H Reductase Subfamily". J. Bacteriol., Febrero 2000, Vol. 182 (3), páginas 627-636.	1,2,3,5,7

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 n°:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
21.05.2002	A. Collados Martín Posadillo	1/1