



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 220 219**

② Número de solicitud: 200301217

⑤ Int. Cl.7: **C12P 13/00**

C12P 1/04

// (C12P 1/04

C12R 1:19

C12R 1:37)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **23.05.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.12.2004**

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Murcia  
Avda. Teniente Flomesta  
Edificio de la Convalecencia  
30003 Murcia, ES**

⑱ Inventor/es: **Cánovas Díaz, Manuel y  
Iborra Pastor, José Luis**

⑳ Agente: **Astiz Suárez, José Enrique**

② Título: **Procedimiento para la producción de L-carnitina a partir de crotonobetaína, D-carnitina, sus sales y derivados, mediante células permeabilizadas de *Proteus sp.* o *Escherichia coli*.**

③ Resumen:

Procedimiento para la producción de L-carnitina a partir de crotonobetaína, D-carnitina, sus sales y derivados, mediante células permeabilizadas de *Proteus sp.* o *Escherichia coli*.

El procedimiento para la producción de L-carnitina, a partir de un sustrato de biotransformación seleccionado entre crotonobetaína, una sal de crotonobetaína, un derivado de crotonobetaína, D-carnitina, una sal de D-carnitina, un derivado de D-carnitina, y mezclas de los mismos, comprende cultivar células permeabilizadas de *Escherichia coli* o de *Proteus sp.*, libres o inmovilizadas, en un medio de cultivo que contiene dicho sustrato de biotransformación y los nutrientes necesarios para mantener la viabilidad de dichas células, bajo condiciones que permiten la producción de L-carnitina. Dicho medio de cultivo puede contener compuestos activadores del crecimiento de dichas células y/o inductores de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina y/o inhibidores de la transformación de crotonobetaína en  $\gamma$ -butirobetaína.

ES 2 220 219 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de L-carnitina a partir de crotonobetaína, D-carnitina, sus sales y derivados, mediante células permeabilizadas de *Proteus sp.* o *Escherichia coli*.

**Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con un nuevo procedimiento para la producción de L-carnitina a partir de crotonobetaína, D-carnitina, sus sales y derivados, en un reactor en el que células permeabilizadas de *Proteus sp.* o *Escherichia coli* actúan como biocatalizadores de la reacción de hidratación y racemización.

**Antecedentes de la invención**

Es bien conocido que la L-carnitina [R(-)-3-hidroxi-4-N-trimetilaminobutirato] es una sustancia ubicua que desempeña distintos papeles en el metabolismo, especialmente en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana interna mitocondrial. La función de la L-carnitina en el metabolismo de las células eucarióticas ha conducido a una serie de aplicaciones clínicas, por ejemplo, en el tratamiento de pacientes con síndromes de deficiencia en carnitina, en la profilaxis y tratamiento de diversas enfermedades cardíacas y como terapia de sustitución en pacientes de hemodiálisis. Adicionalmente, se ha utilizado la L-carnitina como aditivo en bebidas energéticas o ha sido añadida a medios de fermentación para aumentar la velocidad de crecimiento de levaduras y bacterias. El aumento en la demanda del enantiómero biológicamente activo, L-carnitina, para estos y otros propósitos, ha provocado el desarrollo de distintos procedimientos para sintetizar esta betaína en una forma ópticamente pura, ya que el racemato químicamente sintetizado no puede ser administrado debido a que inhibe enzimas importantes tales como las proteínas transportadoras de carnitina y la carnitina acetiltransferasa.

Se han descrito procedimientos químicos de obtención de L-carnitina basados en la resolución de carnitina racémica, o sus precursores, a través de sus diastereómeros por medio de ácidos ópticamente activos (US 4.254.053), en los que la D-carnitina es el producto residual del proceso de resolución. Este problema puede resolverse mediante procedimientos biológicos que permiten la producción a gran escala de L-carnitina a partir de sus precursores aquirales de bajo coste (Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 1993, 50:21-44). De especial interés es la hidratación estereoespecífica de la *trans*-crotonobetaína a L-carnitina utilizando cepas pertenecientes al género *Escherichia* (EP 121444; DD 221905; EP 320460) o *Proteus* (Agric. Biol. Chem., 1988, 52:2415-2421; US 5.300.430). La ventaja de este método radica en que el precursor aquiral puede ser obtenido por deshidratación química de la D-carnitina producto que, de otro modo, carecería de valor.

También se ha descrito la biotransformación de crotonobetaína en L-carnitina con bajo rendimiento (35-45%) utilizando la enzima L-carnitina deshidratasa (WO99/24597; FEMS Microbiol. Lett., 2001, 196:1-6).

Las bacterias gram-negativas, por ejemplo *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, etc., poseen una membrana exterior extra, principalmente protectora, que es capaz de expulsar macromoléculas hidrófilas y sustancias hidrófobas. La integridad de la membrana exterior en las bacterias gram-negativas puede ser alterada por agentes permeabilizantes (Microbiol. Rev., 1992, 56:395-411; Lett. Appl. Microbiol., 1999, 1, 13-16). A modo ilustrativo, se ha descrito que detergentes tales como Triton X-100 (Enz. Microbiol. Technol., 1996, 18:18-22; Enz. Microbiol. Technol., 1998, 22:621-628) y Tween (Enz. Microbiol. Technol., 1996, 19:145-149), así como disolventes orgánicos, tales como tolueno (Biotechnol. Lett., 1994, 16:345-348), actúan como agentes permeabilizantes celulares. Sin embargo, se necesitan investigaciones adicionales sobre la permeabilización de bacterias gram-negativas ya que se dispone de poca información debido a su membrana externa y a las características especiales de su pared celular y se necesita desarrollar métodos eficaces para reducir la acción tipo barrera de la cubierta celular hacia los sustratos y los productos en los procesos biológicos (bioprocesos).

Se han realizado ensayos de permeabilidad sobre distintas bacterias. No obstante, aparentemente, no se han realizado ensayos de permeabilidad sobre células de *Proteus sp.* o de *E. coli* como medio para incrementar el bioproceso de conversión en L-carnitina.

Por otra parte, se conoce que *E. coli* y *Proteus sp.* son capaces de biotransformar compuestos de trimetilamonio (FEMS Microbiol. Lett., 2001, 196:1-6; Biochem. Biophys. Acta, 1989, 1003:270-276; Enzyme Microbiol. Technol., 2001, 28:785-791), por lo que la generación de productos secundarios de la biotransformación de crotonobetaína en L-carnitina, tales como la  $\gamma$ -butirobetaína, supone una producción más baja de L-carnitina así como serios problemas aguas abajo que afectan significativamente a la aplicabilidad industrial del proceso.

**Compendio de la invención**

Existe la necesidad de encontrar un procedimiento microbiológico alternativo para producir L-carnitina a partir de un sustrato de biotransformación apropiado, tal como crotonobetaína, que supere la totalidad o parte de los inconvenientes asociados con los procedimientos microbiológicos de producción de L-carnitina conocidos.

La solución proporcionada por esta invención se basa en un nuevo procedimiento para incrementar la biotransformación de crotonobetaína, D-carnitina, sus sales y derivados, en L-carnitina o sus derivados mediante el empleo

de células permeabilizadas de bacterias gram-negativas, tales como *Proteus sp.* y *E. coli*. La permeabilización celular mejora la entrada de sustrato y el flujo del producto, factores que están controlados por la membrana externa y por la difusión de la pared celular, y el sistema de transporte en sí mismo, conduciendo a un aumento en la conversión del sustrato de hasta el doble (80-90%). Además de obtener L-carnitina con elevada pureza junto con una elevada productividad y rendimiento en L-carnitina, la producción de productos secundarios de la biotransformación, tales como  $\gamma$ -butirotbetaína, es muy reducida o prácticamente nula ya que los niveles de L-carnitina en el interior celular son más bajos debido a la permeabilización, reduciéndose de este modo los costes de tratamiento aguas abajo del proceso.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de L-carnitina, a partir de un sustrato de biotransformación, que comprende cultivar células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.*, en un medio de cultivo que contiene dicho sustrato de biotransformación y los nutrientes necesarios para mantener la viabilidad de dichas células, bajo condiciones que permiten la producción de L-carnitina.

Debido a que la inducción de enzimas relacionadas con la carnitina requiere de condiciones aeróbicas para *Proteus sp.*, o anaeróbicas para en una realización particular, dicho procedimiento comprende cultivar células permeabilizadas de *E. coli* a un pH comprendido entre 4,5 y 8,5, en un medio de cultivo que comprende el sustrato de biotransformación en condiciones aeróbicas, mientras que en otra realización particular, dicho procedimiento comprende cultivar células permeabilizadas de *Proteus sp.* a un pH comprendido entre 4,5 y 8,5, en un medio de cultivo que comprende el sustrato de biotransformación en condiciones anaeróbicas.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica que muestra las curvas de crecimiento de células de *Proteus sp.* en presencia de distintas concentraciones de extracto de levadura, concretamente 1 g.L<sup>-1</sup> (■), 5 g.L<sup>-1</sup> (▲), 10 g.L<sup>-1</sup> (▼), 20 g.L<sup>-1</sup> (◆) y 30 g.L<sup>-1</sup> (●).

La Figura 2 es una gráfica que muestra la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) en h<sup>-1</sup> de células de *Proteus sp.* en presencia de una concentración de extracto de levadura de 30 g.L<sup>-1</sup> (●).

La Figura 3 es una gráfica que muestra las curvas de crecimiento (Figura 3A) y la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ), en h<sup>-1</sup> (Figura 3B), de células de *Proteus sp.* a distintos valores de pH, concretamente a pH 6,6 (◆), 6,8 (▼), 7,1 (■) y 7,8 (▲).

### Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la producción de L-carnitina, a partir de un sustrato de biotransformación seleccionado entre crotonobetaína, una sal de crotonobetaína, un derivado de crotonobetaína, D-carnitina, una sal de D-carnitina, un derivado de D-carnitina, y mezclas de los mismos, en adelante procedimiento de la invención, que comprende cultivar células permeabilizadas de *Escherichia coli* o de *Proteus sp.*, en un medio de cultivo que contiene dicho sustrato de biotransformación y los nutrientes necesarios para mantener la viabilidad de dichas células, bajo condiciones que permiten la producción de L-carnitina.

El procedimiento de la invención comprende el empleo de células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.*. Dichas células permeabilizadas pueden obtenerse por métodos convencionales que comprenden poner en contacto células de *E. coli* o de *Proteus sp.* con un agente permeabilizante bajo condiciones que permiten la permeabilización de tales células. Prácticamente cualquier agente permeabilizante de células, en particular, de bacterias gram-negativas, puede ser utilizado. No obstante, en una realización particular, dicho agente permeabilizante se selecciona entre detergentes, disolventes orgánicos y sus mezclas. Ejemplos de detergentes que pueden ser utilizados para la permeabilización de dichas células incluyen los octoxinolos, por ejemplo, el octoxinol-9, un detergente no iónico comercializado con la marca Triton X-100; los polisorbatos, por ejemplo, un éster polietoxilado de sorbitán comercializado con la marca Tween 20, etc.; polietilenimina (PEI), etc. Ejemplos de disolventes orgánicos que pueden ser utilizados en la permeabilización de dichas células incluyen alcoholes, por ejemplo, etanol, isopropanol, etc.; cetonas, por ejemplo, acetona, etc.; o hidrocarburos aromáticos, por ejemplo, tolueno, etc. El de permeabilización de dichas células de *E. coli* o *Proteus sp.* se puede realizar utilizando uno o más detergentes y/o uno o más disolventes orgánicos.

En una realización particular, el proceso para permeabilizar células de *E. coli* o *Proteus sp.* comprende incubar dichas células en presencia de un agente permeabilizante, en una concentración comprendida entre 1 y 50% (peso/volumen), bajo condiciones aeróbicas, a un pH comprendido entre 4,5 y 8,5, a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C, durante un periodo de tiempo suficiente para garantizar la permeabilización celular, por ejemplo, entre 1 minuto y 24 horas. El valor de pH entre 4,5 y 8,5 puede obtenerse, por ejemplo, utilizando un tampón fosfato, por ejemplo, fosfato potásico, con la concentración adecuada (20-80 mM). Las células permeabilizadas resultantes pueden ser utilizadas directamente en el procedimiento de la invención mediante la adición del sustrato de biotransformación al reactor en el que se encuentran las células permeabilizadas. Alternativamente, dichas células permeabilizadas pueden ser separadas por métodos convencionales y lavadas antes de ser utilizadas en el procedimiento de la invención. Prácticamente cualquier método de separación de células puede ser utilizado; no obstante, en una realización particular, las células permeabilizadas se separan mediante centrifugación, por ejemplo, a 1.000-20.000 x g, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 60 minutos, y se lavan, por ejemplo, con el tampón utilizado en el proceso

## ES 2 220 219 A1

de permeabilización. Los Ejemplos 6 y 7 ilustran realizaciones particulares de permeabilización de células de *E. coli* y de *Proteus sp.*

Para la puesta en práctica del procedimiento de la invención se cultivan células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* en un medio de cultivo que contiene dicho sustrato de biotransformación y los nutrientes necesarios para mantener la viabilidad de dichas células, bajo condiciones que permiten la producción de L-carnitina. Dicho medio de cultivo puede contener, además, si se desea, uno o más compuestos activadores del crecimiento de dichas células y/o uno o más inductores de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina y/o uno o más inhibidores de la transformación de crotonobetaína en  $\gamma$ -butirobetaína.

El sustrato de biotransformación para la producción de L-carnitina según e], procedimiento de la invención puede ser crotonobetaína, una sal de crotonobetaína, un derivado de crotonobetaína, D-carnitina, una sal de D-carnitina, un derivado de D-carnitina, o sus mezclas. Prácticamente cualquier sal, o derivado de crotonobetaína o D-carnitina, por ejemplo, sus sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, sus acil derivados, sus ésteres, etc., puede ser utilizado como sustrato de biotransformación en el procedimiento de la invención. Ejemplos ilustrativos de dichos sustratos de biotransformación incluyen crotonobetaína o D-carnitina, sus sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, por ejemplo, sus sales sódica, potásica, etc., sus acil derivados, por ejemplo, acetil-crotonobetaína, propionil-crotonobetaína, etc., o sus ésteres, por ejemplo, crotonobetainil-palmitato, crotonobetainil-isovalerato, etc. En una realización particular, dicho sustrato de biotransformación es crotonobetaína. El sustrato de biotransformación puede estar presente en el medio de cultivo en prácticamente cualquier concentración, preferentemente, en una concentración comprendida entre 25 mM y 1 M.

Las células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* pueden encontrarse en estado de crecimiento o en estado de reposo. Los términos “estado de crecimiento o estado de reposo” definen una situación en la que las células enteras realizan su ciclo vital consumiendo sustratos y produciendo productos. En esa situación, células enteras en un medio mínimo se encuentran en estado latente o su membrana y pared celular muestran una permeabilidad aumentada hacia ciertos sustratos, debido a los cambios físico-químicos que tienen lugar externamente dentro del medio. Dichos cambios no evitan que se realicen ciertos procesos bioquímicos dirigidos a la producción del producto deseado (Anal. Biochem, 1180, 1982, 211-234; en “Biotechnology”, (Kieslich K. vol. Ed. Rehm H.J. & Reed G. Ed) Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1984, vol. 6a. 5-30).

Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios para mantener la viabilidad de dichas células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.*” pretende incluir los medios de cultivo, tanto mínimos como complejos, que contienen los nutrientes necesarios (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, micronutrientes, etc.) adecuados para el cultivo de dichas células bien en estado de crecimiento o bien en estado de reposo. En general, dichos medios de cultivo son conocidos por los técnicos en la materia. Ejemplos ilustrativos de medios de cultivo en los que puede llevarse a cabo el procedimiento de la invención incluyen:

- (i) un medio de cultivo mínimo para cultivar células de *E. coli* en estado de crecimiento que comprende hidrolizado de caseína (0,1-1 g.L<sup>-1</sup>), crotonobetaína (1-5 g.L<sup>-1</sup>) y sales inorgánicas tales como (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1-5 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1-5 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1-10 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> ·H<sub>2</sub>O (0-0,5 g.L<sup>-1</sup>), MnSO<sub>4</sub> ·H<sub>2</sub>O (0-0,5 g.L<sup>-1</sup>) y FeSO<sub>4</sub> ·H<sub>2</sub>O (0-0,001 g.L<sup>-1</sup>); el pH se ajusta entre 4,5 y 8,5, por ejemplo, mediante adición de una base, tal como NaOH o KOH, antes de la esterilización;
- (ii) un medio de cultivo complejo para cultivar células de *E. coli* en estado de crecimiento que comprende peptona pancreática (1-30 g.L<sup>-1</sup>), crotonobetaína (1-100 g.L<sup>-1</sup>) y NaCl (1-10 g.L<sup>-1</sup>); el pH se ajusta entre 4,5 y 8,5, por ejemplo, mediante adición de una base, tal como NaOH o KOH, antes de la esterilización;
- (iii) un medio de cultivo para cultivar células permeabilizadas de *E. coli* en estado de reposo que contiene únicamente tampón fosfato a una concentración comprendida entre 10 y 1.000 mM, pH 4,5-8,5, al que se le adiciona crotonobetaína a una concentración comprendida entre 25 y 1.000 mM (dependiendo del caso);
- (iv) un medio de cultivo para cultivar células de *Proteus sp.* en estado de crecimiento que comprende extracto de levaduras (1-30 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1-10 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1-10 g.L<sup>-1</sup>) y crotonobetaína (25-1.000 mM); y
- (v) un medio de cultivo para cultivar células permeabilizadas de *Proteus sp.* en estado de reposo que contiene crotonobetaína (1-150 g.L<sup>-1</sup>) y glicerol (1-10 g.L<sup>-1</sup>).

Asimismo, tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “bajo condiciones que permiten la producción de L-carnitina” pretende incluir genéricamente las condiciones necesarias (temperatura, pH, agitación, oxígeno, etc.) para la producción de L-carnitina según el procedimiento de la invención. En general, dichas condiciones pueden ser determinadas por los expertos en la materia mediante ensayos de prueba y error. No obstante, en una realización particular:

- (i) la producción de L-carnitina con células permeabilizadas de *E. coli* en estado de crecimiento comprende incubar en medio complejo para células de *E. coli* en estado de crecimiento, bajo condiciones anaeróbicas, a una temperatura comprendida entre 35°C y 40°C, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5 y con agitación (100-200 rpm);

(ii) la producción de L-carnitina con células permeabilizadas de *E. coli* en estado de reposo comprende incubar dichas células en un medio de cultivo para células de *E. coli* en estado de reposo, bajo condiciones aeróbicas, con aporte de oxígeno (aire o nitrógeno), a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5 (por ejemplo, con tampón fosfato 30-80 mM) y con agitación (100-200 rpm);

(iii) la producción de L-carnitina con células permeabilizadas de *Proteus sp.* en condiciones de crecimiento comprende incubar dichas células en un medio de cultivo para células de *Proteus sp.* en estado de crecimiento, bajo condiciones aeróbicas con aporte de oxígeno (aire o nitrógeno), a una temperatura comprendida entre 35°C y 40°C, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5 (por ejemplo, con tampón fosfato 30-80 mM) y con agitación (100-200 rpm); y

(iv) la producción de L-carnitina con células permeabilizadas de *Proteus sp.* en estado de reposo comprende incubar dichas células en un medio de cultivo para células de *Proteus sp.* en estado de reposo, bajo condiciones aeróbicas, con aporte de oxígeno (aire o nitrógeno), a una temperatura comprendida entre 35°C y 40°C, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5 (tampón fosfato 30-80 mM) y con agitación (100-200 rpm).

El medio de cultivo utilizado para la puesta en práctica del procedimiento de la invención también pueden contener, si se desea, uno o más compuestos activadores del crecimiento de dichas células y/o uno o más inductores de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina y/o uno o más inhibidores de la transformación de crotonobetaína en  $\gamma$ -butirotbetaína.

En una realización particular, dicho medio de cultivo comprende, además, un compuesto activador del crecimiento de dichas células. Prácticamente, cualquier compuesto activador del crecimiento de dichas células puede ser utilizado. No obstante, en una realización concreta, dicho compuesto activador del crecimiento de células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* se selecciona entre glicerina, glucosa, ribosa, sacarosa, lactosa y sus mezclas. En caso de que el medio de cultivo contenga dicho compuesto activador del crecimiento, éste puede estar presente en una concentración comprendida entre 20 mM y 150 mM.

En otra realización particular, dicho medio de cultivo comprende, además, un inductor de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina. Prácticamente, cualquier inductor de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina puede ser utilizado. No obstante, en una realización concreta, dicho inductor de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina se selecciona entre crotonobetaína, una sal de crotonobetaína, un derivado de crotonobetaína, D-carnitina, una sal de D-carnitina, un derivado de D-carnitina, DL-carnitina, una sal de DL-carnitina, un derivado de DL-carnitina, y mezclas de los mismos. En caso de que el medio de cultivo contenga dicho inductor de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina, éste puede estar presente en una concentración comprendida entre 1 mM y 20 mM. En general, cuando el procedimiento de la invención se lleva a cabo utilizando células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* resulta ventajoso o conveniente incluir dicho inductor de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina.

En otra realización particular, dicho medio de cultivo comprende, además, un inhibidor de la transformación de crotonobetaína en  $\gamma$ -butirotbetaína. Prácticamente, cualquier inhibidor de la transformación de crotonobetaína en  $\gamma$ -butirotbetaína puede ser utilizado. No obstante, en una realización concreta dicho inhibidor de la transformación de crotonobetaína en  $\gamma$ -butirotbetaína se selecciona entre fumarato, oxígeno, dióxido de carbono, nitrato, glucosa y sus mezclas. Dichos inhibidores pueden estar presentes en el medio de cultivo en las siguientes cantidades: fumarato (1-50 mM), oxígeno (1-100%), dióxido de carbono (1-10%), nitrato (1-50 mM), glucosa (1-10 g.L<sup>-1</sup>). En general, cuando el procedimiento de la invención se lleva a cabo utilizando células permeabilizadas de *Proteus sp.* no es necesario incluir en el medio de cultivo dicho inhibidor de la transformación de crotonobetaína en  $\gamma$ -butirotbetaína.

El procedimiento de la invención se puede llevar a cabo con las células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* libres o, alternativamente, inmovilizadas en un soporte. El término "células libres" se refiere principalmente a una situación en la que se suspenden células enteras dentro del medio líquido del reactor sin que haya nada que les impida fluir hacia fuera a través de la salida del reactor (Methods in Enzymology, 135, 1987, 3-30). Por el contrario, el término "células inmovilizadas en un soporte" se refiere a una situación en la que las células enteras están fijadas a un soporte por cualquier tipo de interacción, física o química. Virtualmente cualquier soporte de los habitualmente utilizados para inmovilizar células puede ser utilizado. Las células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* pueden ser inmovilizadas sobre dicho soporte mediante métodos convencionales (Enz. Microbiol Technol. 21, 1997, 531-536; J. Appl. Microbiol. 85, 1998, 883-890; Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 1999, 760-766).

El procedimiento de la invención se puede llevar a cabo en un reactor seleccionado entre un reactor que opera en continuo, un reactor que opera en semicontinuo y un reactor que opera en discontinuo (lotes).

En una realización particular, el procedimiento de la invención se realiza en reactores que operan en discontinuo.

En otra realización particular, el procedimiento de la invención se realiza en un reactor que opera en continuo. Tal como aquí se utiliza, el término reactor que opera en continuo se refiere a un reactor, por ejemplo, un reactor tipo tanque agitado, en donde las células de *E. coli* o de *Proteus sp.* se ponen en contacto con el medio de cultivo para transformar la totalidad o la mayor parte del sustrato de biotransformación en L-carnitina. En general, dicho reactor comprende monitores para controlar el pH, la temperatura, la agitación o la concentración de oxígeno y está provisto

de medios para comprobar y corregir los valores de dichos parámetros, así como de bombas dosificadoras y bombas de filtración. Los medios de cultivo se introducen en el reactor a través de las entradas correspondientes mediante bombas dosificadoras. Cuando es necesario, el reactor se somete a una operación de sangrado. En una realización particular, el procedimiento de la invención se lleva a cabo en un reactor que opera en continuo, a diferentes proporciones de dilución, que se ajustan por medio de dos bombas, la bomba dosificadora y la bomba de filtración, a diferentes proporciones de reciclo, velocidades de agitación y concentración de biomasa, en donde la velocidad de salida de la corriente de filtración se controla para un funcionamiento óptimo del reactor.

En general, las condiciones más apropiadas para el cultivo de células permeabilizadas de *Proteus sp.* o de *E. coli* en un reactor que opera en continuo comprenden cultivar el microorganismo a una temperatura comprendida entre 2°C y 50°C y un pH entre 4,5 y 8,5. Para inducir enzimas relacionadas con la carnitina se requieren condiciones anaeróbicas para *E. coli* o aeróbicas para *Proteus sp.*

El procedimiento de la invención se puede llevar a cabo realizando uno o más ciclos de biotransformación. En una realización particular, el procedimiento de la invención se lleva a cabo mediante dos o más ciclos de biotransformación. Operando de esta manera es posible obtener en el segundo ciclo de biotransformación una conversión superior al 50% y una productividad superior a 2,5 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> (Ejemplo 8).

Los siguientes ejemplos ilustran la producción de L-carnitina utilizando células permeabilizadas de *Proteus sp.* y *E. coli* y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

### Ejemplos

Los Ejemplos 1-5 se realizaron con células no permeabilizadas de *Proteus sp.* y sirvieron para establecer las condiciones óptimas para el empleo de dicha bacteria. Los medios de crecimiento y de biotransformación óptimos para *Proteus sp.* fueron establecidos en experimentos en los que las células se encontraban en estado de crecimiento o de reposo. El Ejemplo 6 ilustra la permeabilización de células de *E. coli* mientras que los Ejemplos 7-9 ilustran la permeabilización de células de *Proteus sp.* y su empleo en la biotransformación de crotonobetaína en L-carnitina.

Los procedimientos con las células en estado de reposo se realizaron siempre en tampón fosfato 10-1.000 mM, pH 4,5-8,5 y añadiendo bien crotonobetaína (50-1.000 mM) como sustrato de biotransformación (en función del experimento) en caso de utilizar *E. coli* o bien crotonobetaína (50-1.000 mM) y glicerol (1-10 g.L<sup>-1</sup>) en caso de utilizar *Proteus sp.* El pH de los medios de crecimiento y reposo fue ajustado a 4,5-8,5 con NaOH o KOH 1 M antes de esterilizar. En general, las células crecieron en un medio con una concentración inicial de 0,5-20% (v/v) de cultivo líquido almacenado a -20°C en 20% (v/v) de glicerol a 20-40°C durante 8-10 horas en un matraz de 1 L lleno de 0,2 L de medio de crecimiento y agitado a 150-300 rpm mediante un agitador orbital (*Proteus sp.*) o en un matraz de 1 L lleno hasta el cuello y cerrado con un tapón de caucho (*E. coli*). Durante los experimentos continuos, el medio fue oxigenado o mantenido anaeróbico, según se describe en los ejemplos. La crotonobetaína y la  $\gamma$ -butirobetaína fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna Tracer Spherisorb-NH<sub>2</sub> 3 $\mu$ m, 25 x 0,46 cm, suministrada por Teknokroma (España) en condiciones isocráticas con una fase móvil compuesta por acetonitrilo/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M pH 5,5 (65/35) y una velocidad de flujo de 1 ml/min. La L-carnitina fue determinada mediante el ensayo de la carnitina acetiltransferasa (Enzyme Microbiol. Technol., 2001, 28:785-791).

#### Ejemplo 1

##### Optimización de medios

En este ejemplo se estudió el crecimiento de *Proteus sp.* en distintos medios de cultivo que contenían distintas concentraciones de extracto de levadura (1-30 g.L<sup>-1</sup>) mientras que el resto de los componentes [crotonobetaína (15 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4.4 g.L<sup>-1</sup>) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (6,8 g.L<sup>-1</sup>)] se mantuvieron constantes. Las células de *Proteus sp.* se cultivaron aeróbicamente a 37°C en matraces agitados con un agitador orbital fijado a 150-250 rpm.

La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento (biomasa) a las distintas concentraciones de extracto de levadura ensayadas. Los mayores niveles de biomasa fueron obtenidos con la concentración más alta de extracto de levadura (30 g.L<sup>-1</sup>), por lo que la concentración de extracto de levadura seleccionada para los siguientes experimentos fue 30 g.L<sup>-1</sup>; no obstante, en todos los casos se obtuvo una producción de L-carnitina del 50%.

En la Figura 2 se observa que la velocidad de crecimiento específico máxima para una concentración de extracto de levadura de 30 g.L<sup>-1</sup> fue de 0,31 h<sup>-1</sup>.

El efecto del pH fue comprobado dentro del intervalo de 5,5 a 8,5, en concreto entre 6,6 y 7,8, variando la concentración de fosfato. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 3, donde puede apreciarse que las concentraciones más altas de biomasa se obtuvieron a los valores más altos de pH ensayados, entre 7,1 y 7,8 (Figura 3A). También se observa que la velocidad de crecimiento específico más alta se obtuvo a los valores de pH ensayados más altos (Figura 3B). Por tales razones, se eligió un pH de 7,5 para realizar los siguientes estudios.

## ES 2 220 219 A1

### Ejemplo 2

#### *Producción de L-carnitina por células de Proteus sp. en estado de crecimiento*

5 Se ha estudiado la producción de L-carnitina por células de *Proteus sp.* en estado de crecimiento utilizando 2 medios de cultivo que contenían 10 y 30 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, de extracto de levadura, y distintas concentraciones de crotonobetaína (5,10 y 15 g.L<sup>-1</sup>). Para ello, se cultivaron células de *Proteus sp.* en dichos medios de cultivo en condiciones de aerobiosis, a 37°C, en matraces agitados a 100-200 rpm y a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5 con tampón fosfato 50 mM.

10

La producción de L-carnitina fue más rápida en el cultivo que contenía 30 g.L<sup>-1</sup> de extracto de levadura que en el cultivo que contenía 10 g.L<sup>-1</sup> de extracto de levadura debido, entre otras causas, a que la velocidad de crecimiento específico de *Proteus sp.* era también más alta a esa concentración de extracto de levadura (30 g.L<sup>-1</sup>). Qcarnitina, que representa la velocidad de producción de L-carnitina, era también más alta a medida que aumentaba la concentración de crotonobetaína (Tabla 1). El rendimiento en la producción de L-carnitina no se vio afectado, con valores comprendidos entre 45% y 50% en todos los casos.

15

TABLA 1

20 *Biotransformación con células de Proteus sp. en estado de crecimiento en presencia de concentraciones diferentes de extracto de levadura y crotonobetaína*

Crotonobetaína (g.L <sup>-1</sup> )	Qcarnitina (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	
	Extracto de levadura (10 g.L <sup>-1</sup> )	Extracto de levadura (30 g.L <sup>-1</sup> )
5	0,210	0,296
10	0,378	0,418
15	0,614	0,850

25

30

35 Por consiguiente, el medio de crecimiento para *Proteus sp.* seleccionado para su empleo en los ejemplos siguientes contenía extracto de levadura (30 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4,4 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (6,8 g.L<sup>-1</sup>) y crotonobetaína (15 g.L<sup>-1</sup>).

### Ejemplo 3

40 *Producción de L-carnitina por células de Proteus sp. en estado de reposo*

Se ha estudiado la producción de L-carnitina por células de *Proteus sp.* en estado de reposo. Para ello, células de *Proteus sp.* fueron cultivadas en condiciones de aerobiosis, a 37°C, en matraces agitados en un agitador orbital a 150-250 rpm o en un reactor agitado continuo. El medio complejo tenía la siguiente composición: crotonobetaína (50-150 g.L<sup>-1</sup>), extracto de levadura (0-75 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El pH se ajustó a 7,5 por adición de KOH. Se llegó a la conclusión, después de los estudios realizados, que las células crecían con una velocidad de crecimiento más alta en presencia de oxígeno, obteniéndose en todos los casos valores similares de A<sub>600</sub> (cerca de 1,0-4,0 unidades en estado estacionario).

45

50 Además, después del crecimiento en el medio óptimo, las células se recogieron o se mantuvieron en el reactor, al que se añadió el medio de biotransformación. Se estudió la producción de L-carnitina cambiando las concentraciones de crotonobetaína, biomasa y glicerol (5-10 g.L<sup>-1</sup>) en ese medio. La producción de L-carnitina, su velocidad de producción y su rendimiento, se calcularon con diferentes concentraciones de crotonobetaína (50-150 g.L<sup>-1</sup>). Aunque a una concentración de crotonobetaína de 150 g.L<sup>-1</sup> la velocidad de producción de L-carnitina era más alta que la obtenida con otras concentraciones de crotonobetaína, el rendimiento no pudo ser considerado satisfactorio. La concentración de crotonobetaína de 100 g.L<sup>-1</sup> pareció ser la mejor opción, tal como se recoge en la Tabla 2.

55

60

65

## ES 2 220 219 A1

TABLA 2

*Biotransformación con células de Proteus sp. en estado de reposo en presencia de distintas concentraciones de crotonobetaína*

Crotonobetaína (g.L <sup>-1</sup> )	Qcarnitina (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Producción de L-carnitina (%)
50	1,76	40
75	2,44	42
100	2,90	55
150	2,98	36

### Ejemplo 4

#### *Inducción por crotonobetaína de la producción de L-carnitina en células de Proteus sp.*

La capacidad de células de *Proteus sp.* para producir L-carnitina a partir de crotonobetaína debe ser inducida dentro del medio de crecimiento y, por ese motivo, se realizaron estudios de inducción con distintas concentraciones de crotonobetaína en el medio comprendidas entre 1 y 20 g.L<sup>-1</sup>. Los experimentos se realizaron con distintas concentraciones de células en reposo (biomasa medida como A<sub>600</sub> comprendida entre 1,0 y 4,0) y las concentraciones de crotonobetaína mencionadas en la Tabla 2 (50-150 g.L<sup>-1</sup>). Brevemente, células de *Proteus sp.* fueron cultivadas en condiciones de aerobiosis, a 37°C, con agitación (100-150 rpm), en un medio que contenía crotonobetaína (100 g.L<sup>-1</sup>), extracto de levadura (20 g.L<sup>-1</sup>) y pH ajustado a 7,5 con tampón fosfato 50 mM.

Las células de *Proteus sp.* fueron capaces de expresar las enzimas dependientes del metabolismo de L-carnitina hasta niveles similares, alcanzando la producción de L-carnitina un 50% acompañada de una producción de  $\gamma$ -butirobetaína de 10-15 mM. La velocidad de producción de L-carnitina y el rendimiento en la producción de carnitina aumentaron a concentraciones crecientes de biomasa.

TABLA 3

*Biotransformación utilizando células de Proteus sp. en estado de reposo a diferentes concentraciones de biomasa*

Biomasa A <sub>600</sub>	$\gamma$ -butirobetaína (g.L <sup>-1</sup> )	Qcarnitina (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Producción de carnitina (%)
1,20	1,9	2,16	40
2,05	2,5	2,66	50
3,35	3,1	3,51	55

### Ejemplo 5

#### *Producción de L-carnitina por células de Proteus sp. en estado de reposo en presenciade distintas concentraciones de glicerol*

Se ha estudiado la producción de L-carnitina por células de *Proteus sp.* en estado de reposo en presencia de concentraciones diferentes de glicerol. Para ello, se cultivaron células de *Proteus sp.* en condiciones de aerobiosis, a 37°C, en un reactor de tipo tanque agitado continuo. El medio complejo tenía la siguiente composición: crotonobetaína (100 g.L<sup>-1</sup>), extracto de levadura (10-20 g.L<sup>-1</sup>) y pH ajustado a 7,5 con KOH. Se añadió glicerol a distintas concentraciones (0-10 g.L<sup>-1</sup>) para observar su efecto sobre el medio de biotransformación en estado de reposo utilizado.

## ES 2 220 219 A1

TABLA 4

*Biotransformación utilizando células de Proteus sp. en estado de reposo a diferentes concentraciones de glicerol*

Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	$\gamma$ -butirobetaína (g.L <sup>-1</sup> )	Qcarnitina (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Producción de carnitina (%)
0	2,5	2,86	43
5	2,1	2,56	44
10	2,3	2,79	45

La crotonobetaína y la  $\gamma$ -butirobetaína fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna Tracer Spherisorb-NH<sub>2</sub> 3  $\mu$ m, 25 x 0,46 cm, 17 cm, suministrada por Teknokroma (España) en condiciones isocráticas con una fase móvil compuesta por acetonitrilo/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M pH 5,5 (65/35) y una velocidad de flujo de 1 mUmin. La L-carnitina fue determinada mediante el ensayo de la carnitina acetiltransferasa (Enzyme Microbiol. Technol., 2001, 28:785-791).

### Ejemplo 6

#### *Permeabilización de células de E. coli*

Células de *E. coli* se sometieron a un proceso de permeabilización consistente en incubar dichas células en presencia de un agente permeabilizante, tal como Triton X-100, Tween 20 y polietilenimina (PEI), a distintas concentraciones, bajo condiciones aeróbicas, a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C, tras un periodo de tiempo comprendido entre 12 y 24 horas de cultivo celular. Los ensayos de biotransformación de crotonobetaína en L-carnitina se realizaron con las células permeabilizadas de *E. coli* resultantes utilizando una concentración de crotonobetaína comprendida entre 1 y 150 g.L<sup>-1</sup> en medio de crecimiento y de 1-100 g.L<sup>-1</sup> en medio de reposo.

En la Tabla 5 se recogen los resultados obtenidos en un ensayo de biotransformación con células permeabilizadas de *E. coli* mediante incubación con Triton X-100, Tween 20 o PEI durante 10 minutos, a 4°C. Antes de ser sometidas al proceso de permeabilización, dichas células de *E. coli* fueron cultivadas bajo condiciones aeróbicas, durante un periodo de tiempo comprendido entre 12 y 24 horas. Los ensayos de biotransformación de crotonobetaína en L-carnitina se realizaron en presencia de crotonobetaína (80 g.L<sup>-1</sup>) bajo condiciones aeróbicas a 37°C con tampón fosfato 80 mM, pH 7,5.

TABLA 5

*Biotransformación con células permeabilizadas de E. coli tras permeabilización con Triton X-100, Tween 20 o PEI (10 minutos de incubación a 4°C); la biotransformación se realizó en presencia de crotonobetaína (80 g.L<sup>-1</sup>) bajo condiciones aeróbicas a 37°C con tampón fosfato 80 mM, pH 7,5*

	Concentración (% v/v)	L(-)-carnitina (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Conversión de L-carnitina(%)
Control	0	0,294	42
Triton X-100	1	0,455	65
	2	0,469	70
	5	0,483	75
Tween 20	2	0,500	75
	5	0,503	75
PEI	0,05	0,510	80
	0,5	0,511	85

Triton X-100, Tween 20 y PEI son productos comerciales (Sigma-Aldrich)

## Ejemplo 7

*Permeabilización de células de Proteus sp.*

5 Células de *Proteus sp.* fueron permeabilizadas incubando dichas células en presencia de un agente permeabilizante, bajo condiciones aeróbicas, a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 y 30 minutos. Los ensayos de biotransformación con las células de *Proteus sp.* permeabilizadas resultantes se realizaron en presencia de una concentración de crotonobetaína comprendida entre 1 y 150 g.L<sup>-1</sup> en medio de crecimiento y de 1-100 g.L<sup>-1</sup> en medio de reposo. Los resultados se recogen en los siguientes ejemplos.

7.1 *Permeabilización de células de Proteus sp. con Triton X-100, isopropanol y etanol*

15 Se describen los resultados de 3 experimentos simultáneos realizados con células de *Proteus sp.* utilizando como agentes permeabilizantes Triton X-100 al 1%, isopropanol al 20% y etanol al 20%. Después de 12 h de cultivo celular, se añadieron los agentes y se mantuvieron los cultivos a 35°C hasta alcanzar la fase estacionaria. A continuación, el caldo de cultivo fue centrifugado (o mantenido como estaba) a 16.000 x g y el sedimento (células) se resuspendió durante 48 horas en medio de biotransformación en estado de reposo conteniendo crotonobetaína (50-100 g.L<sup>-1</sup>) y glicerol (1-10 g.L<sup>-1</sup>). Los ensayos de biotransformación con las células de *Proteus sp.* permeabilizadas se realizaron a una temperatura comprendida entre 35°C y 40°C, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5 con tampón fosfato 30-80 mM, con agitación (100-200 rpm), aporte de oxígeno (aire o nitrógeno), en reactores discontinuos (48 horas y en dos fases) o en continuo. Durante los experimentos, se retiraron muestras para determinar el 1 contenido en biomasa y la concentración de L-carnitina. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores de conversión y productividad de L-carnitina recogidos en la Tabla 6 corresponden a los valores medios de los análisis.

TABLA 6

25 *Valores de conversión y productividad utilizando 50 g.L<sup>-1</sup> de crotonobetaína en medio de biotransformación en estado de crecimiento y reposo, respectivamente*

	Etanol 20%		Isopropanol 20%		Triton X-100 1%		Control	
	Rep.	Cto.	Rep.	Cto.	Rep.	Cto.	Rep.	Cto.
35 Conversión (%)	31,2	45,8	20,5	10,6	48,1	65,2	28,5	45,2
40 Productividad (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> célula)	0,77	1,34	0,51	0,28	0,93	1,60	0,72	0,12

40 Cto.: Crecimiento; Rep.: Reposo

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que Triton X-100 era el agente permeabilizante que proporcionaba los mayores valores de conversión y productividad.

7.2 *Permeabilización de células de Proteus sp. utilizando diferentes concentraciones de Triton X-100*

50 Dado que Triton X-100 fue capaz de mejorar la producción de L-carnitina, se ensayaron distintas concentraciones, comprendidas entre 0 y 0,5 g.L<sup>-1</sup>, de Triton X-100. El proceso de permeabilización de células de *Proteus sp.* se realizó incubando dichas células con Triton X-100 bajo condiciones aeróbicas, a una temperatura de 35°C, durante 12 horas. A continuación, el caldo de cultivo fue centrifugado a 16.000 x g y las células se resuspendieron durante 48 horas en medio de biotransformación en estado de reposo conteniendo crotonobetaína (50-100 g.L<sup>-1</sup>) y glicerol (1-10 g.L<sup>-1</sup>). Los ensayos de biotransformación con las células de *Proteus sp.* permeabilizadas se realizaron a una temperatura comprendida entre 35°C y 40°C, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5 con tampón fosfato 30-80 mM, con agitación (100-200 rpm), aporte de oxígeno (aire), en reactores discontinuos (48 horas y en dos fases) o en continuo. Durante los experimentos se retiraron muestras para determinar el contenido en biomasa y la concentración de L-carnitina. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores de conversión y productividad de L-carnitina recogidos en las Tablas 7 y 8 corresponden a los valores medios de los análisis.

## ES 2 220 219 A1

TABLA 7

*Valores de conversión y productividad de L-carnitina en medio de biotransformación en estado de crecimiento utilizando diferentes concentraciones de Triton X-100*

	Triton X-100 (g.L <sup>-1</sup> )					
	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
Conversión (%)	44,4	71,6	70,6	69,5	85,9	75,3
Productividad (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> célula)	1,06	1,93	1,98	1,97	2,21	2,11

TABLA 8

*Valores de conversión y productividad de L-carnitina en medio de biotransformación en estado de reposo utilizando diferentes concentraciones de Triton X-100*

	Triton X-100 (g.L <sup>-1</sup> )					
	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
Conversión (%)	42,0	71,5	75,5	81,3	88,7	67,3
Productividad (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> célula)	1,38	1,99	2,05	2,03	2,37	2,04

En las Tablas 7 y 8 se puede observar que los valores de biotransformación de crotonobetaína en L-carnitina obtenidos utilizando cualquiera de las células permeabilizadas de *Proteus sp.*, a cualquiera de las concentraciones de agente permeabilizante ensayadas, fueron superiores a los del control. Merece la pena destacar la concentración de Triton X-100 de 0,3 g.L<sup>-1</sup>, concentración que proporcionó como resultado una mejora sustancial en la biotransformación con células permeabilizadas de *Proteus sp.* tanto en estado de crecimiento como en estado de reposo.

### Ejemplo 8

*Biotransformación, en varios ciclos, de crotonobetaína en L-carnitina mediante el empleo de células de Proteus sp. permeabilizadas utilizando diferentes concentraciones de Triton X-100*

El proceso de permeabilización de células de *Proteus sp.* se realizó utilizando concentraciones variables de Triton X-100. Brevemente, células de *Proteus sp.* se cultivaron bajo condiciones aeróbicas, a una temperatura de 35°C, durante un periodo de tiempo de 12 horas, y en presencia de una concentración de crotonobetaína de 50 g.L<sup>-1</sup> en el medio de biotransformación de crecimiento y de 100 g.L<sup>-1</sup> en el medio de biotransformación en estado de reposo. Al cabo de las 12 h, se añadió Triton X-100, a concentraciones comprendidas entre 0 y 0,5 g.L<sup>-1</sup> y los cultivos se mantuvieron a 35°C durante 12 h. A continuación, el caldo de cultivo fue centrifugado a 16.000 x g y las células se resuspendieron durante 48 horas en medio de biotransformación en estado de reposo conteniendo crotonobetaína (50-100 g.L<sup>-1</sup>) y glicerol (1-10 g.L<sup>-1</sup>).

Los ensayos de biotransformación con las células de *Proteus sp.* permeabilizadas se realizaron a una temperatura comprendida entre 35°C y 40°C, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5 con tampón fosfato 30-80 mM, con agitación (100-200 rpm), aporte de oxígeno (aire), y en reactores discontinuos (48 horas y en dos fases). Después del primer ciclo de biotransformación los volúmenes finales de cada experimento fueron divididos en 2 muestras iguales que fueron centrifugadas en las mismas condiciones. Las células fueron resuspendidas en dos medios distintos, por una parte, tampón fosfato 60 mM pH 7,5 a 4°C (almacenamiento) y, por otra parte, medio de crecimiento de *Proteus sp.* constituido por extracto de levadura (1-30 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1-10 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.40 g.L<sup>-1</sup>) y crotonobetaína (10 mM). Los cultivos fueron centrifugados de nuevo en las mismas condiciones y se realizó un nuevo ciclo de biotransformación en las condiciones anteriores. Después del segundo ciclo de biotransformación, se realizó un tercer ciclo de biotransformación en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 9 y 10.

## ES 2 220 219 A1

TABLA 9

*Conversión y productividad de L-carnitina en medios de biotransformación en presencia de una concentración de crotonobetaína de 100 g.L<sup>-1</sup> [Almacenamiento de las células en tampón fosfato 60 mM pH 7,5 a 4° C]*

		Triton X-100 (g.L <sup>-1</sup> )					
Nº de ciclos		0	0,5	0,1	0,2	0,3	0,5
1º	Conversión	45,5	73,9	69,2	73,9	89,3	65,0
	Productividad	1,29	2,04	2,02	2,16	2,30	1,23
2º	Conversión	31,0	47,5	48,6	41,3	61,4	0
	Productividad	2,26	3,49	3,02	3,01	2,99	0
3º	Conversión	11,1	10,4	13,5	8,4	8,4	0
	Productividad	0,73	0,68	0,93	0,56	0,56	0

Conversión (%); Productividad (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> célula)

TABLA 10

*Valores de conversión y productividad de L-carnitina en medios de biotransformación en presencia de una concentración de crotonobetaína de 100 g.L<sup>-1</sup> [Almacenamiento de las células en medio de crecimiento a 4° C]*

		Triton X-100 (g.L <sup>-1</sup> )					
Nº de ciclos		0	0,5	0,1	0,2	0,3	0,5
1º	Conversión	44,5	73,9	69,2	85,9	88,3	65,0
	Productividad	1,29	2,04	2,02	2,16	2,10	1,23
2º	Conversión	40,5	46,1	31,6	42,8	55,4	0
	Productividad	2,67	3,22	2,32	2,59	2,99	0
3º	Conversión	28,1	33,4	15,8	26,1	27,3	0
	Productividad	1,73	2,00	1,04	1,57	1,62	0

Conversión (%); Productividad (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> célula)

En las Tablas 9 y 10 puede observarse que los valores de conversión y productividad alcanzados en el segundo ciclo para concentraciones de Triton X-100 de 0,05, 0,2 y 0,3 g.L<sup>-1</sup> fueron superiores al 40% y a 2,5 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Asimismo, en dichas Tablas 9 y 10 puede observarse que incluso en el tercer ciclo, era posible obtener una productividad de 2 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> para una concentración de Triton X-100 de 0,05 g.L<sup>-1</sup>.

### Ejemplo 9

*Producción de  $\gamma$ -butirobetaína por células de Proteus sp. permeabilizadas a diferentes concentraciones de Triton X-100*

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 5 pero utilizando células de *Proteus sp.* permeabilizadas con distintas concentraciones de Triton X-100 (0-0,5 g.L<sup>-1</sup>) se analizó la producción de  $\gamma$ -butirobetaína. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 11.

## ES 2 220 219 A1

TABLA 11

*Producción de  $\gamma$ -butirobetaína por células de Proteus sp. permeabilizadas con Triton X-100*

5	Triton X-100 (g.L <sup>-1</sup> )	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
	Conversión (%)	44,1	60,8	79,4	80,5	90,1	66,9
10	$\gamma$ -butirobetaína (g.L <sup>-1</sup> )	2,9	1,5	ND	ND	ND	ND

ND: No detectado

15 Los resultados ponen de manifiesto que a concentraciones de Triton X-100 superiores a 0,05 g.L<sup>-1</sup> no se produjo  $\gamma$ -butirobetaína, lo que significa un rendimiento superior en L-carnitina y un proceso “aguas abajo” más fácil ya que el producto está prácticamente limpio después de centrifugar los pellets celulares.

20 La crotonobetaína y la  $\gamma$ -butirobetaína fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna Tracer Spherisorb-NH<sub>2</sub> 3  $\mu$ m, 25 x 0,46 cm, suministrada por Teknokroma (España) en condiciones isocráticas con una fase móvil compuesta por acetonitrilo/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M pH 5,5 (65/35) y una velocidad de flujo de 1 ml/min. La L-carnitina fue determinada mediante el ensayo de la carnitina acetiltransferasa (Enzyme Microbiol. Technol., 2001, 28:785-791).

25

30

35

40

45

50

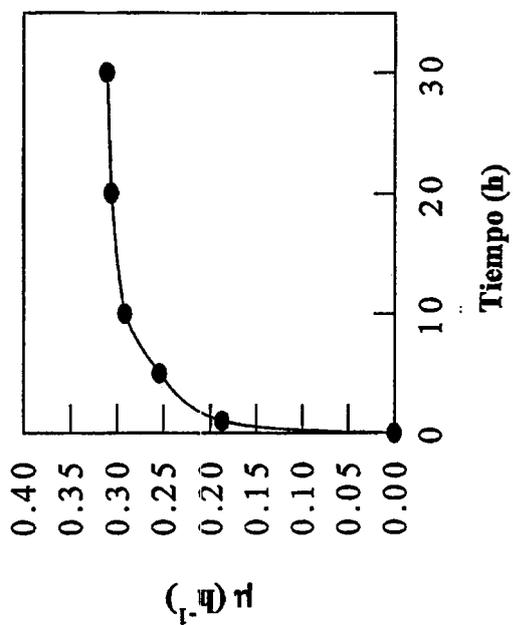
55

60

65

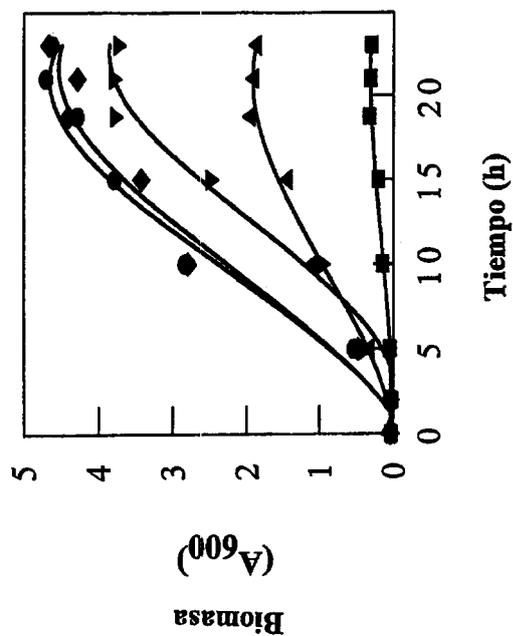
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la producción de L-carnitina, a partir de un sustrato de biotransformación seleccionado entre crotonobetaína, una sal de crotonobetaína, un derivado de crotonobetaína, D-carnitina, una sal de D-carnitina, un derivado de D-carnitina, y mezclas de los mismos, que comprende cultivar células permeabilizadas de *Escherichia coli* o de *Proteus sp.*, en un medio de cultivo que contiene dicho sustrato de biotransformación y los nutrientes necesarios para mantener la viabilidad de dichas células, bajo condiciones que permiten la producción de L-carnitina.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* se cultivan en un medio de cultivo que comprende dicho sustrato de biotransformación a una concentración comprendida entre 25 mM y 1 M.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células permeabilizadas de *E. coli* se cultivan a un pH comprendido entre 4,5 y 8,5, en un medio de cultivo que comprende dicho sustrato de biotransformación en condiciones aeróbicas.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células permeabilizadas de *Proteus sp.* se cultivan a un pH comprendido entre 4,5 y 8,5, en un medio de cultivo que comprende dicho sustrato de biotransformación en condiciones aeróbicas.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* se cultivan en un medio de cultivo que comprende un compuesto activador del crecimiento de dichas células.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho compuesto activador del crecimiento de dichas células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* se selecciona entre glicerina, glucosa, ribosa, sacarosa, lactosa y sus mezclas.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo comprende un inhibidor de la transformación de crotonobetaína en  $\gamma$ -butirobetaína.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho inhibidor de la transformación de crotonobetaína en  $\gamma$ -butirobetaína se selecciona entre fumarato, oxígeno, dióxido de carbono, nitrato, glucosa y sus mezclas.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo comprende un inductor de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina.
- 50 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho inductor de las enzimas implicadas en el metabolismo de la L-carnitina se selecciona entre crotonobetaína, una sal de crotonobetaína, un derivado de crotonobetaína, D-carnitina, una sal de D-carnitina, un derivado de D-carnitina, DL-carnitina, una sal de DL-carnitina, un derivado de DL-carnitina, y mezclas de los mismos.
- 55 11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* se encuentran en estado de crecimiento.
- 60 12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* se encuentran en estado de reposo.
- 65 13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* están libres.
14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* están inmovilizadas en un soporte.
15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el cultivo de dichas células permeabilizadas de *E. coli* o de *Proteus sp.* se realiza en un reactor seleccionado entre un reactor que opera en continuo, un reactor que opera en semicontinuo y un reactor que opera en discontinuo (lotes).
16. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende la realización de uno o más ciclos de biotransformación de sustrato de biotransformación en L-carnitina.



(●): [extracto levadura] = 30 g.L<sup>-1</sup>

**Figura 2**



(■): [extracto levadura] = 1 g.L<sup>-1</sup>  
 (▲): [extracto levadura] = 5 g.L<sup>-1</sup>  
 (▼): [extracto levadura] = 10 g.L<sup>-1</sup>  
 (◆): [extracto levadura] = 20 g.L<sup>-1</sup>  
 (●): [extracto levadura] = 30 g.L<sup>-1</sup>

**Figura 1**

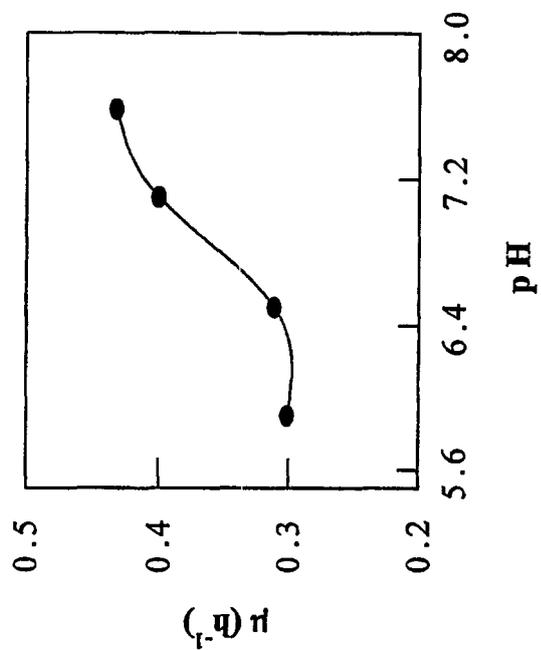


Figura 3B

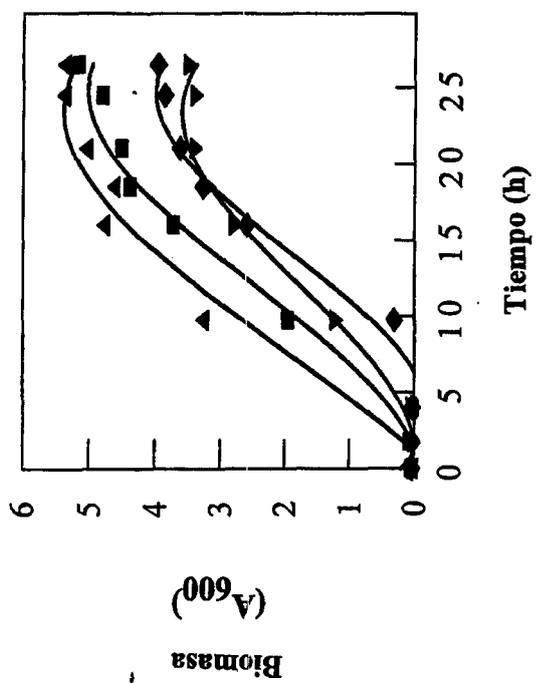


Figura 3A

(◆): pH = 6,6  
 (▼): pH = 6,8  
 (■): pH = 7,1  
 (▲): pH = 7,8



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 220 219

② Nº de solicitud: 200301217

③ Fecha de presentación de la solicitud: **23.05.2003**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.7:** C12P 13/00, 1/04 // (C12P 1/04, C12R 1:19, 1:37)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HANSCHMANN, H. et al. "Conversion of D-carnitine into L-carnitine with stereospecific carnitine dehydrogenases". Biotechnology Letters, 1997. Vol. 19, nº 7, páginas 679-682. Ver página 680.	1
A	EP 0148132 A2 (SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.) 10.07.1985, páginas 8,9; reivindicaciones 1,9-16.	5-8,11,12,16
A	ES 2152864 A1 (UNIVERSIDAD DE MURCIA) 01.02.2001, reivindicaciones 1-3,6-8,12,13.	1-3,7-10,14-16
A	JP 62-118899 A (SEITETSU CHEM IND CO LTD.) 30.05.1987 (resumen) [en línea] [recuperado el 19.08.2004]. Recuperado de EPO WPI Database.	1,3-6
A	KOMOR, E. et al. "Greatly decreased susceptibility of nonmetabolizing cells towards detergents". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. Vol. 76, nº 4, páginas 1814-1818.	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<b>Fecha de realización del informe</b> 14.09.2004	<b>Examinador</b> Asha Sukhwani	<b>Página</b> 1/1
---	------------------------------------	----------------------