

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 586**

21 Número de solicitud: 202230268

51 Int. Cl.:

**B01D 15/32** (2006.01)

**B01D 15/36** (2006.01)

**B01D 15/38** (2006.01)

**C12N 15/70** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**25.03.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.11.2023**

Fecha de concesión:

**29.02.2024**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**07.03.2024**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)**

**Paseo Carlos III, nº 9**

**11003 Cádiz (Cádiz) ES**

72 Inventor/es:

**BOLIVAR PÉREZ, Jorge;**

**CABRERA REVUELTA, Gema;**

**CANTERO MORENO, Domingo;**

**DE LA CALLE SIERRA, María Elena;**

**VALLE GALLARDO, Antonio y**

**LINARES PINEDA, Teresa**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE D-DIBOA PRODUCIDO BIOTECNOLÓGICAMENTE**

57 Resumen:

Procedimiento para la purificación de D-DIBOA producido biotecnológicamente. La aplicación de los compuestos alelopáticos en la agricultura representa una atractiva alternativa a los herbicidas sintéticos no biodegradables. La presente invención establece un proceso de purificación del compuesto de origen alelopático D-DIBOA producido biotecnológicamente mediante el uso de la bacteria *E. coli* como biocatalizador celular. Esta forma de producción evita el uso de procedimientos dañinos con el medio ambiente, pero el D-DIBOA así producido no puede ser aplicado directamente, ya que se encuentra diluido en el medio de cultivo (medio biotransformado). En el proceso propuesto aquí, se parte del medio de cultivo biotransformado para obtener D-DIBOA en forma sólida y elevada pureza utilizando para ello procedimientos cromatográficos sencillos automatizables, y que no generan residuos tóxicos. El escalamiento de este proceso a nivel industrial permitiría por tanto la producción de D-DIBOA de alta pureza utilizando procedimientos acordes con la química verde.

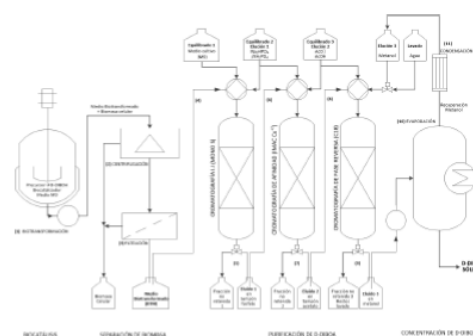


Figura 2.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 952 586 B2

## DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE D-DIBOA PRODUCIDO BIOTECNOLÓGICAMENTE

5

### SECTOR DE LA TÉCNICA

El área científica al que corresponde la invención es la producción biotecnológica de compuestos químicos utilizando procedimientos acordes con la “Química Verde”. En concreto, se establece un proceso de purificación del compuesto D-DIBOA producido biotecnológicamente a partir de su precursor químico mediante el uso de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) como biocatalizador celular. El uso de este compuesto como herbicida constituye una alternativa ambientalmente amigable frente a los herbicidas convencionales, ya que es un compuesto de origen alelopático con mayor degradabilidad y que, por tanto, no se acumularía en la biosfera. La producción biotecnológica de este compuesto utilizando *E. coli* evita además el uso de compuestos y procedimientos dañinos con el medio ambiente durante su síntesis. Sin embargo, el D-DIBOA producido de esta forma debe ser purificado antes de ser utilizado en agricultura o en cualquier otra aplicación, ya que se encuentra disuelto en el medio de cultivo, es decir junto con las células bacterianas, restos del precursor de la síntesis de D-DIBOA que no haya sido biotransformado, compuestos característicos del medio de cultivo y compuestos orgánicos procedentes del metabolismo liberados por las células durante la biocatálisis. En el proceso objeto de esta invención se parte de este medio de cultivo bacteriano para obtener D-DIBOA en forma sólida con un alto grado de pureza utilizando para ello procedimientos en los que se aplican soluciones salinas sencillas y solamente un disolvente orgánico que puede ser recuperado y reutilizado en el proceso de purificación. El escalamiento de este proceso a nivel industrial permitiría por tanto la producción de D-DIBOA de alta pureza utilizando procedimientos acordes con la Química Verde.

30

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la industria química se persigue en la actualidad la sustitución de productos peligrosos por otros más seguros para la salud pública y el medio ambiente a través del desarrollo de procesos de síntesis limpios desde el punto de vista ambiental.

35

Los herbicidas son una herramienta muy importante en agricultura que permiten aumentar la producción mediante la eliminación de las malas hierbas. La producción de herbicidas es un importante negocio que supuso más de la mitad de las ventas de pesticidas en 2019. Sin embargo, los herbicidas clásicos, por ejemplo, el glifosato, han  
5 dado lugar a graves problemas medioambientales, ya que, al no ser biodegradables, se acumulan en la biosfera. Es por esto que desde la Unión Europea se está promoviendo la puesta en el mercado de nuevos pesticidas que contengan compuestos biológicamente activos menos dañinos con el medio ambiente [1].

10 Una de las alternativas más interesantes en este contexto es el uso de herbicidas de origen alelopático. La alelopatía es un fenómeno en el que algunas plantas producen ciertos metabolitos secundarios (denominados compuestos alelopáticos o aleloquímicos) que liberan a su entorno como una forma de defensa, ya que afectan al crecimiento de otras plantas competidoras. Estos metabolitos secundarios son  
15 biodegradables y, por tanto, su aplicación en agricultura representa una atractiva alternativa a los herbicidas sintéticos no biodegradables [2].

El ácido benzohidroxámico DIBOA es uno de estos compuestos alelopáticos que destaca por sus propiedades herbicidas, fungicidas e insecticidas, aunque su baja  
20 producción natural hace muy difícil su purificación y producción a nivel industrial. No obstante, su análogo sintético, D-DIBOA, se ha logrado sintetizar mediante un proceso químico en el que se diferencian 2 etapas (Fig. 1) [3]; la primera es una reacción en la que el 2-nitrofenol (material de partida) sufre una sustitución nucleofílica dando lugar al compuesto intermedio, 2-(2'nitrofenoxi)acetato de etilo. Esta reacción ha sido  
25 optimizada para alcanzar rendimiento del 99%. Sin embargo, la segunda etapa, que implica la reducción del grupo nitro del 2-(2'nitrofenoxi)acetato de etilo (denominado de aquí en adelante como precursor) seguido de una posterior ciclación de la cadena lateral para la producción de D-DIBOA, presenta una serie de desventajas para el escalado del proceso, ya que requiere un costoso catalizador Pd/C, así como el uso  
30 de productos químicos peligrosos como el dioxano y el NaBH<sub>4</sub>, además de ser una reacción exotérmica con una liberación de hidrógeno que la hace potencialmente peligrosa.

Durante los últimos años se ha desarrollado una metodología para la producción de D-  
35 DIBOA de manera segura, escalable y con elevados rendimientos mediante la

combinación de la primera etapa de la reacción química (producción del precursor) seguido de una reacción biológica o biotransformación utilizando cepas de *E. coli* modificadas genéticamente que actúan como biocatalizadores celulares, sustituyendo así la segunda etapa de reacción química, evitando los inconvenientes asociados a ella. Esta biotransformación se consigue añadiendo el sustrato de la reacción (precursor) al medio de cultivo bacteriano. Éste es asimilado por la bacteria, donde se realiza la catálisis enzimática y el producto de la reacción es entonces exportado al medio de cultivo. La capacidad catalítica de estas bacterias se debe a la sobreexpresión de una enzima nitrorreductasa (NfsB ó NfsA) autóloga que es capaz de realizar la reducción del grupo nitro del precursor, lo que da lugar a la formación del producto deseado (D-DIBOA) [4]. Este proceso fue mejorado por los inventores mediante el uso de una cepa modificada genéticamente, en la que el fondo genético de la bacteria fue optimizado para la producción de D-DIBOA. Además, la biocatálisis se llevó a cabo en un medio de cultivo definido y unas condiciones específicas de operación que permitieron alcanzar concentraciones en el medio de cultivo de hasta 0,91 g/L de D-DIBOA con rendimientos próximos al 100 % [5]. La cepa diseñada está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 9760; 14/11/2018) y el proceso optimizado para la producción biotecnológica de D-DIBOA ha sido registrado en la Oficina Española de Patentes y Marcas (P201831274(ES); 21/12/2018) y cuenta con el título de concesión (ES2772598; 05/04/2021). Adicionalmente, se ha solicitado su extensión internacional (PCT/ES2019/000074; 21/12/2018), siendo publicada en junio 2020 (WO2020/178117).

No obstante, sigue existiendo un importante obstáculo que impide la producción biotecnológica de D-DIBOA a escala industrial: el aleloquímico producido se encuentra disuelto en el medio de cultivo junto con el precursor no biotransformado, las células que actúan como biocatalizador del proceso, y restos celulares, por lo que este producto no puede aplicarse directamente a cultivos agrícolas o en cualquier otra aplicación. La producción biotecnológica de D-DIBOA implica por tanto superar el reto de su purificación de una forma rápida y poco costosa a partir del medio de cultivo biotransformado. Esta es una etapa fundamental para explorar la viabilidad de la explotación comercial de los procesos biotecnológicos, ya que las operaciones de separación y purificación, también denominadas *downstream processes*, son a menudo la parte más costosa de un bioproceso. Adicionalmente, en el ámbito de la química verde se persigue no sólo la producción de productos biodegradables, sino

también la potenciación de los procesos que no empleen o minimicen el uso de compuestos tóxicos en las operaciones de síntesis, separación y purificación del producto de interés.

- 5 La producción industrial de D-DIBOA requiere por tanto la optimización de un proceso que permita separar y purificar grandes cantidades de D-DIBOA producido biotecnológicamente, por lo que no se pueden aplicar procedimientos anteriormente descritos, ya que se utilizan grandes volúmenes de disolventes orgánicos en procesos en una serie de procesos laboriosos que impiden el escalamiento a nivel industrial.
- 10 En concreto, en el protocolo descrito por Macías y col. [3] para la purificación de D-DIBOA, tras la segunda etapa de la síntesis química, se utiliza un primer paso de filtración a vacío a través de tierra de diatomeas para eliminar el catalizador de la reacción. Tras un tratamiento con HCl para mantener las condiciones ácidas, la mezcla se somete a una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (AcOEt) para extraer la
- 15 fase orgánica (proceso repetido 3 veces), secándose posteriormente mediante presión reducida con sulfato de sodio anhidro. Finalmente, el D-DIBOA es purificado por cromatografía en columna de sílice, usando como solventes AcOEt:hexano. En base a este protocolo, Valle y col. [6] lograron obtener D-DIBOA puro a partir de una biotransformación utilizando la cepa JM109 de *E. coli* como biocatalizador en el medio
- 20 de cultivo Luria-Bertani (LB) y utilizando el precursor como sustrato de la reacción. Para ello, en un primer paso la biomasa fue separada del medio de cultivo mediante centrifugación, y se realizó un lavado del pellet (biomasa) con agua destilada, centrifugando de nuevo. El sobrenadante de las dos centrifugaciones se unificó y se sometió a un proceso de extracción líquido-líquido usando AcOEt. En este caso, fueron
- 25 necesarias hasta 10 extracciones con AcOEt para tener toda la mezcla en la fase orgánica. El disolvente orgánico fue eliminado con un rotavapor y el extracto resultante se separó en cuatro fracciones con hexano:AcOEt de 1:4 a 1:1 (v/v) y una elución final con metanol mediante cromatografía con columna de sílice. La presencia de precursor y/o D-DIBOA en las fracciones eluidas se determinó mediante cromatografía de capa
- 30 fina (TLC) y, posteriormente, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de fase reversa empleando una columna C18, la cual retiene precursor y producto, que emplea como fase móvil un gradiente Agua:1% ácido acético - metanol:1% ácido acético. Al comparar los espectros UV/Vis y el tiempo de retención, se detectó que únicamente una de las cuatro fracciones contenía D-DIBOA. Además, la fracción en la
- 35 que se encontraba el compuesto contenía otras impurezas, por lo que esta fracción

fue sometida a otra cromatografía, en este caso por una columna semipreparativa en sílica gel usando la mezcla de hexano/EtOAc (6:4, v/v), para obtener finalmente D-DIBOA puro siendo confirmada la estructura del compuesto mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [6]. Este proceso implica un elevado consumo de solventes orgánicos, difícilmente reutilizables, además de ser un procedimiento laborioso y que requiere elevados tiempos de operación por lo que no es posible escalarlo para la purificación de grandes volúmenes (del orden de litros).

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La invención propuesta consiste en un procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA producido biotecnológicamente a partir de su precursor químico mediante el uso de la bacteria *Escherichia coli* (E. coli) como biocatalizador celular, basado en procedimientos cromatográficos sencillos, automatizables y que no generan residuos tóxicos.

Los problemas que plantea la purificación del D-DIBOA producido biotecnológicamente y que resuelve la presente invención son tres:

1- La purificación de D-DIBOA a gran escala mediante el uso de tres etapas cromatográficas sin necesidad de extracciones orgánicas, que conllevan un excesivo gasto de solventes orgánicos, ni uso de HPLC. En la presente invención se aplica un proceso mediante el cual el medio libre de células se aplica directamente a una serie de tres etapas cromatográficas fácilmente escalables ya que se realizan sin necesidad de extracción orgánica y utilizando eluciones isocráticas sin requerir el uso de HPLC.

2- El uso de compuestos no tóxicos o nocivos en el proceso de purificación, y la no generación de desechos tóxicos de acuerdo con los principios de la química verde. En esta invención, el proceso de purificación utiliza principalmente soluciones salinas no tóxicas (medio mínimo salino, soluciones de fosfato de sodio y potasio, y de acetato sódico). El metanol (u otro alcohol como el etanol) es utilizado en la etapa final de purificación que requiere los menores volúmenes de trabajo y puede ser recuperado mediante evaporación/condensación para reutilizarse de nuevo en el proceso de purificación, por lo que no se genera como desecho.

3. El diseño de un procedimiento de operación automatizable y fácilmente escalable. Las operaciones de separación descritas en la invención pueden ser implementadas de forma automática, de modo que se puede obtener D-DIBOA sólido a partir del medio

de biotransformación (una vez eliminadas las células), utilizando sencillos métodos isocráticos de elución. La sencillez de las operaciones propuestas permite su interconexión y automatización, lo cual simplifica el proceso completo, así como su posterior escalado.

5

#### Metodología propuesta

La producción industrial de D-DIBOA requiere la optimización de un proceso que permita separar y purificar grandes cantidades de D-DIBOA producido biotecnológicamente, para lo que los inventores han estudiado y seleccionado columnas de cromatografía dispuestas en serie en sustitución del HPLC. Para ello, se estableció, en primer lugar, como estrategia definir una cromatografía de afinidad que permitiera separar precursor y D-DIBOA, dos moléculas presentes en el medio de cultivo y que, por su semejante estructura y polaridad, son las más difíciles de separar en el medio M9 biotransformado. Por otra parte, es a menudo necesario utilizar varios principios cromatográficos para obtener un alto grado de pureza en el compuesto de interés. En esta invención se utilizan dos cromatografías adicionales a la de afinidad: una etapa previa de cromatografía de intercambio iónico, en la que se aplica directamente el medio M9 biotransformado libre de células y que permite una purificación parcial de D-DIBOA y el cambio de composición de la matriz acuosa en la que está disuelto este compuesto. Esta etapa es fundamental para la aplicación de la cromatografía de afinidad mediante la que se descarta el precursor y se retiene D-DIBOA. Por último, las sales y otros compuestos de carácter polar son eliminados en una tercera cromatografía de fase reversa que además concentra la muestra, obteniéndose una solución de D-DIBOA en metanol. La evaporación del metanol permite obtener una forma sólida de D-DIBOA con alto grado de pureza. El metanol evaporado puede recuperarse mediante condensación, lo que permite su reutilización en el proceso de purificación, evitando el único solvente tóxico utilizado en el proceso. Para definir este proceso se realizaron estudios con disoluciones abióticas consistentes en soluciones equimolares de precursor y D-DIBOA en medio mínimo M9, que es el empleado por los inventores como medio de cultivo en la biotransformación, y eluciones isocráticas con distintas soluciones. El objetivo de estos primeros ensayos fue determinar la idoneidad de distintas resinas cromatográficas para separar el D-DIBOA del precursor, el cual, por su semejanza estructural, podía ser el mayor interferente en el proceso de separación. Una vez comprobada la eficacia del principio

cromatográfico, se aplicaron muestras de biotransformaciones reales (medio biotransformado M9). En estos ensayos se utilizaron los tres principios cromatográficos de separación comentados anteriormente:

- 5     1. Cromatografía de afinidad: La cromatografía de afinidad es uno de los métodos más  
resolutivos en los procesos de separación. En este tipo de cromatografía la resina o  
fase estacionaria contiene un ligando al que la molécula de interés se une de forma  
específica, descartándose así otras moléculas semejantes. En el caso del D-DIBOA,  
los inventores razonaron que la capacidad que tienen ciertos iones metálicos por  
10   conformar compuestos coordinados con los ácidos benzohidroxámicos, como el D-  
DIBOA, podría ser utilizada como principio de unión por especificidad. Este tipo de  
complejos se forman gracias al grupo hidroxalamina ( $-\text{NH}_2\text{OH}$ ) presente en D-DIBOA  
pero del que carece el precursor, por lo que se presumía que este último no sería  
retenido. Para comprobar esta hipótesis se aplicó la Cromatografía de Afinidad con  
15   Metales Inmovilizados (IMAC de sus iniciales en inglés). Este tipo de resinas consiste  
una matriz de sefarosa unida a ácido iminodiacético que permite cargar la resina con  
distintos iones metálicos. Para comprobar qué iones metálicos eran los más  
apropiados para una posible cromatografía de afinidad, se prepararon 5 columnas  
cromatográficas con los siguientes iones: Cu(II), Ni(II), Fe(III), Zn(II) y Co(II). De todas  
20   estas fases estacionarias sólo la columna de Cu(II) resultó ser válida para la  
purificación de D-DIBOA cuando se utilizó la solución abiótica, ya que fue capaz de  
retener D-DIBOA, pero no el precursor. El D-DIBOA retenido en la columna  
cromatográfica puede ser eluido con distintos disolventes orgánicos (por ejemplo,  
isopropanol, metanol o etanol) o con soluciones salinas a pH ácido (por ejemplo 100  
25   mM fosfato sodio/potasio, pH 4,5; 100 mM glicina, pH 2,5) aunque se eligió una  
solución 100 mM acetato/acético por su menor coste. Sin embargo, se comprobó que  
cuando se utilizaba como muestra el D-DIBOA producido en la biotransformación, el  
compuesto de interés no se retenía con la misma afinidad que en los ensayos  
utilizando medio M9 no biotransformado. Esto es debido a que el medio M9 sufre  
30   cambios químicos en el proceso de biotransformación, el más importante de los cuales  
era la disminución del pH (disminución de 7 a 5,5), aunque también se producen otros  
cambios debido al consumo de determinados componentes por parte de las células  
que actúan como biocatalizadores del proceso. Análisis adicionales, permitieron  
demostrar que una solución de D-DIBOA en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM (pH 8) era  
35   suficiente para que la molécula quedase retenida en la fase estacionaria. Se



seleccionó, por tanto, la cromatografía de afinidad con Cu(II) inmovilizado (IMAC-Cu<sup>2+</sup>) para el proceso de purificación de D-DIBOA.

2. Cromatografía de intercambio iónico. En este caso se ensayaron dos tipos de resinas, una de intercambio aniónico (Mono Q) y otra de intercambio catiónico (Mono S). En este caso se seleccionó la columna Mono S, ya que fue la única capaz de retener el producto de interés tanto en el caso de la solución abiótica de precursor y D-DIBOA en medio M9, como utilizando un medio biotransformado. No obstante, esta resina también retiene, aunque con menor afinidad, al precursor y no fue posible separar completamente ambos compuestos utilizando una elución isocrática. No obstante, esta cromatografía permite separar otros compuestos presentes en el medio de cultivo y, lo que es muy importante para el proceso de purificación, el compuesto D-DIBOA puede ser eludido utilizando una solución Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM (pH 8), dando lugar a una solución de D-DIBOA que es apropiada para la unión específica de este compuesto en la cromatografía de afinidad IMAC-Cu<sup>2+</sup>.

3. Cromatografía de fase reversa (C18): En esta cromatografía se utilizó una resina C18 que permite eliminar sales y compuestos polares y concentrar el D-DIBOA en un menor volumen, aunque no se pueden separar precursor y D-DIBOA utilizando eluciones isocráticas. Esta resina mostró capacidad para retener ambos compuestos cuando las muestras cargadas eran soluciones abióticas en medio M9, medio biotransformado o incluso otras soluciones salinas. En este caso, la elución se realiza con disolventes de compuestos orgánicos como los alcoholes. Concretamente, se eligió el metanol por su menor coste. La elución con este tipo de disolventes apolares tiene la ventaja de que se pueden eliminar fácilmente por evaporación, quedando el soluto como sólido.

Una vez seleccionadas las resinas más apropiadas según los principios cromatográficos antes indicados, se estableció una secuencia de operaciones que permitiese purificar D-DIBOA producido mediante biocatálisis celular en un biorreactor (Medio biotransformado + biocatalizador celular o biomasa). Para ello, fue necesario establecer operaciones complementarias a las cromatografías seleccionadas y establecer una secuencia adecuada entre ellas que permitiesen una purificación del D-DIBOA con el mínimo de intervención manual, utilizando procesos de elución sencillos, evitando la producción de desechos tóxicos, constituyendo en su conjunto

un grupo de operaciones sencillas y fáciles de interconectar en vistas a su futuro escalamiento.

5 El proceso de purificación de D-DIBOA establecido en esta invención (Fig. 2) es el siguiente:

10 A) Eliminación de la biomasa. En el procedimiento de producción biotecnológica de D-DIBOA previamente patentado se obtiene como producto final una mezcla de D-DIBOA, precursor no biotransformado, medio M9 modificado por la acción de la biomasa y biocatalizador celular (cepa bacteriana que actúa como catalizador de la reacción de síntesis de D-DIBOA a partir del precursor). La primera etapa del procedimiento consiste en la eliminación de la biomasa mediante centrifugación en rotores convencionales, de flujo continuo o mediante centrifugación tangencial. El medio libre de células es posteriormente filtrado con filtros de tamaño de poro menor  
15 de 0,45  $\mu\text{m}$  para eliminar las células no descartadas en el proceso anterior, ya que el tamaño de las células a eliminar es mayor o igual a 0,5  $\mu\text{m}$ . Este medio (medio biotransformado libre de células) es la solución que se aplica a la etapa de purificación cromatográfica.

20 B) Purificación cromatográfica de D-DIBOA. Se establecen 3 etapas cromatográficas sucesivas en las que en la etapa 1 se aplica el medio biotransformado y en las etapas 2 y 3 se utiliza directamente la fracción eluida de la etapa anterior que contiene D-DIBOA. La elución de la etapa 3 consiste en una solución concentrada de D-DIBOA en metanol de elevada pureza. El sistema de circulación e impulsión de líquidos y la  
25 velocidad de los flujos depende de la escala de trabajo. Las etapas cromatográficas son las siguientes.

1. Cromatografía de intercambio catiónico (Mono S). El equilibrado de la columna se realiza utilizando medio M9 (al menos 3 volúmenes de resina), a continuación, se carga directamente el medio biotransformado libre de células hasta la saturación de la fase  
30 estacionaria con D-DIBOA y se emplea como eluyente, una solución 100 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8).

2. Cromatografía de Afinidad con Cu(II) inmovilizado (IMAC-Cu<sup>2+</sup>). El equilibrado se realiza con una solución 100 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 8 (al menos 3 volúmenes  
35 de resina). La solución a procesar consiste en la fracción eluida de la columna Mono

Se en la etapa 1 con la que se carga la columna IMAC-Cu<sup>2+</sup> hasta saturación de la fase estacionaria con D-DIBOA. La elución se realiza con una solución salina tamponada con pH menor o igual a 6, por ejemplo, 100 mM de acetato sódico/acético, pH 3,5.

- 5 3. Cromatografía de fase reversa. El equilibrado de la columna se realiza con una solución 100 mM de acetato sódico/acético, pH 3,5 (al menos 3 volúmenes de resina). La solución a purificar consiste en la fracción eluida de la columna IMAC-Cu<sup>2+</sup> con la que se carga una columna con una fase estacionaria C18 hasta saturación con D-DIBOA. A continuación, se lava la fase estacionaria con al menos 3 volúmenes de  
10 agua destilada. El eluyente es metanol u otro alcohol puro. El producto final de esta etapa es una solución concentrada de D-DIBOA con un alto grado de pureza.

- C) Obtención de D-DIBOA sólido. Para obtener D-DIBOA sólido con alto grado de pureza se elimina el metanol por evaporación. Éste se recupera por condensación para  
15 ser reutilizado en la etapa 3 de la purificación cromatográfica.

Las ventajas que aporta esta secuencia de operaciones respecto al Estado de la Técnica Actual en la producción de D-DIBOA son los siguientes:

- 20 • Es una secuencia elaborada y optimizada por el equipo de inventores, es novedosa, ya que al no existir hasta el momento un proceso biotecnológico para la producción de D-DIBOA tampoco, obviamente, existe un proceso de separación-purificación de esta biomolécula del medio en el que es producido.
- El procedimiento objeto de invención permite la purificación de forma selectiva del  
25 producto de interés, con un rendimiento elevado y una pureza máxima, obteniéndose una forma sólida adecuada para su conservación y almacenamiento.
- Las operaciones de cromatografía propuestas tienen la ventaja de ser fáciles de operar al utilizar soluciones salinas no complejas junto con procesos de elución isocráticos fácilmente escalables con equipos de cromatografía industriales.
- 30 • El único disolvente orgánico utilizado en la etapa cromatográfica 3 es la que menos volumen requiere y, adicionalmente, puede ser recuperado por evaporación y condensación para ser reutilizado.
- El volumen de medio a tratar va disminuyendo a lo largo del proceso, lo cual resulta muy favorable antes de aplicar la última etapa de concentración por evaporación a  
35 vacío ya que es la que implica mayor energía, lo cual además influye beneficiosamente

en el posterior escalamiento de los equipos.

• Las operaciones propuestas son fácilmente escalables y automatizables, por lo que su disposición en serie podría simplificar técnicamente la operación del proceso global, así como economizar los costes de energía y operación abaratando el coste total de la obtención de D-DIBOA.

• El esquema de purificación es potencialmente aplicable a análogos químicos del D-DIBOA como por ejemplo sus derivados clorados u otros ácidos benzohidroxámicos producidos mediante procesos biotecnológicos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Esquema de la reacción de síntesis química de D-DIBOA.

Figura 2.- Esquema de los distintos procesos para la purificación de D-DIBOA producido biotecnológicamente.

## REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

A continuación, se detalla un ejemplo a escala de laboratorio del esquema propuesto realizado por los inventores por triplicado, cuyos resultados se muestran en la tabla 1:

### A) Eliminación de la biomasa

1. Centrifugación a 6.000 x g durante 10 minutos de 450 mL procedentes de un medio biotransformado que contenía D-DIBOA y restos de precursor sin reaccionar y producidos según el procedimiento descrito en la patente E2772598. El pellet de bacterias fue descartado y se conservó el líquido sobrenadante.

2. Un volumen de 400 mL del líquido sobrenadante de la etapa anterior fue filtrado a vacío a través de una membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ . La solución filtrada (medio

biotransformado abiótico) fue utilizada en la etapa posterior de purificación mediante cromatografía. La concentración de D-DIBOA en esta muestra fue  $3,16 \pm 0,078$  mM y la de precursor (no biotransformado) fue  $1,23 \pm 0,080$  mM.

## 5 B) Purificación cromatográfica

Para la impulsión de líquidos en la etapa cromatográfica se utilizaron bombas peristálticas que permiten seleccionar diferentes velocidades de flujo. Se recogieron fracciones de 2 mL para analizar de manera cualitativa la presencia de D-DIBOA mediante un rápido método espectrofotométrico desarrollado por los inventores [7].

10 Posteriormente, con el objetivo de calcular los rendimientos de cada cromatografía, las fracciones en las que se detectó D-DIBOA fueron unificadas para cuantificar, mediante HPLC, las concentraciones de D-DIBOA y de precursor.

1. Cromatografía Mono S. Un volumen de 50 mL de resina Mono S empaquetado en  
15 una columna de 2,5 x 10 cm fue equilibrado con 150 mL de Medio Mínimo M9 cuya composición es la misma a la empleada como medio de cultivo en la biotransformación. Una vez equilibrada la columna, se cargaron 400 mL de medio biotransformado libre de células y, a continuación, se eluyó con una solución  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM. La velocidad de flujo en esta etapa fue 4 mL/min. El  
20 volumen total de las fracciones que contenían D-DIBOA se agruparon, alcanzando aproximadamente 128 mL, lo que supone una reducción del 68% de volumen de solución a tratar, siendo la concentración de D-DIBOA  $9,78 \pm 0,666$  mM y de precursor  $0,70 \pm 0,355$  mM. Esta solución constituye la corriente de entrada a la etapa 2 de cromatografía.

25

2. Cromatografía de afinidad IMAC- $\text{Cu}^{2+}$ . Un volumen de 50 mL de resina IMAC- $\text{Cu}^{2+}$  empaquetado en una columna de 2,5 x 10 cm fue equilibrado con 150 mL solución  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M pH 8. El volumen eluido de la columna mono S (128 mL) en la etapa cromatográfica 1 fue entonces cargado y eluido con una solución de acetato  
30 sódico/acetato 100 mM pH 3,5. En este caso, para evitar sobrepresión en la resina de sefarosa, el flujo se disminuyó a 3 mL/min. En esta etapa se consiguió eliminar el precursor de la solución, aunque el volumen final de la elución fue de 146 mL, aumentando un 14% el volumen de carga de la columna. La concentración de D-DIBOA en el total de volumen eluido fue  $8,70 \pm 0,700$  mM.

35

3. Cromatografía de fase reversa C18. Un volumen de 20 mL de resina C18 empaquetado en una columna de 5 x 10 cm fue equilibrada con 60 mL de una solución de acetato sódico/acetato 100 mM. El volumen eluido de la columna IMAC-Cu<sup>2+</sup> (146 mL) en la etapa cromatográfica 2 fue entonces cargada, lavada con agua destilada y fue posteriormente eluida con metanol 100 %. El volumen del eluido en esta última etapa (50 mL) se reduce un 66% respecto al alimentado a la columna, facilitando la evaporación posterior. La concentración de D-DIBOA aumenta hasta  $25,79 \pm 6,840$  mM.

#### 10 C) Obtención de D-DIBOA sólido

1. El volumen eluido en la etapa cromatográfica 3 se sometió a evaporación a vacío, mediante el uso de un rotavapor, para eliminar todo el disolvente. El producto final puede conservarse como sólido o resuspendido en el volumen deseado de disolvente elegido. La estructura química del sólido obtenido fue analizada mediante RMN, confirmándose que correspondía a la de D-DIBOA.

2. El metanol pudo ser recuperado por condensación.

En la siguiente tabla se resumen los valores obtenidos para volúmenes, concentración de precursor y D-DIBOA, rendimiento y pureza en cada etapa:

	Muestra	Eluido Mono S	Eluido IMAC-Cu <sup>2+</sup>	Eluido C18
D-DIBOA (mM)	$3,16 \pm 0,078$	$9,78 \pm 0,666$	$8,70 \pm 0,700$	$25,79 \pm 6,840$
Precursor (mM)	$1,23 \pm 0,080$	$0,70 \pm 0,355$	No detectado	No detectado
Vol. muestra (mL)	$450 \pm 0,000$	$400 \pm 0,000$	$128 \pm 3,000$	$146 \pm 16,823$
Vol. eluido (mL)		$128 \pm 3,000$	$146 \pm 16,823$	$50 \pm 13,279$
Rendimiento (%)		$99 \pm 2,398$	$99 \pm 0,669$	$99 \pm 0,553$
Pureza D-DIBOA* (%)	$71 \pm 1,041$	$81 \pm 1,258$	$74 \pm 2,000$	$100 \pm 0,104$

(\*) La pureza fue estimada en base a las áreas de los picos detectados en un análisis HPLC con una columna C18.

Este procedimiento es fácilmente escalable mediante la utilización de equipos industriales que presentan sistemas de bombas impulsoras de líquidos y columnas en serie con detectores que permiten la automatización del proceso objeto de esta patente. Es, por tanto, posible aplicar este proceso a la purificación a nivel industrial del compuesto de D-DIBOA producido biotecnológicamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- [1] European Commision 'EUR-Lex - 52020DC0381 - EN - EUR-Lex'. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52020DC0381>. [Accessed: 29-Nov-5 2021].
- [2] A. Scavo and G. Mauromicale, 'Crop Allelopathy for Sustainable Weed Management in Agroecosystems: Knowing the Present with a View to the Future', *Agron.* 2021, Vol. 11, Page 2104, vol. 11, no. 11, p. 2104, Oct. 2021.
- [3] F. A. Macías, J. M. De Siqueira, N. Chinchilla, D. Marín, R. M. Varela, and J. M. 10 G. Molinillo, 'New herbicide models from benzoxazinones: Aromatic ring functionalization effects', *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 26, pp. 9843–9851, 2006.
- [4] A. Valle, S. Le Borgne, J. Bolívar, G. Cabrera, and D. Cantero, 'Study of the role played by NfsA, NfsB nitroreductase and NemA flavin reductase from *Escherichia coli* in the conversion of ethyl 2-(2'- nitrophenoxy)acetate to 4-hydroxy-(2H)-1,4- 15 benzoxazin-3(4H)-one (D-DIBOA), a benzohydroxamic acid with interesting biological properties', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 94, no. 1, pp. 163–171, 2012.
- [5] M. E. de la Calle, G. Cabrera, D. Cantero, A. Valle, and J. Bolivar, 'A genetically engineered *Escherichia coli* strain overexpressing the nitroreductase NfsB is capable of producing the herbicide D-DIBOA with 100% molar yield', *Microb. Cell Fact.*, vol. 18, 20 no. 1, p. 86, Dec. 2019.
- [6] A. Valle, G. Cabrera, J. M. G. Molinillo, J. M. Gómez, F. A. Macías, and D. Cantero, 'Biotransformation of ethyl 2-(2'-nitrophenoxy)acetate to benzohydroxamic acid (D-DIBOA) by *Escherichia coli*', *Process Biochem.*, vol. 46, no. 1, pp. 358–364, 2011.
- [7] G. Cabrera, T. Linares, M. E. de la Calle, D. Cantero, A. Valle, and J. Bolivar, 25 'Optimization of the Biocatalysis for D-DIBOA Synthesis Using a Quick and Sensitive New Spectrophotometric Quantification Method', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 22, p. 8523, Nov. 2020.

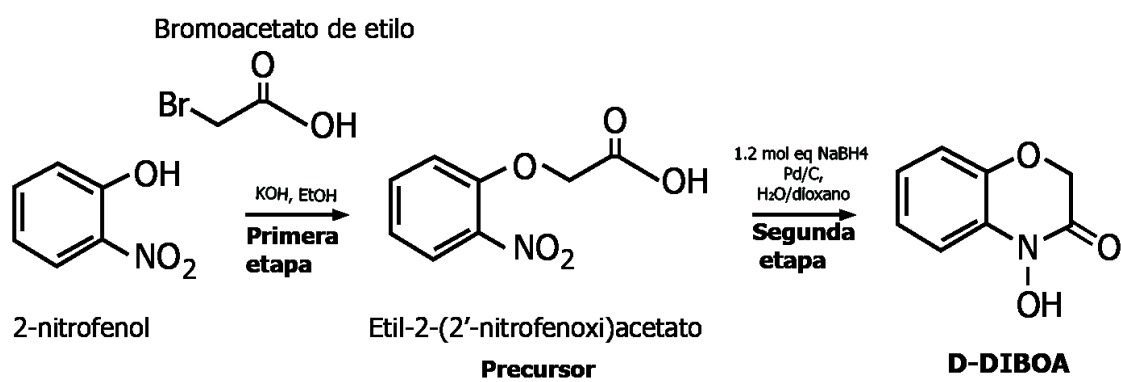
## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA producido biotecnológicamente a partir de su precursor químico mediante el uso de la bacteria  
5 *Escherichia coli* (*E. coli*) como biocatalizador celular, que comprende tres etapas cromatográficas sucesivas:
  - 1) Cromatografía de intercambio catiónico (Mono S),
  - 2) Cromatografía de Afinidad con Cu(II) inmovilizado (IMAC-Cu<sup>2+</sup>), y
  - 3) Cromatografía de fase reversa C18,10 en el que en la etapa 1 se aplica el medio biotransformado libre de células y en las etapas 2 y 3 se utiliza directamente la fracción eluida de la etapa anterior que contiene D-DIBOA.
2. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA, según reivindicación 1,  
15 caracterizado por que el equilibrado de la columna cromatográfica de la etapa 1 se realiza utilizando un medio de cultivo mínimo sin inocular y, a continuación, se carga directamente el medio biotransformado libre de células hasta la saturación de la fase estacionaria con D-DIBOA.
- 20 3. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA, según reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que el eluyente empleado en la etapa 1 consiste en una solución 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8).
- 25 4. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA, según reivindicación 1, caracterizado por que el equilibrado de la columna cromatográfica de la etapa 2 se realiza con una solución 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8, como paso previo al paso del volumen eluido de la etapa 1.
- 30 5. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA, según reivindicaciones 1 y 4, caracterizado por que el eluyente empleado en la etapa 2 consiste en [una solución tamponada a un pH menor o igual a 6.
6. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA, según reivindicación 5 donde el eluyente empleado en la etapa 2 es una solución 100 mM de acetato  
35 sódico/acético, pH 3,5.



7. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA, según reivindicación 1 caracterizado por que el equilibrado de la columna cromatográfica de la etapa 3 se realiza con una solución 100 mM de acetato sódico/acético, pH 3,5.
- 5      8. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA, según reivindicaciones 1 y 7, caracterizado por que el eluyente empleado en la etapa 3 es metanol o etanol puro.
- 10     9. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA, según reivindicaciones anteriores, caracterizado por que para la obtención del D-DIBOA sólido se añade una etapa adicional de eliminación por evaporación del solvente de la fracción eluida de la etapa 3, el cual es reutilizado nuevamente en dicha etapa 3.
- 15     10. Procedimiento para la purificación del compuesto D-DIBOA, caracterizado porque la eliminación de la biomasa del compuesto D-DIBOA producido biotecnológicamente a partir de su precursor químico mediante el uso de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), se realiza en una etapa de centrifugación y/o filtración, previa a las etapas cromatográficas descritas en las reivindicaciones anteriores.

Figura 1



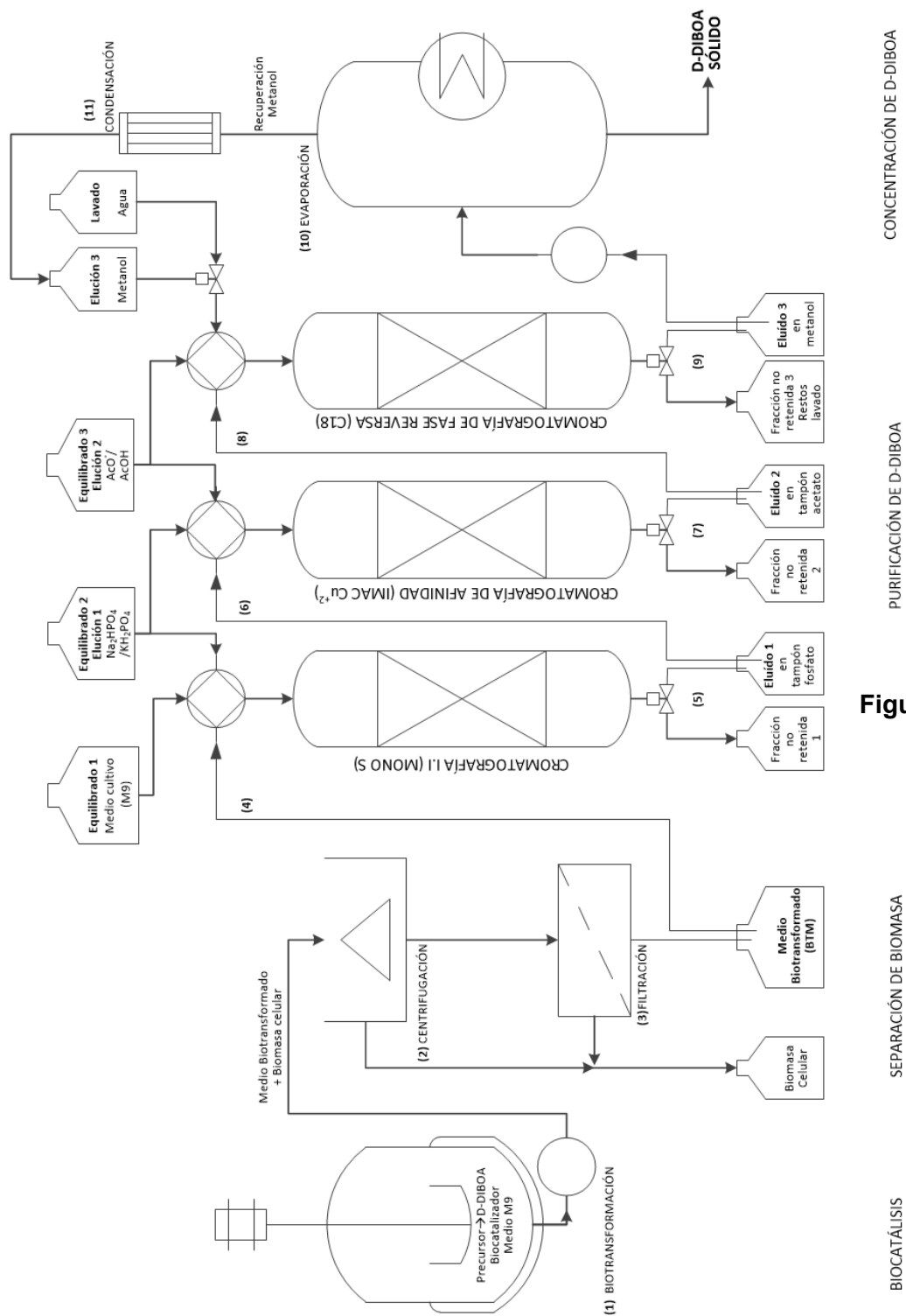


Figura 2.