

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 852**

21 Número de solicitud: 201230867

51 Int. Cl.:

C12P 13/00 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCÓN

B1

22 Fecha de presentación:

05.06.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.12.2013

Fecha de la concesión:

24.09.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

01.10.2014

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.0%)
Avda. Teniente Flomesta, 5
30003 Murcia (Murcia) ES

72 Inventor/es:

CÁNOVAS DÍAZ, Manuel;
ARENSE PARRA, Paula;
FOULQUIE MORENO, María;
CHARLIER, Daniel;
BERNAL SÁNCHEZ, Vicente y
IBORRA PASTOR, José Luis

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

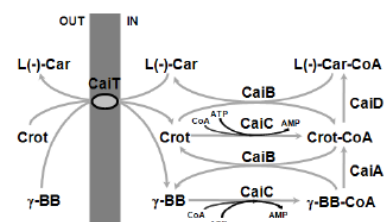
54 Título: **Producción de L(-)-carnitina mediante cepas de Escherichia coli modificadas genéticamente**

57 Resumen:

Procedimiento para la producción de L-carnitina a partir de crotonobetaina, sales o derivados de crotonobetaina y/o D-carnitina con *E. coli* modificada genéticamente mediante mutación insercional en ausencia de plásmidos, sin producción de γ -butirobetaína, caracterizado porque las modificaciones genéticas son al menos de una de las siguientes mutaciones:

- mutaciones para acelerar el flujo sobre el citrato,
- mutaciones para evitar la producción de γ -butirobetaína,
- mutaciones para incrementar la expresión del gen estructural (operon *cai*), mutaciones para incrementar la expresión del gen regulador (*caiF*) y evitar la represión por oxígeno.

Figura 1



DESCRIPCIÓN**PRODUCCIÓN DE L(-)-CARNITINA MEDIANTE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* MODIFICADAS GENÉTICAMENTE****Campo de aplicación.**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de L(-)-carnitina desde crotonobetaína, D(+)-carnitina y derivados, en un reactor donde las cepas modificadas genéticamente de modo insercional actúan como el biocatalizador de la reacción de hidratación.

Estado de la técnica.

La L(-)-carnitina es una sustancia ubicua que juega varios papeles en el metabolismo, especialmente en el transporte de los ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana interna mitocondrial.

10 La función de L(-)-carnitina en el metabolismo de las células eucariotas ha dado lugar a una serie de aplicaciones clínicas, por ejemplo, en el tratamiento de pacientes con síndromes de deficiencia de carnitina, en la profilaxis y terapia de varias enfermedades cardíacas, y en terapias de sustitución para pacientes de hemodiálisis. Además, la L(-)-carnitina se ha utilizado como aditivo en bebidas energéticas, o se ha añadido a los medios de fermentación para incrementar la tasa de crecimiento de levaduras y bacterias. La creciente
15 demanda del enantiómero biológicamente activo, L(-)-carnitina, para esto y otros propósitos, ha causado una amplia investigación sobre diferentes formas de sintetizar esta betaína en su forma ópticamente pura, ya que el racemato químicamente sintetizado no puede ser administrado debido a la inhibición de importantes enzimas, tales como las proteínas transportadoras de carnitina y la enzima carnitina acetiltransferasa.

20 Los procedimientos químicos más conocidos se basan en la resolución de la carnitina racémica o de otros precursores diastereoisómeros mediante los ácidos ópticamente activos (US 4,254,053), donde la D(+)-carnitina es un producto de desecho del proceso de resolución. Sin embargo, este problema se puede resolver mediante el uso de un amplio número de procedimientos biológicos para su producción a gran escala a partir de precursores aquirales de bajo coste (Jung et al., Synthesis of L-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. Adv Biochem Eng Biotechnol 50:21-44.1993).

25 Es especialmente interesante la hidratación estereoespecífica de la *trans*-crotonobetaina para dar L(-)-carnitina mediante el empleo de las cepas pertenecientes al género *Escherichia* (EP0320460). La ventaja de este método radica en que el precursor aquiral puede, incluso, obtenerse por deshidratación química a partir de compuestos sin valor comercial, tales como la D(+)-carnitina.

30 El metabolismo de L(-)-carnitina ha sido caracterizado y ampliamente estudiado debido a su papel como osmoprotector en *E. coli* y su importancia en la supervivencia al estrés. Por otro lado, en eucariotas, la L(-)-carnitina es esencial para el transporte de los ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana interna mitocondrial la eliminación selectiva de residuos acilo y la modulación de la relación acilCoA/CoASH. Además, en varios trabajos se destacan los efectos beneficiosos de la L(-)-carnitina como antioxidante y neuroprotector (Mescka et al., 2011. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in
35 maple syrup urine disease. Metabolic Brain Disease 26(1):21-28.).

El microorganismo *E. coli* tiene la capacidad de transformar crotonobetaína (D,L-carnitina deshidratada) en L(-)-carnitina. En la ruta de biotransformación participan varias enzimas del metabolismo de carnitina (coenzima A transferasa, CaiB, coenzima A ligasa, CaiC, enoil deshidratasa, CaiD), mientras que la reducción a γ -butirotobetaina es catalizada por una crotonobetaína reductasa (CaiA) y CaiB, además, los ésteres de CoA están involucrados como intermedios de estas reacciones. Los estudios genéticos realizados han permitido
40 conocer el metabolismo de *E. coli* O44K74 Existen dos operones divergentes, *caiTABCDE* y *fixABCX*, que se expresan de forma simultánea; el primero es responsable de las enzimas del metabolismo de carnitina y el segundo se requiere para el aporte de electrones necesarios para la reducción de carnitina como se muestra en la figura 1.

45 Existen diferentes sistemas para mejorar los procesos biotecnológicos con *E. coli*. La mayoría se basan en obtener una alta cantidad de biomasa para incrementar la producción de L(-)-carnitina. Así, las células en estado de reposo e inmovilizadas conducen a un incremento en la productividad de carnitina. De forma similar, la aplicación de fermentadores con recirculación celular y reactores de alta densidad celular mejoran dicha producción, debido a la presencia de suspensiones celulares en alta densidad y a la posibilidad de
50 obtener un sistema viable a escala industrial. Los trabajos posteriores publicados con cepas recombinantes de *E. coli* como biocatalizador (Cánovas et al., 2005. Factors affecting the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine by *Escherichia coli*. Biochemical Engineering Journal 26(2-3):145-154.), aportan un beneficio en el proceso de biotransformación debido a la sobreexpresión de ciertos genes.

Los trabajos realizados sobre las rutas metabólicas y su regulación han clarificado la relación existente entre el metabolismo central y el metabolismo secundario, lo que reafirma la importancia de la ingeniería metabólica y de cofactor.

5 La optimización del proceso de biotransformación mediante los sistemas de células libres en crecimiento en suspensión permite mantener unas condiciones estables para las actividades enzimáticas, la energía necesaria y la regeneración de cofactor, lo que evita el descenso de la capacidad de biotransformación. Todo ello permitiría conseguir un bioproceso sin necesidad de utilizar una alta cantidad de biomasa, ya sea con células en estado de reposo o con alta densidad celular por recirculación. Además, los rendimientos de producción de L(-)-carnitina obtenidos en reactores continuos con células libres e inmovilizadas son siempre 10 muy inferiores a los obtenidos en discontinuo y cuyos porcentajes no superaron el 40-45%. Por otra parte, los cultivos aerobios aportan mejores condiciones de crecimiento, a nivel de obtención de energía y en los procesos a mayor escala; sin embargo es conocido, que el metabolismo de carnitina se reprime por oxígeno a través de la proteína CaiF, que induce y controla la expresión del operon *cai* bajo la presencia de FNR .

15 Existe pues la necesidad de proporcionar un procedimiento que dé lugar a un mayor rendimiento en la producción de carnitina, mediante células de *E. coli* modificadas genéticamente en condiciones tanto anaerobias como aerobias.

Descripción de la invención.

20 Así pues en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de L-carnitina (en adelante, procedimiento de la presente invención) a partir de crotonobetaína, sales o derivados de crotonobetaína y/o D-carnitina con *E. coli* modificada genéticamente mediante mutación insercional en ausencia de plásmidos, sin producción de γ -butirobetaína, caracterizado porque las modificaciones genéticas son al menos de una de las siguientes mutaciones:

- mutaciones para acelerar el flujo sobre el citrato,
- mutaciones para evitar la producción de γ -butirobetaína,
- 25 – mutaciones para incrementar la expresión del gen estructural (operon *cai*), mutaciones para incrementar la expresión del gen regulador (*caiF*) y evitar la represión por oxígeno

30 En una realización más en particular de la presente invención, las mutaciones para acelerar el flujo sobre el citrato consisten en la delección de los genes que codifican la isocitrato liasa (*aceA*), isocitrato deshidrogenasa fosfatasa/quinasa (*aceK*) o la delección de ambos genes.

En una realización más en particular de la presente invención, las mutaciones para evitar la producción de γ -butirobetaína consisten en la delección del gen que codifica la crotonobetainil-CoA reductasa (gen *caiA*).

35 En una realización más en particular de la presente invención, las mutaciones para incrementar la expresión de genes reguladores consisten en incrementar la expresión del operón *cai*, incrementar la expresión del gen regulador *caiF* y evitar la represión por oxígeno, consisten en la sustitución de los promotores *pcai*, y *pcaiF* por los promotores p8 y p37 respectivamente.

En una realización más en particular, el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo con la cepa mutante *E.coli* BW 25113 $\Delta aceK \Delta caiA \Delta pcai \text{ } cai\text{-p37}$.

40 En otra realización más en particular, el procedimiento de la presente invención se realiza en un reactor continuo en medio de alimentación complejo o específico para el cultivo de *E. coli*.

En otra realización más en particular, el procedimiento de la presente invención se realiza en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

45 En otra realización más en particular, la concentración de crotonobetaína, sales o derivados de crotonobetaína y/o D-carnitina en el medio de reacción en el procedimiento de la presente invención está comprendida entre 25 mM y 1 M.

En otra realización más en particular, en el procedimiento de la presente invención *E. coli* se encuentra bajo condiciones de crecimiento o en estado de reposo.

50 En otra realización más en particular, el procedimiento de la presente invención comprende múltiples ciclos de biotransformación reutilizando células en reposo en ciclos consecutivos de biotransformación, lo que permite conversiones y productividades mayores de 95% y 2.5 g L⁻¹g⁻¹ respectivamente.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de *E. coli* BW 25113 $\Delta aceK \Delta caiA \Delta pcai cai-p37$ para la producción de L-carnitina según el procedimiento de la presente invención.

Descripción de las figuras

5 La figura 1 muestra una representación esquemática de la biotransformación de crotonobetaína en L(-)-carnitina por *E. coli*. L(-)-Car: L(-)-carnitina; CroT: crotonobetaína; γ -BB: γ -butirotbetaína; CaiT: proteína transportadora de L(-)-carnitina/crotonobetaína/ γ -butirotbetaína; CaiB: acetil-CoA/CoA transferasa; CaiC: L(-)-carnitina, crotonobetaína o γ -butirotbetaína ligasa/transferasa; CaiD: enoil-CoA hidratasa.

10 La figura 2. Muestra la estrategia seguida para la modificación del metabolismo de carnitina. A) Deleción del gen *caiA* por sustitución del gen de resistencia a cloramfenicol, que está flanqueado por los centros *lox*. Reemplazo del promotor natural *cai* por un promotor fuerte (p37), donde los centros de unión a CRP y FNR son eliminados y sustituidos por el gen de resistencia a kanamicina, flanqueado por los centros FRT. B) Reemplazo del promotor natural de *caiF* por un promotor débil (p8), donde los centros de unión a CRP y FNR son eliminados y sustituidos por el gen de resistencia a kanamicina flanqueado por los sitios FRT.

15 La figura 3 muestra la producción de L-carnitina en la cepa control y en las modificadas, después de 24 h de cultivo. La biotransformación tuvo lugar en medio LB suplementado con 50 - 1000 mM de crotonobetaína, bajo condiciones anaerobias. Resultados obtenidos de ensayos realizados por triplicado.

20 La figura 4 muestra el efecto de las mutaciones del metabolismo central (A) y secundario (B) sobre la producción de L(-)-carnitina. Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones anaerobias en el medio descrito anteriormente suplementado con fumarato. Las barras representan la producción de L(-)-carnitina tras 24 h y los puntos la tasa específica de crecimiento, con las desviaciones correspondientes a un total de tres ensayos.

25 La figura 5 muestra el efecto de la sustitución de los promotores constitutivos sobre la producción de L(-)-carnitina en condiciones aerobias. La biotransformación se realizó en ausencia (barras oscuras) y en presencia de fumarato (barras claras). La concentración de L(-)-carnitina fue analizada tras 24 h. Los puntos representan la tasa específica de crecimiento de las cepas en LB (●) y LB suplementado con fumarato (▲). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los ensayos realizados por triplicado.

La figura 6 muestra la producción de L(-)-carnitina con células en estado de reposo de BW 25113 (silvestre) (negro) y BW 25113 $\Delta aceK \Delta caiA \Delta pcai cai-p37$ (gris). Las barras de error corresponden a ensayos realizados por triplicado.

30 La figura 7 muestra la expresión relativa de los genes en las cepas modificadas crecidas bajo condiciones anaerobias (A) y aerobias (B) en LB suplementado con fumarato. Para cada gen, el nivel de transcripción de cada gen de la cepa silvestre se utilizó como referencia para realizar la normalización de los datos. La expresión relativa de los genes de la cepa control (silvestre) tiene, por tanto, el valor de 1. Los resultados son el promedio de tres medidas independientes para cada gen/condición y utilizando triplicados de experimentos independientes

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención, se refiere a un procedimiento para incrementar la biotransformación de crotonobetaína o D(+)-carnitina y sus derivados en L(-)-carnitina o sus derivados, mediante el uso de biorreactores con cepas de *E. coli* modificadas genéticamente por mutación insercional. Así, las células de *E. coli* recombinantes que se utilizaron en los reactores celulares bajo condiciones de crecimiento o en estado de reposo produjeron hasta un rendimiento del 100% en la biotransformación de crotonobetaína en L(-)-carnitina sin la formación de γ -butirotbetaína en el medio de reacción, con una productividad específica de $28 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y lo que es muy importante, una simplificación de las operaciones de separación y purificación del caldo de cultivo, lo que redundará en una reducción de los costes globales del proceso de producción de L(-)-carnitina.

45 Cepas y plásmidos.

La cepa silvestre *E. coli* BW25113 [*lac*^F *rrnB*_{T14} $\Delta lacZ$ _{WJ16} *hsdR514* $\Delta araBAD$ _{AH33} $\Delta rhaBAD$ _{LD78}] se obtuvo de la colección Keio. Las cepas mutantes se construyeron en este estudio (Tabla 1), tal y como se describe en la sección *Modificación de cepas: Estrategia para realizar deleción de genes y sustitución de promotores*

50

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo
<i>Escherichia coli</i> BW25113	<i>lac</i> ^A <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{AH33} <i>ΔrhaBAD</i> _{LD78}
<i>Escherichia coli</i> BW25113 Δ <i>aceK</i>	[BW25113] Δ <i>aceK</i>
<i>Escherichia coli</i> BW25113 Δ <i>aceA</i>	[BW25113] Δ <i>aceA</i>
<i>Escherichia coli</i> BW25113 Δ <i>aceAK</i>	[BW25113] Δ <i>aceAK</i>
<i>Escherichia coli</i> BW25113 Δ <i>caiA</i>	[BW25113] Δ <i>caiA</i>
<i>Escherichia coli</i> BW25113 Δ <i>pcai cai-p37</i>	[BW25113] Δ <i>pcai cai-p37</i>
<i>Escherichia coli</i> BW25113 Δ <i>pcaiF caiF-p8</i>	[BW25113] Δ <i>pcaiF caiF-p8</i>
<i>Escherichia coli</i> BW25113 Δ <i>aceK Δpcai cai-p37</i>	[BW25113] Δ <i>aceK Δpcai cai-p37</i>
<i>Escherichia coli</i> BW25113 Δ <i>aceK ΔcaiA Δpcai cai-p37</i>	[BW25113] Δ <i>aceK ΔcaiA Δpcai cai-p37</i>

5 *Modificación de cepas: Estrategia para realizar delección de genes y sustitución de promotores.*

Se han seguido los protocolos estándar de biología molecular (Sambrook y Russell, 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Los mutantes fueron construidos por sucesivas delecciones de los genes o las regiones reguladoras considerados como diana, mediante el método de Datsenko y Wanner 2000 One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(12):6640-6645.). Las secuencias establecidas fueron amplificadas mediante PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados específicamente (Tabla 2), y fueron utilizados para la transformación de las células portadoras del plásmido pKD46. Los mutantes resultantes fueron seleccionados por su resistencia a kanamicina o cloramfenicol. Para la eliminación del casete de resistencia al antibiótico se utilizó la proteína FLP recombinasa.

Para la mutación de los promotores *cai/fix* y *caiF*, se utilizó un método de sustitución de promotores (De Mey et al., 2010b. Promoter knock-in: a novel rational method for the fine tuning of genes. Bmc Biotechnology 10.). La estrategia consiste en la delección de las respectivas secuencias de los promotores endógenos utilizando el método referenciado. Posteriormente, los mutantes con dicha delección se utilizan para introducir en ellos el nuevo promotor. Se ensayaron dos promotores constitutivos de diferente longitud para realizar la estrategia de modificación: el p37 (fuerte) y el p8 (débil). Todas las construcciones se comprobaron por PCR y secuenciación de DNA.

La cepas mutantes *E. coli* BW25113 Δ *aceK*, BW25113 Δ *aceAK*, BW25113 Δ *caiA* se construyeron siguiendo el método de Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000 One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(12):6640-6645). Las cepas mutantes con los promotores constitutivos: *E. coli* BW 25113 Δ *pcai cai-p37*, BW25113 Δ *aceK Δpcai cai-p37*, , BW25113 Δ *aceK ΔcaiA Δpcai cai-p37* y BW 25113 Δ *pcaiF caiF-p8* se construyeron reemplazando el operon endógeno mediante la metodología de sustitución del promotor mencionada anteriormente (Figura 2).

Los plásmidos pKD46 (Red helper plasmid, resistencia a ampicilina), pKD3 (contiene el gen de resistencia a cloramfenicol (*cat*) flanqueado por secuencias FRT), pKD4 (contiene el gen de resistencia a kanamicina (*kan*) flanqueado por secuencias FRT), pCP20 (expresa la actividad FLP recombinasa) se obtuvieron del Prof. Dr. J-P Hernalsteens (Vrije Universiteit Brussels, Belgium).

Las cepas se almacenaron en glicerol (50%) a -80°C. Los cultivos de referencia de *E. coli* para los ensayos de biología molecular se realizaron en L-Broth sólido o líquido y los antibióticos (ampicilina 100 µg mL⁻¹, kanamicina 30 µg mL⁻¹, cloramfenicol 30 µg mL⁻¹) se adicionaron al medio cuando fue necesario.

Condiciones de cultivo.

En los experimentos de biotransformación, las células crecieron tanto en L-Broth como en el medio indicado posteriormente, y el pH se ajustó a 4,5-8,5 con KOH o NaOH antes de ser esterilizado. Los cultivos se realizaron bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, la crotonobetaína (a cualquier concentración, mM) se suplementó como inductor del operón *cai* y el fumarato, 12,5-75 mM, se añadió para actuar como aceptor y como inhibidor de la reacción catalizada por la crotonobetainil-CoA reductasa (*CaiA*). Los cultivos se inocularon con 2-20% (v/v) de un precultivo crecido durante la noche. Las células crecieron a 20-40°C, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Los ensayos de los cultivos discontinuos anaerobios se realizaron en frascos de cultivo con un volumen de trabajo de 0,06-0,600 L bajo una atmósfera rica en nitrógeno y con agitación magnética o fermentadores controlados como se indica posteriormente. Los ensayos aerobios se realizaron en matraces erlenmeyer de 250-2000 mL con un volumen de trabajo de 50-500 mL, en un agitador rotatorio (150-500 rpm) o en fermentadores controlados como se indica posteriormente.

Células en estado de reposo.

Para realizar los ensayos con células en estado de reposo, los cultivos anaerobios se centrifugaron al final de la fase exponencial de crecimiento a 16000xg durante 10 min, y se lavaron dos veces con tampón de fosfato potásico 67-150 mM, pH 4,5-8,5. Las células se resuspendieron en tampón de fosfato potásico 67-150 mM suplementado con 50-150 mM de crotonobetaína, pH 4,5-8,5, y se incubaron a 20-40°C en matraces erlenmeyer en un agitador rotatorio (150-500 rpm). Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y bajo condiciones estériles. Los valores recogidos son los que pertenecen a los ensayos realizados.

Procedimientos analíticos.

La absorbancia (A) se utilizó para seguir el crecimiento celular de los cultivos, midiendo con un espectrofotómetro (Novaspec II; Pharmacia-LKB, Sweden) a 600 nm, posteriormente se convirtió dicha absorbancia en peso seco (DWC). Para realizar el análisis de L(-)-carnitina y de los metabolitos extracelulares, los cultivos en L-Broth se centrifugaron a 19000xg durante 10 min. La concentración de L(-)-carnitina se determinó con un test enzimático (Jung et al., 1993), mientras crotonobetaína y γ -butirotetaina fueron medidas por HPLC (Obon et al., 1999). Para el análisis de ácidos orgánicos se utilizó una columna de intercambio catiónico HPX-87H suministrada por BioRad Labs (Hercules, CA) con un sistema HPLC de Shimadzu (Kyoto, Japan). La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 5 mM con un flujo de 0,5 ml min⁻¹. El efluente se monitorizó mediante un refractómetro de flujo (Shimadzu, Kioto, Japan).

Extracción de RNA y PCR cuantitativa.

La extracción de RNA se realizó a mitad de la fase exponencial de crecimiento. Los cultivos fueron centrifugados a 15000xg durante 23 s con una temperatura de 4°C. El RNA total se extrajo con el kit Qiagen Rneasy@Mini (QIAGEN Ibérica, Madrid, Spain). De forma adicional, se efectuó una digestión con DNase utilizando el Set RNase-free DNase (QIAGEN Ibérica, Madrid, Spain) para evitar interferencias de DNA durante los pasos de PCR. La calidad y cantidad de RNA se evaluó por electroforesis capilar microfluidica usando el kit Agilent RNA 6000 Pico mediante el bionalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, PaloAlto, CA). Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se diseñaron con el software PrimerExpress® v3.0 (Applied Biosystems, FosterCity, CA) y fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co (St.Louis, USA) (Tabla 2). Los genes *dnaA* y *polA* (que codifican un iniciador multifuncional de la replicación cromosómica y regulador transcripcional y una DNA I polimerasa respectivamente) se utilizaron como control interno para realizar la cuantificación relativa. La PCR cuantitativa se realizó en el sistema 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) con la máster mix PowerSYBR@Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Los datos primarios fueron transformados en valores de ciclo umbral (threshold cycle (Ct)). Los niveles relativos de expresión de los genes se calcularon mediante el método comparativo del Ct ($\Delta\Delta Ct$). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Genes

Construcción de mutantes	Secuencias	secuencias
Fwd- <i>aceAK</i> -P1	SEQ ID NO: 1	
Rev- <i>aceAK</i> -P2	SEQ ID NO: 2	
Fwd- <i>caiF</i> -P1	SEQ ID NO: 3	
Rev- <i>caiF</i> -p8	SEQ ID NO: 4	
Fwd- <i>caiA</i> -lox1	SEQ ID NO: 5	

Rev- <i>caiA-lox2</i>	SEQ ID NO: 6	
Fwd - <i>caiTBC-p37</i>	SEQ ID NO: 7	
Rev- <i>pcaiTBC-P2</i>	SEQ ID NO: 8	
qPCR	Oligo Forward	Oligo Reverse
<i>dnaA</i>	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
<i>polA</i>	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
<i>caiT</i>	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
<i>caiB</i>	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
<i>caiC</i>	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
<i>fixA</i>	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
<i>icd</i>	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
<i>pta</i>	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
<i>aceA</i>	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26

Tabla 2. **Oligonucleótidos utilizados para la PCR a tiempo real.** Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se diseñaron con el programa Primer Express[®] Software v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). Los genes *dnaA* y *polA* (que codifican un iniciador multifuncional de la replicación cromosómica y regulador transcripcional y una DNA I polimerasa respectivamente) se utilizaron como control interno y para la cuantificación relativa.

5

10

15

El proceso consiste en utilizar las células que se han modificado genéticamente en la biotransformación con crotonobetaína, D(+)-carnitina o sus derivados en L(-)-carnitina a cualquier concentración y 50-150 mM de tampón fosfato, pH 4,5-8,5. Para la biotransformación los sustratos se adicionaron directamente al medio de cultivo, donde previamente se habían inoculado las células o tras haberlas centrifugado a 1000 - 10000xg durante 5 min y posterior lavado con el tampón. Por lo tanto, la actual invención aporta un procedimiento para la producción de L(-)-carnitina desde crotonobetaína, sales de crotonobetaína, u otros derivados de crotonobetaína en reactores continuos con células libres o inmovilizadas de *E. coli*, incluyendo el sistema de células en reposo. Las condiciones más apropiadas para trabajar con *E. coli* en reactores continuos es con una temperatura entre 20 y 40°C, y unos valores de pH entre 4,5 y 8,5. Las condiciones aerobias o anaerobias son necesarias en *E. coli* para la inducción de la enzimas relacionadas con carnitina.

20

25

30

35

El medio de reacción apropiado incluye un medio mínimo o de composición compleja. En ambos casos, D(+)-carnitina, crotonobetaína, sales de crotonobetaína y otros derivados de crotonobetaína, se añaden en una concentración entre 25 mM y 1 M. *E. coli* tiene la capacidad de realizar la biotransformación de compuestos de trimetilamonio (Castellar MR, Obon JM, Marin A, Canovas M, Iborra JL. 2001. L(-)-carnitine production using a recombinant Escherichia coli strain. Enzyme and Microbial Technology 28(9-10):785-791; Engemann C, Kleber H-P. 2001. Epigenetic regulation of carnitine metabolising enzymes in Proteus sp. under aerobic conditions. FEMS Microbiology Letters 196(1):1-6; Jung H, Jung K, Kleber H-P. 1989b. Purification and properties of carnitine dehydratase from Escherichia coli a new enzyme of carnitine metabolism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1003(3):270-276). Para *E. coli*, la composición del medio mínimo comprende diferentes concentraciones de caseína hidrolizada, y sales como (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄ 7H₂O, MnSO₄ 4H₂O, FeSO₄ 7H₂O, mientras que el medio complejo contiene diferentes concentraciones de peptona pancreática y NaCl. Los procesos con células en estado de reposo se llevaron a cabo en tampón fosfato 50-150 mM, pH 4,5-8,5 y añadiendo crotonobetaína 50-1000 mM como sustrato de biotransformación (dependiendo del experimento). El pH de los medios utilizados para el crecimiento se ajustó a 4,5-8,5 con NaOH 1 M o KOH antes de esterilizar. Las células crecieron con una concentración inicial de 2 - 20% v/v del cultivo líquido almacenado a -20°C en glicerol al 20% (v/v) y una temperatura de 20 - 40°C durante 8 - 10 h en matraces de 1 L con 0,2 L del medio de crecimiento y una agitación de 150 - 330 rpm mediante un agitador orbital o controlado por el sistema del reactor (aeróbico o anaeróbico). Durante los experimentos en continuo, el medio se oxigenó o se mantuvo en anaerobiosis, como se mencionó anteriormente. Se incluyeron sustratos que permitiesen incrementar la tasa de crecimiento de *E. coli*, tales como glicerol, glucosa, ribosa, sacarosa o lactosa. Además, se añadieron inductores de las enzimas involucradas en el metabolismo de carnitina, tales como D-, (D,L)-carnitina, sus sales y derivados, o crotonobetaína, sus sales y derivados.

40

El término de "reactor celular continuo", que se está utilizando aquí, se refiere al fermentador donde las células de *E. coli* en contacto con el medio de reacción transforman la mayoría de la crotonobetaína en L(-)-

carnitina. Este fermentador está equipado con un controlador que monitoriza el pH, temperatura, agitación o comprueba la concentración de oxígeno y la corrige. Los medios se introducen al fermentador a través de un conducto de entrada mediante una bomba dosificadora. Dicho fermentador puede ser purgado si es necesario. El término “células libres o en suspensión” se refiere principalmente a aquella situación en la cual las células se suspenden dentro del fermentador sin ningún dispositivo que evite que sean eliminadas del mismo a través del conducto de salida (Cánovas et al., 2005. Factors affecting the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine by *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal* 26(2-3):145-154.).

Los términos “condiciones de crecimiento y en estado de reposo” definen la situación en la cual las células llevan a cabo su ciclo de vida, consumen sustratos y producen productos. En esta situación las células en medio mínimo están en un estado latente que no evita que realicen ciertos procesos bioquímicos dirigidos a la producción del producto deseado (Hansruedi F. 1982. Permeabilized cells. *Analytical Biochemistry* 120(2):211-234; Kieslich K, Rehm H-J, Reed G. 1984. *Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes; Vol.6a, Biotransformations*. Germany: Weinheim, FRG : Verlag Chemie.).

A continuación se describen algunos casos donde se ha utilizado *E. coli* modificada genéticamente libre de plásmidos para la producción de L(-)-carnitina.

EJEMPLO 1. Cepas modificadas para la producción de L(-)-carnitina.

En base a las publicaciones mencionadas, se diseñaron cuatro estrategias para mejorar la producción de L(-)-carnitina en *E. coli*, teniendo en cuenta tanto el metabolismo central como el secundario: (i) alteración del flujo sobre el nodo de isocitrato (ciclo glioxilato/ciclo TCA), (ii) evitar la reducción paralela de crotonobetaína a γ -butirotobetaína (ruta de respiración de carnitina), (iii) incrementar la expresión del operón *cai*, e (iv) incrementar la expresión de los genes reguladores (*caiF*) y evitar la represión por las condiciones aerobias.

Todas las modificaciones se realizaron sobre el fondo genético de *E. coli* K12 (en la cepa *E. coli* BW25113), cuya productividad de L(-)-carnitina se encuentra en el mismo orden de magnitud que el de la bien caracterizada cepa *E. coli* O44K74.

En un estudio previo, se comprobó el efecto de modificaciones simples en la producción de L(-)-carnitina. Todas las cepas fueron cultivadas en el medio de biotransformación para determinar en efecto sobre la producción de carnitina. Todas las cepas modificadas mostraron mejoras en el rendimiento de biotransformación (Figura 3).

Respecto a la modificación del metabolismo central, se realizó la delección de los genes que codifican la isocitrato liasa (*aceA*) e isocitrato deshidrogenasa fosfatasa/kinasa (*aceK*). La cepa con la delección del gen *aceK* (carece del control post-traducciona de isocitrato deshidrogenasa) mejoró la producción de L(-)-carnitina (20%), mientras que la delección de *aceA* (que codifica la primera enzima del ciclo del glioxilato) sólo tuvo un ligero efecto en el proceso (6%). Además, se construyó el mutante *aceAK* con una doble delección, para comprobar si la delección del ciclo del glioxilato, el incremento del flujo hacia ciclo TCA o ambos son necesarios para la construcción de cepas de *E. coli* con un alto rendimiento. No se observó mejora adicional en el doble mutante, indicando que la desregulación del ciclo TCA es más relevante que la disminución del flujo a través del ciclo del glioxilato.

Para evitar el uso de crotonobetaína como sumidero de electrones, se realizó la delección del gen *caiA* (que codifica la crotonobetainil-CoA reductasa) lo que dio lugar a una mejora del rendimiento de carnitina del 28%. Para incrementar la expresión de los genes estructurales (operón *cai*) o reguladores (*caiF*) y evitar la represión por las condiciones aerobias, los promotores *pcaiF* y *pcai* que son débiles y altamente regulados se sustituyeron por unos artificiales (sintéticos) (*p37* y *p8* respectivamente) (De Mey et al., 2007). La mejora más importante desde el punto de vista cuantitativo sobre la producción de L(-)-carnitina se observó en las cepas donde se realizó la modificación de las expresiones de los genes relacionados con el metabolismo de carnitina, con un incremento del rendimiento de biotransformación de un 38%.

Para realizar un análisis más completo del comportamiento de estas cepas se determinó la tasa de crecimiento específico y de producción de carnitina en cultivos con y sin fumarato como aceptor alternativo de electrones en condiciones anaerobias y como sustrato energético (Cánovas M, Bernal V, Torroglosa T, Ramirez JL, Iborra JL. 2003. Link between primary and secondary metabolism in the biotransformation of trimethylammonium compounds by *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 84(6):686-699; Kleber HP. 1997. Bacterial carnitine metabolism. *Fems Microbiology Letters* 147(1):1-9).

En presencia de fumarato, la tasa específica de crecimiento se incrementó de un 20 a un 30%, aunque fue similar para todas las cepas ensayadas. Por otro lado, la tasa de producción específica de carnitina presentó diferencias entre las distintas cepas ensayadas. En todas las cepas modificadas se incrementó la producción de L(-)-carnitina, siendo la tasa de producción de BW 25113 $\Delta aceK$ la más baja de todos los mutantes. Por

otro lado, la producción más alta fue exhibida por la cepa BW 25113 $\Delta pcai\ cai-p37$. No obstante, una vez que las cepas alcanzaron el estado estacionario, tanto en la cepa BW 25113 $\Delta pcai\ cai-p37$ como en la BW 25113 $\Delta caiA$ se obtuvieron la mayor concentración de L(-)-carnitina, y ambas con un valor similar. Sin embargo, en los cultivos con fumarato se incrementó la producción de carnitina, y en este caso, la cepa BW 25113 $\Delta caiA$ fue la que alcanzó el mayor valor de biotransformación. Cabe resaltar que la adición de fumarato a los cultivos también mejoró la producción en las cepas deficientes en *caiA*. Los resultados mostraron una inhibición de la actividad CaiA reductasa, tal y como se esperaba al añadir fumarato al medio. Éste se utiliza como aceptor de electrones incrementando el estado energético de las células, por lo que supone una evidencia adicional que confirma la existencia de una carga energética elevada en las células durante la biotransformación.

Estos estudios preliminares permitieron seleccionar las cepas que exhibían la mayor capacidad de producción de L(-)-carnitina. Para mejorar los resultados obtenidos se decidió incluir todas las modificaciones que habían dado lugar a un efecto positivo en la misma cepa. El primer paso consistió en construir un doble mutante que incluyera una delección del gen *aceK* y la sustitución del promotor natural *cai* por un promotor constitutivo. Tal y como se esperaba ninguna de las mutaciones afectó significativamente al crecimiento de la cepa, pero por el contrario, la producción específica de carnitina fue más alta que la mostrada en el mutante simple, capaz de sobreexpresar el metabolismo de carnitina. Finalmente, al doble mutante anteriormente citado se le adicionó una tercera modificación, la delección del gen *caiA*. Esta mutación dio lugar a un triple mutante, BW 25113 $\Delta aceK\ \Delta caiA\ \Delta pcai\ cai-p37$, que también contribuyó a incrementar la producción específica de carnitina, un 70% respecto al conseguido por la cepa silvestre. El triple mutante se cultivó en medio sin y con fumarato, obteniendo el mayor rendimiento de biotransformación de todas las cepas ensayadas (Figura 4). Además, la biotransformación obtenida en presencia de fumarato dio lugar a una conversión de aproximadamente el 95%.

EJEMPLO 2: Biotransformación bajo condiciones aerobias.

Hasta ahora, la producción de carnitina con *E. coli* se realizaba en condiciones anaerobias para inducir la expresión del operon *cai*. Estas condiciones son necesarias de acuerdo con el modelo de regulación del metabolismo de carnitina (Buchet A, Eichler K, Mandrand-Berthelot MA. 1998. Regulation of the carnitine pathway in Escherichia coli: Investigation of the *cai*-fix divergent promoter region. Journal of Bacteriology 180(10):2599-2608; Buchet A, Nasser W, Eichler K, Mandrand-Berthelot MA. 1999. Positive co-regulation of the Escherichia coli carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP and the CaiF activator. Molecular Microbiology 34(3):562-575.). La proteína CaiF es el factor de transcripción específico que activa el metabolismo de carnitina en presencia de los compuestos de trimetilamonio (D,L-carnitina o crotonobetaína). La transcripción de *caiF* se estimula por una proteína reguladora global, FNR. Por tanto, el gen *caiF* y el operón *cai* no se expresan en presencia de oxígeno (Buchet A, Eichler K, Mandrand-Berthelot MA. 1998. Regulation of the carnitine pathway in Escherichia coli: Investigation of the *cai*-fix divergent promoter region. Journal of Bacteriology 180(10):2599-2608; Eichler K, Buchet A, Lemke R, Kleber HP, Mandrand-Berthelot MA. 1996. Identification and characterization of the *caiF* gene encoding a potential transcriptional activator of carnitine metabolism in Escherichia coli. Journal of Bacteriology 178(5):1248-1257).

Como ya se ha descrito anteriormente, podría ser altamente ventajoso obtener L(-)-carnitina en condiciones inusuales, es decir, en presencia de oxígeno, con cepas modificadas que sobreexpresan de forma constitutiva el gen *caiF* y el operon *cai*. De esta forma, se realizó una precisa modificación de la expresión genética sustituyendo los promotores naturales por otros más potentes (De Mey M, Lequeux GJ, Beauprez JJ, Maertens J, Waegeman HJ, Van Bogaert IN, Foulquie-Moreno MR, Charlier D, Soetaert WK, Vanrolleghem PA and others. 2010a. Transient metabolic modeling of Escherichia coli MG1655 and MG1655 Delta *ackA*-pta, Delta *poxB* Delta *ppc* *ppc*-p37 for recombinant beta-galactosidase production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 37(8):793-803; De Mey M, Maertens J, Boogmans S, Soetaert WK, Vandamme EJ, Cunin R, Foulquie-Moreno MR. 2010b. Promoter knock-in: a novel rational method for the fine tuning of genes. Bmc Biotechnology 10).

Los experimentos realizados con las cepas modificadas mostraron la capacidad de producir L(-)-carnitina en condiciones aerobias. Se cultivaron las cepas BW25113 (silvestre), BW25113 $\Delta pcaiF\ caiF-p8$, BW25113 $\Delta pcai\ cai-p37$, BW25113 $\Delta aceK\ \Delta pcai\ cai-p37$ and BW25113 $\Delta aceK\ \Delta caiA\ \Delta pcai\ cai-p37$ y se llevó a cabo el estudio de su tasa específica de crecimiento y la producción específica de carnitina para determinar el efecto del oxígeno en la biotransformación.

No se encontraron diferencias en el crecimiento de estas cepas (datos no mostrados), destacando que la tasa específica de crecimiento alcanzó un valor máximo de $0,84\ h^{-1}$ para cultivos sin fumarato, y de $0,86\ h^{-1}$ para cultivos suplementados con fumarato. Mientras que la cepa silvestre no pudo expresar las enzimas del metabolismo de carnitina en presencia de oxígeno, las cepas modificadas que se utilizaron en el ensayo presentaron producción de L(-)-carnitina. A pesar de que la cepa BW25113 $\Delta aceK\ \Delta pcai\ cai-p37$ obtuvo un nivel más alto de producción específica de carnitina, la cepa BW25113 $\Delta aceK\ \Delta caiA\ \Delta pcai\ cai-p37$ mostró la mayor producción de carnitina una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento en presencia de

fumarato. Por otro lado, ambas cepas BW25113 $\Delta aceK \Delta pcai cai-p37$ y BW25113 $\Delta aceK \Delta caiA \Delta pcai cai-p37$ obtuvieron una producción similar en los cultivos sin fumarato. El nivel de carnitina en la fase estacionaria osciló entre 40-60% en cuanto al rendimiento de biotransformación para los mutantes de p37, como se puede ver en la Figura 5. El rendimiento de biotransformación obtenido por la cepa BW25113 $\Delta pcaiF caiF-p8$ fue tres veces menor (16%) como resultado de la diferente actividad de ambos promotores (De Mey M, Maertens J, Lequeux GJ, Soetaert WK, Vandamme EJ. 2007. Construction and model-based analysis of a promoter library for E-coli: an indispensable tool for metabolic engineering. BMC Biotechnology 7). A pesar de esto, la actividad de p8 fue suficiente para activar la expresión del metabolismo de carnitina y producir L(-)-carnitina en condiciones aerobias.

10 EJEMPLO 3. Biotransformación con células en estado de reposo.

Se realizaron experimentos utilizando células en estado de reposo (resting) para comprobar la capacidad de biotransformación. Las cepas seleccionadas para los ensayos fueron la silvestre (control) y la que obtuvo los mejores resultados de biotransformación en situación de crecimiento (BW25113 $\Delta aceK \Delta caiA \Delta pcai p37 cai$).

15 Las células en estado de reposo mejoraron la producción de carnitina en ambas cepas. Además, la tasa específica de producción fue de 28,5 y 59,6 mmol h⁻¹ para la cepa silvestre y la mutante, respectivamente. Así pues, la cepa transformada fue capaz de conseguir casi el 100% de conversión en menos de dos horas (Figura 6), lo cual no se había conseguido hasta el momento.

EJEMPLO 4. Efectos de las mutaciones en los puntos de control del metabolismo central.

20 La cepa control y la cepa mutante BW25113 $\Delta aceK \Delta caiA \Delta pcai cai-p37$ se seleccionaron para estudiar los cambios impuestos en el metabolismo central debido a la estrategia de modificación de las cepas. Para este fin, se analizaron siete metabolitos: succinato, piruvato, fumarato, lactato, acetato, etanol y formiato, aunque piruvato, lactato y etanol no mostraron ningún cambio importante y sólo se detectaron bajas concentraciones o trazas bajo las condiciones de cultivo ensayadas. Por lo tanto el estudio metabólico se centró en el acetato, que es el producto principal del metabolismo de *E. coli*, y se puede considerar como el indicador del estado energético de la célula, y el succinato, que es un producto de la fermentación ácido mixta de *E. coli*, y también resulta de la respiración del fumarato.

30 En el caso de los cultivos anaerobios suplementados con fumarato, el comportamiento que se observó fue similar para ambas cepas, silvestre y mutante. El punto de máxima concentración coincidió con el tiempo en el cual el fumarato se consumió totalmente al final de la fase exponencial, cuyos valores fueron 12,2 y 13,9 mM para succinato y 10,2 y 16,4 mM para acetato, dichos valores referidos a la cepa silvestre y superproductora respectivamente. Sin embargo, el acetato disminuyó ligeramente durante la fase estacionaria. Los resultados obtenidos en los ensayos donde no se utilizó fumarato fueron similares a los observados anteriormente. Sin embargo, la concentración alcanzada por cada metabolito fue más baja. Además, el formiato sólo se detectó en la fase exponencial, con un considerable incremento durante las diez primeras horas, que fue mayor en la cepa mutante. Posteriormente, no se detectó. Esto indica que hay actividad de la enzima piruvato-formiato liasa (Pfl) bajo estas condiciones. Por tanto, el metabolismo central se centra en mantener unos niveles adecuados de ATP y coenzima A libre, los cuales son considerados como factores limitantes en el proceso de biotransformación.

40 Por otro lado, las cepas que crecieron en condiciones aerobias mostraron una pauta similar en el perfil metabólico, aunque se encontraron diferencias en los niveles, una vez que alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. Al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento, los niveles de succinato y de acetato se incrementaron, alcanzando sus máximas concentraciones, de 8.3 y 18.1 mM en el mutante, mientras que en la cepa silvestre fueron de 7,4 y 12,5 mM, por lo que se pone de manifiesto la importancia del metabolismo del acetato. Además, el acetato disminuyó de forma drástica, indicando la existencia de actividad del sistema rebosadero (overflow), una vez entrada la fase estacionaria. El flujo que se produjo hacia estos metabolitos resalta la necesidad de mantener la relación acetil-CoA/CoA, dependiendo de la demanda celular. Por otro lado, en los medios sin fumarato, la producción de acetato siguió un patrón similar al que se describió anteriormente, pero alcanzando una concentración dos veces menor.

50 Tabla 3. Tasas específicas de producción/consumo de L(-)-carnitina y de los principales metabolitos en las cepas silvestres y superproductora. Los experimentos se realizaron en LB y LB suplementado con fumarato, en condiciones anaerobias y aerobias.

Cepas y condiciones	Q _{L-car}	Q _{Suc}	-Q _{Fum}	Q _{Acet}	Q _{EtOH}	Q _{Form}
Cultivos anaerobios						
L-Broth						
Control (silvestre)	9.30 ± 0.12	8.43 ± 0.22	---	15.71 ± 0.28	7.23 ± 0.20	4.21 ± 0.14
BW- $\Delta aceK$ -p37 <i>caiTBC</i> - $\Delta caiA$	18.87 ± 0.23	7.20 ± 0.17	---	17.44 ± 0.16	2.49 ± 0.12	12.96 ± 0.42
L-Broth + fumarato (2 g/L⁻¹)						
Control (silvestre)	14.23 ± 0.15	13.89 ± 0.54	17.74 ± 0.26	13.15 ± 0.36	4.8 ± 0.32	N.D.
BW- $\Delta aceK$ -p37 <i>caiTBC</i> - $\Delta caiA$	27.75 ± 0.17	10.31 ± 0.32	19.51 ± 0.41	16.44 ± 0.21	3.95 ± 0.27	N.D.
Cultivos aerobios						
L-Broth						
Control (silvestre)	---	N.D.	---	9.49 ± 0.23	0.43 ± 0.05	---
BW- $\Delta aceK$ -p37 <i>caiTBC</i> - $\Delta caiA$	6.15 ± 0.10	N.D.	---	7.79 ± 0.12	1.17 ± 0.08	---
L-Broth + fumarate (2 g/L-1)						
Control (silvestre)	---	3.32 ± 0.11	9.42 ± 0.24	5.74 ± 0.10	0.15 ± 0.02	---
BW- $\Delta aceK$ -p37 <i>caiTBC</i> - $\Delta caiA$	7.02 ± 0.07	2.95 ± 0.08	6.82 ± 0.17	8.31 ± 0.14	1.26 ± 0.06	---

Las tasas se representan como mmol g⁻¹ h⁻¹.

EJEMPLO 5. Análisis de expresión genética.

5 Para lograr un mayor entendimiento de las diferencias observadas entre la cepa silvestre y el triple mutante, se realizó un análisis de la expresión genética por medio de PCR cuantitativa. Se seleccionaron siete genes del metabolismo central y del de carnitina. El RNA se aisló de la cepa silvestre y de la mutante tanto de cultivos aerobios como anaerobios, en la condiciones de máxima velocidad de biotransformación (fase exponencial del crecimiento). La cepa silvestre fue seleccionada como el estado de referencia para analizar la expresión relativa de los genes.

10 Se consideró importante la medida de expresión de tres genes pertenecientes al operón *cai*, *caiT*, *caiB* y *caiC*, puesto que la delección de *caiA* podría alterar la expresión del operón. Tanto en condiciones anaerobias como aerobias el patrón de expresión fue similar. Tal y como se esperaba, el promotor constitutivo incrementó la expresión de los genes del metabolismo de carnitina, *caiB*, *caiT* y *caiC*. Sin embargo, los genes *caiB* y *caiC* mostraron un nivel de expresión menor en la cepa con la delección de *caiA* ($\Delta caiA$) (Figura 7), indicando que puede existir un efecto de polaridad tras la delección del gen *caiA*. Además, el promotor p37 dio lugar a una mayor expresión del operón divergente *fix*, ya que el gen *fixA* también mostró un nivel de expresión superior.

20 Respecto al metabolismo central, se analizaron los genes relacionados con el nodo de isocitrato (*icdA*, que codifica la enzima isocitrato deshidrogenasa, y *aceA*, que codifica la isocitrato liasa) y la producción de acetato (*pta*, que codifica la proteína fosfotransacetilasa). La expresión de estos genes fue similar en todas las cepas. Esto indica que la mayor producción de acetato no se debe a una expresión mayor de *pta* y que la delección de *aceK* no altera la expresión de forma significativa en las dos enzimas involucradas en el nodo de isocitrato (Tabla 3 y Figura 7). Por otra parte, durante el crecimiento en condiciones anaerobias, el gen *aceA* mostró una expresión ligeramente inferior en las cepas modificadas respecto a la cepa silvestre.

25 De esta manera, la producción de L(-)-carnitina en un sistema con células en crecimiento se ha mejorado con éxito utilizando un método que introduce múltiples mutaciones estables en una sola cepa sin reducir la viabilidad celular y sin afectar al crecimiento específico. A esto hay que añadir, que el proceso de

5 biotransformación se ha mejorado debido a que es posible obtener aproximadamente el 100% de conversión en un corto periodo de tiempo, reduciendo el tiempo de transformación y purificación. Además, se ha eliminado la principal restricción para expresar el metabolismo de carnitina en condiciones aerobias. Por tanto, esta patente presenta una estrategia para optimizar cualquier proceso de producción industrial y aplicación biotecnológica, así como, contribuir al entendimiento del metabolismo mediante la utilización de la ingeniería metabólica por medio de cepas modificadas que incluyan la sustitución de promotores.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de L-carnitina a partir de crotonobetaína, sales o derivados de crotonobetaína y/o D-carnitina con *E. coli* modificada genéticamente mediante mutación insercional en ausencia de plásmidos, sin producción de γ -butirobetaína, caracterizado porque las modificaciones genéticas son las siguientes mutaciones:
- mutaciones para acelerar el flujo sobre el citrato,
 - mutaciones para evitar la producción de γ -butirobetaína,
 - mutaciones para incrementar la expresión del gen estructural (operon *cai*),
- mutaciones para incrementar la expresión del gen regulador (*caiF*) y evitar la represión por oxígeno
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde las mutaciones para acelerar el flujo sobre el citrato consisten en la delección de los genes que codifican la isocitrato liasa (*aceA*), isocitrato deshidrogenasa fosfatasa/kinasa (*aceK*) o la delección de ambos genes.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde las mutaciones para evitar la producción de γ -butirobetaína consisten en la delección del gen que codifica la crotonobetainil-CoA reductasa (gen *caiA*).
4. Procedimiento según la reivindicación 1, donde las mutaciones para incrementar la expresión de genes reguladores consisten en incrementar la expresión del operón *cai*, incrementar la expresión del gen regulador *caiF* y evitar la represión por oxígeno, consisten en la sustitución de los promotores *pcai*, y *pcaiF* por los promotores p8 y p37 respectivamente.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde *E. coli* es la cepa mutante *E. coli* BW 25113 $\Delta aceK \Delta caiA \Delta pcai cai$ -p37.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la producción se realiza en un reactor continuo en medio de alimentación complejo o específico para el cultivo de *E. coli*.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el procedimiento se realiza en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la concentración de crotonobetaína, sales o derivados de crotonobetaína y/o D-carnitina en el medio de reacción está comprendida entre 25 mM y 1 M.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque *E. coli* se encuentra bajo condiciones de crecimiento o en estado de reposo.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el procedimiento comprende múltiples ciclos de biotransformación.
11. Uso de *E. coli* BW 25113 $\Delta aceK \Delta caiA \Delta pcai cai$ -p37 para la producción de L-carnitina según el procedimiento descrito en las reivindicaciones 1-10.

Figura 1

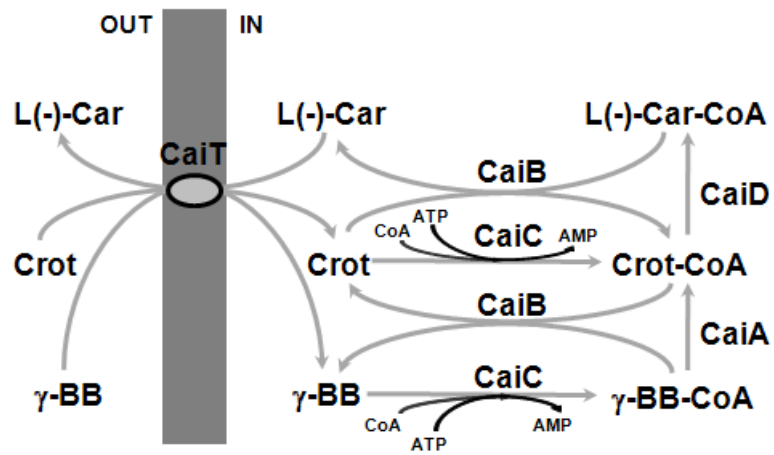


Figura 2

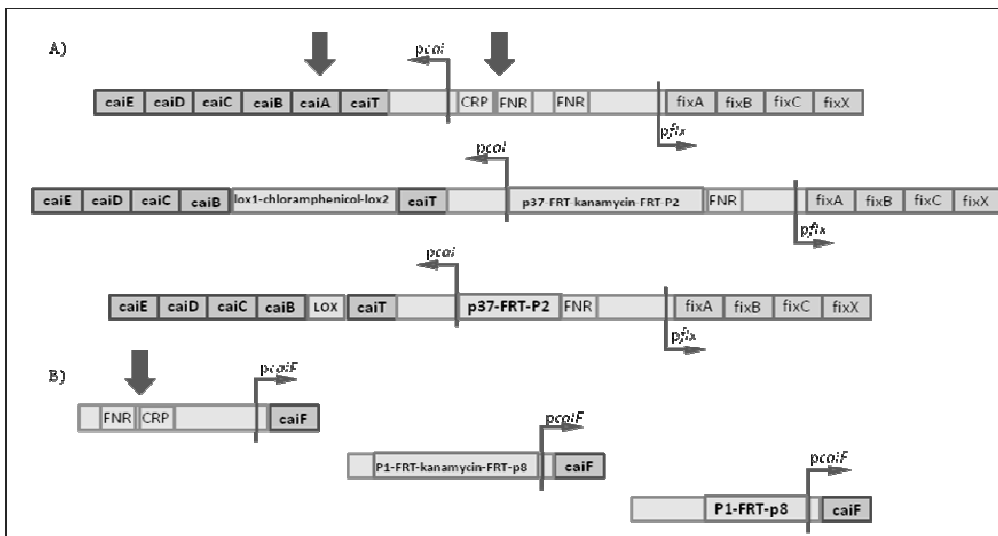


Figura 3

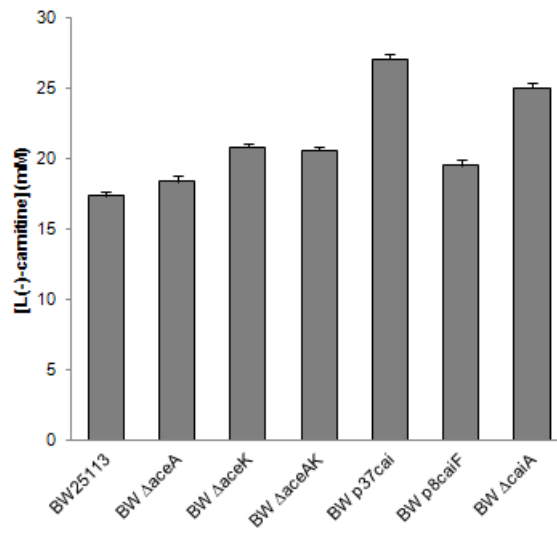
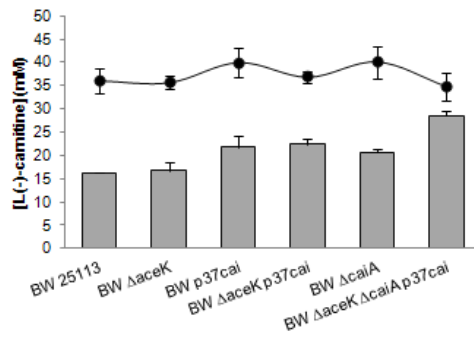


Figura 4

A



B

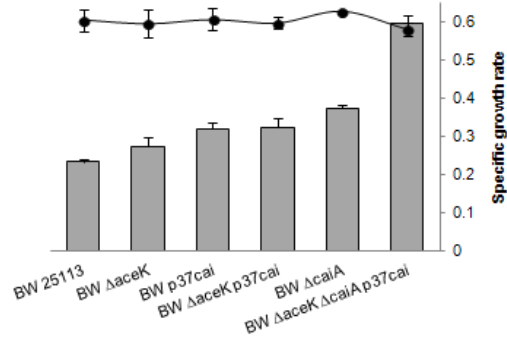


Figura 5

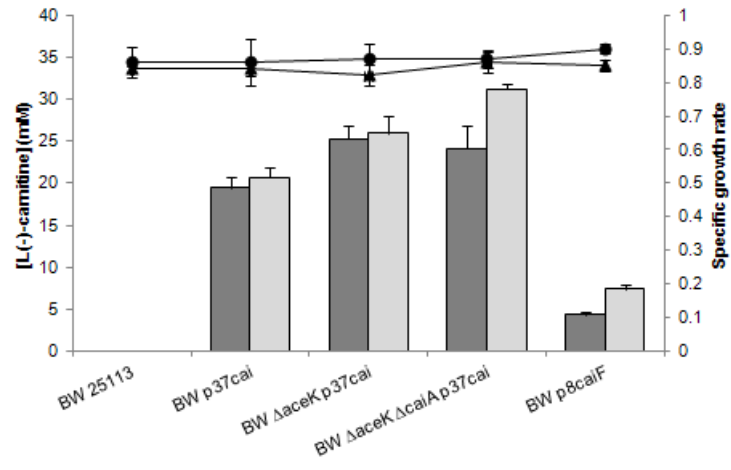


Figura 6

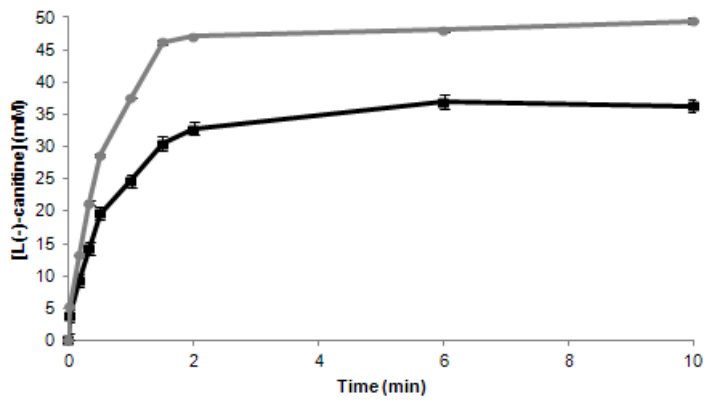
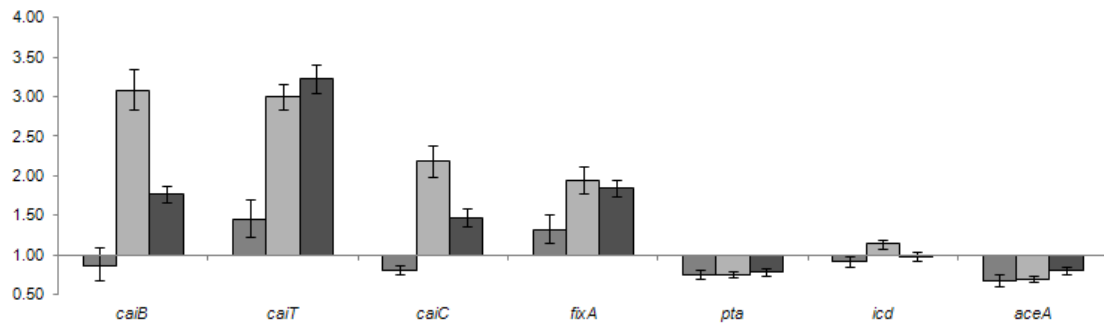
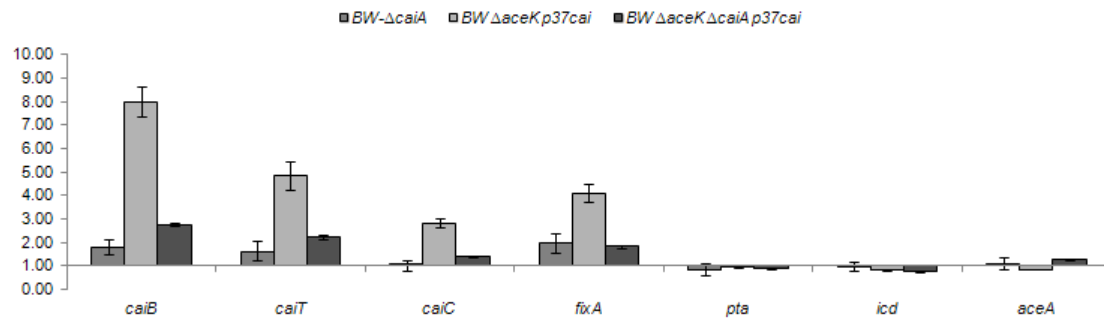


Figura 7

A



B



LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> UNIVERSIDAD DE MURCIA
 <120> PRODUCCIÓN DE L()-CARNITINA MEDIANTE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI
 MODIFICADAS GENÉTICAMENTE
 <130> PT0015/2012
 10 <160> 26
 <170> PatentIn version 3.5
 15 <210> 1
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Mutante E. coli Fwd-aceAK-PI
 <400> 1
 ccacataact atggagcatc tgcacatgaa aaccogtaca caacgtgtag gctggagctg 60
 25 cttc 64
 <210> 2
 30 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Mutante E. coli Rev-aceAK-P2
 <400> 2
 tttgctgcg ccgatacgca taaacatctt ccacatgcc ttcacatata gaatacctc 60
 40 cttag 65
 <210> 3
 <211> 77
 45 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Mutante E. coli Fwd-caiF-P1
 50 <400> 3
 ctgatgagga ccgtttttt ttgccatta agtaaactt ttggggaatc gatattgtg 60
 55 taggctggag ctgctc 77
 <210> 4
 <211> 80
 <212> DNA
 60 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Mutante E. coli Rev-caiF-p8
 65 <400> 4

ES 2 432 852 B1

```

tctggctatg actcgtttg aagcaattaa acaaggccat attaaaattg tggattaacc    60
cgcgaattat atcatattgg                                80

5
<210> 5
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
10
<220>
<223> Mutante E. coli Fwd-caiA-lox1

<400> 5
15 ctcccgtagg cctgataaga cgcatcagcg tcgcatcagg cagcgcacgg acataactc    60
gtatagcata cattatac                                78

20
<210> 6
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
25
<220>
<223> Mutante E. coli Rev-caiA-lox2

<400> 6
30 gcgaaacaga actggaaaga ttaattaacc cccaaaatat caagagggtg aaagataact    60
tcgtataatg tatgctatac g                                81

35
<210> 7
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
40
<220>
<223> Mutante E. coli Fwd -caiTBC-p37

<400> 7
45 atttttgta acattaata taattattat taacctcgtg gacgcgttaa tggcaaaaat    60
gacatatacc acatgga                                77

50
<210> 8
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
55
<220>
<223> Mutante E. coli Rev-pcaiTBC-P2

<400> 8
60 atttttact cacaacagag cataacaac tgattattaa tcaaaattaa catatgaata    60
tcctccttag                                70

65
<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

ES 2 432 852 B1

<220>
 <223> dnaA oligo Forward
 5 <400> 9
 tggcgaaga gctgactaac c 21

10 <210> 10
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> dnaA Oligo Reverse
 <400> 10
 acggcaggca tgaagca 17

20 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> polA Oligo Forward
 <400> 11
 30 gctgaacgtg cagccattaa 20

35 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> polA Oligo Reverse
 <400> 12
 caatcatcgc ccgtttgata a 21

45 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> caiT Oligo Forward
 <400> 13
 55 cacagttcac gcacagtacg 20

60 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> caiT Oligo Reverse
 65 <400> 14

ES 2 432 852 B1

	gcgcatgttg ttctataccg	20
5	<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
10	<220> <223> caiB Oligo Forward	
15	<400> 15 ccggaagatt ggtgtactcc	20
20	<210> 16 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
25	<220> <223> caiB Oligo Reverse	
30	<400> 16 ccgatattt catcgaagcc	20
35	<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
40	<220> <223> caiC Oligo Forward	
45	<400> 17 ggcgacaagg ttgcactaca	20
50	<210> 18 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
55	<220> <223> caiC Oligo Reverse	
60	<400> 18 agcccgaacc agcaaaaga	19
65	<210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
70	<220> <223> fixA Oligo Forward	
75	<400> 19 gcaggctttg atctgatcct	20
80	<210> 20 <211> 20	

ES 2 432 852 B1

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 5 <223> fixA Oligo Reverse

 <400> 20
 ctcaacggtg agggtatctg 20

 10
 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 15
 <220>
 <223> idc Oligo Forward

 <400> 21
 20 ggcacaaggc aagaagatca c 21

 <210> 22
 <211> 23
 25 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> icd Oligo Reverse

 30
 <400> 22
 agggataatc ggatttcag gaa 23

 35 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 40 <220>
 <223> pta Oligo Forward

 <400> 23
 45 tcgcaaacta ccacgctaac a 21

 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 50 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> pta Oligo Reverse

 <400> 24
 55 agactgggca aactggtgct t 21

 <210> 25
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 65 <223> aceA Oligo Forward

ES 2 432 852 B1

<400> 25
agcctcggcg cactg 15

5
<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10
<220>
<223> aceA Oligo Reverse

15 <400> 26
tagactgctt caataccgc ttc 24



②① N.º solicitud: 201230867

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.06.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P13/00** (2006.01)
C12P1/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CASTELLAR, M.R. et al., 'L(-)-carnitine production using a recombinant Escherichia coli strain.', ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 2001, Vol. 28, Nos. 9-10, páginas 785-791, ISSN: 0141-0229, todo el documento.	1-11
A	CASTELLAR, M.R. et al., 'Biotransformation of D(+)-carnitine into L(-)-carnitine by resting cells of Escherichia coli O44 K74.', JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 1998, Vol. 85, No. 5, páginas 883-890, ISSN: 1364-5072, todo el documento.	1-11
A	SEVILLA, A. et al., 'Design of metabolic engineering strategies for maximizing L(-)-carnitine production by Escherichia coli. Integration of the metabolic and bioreactor levels.', BIOTECHNOLOGY PROGRESS, 2005, Vol. 21, No. 2, páginas 329-33, ISSN: 8756-7938, todo el documento.	1-11
A	BERNAL, V. et al., 'Production of L-carnitine by secondary metabolism of bacteria.', MICROBIAL CELL FACTORIES, 2007, Vol. 6, página 31, ISSN: 1475-2859 (Electronic), todo el documento.	1-11
A	WO 2004104207 A1 (UNIVERSIDAD DE MURCIA [ES]) 02.12.2004, todo el documento.	1-11

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:

Fecha de realización del informe
21.08.2013

Examinador
J. L. Vizan Arroyo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.08.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CASTELLAR, M.R. et al., 'L(-)-carnitine production using a recombinant Escherichia coli strain.', ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 2001, Vol. 28, Nos. 9-10, páginas 785-791, ISSN: 0141-0229, todo el documento.	
D02	CASTELLAR, M.R. et al., 'Biotransformation of D(+)-carnitine into L(-)-carnitine by resting cells of Escherichia coli O44 K74.', JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 1998, Vol. 85, No. 5, páginas 883-890, ISSN: 1364-5072, todo el documento.	
D03	SEVILLA, A. et al., 'Design of metabolic engineering strategies for maximizing L(-)-carnitine production by Escherichia coli. Integration of the metabolic and bioreactor levels.', BIOTECHNOLOGY PROGRESS, 2005, Vol. 21, No. 2, páginas 329-33, ISSN: 8756-7938, todo el documento.	
D04	BERNAL, V. et al., 'Production of L-carnitine by secondary metabolism of bacteria.', MICROBIAL CELL FACTORIES, 2007, Vol. 6, página 31, ISSN: 1475-2859 (Electronic), todo el documento.	
D05	WO 2004104207 A1 (UNIVERSIDAD DE MURCIA [ES])	02.12.2004

En D1-D5 se describen diferentes procedimientos para producir L-carnitina mediante estirpes de Escherichia coli modificadas genéticamente.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un procedimiento para la producción de L-carnitina a partir de una estirpe de E.coli modificada genéticamente caracterizada porque contiene mutaciones para acelerar el flujo sobre el citrato, para evitar la producción de γ -butirotbetaína, para incrementar la expresión del gen estructural y del gen regulador (caiF) del operón cai. En el estado de la técnica más próximo, representado por los documentos D1-D5, no se ha divulgado un procedimiento para producir L-carnitina que comparta las mismas características técnicas del reivindicado en la solicitud de patente. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia combinando la información descrita previamente en este campo de la técnica.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-11 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.