



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 152 864**

②① Número de solicitud: 009802324

⑤① Int. Cl.⁷: C12P 13/00

C12P 1/04

//(C12P 1/04

C12R 1:19)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **05.11.1998**

③① Prioridad: **08.11.1997 DE 197 49 480**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2001**

Fecha de concesión: **20.07.2001**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.09.2001**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.09.2001

⑦③ Titular/es: **UNIVERSIDAD DE MURCIA**
Avda. Teniente Flomesta, s/n
Edf. Convalecencia 3ª planta
30003 Murcia, ES

⑦② Inventor/es: **Iborra Pastor, José Luis;**
Canovas Díaz, Manuel;
Obón de Castro, José María y
Kleber, Hans Peter

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤④ Título: **Procedimiento para la fabricación de L-carnitina a partir de crotonobetaína.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento para la fabricación de L-carnitina a partir de crotonobetaína.

Consiste en la obtención de una manera económicamente ventajosa, de L-carnitina a partir de crotonobetaína, sales de crotonobetaína o derivados a través de células inmovilizadas de *Escherichia coli* 044 K74 en un reactor de reciclado de células que funciona de forma continua. Las células en crecimiento o en reposo de *E. coli* son retenidas en un reactor de reciclado de células que funciona de forma continua, por medio de membranas de micro o ultrafiltración, que están dispuestas como módulo de membrana plana o de fibras huecas.

La L-carnitina tiene numerosas aplicaciones clínicas, entre las que destacan la profilaxis y tratamiento de las enfermedades cardíacas.

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

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

ES 2 152 864 B1

DESCRIPCION

Procedimiento para la fabricación de L-carnitina a partir de crotonobetaína.

5 La invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de L-carnitina a partir de crotonobetaína, a partir de sales de crotonobetaína, otros derivados de crotonobetaína o similares.

Se conoce que la L-carnitina, un compuesto que se encuentra en todas partes, juega un papel importante en el metabolismo -especialmente en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondriana interna. A partir de la función de la carnitina en el metabolismo de eucariontes se derivan numerosas aplicaciones clínicas, por ejemplo en el tratamiento de pacientes con síndromes de deficiencia de carnitina, en la profilaxis y terapias de diferentes enfermedades cardíacas así como en el tratamiento de pacientes de hemofilia. Además, la L-carnitina tiene importancia como sustancia nutritiva complementaria y favorece, como aditivo a medios de fermentación también el crecimiento de levaduras y bacterias. La necesidad creciente de este enantiómero de L-carnitina biológicamente activo para éstas y otras aplicaciones ha conducido a una investigación en todo el mundo de vías de síntesis para esta betaína en una forma ópticamente pura, de manera que racemato químicamente sintetizado no se puede utilizar en virtud de la inhibición de la acetiltransferasa de carnitina como también de la proteína portadora de carnitina.

20 Para el aislamiento del L-isómero se utilizan hasta ahora procedimientos, que se basan en la disociación de racemato por medio de cristalización fraccionada utilizando ácidos ópticamente activos (por ejemplo, la patente US 4.254.053, 1981), donde se obtiene D(+)-carnitina como producto de desecho. Este problema se puede solucionar por medio de diferentes procedimientos biológicos, partiendo de etapas previas aquirales económicas (Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 1993, 50, 21-44). De especial interés es la hidratación estereoespecífica de trans-crotonobetaína en L-carnitina aplicando cepas de Genera *Escherichia* (ED 0121444.1984; DD 221 905, 1987; EP 0320460, 1989) o *Proteus* (Agric. Biol. Chem., 1988, 52, 2415-2421; patente US 5.300.430, 1994). La ventaja de este método consiste en que esta etapa previa aquiral se puede obtener también mediante deshidratación química del producto de desecho D-carnitina.

30 Los numerosos procedimientos descritos en la bibliografía con microorganismos inmovilizados en un sistema de reactor que funciona de forma continua tienen la ventaja de que:

- se pueden utilizar medios de reacción puros y de esta manera se facilita la extracción así como el proceso de purificación,
- mediante el empleo de elevadas concentraciones del biocatalizador en el medio de reacción se consiguen productividades elevadas y al mismo tiempo se reduce la posibilidad de contaminaciones,
- se obtiene una reducción de la sensibilidad frente a inhibidores o una deficiencia de sustancia nutritiva,
- se consigue una estabilidad elevada del biocatalizador.

45 Las ventajas mencionadas se pueden utilizar también en un proceso utilizado comercialmente.

Un reactor que funciona de manera continua, en el que se retienen microorganismos por medio de membranas de micro o ultrafiltración, es un procedimiento de inmovilización, que posee, además de la ventaja mencionada anteriormente, también el coste reducido para la inmovilización y al mismo tiempo posibilita un incremento de escala muy fácil.

50 De acuerdo con ello, la invención tiene como objeto un procedimiento para la producción de L-carnitina a partir de crotonobetaína, sales de crotonobetaína u otros derivados de crotonobetaína en un reactor continuo con células libres o inmovilizadas, células en crecimiento o en reposo de *Escherichia coli* 044K74 (DSM 8828), que son retenidas por medio de membranas de micro o ultrafiltración en módulos de membrana plana o de fibras huecas.

60 *E. coli* se mantiene en el reactor mencionado a temperaturas entre 20 y 40°C, valores-pH entre pH 6,0 -8,0 y en condiciones anaerobias, que son necesarias para la inducción de enzimas metabolizantes de carnitina. Como medios de reacción se emplea un medio mínimo o complejo. En ambos casos se añade crotonobetaína, sales de crotonobetaína u otros derivados de crotonobetaína en concentraciones entre 25 mmol y 1 M. El medio mínimo contiene diferentes concentraciones de hidrolisato de caseína y sales (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄ x 7H₂O, MnSO₄ x 4H₂O, FeSO₄ x 7H₂O), mientras que el

medio complejo contiene diferentes concentraciones de peptona pancreática y NaCl. Para la mejora del crecimiento de *E. coli* se añaden glicerina, glucosa, ribosa, sacarosa o lactosa. Adicionalmente se añaden al medio inhibidores, que impiden la transformación de crotonobetaína en γ -butirobetaína (fumarato, glucosa o nitrato) e inductores de enzimas metabolizantes de carnitina como D-, L-, DL-carnitina, sus sales y derivados o crotonobetaína, sus sales y derivados.

El desarrollo de la reacción en el reactor de reciclado de células continuo utilizado aquí se puede dividir en dos secciones. Una sección consta de un depósito de reactor, en el que células de *E. coli* junto con el medio de reacción transforman la mayor parte de la crotonobetaína en L-carnitina. Este depósito de reactor posee elementos de control para valor-DH, temperatura y velocidad de agitación así como para el control y corrección de la concentración de oxígeno. La alimentación del medio de reacción en el reactor se realiza por medio de una bomba dosificadora. Cuando es necesario, debe realizarse una descarga del depósito del reactor de medio excedente. La segunda sección consta de un circuito de retorno externo, que está conectado en el depósito del reactor y que conduce por medio de una bomba el contenido del reactor a través de una unidad de filtro. Mientras el filtrado se acumula, para aislar L-carnitina como producto de reacción del mismo, el residuo de la filtración se alimenta de nuevo al reactor. Para la filtración de la suspensión de células se pueden emplear sistemas de filtros comerciales de diferente procedencia, mientras posean un tamaño de poro, que está por debajo del tamaño de las células de *E. coli*. La velocidad de la bomba de retorno permanece inalterada, para conseguir las mejores velocidades de filtración posibles y para reducir al mínimo la formación de una membrana de polarización durante el proceso de filtración.

La expresión células de *E. coli* libres designa el estado, en el que todas las células están suspendidas en el medio de reacción, sin que se impida una salida de células a través de la solución de salida. La expresión células inmovilizadas describe el estado, en el que todas las células están ligadas a polímeros solubles o soportes insolubles, o están encerradas en sistemas de membranas (en *Methods in Enzymol.* 1987, Vol. 135, 3-30).

El concepto condiciones de crecimiento se define como la situación, en la que todas las células consumen substrato durante su ciclo de vida y forman productos. Por condiciones en reposo se entienden células intactas, pero que no crece, que muestran en determinadas condiciones prestaciones de metabolismo especiales (En "Biotechnology" (Kieslich, K.; Eds. Rehm, H.J. y Reed, G.), Verlag Chemie, Weinheim, Alemania. 1984. Vol. 6a, 5-30).

El procedimiento se explica a continuación en ejemplos de realización propios:

Ejemplo 1

Se cultivó *Escherichia coli* 044 K74 en un matraz Erlenmeyer lleno hasta el borde, cerrado herméticamente a 37°C en condiciones anaerobias sobre un vibrador giratorio (150 r.p.m.). El medio complejo empleado tenía la siguiente composición: 50 mM de crotonobetaína, 50 mM de fumarato, 5 g/l de NaCl y diferentes concentraciones (entre 0,5 y 10 g/l) de peptona pancreática. El pH se ajustó por medio de KOH a pH 7,5. En la Tabla 1 se agrupan las velocidades de crecimiento específicas en diferentes concentraciones de peptona.

TABLA 1

Velocidad de crecimiento específica máxima de Escherichia coli 044 K74

(Peptona/g/l)	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,224	0,296	0,351	0,372	0,325

En las condiciones mencionadas, células en crecimiento de *E. coli* están en condiciones de producir de 20 - 30 mM de L-carnitina hasta la terminación del ensayo.

Concentraciones superiores a 5 g/l de peptona dan como resultado tanto parámetros de crecimiento y cinéticos como también contenidos de biomasa (OD 600 nm). En oposición a ello, en concentraciones de peptona más bajas se obtienen parámetros de crecimiento reducidos.

ES 2 152 864 B1

Ejemplo 2

Se cultivó *Escherichia coli* 044 K74 en un matraz Erlenmeyer lleno hasta el borde, cerrado herméticamente a 37°C en condiciones anaerobias sobre un vibrador giratorio (150 r.p.m.). El medio complejo empleado tenía la siguiente composición: 50 mM de crotonobetaína, 5 g/l de peptona pancreática, 5 g/l de NaCl así como concentraciones escalonadas (entre 0 y 75 mM) de fumarato. El pH se ajustó con KOH a pH 7,5.

La Tabla 2 muestra que una adición de fumarato condiciona elevadas velocidades de crecimiento de *E. coli* 044 K74 y una OD a 600 nm de aproximadamente 1,0 en estado estable. Además, el fumarato provoca una formación de L-carnitina de 20 - 30 mM hasta el final del crecimiento. En ausencia de fumarato se obtiene una concentración de carnitina de sólo 5 mM.

TABLA 2

Biomasa (OD_{600nm}) en diferente concentración de fumarato después de 10 h de ensayo.

Fumarato (mM)	0	25	50	75
μ_{max} (h^{-1})	0,2	0,37	0,38	0,39
Biomasa OD (600 nm)	0,980	0,910	1,00	0,950

Ejemplo 3

La aptitud de *Escherichia coli* 044 K74 para formar L-carnitina a partir de crotonobetaína, se induce por medio de crotonobetaína. Los estudios de inducción se realizaron con crotonobetaína entre 5 y 75 mM utilizando células en reposo. En concentraciones elevadas de crotonobetaína se obtuvieron proporciones de conversión de sobre 60 % de L-carnitina (Tabla 3).

TABLA 3

Dependencia de la producción de L-carnitina por medio de células en reposo de Escherichia coli 044 K74 en función de diferentes concentraciones de crotonobetaína.

Crotonobetaína (mM)	5	25	50	75
Producción de L-carnitina (%)	55	60	62	65

Ejemplo 4

Se cultivó *Escherichia coli* 044 K74 en un matraz Erlenmeyer lleno hasta el borde, cerrado herméticamente a 37°C en condiciones anaerobias sobre un vibrador giratorio (150 r.p.m.). El medio complejo empleado tenía la siguiente composición: 50 mM de crotonobetaína, 5 g/l de peptona pancreática, 5 g/l de NaCl y 50 mM de fumarato. El pH se ajustó con KOH a 7,5.

Para elevar la concentración de biocatalizador en el reactor y posibilitar una producción de L-carnitina en proporciones de dilución mayores que la velocidad de crecimiento específica máxima, se utilizó un reactor de membrana. Las células se retuvieron por medio de una membrana de microfiltración de polisulfona con un límite de desecho de 0,1 μm y se utilizaron repetidas veces. Las membranas se dispusieron en un módulo de placas. En la Tabla 4 se resume el contenido de biomasa y en la Tabla 5 la producción de carnitina, la conversión de crotonobetaína y la productividad en este sistema.

ES 2 152 864 B1

TABLA 4

Contenido de biomasa de *E. coli* 044 K74 en un reactor de membrana que funciona continuamente

5	Proporción de dilución (h^{-1})	0,0	0,2	1,0	2,0
10	Biomasa (g peso en seco/l)	0,5	2,1	9,4	27,0

TABLA 5

Producción de L-carnitina, conversión de crotonobetaína y productividad en un reactor celular que funciona de forma continua con *Escherichia coli* 044 K74

20	Proporción de dilución (h^{-1})	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
25	Producción de L-carnitina (%)	0,0	38	42	42	38
30	Conversión de crotonobetaína	0,0	24	26	26	30
	Productividad ($\text{g/l}_{\text{reactor}}/\text{h}$)	0,0	1,75	3,5	5,5	6,5

A partir de las tablas se deduce que con células inmovilizadas de *Escherichia coli* 044 K74 se un reactor de reciclado de células se consigue una formación de L-carnitina a partir de crotonobetaína de 6,5/1/h con una proporción de metabolización de aproximadamente 40 %.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la fabricación de L-carnitina a partir de crotonobetaína, **caracterizado** porque un microorganismo inmovilizado en un reactor celular que funciona de forma continua convierte la
5 substancia de partida crotonobetaína como tal o en forma de sus sales o derivados en L-carnitina.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el microorganismo es *E. coli* 044 K74 (DSM 8828).
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque *E. coli* se inmoviliza en material de soporte, que no perjudica su viabilidad.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque como material de soporte se utiliza cerámica, perlas de vidrio, discos de poliuretano.
- 15 5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la mezcla de reacción se filtra de cerámicas, que llevan el microorganismo, se separa la L-carnitina de una manera conocida y se retorna la crotonobetaína al circuito.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la concentración de crotonobetaína en el medio de reacción está entre 25 mM y 1 M.
7. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque al medio complejo comercial usual que afluye al reactor o al medio mínimo *E. coli* bien definido se añaden aceptores de electrones de la respiración de los inhibidores como fumarato, nitrato, oxígeno, óxido-N o glucosa, que
25 impiden la hidrogenación de la crotonobetaína en γ -buritobetaína.
8. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque al medio mínimo se añaden inductores de enzimas metabolizantes de carnitina como L-, D-, o DL-carnitina, derivados y sales de las mismas así como crotonobetaína, derivados y sales de la misma.
30
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque se cultiva *E. coli* 044 K74 de forma anaerobia o parcialmente anaerobia en un medio complejo, manteniendo una concentración de fumarato de 50 mM.
35
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque se cultiva *E. coli* 044 K74 de forma anaerobia o parcialmente anaerobia en un medio complejo, donde el medio complejo contiene 50 mM de crotonobetaína, 5 g/l de peptona pancreática, 5 g/l de NaCl y 50 mM de fumarato, presenta un pH de 7,5 y la reacción se desarrolla en un reactor de membrana que funciona continuamente.
40
11. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque el retorno de las bacterias al reactor se realiza de forma continua utilizando módulos de filtración de corriente transversal o de fibras huecas comerciales, que están constituidos por membranas de ultra o microfiltración conocidas en si de diferente composición química como celulosa, polisulfona o polisulfona polisulfonada con un límite
45 de desecho de 300 kDa o 0,2 μ .
12. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la síntesis se realiza en condiciones anaerobias o parcialmente anaerobias.
- 50 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la producción de carnitina se realiza en un reactor que funciona de forma continua a diferentes proporciones de dilución, que se ajustan por medio de dos bombas, la bomba dosificadora y la bomba de filtración, y a diferentes velocidades de agitación y concentraciones de biomasa.
- 55 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado** porque la velocidad de salida de la corriente de filtración se controla mediante la dirección del proceso.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 115, n° 1, 08.07.1991 (Columbus, OHIO, US) Resumen n° 6956. JUNG, H. et al.: "Production of L(-)-carnitine by biotransformation" XP002096268 DECHEMA BIOTECHNOL. CONF. (1990), 4 (PT. B, LECT. DECHEMA ANNU. MEET. BIOTECHNOL. 8th, 1990), 1041-4 CODEN: DBCOEU	1
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 117, n° 19, 08.11.1992 (Columbus, OHIO, US) Resumen n° 187989. JUNG, H. et al.: "L(-)-Carnitine synthesis by stereoselective hydratation of crotonobetaine" XP002096269. PROC. -EUR. CONGR. BIOTECHNOL., 5TH (1990), Volumen 1, 251-4. EDITOR(S): CHRISTIANSEN C.; MUNCK, L.; VILLADSEN, J., PUBLISHER: MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DEN. CODEN: 57RVAO	1
A	EP 320460 A (SIGMA TAU IND FARMACEUTI) 14.06.1989, reivindicaciones.	1
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 128, n° 2, 12.01.1998 (Columbus, OHIO, US) Resumen n° 12603. OBON, JOSE MARIA et al.: L(-)-Carnitine production with immobilized Escherichia coli cells in continuous reactors" XP002096270. ENZYME MICROB. TECHNOL. (1997), 21 (7), 531-536. CODEN: EMTED2; ISSN: 0141-0229	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

18.12.2000

Examinador

A. Santos Díaz

Página

1/1