

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 677**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/04** (2006.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)  
**C12R 1/545** (2006.01)  
**C12P 7/22** (2006.01)  
**C12P 7/24** (2006.01)  
**C12P 7/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2008 E 08762131 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **02.12.2009 EP 2126059**

54 Título: **Sistema de producción de moléculas aromáticas en Streptomyces**

30 Prioridad:

**21.02.2007 FR 0701229**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.02.2013**

73 Titular/es:

**V. MANE FILS (100.0%)  
620, ROUTE DE GRASSE  
06620 BAR SUR LOUP, FR**

72 Inventor/es:

**LAMBERT, FANNY;  
ZUCCA, JOSEPH y  
MANE, JEAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 394 677 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Sistema de producción de moléculas aromáticas en *Streptomyces*.

La presente invención se refiere a la producción de moléculas aromáticas naturales. Más particularmente, la presente invención se refiere a la bioconversión en una bacteria de sustratos, preferiblemente eugenol, en derivados fenólicos principalmente alcohol coniferílico y ácido ferúlico, utilizándose dichos derivados para la producción de vainillina natural empleada en aromaticidad alimentaria o en perfumería (aromas o fragancias).

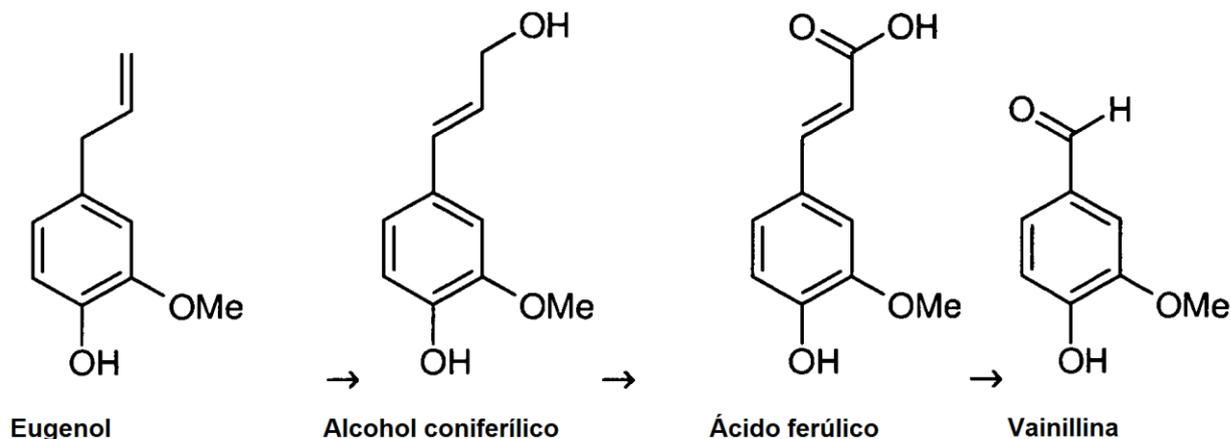
La vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) es el componente principal responsable de las propiedades olfativas y gustativas del extracto de vainilla derivado de vainas de *Vanilla planifolia*. Se trata de una de las moléculas aromáticas más utilizadas en la industria. Sin embargo, la producción de vainillina natural a partir de vaina de vainilla o de extracto de vainilla no cubre más que el 20% de este mercado; su utilización está limitada debido por una parte al potencial de vainas disponibles a nivel mundial y por otra al elevado precio, muy fluctuante, de estas vainas (del orden de 30 €/kg a 450 €/kg es decir como mínimo 1500 €/kg de potencial en vainillina natural).

La vainillina de síntesis es por consiguiente utilizada frecuentemente como un sustituyente barato (aproximadamente 15 €/kg) de la vainillina natural para aplicaciones en perfumería, en cosmética y en las industrias agroalimentarias. Los aromas de síntesis son sin embargo menos apreciados por los consumidores que los aromas naturales.

Este es el motivo por el que se busca obtener moléculas aromáticas naturales, en particular la vainillina, por procedimientos biológicos, principalmente de bioconversión, que utilizan microorganismos tales como bacterias.

En el sentido de la presente invención, se entiende por bioconversión la transformación biológica de un sustrato, preferiblemente procedente de una fuente natural, para obtener aromas, fragancias o precursores de aromas o de fragancias naturales.

La vainillina se puede producir según el esquema de reacción siguiente:



En la técnica anterior ya se han descrito varios procedimientos de producción de moléculas naturales, tal como la vainillina.

Principalmente, la patente EP 0885968 describe un procedimiento de producción de vainillina en una bacteria que pertenece al género *Streptomyces*. Este procedimiento comprende: a) el cultivo en un medio apropiado de una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* de manera que se forme un caldo de fermentación, b) la adición a dicho caldo de 5 a 40 g/L de ácido ferúlico, de forma que se produzca la vainillina, y c) la extracción de la vainillina y del guayacol que se producen.

Otro ejemplo descrito en el artículo de J. Overhage et al., divulga: 1) la expresión del gen de la vainillil-alcohol-oxidasa en *Escherichia coli* y 2) la expresión de los genes *calA* (que codifica la coniferil-alcohol-deshidrogenasa) y *calB* (que codifica la coniferil-aldehído-deshidrogenasa). Este procedimiento permitiría la producción de ácido ferúlico como producto principal de la conversión de eugenol por la cepa recombinante final *E. coli* XL1 Blue (pSKvaom-PcalAmcalB) (Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*, 2003, Applied and Environmental Microbiology pp. 6569-6576). Se indica que el ácido ferúlico producido por esta cepa podría servir de sustrato a una segunda cepa multi-recombinada *E. coli* (pSKechE/Hfcs) para producir vainillina natural (J. Overhage et al., Appl. Env. Microbiol. 65: 4837-4847, 1999)

El documento WO 2007/099230 describe un procedimiento de producción de ácido ferúlico, alcohol coniferúlico y/o vainillina naturales a partir de eugenol en levadura pero no hace ninguna mención del género Streptomycetaceae como hospedante potencial para la expresión heteróloga del gen vao.

5 El documento WO 01/55342 describe diferentes secuencias de ácidos nucleicos de síntesis, optimizadas para aumentar su expresión en un sistema heterólogo. Más particularmente, este documento describe la secuencia sintética del gen vaoA (SEQ ID N°67 página 30, líneas 33-38) que además es idéntica en un 84% a la secuencia optimizada SEQ ID N°1 y en un 78% a la secuencia optimizada SEQ ID N°8 considerada en toda su longitud. Sin embargo, en este documento, los genes sintéticos se obtienen con el fin de una mayor expresión en las bacterias entéricas (entre ellas E. coli) pero no en Streptomycetaceae.

10 Un último ejemplo de producción de derivados fenólicos a partir de eugenol está descrito en el artículo «Harnessing eugenol as a substrate for production of aromatic compounds with recombinant strains of Amycolatopsis sp HR167» (J. Biotechnol. 2006 Sep 18;125(3):369-76. Epub 2006 May 4. Overhage J, Steinbuechel A, Priefert H.). Este artículo describe la expresión del gen de la vainillil-alcohol-oxidasa en la cepa Amycolatopsis sp HR167, permitiendo catalizar la conversión de eugenol en alcohol coniferílico, aldehído coniferílico, ácido ferúlico, guayacol y ácido vainillínico. Estos tres ejemplos de producción de precursores de vainillina natural o de vainillina natural propiamente dicha presentan el inconveniente en primer lugar de tener un coste de producción relativamente elevado debido a la utilización de ácido ferúlico purificado que es una materia prima cara y por otro lado ser difíciles de realizar industrialmente debido a: 1) la utilización de cepas multi-recombinadas no alimentarias; y 2) el bajo rendimiento de las bioconversiones.

20 Para que un procedimiento biológico que emplea microorganismos pueda ser rentable, es preferible utilizar un sustrato muy disponible y barato y un microorganismo inofensivo y genéticamente estable. Los inventores han buscado también poner a punto un procedimiento de producción de precursores de vainillina natural o vainillina natural propiamente dicha, que sea sencillo de realizar industrialmente, es decir que no conste preferiblemente más que de una sola etapa y cuyo coste de producción sea menor que el de la técnica anterior. La solución propuesta por la invención es utilizar un sustrato natural disponible y de bajo coste que es eugenol así como una cepa de clase 1 que pertenezca al género Streptomyces, tal como por ejemplo Streptomyces griseus.

25 Así, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de fabricación de vainillina o de precursores de vainillina tales como ácido ferúlico o alcohol coniferílico, o incluso una mezcla que contenga los precursores de vainillina y la vainillina, por bioconversión de eugenol, en una bacteria perteneciente al género Streptomyces, tal como se define en la reivindicación 1. En un primer modo de realización, el procedimiento de la invención permite fabricar vainillina. En un segundo modo de realización, el procedimiento de la invención permite fabricar ácido ferúlico. En un tercer modo de realización, el procedimiento de la invención permite fabricar alcohol coniferílico. En un cuarto modo de realización, el procedimiento de la invención permite fabricar una mezcla de alcohol coniferílico, ácido ferúlico y/o vainillina.

30 El procedimiento de la invención se realiza con ayuda de una bacteria perteneciente al género Streptomyces que comprende la secuencia SEQ ID NO :1 o la secuencia SEQ ID NO :8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :8. Las secuencias SEQ ID NO :1 y SEQ ID NO :8 corresponden al gen de la vainillil-alcohol-oxidasa presente en el genoma del hongo filamentoso Penicillium simplicissimum, habiendo sido optimizado dicho gen para ser leído en una bacteria perteneciente al género Streptomyces.

La presente invención tiene por consiguiente la ventaja de permitir la producción en una sola etapa, por medio de un catalizador biológico, de vainillina natural, alcohol coniferílico y/o ácido ferúlico naturales, esencialmente desprovistos de impurezas y a bajo precio.

45 Otro objeto de la invención es una bacteria perteneciente al género Streptomyces que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO 8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :8.

Preferiblemente, la bacteria es Streptomyces griseus.

50 Otro objeto de la invención es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 y la secuencia SEQ ID NO :8. La secuencia original de la vainillil-alcohol-oxidasa está presente en el genoma del hongo filamentoso Penicillium simplicissimum. Los codones presentes en el ADN de Penicillium simplicissimum no pueden utilizarse para la transcripción por una bacteria perteneciente al género Streptomyces. Por consiguiente los inventores han sustituido estos codones por codones apropiados leídos por una bacteria perteneciente al género Streptomyces, de forma que se obtenga una secuencia nucleotídica optimizada (SEQ ID NO :1 y SEQ ID NO :8).

Otro objeto de la invención es un vector de expresión que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o al menos una secuencia SEQ ID NO :8. Se entiende por «vector» o «vector de expresión» cualquier

secuencia de ADN en la que es posible insertar fragmentos de ácido nucleico extraño, permitiendo los vectores introducir ADN extraño en una célula hospedante. Ejemplos de vectores son plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC) y cromosomas artificiales derivados del bacteriófago P1 (PAC) o vectores derivados de virus.

5 En un modo de realización de la invención, el vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o la secuencia SEQ ID NO :8 es un vector bifuncional específico de las bacterias pertenecientes al género *Streptomyces*. Se entiende por vector bifuncional cualquier plásmido capaz de replicarse en dos organismos hospedantes diferentes debido a que lleva dos orígenes de replicación diferentes y, en consecuencia, puede ser utilizado para transferir genes de un hospedante a otro. En el sentido de la presente invención, un vector bifuncional  
10 específico de las bacterias pertenecientes al género *Streptomyces* es un vector que comprende medios que permiten su expresión en dichas bacterias. Preferiblemente, el vector bifuncional comprende un gen oriT que permite una conjugación intergenérica y principalmente una expresión tanto en *E. coli* como en una bacteria perteneciente al género *Streptomyces*.

15 Más preferiblemente, el vector de expresión utilizado en la invención, comprende: 1) secuencias (bien un gen de integración o bien un gen de replicación) que permitan la introducción y el mantenimiento de la secuencia SEQ ID NO :1 o de la secuencia SEQ ID NO :8 en la cepa, 2) un gen de resistencia a un antibiótico, 3) secuencias que permitan la escisión del marcador de selección en la cepa industrial final, 4) un origen de transferencia oriT de tipo RP4 que permita la conjugación intergenérica entre *E. coli* y *Streptomyces*; 5) un promotor y 6) un terminador fuertes para la expresión de la secuencia SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 y 7) una secuencia MCS.

20 En un modo de realización de la invención, el vector de expresión se elige entre un vector integrador o un vector altamente replicable de tipo multicopia. Preferiblemente, el vector se elige entre los vectores integradores pFLA2 y pFLA3. Estos vectores integradores tienen la ventaja de permitir una integración simple o múltiple de un gen de interés en la cepa final. La escisión del marcador de selección permite reutilizar el mismo vector para transformar de nuevo la cepa y aumentar así el número de copias del gen de interés.

25 Según otra preferencia, el vector altamente replicable de tipo multicopia es el vector pFLA4. Este vector presenta la ventaja de replicarse numerosas veces en el hospedante, asegurando así un gran número de copias del gen de interés en el hospedante.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de producción de ácido ferúlico, alcohol coniferílico y/o vainillina, que comprende la bioconversión de eugenol por una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* que comprende  
30 al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :8.

Dicha bacteria se obtiene por:

35 a) clonación de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 correspondiente al gen de la vainillil-alcohol-oxidasa en un vector de expresión, preferiblemente específico de las bacterias perteneciente al género *Streptomyces*,

b) transformación del vector de expresión obtenido en a) en una bacteria competente, preferiblemente *E. coli* DH5 $\alpha$ ,

40 c) transferencia del vector de expresión que comprende la secuencia SEQ ID NO :1 o la secuencia SEQ ID NO :8 (después de los ensayos de actividad de la enzima producida) a *E. coli* ET12567 (pUZ8002),

d) transformación o conjugación de una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* con la bacteria obtenida en c), y

e) selección de las mejores bacterias transformantes obtenidas en d) en presencia del sustrato eugenol.

45 Según un modo de realización de la invención, la secuencia SEQ ID NO :1 o la secuencia SEQ ID NO :8 se clona en un vector de expresión, siendo dicho vector preferiblemente un vector bifuncional específico de las bacterias perteneciente al género *Streptomyces*. Para ello, la secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 comprendida en un vector de tipo pUC57 y dicho vector de expresión son en un primer momento digeridos por una o varias enzimas de restricción. La secuencia SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 se inserta a continuación por simple ligamiento o cualquier otro medio de inserción en el vector de expresión.

50 Las bacterias del tipo *E. coli* DH5 $\alpha$  se transforman según cualquier procedimiento conocido con el producto de ligamiento (vector de expresión que comprende la secuencia SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8). A continuación se seleccionan las bacterias que contienen el vector de expresión gracias al marcador de selección, preferiblemente un gen de resistencia a los antibióticos, presente en el vector de expresión. Ventajosamente, este marcador de selección es el gen de resistencia a la tioestreptona.

Ventajosamente, el vector de expresión se introduce a continuación por transformación en bacterias competentes, preferiblemente la cepa E. coli ET12567. A continuación se seleccionan las bacterias transformantes según el método descrito anteriormente.

- 5 Por último, la transferencia del gen de la vainillil-alcohol-oxidasa en una bacteria perteneciente al género Streptomyces puede realizarse por conjugación o transformación. Dichas bacterias que comprenden el gen de la vainillil-alcohol-oxidasa integrado o no en su genoma se seleccionan según el método descrito anteriormente.

Las bacterias pertenecientes al género Streptomyces y que comprenden el gen de la vainillil-alcohol-oxidasa se cultivan entonces en condiciones que permitan la expresión de dicho gen y en presencia de eugenol.

- 10 Preferiblemente, las bacterias se incuban en un medio cuyo pH es inferior a 10, preferiblemente comprendido entre 6 y 9,5, y preferiblemente comprendido entre 7 y 9, y más preferiblemente comprendido entre 7,5 y 8,5; y cuya temperatura está comprendida entre 27 y 40°C, preferiblemente entre 27 y 39°C, más preferiblemente entre 29 y 37°C e incluso más preferiblemente entre 36 y 37°C, es decir igual a 37°C.

En un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención comprende:

- 15 1) el cultivo de una bacteria perteneciente al género Streptomyces que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :8,
- 2) la adición en una sola dosis de eugenol como sustrato de bioconversión en el medio de fermentación en una cantidad comprendida entre 5 y 40 g/L, preferiblemente entre 10 y 35 g/L, y
- 20 3) la extracción de alcohol coniferílico del medio de fermentación.

Según este procedimiento destinado a obtener una tasa de conversión mayoritaria en alcohol coniferílico, el sustrato eugenol se añade preferiblemente en una sola dosis al medio de cultivo de dicha bacteria y la cantidad de eugenol introducida está comprendida entre 5 y 40 g/L, preferiblemente de 10 a 25 g/L. Preferiblemente, la solución de eugenol añadida comprende una mezcla de eugenol, glucosa y aceite o una mezcla de eugenol, glicerol y aceite.

- 25 Preferiblemente, dichas bacterias se incuban en un medio cuyo pH está comprendido entre 8 y 10, preferiblemente entre 7 y 9 y más preferiblemente igual a 9. La aireación del medio está comprendida preferiblemente entre 0,1 y 1 L de aire/min. La agitación del medio es preferiblemente inferior a 1000 rpm para 3 L de medio, y más preferiblemente de 900 rpm para 3 L de medio. La temperatura del medio está comprendida preferiblemente entre 27 y 40°C, preferiblemente entre 27 y 39°C, más preferiblemente entre 27 y 37°C y más preferiblemente es 37°C.
- 30 En estas condiciones, la tasa de conversión del eugenol en alcohol coniferílico está comprendida generalmente entre aproximadamente 50 y 95% para una cantidad de sustrato introducido que varía de 10 a 25 g/L. El alcohol coniferílico es producido en una cantidad de 10 a 25 g/L.

En un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención comprende:

- 35 1) el cultivo de una bacteria perteneciente al género Streptomyces que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :8,
- 2) la adición continua de eugenol como sustrato de bioconversión en el medio de fermentación en una cantidad comprendida entre 5 y 30 g/L, preferiblemente de 10 a 25 g/L, y
- 40 3) la extracción de ácido ferúlico del medio de fermentación.

- Según este procedimiento destinado a obtener una tasa de conversión mayoritaria en ácido ferúlico, el sustrato se añade preferiblemente de continuo al medio de cultivo de dicha bacteria y la cantidad de eugenol final introducido está comprendida entre 5 y 30 g/L, preferiblemente de 10 a 25 g/L. Preferiblemente, la solución de eugenol añadida comprende una mezcla de eugenol, glucosa y aceite o una mezcla de eugenol, glicerol y aceite. Preferiblemente, la solución de eugenol se añade continuamente al medio durante 3 a 5 días con un caudal comprendido entre 0,2 g/L/h y 0,12 g/L/h.
- 45

- Preferiblemente, dichas bacterias se incuban en un medio cuyo pH está comprendido entre 8 y 10, preferiblemente entre 7 y 9 y más preferiblemente entre 7 y 8,5. La aireación del medio está comprendida preferiblemente entre 0,1 y 1 L de aire/min. La agitación del medio es preferiblemente inferior a 1000 rpm por 3 L de medio, y más preferiblemente de 900 rpm por 3 L de medio. La temperatura del medio está comprendida preferiblemente entre 27 y 40°C, preferiblemente entre 27 y 39°C, más preferiblemente entre 27 y 37°C y más preferiblemente es 37°C. El caudal de sustrato en el fermentador de 3L está comprendido entre 0,05 g de eugenol/L/hora y 1 g de
- 50

eugenol/L/hora. Preferiblemente, el caudal de eugenol se fija entre 0,15 y 0,7 g de eugenol/L/hora. En estas condiciones, la tasa de conversión en ácido ferúlico está comprendida generalmente entre aproximadamente 50 y 95% para una cantidad de sustrato introducido que varía de 10 a 25 g/L. El ácido ferúlico se produce en una cantidad de 10 a 25 g/L.

5 En un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención comprende:

1) el cultivo de una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :8,

10 2) la adición continua o en una sola dosis de eugenol como sustrato de bioconversión al medio de fermentación en una cantidad comprendida entre 5 y 50 g/L, preferiblemente 10 a 35 g/L, y

3) la extracción de la vainillina del medio de fermentación.

15 Según este procedimiento destinado a obtener una tasa de conversión lo más elevada posible en vainillina natural, dichas bacterias se incuban, preferiblemente, en un medio cuyo pH es inferior a 10, preferiblemente comprendido entre 7 y 9, y más preferiblemente entre 7,5 y 8,5. La aireación del medio está comprendida preferiblemente entre 0,1 y 1 L de aire/min. La agitación del medio es preferiblemente inferior a 1000 rpm para 3 L de medio, y más preferiblemente de 900 rpm para 3 L de medio. La temperatura del medio está comprendida preferiblemente entre 27 y 40°C, preferiblemente entre 27 y 39°C, más preferiblemente entre 27 y 37°C y más preferiblemente es 37°C.

20 Preferiblemente, la cantidad de eugenol añadida al medio de cultivo de dicha bacteria está comprendida entre 5 y 50 g/L, preferiblemente de 10 a 35 g/L. La adición de eugenol puede realizarse de continuo o en una sola dosis. Preferiblemente, la solución de eugenol añadida comprende una mezcla de eugenol, glucosa y aceite o una mezcla de eugenol, glicerol y aceite. Preferiblemente, cuando la solución de eugenol se añade de continuo al medio, la adición se realiza durante 3 a 5 días con un caudal comprendido entre 0,2 g/L/h y 0,12 g/L/h.

25 La tasa de conversión en vainillina está comprendida entre 30 y 72% para una cantidad de eugenol distribuida que varía de 10 a 35 g/L.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de producción de vainillina a partir de ácido ferúlico por la misma bacteria perteneciente al género *Streptomyces*. En efecto, la cepa posee de forma natural el patrimonio genético y enzimático que le permite ejecutar esta reacción. Así, tanto si contiene, como si no, la secuencia SEQ ID NO :1 o la secuencia SEQ ID NO :8, es capaz de convertir el ácido ferúlico en vainillina. En efecto se puede verificar que en condiciones apropiadas, la cantidad de vainillina producida puede estar comprendida entre 10 y 25 g/L, preferiblemente entre 14 y 24 g/L, cuando se administra a la cepa entre 28 y 36 g/L de ácido ferúlico.

30 Según otro modo de realización de la invención, la etapa de conversión del ácido ferúlico en vainillina se realiza por vía enzimática o vía bioquímica, principalmente según los procedimientos descritos en las patentes EP 0606441 y EP 0804606.

### 35 EJEMPLOS

La presente invención se comprenderá mejor con ayuda de la siguiente descripción que se refiere a los ejemplos de obtención de vectores de expresión que comprenden la secuencia SEQ ID NO :1, de bacterias perteneciente al género *Streptomyces* que comprenden estos vectores de expresión y a su utilización para la producción, por bioconversión, de eugenol, ácido ferúlico y vainillina.

40 En los siguientes ejemplos, dados con fines ilustrativos, se hará referencia a las figuras de los dibujos adjuntos, en las que:

la figura 1 corresponde al vector de expresión pFLA2,

la figura 2 corresponde al vector de expresión pFLA3,

la figura 3 corresponde al vector de expresión pFLA4.

45 1.- Obtención de la secuencia SEQ ID NO :1 correspondiente a la vainillil-alcohol-oxidasa optimizada para la transcripción en bacterias pertenecientes al género *Streptomyces*.

50 Ciertos codones del gen de la vainillil-alcohol-oxidasa presentes en *Penicillium simplicissimum* probablemente no son leídos por las bacterias perteneciente al género *Streptomyces*. Se consideran codones «probablemente no leídos» los codones que tienen una frecuencia de utilización en las bacterias perteneciente al género *Streptomyces* inferior a 10 por 1000. La frecuencia de utilización de los codones está descrita en la base de datos «codon usage database» (<http://www.kasuka.or.jp/codon/>). Según la frecuencia de utilización de los codones en las bacterias

pertenecientes al género *Streptomyces*, los inventores han creado una secuencia óptima SEQ ID NO :1 para la expresión de la vainillil-alcohol-oxidasa en estas células.

Los sitios de restricción se introdujeron en 5' y 3' para permitir la clonación de la secuencia en un vector. Los sitios de restricción añadidos son función de los sitios de restricción presentes en las zonas de sitios de clonación múltiple (MCS) de los vectores. En el extremo 3' de la secuencia se introducen igualmente los codones de PARADA y la cola de polihistidina que permiten una purificación rápida de la enzima producida por una columna de Ni-NTA.

La secuencia SEQ ID NO :1 optimizada fue sintetizada en el plásmido pUC57 por la sociedad GenScript.

2.- Construcción de cuatro vectores de expresión que comprenden la secuencia SEQ ID NO :1 : pFLA2, pFLA3 y pFLA4.

10 Construcción de pFLA2 (Figura 1):

Se utilizó el plásmido pRES19 como fuente del gen bla que codifican la beta-lactamasa. El gen bla se amplificó por PCR con los cebadores bla1F (5'CTCGAGAGACGAACTCCTTGAACC3', SEQ ID NO :2) y bla1R (5'GGCCTTACCAATGCTTAATCAG3', SEQ ID NO :3) para obtener un fragmento de 1,4 kb digerido por las enzimas de restricción XhoI y HaeIII. De la misma manera, se amplificó el gen tsr del plásmido pANT849 con los cebadores tsr1F (5'GAGCTCTGACTGAGTTGGACAC3', SEQ ID NO :4) y tsr1R (5'CTCGACTTATCGGTTGGCCG3', SEQ ID NO :5) y el fragmento de 821 pb obtenido fue digerido por las enzimas SacI y XhoI. Los fragmentos de ADN bla 1,4 kb (en los extremos XhoI/HaeIII) y tsr 819 pb (en los extremos XhoI/NdeI) se clonaron en el vector pSET 152 digerido por las enzimas de restricción NaeI y SacI para formar pFLA2b.

Construcción de pFLA3 (Figura 2):

20 En el vector de expresión pFLA3b, el gen LacZ de pFLA2b fue sustituido por un promotor fuerte de *Streptomyces*: el promotor ermEp\*. El gen ermEp\* fue sintetizado en el vector pUC57 por la sociedad GenScript Corporation y el inserto se aisló por digestión del vector (pU57-ermEp) con las enzimas de restricción XbaI y EcoRI.

El vector pFLA2b fue digerido igualmente por las enzimas de restricción XbaI y EcoRI con el fin de abrir la secuencia LacZ y clonar el promotor ermEp\* por simple ligamiento entre los dos sitios de corte.

25 Construcción de pFLA4 (Figura 3) :

El vector pFLA4b se construye a partir del vector pFLA3b. Los genes int phiC31 y attP se escinden del vector pFLA3 por una digestión endonucleásica AfeI y SbfI. El extremo cohesivo (3') generado por SbfI es liberado por la acción de la nucleasa S1 y los dos extremos se empalman por simple ligamiento. Se eliminan así 1771 pb del vector pFLA3b para obtener el vector pFLA3-2b. Un fragmento nucleotídico de 1,8 kb que comprende el gen rep, que permite al vector una replicación autónoma en la cepa hospedante, es amplificado por PCR en el vector pJ101 aislado de *Streptomyces lividans* utilizando los cebadores rep1F (5'ACATGTGTTAGTGCGAAGTGGGC3', SEQ ID NO :6) y resp1R (5'CTGCGAGTTCAG3', SEQ ID NO :7). Los productos de PCR son digeridos por las endonucleasas PciI y DrrI y el inserto así obtenido se clonó en los vectores pFLA3-2b entre los sitios PciI y DrrI para obtener el vector pFLA4b de 6727 pb.

35 La secuencia SEQ ID NO :1 comprende los extremos BamHI (GGATCC) (5') y XbaI (3'), cuando la clonación está prevista en el vector pFLA2.

La secuencia SEQ ID NO :1 comprende los extremos ApaI (5') y BamHI (GGATCC) (3'), cuando la clonación está prevista en el vector pFLA3.

40 La secuencia SEQ ID NO :1 comprende los extremos KpnI (GGTACC) (5') y XbaI (TCTAGA) (3'), cuando la clonación está prevista en el vector pFLA4.

3.- Transferencia de la secuencia SEQ ID NO :1 en una bacteria perteneciente al género *Streptomyces*

Las bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  se transforman con uno de los vectores construidos anteriormente que comprende la secuencia SEQ ID NO :1. A continuación estos vectores se introducen, en una segunda fase en la cepa *E. coli* ET12567 (pUZ8002) haciéndolos competentes. Esta cepa es deficiente en metilación lo que evita las restricciones en el ADN cuando éste se introduce en una bacteria perteneciente al género *Streptomyces*.

La selección de las bacterias transformantes obtenidas se realiza en presencia del antibiótico apramicina: las cepas resistentes son las que comprenden la secuencia SEQ ID NO :1.

A continuación se realiza la transferencia de la secuencia SEQ ID NO :1 a *Streptomyces griseus* por conjugación. Los exconjugantes se seleccionan de nuevo por su resistencia a la apramicina. Las cepas *Streptomyces* 92873 y *Streptomyces* sp 92286 se transforman con uno de los vectores construidos anteriormente y se seleccionan dos cepas recombinantes. A estas cepas, que comprenden al menos una copia de la secuencia SEQ ID NO :1 se les

denomina respectivamente *Streptomyces* sp 92873 y *Streptomyces* sp 92286.

5 Se realizó una estimación del nivel de producción de la vainillil-alcohol-oxidasa efectuando cultivos de la cepa transformada en el medio Strepto y un análisis SDS-PAGE de los extractos totales de bacteria. El análisis confirma la presencia de una proteína del tamaño esperado de 64 kDa. La cantidad producida se estima entre 0,5 y 5 µg de VAO por ml de cultivo para un peso seco de 8 g/L de células.

4.- Actividad enzimática de la vainillil-alcohol-oxidasa expresada en las cepas de *E. coli* DH5α que comprende la secuencia SEQ ID NO :1

10 Las células bacterianas se cultivan a partir de una reserva conservada a -80°C y la expresión del VAO es constitutiva debido a los fuertes promotores utilizados en los vectores de clonación. Las células se tratan a continuación con ultrasonidos y el extracto total (Fracción T) se centrifuga para eliminar los residuos celulares y mostrar la presencia de la VAO en la fracción soluble. El análisis por SDS-PAGE muestra que se produce bien la proteína VAO cuyo tamaño teórico esperado es aproximadamente 64,7 kDa. Dicha proteína es mayoritariamente soluble. La proteína clonada comprende una cola polihistidínica en su extremo terminal N, se purifica en una columna de níquel y el nivel de expresión se analiza por SDS-PAGE. La cantidad de vainillil-alcohol-oxidasa  
15 producida en *E. coli* varía de 2 a 5 µg por ml de cultivo para una DO de 2,3 a 600 nm.

La actividad enzimática de la vainillil-alcohol-oxidasa se analiza por conversión del alcohol vainílico y de eugenol con la proteína purificada en la columna de Ni-NTA a partir de 10 mL de cultivo de bacterias *E. coli* que comprenden la secuencia SEQ ID NO :1. Los productos aromáticos derivados de estas conversiones se analizan por HPLC.

20 Se ha podido determinar que la enzima producida era la vainillil-alcohol-oxidasa. La tasa de transformación con la enzima purificada está comprendida entre 85 y 92%. Se midió vainillina 0,74 mM formada a partir de alcohol vainílico 0,8 mM y alcohol coniferílico 0,69 mM formado a partir de eugenol 0,8 mM.

El alcohol vainílico se convierte en vainillina tanto si la enzima está purificada como si la reacción tiene lugar en un caldo de células *E. coli* DH5α. El pH óptimo para la conversión está situado entre 7 y 10 y en estas condiciones, la cantidad de vainillina producida varía de 0,41 a 1 g/L a partir de 0,5 a 1 g/L de alcohol vainílico distribuido.

25 La vainillil-alcohol-oxidasa cataliza también la conversión del eugenol en alcohol coniferílico. El gen clonado en *E. coli* DH5α que codifica la VAO transforma hasta 10 g/L de eugenol en alcohol coniferílico con un rendimiento de 90% en un medio a pH 10. La reacción es eficaz tanto con la enzima purificada como con un caldo de células recombinantes *E. coli* DH5α.

5.- Selección de cepas recombinantes que comprenden la secuencia SEQ ID NO :1

30 La purificación de la enzima en la columna Ni-NTA y el análisis en gel SDS-PAGE muestran que la proteína producida por los transformantes de las cepas *Streptomyces* sp 92873 o *Streptomyces* sp 92286 es la vainillil-alcohol-oxidasa.

35 Las bacterias transformadas con el vector de expresión que contiene la vainillil-alcohol-oxidasa, tales como las descritas anteriormente, han sido seleccionadas por su capacidad para consumir eugenol y convertirlo en vainillina, en ácido ferúlico o en alcohol coniferílico según las condiciones experimentales. Las cepas de *Streptomyces* sp 92286 y *Streptomyces* sp 92873 se seleccionaron como las mejores candidatas. Los ensayos en matraces Erlenmeyer con cepas de *Streptomyces* que comprenden la secuencia SEQ ID NO :1 muestran tasas de consumo de eugenol que varían de 75 a 90%, según las condiciones de bioconversión.

Las condiciones de bioconversión en matraces Erlenmeyer son las siguientes:

40 Las bacterias transformadas se cultivan en medio completo de agar-agar (YPD) y luego se traspasan a 100 mL de medio Strepto líquido hasta el final de la fase exponencial de crecimiento en las siguientes condiciones: 35°C, 175 rpm. El sustrato se añade luego al medio después de recoger las células en un tampón de fosfato 0,5M, pH 8,5 con una cantidad de 2,5 g/L de eugenol. Las condiciones de bioconversión son las siguientes: 35°C, 175 rpm, 48 h. Una  
45 jornada más permite calcular los rendimientos de bioconversión. Los análisis se realizan por HPLC. Todos los derivados fenólicos se miden y cuantifican.

La cantidad de ácido vainillínico o de vainillina sintetizada por el mejor candidato es del orden de 1 a 2 g/L a partir de 2,5 g/L de eugenol proporcionado al comienzo de la bioconversión.

6.- Conversión de eugenol en vainillina natural por una cepa de *Streptomyces* que comprende la secuencia SEQ ID NO :1

50 La bioconversión de eugenol se optimiza en un fermentador de 3 litros. La tasa de conversión en 4 días está comprendida entre 30 y 72% para una cantidad de sustrato distribuida que varía de 10 a 25 g/L. Las condiciones óptimas de pH durante la conversión son las siguientes: el pH se regula entre 7 y 10 y preferiblemente entre 7 y 9.

La aireación está comprendida entre 0,1 y 0,8 volúmenes de aire/volumen de medio/min. La agitación es 900 rpm para 3 L de medio y la temperatura regulada a 37°C durante las fases de cultivo y de conversión.

Un ejemplo de condiciones de fermentación es el siguiente:

5 Día 1: Puesta en cultivo de la cepa transformada 92873 que comprende la secuencia SEQ ID NO :1 en un medio Strepto (extracto de levadura: 0,8%, glucosa 3,2%) a pH 7,5 durante 48 horas en fermentador de 3L, a 37°C y 900 rpm, con una aireación de 0,3 vvm.

Día 3: Cuando la tasa de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se estabiliza en el 100% después de al menos 4 horas y la medida de la tasa de glucosa en el medio indica que dicho medio está completamente agotado, se añaden al medio entre 0,04% y 0,08% de MgSO<sub>4</sub>.

10 Adición del sustrato:

La adición de eugenol se realiza de continuo durante 3 días (para 15 g/L de eugenol, adición de 15 g/L de glucosa + 200 g de aceite) con un caudal de 0,2 g/L/h o durante 5 días (siendo entonces el caudal de 0,12 g/l/h). Las condiciones de fermentación son las siguientes: pH regulado entre 7 y 9, aireación comprendida entre 0,2 y 1 L de aire/min.

15 Día 6 u 8: Detención de la conversión cuando los resultados cromatográficos confirmen el final de la biotransformación.

Una jornada más permite calcular los rendimientos de la bioconversión. Los análisis se realizan por HPLC. Todos los derivados vainílicos se miden y cuantifican.

Otro ejemplo de las condiciones de fermentación es el siguiente:

20 Día 1: Puesta en cultivo de la cepa transformada 92873 que comprende la secuencia SEQ ID NO :1 en un medio Strepto (extracto de levadura: 0,8%, glucosa 3,2%,) a pH 7,5 durante 48 horas en un fermentador de 3L, a 37°C y 900 rpm, con una aireación de 0,3 vvm.

25 Día 3: Cuando la tasa de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se estabiliza en el 100% después de al menos 4 horas y la medida de la tasa de glucosa en el medio indica que dicho medio está completamente agotado, se añaden al medio entre 0,04% y 0,08% de MgSO<sub>4</sub>.

Adición del sustrato:

La adición de eugenol se realiza de continuo durante 5 días (para 20 g/L de eugenol, adición de 10 g/L de glucosa + 85 g/L de aceite) con un caudal de 0,17 g/L/h. Las condiciones de fermentación son las siguientes: pH regulado entre 7 y 9, aireación comprendida entre 0,2 y 1 L de aire/min.

30 Día 6 u 8: Detención de la conversión cuando los resultados cromatográficos confirmen el final de la biotransformación.

Una jornada más permite calcular los rendimientos de la bioconversión. Los análisis se realizan por HPLC. Todos los derivados vainílicos se miden y cuantifican.

Otro ejemplo de conversión es el siguiente:

35 Día 1: Puesta en cultivo de la cepa transformada 92873 que comprende la secuencia SEQ ID NO :1 en un medio Strepto (extracto de levadura: 0,8%, glucosa 3,2%, MgSO<sub>4</sub> entre 0,04% y 0,08%) a pH 7,5 durante 48 horas en un fermentador de 3L, a 37°C y 900 rpm, con una aireación de 1 L de aire/min.

40 Día 3: Cuando la tasa de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se estabiliza en el 100% después de al menos 4 horas y la medida de la tasa de glucosa en el medio indica que dicho medio está completamente agotado, se añaden al medio entre 0,04% y 0,08% de MgSO<sub>4</sub>.

Adición del sustrato:

Se añade eugenol en 1 sola dosis (para 10 g/L de eugenol se añaden 10 g/L de glucosa) con las condiciones de fermentación siguientes: el pH se regula entre 7 y 9 con sosa, la aireación está comprendida entre 0,1 y 0,33 vvm.

Día 5: Detención de la conversión cuando los resultados cromatográficos confirmen el final de la biotransformación.

45 Una jornada más permite calcular los rendimientos de la bioconversión. Los análisis se realizan por HPLC. Todos los derivados vainílicos se miden y cuantifican.

7.- Conversión de eugenol en ácido ferúlico natural por una cepa de Streptomyces que comprende la secuencia

## SEQ ID NO :1

5 La bioconversión de eugenol en ácido ferúlico se optimiza en un fermentador de 3 litros. La tasa de conversión en 5 días está comprendida entre 30 y 90% para una cantidad de sustrato distribuido que varía de 10 a 25 g/L. Las condiciones óptimas de pH durante la conversión son las siguientes: el pH se regula entre 7 y 10 y preferiblemente a 7.

La aireación está comprendida entre 0,1 y 0,8 volúmenes de aire/volumen de medio/min. La agitación es 900 rpm para 3 L de medio y la temperatura se regula a 37°C durante las fases de cultivo y de conversión.

Un ejemplo de condiciones de fermentación es el siguiente:

10 Día 1: Puesta en cultivo de la cepa transformada 92873 que comprende la secuencia SEQ ID NO :1 en un medio Strepto (extracto de levadura: 0,8%, glucosa 3,2%) a pH 7,5 durante 48 horas en un fermentador de 3 L, a 37°C y 900 rpm, con una aireación de 0,3 vvm.

Día 3: Cuando la tasa de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se estabiliza en el 100% después de al menos 4 horas y la medida de la tasa de glucosa en el medio indica que dicho medio está completamente agotado, se añaden al medio entre 0,04% y 0,08% de MgSO<sub>4</sub>.

15 Adición del sustrato:

La adición de eugenol se realiza de continuo durante 4 días (para 15 g/L de eugenol, adición de 15 g/L de glucosa + 200 g de aceite) con un caudal de 0,15 g/L/h. Las condiciones de fermentación son las siguientes: pH regulado a 7, aireación comprendida entre 0,2 y 1 L de aire/min.

Día 7: Detención de la conversión cuando los resultados cromatográficos confirmen el final de la biotransformación.

20 Una jornada más permite calcular los rendimientos de la bioconversión. Los análisis se realizan por HPLC. Todos los derivados vainílicos se miden y cuantifican. Se puede obtener una mezcla de vainillina, alcohol coniferílico y ácido ferúlico.

8.- Conversión de eugenol en alcohol coniferílico natural por una cepa de Streptomyces que comprende la secuencia SEQ ID NO :1

25 La bioconversión de eugenol se optimiza en un fermentador de 3 litros. La tasa de conversión en 2 días está comprendida entre 40 y 95% para una cantidad de sustrato distribuido que varía de 10 a 25 g/L. Las condiciones óptimas de pH durante la conversión son las siguientes: el pH se regula entre 7 y 10 y preferiblemente entre 7 y 9.

La aireación está comprendida entre 0,1 y 0,8 volúmenes de aire/volumen de medio/min. La agitación es 900 rpm para 3 L de medio y la temperatura se regula a 37°C durante las fases de cultivo y de conversión.

30 Un ejemplo de conversión es el siguiente:

Día 1: Puesta en cultivo de la cepa transformada 92873 que comprende la secuencia SEQ ID NO :1 en un medio Strepto (extracto de levadura: 0,8%, glucosa 3,2%, MgSO<sub>4</sub> entre 0,04% y 0,08%) a pH 7,5 durante 48 horas en un fermentador de 3 L, a 37°C y 900 rpm, con una aireación de 1 L de aire/min.

35 Día 3: Cuando la tasa de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se estabiliza en el 100% después de al menos 4 horas y la medida de la tasa de glucosa en el medio indica que dicho medio está completamente agotado, se añaden al medio entre 0,04% y 0,08% de MgSO<sub>4</sub>.

Adición del sustrato:

40 Se añade eugenol en 1 sola dosis (para 10 g/L de eugenol se añaden 10 g/L de glucosa) con las condiciones de fermentación siguientes: el pH se regula entre 8 y 9 con sosa 5M, la aireación está comprendida entre 0,1 y 0,33 vvm.

Día 4 o 5: Detención de la conversión cuando los resultados cromatográficos confirmen el final de la biotransformación.

Una jornada más permite calcular los rendimientos de la bioconversión. Los análisis se realizan por HPLC. Todos los derivados vainílicos se miden y cuantifican.

45 9.- Ejemplo de extracción de la vainillina del caldo de bioconversión.

Al finalizar el cultivo, el caldo se concentra a vacío parcial y luego se extrae con metilciclohexano en caliente. Después de la concentración del disolvente, cristaliza la vainillina. Se lava con etanol y se recristaliza de forma que se obtenga una pureza HPLC superior al 99,5%.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> V MANE FILS

5

<120> Sistema de producción de moléculas aromáticas en Streptomyces

<130> QT

10 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 1680

<212> ADN

<213> artificial

<220>

20 <223> VAO optimizado

<400> 1

ES 2 394 677 T3

atgtcgaaga cccaagagtt ccggccgctg accctgccgc cgaagctgtc gctgtcggac 60  
 ttcaacgagt tcatccagga catcatccgc atcgtcggct cggagaacgt cgaggatc 120  
 tcgtcgaagg accagatcgt cgacggctgc tacatgaagc cgaccacac ccacgacccg 180  
 caccacgtca tggaccagga ctacttcctg gcctcggcca tcgtcgcgcc gcgcaacgtc 240  
 gccgacgtgc agtcgatcgt gggcctcgcc aacaagttct cgttcccgtc ctggccgatc 300  
 tcgatcggcc gcaactcggg ctacggcggc gccgccccgc gcgtctcggg ctcggtcgtc 360  
 ctggacatgg gcaagaacat gaaccgcgtc ctggaggcca acgtcgaagg cgcctactgc 420  
 gtcgtcgaag cgggcgtcac ctaccacgac ctgcacaact acctggaggc caacaacctg 480  
 cgcgacaagc tgtggctgga cgtcccggac ctgggaggcg gctcggctct gggcaacgcc 540  
 gtcgagcgcg gcgtcggcta caccctgtac ggcgaccact ggatgatgca ctcgggcatg 600  
 gaggtggtgc tggccaacgg cgagctgctg cgcaccggca tgggcgccct gccggacccc 660  
 aagcgcgccg agaccatggg cctgaagcct gaggaccagc cgtggctgaa gatcgccac 720  
 ctgttcccgt acggcttcgg cccgtacatc gacggcctgt tctcgcagtc gaacatgggc 780  
 atcgtgacca agatcggcat ctggctgatg ccgaaccggc gcggctacca gtcgtacctg 840  
 atcaccctgc cgaaggacgg cgacctgaag caggccgtcg acatcatccg cccgctgcgc 900  
 ctgggcatgg ccctgcagaa cgtcccgacc atccgccaca tcctgctgga cgccgccgtc 960  
 ctgggagaca agcgtcgtga ctcgtcgaag accgagccgc tgcggacga ggagctggac 1020  
 aagatcgcca agcagctgaa cctgggcccgc tggaaactct acggcgccct gtacggcccg 1080  
 gagccgatcc gccgcgtgct gtgggagacc atcaaggacg ccttctcggc catcccgggc 1140  
 gtgaagttct acttcccgga ggacaccccg gagaactcgg tcctgcgcgt ccgcgacaag 1200  
 accatgcagg gcatcccgac ctacgacgag ctgaagtgga tcgactggct gccgaatggc 1260  
 gccacactgt tcttctcgcc gatcgccaag gtctcgggcg aggacgcat gatgcagtac 1320  
 gccgtacca agaagcgtg ccaggaggcc ggcctggact tcatcggcac cttaccgtg 1380  
 ggcgtgcgcg agatgcacca catcgtctgc atcgtcttca acaagaagga cctgatccag 1440  
  
 aagcgaagg tccagtggct gatgcgcacg ctgatcgacg actgcgccgc caacggttgg 1500  
 ggcgagtacc gcacgcacct ggccttcatg gaccagatca tggagacgta caactggaac 1560  
 aactcgtcgt tcctgcgctt caacgaggtc ctgaagaacg ccgtcgacc gaacggcatc 1620  
 atcgcgcccg gcaagtcggg cgtctggccg tcgcagtact cgcacgtcac ctggaagctg 1680

- 5 <210> 2
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> artificial

10 <220>

<223> cebador bla1F

<400> 2  
ctcgagagac gaactccttg aacc 24

5 <210> 3  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> artificial  
<220>

10 <223> cebador bla1R

<400> 3  
ggccttacca atgcttaac ag 22

15 <210> 4  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> artificial

20 <220>  
<223> cebador tsr1F

<400> 4  
gagctctgac tgagttggac ac 22

25 <210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

30 <220>  
<223> cebador tsr 1R

<400> 5  
35 ctcgacttat cggttggccg 20

# ES 2 394 677 T3

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> artificial

5

<220>

<223> cebador rep1F

<400> 6

10 acatgtgtta gtgccaagtg ggc

23

<210> 7

<211> 12

<212> ADN

15 <213> artificial

<220>

<223> cebador rep1R

20 <400> 7

ctgcgagttc ag

12

<210> 8

<211> 1810

25 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> VAO optimizado 2

30

<400> 8

ES 2 394 677 T3

gatctagaga tatcgagaag ggagcggaca tacatgtcga agaccaaga gttccggccg 60  
ctgaccctgc cgccgaagct gtcgctgtcg gacttcaacg agttcatcca ggacatcatc 120  
cgcacgtcgc gctcggagaa cgtcggagtc atctcgtcga aggaccagat cgtcgacggc 180  
tcgtacatga agccgaccca caccacgac ccgcaccacg tcatggacca ggactacttc 240  
ctggcctcgg ccacgtcgc cccgcgcaac gtcgccgacg tgcagtcgat cgtgggcctc 300  
gccacaagt tctcgttccc gctctggccg atctcgatcg gccgcaactc gggctacggc 360  
ggcgcgcc cgcgctctc gggctcggtc gtcctggaca tgggcaagaa catgaaccgc 420  
gtcctggagg tcaacgtcga gggcgcctac tgcgtcgtcg agccgggct cacctaccac 480  
gacctgcaca actacctgga ggccaacaac ctgcgcgaca agctgtggct ggacgtcccc 540  
gacctgggcg gcggtcggc cctgggcaac gccgtcgcg gggcgtcgg ctacaccccc 600  
tacggcgacc actggatgat gcaactcggc atggaggtgg tgctggcaa cggcgagctg 660  
ctgcgcaccg gcatgggctc cctgccggac cccaagcgc ccgagacat gggcctgaag 720  
cctgaggacc agccgtggc gaagatcgcc cacctgttcc cgtacggctt cggcccgtac 780  
atcgacggcc tgttctcga gtcgaacatg ggatcgtga ccaagatcgg catctggctg 840  
atgccgaacc cgggaggcta ccagtcgtac ctgatcacc tgccgaagga cggcgacctg 900  
aagcaggccg tcgacatcat ccgcccgctg cgcctgggca tggccctgca gaacgtcccg 960  
accatccgcc acatcctgct ggacgcccgc gtctgggcg acaagcgtc gtactcgtcg 1020  
aagaccgagc cgtcgtcga cgaggagctg gacaagatcg ccaagcagct gaacctgggc 1080  
cgtggaact tctacggcg cctgtacggc ccggagccga tccgccgct gctgtgggag 1140  
accatcaagg acgccttctc ggccatccc ggctgaagt tctacttccc ggaggacacc 1200  
ccggagaact cgtcctcgc cgtccgcgac aagaccatgc agggcatccc gacctacgac 1260  
gagctgaagt ggatcgacty gctgccgaat ggcgccacc tgttcttctc gccgatcgcc 1320  
aaggctcctg gcgaggacgc catgatgag tacgccgtca ccaagaagcg ctgccaggag 1380  
  
gccggcctgg acttcatcgg caccttacc gtgggcatgc gcgagatgca ccacatcgtc 1440  
tgcatcgtct tcaacaagaa ggacctgatc cagaagcga aggtccagtg gctgatgctc 1500  
acgctgatcg acgactgctc cgccaacggt tggggcagat accgcacgca cctggccttc 1560  
atggaccaga tcatggagac gtacaactgg aacaactcgt cgttcctgct cttcaacgag 1620  
gtcctgaaga acgcccgtcga cccgaacggc atcatcgccc cgggcaagtc gggcgtctgg 1680  
ccgtcgcagt actcgcacgt cacctggaag ctgggatccc accaccacca ccaccagga 1740  
tcctaataat tactaattaa ttggggaccc tagagggtccc cttttttatt ttaaaagata 1800  
tcaagcttgc 1810

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de producción de ácido ferúlico, alcohol coniferílico y/o vainillina naturales, que comprende la bioconversión de eugenol por una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la SEQ ID NO :8.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende:
  - 1) el cultivo de una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la SEQ ID NO :8,
  - 2) la adición continua o en una sola dosis de eugenol como sustrato de bioconversión al medio de fermentación en una cantidad comprendida entre 5 y 50 g/L, preferiblemente 10 a 35 g/L, y
  - 3) la extracción de la vainillina del medio de fermentación.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende:
  - 1) el cultivo de una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la SEQ ID NO :8,
  - 2) la adición en una sola dosis de eugenol como sustrato de bioconversión al medio de fermentación en una cantidad comprendida entre 5 y 40 g/L, preferiblemente 10 a 35 g/L, y
  - 3) la extracción de alcohol coniferílico del medio de fermentación.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende:
  - 1) el cultivo de una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la SEQ ID NO :8,
  - 2) la adición continua de eugenol como sustrato de bioconversión al medio de fermentación en una cantidad comprendida entre 5 y 30 g/L, preferiblemente 10 a 25 g/L, y
  - 3) la extracción de ácido ferúlico del medio de fermentación.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha bacteria se incuba en un medio cuyo pH es inferior a 10.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha bacteria se incuba a una temperatura comprendida entre 27 y 40°C, preferiblemente igual a 37°C.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha bacteria se obtiene por:
  - a) clonación de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8 en un vector de expresión, preferiblemente específico de las bacterias pertenecientes al género *Streptomyces*,
  - b) transformación del vector de expresión obtenido en a) en una bacteria competente, preferiblemente *E. coli* DH5 $\alpha$ ,
  - c) transferencia del vector de expresión que comprende la secuencia SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO : 8 a *E. coli* ET12567,
  - d) transformación o conjugación de una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* con la bacteria obtenida en c), y
  - e) selección de las mejores bacterias transformantes obtenidas en d) en presencia del sustrato eugenol.
8. Bacteria perteneciente al género *Streptomyces* que comprende al menos una secuencia nucleotídica SEQ ID

NO :1 o SEQ ID NO : 8 o cualquier secuencia nucleotídica que sea al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO :1 o cualquier secuencia que sea al menos 80%, preferiblemente 90% idéntica a la SEQ ID NO :8.

9. Bacteria según la reivindicación 8, que es preferentemente *Streptomyces griseus*.
- 5 10. Secuencia nucleotídica SEQ ID NO :1.
11. Secuencia nucleotídica SEQ ID NO :8.
12. Vector de expresión que comprende al menos una secuencia SEQ ID NO :1 o SEQ ID NO :8.
13. Vector según la reivindicación 11, caracterizado porque es un vector bifuncional específico de las bacterias perteneciente al género *Streptomyces*.
- 10 14. Vector según la reivindicación 12, caracterizado porque se elige entre un vector integrador o un vector replicable de tipo multicopia.
15. Vector según la reivindicación 13, caracterizado porque se elige entre pFLA2 y pFLA3.
16. Vector según la reivindicación 13, caracterizado porque es el vector pFLA4.
- 15 17. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se produce vainillina, ácido ferúlico o alcohol coniferílico en una cantidad de 10 a 25 g/L.
18. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la conversión del ácido ferúlico en vainillina se efectúa en la misma bacteria perteneciente al género *Streptomyces* o se efectúa por vía bioquímica o enzimática.

FIGURA 1

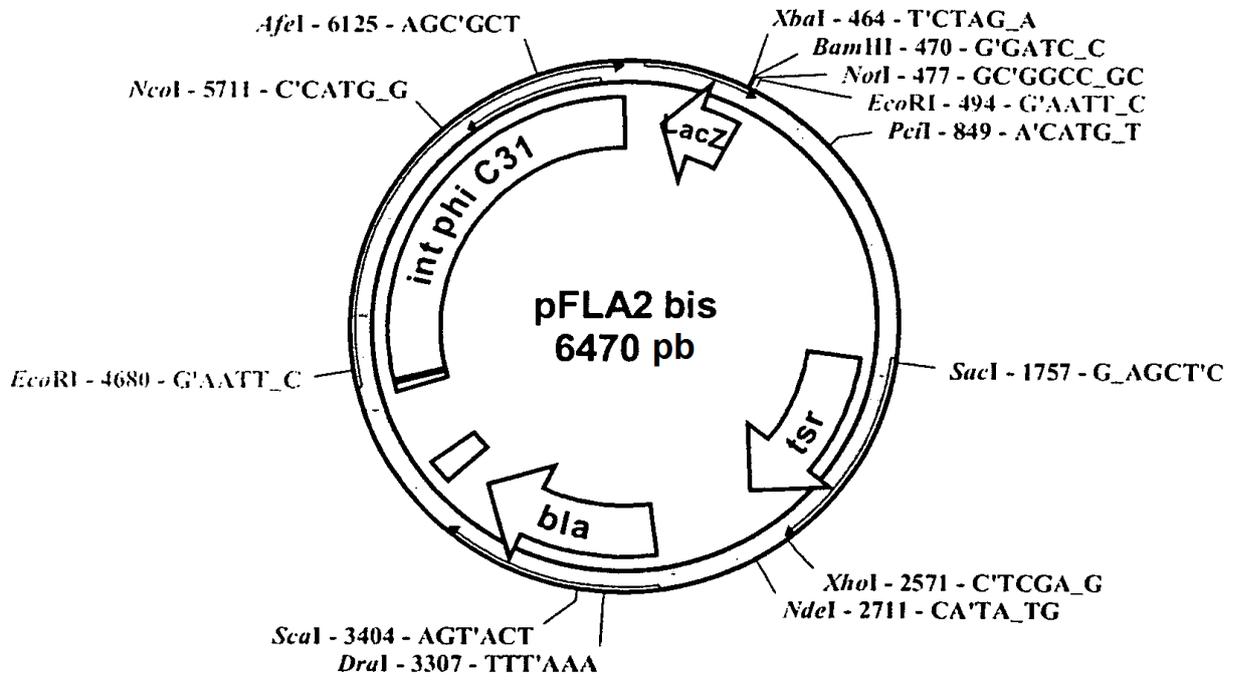


FIGURA 2

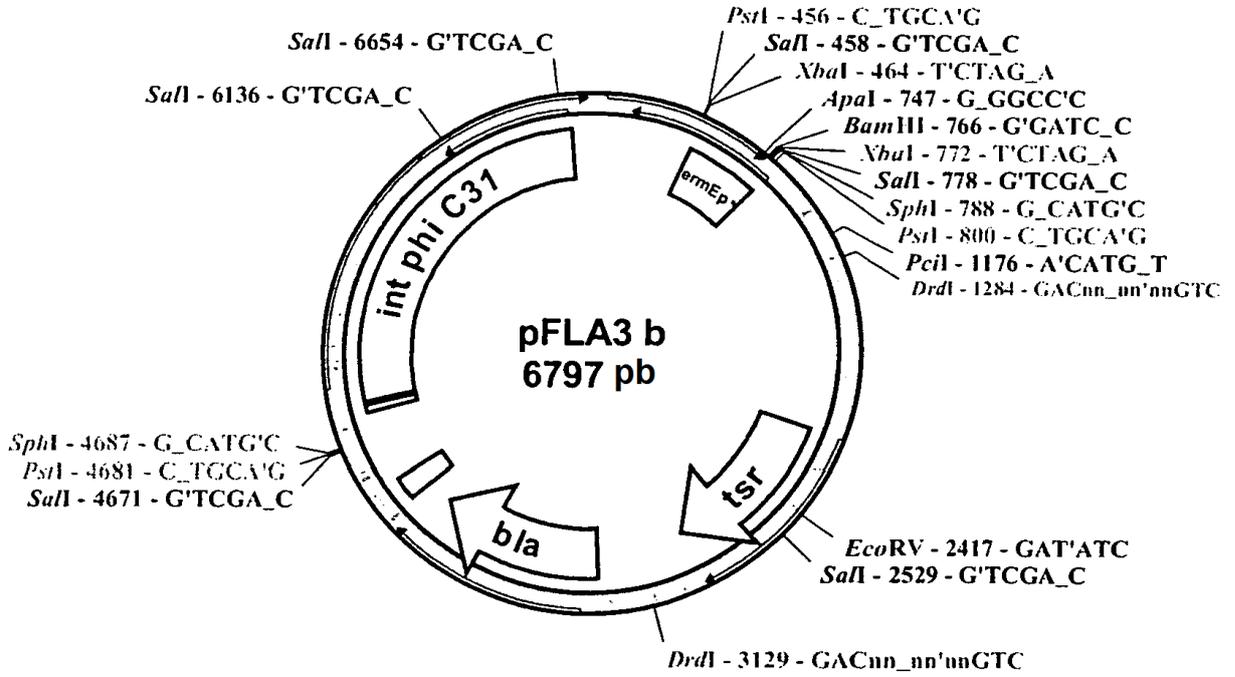


FIGURA 3

