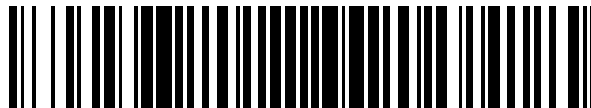


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 892**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C07D 239/00 (2006.01)

C07D 405/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008** **E 08847246 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015** **EP 2207876**

54 Título: **Hidroxilación estereoespecífica**

30 Prioridad:

07.11.2007 DE 102007052900

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.12.2015

73 Titular/es:

**RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-
UNIVERSITÄT BONN (50.0%)
REGINA-PACIS-WEG 3
53113 BONN, DE y
BITOP AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GALINSKI, ERWIN, A.;
STEIN, MARLENE;
URES, ANDREA y
SCHWARZ, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 553 892 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

Hidroxilación estereoespecífica

5 La invención se refiere a un procedimiento de hidroxilación estereoespecífica de derivados de ácidos α -amino-S-carboxílicos cíclicos para dar compuestos de ácido α -amino- β -hidroxi-S-carboxílico, en los que la función α -amino está incorporada en el sistema anular y los grupos hidroxilo y ácido están en configuración trans, usando microorganismos con actividad de hidroxilasa en un medio de producción, en el que los derivados de ácido S-carboxílico se añaden al medio de producción y se hidrolizan en el microorganismo en presencia de oxígeno y de un cosustrato usando sistemas de transporte del microorganismo activados osmóticamente y, a continuación, se liberan del microorganismo de forma activa o pasiva, para recuperarlos a partir del medio de producción.

10 Las transformaciones de materiales en solo pocas etapas catalíticas y con la participación de sistemas biológicos (enzimas) se denominan también biotransformaciones y se incluyen en la biotecnología "blanca", que particularmente en lo relativo a la sostenibilidad se está convirtiendo de forma creciente en un soporte importante de la industria química. Básicamente, a este respecto, son preferentes sistemas catalíticos que hacen reaccionar un espectro de sustratos lo más amplio posible. En el caso de reacciones de oxidación/reducción, tales como, por ejemplo, reacciones de hidroxilación, la regeneración de los cofactores necesarios para ello representa un problema técnico. Siempre que la regeneración del cofactor solo pueda realizarse en sistemas celulares completos, es decir, en microorganismos vivos intactos o inactivos, esto lleva asociado un serie de dificultades. Estas son, en primer lugar, el transporte con velocidad generalmente limitada del sustrato al interior de las células, en segundo lugar el uso de un sustrato barato para la regeneración del cosustrato y en tercer lugar la exportación del producto desde la célula al medio, desde el que puede recuperarse el producto después.

20 En hidroxilaciones estereoespecíficas con participación de los cofactores NADH o NADPH se resuelve el problema de la regeneración del cofactor introduciendo un segundo sistema enzimático, por ejemplo el formiato deshidrogenasa, para la regeneración del cofactor en la cepa productora o un denominado reactor de membrana. El sustrato necesario para ello, en el ejemplo mencionado el formiato, se consume en la reacción. Las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato para reacciones de hidroxilación con participación de oxígeno molecular son, de hecho, conocidas, pero hasta la fecha no se han aplicado en la práctica, ya que el cosustrato es demasiado caro como para consumirse en la reacción y se ha comprobado, hasta la fecha, que los sistemas celulares completos son también poco económicos.

30 Por N. Grammel, "Molekulargenetische und biochemische Analyse der Biosynthese von 2-Methyl-4-Carboxy-3,4,5,6-Tetrahydropyrimidin und seinem 5-Hydroxyderivat, zwei Salzstress induzierbaren Osmolyten, in *Streptomyces chrysomallus*" (1999), disertación, Universidad Técnica de Berlín, y el documento WO2001/038500A2 se conoce una enzima con actividad de tetrahidropirimidina dioxigenasa de *Streptomyces chrysomallus*, que se ha usado in vitro para la hidroxilación de ectoína para dar hidroxiectoína en presencia de 2-oxoglutarato. Se menciona la expresión de la secuencia génica que codifica la enzima en *Streptomyces lividans* y *E. coli*. Para la expresión de la enzima en la célula viva se advierte de la necesidad de la permeabilización previa de la célula para favorecer la puesta en contacto de la enzima con la tetrahidropirimidina que se va a hidroxilar. Sobre la problemática de la liberación del producto hidroxilado desde la célula viva no hay ninguna indicación.

40 La ectoína es una tetrahidropirimidina que se forma en numerosas bacterias, por ejemplo en *Halomonas elongata* por medio de los genes de biosíntesis de ectoína. La ectoína hidroxilasa también presente en las mismas puede transformar ectoína en hidroxiectoína. No obstante, siempre se transforma solo una parte de la ectoína formada también en hidroxiectoína, en general claramente menos del 50 %. Dado que la separación de ectoína e hidroxiectoína es costosa, la obtención de hidroxiectoína pura exige mucho tiempo y es cara.

Se ha identificado una serie de ectoína hidroxilasas potenciales en los microorganismos siguientes:

Cepa	Proteína	Identidad de secuencia [%]
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ¹	Ectoína-hidroxilasa (EctD)	100
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043 ¹	Fitanoil-CoA-dioxigenasa	75
<i>Bordetella parapertussis</i>	L-Prolina-4-hidroxilasa putativa	51
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	L-Prolina-4-hidroxilasa putativa	51
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	Ectoína-hidroxilasa putativa	50
<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	Ectoína-hidroxilasa putativa	50
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Ectoína-hidroxilasa putativa	49
<i>Streptomyces chrysomallus</i>	Ectoína-hidroxilasa (ThpD)	48
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	L-Prolina-4-hidroxilasa	46
<i>Dactylosporangium</i> sp.	L-Prolina-4-hidroxilasa	33

45 Se ha comprobado la biocatálisis in vitro de ectoína para dar hidroxiectoína como también de análogos de ectoína para dar compuestos hidroxilados con la hidroxilasa de *C. salexigens*. Los primeros resultados apuntan a una

actividad correspondiente de las otras hidroxilasas.

La invención se basa en proporcionar un sistema biológico que posibilite la hidroxilación estereoespecífica particularmente de ectoína, pero también de moléculas similarmente formadas usando dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato en un sistema celular completo en cantidades económicamente importantes. Tienen particular interés como compuestos diana aquellos de la clase de sustancias de los solutos compatibles que pueden usarse en procedimientos de fabricación o productos químicos, cosméticos y farmacéuticos. Un sistema celular completo de este tipo debe disponer de sistemas de transporte necesarios para introducir los eductos desde el medio de cultivo y ser capaz de llevar al exterior los productos mediante sistemas de transporte o por otra vía, por ejemplo los denominados escapes.

Este objetivo se logra con un procedimiento en el que como microorganismos se usan los de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Marinococcus* o *Halomonas*.

En el procedimiento se añaden para la hidroxilación estereoespecífica de derivados de ácido α -amino-S-carboxílico (en adelante derivados de ácido S-carboxílico) para dar compuestos de ácido α -amino- β -hidroxi-S-carboxílico usando microorganismos con actividad de hidroxilasa en un medio de producción los derivados de ácido S-carboxílico al medio de producción y se hidrolizan en el microorganismo en presencia de oxígeno y un cosustrato usando, por ejemplo, sistemas de transporte activados osmóticamente del microorganismo y, a continuación, se liberan del microorganismo de forma activa o pasiva para recuperarlos del medio de producción. La hidroxilación se realiza estereotácticamente de modo que el grupo de ácido hidroxicarboxílico esté en configuración trans en los compuestos cíclicos.

Las formas de realización preferentes son objeto de las reivindicaciones subordinadas.

Por liberación activa se entiende la liberación mediante un sistema de transporte, por liberación pasiva mediante canales o escapes mecanosensibles.

Los derivados y compuestos en el sentido de la invención son particularmente los ácidos mismos, pero también sus sales, ésteres y amidas.

El procedimiento según la invención es particularmente adecuado para transformar el educto totalmente y de forma estereoselectiva para dar el producto hidrolizado, que después se puede recuperar del medio de producción según procedimientos estandarizados. Se entiende que el producto hidrolizado también puede recuperarse a partir de los microorganismos.

Los microorganismos pueden ser aquellos que presentan la actividad de hidroxilasa de forma natural. En este caso debe asegurarse que están presentes los sistemas de transporte necesarios para transportar al interior y al exterior educto y producto y que el gen de hidroxilasa se expresa permanentemente. En el caso de bacterias extremófilas del género *Halomonas*, *Marinococcus*, entre otros, que presentan actividad de hidroxilasa, están presentes de hecho los mecanismos correspondientes para superar la barrera de la membrana, pero el gen de hidroxilasa no se expresa permanentemente. La expresión permanente del gen de hidroxilasa presente de forma natural puede lograrse, por ejemplo, disponiendo el gen mediante procedimientos recombinantes de forma genómica bajo el control de otro promotor presente de forma natural, o se introduce un promotor adecuado en el microorganismo de un modo conocido de por sí, para reemplazar en el mismo al promotor presente de forma natural. Un promotor adecuado es, por ejemplo, el promotor inducido osmóticamente PromA de *Marinococcus halophilus* o los promotores que pueden inducirse osmóticamente de la agrupación génica de biosíntesis de ectoína de *Halomonas elongata* (así como modificaciones de los mismos) y otros promotores inducidos por estrés o promotores de fase estacionaria. De forma alternativa, la expresión permanente del gen de hidrolasa presente de forma natural también puede lograrse disponiendo el gen en un plásmido presente de forma natural o en un vector introducido bajo el control de promotores adecuados. Se entiende que también se consideran promotores (naturales) modificados de forma recombinante por mutación.

Preferentemente se trata, no obstante, de un microorganismo transformado con un gen de hidroxilasa, que puede llevarse, para ello, de un modo habitual a expresar la hidrolasa, por ejemplo mediante el uso de un inductor. Inductores adecuados son lactosa o IPTG. Es preferente, no obstante, la inducción de actividad de hidroxilasa produciendo una situación de estrés en el medio de cultivo, por ejemplo mediante la modificación de la temperatura o la modificación osmótica, o si no provocando una situación de escasez tal como, por ejemplo, en la transición a la fase estacionaria.

Los microorganismos según la invención son los de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Marinococcus*, particularmente *Escherichia coli*, *Halomonas elongata*, *Bacillus subtilis*, *Marinococcus halophilus* y *Corynebacterium glutamicum*. Preferentemente se usa la hidrolasa de *H. elongata* DSM 2581, que se transfiere al organismo diana de un modo conocido de por sí, por ejemplo por medio de un plásmido. Plásmidos adecuados son, por ejemplo, los de pET-Typ (por ejemplo pET22b(+)) de la empresa NOVAGEN, Madison, Estados Unidos), de pBBR-Typ (Kovach ME, Elzer PH, Hill SD, Robertson GT, Farris MA, Roop MR, Peterson KM (1995) Gene 166:175-176) y pHSG575 y derivados (Takeshita S, Sato M, Toba M, Masahashi W, Hashimoto-Gotoh T (1987) Gene 61:63-74). El gen de hidrolasa (ectD) de DSM 2581 de *Halomonas elongata* está

descrito, véase A. Ures y col., Ectoine Hydroxylase (ectD) from *Halomonas elongata*. Exposición de pósteres para la sesión anual de VAAM en Göttingen del 25/09 al 28/09/2005.

5 Se ha demostrado que es adecuado para la realización del procedimiento según la invención, entre otros, el microorganismo de *E.coli* BL21 (STRATAGENE, La Jolla, Estados Unidos). El procedimiento se puede usar correspondientemente en otros microorganismos según la invención, que recojan los eductos por medio de un sistema de transporte y suministren los productos al medio, por ejemplo otras proteobacterias o bacterias gram-positivas del género *Bacillus* o *Corynebacterium*.

Todos los microorganismos y plásmidos indicados en el presente documento son aquellos que se pueden obtener comercialmente, se pueden obtener libremente de depósitos o están descritos con detalle en la literatura.

10 Como cosustrato para la dioxigenasa de *Halomonas elongata* mencionada anteriormente puede usarse 2-oxoglutarato. Como fuente de carbono pueden usarse las habituales; particularmente existe también la posibilidad de usar glicerina como fuente de carbono extraordinariamente económica. La regeneración se realiza de un modo conocido mediante acetil-CoA y el ciclo de citrato.

15 Tienen particular importancia los sistemas de transporte de los microorganismos que se pueden usar, que deben ser adecuados para transportar eductos a través de la membrana celular. En el caso de la *E.coli* se trata, por ejemplo, de los transportadores bien caracterizados ProP y ProU, que tienen ambos un espectro de sustratos muy amplio y pueden transportar a través de la barrera de la membrana moléculas lineales o cíclicas. Así, se transportan sin más glicina-betaína, dimetilglicina, glicina, homobetaína, prolina, prolina-betaína, 3,4-dihidroprolina, ácido pipercolínico, taurina, carnitina, γ -butirotbetaína, trigonelina y ectoína a través de la membrana celular, véase G. Gousbet y col., *Pepicolic acid is an osmoprotectant for Escherichia coli taken up by the general osmoporters ProU and ProP*, *Microbiology* 140 (1994), 2415-2422; B. Kempf y col., *Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments*, *Arch. Microbiol.* 170 (1998), 319-330. La eficacia del procedimiento puede verse influenciada porque los sistemas de transporte presentes han sufrido total o parcialmente delección, mutagénesis o han visto influenciada su selectividad de otro modo.

25 El procedimiento según la invención puede llevarse a cabo de un modo habitual en un medio de cultivo o de producción, pudiendo usarse tanto procedimientos por lotes, como también procedimientos semicontinuos o continuos. Es preferente un modo de procedimiento en continuo. Los productos hidroxilados pueden aislarse de un modo conocido usando procedimientos cromatográficos, por ejemplo mediante cromatografía en columna.

30 Los derivados de ácido S-carboxílico que sirven como compuestos de partida son derivados de α -amino-S-carboxílico cíclicos que tienen la estructura básica de aminoácidos y son capaces de formar correspondientemente iones bipolares.

35 Son particularmente preferentes derivados de ácido S-carboxílico cíclicos en los que existe un grupo α -amino en el sistema anular. El sistema anular puede estar constituido por de 3 a 8 miembros, pudiendo estar presentes además del átomo de nitrógeno en la posición α con respecto al ácido carboxílico uno o varios átomos adicionales de nitrógeno, oxígeno o azufre. El anillo puede estar sustituido adicionalmente con grupos alquilo con hasta seis átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos amino, imino, nitro, CN, hidroxilo, éter o éster, considerándose para los restos éter y éster particularmente restos alquilo con hasta seis átomos de carbono. Lo mismo tiene validez también, naturalmente, para eductos no cíclicos.

40 Se ha comprobado que el procedimiento según la invención puede transformar los compuestos de partida de forma muy estereoespecífica en los compuestos de ácido trans- β -hidroxi-S-carboxílico. La transformación no se realiza, como en el estado de la técnica, enzimáticamente en una solución tampón en el exterior de la célula, sino en la célula del microorganismo transformado mismo, que después suministra el producto de nuevo al medio.

45 Al contrario que otras dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, la procedente de *Halomonas elongata*, que se usa preferentemente, es relativamente poco específica y es capaz de hidrolizar una serie de compuestos de partida. El amplio espectro de sustratos se complementa con la capacidad del sistema de transportar el educto mediante un sistema de transporte a la hidrolasa expresada en el citoplasma y de suministrar el producto después de la transformación al medio. Con ello se supera la membrana celular como barrera de permeabilidad y el cofactor se regenera a través de la célula misma. El producto puede acumularse sin destrucción de las células que producen la expresión en casi cualquier cantidad en concentraciones muy elevadas en el medio y recuperarse a partir del mismo.

50 Las proteínas de membrana usadas para el transporte a las células (transportadores), son en el caso de *E. coli*, como se ha mencionado, preferentemente los transportadores osmóticos proP y proU. Estos son sistemas específicos que además de los sustratos preferentes glicina-betaína y prolina-betaína, entre otros, también aceptan prolina, ectoína y una serie de derivados de ectoína. Básicamente son adecuados todos los sistemas de transporte que superan la barrera de la membrana para los eductos, es decir, por ejemplo también otros sistemas de transporte
55 para aminoácidos.

Los sistemas de transporte ProP y ProU de *E.coli* tienen, tal como se ha indicado ya, un sistema de sustratos amplio. Los sistemas de transporte conocidos de *Bacillus subtilis* son OpuA, OpuB, OpuC y OpuD, en el caso de

Corynebacterium glutamicum EctP, BetP, ProP y LcoP. Todos estos sistemas de transporte aceptan también un espectro de sustratos amplio.

El procedimiento según la invención posibilita de un modo económico la transformación casi total de un sustrato en un producto con funcionalidad β -hidroxilo, que se enriquece en el medio mismo. Este produce siempre en el caso de derivados de ácido α -aminocarboxílico una estereoconfiguración con el grupo hidroxilo en la posición trans con respecto al grupo de ácido carboxílico. En la figura 1 se indican una serie de productos. De las sustancias mencionadas la hidroxiectoína y derivados similares son de particular interés, ya que estos pueden usarse particularmente como sustancias protectoras celulares novedosas en cosmética y en productos medicinales. Pueden usarse biopolímeros novedosos construidos a partir de los monómeros hidroxilados, por ejemplo, como anfóteros, denominados "polímeros de diseño" en cosmética o para el recubrimiento de superficie, para aumentar su biocompatibilidad. Según el estado de la técnica no es posible una productibilidad económica de estas sustancias para las aplicaciones mencionadas.

Ejemplo: Hidroxilación de ectoína y similares

La cepa de producción de *E. coli* BL21 contiene el gen de hidroxilasa de *Halomonas elongata* en el plásmido pET22b(+)-EctD. Se cultiva a 37 °C en un medio con la composición siguiente: 13,61 g/l de KH_2PO_4 , 4,21g/l de KOH, 1,98 g/l de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 0,25 g/l de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,1 mg/l de $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 g/l de NaCl, 5 g/l de glucosa, pH 7,0 ajustado con KOH, 100 mg/l de carbenicilina.

El medio se aireó con oxígeno, manteniéndose la saturación de oxígeno mediante la modificación de la corriente de aire a presión (0,1 a 0,5 l/min) y de la frecuencia de giro del agitador (200 a 600 rpm) a más del 50 %. Al lograr una densidad óptica de 0,6 (a 600 nm) se indujo por inyección de 1 ml de solución de IPTG (23,8 mg/ml, filtrado de forma estéril) por litro la expresión. Aproximadamente una hora después de la inducción se realizó la adición estéril del sustrato (concentración final: 2 a 20 mM) dado el caso en combinación con una fuente de carbono para la regeneración del cofactor. La hidroxilación del sustrato se prosiguió con la toma de muestra y posterior análisis por HPLC tanto en las células como también en el medio. Mediante la adición posterior de sustrato en combinación con una fuente de C (por ejemplo glicerina) pudo controlarse el rendimiento y aumentarse la concentración del producto en el medio. Después de la conversión total del sustrato, el cultivo se separó del medio de cultivo por centrifugación y se preparó para el aislamiento del producto. La velocidad de reacción fue superior a 0,1 mmol/g de biomasa seca y hora.

El educto y la fuente de C deben añadirse simultáneamente en cantidades adecuadas. En caso de usar glicerina como fuente de C, la relación molar es 1:1.

El procedimiento se llevó a cabo, a modo de ejemplo, con concentraciones estándar de 2 a 20 mM. Son posibles concentraciones superiores. El grado de saturación de oxígeno no es determinante; es importante que los microorganismos tengan a disposición suficiente oxígeno.

El procedimiento se llevó a cabo, a modo de ejemplo, en el plásmido pET22b (+)-EctD. Los plásmidos de tipos pBBR y los plásmidos de baja copia, por ejemplo pHSG 575, son también adecuados, particularmente cuando el gen de hidroxilasa de *Halomonas elongata* se encuentran bajo el control de un promotor inducido osmóticamente, tal como, por ejemplo, PromA de *Marinococcus halophilus*, promotores inducidos por estrés, promotores de fase estacionaria y otros promotores fuertes.

Eductos preferentes son compuestos de las fórmulas I, II y III, en las que R_1 y R_2 representan hidrógeno y R_3 es hidrógeno, un grupo alquilo con hasta 6 átomos de carbono o un grupo amino. x representa un número entero de 1 a 5, y representa de 1 a 4.

La fórmula IV representa guanidinio-ectoína con una configuración S en C_2 . El compuesto corresponde a la fórmula III con $R_1=R_2=H$, $y=2$ y $R_3=NH_2$.

En la parte del producto R_2 representa un grupo 3-hidroxilo, que está en posición trans con respecto al grupo S-carboxilo. La hidroxilación se realiza exclusivamente en la posición trans 3. La fórmula V proporciona de nuevo el producto de hidroxilación de guanidinio-ectoína.

Se entiende que las estructuras I a V pueden estar sustituidas con otros grupos alquilo con hasta 6 átomos de carbono, átomos de hidrógeno, grupos amino, imino, nitro, CN, hidroxilo, éter o éster.

La invención se refiere, finalmente, también a los compuestos nuevos 3-hidroxi-homoectoína, 3-hidroxi-DHMICA, 3-hidroxi-ADPC, 3-hidroxi-guanidinio-ectoína y ácido 3-hidroxi-2-azetidincarboxílico y sus derivados, particularmente ésteres, amidas y sales. Todos estos compuestos muestran el grupo hidroxilo en la posición trans con respecto a la función ácido carboxílico o ácido sulfónico. Se refiere también a los compuestos lineales que pueden obtenerse mediante hidrólisis alcalina a partir de los compuestos hidroxilados: ácido N- α -acetil- o N- δ -acetyl-2,5-diamino-3-hidroxi-valerianico, ácido N- α -acetil- o N- β -acetil-2,3-diamino-3-hidroxi-propiónico, 3-hidroxi-glutamina, así como sus derivados, particularmente ésteres, aminas y sales.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de hidroxilación estereoespecífica de derivados de ácidos α -amino-S-carboxílicos cíclicos para dar compuestos de ácido α -amino- β -hidroxi-S-carboxílicos, en los que la función α -amino está incorporada en el sistema anular y los grupos hidroxilo y ácido están en configuración trans, usando microorganismos con actividad de ectoína-hidroxilasa en un medio de producción, en el que los derivados de ácido S-carboxílico se añaden al medio de producción y se hidrolizan en el microorganismo en presencia de oxígeno y un cosustrato usando sistemas de transporte del microorganismo activados osmóticamente y, a continuación, se liberan del microorganismo de forma activa o pasiva, para recuperarlos a partir del medio de producción, **caracterizado porque** como microorganismos se usan los de los géneros Escherichia, Bacillus, Corynebacterium, Klebsiella, Marinococcus o Halomonas.
- 5
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el microorganismo presenta de forma natural un gen de hidroxilasa o es un microorganismo transformado con un gen de hidroxilasa.
- 10
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** el microorganismo es un microorganismo transformado con un gen transportador o posee de forma natural un sistema transportador adecuado.
- 15
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** los genes se llevan a expresión permanente bajo el control de promotores presentes de forma natural o el microorganismo es un microorganismo transformado con un promotor natural, mutado o modificado genéticamente.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el gen de hidroxilasa procede de Halomonas elongata.
- 20
6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado porque** el gen de hidroxilasa está contenido en un plásmido de tipo pET, de tipo pBBR o pHSG 575, así como derivados de los mismos.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se usa E.coli BL 21 como microorganismo.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el co-sustrato 2-oxoglutarato se regenera con glucosa, acetato o glicerina como fuente de C.
- 25
9. Procedimiento en continuo según una de las reivindicaciones anteriores.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** la obtención mediante cromatografía de los compuestos de ácido trans- β -hidroxicarboxílico.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se usa un derivado de ácido α -amino-S-carboxílico.
- 30
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el derivado de ácido S-carboxílico es un soluto compatible.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el derivado de ácido S-carboxílico es ectoína, homoectoína, DHMICA, ADPC, prolina, ácido azetidin-2-carboxílico o guanidinio-ectoína.
- 35
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** la hidroxilación total de ectoína para dar hidroxiectoína.
15. 3-Hidroxihomoectoína, 3-hidroxi-DHMICA, 3-hidroxi-ADPC, 3-hidroxi-guanidinio-ectoína y ácido 3-hidroxi-2-azetidincarboxílico, sus ésteres y sus sales, así como compuestos lineales que pueden obtenerse a partir de los mismos por medio de una hidrolasa alcalina.

