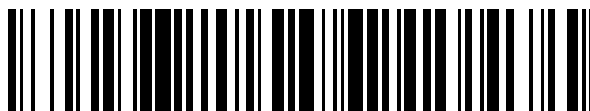


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 883**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2014 E 14175312 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2963109**

54 Título: **Procedimiento para la preparación biotecnológica de dihidrochalconas de glicósidos de flavanonas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2017

73 Titular/es:

**SYMRISE AG (100.0%)
Patentabteilung, Gebäude D 211,
Mühlenfeldstraße 1
37603 Holzminden, DE**

72 Inventor/es:

**THOMSEN, MAREN;
BORNSCHEUER, UWE;
HINRICHS, WINFRIED;
GROSS, EGON;
LEY, JAKOB y
GEISSLER, TORSTEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 647 883 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

Procedimiento para la preparación biotecnológica de dihidrochalconas de glicósidos de flavanonas

Campo de la invención

5 La invención se encuentra en el campo de la biotecnología y se refiere a un procedimiento en el que glicósidos de flavanonas se transforman, sin etapas intermedias químicas, en las correspondientes dihidrochalconas, a un microorganismo correspondiente, a un vector y a una célula huésped.

Estado de la técnica

10 En el marco de un programa de investigación del Departamento de Agricultura de EE.UU para reducir el sabor amargo en los zumos de cítricos, hacia la mitad de los años 60 del siglo pasado se reconoció una serie de glicósidos de flavanonas tales como, por ejemplo, naringina, hesperidina y narirutina como las sustancias amargas decisivas. Posteriormente, se encontró que la hidrogenación de los glicósidos de flavanonas para dar dihidrochalconas conduce a sustancias que en el límite de detección del efecto de dulzor tienen un sabor 1800 veces más dulce que el azúcar; si se sustituye el azúcar por estas dihidrochalconas en la relación ponderal 1:1, las dihidrochalconas continúan manifestándose todavía más eficaces en al menos un factor de 300. Dihidrochalcona de naringina, dihidrochalcona de hesperidina y dihidrochalcona de neohesperidina no sólo cuentan hoy en día a las sustancias edulcorantes más intensas, sino que también son particularmente adecuadas para enmascarar el sabor amargo de las sustancias de cítricos.

15 Determinados glicósidos de dihidrochalcona se pueden obtener mediante extracción a partir de bayas, especialmente de *Malus spp.* Sin embargo, el procedimiento es complejo, costoso y, además, depende de la temporada, de modo que no tiene técnicamente importancia alguna.

20 Partiendo de los glicósidos de flavanonas la preparación de las dihidrochalconas tiene lugar hoy en día mediante reducción catalítica bajo condiciones fuertemente básicas o mediante una acilación del tipo Friedel-Crafts de fenoles con ácidos dihidrocinámicos. Aun cuando la síntesis tiene lugar en rendimientos satisfactorios y está establecida industrialmente, presenta, sin embargo, una desventaja decisiva: se trata de un proceso de preparación químico, lo que significa que el producto final no puede ser declarado como natural por motivos reguladores.

25 A este respecto se ha de mencionar el documento **EP 2692729 A1** (SYMRISE), del que se conoce un procedimiento para la preparación de una dihidrochalcona utilizando un microorganismo transgénico, que comprende las siguientes etapas:

- 30 (i) proporcionar un microorganismo transgénico que contiene un segmento de ácido nucleico (a) que comprende o consiste en un gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana, y/o un segmento de ácido nucleico (a') que comprende o consiste en un gen que codifica una chalcona isomerasa vegetal, así como un segmento de ácido nucleico (b) que comprende o consiste en un gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana,
- 35 (ii) añadir una o varias flavanonas y/o uno o varios precursores o uno o varios derivados de los mismos al microorganismo transgénico y cultivar el microorganismo transgénico bajo condiciones que posibilitan la reacción de la o bien de las flavanonas y/o del o de los precursores o del derivado o bien de los derivados de los mismos para dar una dihidrochalcona,
- (iii) opcionalmente: aislar así como, eventualmente purificar la dihidrochalcona, en particular de floretilina.

40 Pericialmente se cita la redacción publicada posteriormente de *GALL et al* con el título "*Enzymatische Umsetzung von Flavonoiden mit einer bakteriellen Chalconisomerase und einer Enoatreduktase*" en **Angewandten Chemie, 126(5), págs. 1463-1466 (2014)**. En ella se describe la identificación y la expresión recombinante de la chalcona isomerasa y una enoato-reductasa de la bacteria anaerobia *Eubacterium ramulus*. La cepa de *E. coli* que expresa las dos enzimas puede emplearse para llevar a cabo la transformación de diferentes flavanonas en sus respectivas dihidrochalconas. El documento da a conocer, con ello, únicamente un procedimiento para la preparación de dihidrochalcona a partir de las correspondientes flavanonas. No se da a conocer en este documento la preparación de dihidrochalconas de glicósidos de flavanona.

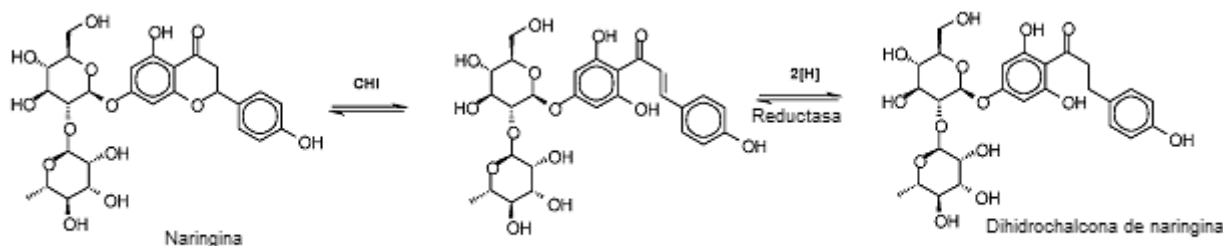
45 La misión de la presente invención ha consistido, por consiguiente, en proporcionar un procedimiento, con ayuda del cual se puedan transformar glicósidos de flavanona rápidamente y en elevados rendimientos en procedimientos biotecnológicos en las correspondientes dihidrochalconas, debiendo no tener lugar obligatoriamente etapas intermedias químicas.

Descripción de la invención

50 Un primer objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de dihidrochalconas de glicósidos de flavanona que comprende las etapas:

- (a) proporcionar un microorganismo transgénico, que contiene
- (i) un primer segmento de ácido nucleico (A) que contiene un gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana, así como
- (ii) un segundo segmento de ácido nucleico (B) que contiene un gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana,
- (b) añadir uno o varios glicósidos de flavanona al microorganismo transgénico,
- (c) cultivar el microorganismo transgénico en condiciones que posibiliten la simultánea isomerización y reducción del glicósido de flavanona para dar dihidrochalcona de glicósido de flavanona, así como, eventualmente
- (d) aislar y purificar el producto final,
- en donde el segmento de ácido nucleico (A)
- (1) representa una secuencia de ácidos nucleicos conforme a SEQ ID NO: 1, en la que el segmento de ácido nucleico (A') conforme a SEQ ID NO: 3 ha sido escindido, o
- (2) codifica una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 2, en la que el segmento de aminoácido (A') conforme a SEQ ID NO: 4 ha sido escindido.

Sorprendentemente, se encontró que mediante la incorporación de dos segmentos diferentes de ácido nucleico que, por una parte, contienen un gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana y, por otra parte, un gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana en un microorganismo adecuado, preferiblemente un microorganismo facultativamente anaerobio, proporciona un sistema que, en el caso de la adición de glicósidos de flavanona y el cultivo, posibilita simultáneamente la isomerización del glicósido de flavanona para dar chalcona y la reducción de la chalcona en la dihidrochalcona en tiempos cortos y con rendimientos extraordinarios, tal como se representa en el ejemplo de la reacción del glicósido de flavanona naringina para dar dihidrochalcona de naringina (= Naringin dihydrochalcone) a modo de ejemplo:



Dado que todo el procedimiento se contenta sólo con procesos enzimáticos/fermentativos, las dihidrochalconas de glicósidos de flavanona obtenidas de esta forma pueden designarse como naturales.

CHALCONA ISOMERASAS

Una "chalcona isomerasa" (CHI) en el sentido de la presente invención es una enzima que cataliza la reacción de una flavanona para dar chalcona. En particular, la CHI cataliza la reacción de naringina para dar chalcona de naringina.

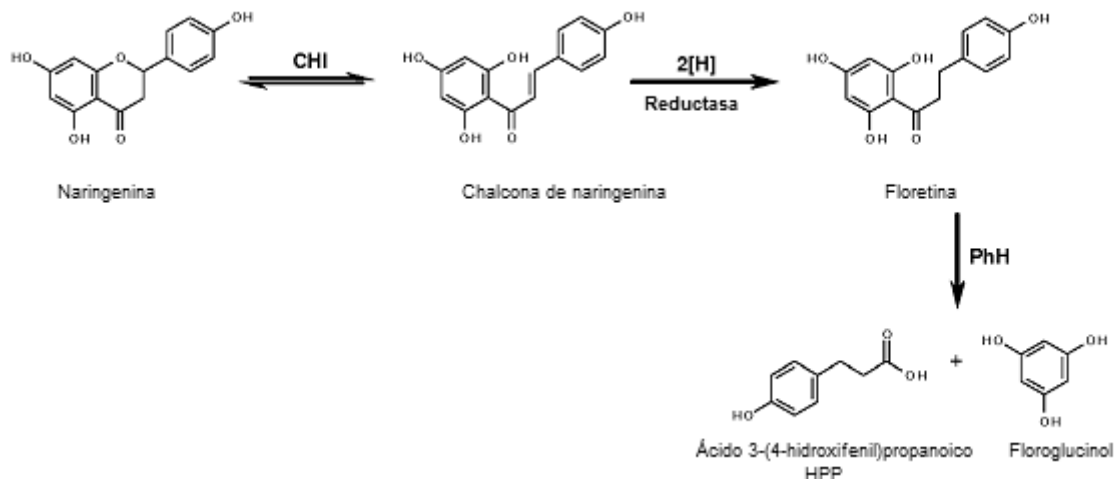
En una forma de realización concreta de la invención, el presente procedimiento biotecnológico se caracteriza por que una chalcona isomerasa bacteriana se incorpora, en combinación con una enoato-reductasa asimismo bacteriana, preferiblemente de la misma bacteria, en un microorganismo transgénico el cual, tras ello, está en condiciones de formar las dihidrochalconas de glicósido de flavanona deseadas, en particular dihidrochalcona de naringina.

Para este fin, primero y en particular, entra en consideración una chalcona isomerasa bacteriana que procede de un microorganismo del filo firmicutes, preferiblemente de la clase Clostridia, en particular del orden Clostridiales, siendo particularmente preferido entre ellos el organismo anaerobio *Eubacterium ramulus*.

Para los fines de la presente invención es particularmente preferido el uso de una chalcona isomerasa que presenta una, varias o todas las siguientes propiedades:

K_M [$\mu\text{mol/l}$]	$V_{\text{máx}}$ [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat} / K_M [$l^* \text{mol}^{-1} * \text{s}^{-1}$]
36,83	107,3	416,7	1,13* 107

5 Del estado de la técnica es conocido que el microorganismo anaerobio *Eubacterium ramulus* está en condiciones de degradar naringenina, formándose floretina de modo intermedio. La floretina formada de modo intermedio continúa metabolizándose directamente en *Eubacterium ramulus* (véase Schneider *et al*, Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*, **Arch Microbiol (2000) 173: 71-75**), tal como se representa en el siguiente esquema de reacción (véase en particular la reacción inducida por la floretina hidrolasa (PhH):



10 En el estado de la técnica se describen ciertamente diferentes posibilidades de empleo de sistemas enzimáticos y métodos de la biotransformación microbiana; por ejemplo, se conoce la posibilidad de una simple reducción de dobles enlaces mediante levaduras (p. ej., *Saccharomyces*). Sin embargo, disociaciones de éter enzimáticas apenas se examinaron hasta ahora.

15 En relación con la presente invención, se remite básicamente a las siguientes publicaciones: *Schoefer et al*, Anaerobic Degradation of Flavonoids by *Clostridium orbiscindens*, **Appl. Environ. Microbiol.**, oct. 2003, págs. 5849-5854 y *Herles et al*, "First bacterial chalcone isomerase isolated from *Eubacterium ramulus*", **Arch Microbiol (2004) 181: 428-434**. Reconocimientos en relación con la degradación de lignina se han descrito, por ejemplo, por Masai et al. (Masai et al., 1993; Otsuka et al., 2003; véase también el documento **JP 2002034557**).

20 En el documento **WO 2006 010117 A1** (KOFFAS) y el documento **WO 2005 084305 A1** (SCHMIDT-DANERT) se describe, además, la aplicación de la expresión heteróloga para la formación de flavonoides. En ellos se describen genes (exclusivamente) vegetales que procuran una expresión heteróloga de diferentes sustancias (partiendo de L-fenilalanina, tirosina y ácido cinámico).

25 En relación con la presente invención se comprobó, sin embargo, que las chalcona isomerasas en general y la CHI ex *E. ramulus* no siempre muestran rendimientos satisfactorios de los productos, si en lugar de las agliconas se emplean los correspondientes glicósidos. Un punto de vista particular de la presente invención ha consistido, por consiguiente, en realizar modificaciones preestablecidas en la enzima, de modo que ahora se emplean de una manera prácticamente igual agliconas o los correspondientes glicósidos, y las correspondientes dihidrochalconas pueden entonces también expresarse en un tiempo corto y en rendimientos satisfactorios.

Como se ha descrito arriba, la invención se refiere a un procedimiento, el cual se caracteriza por que el segmento de ácido nucleico (A) incorporado en el microorganismo transgénico contiene una secuencia de nucleótidos conforme a SEQ ID NO: 1, en la que se ha escindido el segmento de ácido nucleico (A') conforme a SEQ ID NO: 3.

30 Básicamente adecuados son también aquellos segmentos de ácidos nucleicos que coinciden con los segmentos de ácidos nucleicos (A-A') conformes a la invención en al menos un 50%, preferiblemente en al menos un 60 y especialmente en al menos un 80%, aun cuando con estas secuencias no se puedan alcanzar los mismos tiempos de expresión y rendimientos de expresión ventajosos.

35 Mutatis mutandis es asimismo objeto de la invención un procedimiento, en el que la chalcona isomerasa bacteriana contiene una secuencia de nucleótidos conforme a SEQ ID NO: 1, en la que se ha escindido el segmento de ácido nucleico (A') conforme a SEQ ID NO: 3.

La presente invención se refiere, además, a un procedimiento que se caracteriza porque el segmento de aminoácido (A) expresado en el microorganismo transgénico contiene una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 2 en la que se ha separado por corte el segmento de aminoácidos (A') conforme a SEQ ID NO: 4.

5 Básicamente, son adecuados también aquellos segmentos de aminoácidos que coinciden con los segmentos de aminoácidos (A-A') conformes a la invención en al menos un 50%, preferiblemente en al menos un 60% y especialmente en al menos un 80%, aun cuando con estas secuencias no se puedan alcanzar los mismos tiempos de expresión y rendimientos de expresión ventajosos.

10 Mutatis mutandis, es asimismo objeto de la invención un procedimiento en el que la chalcona isomerasa bacteriana contiene una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 2 en la que se ha escindido el segmento de aminoácidos (A') conforme a SEQ ID NO: 4.

15 En el marco de la presente invención, la "identidad de la secuencia de aminoácidos" se ha de determinar preferiblemente con ayuda del algoritmo de Waterman-Smith con una penalización de la apertura de espacio ("gap open penalty") de 10, una penalización de la extensión de espacio ("gap extension penalty") de 0,5 y la matriz BLOSUM62 (en relación con el algoritmo de Waterman-Smith, véase, por ejemplo, *Smith, T.F. y Waterman, M.S. "identification of common molecular subsequences", Journal of Molecular biology (1981), 147:195-197;* implementado en línea a través de la correspondiente página web de EMBL). Las secuencias de nucleótidos presentadas se crearon con ayuda del software BISSAP de la Oficina Europea de Patentes conforme al patrón WIPO 25.

20 La separación del segmento mencionado a partir de la secuencia total puede llevarse a cabo, por ejemplo, con el método FastCloning. Para este fin, se lleva a cabo una PCR con los siguientes cebadores:

Cebador directo: 5'-GATCCCGGCAGCAGCAGAAGGAAATCC-3'

Cebador inverso: 5'-GGATTCCTTCTGCTGCTGCCGGGATC-3'

25 A continuación, el plásmido de partida con DpnI. Una vez realizada la clonación, el plásmido pET28_CHI_ΔLid, así obtenido, puede ser transformado, de manera en sí conocida, junto con el segundo plásmido PET22_ERED (tal como se explica con detalle más adelante) en un microorganismo, en este caso preferiblemente *E. coli* BL21.

ENOATO REDUCTASAS

Una "enoato-reductasa" (ERED) en el sentido de la presente invención es una enzima que cataliza la deshidrogenación de determinados compuestos, en particular la reacción de chalcona de glicósido de naringenina para dar dihidrochalcona de glicósido de naringenina.

30 Como segunda y asimismo preferida forma de realización entra en consideración una enoato-reductasa bacteriana procedente de un microorganismo del filo de firmicutes, preferiblemente de la clase Clostridia, en particular del orden Clostridiales, siendo en este caso particularmente preferido el organismo anaerobio *Eubacterium ramulus*. En conjunto se prefiere la doble transformación tanto de la chalcona isomerasa como de la enoato-reductasa ex *Eubacterium ramulus* en un microorganismo adecuado, preferiblemente *E. coli*.

35 Para los fines de la presente invención se prefiere el uso de una enoato-reductasa que presenta un tamaño de proteínas de 74,455 kDa y/o expresa tanto en la fracción de proteínas soluble como también en la insoluble después de hasta 20 h bajo condiciones anóxicas a diferentes temperaturas.

40 Otra forma de realización preferida de la invención se refiere, por lo tanto, a un procedimiento, el cual se caracteriza porque el segmento de ácido nucleico (B) incorporado en el microorganismo transgénico, representa una secuencia de nucleótidos conforme a SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.

Mutatis mutandis es asimismo objeto de la invención un procedimiento en el que la enoato-reductasa bacteriana contiene una secuencia de nucleótidos conforme a SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.

45 Otra forma de realización particular de la invención se refiere, por lo tanto, a un procedimiento que se caracteriza porque el segmento de aminoácido (B) expresado en el microorganismo transgénico representa una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 6.

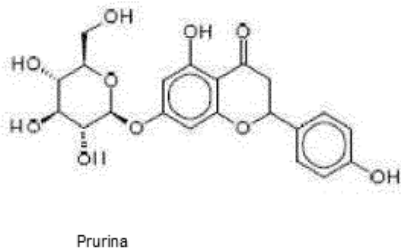
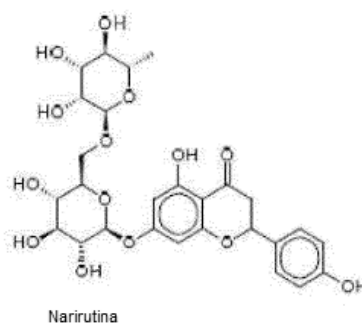
Básicamente adecuados son también aquellos segmentos de aminoácidos que coinciden con los segmentos de aminoácidos (B) conformes a la invención en al menos un 50%, preferiblemente en al menos un 60% y especialmente en al menos un 80%, aun cuando con estas secuencias no se puedan alcanzar los mismos tiempos de expresión y rendimientos de expresión ventajosos.

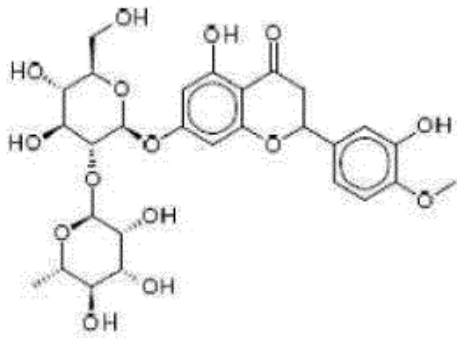
50 Mutatis mutandis, es asimismo objeto de la invención un procedimiento, en el que la enoato-reductasa bacteriana contiene una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 6.

GLICÓSIDOS DE FLAVANONA

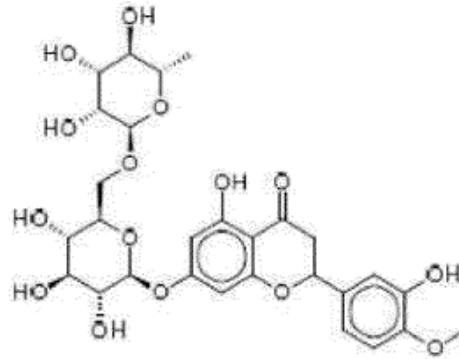
En el sentido de la presente invención, entran en consideración como glicósidos de flavanona que se hacen reaccionar para dar las correspondientes dihidrochalconas de glicósidos de flavanona, las siguientes sustancias:

- 5 Naringina, narirutina, prunina (naringina-7-O-glicósido), hesperidina, neohesperidina, hesperetin-7-O-glicósido, eriodictiolglicósidos tales como eriocitrina, neoeriocitrina, eriodictiol-7-O-glicósido, homoeriodictiolglicósidos tales como homoeriodictiol-7-O-glicósido, glicósidos de esterubina, glicósidos de sacuranetina, glicósidos de isosacuranetina, glicósidos de 4',7-dihidroxi-flavanona, glicósidos de 4',7-dihidroxi-3'-metoxi-flavanona, glicósidos de 3',7-dihidroxi-4'-metoxi-flavanona, glicósidos de 3',4',7-trihdroxt-flavanona, pudiendo presentarse las flavanonas en relación con la posición 2 del armazón de flavanona como enantiómero (S), como enantiómero (R), como racemato
- 10 o como mezcla arbitraria de los dos enantiómeros. En lo que sigue se representan a modo de ejemplo algunas de las flavanonas a emplear con preferencia:

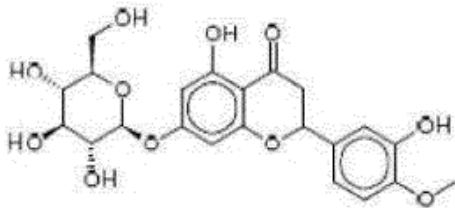




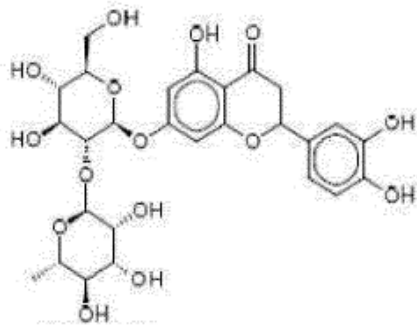
Neohesperidina



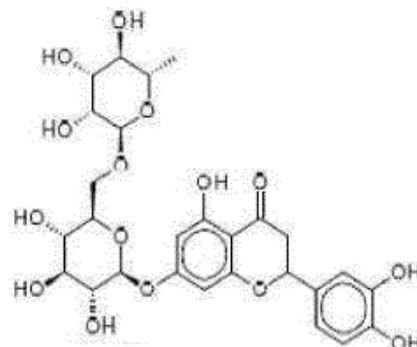
Hesperidina



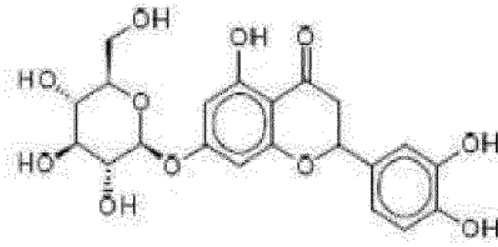
Hesperidina-7-O-glucósido



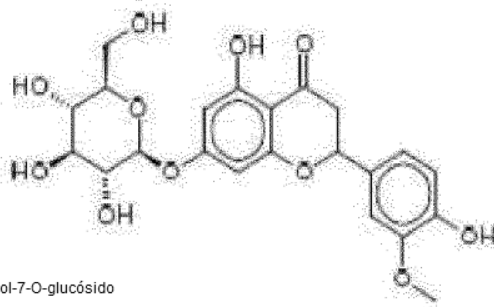
Neohesperidina



Eriocitrina

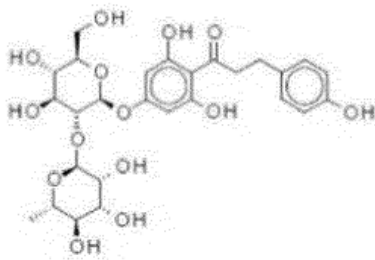


Eriodictiol-7-O-glucósido

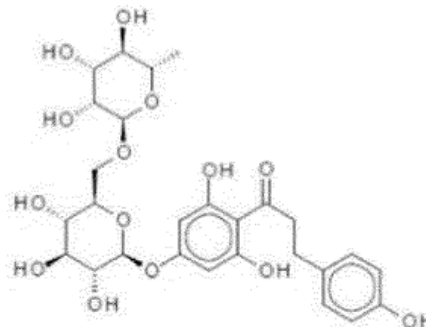


Homoeriodictiol-7-O-glucósido

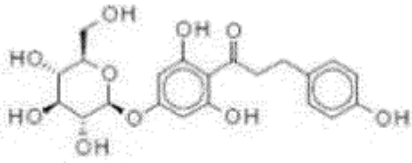
Éstas se pueden transformar, conforme al procedimiento de la invención, en las correspondientes dihidrochalconas que se reproducen en lo que sigue:



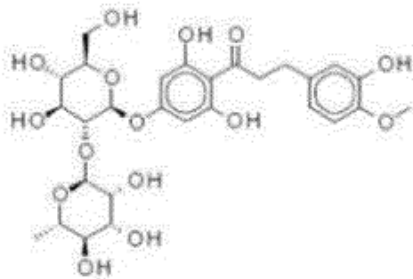
Dihidrochalcona de naringina



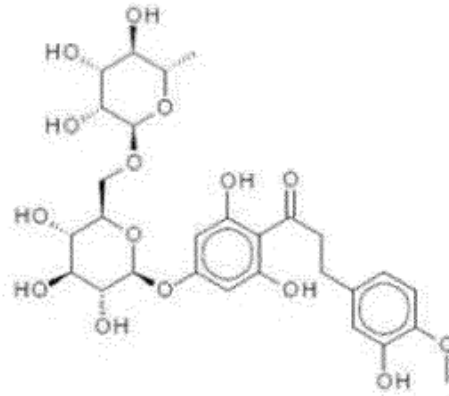
Dihidrochalcona de narirutina



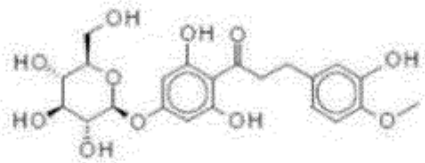
Dihidrochalcona de purina = Trilobatina



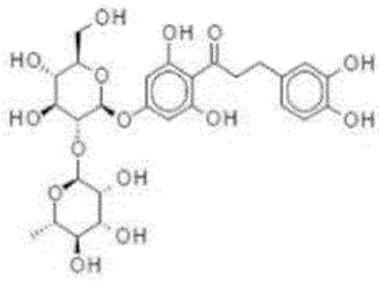
Dihidrochalcona de neohesperidina



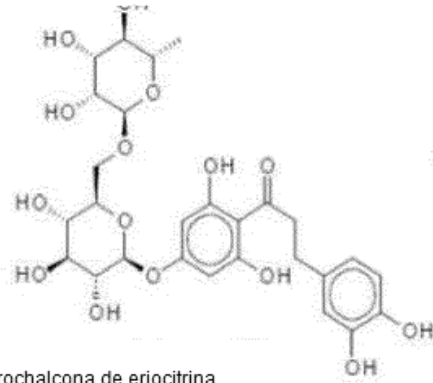
Dihidrochalcona de hesperidina



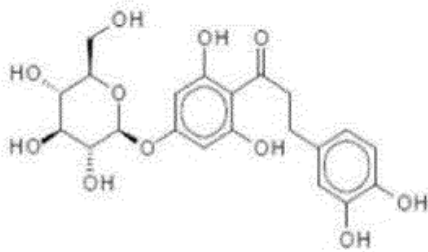
Dihidrochalcona de hesperidin-7-O-glucósido



Dihidrochalcona de neoeriodictina

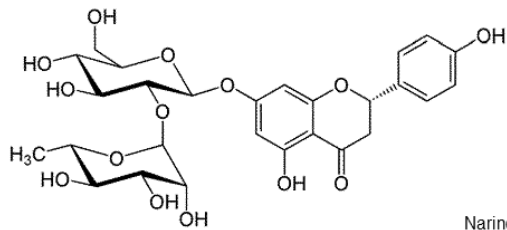


Dihidrochalcona de eriodictina

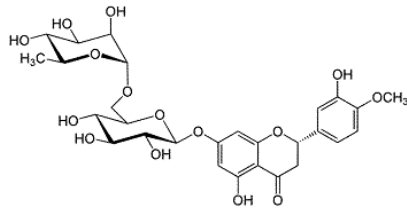


Dihidrochalcona de eriodictiol-7-O-glucósido

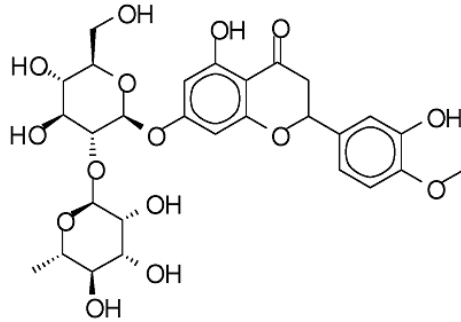
Particularmente preferida – ya que es comercialmente de importancia considerable y se puede obtener en tiempos particularmente cortos y con elevados rendimientos – es la reacción de los siguientes glicósidos de flavanona para dar las correspondientes dihidrochalconas:



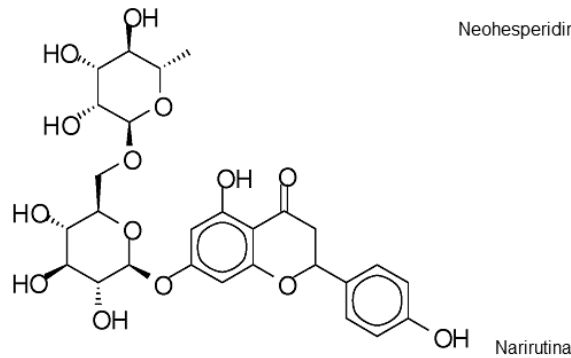
Naringina



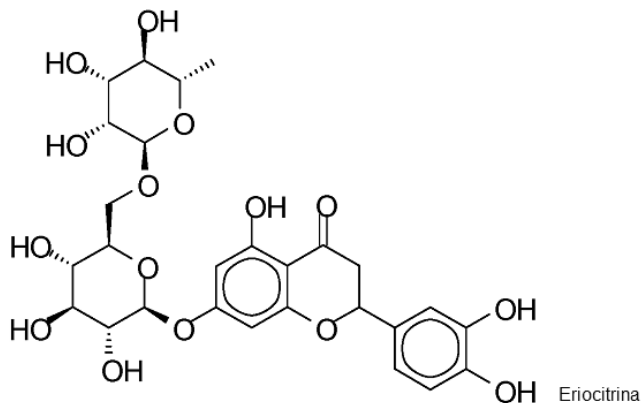
Hesperidina



Neohesperidina



Narirutina



Eriocitrina

Cultivo; expresión y aislamiento

- 5 Tal como se describe arriba, en la etapa (ii) de un procedimiento de acuerdo con la invención se añaden uno o varios glicósidos de flavanona al microorganismo transgénico, cultivándose el microorganismo transgénico en condiciones que posibilitan la reacción del o de los glicósidos de flavanona.

De acuerdo con una realización preferida de un procedimiento de acuerdo con la invención, los microorganismos transgénicos se cultivan primeramente, es decir, antes de la etapa (ii) en condiciones aerobias, preferiblemente

hasta alcanzar una concentración máxima de biomasa. En este caso, la DO_{600} debería encontrarse al menos en el intervalo de 1 a 15 o por encima, preferiblemente en el intervalo de 5 a 300, en particular en el intervalo de 10 a 275, preferiblemente en el intervalo de 15 a 250. A continuación, los microorganismos en la etapa (ii) se cultivan preferiblemente en condiciones anaerobias, teniendo lugar la expresión de las secuencias de aminoácidos deseadas o bien de las enzimas deseadas a base de los segmentos de ácido nucleico introducidos o bien de los transgenes introducidos, por ejemplo excitados mediante inducción mediante IPTG y/o lactosa (en el caso de utilizar un promotor correspondiente adecuado o bien un sistema de expresión correspondiente adecuado).

Básicamente, de acuerdo con la invención se prefiere que la incubación en la etapa (ii) tenga lugar al menos en parte o por completo bajo condiciones anaerobias.

En función del microorganismo, el experto en la materia puede crear en la etapa (ii) para los fines de la presente invención condiciones del entorno adecuadas y, en particular, proporcionar un medio (de cultivo) adecuado. El cultivo tiene lugar preferiblemente en medio LB o TB. Alternativamente, puede utilizarse un medio (más complejo) consistente en o que comprende materias primas vegetales, en particular de plantas de cítricos, de pomelo y naranjo. El cultivo tiene lugar, por ejemplo, a una temperatura mayor que 20°C, preferiblemente mayor que 25°C, en particular mayor que 30°C (preferiblemente, en el intervalo de 30 a 40°C), lo cual puede favorecer, en particular la formación de dihidrochalcona de naringina o bien aumentar el rendimiento. Además, también una temperatura para la inducción (véase arriba) menor que 40°C, en particular menor que 35°C (preferiblemente en el intervalo de 20 a 30°C) puede favorecer la formación de dihidrochalcona de naringina o bien aumentar el rendimiento.

Los glicósidos de flavanona se agregan, referido al medio (de cultivo) que contiene los microorganismos transgénicos, en la etapa (ii) preferiblemente en una cantidad de 0,1 mM a 100 mM (mmol / L), preferiblemente de 0,5 a 95 mM, de manera particularmente preferida de 1 a 90 mM al microorganismo transgénico. En este caso, pueden pasar a emplearse (co)disolventes adecuados.

En el caso de que para la inducción (p. ej., del operón lac) se utilicen uno o varios inductores adecuados, p. ej., IPTG o lactosa, se prefiere emplear el inductor referido al medio (de cultivo) que contiene los microorganismos transgénicos, en la etapa (ii) en una cantidad de 0,001 mM a 1 mM, preferiblemente de 0,005 a 0,9 mM, de manera particularmente preferida de 0,01 a 0,8 mM, dado que en este caso se pueden alcanzar rendimientos particularmente buenos.

Para el aislamiento o la purificación de las dihidrochalconas de glicósidos de flavanona expresadas pueden efectuarse, por ejemplo, extracciones con disolventes orgánicos. Estos se eligen preferiblemente de la siguiente lista: isobutano, 2-propanol, tolueno, acetato de metilo, ciclohexano, 2-butanol, hexano, 1-propanol, petróleo ligero, 1,1,1,2-tetrafluoroetano, metanol, propano, 1-butanol, butano, etilmetilcetona, acetato de etilo, dietiléter, etanol, dibutiléter, CO₂, terc.-butilmetiléter, acetona, diclorometano y N₂O. Particularmente preferidos son aquellos disolventes que con el agua configuran un límite de fases ópticamente reconocible. Después de ello, se puede proponer por sí misma una separación del agua residual en el disolvente, así como la separación del disolvente, a la que de nuevo se puede unir una retro-disolución de la dihidrochalcona en un (eventualmente otro) disolvente, que es adecuado, p. ej., para una cristalización eventualmente subsiguiente y un secado del producto. Alternativa o adicionalmente, puede tener lugar una purificación por adsorción, una purificación por destilación y/o una purificación cromatográfica.

Alternativamente, para el aislamiento o la purificación de las dihidrochalconas de glicósidos de flavanona formadas pueden utilizarse procedimientos para el secado, en particular procedimientos del secado en cinta continua en vacío, secado por pulverización, destilación o liofilización de la disolución de fermentación con contenido o exenta de células.

Microorganismos transgénicos

Por un "microorganismo transgénico" se ha de entender en relación con la presente invención un microorganismo alterado o bien modificado por técnicas genéticas en el que se han introducido de manera preestablecida, mediante procedimientos biotecnológicos, segmentos de ácidos nucleicos (véanse los segmentos (A) y (B) de ácidos nucleicos tal como se describen en esta memoria) o bien genes de otro organismo (los denominados transgenes).

Otro objeto de la invención comprende, por lo tanto, un microorganismo transgénico, que contiene

- (i) un primer segmento (A) de ácido nucleico que contiene un gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana, así como
- (ii) un segundo segmento (B) de ácido nucleico que contiene un gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana,

en donde el segmento (A) de ácido nucleico

- (1) representa una secuencia de ácidos nucleicos conforme a SEQ ID NO: 1, en la que el segmento (A') del ácido nucleico ha sido escindido conforme a SEQ ID NO: 3, o

- (2) codifica una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 2, en la que el segmento (A') de aminoácido ha sido escindido conforme a SEQ ID NO: 4.

Preferiblemente, en este caso se trata de un microorganismo anaerobio facultativo, preferiblemente de una proteobacteria, en particular una enterobacteria, por ejemplo del género *Escherichia*, preferiblemente *E. coli*, en particular *E. coli* Rosetta, *E. coli* BL21, *E. coli* K12, *E. coli* MG1655, *E. coli* SE1 y sus derivados, levaduras, por ejemplo *S. cerevisiae* y *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha*, así como hongos tales como *Aspergillus spp.* o *Trichoderma spp.*

El microorganismo transgénico de acuerdo con la invención se distingue, en particular, porque

- (i) el gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana codifica una chalcona isomerasa de un microorganismo del filo de firmicutes, y/o
- (ii) el gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana codifica una enoato-reductasa de un microorganismo del filo de firmicutes.

Métodos que, en base a los segmentos introducidos de ácido nucleico o bien de los transgenes, posibilitan una expresión de las secuencias de aminoácidos deseadas o bien de las enzimas deseadas, son asimismo suficientemente conocidos por el experto en la materia, p. ej., utilizando un elemento regulador, en particular un promotor.

Vector

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector, es decir, una vesícula de transporte ("transbordador de genes"), en particular un vector de plásmido, para la transferencia de ácido o ácidos nucleicos extraños a una célula receptora, en particular un vector de plásmido que posibilita la clonación de uno o varios segmentos de ácidos nucleicos, que contiene

- (i) un primer segmento (A) de ácido nucleico que contiene un gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana, así como
- (ii) un segundo segmento (B) de ácido nucleico que contiene un gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana,

en donde el segmento (A) de ácido nucleico

- (1) representa una secuencia de ácidos nucleicos conforme a SEQ ID NO: 1, en la que el segmento (A') del ácido nucleico ha sido escindido conforme a SEQ ID NO: 3, o
- (2) codifica una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 2, en la que el segmento (A') de aminoácido ha sido escindido conforme a SEQ ID NO: 4.

Célula huésped

La presente invención se refiere también a una célula huésped que contiene uno o varios vectores de acuerdo con la invención, idénticos o diferentes, tal como se describe en esta memoria. De acuerdo con la invención, se prefiere una célula huésped que contenga tanto uno o varios vectores con un segmento (A) de ácidos nucleicos, que contiene un gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana, como uno o varios vectores con un segmento (B) de ácidos nucleicos que contiene un gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana.

En el caso de una célula huésped de acuerdo con la invención se trata preferiblemente de un microorganismo a emplear de acuerdo con la invención o bien de acuerdo con la invención (tal como se describe arriba). Las células huésped de acuerdo con la invención o bien microorganismos de acuerdo con la invención o a emplear de acuerdo con la invención descritos en esta memoria son o bien sirven preferiblemente como cepa (de producción) para la preparación biotecnológica de dihidrochalconas descritas en esta memoria, en particular de dihidrochalcona de naringina.

Preparados

Con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención, se puede transformar de esta manera, a partir de uno o varios de los glicósidos de flavanona arriba mencionados, que están contenidos en alimentos con contenido en glicósidos de flavanona o preparados adecuados para la preparación de alimentos, en las correspondientes dihidrochalconas y, con ello, se obtienen preparados designables como naturales, que se caracterizan porque contienen al menos una de las dihidrochalconas arriba mencionadas y, con ello, tienen un sabor menos amargo y más dulce que el preparado de partida.

A este respecto, se dan a conocer, además, preparados de alimentos que contienen las dihidrochalconas de glicósidos de flavanona obtenidas según el procedimiento de acuerdo con la invención.

En este caso, los glicósidos de flavanona arriba definidos se obtienen preferiblemente de partes de plantas, en particular frutos o fructificaciones o productos obtenidos mediante procesos habituales, p. ej., frutos secos o partes de frutos frescos o secos (p. ej., albedo, flavedo), zumos directos, fracciones de zumos, corrientes secundarias de la producción de zumo, aceites esenciales, oleorresinas, concentrados de zumos, purés de frutas, fruta prensada, 5 hojas frescas o secas, de los géneros *Citrus* o *Poncirus* o *Clymenia* o *Eremocitrus* o *Microcitrus* u *Oxanthera* o *Fortunella* o *Eriodictyon* o *Viscum*. Los glicósidos de flavanona arriba definidos pueden aislarse, extraerse o enriquecerse también mediante los disolventes permitidos para la producción de alimentos o mezclas de disolventes o mediante variación del pH, preferiblemente tratamiento alcalino y luego ácido.

Los alimentos con contenido en glicósidos de flavanona obtenidos de esta forma o los preparados adecuados para la producción de alimentos se transforman con el procedimiento de acuerdo con la invención en preparados con contenido en glicósido de dihidrochalcona, designables como naturales, y pueden entonces utilizarse como tales o emplearse, después de la separación de la célula huésped y/o de sus componentes y de la concentración obtenida opcional mediante procesos físicos, como preparado adecuado para la producción de alimentos, preferiblemente como preparado adecuado para la preparación de alimentos con un efecto enmascarador del amargor o potenciador del dulzor. 10 15

Ejemplos de alimentos adecuados comprenden, en particular, dulces (por ejemplo productos en barritas de chocolate, demás productos en barritas, gominolas, caramelos duros y blandos, goma de mascar), bebidas alcohólicas o no alcohólicas (por ejemplo café, té, té helado, vino, bebidas con contenido en vino, cerveza, bebidas con contenido en cerveza, licores, aguardientes, brandis, limonadas con contenido en frutas (carbonatadas), bebidas isotónicas (carbonatadas), bebidas refrescantes (carbonatadas), néctares, zumos con agua mineral, zumos de frutas y hortalizas, preparados de zumos de frutas u hortalizas, así como bebidas instantáneas (por ejemplo, bebidas de cacao instantáneo, bebidas de té instantáneo, bebidas de café instantáneo, bebidas de frutas instantáneas). 20

Particularmente preferidos son en este caso como alimentos con contenido en glicósidos de flavanona zumos de cítricos, en particular zumos de naranja, que contienen un elevado contenido en naringina y que pueden transformarse mediante el procedimiento de acuerdo con la invención en zumos de naranja con contenido en dihidrochalcona de naringina de acuerdo con la invención. 25

EJEMPOS

EJEMPLO 1

Estrategia de clonación

La escisión de la secuencia del Lid a partir del gen de la CHI se llevó a cabo mediante el método *FastCloning*. Para este fin tuvo lugar una PCR con los cebadores mencionados más adelante sobre pET28_CHI (desnaturalización: 30 s, 95°C, reasociación: 30 s, 50°C, alargamiento: 6,5 min, 72°C). A continuación, se digirió el plásmido de partida con *DpnI*. 30

Cebador directo: 5'-GATCCCGGCAGCAGCAGAAGGAAATCC-3'

35 Cebador inverso: 5'-GGATTCCTTCTGCTGCTGCCGGGATC-3'

Después de efectuada la clonación, el plásmido pET28_CHI_ΔLid (**Figura 1**) se transformó junto con el plásmido pET22_ERED en *E. coli* BL21.

EJEMPLO 2

Expresión de la doble transformación

40 200 mL de LB_{can,amp} se inocularon con 1% (v/v) de un cultivo de una noche y se cultivaron a 37°C a una DO ≥ 1. Después tuvo lugar la inducción de la expresión con IPTG 0,1 mM. La expresión de la proteína tuvo lugar durante 21 h a 20°C.

Tal como se puede observar en la **Figura 2**, la expresión de CHI_ΔLid tuvo lugar tanto en la fracción soluble como en la fracción no soluble, mientras que la ERED solamente se podía expresar en la forma insoluble.

45 EJEMPLO 3

Biocatálisis de células enteras

Después del cultivo de las células, éstas se normalizaron con TRIS-HCl 20 mM pH 7,5 a una DO = 150. Para llevar a cabo las biocatálisis, en cada caso 490 μL de la suspensión de células con 10 μL de disolución de naringina (solución patrón: naringina 7,5 mM disuelta en 1,2-propilenglicol; concentración final: 150 μM) se añadieron a un recipiente de reacción Eppendorf de 2 mL y se gasificaron con nitrógeno. Las biocatálisis se llevaron a cabo a 23°C, 900 rpm y 22 h. La extracción de los sustratos tuvo lugar dos veces con acetato de etilo. 50

Después de 22 h pudo observarse una conversión del 65% de la naringina (**Figura 3**).

EJEMPLO 4

Supresión del amargor de zumo de naranja con contenido en naringina

5 Un zumo de naranja con una concentración de 100 ppm de naringina se incubó con las células descritas en el Ejemplo 3 y se incubó a 23°C con agitación durante 48 h. El contenido de naringina se redujo a 50 ppm y al mismo tiempo se forma dihidrochalcona de naringina.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Symrise AG	
5	<120> Procedimiento para la preparación biotecnológica de dihidrochalconas de glicósidos de flavanonas	
	<130> C 3275 EP	
10	<140> EPEp14175312.9	
	<141> 01-07-2014	
	<150> EP14175312.9	
	<151> 01-07-2014	
15	<160> 7	
	<170> BiSSAP 1.3	
20	<210> 1	
	<211> 852	
	<212> DNA	
	<213> Eubacterium ramulus	
	<400> 1	
	atggcagatt tcaaattcga accaatgaga agtcttatct acgttgactg cgtaagcgaa	60
	gactacagac caaaacttca gagatggatt tataaagtac atattccgga cagcatctct	120
	cagtttgagc cgtatgttac caaatatgca ttttatccgt ccttccgat tccaccacag	180
	ggatgatcgtt tcggatagc aagaatgcag ctgacagagc atcactgggt agtaagcgac	240
	cttgatcttc gtcttgagat caaagcaatc gctgagacat tccgatgga cgtacttgta	300
	tggcagggac agatcccggc agcagctcat acagacgctc agatcgatc tgacggagat	360
	gcaggaaatg cagcccgtaa atccaacaat gcagaaggaa atccatttat ctttgcatc	420
	cttccgatgt ggtgggagaa agacctgaaa ggaaaaggac gtacgatcga ggacggcgca	480
	aactatcgtt tcaatatgac tatcggtttc ccagaaggcg tagacaaagc agaggagag	540
	aatgggttat ttgagaaagt agttccgatt cttcaggcag ctccggagtg tacacgtgta	600
	cttgcaagtg cagtaaagaa agacatcaac ggatgcgtaa tggattgggt acttgaaatc	660
25	tggtttgaga atcagtcgg atggtacaaa gtaatggtag atgacatgaa agcacttgaa	720
	aaaccgcat gggctcagca ggatgcttcc cggttcctga aaccatacca caatgtttgc	780
	agtgcagcag ttgctgatta tacaccaagc aacaaccttg caaattatcg tggatacatc	840
	accatgagat aa	852
	<210> 2	

ES 2 647 883 T3

	<211> 187		
	<212> DNA		
	<213> Eubacterium ramulus		
5	<400> 2		
	madkmrsyv d cvsdyrkrwy kvhdssyvtk yaysgdrgya rmthhwsdd rkaatmdvww	60	
	gaahtdads dgdagnaark snnagnamww kdkgkgrtdg anyrnmtdggv dkagkwkvva	120	
	actrvasavk kdngcvmdwv wnsqwykvmv ddmkakswad akyhnvcsaa vadytsnna	180	
	yrgytmr	187	
	<210> 3		
	<211> 66		
10	<212> DNA		
	<213> Eubacterium ramulus		
	<400> 3		
	catacagacg ctcagatcga ttctgacgga gatgcaggaa atgcagcccg taaatccaac	60	
	aatgca	66	
15	<210> 4		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Eubacterium ramulus		
20	<400> 4		
	htdadsdgd gnaarksna 20		
	<210> 5		
25	<211> 2037		
	<212> DNA		
	<213> Eubacterium ramulus		
	<400> 5		
30	atggcagaaa aaaatcagta ttttccacat ttgtttgagc cgttaaaagt tggttcaaag	60	

ES 2 647 883 T3

acaattaaga accgtattga ggcagcaccg gctttatttg cattcgagca ttatatogaa 120
 ctgaatccgg atccgtttgg ctataccaca ccggttccgg agcgtgcggt ccgtatgctg 180
 gaggcaaagg caaaaggagg ggcaggaatt gtatgtctgg gtgagttaag ccggaatcat 240
 gagtatgaca aacggtttcc gtttgaaccg tatcttgatt ttacatccag atcagataag 300
 cagtttgaaa ttatgaagga aactgccggag atgatcaaaa gctatggggc atttccgatg 360
 ggcgagctgc tttcctgcgg tgaaatcaag acaaatatcg gagatggat caatccgaag 420
 ggaccatctg agaaagatct tccggatggc tctcatgtgg aggcgtttac aaaagaagag 480
 atlllaagct gclalcagga llalglaacl gcalglaaal gglllcagge agcaggctcg 540
 gaaggcalla lgalccactg cggacatggc lggcllccgg cacagllccl glclccgcaa 600
 tacaataaac gtaccgatga gtatggggga tcttttghaa acagagcaag atttactggt 660
 gatctgttaa aaactgttgg tgaagctatg ggaccggact tegtgatcga gatccgtgct 720
 agcagctctg agcatttacc gggcggatta gagctggaag atgctgtaaa ttattgtaaa 780
 ctgtgtgagc catacattga tatgatccat gtctctgtg gtcattacct gatttcttcc 840
 agaagttggg agttcacaac tgcttatgca ccgcatggc cgaatattga accggcagct 900
 gttatcaaac agaacgtatc cattccggtt gcgqcagtcg gcqccatcaa ttctccgaa 960
 caggcggag aggcaatcgc gtcaggaaaa atcgatatgg tatccatggg acgtcagttc 1020
 tttgcagatc cggcatttcc aaacaaggca aaagaagggc atgcagatga gatccgtcgc 1080
 tgtctgcgct gcggaagatg ctatccgggt ccgtccggcg agcatgaaac agagatctcg 1140
 accgtgaaat tcccaccact ggattcctgt accatcaatc catatgatgt atggccggca 1200
 tctcatcata aagtcccttc ggaccgcctg ccgaaaccgg aagcaagccg taaggatttg 1260
 gtatgaggcg gcggctgtgg cggctctcag acagcgatca cagcatcaga cagaggtcat 1320
 caggtaatcc tgtgcgaaaa atccggagta ttaggcggtc tgatcaattt tacggatcat 1380
 accgataata aagtagatat cagaaacttc aaagatctgc tgatccgcga tgtggagaaa 1440
 cgtccgatcg aagtaagatt aaactgtgaa gtaacaccgg aactcatcag agaaattgct 1500
 ccggaagcag ttgtactggc cgtccgatcc gatgatctga tcttccaat cgaggggaatt 1560

ES 2 647 883 T3

	gaaaatgCGg taacagcaat ggacgtatac agcaatgact ttgcaggTct tggaaagagc	1620
	accatcgtac tCGgtggCGg tctggTtggc tgtgaggcag cgcagatta tattgatcac	1680
	ggtgtagaga caacgattgt tGaaatGaaa ggtgcgctga tgccggagac aaccggtctg	1740
	taccgtacag ctgtacatga tttcatcgac aaaaacggcg gcaaatacga agtaaagca	1800
	aaagttgtca aagttggcaa agatTttgtg gtagcggaaC aagatgggaa agagattacc	1860
	atcaaagcag attctgttgt caatgcaatg ggacgccgtg cgcAtgcgac agaagcactt	1920
	gagacagcta tcaaagaagc tggTattccg gTatggaaga tCGgtgactg tgtccgtgCG	1980
	cgtcagatcg gtgatgcggt aagagaaggc tggaccgcag caatggaaat tatctaa	2037
	<210> 6	
	<211> 447	
5	<212> DNA	
	<213> Eubacterium ramulus	
	<400> 6	
	maknyhkvgs ktknraaaah yndgyttvra rmakakggag vcgsnhydkr ydtsrsdkmk	60
	tamksygamg sogktngdgn kgsKddgshv atkscydyvt ackwaagwgm hoghgwasyn	120
	krtDyggSnr artvdktvra mgdvrvssh ggDavnyckc ydmhvscghy sssrswttay	180
	ahgnaavknv svaavggnsa aasgkdmvsm gradankag hadrrrcrcgr cygsghtwtv	240
	kdscTnydvw ashhkvdRmk asrkvvvggg cggTatasdr ghvcksgvgg ntdhtdhkvd	300
	rnkdrdvkrv rncvtraavv avgsddgnav tamdvysnda ggkstvgggv gcaaadydhg	360
	vttvmkgamt tgyrtavhdd knggkyvnaK vvkvgkdvva dgkTkadsvv namgrrahat	420
10	atakagvwkg dcvrargdav rgwtaam	447
	<210> 7	
	<211> 2037	
	<212> DNA	
	<213> Eubacterium ramulus	
15	<400> 7	
	atggcagaaa agaaccaata ctTcccgcac ctgtTtgaac cgetgaaagt cggctctaaa	60
	accatTaaaa atcgcatega agcagcaccg gccctgtTtg cattcgaaca ttatatcgaa	120

ES 2 647 883 T3

ctgaaccggg acccgtttgg ttacaccacg ccggtgccgg aacgtgcatt ccgtatgctg	180
gaagccaaag caaaaggcgg tgcgggcatt gtttgtctgg gtgaactgag cccgaatcac	240
gaatatgata aacgctttcc gttogaaccg tacctggatt ttaccagccg ttctgacaaa	300
cagttcgaaa ttatgaaaga aacggcagaa atgatcaaaa gctatggcgc ttttccgatg	360
ggtgaactgc tgcctgtcgg tgaatcaaaa accaacattg gcgatgggat caatccgaaa	420
ggcccgctcag aaaaagatct gccggacggt tcgcatgtgg aagccttcac caaagaagaa	480
alccclgcal gttaccagga ttaagttacg gcalgcaaal gllccaagc ggccggctgg	540
gaaggtatta tgatecattg tggccacggt tggctgccgg ccgagtttct gaggccgcaa	600
lalaacaaac gcaccgatga aacggcgggt lcllllgaaa atcgtgccgg clccaccgtc	660
gatctgctga aaacgggtcgg tgaagcgatg ggcccggaact tcgtgattga aatccgtggt	720
agctctagtg aacatctgcc gggcggctctg gaactggaag atgcggtgaa ctattgcaaa	780
ctgtgtgaac cgtacattga catgatccat gttagttgcg gccactatct gtcctcctcg	840
cgctcctggg aatttaccac ggcttaacgg ccgcacggtc cgaacatcga accggcagct	900
gtcattaaac agaatgtgag catcccgtt gcacgactcg gcggtatcaa ctctccgga	960
caagcgggaag aagccattgc aagtggcaaa atcgatatgg ttagcatcgg ccgtcagttt	1020
ttcgtgacc ccgcctttcc qaataaagca aaagaagccc atgctgatga aattcgtcgc	1080
tgcctgcggt gtggctcgtg ctatccggc ccgagtggtg aacacgaaac cgaaatctgg	1140
acggtgaaat tcccgccgct ggatagttgt accattaacc cgtacgactg gtggccggca	1200
tcccateaca aagttctgcc ggatcgcctg ccgaaaccgg aagcgtcccg taaagtctg	1260
gtggttggcg gtcgctgtgg tggctcag accgcaatca cggcatcaga ccgcggccat	1320
caagtcattc tggcgaaaa atcgggtgtg ctgggtggcc tgattaactt taccgatcat	1380
acggaccaca aagttgatat tgcgaattc aaagatctgc tgatccgtga cgtcgaaaaa	1440
cgcccgattg aagttcgtct gaattgngaa gtcaccocgg aactgattcg tgaatatcgt	1500
ccggaagcag tcgtgctgcc agtgggcagt gatgacctga ttctgccgat cgaaggtatt	1560
gaaaacgccg ttaccgcaat ggatgtctat agcaatgact ttgccggcct gggtaaatct	1620

ES 2 647 883 T3

acgatcgtgc tgggtggcgg tctggttggc tgcgaagcag ctgcggatta tatcgatcat	1680
ggcgtggaaa ccacgattgt tgaaatgaaa ggcgcactga tgccggaaac cacgggtctg	1740
tatcgtaccg ctgtgcacga ttttattgac aaaaacggcg gtaaatacga agtcaatgcc	1800
aaagttgtca aagtgggcaa agatttcgtg gttgcagaac aggacggtaa agaaattacc	1860
atcaaagcgg attctgtcgt gaatgcgatg ggcctgcgctg ctcacgcaac cgaagctctg	1920
gaaacggcga ttaaagaagc cggcatcccg gtttgaaaa ttggtgattg cgtccgtgcc	1980
cgccaaatcg gtgacgcagt tcgtgaaggc tggacggctg caatggaaat catctaa	2037

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de dihidrochalconas de glicósidos de flavanona, que comprende las etapas:
- (a) proporcionar un microorganismo transgénico, que contiene
- 5 (i) un primer segmento de ácido nucleico (A) que contiene un gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana, así como
- (ii) un segundo segmento de ácido nucleico (B) que contiene un gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana,
- (b) añadir uno o varios glicósidos de flavanona al microorganismo transgénico,
- 10 (c) cultivar el microorganismo transgénico en condiciones que posibiliten la simultánea isomerización y reducción del glicósido de flavanona para dar dihidrochalcona de glicósido de flavanona, así como, eventualmente
- (d) aislar y purificar el producto final,
- en donde el segmento de ácido nucleico (A)
- (1) representa una secuencia de ácidos nucleicos conforme a SEQ ID NO: 1, en la que el segmento de ácido nucleico (A') conforme a SEQ ID NO: 3 ha sido escindido, o
- 15 (2) codifica una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 2, en la que el segmento de aminoácido (A') conforme a SEQ ID NO: 4 ha sido escindido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el microorganismo transgénico es un microorganismo anaerobio facultativo.
- 20 3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y/o 2, caracterizado por que el gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana codifica una chalcona isomerasa de un microorganismo del filo firmicutes.
4. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana codifica una enoato-reductasa de un microorganismo del filo firmicutes.
- 25 5. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el segmento (B) del ácido nucleico representa una secuencia de nucleótidos conforme a SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.
6. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la chalcona isomerasa bacteriana contiene una secuencia de nucleótidos conforme a SEQ ID NO: 1, en la que el segmento de ácido nucleico (A') conforme a SEQ ID NO: 3 ha sido escindido.
- 30 7. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la enoato-reductasa bacteriana contiene una secuencia de nucleótidos conforme a SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.
8. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que el segmento (B) del aminoácido expresado en el microorganismo transgénico representa una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 6.
- 35 9. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la enoato-reductasa bacteriana contiene una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 6.
10. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que los glicósidos de flavanona se eligen del grupo que está formado por naringina, narirutina, prunina (naringina-7-O-glicósido), hesperidina, neohesperidina, hesperetin-7-O-glicósido, eriodictiolglicósidos tales como eriocitrina, neoeriocitrina, eriodictiol-7-O-glicósido, homoeriodictiolglicósidos tales como homoeriodictiol-7-O-glicósido, glicósidos de esterubina, glicósidos de sacuranetina, glicósidos de isosacuranetina, glicósidos de 4',7-dihidroxi-flavanona, glicósidos de 4',7-dihidroxi-3'-metoxi-flavanona, glicósidos de 3',7-dihidroxi-4'-metoxi-flavanona, glicósidos de 3',4',7-trihdroxt-flavanona, así como sus mezclas.
- 40 11. Microorganismo transgénico, que contiene
- (i) un primer segmento de ácido nucleico (A) que contiene un gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana, así como
- 45 (ii) un segundo segmento de ácido nucleico (B) que contiene un gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana,

en donde el segmento de ácido nucleico (A)

(1) representa una secuencia de ácidos nucleicos conforme a SEQ ID NO: 1, en la que el segmento de ácido nucleico (A') conforme a SEQ ID NO: 3 ha sido escindido, o

5 (2) codifica una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 2, en la que el segmento de aminoácido (A') conforme a SEQ ID NO: 4 ha sido escindido.

12. Microorganismo según la reivindicación 11, caracterizado por que se trata de un microorganismo anaerobio facultativo.

13. Microorganismo según las reivindicaciones 11 y/o 12, caracterizado por que

10 (i) el gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana codifica una chalcona isomerasa de un microorganismo del filo firmicutes, y/o

(ii) el gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana codifica una enoato-reductasa de un microorganismo del filo firmicutes.

14. Vector, que contiene

15 (i) un primer segmento de ácido nucleico (A) que contiene un gen que codifica una chalcona isomerasa bacteriana, así como

(ii) un segundo segmento de ácido nucleico (B) que contiene un gen que codifica una enoato-reductasa bacteriana,

en donde el segmento de ácido nucleico (A)

20 (1) representa una secuencia de ácidos nucleicos conforme a SEQ ID NO: 1, en la que el segmento de ácido nucleico (A') conforme a SEQ ID NO: 3 ha sido escindido, o

(2) codifica una secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 2, en la que el segmento de aminoácido (A') conforme a SEQ ID NO: 4 ha sido escindido.

15. Célula huésped, que contiene al menos un vector según la reivindicación 14.

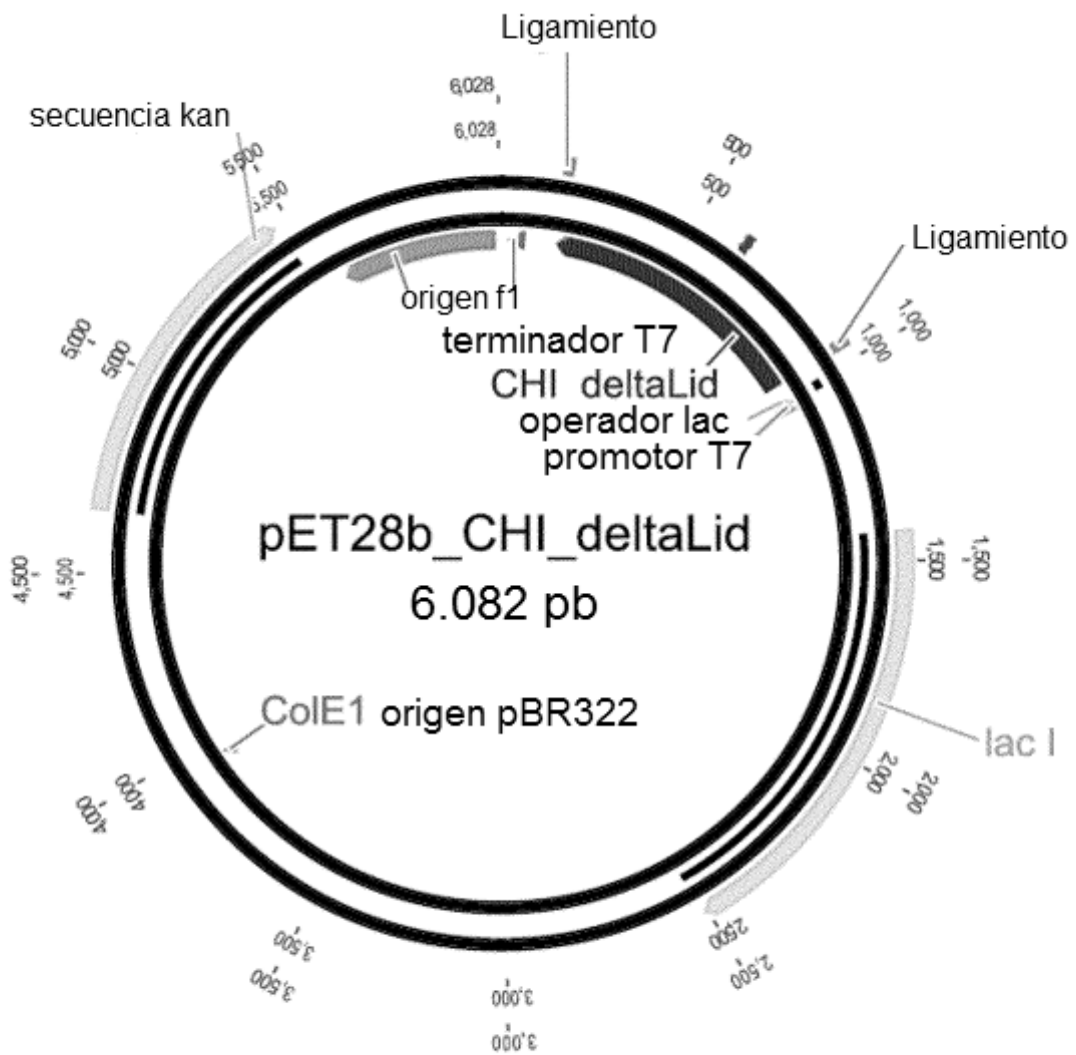


Figura 1:
Plásmido pET28_CHI_ΔLid.

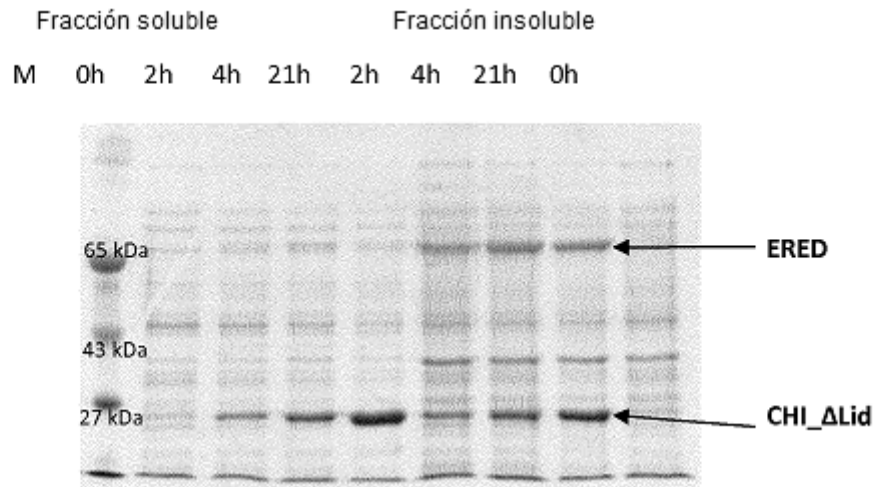


Figura 2
SDS-PAGE de la expresión de la doble transformación de pET22_ERED y pET28_CHI_ΔLid 0h caracteriza el momento de la inducción.

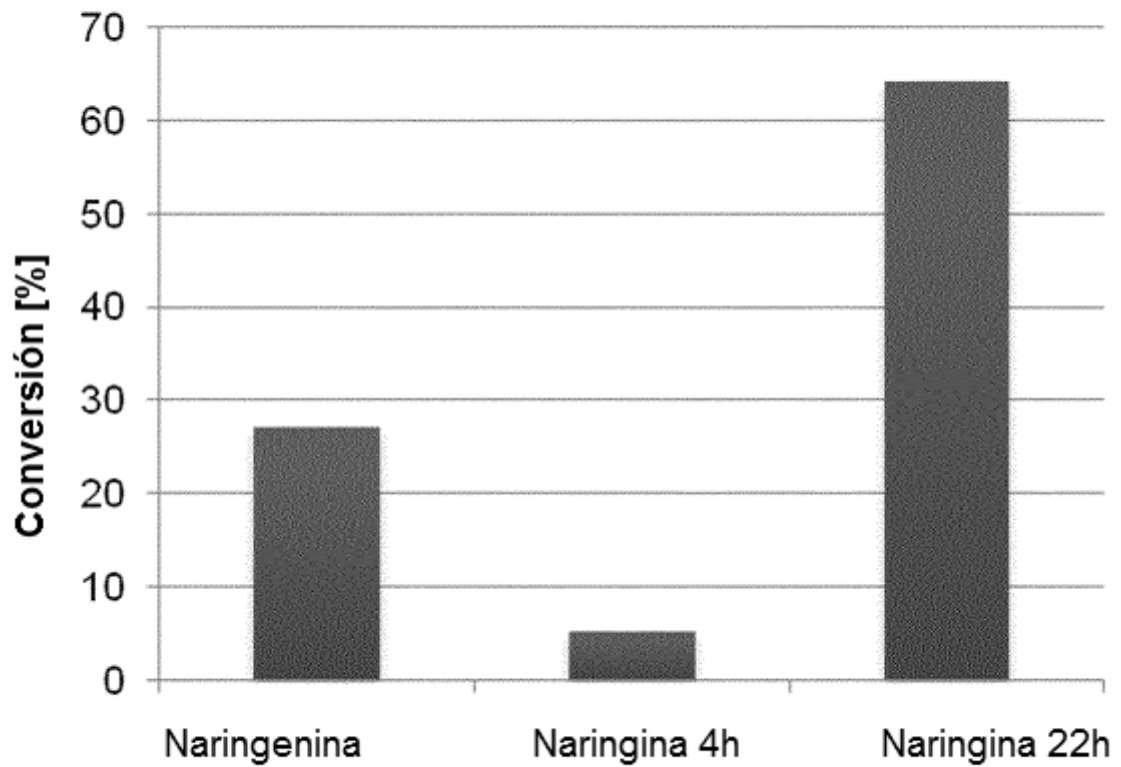


Figura 3
Reacción de los sustratos mediante biocatálisis de células enteras.