

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 753**

51 Int. Cl.:

C07D 311/92 (2006.01)

C12P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2015 PCT/EP2015/072262**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16050690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2015 E 15770541 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3201184**

54 Título: **Procedimiento para la ciclización biocatalítica de geranillinalool y los productos de ciclización obtenidos al respecto**

30 Prioridad:

29.09.2014 EP 14186830

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

04.07.2019

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**BREUER, MICHAEL y
PELZER, RALF**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 718 753 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 ciclización biocatalítica de geranillinalool y los productos de ciclización obtenidos al respecto

La presente invención se refiere a un procedimiento de tipo novedoso para la ciclización de geranillinalool, usando la ciclasa de escualeno-hopeno (Zm-SHC) proveniente de *Zymomonas mobilis* o una ciclasa con una identidad de secuencia de al menos 95 % frente a Zm-SHC.

Base de la invención

La biosíntesis de numerosos monoterpenos en los correspondientes organismos productores fue ya aclarada. Al respecto, frecuentemente se forman ciclos de moléculas precursoras lineales mediante biocatalizadores altamente específicos. Los precursores son por regla general ésteres de terpenoalcoholes lineales y ácido difosfórico. Un ejemplo típico de un precursor tal es el geranilpifosfato. Los grupos pifosfato son eliminados por vía enzimática de la molécula y a continuación son hidrolizados en dos grupos fosfato. Al respecto, por otro lado surge un carbocatión, que sólo puede reaccionar nuevamente de modo intramolecular y recombinarse por ejemplo con escisión de un protón, hasta dar un monoterpeno cíclico (Curr. Opin. Chem. Biol. 2009, 13:180-188).

De modo conocido, los triterpenos no activados como escualeno u oxidoescualeno son transformados in vivo mediante ciclasas de escualeno-hopeno (SHC) hasta los correspondientes compuestos cíclicos (Siedenburg, G. y Jendrosseck, D., Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77, (12), 3905).

La actividad de determinadas ciclasas de escualeno-hopeno (SHC) no está limitada a los triterpenos. En el documento internacional PCT/EP2011/070304 (WO 2012066059 A2), sobre el cual se hace aquí expresa referencia en toda su extensión, se describen mutantes de ciclasa de escualeno-hopeno, que catalizan la ciclización de un isómero de citronelal hasta dar un isómero de isopulegol.

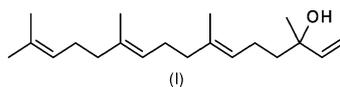
En el documento internacional PCT/EP2010/057696(WO2010139719 A2), al cual se hace aquí expresa referencia en toda su extensión, se proponen ciclasas de escualeno-hopeno como biocatalizadores para la ciclización de homofarnesol hasta ambroxano.

Las secuencias de gen y de proteína de la ciclasa de escualeno-hopeno (Zm-SHC) proveniente de la bacteria *Zymomonas mobilis* son conocidas (Genpept Accession No AAV90172 2004 y Nat Biotechnol 2005, 23:63-68, véase SEQ ID NO:1 y 2).

Fue objetivo de la presente invención suministrar un procedimiento para la ciclización de geranillinalool.

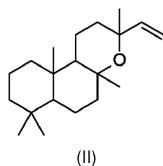
Sinopsis de la invención

El objetivo anterior se consiguió mediante un procedimiento para la ciclización biocatalítica de un compuesto de la fórmula (I)



En presencia de una ciclasa, que exhibe una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO:2 o con una identidad de secuencia de al menos 95 % respecto a SEQ ID NO:2.

En el procedimiento de acuerdo con la invención se transforma el compuesto de la fórmula (I) hasta al menos un compuesto de la fórmula (II)

**Descripción detallada de la invención****A. Definiciones generales**

En el sentido de la presente invención, las "ciclasas" son en general enzimas o mutantes de enzimas, que muestran en particular la actividad de una ciclasa de geranillinalool. Bajo la actividad de una ciclasa de geranillinalool se entiende una actividad enzimática para la isomerización de geranillinalool (I) con formación de

por lo menos un anillo de 5 o 6 miembros, en particular una estructura transformada en ciclo, de tipo cromeno y sobre todo una de tipo benzocromeno. Como enzimas con la actividad de una ciclasa de geranillinalool son adecuadas las transferasas intramoleculares de la subclase de las isomerasas; por consiguiente proteínas con el número EC 5.4. (código de enzima de acuerdo con Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650). En particular es un representante de EC 5.4.99.17. Como enzimas con la actividad de una ciclasa de geranillinalool son adecuadas en particular aquellas ciclasas, que provocan también la ciclización de homofarnesol hasta ambroxan, de un isómero de citronelal hasta un isómero de isopulegol o de escualeno hasta hopeno (por ello también tienen algunas veces la denominación "SHC" ciclasa de escualeno hopeno) y que son descritas detalladamente en los documentos internacionales PCT/EP2010/057696 y PCT/EP2011/070304, sobre los cuales se hace aquí referencia expresa.

Debido a la reversibilidad de las reacciones enzimáticas, la presente invención se refiere a las transformaciones enzimáticas descritas aquí, en ambas direcciones de reacción.

Los "mutantes funcionales" de una "ciclasa" comprenden los "equivalentes funcionales" de tal enzima, descritos abajo.

El concepto de "procedimiento biocatalítico" se refiere a cada "procedimiento para la ciclización biocatalítica de un compuesto de la fórmula (I)", es decir procedimiento en presencia de enzima cruda, purificada, disuelta, dispersa o inmovilizada, o en presencia de células de un microorganismo que exhibe ciclasa, la cual muestra o expresa la actividad de una ciclasa de geranillinalool. Los procedimientos biocatalíticos comprenden con ello procedimientos enzimáticos como también microbianos así como procedimientos fermentativos.

El concepto "estereoespecífico" significa que uno de varios estereoisómeros posibles de un compuesto preparado de acuerdo con la invención con al menos un centro de asimetría, es producido mediante la acción de una enzima usada de acuerdo con la invención, en elevado "exceso de enantiómero" o elevada "pureza de enantiómero", como por ejemplo al menos 90 %ee, en particular al menos 95 %ee, o al menos 98 %ee, o al menos 99 %ee. El valor ee % es calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$ee\% = [X_A - X_B] / [X_A + X_B] * 100,$$

en la que X_A y X_B representan la fracción molar de los enantiómeros A o B.

"Residuo de primera esfera" y "residuo de segunda esfera" son radicales de aminoácido que, sobre la base de análisis estructurales de la proteína, están dispuestos en una proximidad particular respecto al centro reactivo de la ciclasa. El criterio para la primera esfera es la distancia hasta los ligandos 2-azaescualeno, que está indicada en una estructura Röntgen publicada (pdb: 1ump). Estos radicales fueron determinados automáticamente con un programa de computador (<http://ligin.weizmann.ac.il/cgi-bin/lpcCsu/LpcCsu.cgi>; Sobolev V, Sorokine A, Prilusky J, Abola EE, Edelman M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. Bioinformatics 1999;15(4):327-332.). Este programa parte de que dos moléculas están en contacto mutuo cuando la eliminación de sus átomos corresponde a la suma de sus radios van der Waals $\pm 1 \text{ \AA}$. En la segunda esfera se cuentan todos los aminoácidos que están en un radio de 5 \AA respecto a cada residuo de la primera esfera. Tales residuos son por ello adecuados de modo particular para la ejecución de mutaciones focalizadas, para modificar más de modo focalizado la actividad enzimática.

Una "actividad de ciclasa", que fue determinada con geranillinalool de la fórmula (I), en particular E,E geranillinalool como sustrato de referencia bajo condiciones estándar, es una actividad enzimática que describe la formación de un producto cíclico de reacción.

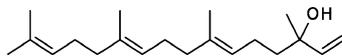
"Condiciones estándar" son por ejemplo concentraciones de sustrato de 10 mM a 0,2 M, en particular 15 a 100 mM, como por ejemplo aproximadamente 20 a 25 mM; a pH 4 a 8, y a temperaturas de por ejemplo 15 a 45 o 20 a 25 °C. Al respecto, la determinación puede ocurrir con células recombinantes que expresan ciclasa, células digeridas que expresan ciclasa, fracciones de ellas o enzima ciclasa concentrada o purificada. En particular es sustrato de referencia un geranillinalool de la fórmula (I); en particular E,E-Geranillinalool en una concentración de 15 a 100 mM o aproximadamente 20 a 25 mM, a 20 a 25 °C y pH 6-7, como aproximadamente 6,5; como también se describe en más detalle en los ejemplos.

En general están incluidas todas las formas de isómeros de acuerdo con la invención de los compuestos descritos aquí, como isómeros de constitución y en particular estereoisómeros y mezclas de ellos, como por ejemplo isómeros ópticos o isómeros geométricos, como isómeros E y Z, así como combinaciones de ellos. Están presentes varios centros de asimetría en una molécula, de modo que la invención comprende todas las combinaciones de diferentes conformaciones de estos centros de asimetría, como por ejemplo pares de enantiómeros o cada una de las mezclas de las formas de estereoisómeros.

B. Acondicionamientos especiales de la invención

La presente invención se refiere en particular a las siguientes formas especiales de realización:

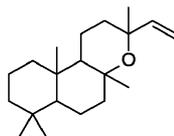
1. Procedimiento para la ciclización biocatalítica de un compuesto de la fórmula (I)



(I)

- 5 en presencia de una ciclasa, que exhibe una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO:2 o con una identidad de secuencia de al menos 95 %, como por ejemplo 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a SEQ ID NO:2;

en el que el compuesto de la fórmula (I) reacciona hasta dar el compuesto de la fórmula (II)



(II),

- 10 el cual en particular está presente en forma de estereoisómeros puros así como una mezcla que comprende al menos uno de los posibles estereoisómeros de este compuesto.

2. Procedimiento de acuerdo con la forma de realización 1, en el que el compuesto de la fórmula (II) está presente en forma de una mezcla, que comprende varios estereoisómeros.

3. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes, en el que el compuesto de la fórmula (II) está presente en forma de un estereoisómero.

- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes, en el que al menos un compuesto de la fórmula (I) entra en contacto con la ciclasa en un medio de reacción líquido, en particular en un medio de reacción orgánico monofásico o acuoso-orgánico de dos fases, en particular bajo condiciones que no perjudican la reacción deseada, y sobre todo bajo condiciones que promueven la reacción deseada. Las condiciones adecuadas de reacción (como por ejemplo concentración óptima de sustrato, enzima, valor de pH, tipo de amortiguador dado el caso usado, duración y temperatura de reacción, solvente orgánico) pueden ser determinadas simplemente por el experto promedio mediante pocos ensayos previos.

- 20 5. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes, en el que el compuesto de la fórmula (I) es usado en forma de una mezcla de ambos enantiómeros.

- 25 6. Procedimiento de acuerdo con la forma de realización 5, en el que la mezcla es una mezcla racémica.

7. Procedimiento de acuerdo con la forma de realización 5, en el que uno de los dos enantiómeros está presente en la mezcla en exceso.

- 30 8. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes, en el que la ciclasa está presente cruda, purificada, disuelta, dispersa o inmovilizada, o en presencia de células de un microorganismo que exhiben ciclasa.

9. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes, en el que la ciclasa está presente en una forma elegida de entre:

a) ciclasa libre, han dado el caso purificada o parcialmente purificada;

b) ciclasa inmovilizada;

- 35 c) ciclasa de acuerdo con a) o b) aislada de células;

d) células completas, dado el caso recombinantes, dado el caso en reposo o células digeridas que contienen ciclasa;

e) lisados de células u homogeneizados de células, de las células descritas bajo d).

10. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes en presencia de un

microorganismo recombinante, que porta una secuencia de nucleótidos que codifica para la ciclasa.

11. Procedimiento de acuerdo con la forma de realización 10, en el que la parte de secuencia de nucleótidos es un casete de expresión y está allí bajo el control de al menos una secuencia de regulación.

5 12. Procedimiento de acuerdo con la forma de realización 11, en el que la parte de casete de expresión es un vector de expresión.

13. Procedimiento de acuerdo con la forma de realización 12, en el que el vector de expresión es elegido de entre plásmidos.

14. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes, en el que el microorganismo es elegido de entre bacterias, hongos y levaduras.

10 15. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización 4 a 15, en el que el microorganismo es elegido de entre las especies *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia glumae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis* y *Zymomonas mobilis*.

15 16. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes, en el que el microorganismo es *E. coli*.

17. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes, en el que la ciclización biocatalítica ocurre en sistemas acuosos monofásicos o en sistemas bifásicos; o en sistemas anhidros, como en líquidos iónicos o los denominados solventes eutécticos profundos.

20 18. Procedimiento de acuerdo con una de las formas de realización precedentes, en el que la ciclización biocatalítica ocurre a una temperatura en el intervalo de 20 a 45°C y/o un valor de pH en el intervalo de 4 a 8.

C. Otras configuraciones de la invención

1. Ciclasas usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención

25 La presente invención no está limitada al procedimiento en el cual se usa la ciclasa divulgada concretamente, sino que se extiende de manera múltiple también a procedimientos de ejecutados usando equivalentes funcionales de la ciclasa descrita concretamente.

En el marco de la presente invención "equivalentes funcionales" o enzimas y mutantes de enzima análogos a los divulgados de manera concreta (derivados de SEQ ID NO:2) son polipéptidos diferentes de ellos, que además poseen la actividad deseada de ciclasa.

30 En el sentido de la invención (es decir con un sustrato de referencia bajo condiciones estándar), de este modo se entiende por ejemplo por "equivalentes funcionales", enzimas y mutantes que en una prueba usada sobre "actividad de ciclasa" exhiben una actividad de una enzima, que comprende una secuencia de aminoácidos definida concretamente aquí derivada de SEQ ID NO:2, más alta o más baja en por lo menos 1 %, en particular en por lo menos aproximadamente 5 a 10 % como por ejemplo por lo menos 10 % o por lo menos 20 %, como por ejemplo por lo menos 50 % o 75 % o 90 %.

35 Los datos de actividad para equivalentes funcionales se refieren aquí, cuando no se indique de otro modo, a determinaciones de actividad ejecutadas por medio de un sustrato de referencia (bajo "condiciones estándar" como se definen aquí).

40 En el sentido de la invención, la "actividad de ciclasa" puede ser determinada con ayuda de una prueba usando el sustrato de referencia, como por ejemplo geranillinalool, bajo condiciones estándar, como se describió anteriormente y se aclara en la parte experimental.

45 Los equivalentes funcionales son estables además por ejemplo entre pH 4 a 11 y poseen además un óptimo de pH en un intervalo de pH 5 a 10, como en particular 6,5 a 9,5 o 7 a 8 o por ejemplo a 7,5, así como un óptimo de temperatura en el intervalo de 15 °C a 80 °C o 20 °C a 70 °C, como por ejemplo aproximadamente 30 a 60 °C o aproximadamente 35 a 45 °C, como aproximadamente a 40 °C.

Los "equivalentes funcionales" son en el sentido anterior también "precursores" de los polipéptidos descritos así como "derivados funcionales" y "sales" de los polipéptidos.

Los "equivalentes funcionales" comprenden los mutantes obtenibles por una o varias, como por ejemplo 1 a 50, 2 a

30, 2 a 15, 4 a 12 o 5 a 10 "mutaciones", como adiciones, sustituciones, eliminaciones y/o inversiones de aminoácidos, en las que las modificaciones mencionadas pueden ocurrir en cada posición de secuencia, en tanto conduzcan a un mutante con el perfil de propiedades de acuerdo con la invención. La equivalencia funcional es dada en particular también entonces cuando el patrón de reactividad entre mutante y polipéptido inalterado se superponen cualitativamente, es decir por ejemplo reaccionan los mismos sustratos con diferente velocidad.

En la siguiente tabla se compilan ejemplos no limitantes para sustituciones adecuadas de aminoácidos:

Residuo original	Ejemplo de la sustitución
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Los "precursores" son al respecto precursores naturales o sintéticos de los polipéptidos con o sin la actividad biológica deseada.

10 Bajo la expresión "sales" se entienden tanto sales de grupos carboxilo como también sales de adición ácida de grupos amino de la ciclasa. Las sales de grupos carboxilo pueden ser preparados de manera de por sí conocida y comprenden sales inorgánicas, como por ejemplo sales de sodio, calcio, amonio, hierro y zinc, así como sales con bases orgánicas, como por ejemplo aminas, como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina y similares. Las sales de adición ácida, como por ejemplo sales con ácidos minerales, como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, como ácido acético y ácido oxálico son usadas así mismo de acuerdo con la invención.

15 Los "derivados funcionales" de la ciclasa pueden ser preparados así mismo en grupos funcionales laterales de aminoácido o en sus extremos terminales en N o en C, con ayuda de técnicas conocidas. Tales derivados comprenden por ejemplo ésteres alifáticos de grupos ácido carboxílico, amidas de grupos ácido carboxílico, obtenibles mediante reacción con amoníaco o con una amina primaria o secundaria; los derivados de acilo en N de grupos amino libres, preparados mediante reacción con grupos acilo; o derivados de acilo en O de grupos hidroxilo libres, preparados mediante reacción con grupos acilo.

20 Los "equivalentes funcionales" comprenden naturalmente también polipéptidos que son accesibles de otros organismos, así como variables que ocurren de modo natural. Por ejemplo, mediante comparación de secuencia se establecen intervalos de regiones homólogas de secuencia y se determinan enzimas equivalentes siguiendo las instrucciones concretas.

25 Los "equivalentes funcionales" comprenden así mismo fragmentos, preferiblemente dominios individuales o motivos de secuencia de la ciclasa, los cuales exhiben por ejemplo la función biológica deseada.

Los "equivalentes funcionales" son además proteínas de fusión, que exhiben una de las secuencias de polipéptido mencionadas anteriormente o equivalentes funcionales derivados de ellas y al menos otra secuencia heteróloga funcionalmente diferente de ellas, en unión funcional terminal en N o C (es decir sin perjuicio funcional esencial recíproco de la parte de proteína de fusión). Son ejemplos no limitantes de tales secuencias heterólogas por ejemplo péptidos de señal, anclas de histidina o enzimas.

En el caso de una posible glicosilación de proteína, los "equivalentes funcionales" de ciclasa comprenden formas obtenibles modificadas, en forma desglicosilada o glicosilada así como mediante modificación del patrón de glicosilación.

Pueden generarse homólogos de la ciclasa mediante mutagénesis, por ejemplo mediante mutación puntual, alargamiento o acortamiento de la proteína.

Los homólogos de las proteínas usadas de acuerdo con la invención pueden ser identificados mediante discriminación de bancos de combinación de mutantes, como por ejemplo mutantes de acortamiento. Por ejemplo pueden generarse un banco un variopinto de variantes de proteína, mediante mutagénesis combinatoria en el plano de ácido nucleico, como por ejemplo mediante unión enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Existe una multiplicidad de procedimientos que pueden ser usados para la preparación de bancos de homólogos potenciales, a partir de una secuencia degenerada de oligonucleótido. La síntesis química de una secuencia degenerada de gen puede ser ejecutada en un sistema automático de síntesis de ADN, y el gen sintético puede ser unido entonces a un vector adecuado de expresión. El uso de una frase degenerada de gen hace posible la preparación de todas las secuencias en una mezcla, que codifican la frase deseada en secuencias potenciales de proteína. Los procedimientos para la síntesis de oligonucleótidos degenerados son conocidos por los expertos (por ejemplo Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:477).

En el estado de la técnica se conocen varias técnicas para la discriminación de productos de gen de bancos combinatorios, que ha sido preparados mediante mutaciones puntuales o acortamiento, y para la discriminación de bancos de cADN en productos de gen con una propiedad elegida. Estas técnicas se ajustan en la discriminación rápida de los bancos de gen, que haya sido generados mediante mutagénesis combinatoria de homólogos usados. Las técnicas usadas más frecuentemente para la discriminación de grandes bancos de gen, que son la base de un análisis con elevado desempeño, comprenden la clonación de bancos de gen en vectores replicables de expresión, transformación de las células adecuadas con el banco de vector resultante y expresión del gen combinatorio bajo condiciones, bajo las cuales la detección de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen, cuyo producto fue detectado. La Mutagénesis Recursiva de Conjunto (REM), una técnica que incrementa la frecuencia de mutantes funcionales en los bancos, puede ser usada en combinación con las pruebas de discriminación, para identificar homólogos (Arkin y Yourvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

Los "equivalentes funcionales" usados de acuerdo con la invención son homólogos con las proteínas divulgadas concretamente. Estas poseen al menos 60 %, preferiblemente al menos 75 % en particular al menos 85 %, como por ejemplo 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97,98 o 99 %, de homología (o identidad) con una de las secuencias de aminoácidos divulgadas concretamente, calculada de acuerdo con el algoritmo de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85(8), 1988, 2444-2448. Una homología o identidad porcentual de un polipéptido homólogo usado de acuerdo con la invención significa en particular identidad porcentual de los residuos de aminoácidos, referida a la longitud total de una de las secuencias de aminoácidos descritas concretamente aquí.

Los valores de identidad porcentual pueden ser determinados también mediante alineaciones BLAST, algoritmos blastp (proteína-proteína BLAST), o mediante aplicación de los ajustes Clustal indicados posteriormente.

2. Ácidos nucleicos y fragmentos estructurales

2.1 Ácidos nucleicos

El procedimiento de acuerdo con la invención puede ser ejecutado en presencia de un microorganismo, el cual porta una secuencia de nucleótido que codifica para la ciclasa, por consiguiente una molécula de ácido nucleico.

Todas las moléculas de ácido nucleico mencionadas aquí (secuencias de cuerda individual y cuerda doble de ADN y ARN, como por ejemplo cADN y mARN) pueden ser fabricadas de manera de por sí conocida mediante síntesis química de los elementos de nucleótido, como por ejemplo mediante condensación de fragmentos de elementos de ácido nucleico de la hélice doble, individuales, complementarios que se traslapan. La síntesis química de oligonucleótidos puede ocurrir por ejemplo, de manera conocida de acuerdo con el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press Nueva York, páginas 896-897). La acumulación de oligonucleótidos sintéticos y llenado de vacíos con ayuda de fragmentos de Klenow de la ADN-polimerasa y reacciones de unión así como

procedimientos generales de clonación, son descritos en Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

5 Existe diferencia entre moléculas aisladas de ácido nucleico, que codifican para la ciclasa o cortes de ella biológicamente activos, y fragmentos de nucleótido, que pueden ser usados por ejemplo para la aplicación como sondas de hibridación o cebadores para la identificación o amplificación de ácidos nucleicos que codifican ciclasa.

Las moléculas de ácido nucleico pueden contener además secuencias no traducidas de los extremos 3' y/o 5' del intervalo de gen que codifica.

Respecto a las secuencias de nucleótido descritas concretamente existen moléculas complementarias de ácido nucleico o cortes de ellas.

10 Las secuencias de nucleótidos hacen posible la generación de sondas y cebadores, que son utilizables para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas en otros tipos de células y organismos. Tales sondas o cebadores comprenden comúnmente un intervalo de secuencia de nucleótido, que bajo condiciones "exigentes" (véase abajo) hibridan sobre por lo menos aproximadamente 12, preferiblemente por lo menos aproximadamente 25, como por ejemplo aproximadamente 40, 50 o 75 nucleótidos consecutivos de una cuerda en sentido de la
15 secuencia de ácido nucleico o una correspondiente cuerda antisentido.

Una molécula "aislada" de ácido nucleico es separada de otras moléculas de ácido nucleico, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y puede además en esencia estar libre de otros materiales celulares o medio de cultivo, cuando es preparada mediante técnicas recombinantes, o estar libre de precursores químicos u otras sustancias químicas, cuando es sintetizada por vía química.

20 La molécula de ácido nucleico puede ser aislada por medio de técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencia suministrada. Por ejemplo puede aislarse cADN de un banco adecuado de cADN, en lo cual se usa una de las secuencias completas divulgadas de manera concreta o un corte de ellas, como sonda de hibridación y técnicas estándar de hibridación (como se describe por ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además se aísla una molécula de ácido nucleico, que
25 comprende una de las secuencias divulgadas o un corte de ella, mediante reacción de cadena de polimerasa, en lo cual se usa el cebador de oligonucleótido, que fue construido sobre la base de estas secuencias. El ácido nucleico así amplificado puede ser clonado en un vector adecuado y ser caracterizado mediante análisis de secuencia de ADN. Los oligonucleótidos pueden ser preparados además mediante procedimientos estándar de síntesis, por
30 ejemplo con un aparato automático de síntesis de ADN.

Las secuencias de ácido nucleico o derivados de ellas, homólogos o partes de estas secuencias, son aislados por ejemplo con procedimientos corrientes de hibridación o la técnica PCR a partir de otras bacterias, por ejemplo mediante bancos genómicos o de cADN. Estas secuencias de ADN hibridan bajo condiciones estándar con las secuencias descritas aquí.

35 Se entiende por "hibridar" a la capacidad de un poli o oligonucleótido de unirse bajo condiciones estándar a una secuencia virtualmente complementaria, mientras bajo estas condiciones se detienen las uniones no específicas entre asociados no complementarios. Para ello las secuencias pueden ser complementarias hasta 90-100 %. La propiedad de las secuencias complementarias de poder unirse de manera específica una a otra, es capitalizada por ejemplo en la técnica Northern-blot o Southern-Blot o en la unión de cebadores en PCR o RT-PCR.

40 Para la hibridación se usan de manera ventajosa oligonucleótidos cortos del intervalo conservado. Sin embargo, para la hibridación también pueden usarse fragmentos más largos de los ácidos nucleicos usados de acuerdo con la invención o las secuencias completas. Dependiendo del ácido nucleico usado (oligonucleótido, fragmento más largo o secuencia completa) o dependiendo de cuál tipo de ácido nucleico ADN o ARN sea usado para la hibridación, varían estas condiciones estándar. De este modo, por ejemplo las temperaturas de fusión para
45 híbridos ADN:ADN están aproximadamente 10 °C más abajo que las de los híbridos ADN:ARN que tienen la misma longitud.

Bajo condiciones estándar se entienden por ejemplo, dependiendo del ácido nucleico, temperaturas entre 42 y 58 °C en una solución acuosa amortiguada con una concentración entre 0,1 a 5 x SSC (1 X SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7,2) o adicionalmente en presencia de 50 % formamida como por ejemplo 42 °C en 5 x
50 SSC, 50 % de formamida. De manera ventajosa, las condiciones de hibridación para híbridos ADN:ADN están en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 20 °C a 45 °C, preferiblemente entre aproximadamente 30 °C a 45 °C. Para híbridos ADN:ARN, las condiciones de hibridación están ventajosamente en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 30 °C a 55 °C, preferiblemente entre aproximadamente 45 °C a 55 °C. Estas temperaturas indicadas para la hibridación son por ejemplo valores de temperatura de fusión calculadas para un ácido nucleico

con una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y un contenido de G + C de 50 % en ausencia de formamida. Las condiciones experimentales para la hibridación de ADN son descritas en libros pertinentes de texto de genética, como por ejemplo Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, y se calculan de acuerdo con fórmulas conocidas por los expertos, por ejemplo dependiendo de la longitud de los ácidos nucleicos, del tipo de híbrido o del contenido de G + C. Otras informaciones sobre la hibridación pueden ser tomadas por el experto, de los siguientes libros de texto: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

5
10 La "hibridación" puede ocurrir en particular bajo condiciones exigentes. Tales condiciones de hibridación son descritas por ejemplo por Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., en: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57 o en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

15 Se entiende por condiciones "exigentes" de hibridación en particular: la incubación a 42 °C durante la noche en una solución consistente en 50 % de formamida, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano 10 % y 20 g/ml de ADN desnaturalizado, cortado de esperma de salmón, seguido por una etapa de lavado del filtro con 0,1x SSC a 65 °C.

20 Las secuencias de nucleótidos pueden fusionarse con promotores. Los promotores, que preceden a las secuencias de nucleótidos indicadas, pueden ser modificados mediante al menos un reemplazo de nucleótido, al menos una inserción, inversión y/o eliminación, sin perjudicar sin embargo la funcionalidad o eficacia de los promotores. Además, puede aumentarse la eficacia de los promotores mediante modificación de su secuencia, o de manera completa mediante promotores más eficaces de organismos externos.

25 Se entiende por "identidad" entre dos ácidos nucleicos, la identidad de los nucleótidos sobre la respectiva totalidad de longitud de ácidos nucleicos, en particular la identidad que es calculada mediante comparación con ayuda del software Vector NTI Suite 7.1 de la compañía Informax (EEUU) con aplicación del método Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1), mediante ajuste de los siguientes parámetros:

Parámetros de alineación múltiple:

Penalidad por abertura de brecha	10
Penalidad por extensión de brecha	10
Intervalo de penalidad por separación de brecha	8
Penalidad por separación de brecha	Apagado
% de identidad por retardo de alineación	40
Brechas específicas de residuo	Apagado
Brecha de residuo y hidrofílico	Apagado
Ponderación de la transición	0

30 Parámetros de alineación pareada:

Algoritmo FAST	Encendido
Tamaño K de aumento	1
Penalidad por brecha	3
Tamaño de ventana	5
Número de mejores diagonales	5

35 De modo alternativo a ello, puede determinarse la identidad también de acuerdo con Chenna, Ramu, Sugawara, Hideaki, Koike, Tadashi, Lopez, Rodrigo, Gibson, Toby J, Higgins, Desmond G, Thompson, Julie D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. (2003) Nucleic Acids Res 31 (13):3497-500, según la dirección de internet: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html#> y con los siguientes parámetros:

Penalidad abierta de brecha de ADN	15
------------------------------------	----

Penalidad de extensión de brecha de ADN	6,66
Matriz de ADN	Identidad
Penalidad abierta de brecha de proteína	10
Penalidad de extensión de brecha de proteína	0,2
Matriz de proteína	Gonnet
ENDGAP de proteína/ADN	-1
GAPDIST de proteína/ADN	4

2.2 Generación de mutantes funcionales

5 El experto conoce además el procedimiento para la generación de mutantes funcionales, por consiguiente de secuencias de nucleótidos, que codifican para una ciclasa con identidad de secuencia de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % frente a SEQ ID NO:2.

10 Dependiendo de la técnica usada, el experto puede incorporar mutaciones completamente aleatorias o también focalizadas, en genes o también intervalos de ácido nucleico que no codifican (que son importantes por ejemplo para la regulación de la expresión) y a continuación crear bancos de gen. Los métodos de biología molecular requeridos para ello son conocidos por los expertos y están descritos por ejemplo en Sambrook y Russell, Molecular Cloning. 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

Los métodos para la modificación de genes y con ello para la modificación de la proteína codificada por estos, son familiares para los expertos desde hace tiempo, como por ejemplo

- la mutagénesis específica de sitio, en la cual se intercambian de manera focalizada uno o varios nucleótidos de un gen (Trower MK (Hrsg.) 1996; in vitro mutagenesis protocols. Humana Press, Nueva Jersey),
- 15 - la mutagénesis de saturación, en la cual en cualquier posición de un gen puede cambiarse un codón por un aminoácido cualquiera o añadirse un aminoácido cualquiera (Kegler-Ebo DM, Docktor CM, DiMaio D (1994) Nucleic Acids Res 22:1593; Baretino D, Feigenbutz M, Valcárel R, Stunnenberg HG (1994) Nucleic Acids Res 22:541; Barik S (1995) Mol Biotechnol 3:1),
- la reacción de cadena de polimerasa sensible al error (*error-prone PCR*), en la cual se mutan secuencias de nucleótidos por polimerasas de ADN que trabajan de modo defectuoso (Eckert KA, Kunkel TA (1990) Nucleic Acids Res 18:3739);
- 20 - el método SeSaM (método de saturación de secuencia), en el cual se impiden intercambios preferidos por la polimerasa. Schenk et al., Biospektrum, vol. 3, 2006, 277-279
- el paso de genes en cepas de mutador, en las cuales por ejemplo debido a mecanismos defectuosos de reparación de ADN, ocurre una elevada tasa de mutación de secuencias de nucleótidos (Greener A, Callahan M, Jerpset B (1996) An efficient random mutagenesis technique using an E.coli mutator strain. En: Trower MK (ed.) In vitro mutagenesis protocols. Humana Press, Nueva Jersey), o
- 25 - el arrastre de ADN, en el cual se forma un conjunto de genes relacionado de manera cercana y es digerido, y los fragmentos son usados como patrones para una reacción de cadena de polimerasa, en la cual mediante separación repetida de la cuerda y aproximación repetida se generan finalmente genes de mosaico de toda la longitud (Stemmer WPC (1994) Nature 370:389; Stemmer WPC (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:10747).
- 30

35 Mediante aplicación de la denominada evolución dirigida ("*directed evolution*"; descrita entre otros en Reetz MT y Jaeger K-E (1999), Topics Curr Chem 200:31; Zhao H, Moore JC, Volkov AA, Arnold FH (1999), Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution, en: Demain AL, Davies JE (ed.) Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology) el experto puede generar también de manera focalizada y también en gran escala, mutantes funcionales. Al respecto, en una primera etapa se generan primero bancos de gen de las respectivas proteínas, en el que por ejemplo pueden encontrar aplicación los métodos indicados anteriormente. Los bancos de gen son expresados de manera adecuada, por ejemplo mediante bacterias o mediante sistemas de despliegue de fagos.

40 Los genes en cuestión de organismos anfitriones, que expresan mutantes funcionales con propiedades que corresponden ampliamente a las propiedades deseadas, pueden ser sometidos a otra ronda de mutación. Las etapas de la mutación y la selección o la discriminación pueden ser repetidas de manera iterativa hasta que los

mutantes funcionales presentes exhiban en extensión suficiente las propiedades deseadas. Mediante esta forma iterativa de trabajar puede realizarse en etapas un número limitado de mutaciones, como por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones, y evaluarse y seleccionarse respecto a su influencia en la propiedad enzimática en cuestión. Los mutantes seleccionados pueden ser sometidos entonces de la misma manera a otra etapa de mutación. Mediante ello se reduce de manera significativa el número de los mutantes individuales que van a ser estudiados.

Los resultados de acuerdo con la invención entregan también importantes informaciones en referencia a la estructura y secuencia de las enzimas en cuestión, que son necesarias para generar de manera focalizada otras enzimas con propiedades modificadas deseadas. En particular pueden definirse las denominadas "manchas calientes", es decir cortes de secuencia, que son potencialmente adecuados para modificar una propiedad enzimática, mediante la introducción de mutaciones focalizadas.

Así mismo, son derivables informaciones respecto a las posiciones de secuencia de aminoácidos, en cuyo intervalo pueden ejecutarse mutaciones, que deberían tener presumiblemente poca influencia sobre la actividad enzimática, y pueden ser denominadas como potenciales "mutaciones silenciosas".

2.3 Estructuras

En el procedimiento de acuerdo con la invención, la secuencia de nucleótido puede ser parte de un casete de expresión. Los conceptos de casete de expresión y estructura de expresión son usados como sinónimos. La estructura de expresión recombinante preferida contiene entre los controles genéticos de secuencias reguladoras de ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido usado de acuerdo con la invención.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, el casete de expresión puede ser parte de un vector de expresión, en particular un vector de expresión recombinante.

Se entiende por una "unidad de expresión" aquí un ácido nucleico con actividad de expresión, que comprende un promotor como se define aquí, y después de unión funcional con un ácido nucleico o un gen que va a ser expresado, regula la expresión, por consiguiente la transcripción y la traducción de este ácido nucleico o este gen. Por ello, en esta relación se habla también de una "secuencia reguladora de ácido nucleico". En adición al promotor pueden estar presentes otros elementos reguladores, como por ejemplo potenciadores.

Se entiende por un "casete de expresión" o "estructura de expresión" aquí una unidad de expresión, que está unida de modo funcional al ácido nucleico que va a ser expresado o al gen que va a ser expresado. Contrario a una unidad de expresión, un casete de expresión comprende con ello no sólo secuencias de ácido nucleico que regulan la transcripción y traducción, sino también las secuencias de ácido nucleico que debieran ser expresadas como proteína, como consecuencia de la transcripción y traducción.

En el presente contexto, los conceptos de "expresión" o "sobreexpresión" describen la producción o elevación de la actividad intracelular de una o varias enzimas en un microorganismo, que son codificadas por el correspondiente ADN. Para ello puede introducirse por ejemplo un gen en un organismo, reemplazarse un gen presente por otro gen, elevar el número de copias del gen o de los genes, usar un promotor fuerte o usar un gen que codifica para la correspondiente enzima con una elevada actividad y dado el caso pueden combinarse estas medidas.

Preferiblemente comprenden aquellas estructuras descritas aquí ubicadas 5' corriente arriba de la respectiva secuencia que codifica de un promotor y ubicadas corriente abajo 3' de una secuencia de terminador, así como dado el caso otros elementos reguladores corrientes, y concretamente enlazados de modo operativo en cada caso con la secuencia que codifica.

Se entiende por un "promotor", un "ácido nucleico con actividad de promotor" o una "secuencia de promotor", un ácido nucleico que en unión funcional con un ácido nucleico que va a ser transcrito, regula la transcripción de este ácido nucleico.

En esta relación, se entiende por una unión "funcional" u "operativa" por ejemplo la disposición secuencial de uno de los ácidos nucleicos con actividad de promotor y una secuencia de ácido nucleico que va a ser transcrita y dado el caso otros elementos reguladores, como por ejemplo secuencias de ácido nucleico, que garantizan la transcripción de ácidos nucleicos, así como por ejemplo un terminador, de modo que cada uno de los elementos reguladores puede cumplir su función en la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. Para ello no es absolutamente necesaria una unión directa en el sentido químico. Las secuencias de control genético, como por ejemplo las secuencias de potenciador, pueden ejercer su función también de posiciones eliminadas adicionalmente o incluso de otras moléculas de ADN, sobre la secuencia objetivo. Se prefieren disposiciones en las cuales la secuencia de ácido nucleico que va a ser transcrita está ubicada detrás (es decir en el extremo 3') de la secuencia de promotor, de modo que ambas secuencias están unidas mutuamente de modo covalente. Al

respecto, la separación entre la secuencia de promotor y la secuencia de ácido nucleico que va a ser expresada de modo transgénico, puede ser inferior a 200 pares de base, o inferior a 100 pares de base o inferior a 50 pares de base.

5 Aparte de los promotores y terminador, se mencionan como ejemplos de otros elementos reguladores las secuencias que dan objetivo, potenciadores, señales de poliadenilación, marcadores seleccionables, señales de amplificación, orígenes de replicación y similares. Las secuencias reguladoras adecuadas son descritas por ejemplo en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

10 Las estructuras de ácidos nucleicos usadas de acuerdo con la invención comprenden en particular una secuencia que codifica para una ciclasa, derivada por ejemplo de SEQ ID NO: 1 o que codifica para una ciclasa de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o derivados y homólogos de ella, así como las secuencias de ácidos nucleicos derivables de ella, que están unidas de modo operativo o funcional con una o varias señales de regulación, de manera ventajosa para la modulación, por ejemplo elevación de la expresión de gen.

15 Adicionalmente a estas secuencias de regulación, la regulación natural de estas secuencias puede estar aún presente antes de los verdaderos genes estructurales y dado el caso haber sido modificada genéticamente, de modo que la regulación natural fue deshabilitada y la expresión de los genes fue aumentada. La estructura de ácido nucleico puede estar constituida sin embargo de manera simple, es decir no se insertó una señal adicional de regulación antes de la secuencia que codifica y no se eliminó el promotor natural con su regulación. En lugar de ello, la secuencia natural de regulación muta de modo que ya no ocurre una regulación y se eleva la expresión de gen.

20 Una estructura preferida de ácido nucleico contiene de manera ventajosa también una o varias de las ya mencionadas secuencias "potenciadoras", unidas funcionalmente con el promotor, lo cual hace posible una elevada expresión de la secuencia de ácido nucleico. También en el extremo 3' de las secuencias de ADN pueden insertarse secuencias ventajosas adicionales, como otros elementos reguladores o terminadores. Los ácidos nucleicos usados de acuerdo con la invención pueden estar presentes en la estructura en una o varias copias. En la estructura pueden estar presentes aún otros marcadores, como genes complementarios de resistencias a los antibióticos o a auxotrofías, dado el caso para la selección en la estructura.

25 Ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas están presentes en promotores como promotor cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacI^q, T7, T5, T3, gal, trc, ara, rhaP (rhaP_{BAD})SP6, lambda-P_R o im lambda-P_L, que encuentran aplicación de manera ventajosa en bacterias gram-negativas. Otras secuencias ventajosas de regulación están presentes por ejemplo en los promotores gram-positivos amy y SPO2, en los promotores de levaduras u hongos ADC1, MFalpha, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH. Para la regulación pueden usarse también promotores artificiales.

30 Para la expresión en un organismo anfitrión, se inserta la estructura de ácido nucleico, ventajosamente en un vector, como por ejemplo un plásmido o un fago, lo cual hace posible una expresión óptima de los genes en el anfitrión. Aparte de plásmidos y fagos, por vectores se entienden también todos los otros vectores conocidos por los expertos, por consiguiente por ejemplo virus, como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposons, elementos IS, fásmidos, cósmidos, y ADN lineal o circular. Estos vectores pueden ser replicados de manera autónoma en el organismo anfitrión o ser replicados de manera cromosómica.

35 40 Son plásmidos adecuados por ejemplo en E. coli pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pKK223-3, pDHE19.2, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹³-B1, λgt11 o pBdCl, en Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361, en Bacillus pUB110, pC194 o pBD214, en Corynebacterium pSA77 o pAJ667, en mohos pALS1, pIL2 o pBB116, en levaduras 2alphaM, pAG-1, YEp6, YEp13 o pEMBLYe23 o en plantas pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 o pDH51. Los plásmidos mencionados representan una pequeña elección de los posibles plásmidos. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos y pueden ser tomados por ejemplo del libro Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

45 50 En otra forma de acondicionamiento del vector, el vector que contiene la estructura de ácido nucleico usada de acuerdo con la invención o el ácido nucleico usado de acuerdo con la invención, puede ser introducido también de manera ventajosa en el microorganismo en forma de un ADN lineal, y mediante recombinación heteróloga u homóloga puede ser integrado en el genoma del organismo anfitrión. Este ADN lineal puede consistir en un vector transformado en lineal como un plásmido o sólo en la estructura de ácido nucleico o en el ácido nucleico usado de acuerdo con la invención.

55 Para una óptima expresión de genes heterólogos en organismos, es ventajoso cambiar las secuencias de ácido nucleico de modo correspondiente con el uso de "codón" específico usado en el organismo. El "uso de codón" es

determinado fácilmente mediante evaluaciones por computador de otros genes conocidos del organismo en cuestión.

La preparación de un casete de expresión usado de acuerdo con la invención ocurre mediante fusión de un promotor adecuado con una secuencia de nucleótido que codifica de modo adecuado, así como una señal de terminación o de poliadenilación. Para ello se usan técnicas corrientes de recombinación y clonación, como se describen por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols en Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience (1987).

La estructura de ácido nucleico recombinante o estructura de gen son insertadas para la expresión en un organismo anfitrión adecuado, de manera ventajosa en un vector específico del anfitrión, lo cual hace posible una expresión óptima de los genes en el anfitrión. Los vectores son bien conocidos por los expertos y pueden ser tomados por ejemplo de "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., ed. Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985).

3. Microorganismos

Dependiendo de la relación, bajo el concepto de "microorganismos" puede entenderse un microorganismo de tipo silvestre o un microorganismo recombinante, genéticamente modificado o ambos.

Con ayuda de los vectores usados de acuerdo con la invención, son producibles microorganismos recombinantes, que son transformados por ejemplo con al menos un vector así y pueden ser usados para la producción de los polipéptidos usados de acuerdo con la invención. De manera ventajosa, las estructuras recombinantes descritas anteriormente son incorporadas y expresadas en un sistema anfitrión adecuado. Al respecto, se usan preferiblemente métodos de clonación y transfección familiares conocidos por los expertos, como por ejemplo coprecipitación, fusión de protoplastos, electroevaporación, transfección retroviral y similares, para llevar a expresión los mencionados ácidos nucleicos en los respectivos sistemas de expresión. Por ejemplo en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., ed., Wiley Interscience, Nueva York 1997, o Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 se describen sistemas adecuados.

Como organismos anfitriones recombinantes para el ácido nucleico usado de acuerdo con la invención o la estructura de ácido nucleico, entran en consideración en principio todos los organismos procarióticos o eucarióticos. De modo ventajoso, como organismos anfitriones se usan microorganismos como bacterias, mohos o levaduras. De manera ventajosa se usan bacterias gram-positivas o gram-negativas, preferiblemente bacterias de las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomycetaceae o Nocardiaceae, de modo particular preferiblemente bacterias de los géneros Escherichia, Pseudomonas, Streptomyces, Nocardia, Burkholderia, Salmonella, Agrobacterium, Clostridium o Rhodococcus. De modo muy particular se prefiere el género y tipo Escherichia coli. Además otras bacterias ventajosas se encuentran en el grupo de las alpha-proteobacterias, beta-proteobacterias o gamma-proteobacterias.

El organismo anfitrión o los organismos anfitriones contienen al respecto preferiblemente por lo menos una de las secuencias de ácido nucleico, estructuras de ácido nucleico o vectores descritas aquí, que codifican para una enzima con actividad de deshidrogenasa de feniletanol de acuerdo con la definición anterior.

Los organismos usados en el procedimiento de acuerdo con la invención son cultivados o propagados de manera conocida por el experto, dependiendo del organismo anfitrión. Por regla general, los microorganismos son cultivados en un medio líquido, el cual contiene una fuente de carbono usualmente en forma de azúcares, una fuente de nitrógeno usualmente en forma de fuentes de nitrógeno orgánico como extracto de levadura o sales como sulfato de amonio, elementos traza como sales de hierro, manganeso y magnesio y dado el caso vitaminas, a temperaturas entre 0 °C y 100 °C, preferiblemente entre 10 °C a 60 °C bajo aplicación de oxígeno gaseoso. Al respecto, el pH del líquido nutritivo puede ser mantenido en un valor fijo, es decir ser regulado o no durante la propagación. La propagación puede ocurrir en modo de "lote", en modo de "semilote" o continuamente. Los nutrientes pueden ser colocados al inicio de la fermentación o alimentados de modo semicontinuo o continuo.

4. Preparación recombinante de enzimas usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención

Se describen aquí además procedimientos para la preparación recombinante de enzimas usadas de acuerdo con la invención o fragmentos funcionales, biológicamente activos, derivados de ellas, en los que se cultiva un microorganismo que produce enzima, dado el caso se induce la expresión de los polipéptidos y se aíslan estos del cultivo. Los polipéptidos pueden ser producidos así también a gran escala, en caso de desearse.

Los microorganismos así producidos pueden ser cultivados continuamente o en forma discontinua en el procedimiento de lote (cultivo en porciones) o en el procedimiento de lote alimentado (procedimiento de alimentación) o procedimiento en lote alimentado de manera repetida (procedimiento de alimentación repetitiva). En el libro de texto de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (editorial Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) se encuentra una compilación sobre métodos conocidos de cultivo.

El medio de cultivo que va a ser usado tiene que satisfacer de manera adecuada las declaraciones de las respectivas cepas. En el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D. C., EEUU, 1981) están contenidas descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos.

Estos medios utilizables de acuerdo con la invención comprenden de manera corriente una o varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o elementos traza.

Son fuentes preferidas de carbono los azúcares, como mono-, di- o polisacáridos. Son muy buenas fuentes de carbono por ejemplo glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. Pueden añadirse a los medios también azúcares mediante compuestos complejos, como melasas, u otros productos secundarios de la refinación del azúcar. Puede ser ventajoso también añadir mezclas de diferentes fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico o ácido linoleico, alcoholes como por ejemplo glicerina, metanol o etanol y ácidos orgánicos como por ejemplo ácido acético o ácido láctico.

Son fuentes de nitrógeno usuales los compuestos orgánicos o inorgánicos de nitrógeno o materiales que contienen estos compuestos. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno comprenden amoníaco gaseoso o sales de amonio, como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes complejas de nitrógeno, como licor de maíz fermentado, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno pueden ser usadas individualmente o como mezcla.

Los compuestos inorgánicos de sal, que pueden estar presentes en los medios, comprenden una sal de cloruro, fósforo o sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, zinc, cobre e hierro.

Como fuentes de azufre pueden usarse compuestos inorgánicos que tienen azufre como por ejemplo sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetracionatos, tiosulfatos, sulfuros pero también compuestos orgánicos de azufre, como mercaptanos y tioles.

Como fuentes de fósforo pueden usarse ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato de dipotasio o las correspondientes sales que tienen sodio.

Pueden añadirse al medio formadores de quelatos, para mantener en solución los iones metálicos. Los formadores de quelatos adecuados de modo particular comprenden dihidroxifenoles, como catecol o protocatecuato, o ácidos orgánicos como ácido cítrico.

Los medios de fermentación utilizados de acuerdo con la invención contienen usualmente también otros factores de crecimiento, como vitaminas o promotores de crecimiento, a los cuales pertenecen por ejemplo biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y sales provienen frecuentemente de componentes de medios complejos, como extracto de levadura, melasas, licor de fermentación de maíz y similares. Pueden añadirse al medio de cultivo además precursores adecuados. La composición exacta de los compuestos de los medios depende fuertemente del respectivo experimento y es determinada individualmente por cada caso específico. A partir del libro de texto "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (ed. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3) es obtenible información sobre la optimización de los medios. También se obtiene referencia de los medios de crecimiento de proveedores comerciales, como Standard 1 (Merck) o BHI (Brain heart infusion, DIFCO) y similares.

Todos los componentes de los medios son esterilizados, sea por calentamiento (20 min a 150 kPa y 121 °C) o mediante esterilización por filtración. Los componentes pueden ser esterilizados conjuntamente o en caso de requerirse, separadamente. Todos los componentes de los medios pueden ser añadidos al comienzo del cultivo o, a elección, ser añadidos continuamente o por carga.

La temperatura del cultivo está normalmente entre 15 °C y 45 °C, preferiblemente a 25 °C a 40 °C y puede ser mantenida constante o cambiar durante el experimento. El valor de pH del medio debería estar en el intervalo de 5

- a 8,5, preferiblemente en 7,0. El valor de pH para el cultivo es controlado durante el cultivo mediante adición de compuestos básicos como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o agua amoniacal o compuestos ácidos como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control del desarrollo de espuma pueden usarse antiespumantes, como por ejemplo poliglicolésteres de ácidos grasos. Para el mantenimiento de la estabilidad de plásmidos pueden añadirse al medio sustancias adecuadas con efecto selectivo, como por ejemplo antibióticos.
- 5 Para mantener condiciones aeróbicas, se incorpora en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, como por ejemplo aire del ambiente. La temperatura del cultivo está normalmente en 20 °C a 45 °C. El cultivo es continuado por el tiempo necesario hasta que se ha formado un máximo del producto deseado. Este objetivo es alcanzado normalmente dentro de un periodo de 10 horas a 160 horas.
- 10 El caldo de fermentación es a continuación procesado nuevamente. Dependiendo del requerimiento, la biomasa puede ser eliminada del caldo de fermentación, total o parcialmente mediante métodos de separación, como por ejemplo centrifugación, filtración, decantación o una combinación de estos métodos, o dejada completamente en él.
- 15 En caso de que los polipéptidos no sean secretados en el medio de cultivo, las células pueden ser también sometidas a digestión y el producto puede ser obtenido a partir del resultado de la lisis, de acuerdo con procedimientos conocidos de aislamiento de proteína. Opcionalmente las células pueden ser digeridas mediante ultrasonido de alta frecuencia, mediante alta presión, como por ejemplo en una celda francesa a presión, mediante osmólisis, mediante el efecto de detergentes, enzimas líticas o solventes orgánicos, mediante homogenización o mediante combinación de varios de los procedimientos citados.
- 20 Puede alcanzarse una purificación de los polipéptidos con procedimientos cromatográficos conocidos, como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), como cromatografía de Q-Sepharosa, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba, así como con otros procedimientos corrientes como ultrafiltración, cristalización, exclusión por sal, diálisis y electroforesis de gel nativa. Por ejemplo en Cooper, T. G., *Biochemische Arbeitsmethoden*, editorial Walter de Gruyter, Berlín, Nueva York o en Scopes, R., *Protein Purification*, editorial Springer, Nueva York, Heidelberg, Berlín se describen procedimientos adecuados.
- 25 Para el aislamiento de la proteína recombinante puede ser ventajoso usar sistemas de vector u oligonucleótidos, que alargan el cADN en determinadas secuencias de nucleótidos y con ello codifican para polipéptidos o proteínas de fusión modificados, que sirven por ejemplo para una purificación simple. Tales modificaciones adecuadas son denominadas por ejemplo "balizas" que actúan como anclas, como por ejemplo la modificación o epítipo conocidas como ancla de hexa-histidina, que pueden ser reconocidas como antígenos de anticuerpos (descritas por ejemplo en Harlow, E. y Lane, D., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Estas anclas pueden servir para la unión de las proteínas a un soporte sólido, como por ejemplo una matriz de polímero, que puede ser empacada por ejemplo en una columna de cromatografía, o puede ser usada en una placa de microtitulación o en otro soporte.
- 30 Simultáneamente, estas anclas pueden ser usadas también para el reconocimiento de las proteínas. Para el reconocimiento de las proteínas pueden usarse además marcadores corrientes, como colorantes de fluorescencia, marcadores enzimáticos, que después de la reacción con un sustrato forman un producto de reacción detectable, o marcadores radioactivos, solos o en combinación con las anclas para formar los derivados de las proteínas.
- 35 De manera análoga pueden usarse tales microorganismos que expresan ciclasa también para la preparación fermentativa de los compuestos de la fórmula II, en la que al medio se agregan como sustrato adicionalmente compuestos de la fórmula I y se cultivan los microorganismos, y se aísla el producto valioso dado el caso a partir del caldo de fermentación. Además, puede prepararse de manera autónoma el compuesto de la fórmula (I) también de un microorganismo, puesto que este microorganismo posee los rasgos bioquímicos correspondientes para la síntesis de (I) a partir de precursores simples.
- 40
- 45 **5. Inmovilización de la enzima**
- Las enzimas utilizadas de acuerdo con la invención pueden ser usadas en el procedimiento descrito aquí, en forma libre o inmóvil. Se entiende por una enzima inmovilizada, una enzima que está fija a un soporte inerte. A partir de los documentos EP-A-1149849, EP-A-1 069 183 y el DE-OS 100193773 así como de los pasajes de literatura citados allí, se conocen materiales adecuados de soporte así como las enzimas inmovilizadas sobre ellos.
- 50 Respecto a la divulgación de estos documentos se hace referencia en toda extensión. A los materiales de soporte adecuados pertenecen por ejemplo arcillas, minerales de arcilla, como caolinita, tierras diatomáceas, perlita, dióxido de silicio, óxido de aluminio, carbonato de sodio, carbonato de calcio, polvo de celulosa, materiales de intercambio aniónico, polímeros sintéticos, como poliestireno, resina acrílica, resina de fenol-formaldehído, poliuretanos y poliolefinas, como polietileno y polipropileno. Los materiales de soporte son usados para la
- 55 fabricación de enzimas soportadas, usualmente en una forma de partículas finamente divididas, en las que se

prefieren las formas porosas. El tamaño de partícula del material de soporte es usualmente no mayor a 5 mm, en particular no mayor a 2 mm (línea de criba). De manera análoga para el uso de las deshidrogenasas como catalizador de celda completa se elige una forma libre o inmovilizada. Los materiales de soporte son por ejemplo alginato de Ca, y carragenina. Pueden entrecruzarse enzimas como también células directamente con glutaraldehído (entrecruzamiento hasta CLEAs). Por ejemplo en J. Lalonde y A. Margolin "Immobilization of Enzymes" en K. Drauz y H. Waldmann, Enzyme Catalysis en Organic Synthesis 2002, vol. III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim se describen los correspondientes y otros procedimientos de inmovilización. Por ejemplo también en Rehm et al. (Ed) Biotechnology, 2ª edición, vol 3, capítulo 17, VCH, Weinheim se encuentran otras informaciones sobre biotransformaciones y bioreactores para la ejecución de los procedimientos de acuerdo con la invención.

10 6. Ciclización enzimática de geranillinalool

En particular, el procedimiento de ciclización de acuerdo con la invención es ejecutado en presencia de una enzima, en el que la enzima es codificada por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO:1 o un equivalente funcional de ella, en el que la secuencia de ácido nucleico es componente de una estructura de gen o vector. Tales estructuras de gen o vectores son descritas detalladamente en el documento internacional PCT/EP2010/057696 en las páginas 16 a 20, sobre el cual se hace aquí referencia expresa.

La célula anfitrión, que contiene una estructura de gen o un vector en los que está presente la secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima con la actividad deseada, es denominada también como organismo transgénico. La preparación de tales organismos transgénicos es conocida en principio y es discutida por ejemplo en el documento PCT/EP2010/057696 en la página 20, sobre el cual se hace aquí expresa referencia.

20 Como organismos transgénicos se eligen preferiblemente células de los grupos consistentes en bacterias, cianobacterias, mohos y levaduras. Preferiblemente las células son elegidas de entre mohos del género *Pichia* o bacterias de los géneros *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Zymomonas*, *Rhodobacter*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Lactobacillus* o *Lactococcus*. De modo particular preferiblemente la célula es elegida de entre bacterias de las especies *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*,
25 *Burkholderia glumae*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* o *Zymomonas mobilis*.

Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la invención, caracterizado porque la enzima con la actividad de una ciclasa es codificada por un gen, el cual fue aislado de un microorganismo elegido de entre *Zymomonas mobilis*.

Además, se prefiere un procedimiento de acuerdo con la invención, caracterizado porque la enzima con la actividad de ciclasa fue generada por un microorganismo, el cual sobreprodujo la enzima y que fue elegido de
30 entre el grupo de microorganismos que consiste en los géneros *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Zymomonas*, *Rhodobacter*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

De modo particular se menciona un procedimiento de acuerdo con la invención caracterizado porque la enzima con actividad de ciclasa fue generada por microorganismos transgénicos de las especies *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia glumae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis* o *Zymomonas mobilis*, los cuales sobreproducen la enzima con la actividad de ciclasa.

El procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque la enzima está presente en al menos una de las siguientes formas:

- 40 a) polipéptido libre, dado el caso purificado o parcialmente purificado;
- b) polipéptido inmovilizado;
- c) polipéptido aislado de células de acuerdo con a) o b);
- d) células completas, dado el caso en reposo o en crecimiento, que contienen por lo menos un polipéptido así;
- 45 e) lisado u homogeneizado de células de acuerdo con d).

Otra forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque las células son microorganismos, preferiblemente microorganismos transgénicos que expresan por lo menos una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica para un polipéptido con la actividad de ciclasa.

Una forma preferida de realización del procedimiento de acuerdo con la invención comprende al menos las
50 siguientes etapas a), b) y d):

a) aislar de una fuente natural, o producir de manera recombinante un microorganismo que produce una enzima con actividad de ciclasa,

b) multiplicar estos microorganismos,

5 c) dado el caso aislar de los microorganismos la enzima con actividad de ciclasa o preparar una fracción de proteína que contiene esta enzima, y

d) transferir los microorganismos de acuerdo con la etapa b) o la enzima de acuerdo con la etapa c), a un medio que contiene el sustrato de la fórmula general (I).

10 En el procedimiento de acuerdo con la invención se pone en contacto y/o se incuba sustrato con la enzima ciclasa, en un medio de manera que ocurre una transformación del sustrato en presencia de la enzima. Preferiblemente el medio es un medio acuoso de reacción.

El valor de pH del medio acuoso de reacción en el cual se ejecuta preferiblemente el procedimiento de acuerdo con la invención, es mantenido al respecto de manera ventajosa entre pH 4 y 12, preferiblemente entre pH 4,5 y 9, de modo particular preferiblemente entre pH 5 y 8.

15 El medio acuoso de reacción son preferiblemente soluciones amortiguadas, que exhiben por regla general un valor de pH de preferiblemente de 5 a 8. Como amortiguador puede usarse un amortiguador de citrato, de fosfato, de TRIS (tris(hidroximetil)-aminometano) o de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico). Además, el medio de reacción puede contener aun otras adiciones, como por ejemplo detergentes (por ejemplo taurodesoxicolato).

El sustrato es usado en la reacción enzimática preferiblemente en una concentración de 2 - 200 mM, de modo particular preferiblemente de 5-25 mM y puede ser repuesto de manera continua o discontinua.

20 La ciclización enzimática ocurre por regla general a una temperatura de reacción inferior a la temperatura de desactivación de la enzima usada y por encima de -10 °C. Preferiblemente el procedimiento de acuerdo con la invención es ejecutado a una temperatura entre 0 °C y 95 °C, de modo particular preferiblemente a una temperatura entre 15 °C y 60 °C, en particular entre 20 y 45 °C, por ejemplo aproximadamente 25 a 30°C.

25 De modo particular se prefiere un procedimiento de acuerdo con la invención en el que la reacción ocurre a una temperatura en el intervalo de 20 a 40°C y/o un valor de pH en el intervalo de 4 a 8.

Aparte de estos sistemas acuosos monofásicos, en otra variante de la invención se usan también sistemas bifásicos. Al respecto, aparte de una fase acuosa, como segunda fase se usan medios de reacción orgánicos no miscibles en agua. Mediante ello, los productos de reacción se acumulan en la fase orgánica. Después de la reacción, el producto es separable fácilmente de la fase acuosa, que contiene el biocatalizador, en la fase orgánica.

30 El producto de reacción puede ser sometido a extracción con solventes orgánicos y dado el caso ser destilado para la purificación.

35 Son solventes orgánicos adecuados por ejemplo hidrocarburos alifáticos, preferiblemente con 5 a 8 átomos de carbono, como pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, heptano, octano o ciclooctano, hidrocarburos alifáticos halogenados, preferiblemente con uno o dos átomos de carbono, como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano o tetracloroetano, hidrocarburos aromáticos, como benceno, tolueno, los xilenos, clorobenceno o diclorobenceno, éteres o alcoholes alifáticos cíclicos y acíclicos, preferiblemente con 4 a 8 átomos de carbono, como etanol, isopropanol, dietiléter, metil-tert-butiléter, etil-tert-butiléter, dipropiléter, diisopropiléter, dibutiléter, tetrahidrofurano o ésteres como etilacetato o n-butilacetato o cetonas como metilisobutilcetona o dioxano o mezclas de ellos. De modo particular preferiblemente se usan heptano, metil-tert-butiléter, 40 diisopropiléter, tetrahidrofurano, etilacetato mencionados anteriormente.

Las ciclasas usadas de acuerdo con la invención pueden ser utilizadas en el procedimiento de acuerdo con la invención como enzima libre o inmovilizada, como se describió anteriormente.

45 Para el procedimiento de acuerdo con la invención pueden usarse células en reposo o en crecimiento, libres o inmovilizadas, que contienen ácidos nucleicos, estructuras de ácido nucleico o vectores que codifican para la ciclasa. También pueden usarse células sometidas a digestión, como lisados celulares u homogeneizados celulares. Se entiende por células sometidas a digestión por ejemplo células que han sido convertidas en permeables mediante un tratamiento por ejemplo con solventes, o células que mediante un tratamiento enzimático, mediante un tratamiento mecánico (por ejemplo prensa francesa o ultrasonido) o mediante otro método, han sido 50 rotas. Los extractos crudos así obtenidos son adecuados de manera ventajosa para el procedimiento de acuerdo con la invención. También pueden usarse para el procedimiento de acuerdo con la invención enzimas purificadas o parcialmente purificadas.

Si para el procedimiento de acuerdo con la invención se usan organismos libres o enzimas, entonces son separados de manera conveniente antes de la extracción, por ejemplo mediante una filtración o centrifugación.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede ser operado en modo de lote, de semilote o en modo continuo.

5 En una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, preferida de modo particular, la enzima con actividad de ciclasa es elegida de entre enzimas que comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o una secuencia derivada de ella, en la cual hasta 5, 4, 3, 2, 1 % de los residuos de aminoácido fueron modificados mediante una eliminación, una sustitución, una inserción o una combinación de eliminación, sustitución e inserción. Al respecto, estas secuencias de polipéptido modificadas respecto a SEQ ID NO: 2 pueden poseer aun por lo menos 50 %, preferiblemente 65 %, de modo particular preferiblemente 80 %, en particular más de 90 % de la actividad enzimática de SEQ ID NO:2. En esta relación, debería entenderse por actividad enzimática de SEQ ID NO:2 a la capacidad de transformar por vía biocatalítica en ciclo un compuesto de la fórmula general (I), hasta el correspondiente compuesto de la fórmula (II).

Parte experimental

En tanto no se hagan declaraciones especiales en los siguientes ejemplos, son válidas las siguientes indicaciones.

15 A. Indicaciones generales

Todos los materiales y microorganismos usados son productos obtenibles en el comercio.

En tanto no se indique de otro modo, la clonación y expresión de proteínas recombinantes ocurre de acuerdo con métodos estándar, como se describe por ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

a) cepas de bacterias, plásmidos y condiciones de crecimiento

A partir de un correspondiente cultivo previo de 2mL inoculado, se cultivó *E. coli* LU15568 en 20mL de caldo lítico Amp/Spec/Cm (100µg/l de ampicilina; 100µg/l de espectinomicina; 20µg/l de cloroamfenicol), en presencia de IPTG 0,1 mM, ramnosa 0,5g/L en matraces Erlenmeyer de 100mL (con deflectores internos) por 16 h a 37°C, se sometió a centrifugación a 5.000*g por 10min.

b) ensayo de ciclización con geranillinalool (condiciones estándar)

Se suspendieron células de *E. coli* recombinante en Tris-HCl 20 mM con pH 8,0 (3 ml por g de células húmedas). La mezcla de ciclización contenía 250 µl de suspensión de células, 50 µl de amortiguador de citrato 1 M (pH 4,5), sustrato 20 mM (concentración final) y agua hasta 500 µl. En la ciclización de escualeno se añadió 1 % (v/v) de Triton-X100. Para la reacción de ciclización se suspendieron células de *E. coli* (6 g de células húmedas) en amortiguador de disolución (fosfato 50 mM, MgCl₂ 10 mM (pH 6,5; volumen total: 25 ml). Las células fueron sometidas a digestión a 150 Mpa usando un homogeneizador Manton-Gaulin. Los residuos celulares insolubles fueron separados por centrifugación (15 min a 4 °C y 7.150*g).

35 Para la reacción de geranillinalool se mezclaron 1,2 mL de amortiguador KP_i (fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5; MgCl₂ 10 mM) con 1 mL de extracto crudo de enzima (contenido de proteína 39,3 mg/mL en amortiguador 50 mM de KP_i) y 22 µL de geranillinalool (compañía Sigma-Aldrich-Fluka; Nr. 48809) y se incubó en un recipiente de vidrio de 10 mL con tapa rosca con barra de agitación magnética, durante tres o veinte horas a 37 °C y 300 rpm.

40 Al final del tiempo de incubación se realizó extracción a las muestras con 5 mL de n-heptano / 1-propanol (3:2) y se analizaron por medio de GC. Se ejecutaron controles con células de *E. coli*, que portaban un vector vacío así como células que expresan SHC inactivadas con calor.

c) cromatografía de gases

Equipo:	Agilent 6890series
Columna:	OPTIMA-1 TG ID: 0,32 mm, longitud: 10 m (Macherey-Nagel, Düren, Alemania)
Rata de flujo:	1,0/min a 35,16 kPa (y 80 °C)
División:	1:50, flujo de división: 50 mL/min,
Soporte:	Nitrógeno
Inyector:	Lámina de división/no división (Restec GmbH, Bad Homburg, Alemania; desactivada con Siltec, 4*6,3*78,5 mm, lana de vidrio) temperatura del inyector 280 °C

Volumen de inyección: 1 µL
 Detector: FID con 300 mL/min de aire, 30 mL/min de hidrógeno y 30 mL/min de nitrógeno
 Temperatura del detector: 320 °C

Programa de temperatura:

Inicio: 100 °C
 Tiempo 1 de retención: 0 min
 Elevación 1 de T: 5°C/min
 T 1 final: 200 °C
 Tiempo 2 de retención: 5 min
 Elevación 2 de T: 30 °C/min

(continuación)

T 2 final: 320 °C
 Tiempo 3 de retención: 20 min
 Tiempo total: 49,0 min
 Análisis de datos: Empower-3-Software Service Release 1 (Waters GmbH, Eschborn, Alemania)

5 Tiempo de retención de geranillinalool: 14,4 min

B. Ejemplos

Ejemplo 1: Ciclización de geranillinalool mediante Zmo-SHC (SEQ ID NO:2)

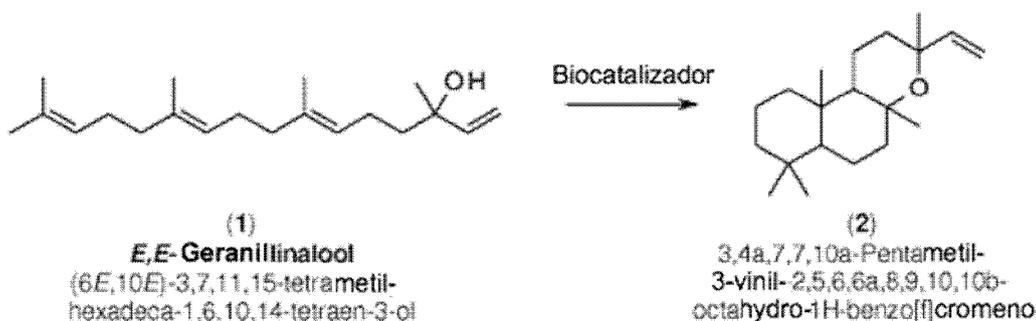
a) Ejecución:

10 Se preparó Zmo-SHC recombinante como se describió, mediante cultivo y digestión de LU 15568 (véase PCT/EP2010/057696(WO2010139719 A2). Para confirmar esta preparación de enzima se determinó nuevamente la actividad con homofarnesol como sustrato de referencia. La actividad obtenida (63 % de rendimiento en 3 horas con 39 mg de proteína total) está en el marco de los resultados alcanzados hasta ahora bajo estas condiciones.

La reacción de geranillinalool ocurrió como se describió anteriormente bajo condiciones estándar.

15 Al terminar el tiempo de incubación se realizó extracción a las muestras con 5 mL de n-heptano / 1-propanol (3:2) y se analizaron por medio de GC.

Ecuación de reacción:



b) Resultados

20 Después de 20 horas se encontraron dos picos dependientes de la enzima (tiempo de retención 13,3 o 13,7 min). El rendimiento, referido al geranillinalool usado fue de aproximadamente 11 %. Mediante análisis de GC-MS e interpretación de los espectros de masas se asignaron los dos picos a dos isómeros estructurales del derivado 2 de benzocromeno. La diferencia entre los dos picos a 13,3 o 13,7 min no pudo ser aclarada por medio de MS. Por

ejemplo es posible que sean estereoisómeros del compuesto 2.

En un control negativo, que fue incubado sin adición de enzima, no pudieron detectarse estos picos.

Este resultado muestra que Zmo-SHC también está en capacidad de formar ciclo de geranillinalool (1). Sin embargo, en la reacción parecen ocurrir por lo menos dos isómeros.

5 **c) Resumen:**

Con la ciclasa recombinante de escualeno-hopeno de *Zymomonas mobilis* pudo mostrarse por primera vez la ciclización de geranillinalool hasta un derivado tricíclico de vinilbenzocromeno.

Secuencias:

SEQ ID NO: 1: secuencia de ácido nucleico de Zmo-SHC

10 SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácidos de Zmo-SHC

Listado de secuencias

<110> BASF SE

<120> Ciclización enzimática de geranillinalool

<130> PF 75027, M/54304

15 <160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2178

<212> ADN

20 <213> *Zymomonas mobilis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2178)

<400> 1

ES 2 718 753 T3

atg ggt att gac aga atg aat agc tta agt cgc ttg tta atg aag aag	48
Met Gly Ile Asp Arg Met Asn Ser Leu Ser Arg Leu Leu Met Lys Lys	
1 5 10 15	
att ttc ggg gct gaa aaa acc tcg tat aaa ccg gct tcc gat acc ata	96
Ile Phe Gly Ala Glu Lys Thr Ser Tyr Lys Pro Ala Ser Asp Thr Ile	
20 25 30	
atc gga acg gat acc ctg aaa aga ccg aac cgg cgg cct gaa ccg acg	144
Ile Gly Thr Asp Thr Leu Lys Arg Pro Asn Arg Arg Pro Glu Pro Thr	
35 40 45	
gca aaa gtc gac aaa acg ata ttc aag act atg ggg aat agt ctg aat	192
Ala Lys Val Asp Lys Thr Ile Phe Lys Thr Met Gly Asn Ser Leu Asn	
50 55 60	
aat acc ctt gtt tca gcc tgt gac tgg ttg atc gga caa caa aag ccc	240
Asn Thr Leu Val Ser Ala Cys Asp Trp Leu Ile Gly Gln Gln Lys Pro	
65 70 75 80	
gat ggt cat tgg gtc ggt gcc gtg gaa tcc aat gct tcg atg gaa gca	288
Asp Gly His Trp Val Gly Ala Val Glu Ser Asn Ala Ser Met Glu Ala	
85 90 95	
gaa tgg tgt ctg gcc ttg tgg ttt ttg ggt ctg gaa gat cat ccg ctt	336
Glu Trp Cys Leu Ala Leu Trp Phe Leu Gly Leu Glu Asp His Pro Leu	
100 105 110	
cgt cca aga ttg ggc aat gct ctt ttg gaa atg cag cgg gaa gat ggc	384
Arg Pro Arg Leu Gly Asn Ala Leu Leu Glu Met Gln Arg Glu Asp Gly	
115 120 125	
tct tgg gga gtc tat ttc ggc gct gga aat ggc gat atc aat gcc acg	432
Ser Trp Gly Val Tyr Phe Gly Ala Gly Asn Gly Asp Ile Asn Ala Thr	
130 135 140	
gtt gaa gcc tat gcg gcc ttg cgg tct ttg ggg tat tct gcc gat aat	480
Val Glu Ala Tyr Ala Ala Leu Arg Ser Leu Gly Tyr Ser Ala Asp Asn	
145 150 155 160	

ES 2 718 753 T3

cct gtt ttg aaa aaa gcg gca gca tgg att gct gaa aaa ggc gga tta Pro Val Leu Lys Lys Ala Ala Ala Trp Ile Ala Glu Lys Gly Gly Leu 165 170 175	528
aaa aat atc cgt gtc ttt acc cgt tat tgg ctg gcg ttg atc ggg gaa Lys Asn Ile Arg Val Phe Thr Arg Tyr Trp Leu Ala Leu Ile Gly Glu 180 185 190	576
tgg cct tgg gaa aag acc cct aac ctt ccc cct gaa att atc tgg ttc Trp Pro Trp Glu Lys Thr Pro Asn Leu Pro Pro Glu Ile Ile Trp Phe 195 200 205	624
cct gat aat ttt gtc ttt tcg att tat aat ttt gcc caa tgg gcg cgg Pro Asp Asn Phe Val Phe Ser Ile Tyr Asn Phe Ala Gln Trp Ala Arg 210 215 220	672
gca acc atg gtg ccg att gct att ctg tcc gcg aga cga cca agc cgc Ala Thr Met Val Pro Ile Ala Ile Leu Ser Ala Arg Arg Pro Ser Arg 225 230 235 240	720
ccg ctg cgc cct caa gac cga ttg gat gaa ctg ttt cca gaa ggc cgc Pro Leu Arg Pro Gln Asp Arg Leu Asp Glu Leu Phe Pro Glu Gly Arg 245 250 255	768
gct cgc ttt gat tat gaa ttg ccg aaa aaa gaa ggc atc gat ctt tgg Ala Arg Phe Asp Tyr Glu Leu Pro Lys Lys Glu Gly Ile Asp Leu Trp 260 265 270	816
tcg caa ttt ttc cga acc act gac cgt gga tta cat tgg gtt cag tcc Ser Gln Phe Phe Arg Thr Thr Asp Arg Gly Leu His Trp Val Gln Ser 275 280 285	864
aat ctg tta aag cgc aat agc ttg cgt gaa gcc gct atc cgt cat gtt Asn Leu Leu Lys Arg Asn Ser Leu Arg Glu Ala Ala Ile Arg His Val 290 295 300	912
ttg gaa tgg att atc cgg cat cag gat gcc gat ggc ggt tgg ggt gga Leu Glu Trp Ile Ile Arg His Gln Asp Ala Asp Gly Gly Trp Gly Gly 305 310 315 320	960
att cag cca cct tgg gtc tat ggt ttg atg gcg tta cat ggt gaa ggc Ile Gln Pro Pro Trp Val Tyr Gly Leu Met Ala Leu His Gly Glu Gly 325 330 335	1008
tat cag ctt tat cat ccg gtg atg gcc aag gct ttg tcg gct ttg gat Tyr Gln Leu Tyr His Pro Val Met Ala Lys Ala Leu Ser Ala Leu Asp 340 345 350	1056
gat ccc ggt tgg cga cat gac aga ggc gag tct tct tgg ata cag gcc Asp Pro Gly Trp Arg His Asp Arg Gly Glu Ser Ser Trp Ile Gln Ala 355 360 365	1104
acc aat agt ccg gta tgg gat aca atg ttg gcc ttg atg gcg tta aaa Thr Asn Ser Pro Val Trp Asp Thr Met Leu Ala Leu Met Ala Leu Lys 370 375 380	1152
gac gcc aag gcc gag gat cgt ttt acg ccg gaa atg gat aag gcc gcc Asp Ala Lys Ala Glu Asp Arg Phe Thr Pro Glu Met Asp Lys Ala Ala 385 390 395 400	1200
gat tgg ctt ttg gct cga cag gtc aaa gtc aaa ggc gat tgg tca atc Asp Trp Leu Leu Ala Arg Gln Val Lys Val Lys Gly Asp Trp Ser Ile 405 410 415	1248

ES 2 718 753 T3

aaa ctg ccc gat gtt gaa ccc ggt gga tgg gca ttt gaa tat gcc aat	1296
Lys Leu Pro Asp Val Glu Pro Gly Gly Trp Ala Phe Glu Tyr Ala Asn	
420 425 430	
gat cgc tat ccc gat acc gat gat acc gcc gtc gct ttg atc gcc ctt	1344
Asp Arg Tyr Pro Asp Thr Asp Asp Thr Ala Val Ala Leu Ile Ala Leu	
435 440 445	
tcc tct tat cgt gat aag gag gag tgg caa aag aaa ggc gtt gag gac	1392
Ser Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Glu Trp Gln Lys Lys Gly Val Glu Asp	
450 455 460	
gcc att acc cgt ggg gtt aat tgg ttg atc gcc atg caa agc gaa tgt	1440
Ala Ile Thr Arg Gly Val Asn Trp Leu Ile Ala Met Gln Ser Glu Cys	
465 470 475 480	
ggc ggt tgg gga gcc ttt gat aag gat aat aac aga agt atc ctt tcc	1488
Gly Gly Trp Gly Ala Phe Asp Lys Asp Asn Asn Arg Ser Ile Leu Ser	
485 490 495	
aaa att cct ttt tgt gat ttc gga gaa tct att gat ccg cct tca gtc	1536
Lys Ile Pro Phe Cys Asp Phe Gly Glu Ser Ile Asp Pro Pro Ser Val	
500 505 510	
gat gta acg gcg cat gtt tta gag gcc ttt ggc acc ttg gga ctg tcc	1584
Asp Val Thr Ala His Val Leu Glu Ala Phe Gly Thr Leu Gly Leu Ser	
515 520 525	
cgc gat atg ccg gtc atc caa aaa gcg atc gac tat gtc cgt tcc gaa	1632
Arg Asp Met Pro Val Ile Gln Lys Ala Ile Asp Tyr Val Arg Ser Glu	
530 535 540	
cag gaa gcc gaa ggc gcg tgg ttt ggt cgt tgg ggc gtt aat tat atc	1680
Gln Glu Ala Glu Gly Ala Trp Phe Gly Arg Trp Gly Val Asn Tyr Ile	
545 550 555 560	
tat ggc acc ggt gcg gtt ctg cct gct ttg gcg gcg atc ggt gaa gat	1728
Tyr Gly Thr Gly Ala Val Leu Pro Ala Leu Ala Ala Ile Gly Glu Asp	
565 570 575	
atg acc cag cct tac atc acc aag gct tgc gat tgg ctg gtc gca cat	1776
Met Thr Gln Pro Tyr Ile Thr Lys Ala Cys Asp Trp Leu Val Ala His	
580 585 590	
cag cag gaa gac ggc ggt tgg ggc gaa agc tgc tct tcc tat atg gag	1824
Gln Gln Glu Asp Gly Gly Trp Gly Glu Ser Cys Ser Ser Tyr Met Glu	
595 600 605	
att gat tcc att ggg aag ggc cca acc acg ccg tcc cag act gct tgg	1872
Ile Asp Ser Ile Gly Lys Gly Pro Thr Thr Pro Ser Gln Thr Ala Trp	
610 615 620	
gct ttg atg ggg ttg atc gcg gcc aat cgt ccc gaa gat tat gaa gcc	1920
Ala Leu Met Gly Leu Ile Ala Ala Asn Arg Pro Glu Asp Tyr Glu Ala	
625 630 635 640	
att gcc aag gga tgc cat tat ctg att gat cgc caa gag cag gat ggt	1968
Ile Ala Lys Gly Cys His Tyr Leu Ile Asp Arg Gln Glu Gln Asp Gly	
645 650 655	
agc tgg aaa gaa gaa gaa ttc acc ggc acc gga ttc ccc ggt tat ggc	2016
Ser Trp Lys Glu Glu Glu Phe Thr Gly Thr Gly Phe Pro Gly Tyr Gly	

ES 2 718 753 T3

660	665	670	
gtg ggt cag acg atc aag ttg gat gat ccg gct tta tcg aaa cga ttg			2064
Val Gly Gln Thr Ile Lys Leu Asp Asp Pro Ala Leu Ser Lys Arg Leu			
675	680	685	
ctt caa ggc gct gaa ctg tca cgg gcg ttt atg ctg cgt tat gat ttt			2112
Leu Gln Gly Ala Glu Leu Ser Arg Ala Phe Met Leu Arg Tyr Asp Phe			
690	695	700	
tat cgg caa ttc ttc ccg att atg gcg tta agt cgg gca gag aga ctg			2160
Tyr Arg Gln Phe Phe Pro Ile Met Ala Leu Ser Arg Ala Glu Arg Leu			
705	710	715	720
att gat ttg aat aat tga			2178
Ile Asp Leu Asn Asn			
725			

<210> 2

<211> 725

<212> PRT

5 <213> Zymomonas mobilis

<400> 2

Met Gly Ile Asp Arg Met Asn Ser Leu Ser Arg Leu Leu Met Lys Lys																	
1				5					10						15		
Ile Phe Gly Ala Glu Lys Thr Ser Tyr Lys Pro Ala Ser Asp Thr Ile																	
			20						25						30		
Ile Gly Thr Asp Thr Leu Lys Arg Pro Asn Arg Arg Pro Glu Pro Thr																	
			35					40							45		
Ala Lys Val Asp Lys Thr Ile Phe Lys Thr Met Gly Asn Ser Leu Asn																	
			50					55					60				
Asn Thr Leu Val Ser Ala Cys Asp Trp Leu Ile Gly Gln Gln Lys Pro																	
			65					70					75				80
Asp Gly His Trp Val Gly Ala Val Glu Ser Asn Ala Ser Met Glu Ala																	
			85						90								95
Glu Trp Cys Leu Ala Leu Trp Phe Leu Gly Leu Glu Asp His Pro Leu																	
			100						105								110
Arg Pro Arg Leu Gly Asn Ala Leu Leu Glu Met Gln Arg Glu Asp Gly																	
			115						120								125
Ser Trp Gly Val Tyr Phe Gly Ala Gly Asn Gly Asp Ile Asn Ala Thr																	
			130						135								140
Val Glu Ala Tyr Ala Ala Leu Arg Ser Leu Gly Tyr Ser Ala Asp Asn																	

ES 2 718 753 T3

Asp Trp Leu Leu Ala Arg Gln Val Lys Val Lys Gly Asp Trp Ser Ile
 405 410 415

Lys Leu Pro Asp Val Glu Pro Gly Gly Trp Ala Phe Glu Tyr Ala Asn
 420 425 430

Asp Arg Tyr Pro Asp Thr Asp Asp Thr Ala Val Ala Leu Ile Ala Leu
 435 440 445

Ser Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Glu Trp Gln Lys Lys Gly Val Glu Asp
 450 455 460

Ala Ile Thr Arg Gly Val Asn Trp Leu Ile Ala Met Gln Ser Glu Cys
 465 470 475 480

Gly Gly Trp Gly Ala Phe Asp Lys Asp Asn Asn Arg Ser Ile Leu Ser
 485 490 495

Lys Ile Pro Phe Cys Asp Phe Gly Glu Ser Ile Asp Pro Pro Ser Val
 500 505 510

Asp Val Thr Ala His Val Leu Glu Ala Phe Gly Thr Leu Gly Leu Ser
 515 520 525

Arg Asp Met Pro Val Ile Gln Lys Ala Ile Asp Tyr Val Arg Ser Glu
 530 535 540

Gln Glu Ala Glu Gly Ala Trp Phe Gly Arg Trp Gly Val Asn Tyr Ile
 545 550 555 560

Tyr Gly Thr Gly Ala Val Leu Pro Ala Leu Ala Ala Ile Gly Glu Asp
 565 570 575

Met Thr Gln Pro Tyr Ile Thr Lys Ala Cys Asp Trp Leu Val Ala His
 580 585 590

Gln Gln Glu Asp Gly Gly Trp Gly Glu Ser Cys Ser Ser Tyr Met Glu
 595 600 605

Ile Asp Ser Ile Gly Lys Gly Pro Thr Thr Pro Ser Gln Thr Ala Trp
 610 615 620

Ala Leu Met Gly Leu Ile Ala Ala Asn Arg Pro Glu Asp Tyr Glu Ala
 625 630 635 640

Ile Ala Lys Gly Cys His Tyr Leu Ile Asp Arg Gln Glu Gln Asp Gly
 645 650 655

ES 2 718 753 T3

Ser Trp Lys Glu Glu Glu Phe Thr Gly Thr Gly Phe Pro Gly Tyr Gly
660 665 670

Val Gly Gln Thr Ile Lys Leu Asp Asp Pro Ala Leu Ser Lys Arg Leu
675 680 685

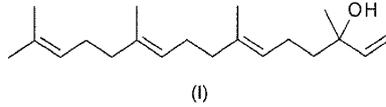
Leu Gln Gly Ala Glu Leu Ser Arg Ala Phe Met Leu Arg Tyr Asp Phe
690 695 700

Tyr Arg Gln Phe Phe Pro Ile Met Ala Leu Ser Arg Ala Glu Arg Leu
705 710 715 720

Ile Asp Leu Asn Asn
725

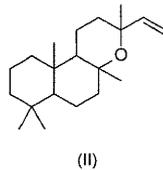
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la ciclización biocatalítica de un compuesto de la fórmula (I)



5 en presencia de una ciclasa, que exhibe una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO:2 o con identidad de secuencia de al menos el 95 % frente a SEQ ID NO:2;

en donde el compuesto de la fórmula (I) reacciona hasta dar el compuesto de la fórmula (II)



2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la ciclasa está presente cruda, purificada, disuelta, dispersa o inmovilizada, o en presencia de células de un microorganismo que exhiben ciclasa.

10 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 y 2 en presencia de un microorganismo recombinante, el cual porta una secuencia de nucleótido que codifica para ciclasa.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la secuencia de nucleótido es parte de un casete de expresión y allí está bajo el control de al menos una secuencia reguladora.

15 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el casete de expresión es parte de un vector de expresión.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el vector de expresión es elegido de entre plásmidos.

7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el microorganismo es elegido de entre bacterias, hongos y levaduras.

20 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el microorganismo es *E. coli*.