(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 772 598**

(21) Número de solicitud: 201831274

(51) Int. CI.:

C12N 9/00 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

21.12.2018

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

07.07.2020

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
C/ Ancha 16
11001 Cádiz ES

(72) Inventor/es:

CANTERO MORENO, Domingo;
BOLIVAR PÉREZ, Jorge;
CABRERA REVUELTA, Gema;
VALLE GALLARDO, Antonio y
DE LA CALLE SIERRA, María Elena

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

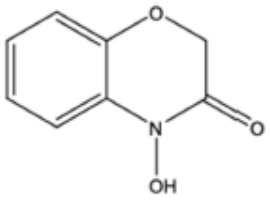
(54) Título: **PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE D-DIBOA Y SUS DERIVADOS CLORADOS A PARTIR DE SUS PRECURSORES NITROFENOXIDO-ACETATO**

(57) Resumen:

Producción biotecnológica de D-Diboa y sus derivados clorados a partir de sus precursores nitrofenoxido-acetato.

El área científica al que corresponde la invención es la biotecnología, ya que se trata de la optimización de un proceso biotecnológico para producir un compuesto con uso potencial como herbicida, insecticida, funguicida y/o bactericida. Por ello, el sector industrial de aplicación es el sector agroquímico que dirige sus esfuerzos hacia la búsqueda de nuevos compuestos fitoquímicos más selectivos y activos y que, además sean respetuosos con el medio ambiente.

Figura 5.



(X)

ES 2 772 598 A1

DESCRIPCIÓN

PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE D-DIBOA Y SUS DERIVADOS CLORADOS A PARTIR DE SUS PRECURSORES NITROFENOXIDO-ACETATO

SECTOR DE LA TÉCNICA

El área científica al que corresponde la invención es la biotecnología, ya que se trata de la optimización de un proceso biotecnológico para producir un compuesto con uso potencial como herbicida, insecticida, funguicida y/o bactericida. Por ello, el sector industrial de aplicación es el sector agroquímico que dirige sus esfuerzos hacia la búsqueda de nuevos compuestos fitoquímicos más selectivos y activos y que, además sean respetuosos con el medio ambiente.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La invención para la producción biotecnológica de D-DIBOA, un compuesto con potencial aplicación como herbicida, insecticida, fungicida y/o bactericida utilizando una cepa modificada genéticamente de la bacteria *Escherichia coli*, es un proceso que unifica por un lado la síntesis de un compuesto biológicamente activo que no presenta impactos negativos sobre el medio ambiente y, por otro, el uso de esta cepa modificada genéticamente para llevar a cabo el proceso biológico con elevados rendimientos.

Los herbicidas han sido tradicionalmente utilizados para aumentar la producción agrícola con un incremento de los rendimientos y de la seguridad alimentaria. Actualmente, el uso de herbicidas sintéticos es la estrategia más eficaz para reducir y controlar tanto el crecimiento como la propagación de las malas hierbas. Sin embargo, su uso indiscriminado ha provocado un fuerte impacto ambiental y ecológico (Cordeau et al., 2016). Así, problemas como la contaminación, la bioacumulación y la aparición de fenómenos de resistencia han sido atribuidos al efecto de los herbicidas. Este hecho ha promovido la investigación enfocada a encontrar nuevas fórmulas que sean, principalmente, más respetuosas con el medio ambiente y que, además, presenten nuevos modos de acción para los que no hayan sido descritos, por tanto, fenómenos de resistencia.

Para reducir la dependencia del control químico y mitigar los impactos negativos que los herbicidas tienen sobre el medio ambiente, la estrategia de utilizar productos naturales con propiedades análogas tiene cada vez mayor aceptación en el sector agrícola (Muzell Trezzi et al., 2016). Una de las alternativas más interesantes a estos herbicidas sintéticos es el uso de aleloquímicos de plantas. Éstos son productos que sintetizan las plantas de manera natural y que afectan a la supervivencia o el crecimiento de otros organismos, ya sean plantas, insectos, microorganismos u hongos (Rimando y Duke, 2006). Debido a su diversidad estructural, modo de acción específico y degradabilidad en el suelo, los aleloquímicos han sido propuestos como nuevos modelos de herbicidas efectivos para controlar el manejo de plagas en los cultivos agrícolas (Macías et al., 2009).

Dentro de estos compuestos los alcaloides, metabolitos secundarios sintetizados a partir de aminoácidos, han despertado especial interés por haber sido identificados como compuestos básicos farmacológicamente activos (Tiwari y Rana, 2015). Entre ellos, los ácidos hidroxámicos destacan por ser emitidos por diversos cultivos de gran importancia desde el punto de vista agrolimentario. Así, las especies de la familia Poaceae (gramíneas) como *Zea mays* L. (maíz), el *Triticum aestivum* L. (trigo) y *Hordeum vulgare* L. (cebada) presentan numerosos antecedentes como plantas con actividad alelopática, la cual ha sido atribuida a la exudación e incorporación al suelo de estos ácidos hidroxámicos.

Los ácidos hidroxámicos cíclicos, conocidos como ácidos benzohidroxámicos (Figura 1), actúan aportando protección a multitud de especies de la familia Poaceae, incluyendo cultivos agrícolas tan importantes como el maíz, el trigo o el centeno (*Secale cereale* L.) (Frey et al., 2009). En concreto, el DIBOA (2,4-dihidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona) (Figura 2) es el ácido benzohidroxámico que mayor interés ha suscitado debido a su alta fitotoxicidad, alta especificidad y alta degradabilidad en el suelo. Éste se aisló por primera vez de las raíces de centeno en 1959. La actividad fitotóxica del DIBOA y de los productos relacionados con su degradación en el suelo, ha sido testada tanto en especies modelo de estudios fitotóxicos como en especies que causan problemas en cultivos agrícolas (malas hierbas), comprobándose que éste compuesto no sólo es comparable con el de algunos herbicidas sintéticos comerciales, sino que incluso en algunos casos los mejora (Macías et al., 2006b, 2005).

A pesar del éxito que supuso el aislamiento del DIBOA a partir de plantas, su síntesis está condicionada por factores externos y, además, se ve limitada a pequeñas cantidades que no hacen viable una extracción, producción y aplicación a mayor escala. Por lo tanto, muchos estudios han estado enfocados a la síntesis química de estos compuestos.

La síntesis química de un gran número de compuestos con un esqueleto (2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona **(I)** ha sido llevada a cabo mediante una metodología de ciclación reductiva reportada inicialmente por Coutts (1963) (Atkinson et al., 1991). Posteriormente, se utilizó esta reacción para patentar un proceso de síntesis química del DIBOA **(II)**, y otros ácidos benzohidroxámicos, a partir del 2-nitrofenol o derivados (Jernow y Rosen, 1975) (Figura 3). En una primera reacción el 2-nitrofenóxido **(III)** sufre una sustitución nucleofílica en el C-2 dando lugar a un compuesto 2-nitrofenoxi-acetato de metilo **(IV)**. Posteriormente, la ciclación reductiva de este compuesto intermedio produce el correspondiente ácido benzohidroxámico **(V)**, sin embargo, este compuesto aún tiene que ser sometido a diferentes modificaciones en sus radicales para, finalmente, obtener el DIBOA.

En ese mismo año, un proceso alternativo de síntesis química de DIBOA mediante quelantes de zinc fue patentado (Tipton y Tsao, 1975) (Figura 4), con un fundamento similar al anterior. En este caso la invención se basa de manera concreta en la síntesis química de DIBOA a partir del 2-nitrofenol **(VI)**, el cual reacciona con un cloro-fluoro-acetato de alquilo **(VII)** bajo condiciones ambientales para dar lugar al compuesto intermedio 2-nitrofenoxi-fluor-acetato de alquilo **(VIII)**. La reacción de ciclación reductiva se origina al hacer reaccionar este compuesto intermedio en solución acuosa con zinc y cloruro de amonio para producir el quelato de zinc DIBOA **(IX)**. Si este complejo se hace reaccionar con EDTA en exceso se asegura la completa conversión del quelato de zinc hacia un DIBOA libre.

Recientemente, se ha conseguido sintetizar de manera química las formas desoxi de las 2,4-dihidroxibenzoxacinonas utilizando el mismo fundamento de síntesis que en los casos anteriores, obteniéndose en este caso 4-hidroxibenzoxacinonas y, en particular, el 4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3-(4H)-ona (D-DIBOA) **(X)** (Figura 5). Macías y colaboradores patentaron (2008) (WO 2008/012385 Al) un conjunto de métodos químicos para sintetizar varios derivados halogenados del D-DIBOA, entre ellos destacan el 6-Cl-4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3-(4H)-ona (6-Cl-D-DIBOA) (**XI**) (Figura

5) y el 8-Cl-4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3-(4H)-ona (8-Cl-D-DIBOA) (**XII**) (Figura 5) que se caracterizan por presentar una mayor actividad fitotóxica y una alta selectividad, respectivamente. Previamente, habían reportado la síntesis del D-DIBOA en dos etapas análogas a las anteriormente descritas. En este caso concreto, la primera etapa, emplea como material de partida el 2-nitrofenol **(VI)** y bromoacetato de etilo, obteniéndose el compuesto intermedio 2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo **(XII)** (de aquí en adelante denominado **precursor**) con un rendimiento del 99%. En la segunda etapa, la ciclación reductiva de este compuesto da lugar al D-DIBOA **(X)** con un rendimiento del 70% (Macías et al., 2006a, 2006c) (Figura 6).

Estudios de fitotoxidad demostraron que la forma D-DIBOA presenta mayor actividad biológica que su análogo DIBOA (Macías et al., 2005), por lo que la síntesis del D-DIBOA adquirió mayor relevancia en el ámbito de la industria agroquímica.

Sin embargo, hay dos problemas a resolver para lograr la producción a escala industrial de D-DIBOA, ambos relacionados con la segunda etapa de la síntesis química. El primero es que se trata de una reacción de catálisis heterogénea exotérmica con desprendimiento de hidrógeno, lo que lleva asociado un elevado riesgo de explosión. Estas condiciones de reacción hacen que el proceso sea caro y peligroso. El segundo de los problemas es el rendimiento relativamente bajo de esta segunda etapa, que provoca la pérdida de un 30% del precursor.

Uno de los mayores retos de la industria química actual es el de trabajar con procesos en los que se maximicen los productos deseados, se minimicen los subproductos, se simplifiquen las rutas de síntesis y, además, se utilicen disolventes poco contaminantes. En base a este planteamiento surgió el término “Química Verde” (Anastas y Warner, 1998), cuyo objetivo es el de fomentar el uso de procesos químicos que sean ambiental y ecológicamente poco dañinos (Tucker y Faul, 2016).

Los biocatalizadores se plantean como una alternativa interesante a la síntesis química desde el punto de vista de la química verde. El uso de enzimas como biocatalizadores destacan por su capacidad selectiva para para convertir unos compuestos, en principio poco costosos, en moléculas complejas, todo ello en un medio acouso y en condiciones de reacción más suaves que las reacciones químicas (Hammer et al., 2017). El uso de las enzimas como catalizadores en procesos de síntesis química tiene una creciente aceptación, ya que la biocatálisis da lugar a velocidades de reacción extremadamente altas que van más allá de las obtenidas en

la catálisis química y con una especificidad de unión a sustrato mucho mayor que los catalizadores químicos (Koeller y Wong, 2001). Lo cual se debe al desarrollo de la tecnología de producción de proteínas recombinantes, que permite la producción de biocatalizadores de una forma rápida y económica mediante la sobreexpresión de la enzima de interés. Una vez sobreexpresadas, las enzimas pueden ser utilizados dentro de la célula, funcionando ésta como catalizador (biocatalizador celular o whole-cell-biocatalyst) o pueden ser purificados para su utilización *in vitro* (de Carvalho, 2011; Wachtmeister y Rother, 2016).

La posibilidad de la producción de D-DIBOA mediante una biocatálisis celular del precursor, a partir de las especies bacternias *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*, fue explorada por Valle y col. (2011). Este trabajo supuso un gran avance en el ámbito biotecnológico, puesto que demostró que *E. coli* es capaz de biotransformar el precursor en D-DIBOA utilizando un medio de cultivo complejo (medio LB). Sin embargo, el rendimiento de este proceso era muy bajo alcanzándose un máximo del 20%.

Un estudio posterior del mismo grupo identificó las enzimas responsables del proceso de biotransformación en *E. coli*, concluyendo que las nitrorreductasas insensibles al oxígeno de tipo I, NfsA y NfsB son las que realizan la catálisis enzimática que da lugar a la síntesis de D-DIBOA ya que la mutación de los genes que expresan dichas proteínas anulaba la síntesis de D-DIBOA (Valle et al., 2012). Además, la clonación de los genes *nfsA* o *nfsB* (que expresan las enzimas NfsA y NfsB, respectivamente) en el vector de expresión inducible pBAD, provocó que estos mutantes, no sólo recuperasen el rendimiento del 20% de la cepa silvestre sino que dieron lugar a un incremento considerable. De entre los fenotipos analizados en este trabajo, se identificó la cepa de *E. coli nfsB*$^-$/pBAD-NfsB, la cual presentaba la deleción del gen *nfsB* y su posterior complementación con el vector pBAD-NfsB, como la que mejor rendimiento molar alcanzó en el proceso de biotransformación, con un 60% de conversión del precursor en D-DIBOA. Las condiciones en las que se lleva a cabo la etapa biológica son más suaves y respetuosas con el medio ambiente que la etapa química, lo que facilita el escalamiento de la síntesis. Sin embargo, la biotransformación con esta cepa de *E. coli* no solucionaba el segundo problema para abordar el escalado de la producción de D-DIBOA, esto es, no sólo no mejoraba el rendimiento del proceso químico (70%) sino que era inferior (60%). Es por tanto el aumento del rendimiento el reto que sería

necesario abordar para que la síntesis de este interesante compuesto pueda ser producido a gran escala.

Referencias bibliográficas:

Anastas, P.T., Warner, J.C., 1998. Green chemistry : theory and practice. Oxford University Press.

Atkinson, J., Morand, P., Arnason+, J.T., Niemeyer, H.M., Bravo, H.R., 1991. Analogues of the cyclic hidroxamic acid 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one: Decomposition to Benzoxazolinones and Reaction with β-Mercaptoethanol, J. Org. Chem. UTC.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol. Syst. Biol. 2, 2006.0008. https://doi.org/10.1038/msb4100050

Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S., Steinberg, C., Guillemin, J.-P., 2016. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. Crop Prot. 87, 44-49. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.016

Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 6640-5. https://doi.org/10.1073/pnas.120163297

de Carvalho, C., 2011. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. Biotechnol. Adv. 29, 75-83. https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.09.001

Frey, M., Schullehner, K., Dick, R., Fiesselmann, A., Gierl, A., 2009. Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. Phytochemistry 70, 1645-1651. https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2009.05.012

Green, M.R., Sambrook, J., 2001. Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. https://doi.org/10.1086/394015

Hammer, S.C., Knight, A.M., Arnold, F.H., 2017. Design and evolution of enzymes for non-natural chemistry. Curr. Opin. Green Sustain. Chem. 7, 23-30. https://doi.org/10.1016/J.COGSC.2017.06.002

Jernow, J.., Rosen, P., 1975. 2h-1,4-benzoxazin-3(4h)-ones.

Koeller, K.M., Wong, C.-H., 2001. Enzymes for chemical synthesis. Nature 409, 232-240. https://doi.org/10.1038/35051706

Macías, F.A., De Siqueira, J.M., Chinchilla, N., Marín, D., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., 2006a. New herbicide models from benzoxazinones: Aromatic ring functionalization effects. J. Agric. Food Chem. 54, 9843-9851. https://doi.org/10.1021/jf062709g

Macías, F.A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Castellano, D., M. Simonet, A., Molinillo, J.M.G., 2005. Structure−Activity Relationships (SAR) studies of benzoxazinones, their degradation products and analogues. Phytotoxicity on standard target species (STS). J. Agric. Food Chem. 53, 538-548. https://doi.org/10.1021/JF0484071

Macías, F.A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Castellano, D., Simonet, A.M., Molinillo, J.M.G., 2006b. Structure−Activity Relationship (SAR) Studies of benzoxazinones, their degradation products, and analogues. Phytotoxicity on problematic weeds Avena fatua L. and Lolium rigidum Gaud. J. Agric. Food Chem. 54, 1040-1048. https://doi.org/10.1021/jf050903h

Macías, F.A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Molinillo, J.M.G., 2009. Rediscovering the bioactivity and ecological role of 1,4-benzoxazinones. Nat. Prod. Rep. 26, 478-89. https://doi.org/10.1039/b700682a

Macías, F.A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Molinillo, J.M.G., 2006c. Optimization of Benzoxazinones as Natural Herbicide Models by Lipophilicity Enhancement. J. Agric. Food Chem. 54, 9357-9365. https://doi.org/10.1021/jf062168v

Macías, F.A., Molinilo, J.M., Varela, R.M., Chinchilla, N., De Siqueira, J.M., Marín, D., 2008. Derivados halogenados de benzoxazinonas, con actividad fitotóxica.

Muzell Trezzi, M., Vidal, R.A., Balbinot Junior, A.A., von Hertwig Bittencourt, H., da Silva Souza Filho, A.P., 2016. Allelopathy: driving mechanisms governing its

activity in agriculture. J. Plant Interact. 11, 53-60. https://doi.org/10.1080/17429145.2016.1159342

Rimando, A.M., Duke, S.O., 2006. Natural Products for Pest Management. American Chemical Society, pp. 2-21. https://doi.org/10.1021/bk-2006-0927.ch001

Tipton, C.L., Tsao, F.H.-C., 1975. Zinc chelate of 2,4-dihydroxy-1,4(2H)-benzoxazine-3-one.

Tiwari, R., Rana, C., 2015. Plant secundary metabolites: a review. Int. J. Eng. Res. Gen. Sci. 3.

Tucker, J.L., Faul, M.M., 2016. Drug companies must adopt green chemistry. Nature 534, 27-29. https://doi.org/10.1038/534027a

Valle, A., Cabrera, G., Molinillo, J.M.G., Gómez, J.M., Macĺas, F.A., Cantero, D., 2011. Biotransformation of ethyl 2-(2`-nitrophenoxy)acetate to benzohydroxamic acid (D-DIBOA) by Escherichia coli. Process Biochem. 46, 358-364. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.011

Valle, A., Le Borgne, S., Bolívar, J., Cabrera, G., Cantero, D., 2012. Study of the role played by NfsA, NfsB nitroreductase and NemA flavin reductase from Escherichia coli in the conversion of ethyl 2-(2`- nitrophenoxy)acetate to 4-hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (D-DIBOA), a benzohydroxamic acid with interesting biol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 94, 163-171. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3787-0

Wachtmeister, J., Rother, D., 2016. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. Curr. Opin. Biotechnol. 42, 169-177. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.05.005

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una cepa bacteriana perteneciente a la especie *E. coli* caracterizada porque dicha cepa presenta el gen *lapA* y/o el gen *fliQ* inactivado/s funcionalmente o completamente o parcialmente

eliminados, porque dicha cepa sobreexpresa el gen de la enzima NfsB, y porque dicha cepa es capaz de producir D-DIBOA, 6-Cl-D-DIBOA u 8-Cl-D-DIBOA, respectivamente, a partir de su precursor 2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de etilo, 4-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo, o 6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo. Preferiblemente, dicha cepa es la cepa BW25113. Más preferiblemente, dicha cepa presenta el gen *lapA* y el gen *fliQ* inactivados funcionalmente o completamente o parcialmente eliminados. Aún más preferiblemente, dicha cepa se corresponde con la cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en fecha 14/11/2018, con número de acceso CECT 9760.

Un segundo aspecto de la invención, se refiere al uso *in vitro* de la cepa bacteriana tal y como se ha definido en el primer aspecto de la invención, para la producción de D-DIBOA a partir de su precursor 2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de etilo. Preferiblemente, dicha producción se realiza en el medio mínimo de cultivo que comprende: $MgSO_4$; $CaCl_2$; Na_2HPO_4; KH_2PO_4; NaCl; NH_4Cl; y glucosa. Más preferiblemente, dicha producción se realiza en el medio mínimo de cultivo que comprende: 0,24 g/L $MgSO_4$; 0,01 g/L $CaCl_2$; 11,12 g/L Na_2HPO_4; 3 g/L KH_2PO4; 0,5 g/L NaCl; 1 g/L NH_4Cl; 4 g/L glucosa. Aún más preferiblemente, dicha producción se realiza según el método descrito en el ejemplo 1 o 2.

Un tercer aspecto de la invención, se refiere al uso *in vitro* de la cepa bacteriana tal y como se ha definido en el primer aspecto de la invención, para la producción de 6-Cl-D-DIBOA a partir de su precursor 4-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo.

Un cuarto aspecto de la invención, se refiere al uso *in vitro* de la cepa bacteriana tal y como se ha definido en el primer aspecto de la invención, para la producción de 8-Cl-D-DIBOA a partir de su precursor 6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo.

Un quinto aspecto de la invención, se refiere a un medio cultivo que comprende: 0,24 g/L $MgSO_4$; 0,01 g/L $CaCl_2$; 11,12 g/L Na_2HPO_4; 3 g/L KH_2PO_4; 0,5 g/L NaCl; 1 g/L NH_4Cl; 4 g/L glucosa. Preferiblemente, dicho medio de cultivo del quinto aspecto de la invención, se utiliza para la producción de D-DIBOA a partir de su precursor 2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de etilo. Más preferiblemente, dicho medio de cultivo se utiliza para la producción con una cepa bacteriana perteneciente a la especie *E. coli* caracterizada porque dicha cepa sobreexpresa el gen de la enzima NfsB. Aún más

preferiblemente, dicha cepa bacteriana está caracterizada porque dicha cepa presenta el gen *lapA* y el gen *fliQ* inactivados funcionalmente o completamente o parcialmente eliminados, y porque dicha cepa sobreexpresa el gen de la enzima NfsB.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al procedimiento de síntesis biológica del D-DIBOA utilizando como biocatalizador la cepa de *E. coli* según cualquiera de las reividicaciones 1 a 4, empleando como precursor 2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo, donde dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

a. Cultivar la cepa de *E. coli* en el medio de cultivo definido en cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7;

b. Inducir a la bacteria para la expresión de la proteína NfsB;

c. Adicionar el precursor 2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo;

d. Opcionalmente, adicionar nuevos lotes de sustrato en el medio de cultivo en distintos tiempos de biotransformación para obtener mayores rendimientos y/o concentraciones del producto.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere al procedimiento de síntesis del D-DIBOA mediante una estrategia alternativa de biocatálisis usando la enzima NfsB purificada en una reacción química, preferiblemente con un medio tamponado con fosfato y añadiendo el cofactor de reducción NADH, más preferiblemente utilizando un procedimiento como el descrito en el ejemplo 4.

Un octavo aspecto de la invención se refiere al procedimiento de síntesis del 6-Cl-D-DIBOA mediante una estrategia alternativa de biocatálisis usando la enzima NfsB purificada en una reacción química, preferiblemente con un medio tamponado con fosfato y añadiendo el cofactor de reducción NADH, más preferiblemente utilizando como procedimiento el descrito en el ejemplo 5.

Un noveno aspecto de la invención se refiere al procedimiento de síntesis del 8-Cl-D-DIBOA mediante una estrategia alternativa de biocatálisis usando la enzima NfsB purificada en una reacción química, preferiblemente con un medio tamponado con fosfato y añadiendo el cofactor de reducción NADH, más preferiblemente utilizando como procedimiento el descrito en el ejemplo 6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Teniendo en cuenta el estado del arte, la necesidad de encontrar nuevas cepas, metodologías y/o condiciones de cultivo que mejoren el rendimiento de la biotransformación es de especial interés para la producción biotecnológica del D-DIBOA.

En esta invención se describe la metodología de optimización de la síntesis biológica del D-DIBOA a partir de su precursor químico, 2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo. Para ello, se describen dos metodologías biocatalíticas: la primera de ellas consiste en una biocatálisis celular, en la que se emplean como catalizadores células vivas de *E. coli* con un fondo genético apropiado en las que se sobreexpresa la enzima NfsB y que actúan como fábricas celulares productoras de D-DIBOA. La segunda, es una biocatálisis mediante enzima purificada, en la que se emplea la enzima NfsB producida mediante la tecnología del ADN recombinante en *E. coli*, es un proceso en el que es necesario el cofactor de oxidorreducción NADH y una solución tamponada con fosfato de sodio. En este caso el uso de la forma reducida del cofactor NADH encarece el proceso, pero se consigue que la biotransformación sea más rápida que en la biocatálisis celular.

A) BIOCATÁLISIS CELULAR. En este apartado se describe la metodología para el uso de biocatalizadores celulares, empleando para ello una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para alcanzar rendimientos de hasta el 100% (frente al 70% de la síntesis química y el 60% de la síntesis biológica previamente reportada) y un aumento en la concentración de D-DIBOA en el medio de cultivo de hasta un 379% respecto a lo descrito en la literatura en los procesos de biotransformación. Además, esta producción se obtiene en un medio de cultivo definido, frente al uso de medios de cultivo complejos reportados anteriormente, lo que facilitará la futura purificación del producto. Todo ello se lleva a cabo bajo unas condiciones suaves y respetuosas con el medio ambiente, ya que el proceso se realiza en un medio acuoso y se minimiza el uso de solventes orgánicos. El rendimiento de la reacción, la concentración de producto alcanzada y las condiciones en que se realiza hacen que la producción de D-DIBOA mediante esta metodología sea potencialmente escalable, pudiendose producir cantidades adecuadas para su explotación comercial.

El proceso de biotransformación de D-DIBOA a partir del precursor se realiza en un sistema discontinuo, en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Bajo unas condiciones específicas, la cepa es utilizada como un biocatalizador capaz de transformar biológicamente el precursor (siendo éste el sustrato de la reacción) y convertirlo en D-DIBOA. Como se ha descrito en el estado del arte, este concepto ya fue reportado por Valle y col. (2012), sin embargo, la presente invención ha llevado a cabo la modificación de los siguientes parámetros para la optimización el proceso:

i. Cepa de *E. coli* empleada en el bioproceso

ii. Medio de cultivo

iii. Temperatura de crecimiento del cultivo microbiano

iv. Fase de inducción de la expresión de la enzima

v. Inoculación del medio de cultivo

vi. Fase de adición del precursor al medio de cultivo

vii. Modo de alimentación

(i) La cepa de *E. coli* Δ*lapA*Δ*fliQ*::kan/pBAD-NfsB (nº de registro: CECT 9760) es utilizada para llevar a cabo el proceso de la presente invención. Esta cepa fue construida a partir del mutante simple *lapA* (expresa la proteína LapA implicada en el ensamblaje del lipopolisacárido de la pared celular), adquirida de la colección de The Coli Genetic Stock Center (CGSC). En esta cepa se delecionó el gen *fliQ* (expresa la proteína FliQ implicada en la biosíntesis del flagelo) usando la metodología de mutagénesis dirigida mediante recombinación homóloga (Datsenko y Wanner, 2000). La elección de estas dos mutaciones para la construcción del doble mutante fue fruto de un trabajo previo de selección sobre los 3985 mutantes simples de los que constan la Keio Collection de NAIST (Nara Institute of Science and Technology, Kyoto) (Baba et al., 2006), en base a un diseño racional en el que se seleccionaron mutantes que pudiesen potencialmente aportar mayor disponibilidad de los cofactores NADH, NADPH o mayor disponibilidad de recursos metabólicos (energía) al proceso de biotransformación. Se consideró este criterio debido a que la enzima NfsB requiere dos moléculas de los cofactores NADH o NADPH en su forma reducida para poder llevar a cabo la reducción del grupo nitro del precursor. Estos cofactores pasan

entonces a su forma oxidada (NAD^+ o $NADP^+$), siendo su regeneración un factor limitante en el proceso (Figura 7). En concreto, se pre-seleccionaron aquellos genes que pudieran estar relacionados con rutas metabólicas que requieran la reducción de éstos u otros cofactores, como pueden ser ciertas rutas de biosíntesis de macromoléculas, utilización de carbono, intermediarios del metabolismo central, del metabolismo energético o de producción de energía o transporte a través de la membrana.

En base a los criterios expuestos, se seleccionaron 34 cepas mutantes simples, que fueron modificadas para que sobreexpresasen de forma inducible la nitrorreductasa NfsB. La sobreexpresión se controla mediante la adicción al medio de cultivo del compuesto L-arabinosa, ya que este gen fue clonado en el vector de expresión inducible pBAD (vector pBAD-NfsB), previamente construido por los inventores. A continuación, se testó la capacidad de cada cepa construida para biotransformar el precursor en D-DIBOA (Figura 8). Para cuantificar los rendimientos de biotransformación, las células fueron retiradas mediante centrifugación y el medio de cultivo fue analizado mediante HPLC con una columna C18 según metodología previamente desarrollada por el grupo (Valle et al., 2011).

A partir de este estudio se seleccionaron sólo aquellos fondos mutantes que mejoraban el rendimiento de la cepa silvestre (40%) por encima de un 20%, con la intención de realizar mutantes múltiples que permitiesen incrementar los rendimientos obtenidos en los mutantes simples. El objetivo era obtener una cepa mutante múltiple que fuese capaz de biotransformar el precursor en D-DIBOA con rendimientos superiores al 60% reportado para la biotransformación y el 70% reportado en la síntesis química. En el extenso screening realizado, 19 cepas mutantes mejoraron la producción de D-DIBOA respecto a la cepa de referencia, de las cuales sólo 4 incrementaron en un 20% los valores de la misma. Por el contrario, los 15 fondos genéticos restantes no solo no mejoraron los rendimientos, sino que presentaron una producción inferior a la cepa de referencia (figura 8). De las 4 cepas que aumentaron notablemente el rendimiento de la reacción, el mutante sencillo Δ*lapA* fue el que alcanzó incrementos más altos, con valores que superan los previamente reportados en biocatálisis y alcanzando rendimientos próximos al proceso químico (68%). Los otros tres mutantes que aumentaron también de forma significativa, aunque en menor medida, el rendimiento de la reacción fueron: Δ*fliQ*, Δ*nuoG* y Δ*fadR* (Figura 9). No obstante, el mutante Δ*fliQ* mostraba una característica interesante y distintiva, ya que fue capaz de alcanzar altos niveles de biotransformación en menor tiempo que

cualquier otro de los mutantes ensayados. Dado que ambos mutantes no estaban metabólicamente relacionados, se razonó que una cepa que careciese de actividad para ambos genes podría mejorar las favorables características de biotransformación de ambas cepas, por lo que se optó por construir el doble mutante Δ*lapA*Δ*fliQ*. Para ello, se generó un doble mutante a partir del mutante simple Δ*lapA* mediante la metodología descrita por Datsenko y Wanner (2000), descrita en el ejemplo 4.

La cepa construida Δ*lapA*Δ*fliQ* resultó ser un fondo genético óptimo para la síntesis de D-DIBOA mediante la sobreexpresión del enzima NfsB, alcanzándose rendimientos del 76% (Figura 10), lo que superaba el rendimiento de la reacción química.
Posteriormente, se procedió a la optimización de las condiciones de cultivo comenzando por el aumento de la temperatura de incubación desde los 30 ºC, previamente reportados en la literatura, hasta los 37 ºC, lo cual permitió incrementar el rendimiento hasta el 90% (ver punto (iii) de la presente invención (Figura 11)).

Además, tal y como se expone en los ejemplos de invención con esta cepa se ha logrado alcanzar rendimientos del 100%, algo no conseguido hasta ahora ni en la síntesis química ni en procesos biotecnológicos. Adicionalmente, se ha incrementado la concentración en el medio de cultivo hasta 375% respecto a lo previamente reportado en procesos de biotransformación.

(ii) se sustituyó el medio complejo Luria-Bertani (LB) por un medio mínimo definido debido a la mayor estabilidad que presenta el precursor en este medio frente al LB. Tomando como base el medio mínimo mineral M9 con glucosa (Green y Sambrook, 2001), se diseñó un medio de cultivo más sencillo que facilitará el proceso de purificación del D-DIBOA, compuesto de: 0,24 g/L $MgSO_4$; 0,01 g/L $CaCl_2$; 11,12 g/L Na_2HPO_4; 3 g/L KH_2PO_4; 0,5 g/L NaCl; 1 g/L NH_4Cl; 4 g/L glucosa. El medio de cultivo LB es utilizado solamente para crecer la bacteria en las etapas previas a la biotransformación.

(iii) La temperatura de cultivo durante la biotransformación es de 37 ºC en lugar de los 30 ºC reportados previamente.

(iv) La inducción de la expresión de la proteína NfsB se realiza mediante la adición de 0,02% de L-arabinosa en el pre-inóculo y manteniendo esta concentración en todo el

proceso, en lugar de añadirlo en cultivo en crecimiento a una densidad óptica medida a 600 nm de longitud de onda (OD_{600nm}) de 0,6.

(v) El pellet resultante de la centrifugación de 10 mL de bacteria crecida e inducida durante 12 h en medio M9 modificado es resuspendido en 100 mL del mismo medio fresco.

(vi) El precursor es añadido al medio, a una concentración de 2,2 mM, cuando el cultivo alcanza una OD_{600nm} de 0,6 desde la inoculación (considerado como tiempo=0).

(vii) La presente invención considera distintos momentos de alimentación del precursor al sistema. Este factor da lugar al desarrollo de dos nuevas estrategias de producción de D-DIBOA:

Estrategia 1: en esta estrategia se plantea un cultivo alimentado en dos lotes de carga (añadiendo 0,22 mmoles de precursor en cada uno de ellos), uno a tiempo inicial y otro a las 8 horas. El aumento de la cantidad de precursor tratada y las condiciones de cultivo y de operación, se traducen en un incremento de la concentración de D-DIBOA hasta 0,80 g/L, acompañado de un rendimiento del 100% en la biotransformación.

Estrategia 2: en la que se plantea un cultivo alimentado en tres lotes (añadiendo 0,22 mmoles de precursor en cada uno de ellos), uno a tiempo inicial, a las 4 y a las 8 horas. En este caso se logra alcanzar una concentración máxima de 0,91 g/L, sin embargo, el rendimiento aunque mejora el alcanzado hasta ahora (76,2%), implica una pérdida del precursor del 23,8%, respecto a la estrategia 1.

Ambos procesos tienen en común las primeras etapas del procedimiento. Así, en primer lugar, se utiliza el medio de cultivo LB para crecer un inóculo de la bacteria. Una vez crecido el inóculo, el medio LB se retira mediante centrifugación y es sustituido por el medio mínimo mineral M9 modificado, en el cual se llevará a cabo el proceso de biotransformación. Los reactivos que son necesarios añadir al medio de cultivo para la síntesis de D-DIBOA son los siguientes:

- Antibióticos. La cepa Δ*lapA*Δ*fliQ*/pBAD-NfsB presenta resistencia a los antibióticos kanamicina y ampicilina, por lo que, para descartar posibles contaminaciones y para evitar la pérdida del plásmido pBAD-NfsB,

todos los medios de cultivo utilizados son suplementados con ambos antibióticos a una concentración final de 50 y 100 µg/mL, respectivamente.

- L-arabinosa: para la inducción de la expresión de la proteína NfsB se añade un 0,02% de L-arabinosa al medio de cultivo.
- Precursor: solución de precursor en metanol. En los ensayos realizados se utilizó una solución de 50 mg/mL (222 mM).

B) BIOCATÁLISIS MEDIANTE LA ENZIMA NfsB PURIFICADA. Como alternativa a esta biocatálisis celular, en esta invención se propone la producción de D-DIBOA y sus derivados clorados, 6-Cl-D-DIBOA y 8-Cl-D-DIBOA, mediante una reacción biocatalizada por la enzima NfsB de *E. coli*. Esta estrategia requiere la purificación del enzima, la optimización de la solución de reacción y la selección del compuesto tamponante, pH y cofactor de oxidorreducción más adecuados para llevar a cabo el proceso. Estas tareas han sido llevadas a cabo por los inventores, tal como se describe en los ejemplos 4, 5 y 6, Utilizando este procedimiento se alcanzan rendimientos del 63% en la producción de D-DIBOA y para ello son necesarios tan sólo 210 min de reacción frente a las 24 ó 26 horas requeridas para las estrategias con célula viva. La biocatálisis mediante la enzima NfsB purificada presentó mayores rendimientos de transformación para la producción de los derivados clorados, alcanzado valores del 81% para el 6-Cl-D-DIBOA (precursor 4-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo) y del 97% para el 8-Cl-D-DIBOA (precursor 6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo) (Figuras 15 y 16). Además, los tiempos en alcanzar estos rendimientos disminuyeron hasta 150 min en ambos casos. Para ello se utiliza esta enzima producida mediante tecnología del ADN recombinante y purificada mediante cromatografía de afinidad según se describe a continuación.

Para la obtención de la enzima NfsB, el gen *nfsB* fue clonado en el vector de expresión pBiEx™ (Novagen) mediante las enzimas de restricción *Hind*III (5´) y *Bam*HI (3´), de modo que expresa el gen *nfsB* fusionado a una secuencia de polihistidinas. El plásmido resultante, pBiEx-NfsB fue transformado en la cepa de *E. coli* BL21 Star (Novagen) para la producción de la proteína mediante la inducción de expresión con IPTG (1 mM) durante 4 horas a partir de células crecidas en cultivo exponencial. La obtención del extracto proteico se llevó a cabo mediante sonicación de la biomasa de bacterias inducidas y previamente centrifugadas en un tampón fosfato 50 mM (pH

7,5), comprobándose mediante western-blot, con un anticuerpo anti-histidina, que la proteína se encontraba en la fracción soluble. De dicha fracción se purificó la enzima NfsB mediante cromatografía de afinidad aprovechando la cola de poli-histidinas y utilizando una columna de afinidad con iones de niquel inmovilizados (columna Ni-NTA, GE-Healthcare). La enzima fue eluída de la columna con una solución 0,5 M de imidazol. El imidazol fue posteriormente eliminado mediante diálisis frente al buffer de reacción.

La enzima purificada fue utilizada como biocatalizador para la producción de D-DIBOA, 6-Cl-D-DIBOA y 8-Cl-D-DIBOA a partir del sus correspondientes precursores, 2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo, 4-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo y 6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo, tal como se indica en los ejemplos 4, 5 y 6, respectivamente.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Fórmula general del esqueleto (2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona.

Figura 2. Fórmula del DIBOA.

Figura 3. Esquema de la síntesis de 2H-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona patentada por Jernow y col., 1975.

Figura 4. Esquema de la síntesis de los quelantes de zinc de DIBOA, patentada por Tipton, 1975.

Figura 5. Fórmulas de los compuestos sintetizados en la presente invención: D-DIBOA (X), 6-Cl-D-DIBOA (XI) y 8-Cl-D-DIBOA (XII).

Figura 6. Esquema de la síntesis de D-DIBOA optimizada por Macías y col. (2006). 2-nitrofenol (IV); Precursor, 2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo (XIII); D-DIBOA (X).

Figura 7. Esquema de la reacción catalizada por la enzima NfsB. Para la síntesis de D-DIBOA. En la síntesis de una molécula de D-DIBOA se consumen dos NAD(P)H. La regeneración de este cofactor (*) es un factor limitante del proceso.

Figura 8. Resultados del screening en los 34 mutantes de la colección Keio seleccionados. En el eje X se muestran rendimientos de biotransformación de los

mutantes simples estandarizados respecto a las cepa de referencia. Las barras en negro muestran los 4 mutantes que mayor incremento de rendimiento en la producción de D-DIBOA presentaron (Δ*lapA*, Δ*fliQ*, Δ*nuoG* y Δ*fadR*).

Figura 9. Concentración de D-DIBOA producida por la cepa de referencia y los 4 mutantes simples que mayor producción de D-DIBOA biotransforman.

Figura 10. Concentración de D-DIBOA alcanzada por los mutantes simples Δ*lapA* y Δ*fliQ* y por el mutante doble Δ*lapA*Δ*fliQ.*

Figura 11. Efecto del incremento de temperatura en la producción de D-DIBOA por el doble mutante Δ*lapA*Δ*fliQ*.

Figura 12. Ejemplo 1.Producción de D-DIBOA utilizando la cepa Δ*lapA*Δ*fliQ* mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

Figura 13. Ejemplo 2. Producción de D-DIBOA utilizando la cepa Δ*lapA*Δ*fliQ* mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Figura 14. Ejemplo 4. Cinética de la producción de D-DIBOA a partir de su precursor empleando la enzima NfsB aislada como biocatalizador.

Figura 15. Ejemplo 5. Cinética de la producción de 6-Cl-D-DIBOA a partir de su precursor 4-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo empleando la enzima NfsB aislada como biocatalizador.

Figura 16. Ejemplo 6. Cinética de la producción de 8-Cl-D-DIBOA a partir de su precursor 6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo empleando la enzima NfsB aislada como biocatalizador.

EJEMPLO DE REALIZACIÓN CONCRETA DE LA INVENCIÓN

EJEMPLO 1.

Método para obtener un 100% en el rendimiento de biotransformación de D-DIBOA a partir del precursor.

A continuación, se describe el método de producción de D-DIBOA para la **estrategia 1**, cultivo alimentado en dos lotes que se realiza en los siguientes 7 pasos:

1. Sembrar 1 colonia de la cepa *E. coli* Δ*lapA*Δ*fliQ*/pBAD-NfsB previamente crecida en placa Petri en medio LB-agar en 5 mL de medio LB. Incubar 8-10 horas a 37 ºC y 200 rpm.
2. Centrifugar el cultivo durante 10 minutos, 3.000 *xg*. Descartar el sobrenadante.
3. Resuspender la biomasa en 100 mL de medio mínimo M9 modificado. Inducir con L-arabinosa (0,02%) e incubar durante 8-10 h a 37 ºC y 200 rpm.
4. Centrifugar 10 mL del cultivo durante 10 minutos, 3.000 *x g*. Descartar el sobrenadante y resuspender la biomasa en 100 mL de medio mínimo M9 modificado suplementado con L-arabinosa (0,02%) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
5. Incubar a 37 ºC y 200 rpm hasta que la OD_{600nm} del cultivo sea 0,6. Añadir 1 mL del stock precursor, que contiene 0,22 mmol.
6. Incubar a 37 ºC y 200 rpm durante 8 horas y volver a añadir 1 mL del stock precursor, que contiene 0,22 mmol.
7. Incubar a 37 ºC y 200 rpm durante 14 horas más.

Al finalizar este procedimiento se obtiene un volumen de cultivo de 100 mL, en el que se ha añadido un total de 4,4 mM de precursor. Siendo el rendimiento de biotransformación del 100%, y puesto que la relación molar precursor:D-DIBOA es 1:1, se obtienen 4,4 mM D-DIBOA (0,8 g/L) (Figura 12).

EJEMPLO 2.

Método para obtener una concentración de D-DIBOA de 379% respecto a lo reportado en el estado del arte.

El procedimiento de la **estrategia 2** es similar al anterior, pero con una alimentación en tres lotes, se compone de 8 pasos de los cuales los 5 primeros coinciden con los de pasos 1-5 de la estrategia 1:

1. Sembrar 1 colonia de la cepa *E. coli* Δ*lapA*Δ*fliQ*/pBAD-NfsB crecida en placa Petri en medio LB-agar en 5 mL de medio LB. Incubar 8-10 horas a 37 ºC y 200 rpm.
2. Centrifugar el cultivo durante 10 minutos, 3.000 *xg*. Descartar el sobrenadante.
3. Resuspender la biomasa en 100 mL del medio mínimo M9 modificado. Inducir con L-arabinosa e incubar 8-10 horas a 37 ºC y 200 rpm.
4. Centrifugar 10 mL del cultivo durante 10 minutos, 3.000 *xg*. Descartar el sobrenadante y resuspender la biomasa en 100 mL de medio mínimo M9 modificado suplementado con L-arabinosa en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
5. Incubar a 37 ºC y 200 rpm hasta que la OD_{600nm} del cultivo sea 0,6. Añadir 1 mL del stock precursor, que contiene 0,22 mmol.
6. Incubar a 37 ºC y 200 rpm durante 4 horas y volver a añadir 1 mL del stock precursor, que contiene 0,22 mmol.
7. Incubar a 37 ºC y 200 rpm durante las 4 horas siguientes y añadir 1 mL del stock precursor, que contiene 0,22 mmol.
8. Incubar a 37 ºC y 200 rpm durante 14 horas más.

En este caso, al finalizar el procedimiento se obtiene un volumen de cultivo de 100 mL, en el que se ha añadido un total de 6,6 mM de precursor, y dado que el rendimiento es del 76,2%, resulta una concentración final de D-DIBOA de 5,05 mM (0,91 g/L) de D-DIBOA, siendo la concentración más alta alcanzada (Figura 13).

EJEMPLO 3.

Construcción de la cepa doble mutante Δ*lapA*Δ*fliQ*

La metodología de mutagénesis mediante recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000) fue la empleada para la construcción del doble mutante. En un primer paso, se eliminó el *cassette/*marcador de kanamicina insertado en el mutante simple Δ*lapA* (Δ*lapA*::kan) mediante la transformación con el plásmido pCP20 (que tiene la resistencia al cloranfenicol y ampicilina como marcadores de selección)

que permite la expresión de la enzima flipasa (FLP) que recombina las secuencias FRT que flanquean el gen de resistencia a la kanamicina, eliminándolo del genoma de la bacteria. Este plásmido fue suprimido mediante la incubación a 42 ºC, ya que es termosensible, y los clones fueron seleccionados mediante *replica plating* en placas de LB agar suplementadas en kanamincina o cloranfenicol, obteniéndose de este modo la cepa Δ*lapA*.

Para eliminar el gen *fliQ* de la cepa Δ*lapA*, en primer lugar, se amplificó mediante PCR el casette de resistencia a la kanamicina a partir del plásmido molde pKD13 utilizando oligonucleótidos que en el extremo 3´ contenían secuencias complementarias al plásmido y en el extremo 5´ secuencias homólogas flanqueantes al gen *fliQ* (Tabla 1). De esta forma se generó un fragmento de ADN que contenía el gen de resistencia al antibiótico flanqueado por las secuencias de FRT y secuencias homólogas al gen diana en cada extremo. El producto generado mediante PCR fue introducido por electroporación en el mutane Δ*lapA*, previamente transformado con el vector pKD46, que es codificante para el sistema de recombinación Red.

Oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)
H1P4-fliQ	TGCTGGTCGGTTCGCTGGCGCAGAGCTTTTACAGCTAGAGAGGCAAAATG
H2P1-fliQ	GTTCGCTTGTCACCTGCAACATAGTACGGCTACCCGATGATATACGGCAG

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la construcción del doble mutante ΔlapAΔfliQ.

EJEMPLO 4.

Método para obtener D-DIBOA a partir del precursor utilizando la enzima NfsB aislada como catalizador.

Se trata de un procedimiento distinto a los anteriores ya que, en este caso, se trabaja con la enzima NfsB producida mediante la tecnología del ADN recombinante y purificada mediante cromatografía de afinidad. Los ensayos realizados se llevan a cabo en tubos de 5 mL, con un volumen de reacción de 4 mL. Para evitar la inactivación de la enzima, durante la preparación de la reacción enzimática se mantiene la temperatura de los reactivos a 4 ºC. Las condiciones de reacción son las siguientes: 50 mM de tampón fosfato (NaH_2PO_4+ K_2HPO_4) a pH 7; 1 mM de precursor; 1 µg de enzima NfsB purificada y 5 mM de NADH. La reacción se lleva a cabo a 30 ºC durante 210 min. Para detener la reacción se añade 1 M de hidrocloruro de guanidina y la concentración de D-DIBOA se analiza mediante HPLC con columna C18.

En este caso se alcanza un rendimiento de un 65%, lo que implica una producción de D-DIBOA de 0,65 mM (Figura 14).

EJEMPLO 5.

Método para obtener 6-Cl-D-DIBOA a partir de su precursor utilizando la enzima NfsB aislada como catalizador.

Se trata de un proceso similar al anterior, ya que se utiliza la enzima NfsB purificada como biocatalizador, aunque en este caso el compuesto empleado como precursor y el buffer de reacción en los que se lleva a cabo la reacción son diferentes. Los ensayos realizados se llevan a cabo en tubos de 5 mL, con un volumen de reacción de 4 mL. Para evitar la inactivación de la enzima, durante la preparación de la reacción enzimática se mantiene la temperatura de los reactivos a 4 ºC. Las condiciones de reacción son las siguientes: 50 mM de tampón fosfato (NaH_2PO_4 + K_2HPO_4) a pH 5,75; 1 mM de precursor (4-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo); 1 µg de enzima NfsB purificada y 5 mM de NADH. La reacción se lleva a cabo a 30 ºC durante 150 min. Para detener la reacción se añade 1 M de hidrocloruro de guanidina y la concentración de 6-Cl-D-DIBOA y su precursor se analiza mediante HPLC con una columna C18.

En este caso se alcanza un rendimiento de un 81%, lo que implica una producción de D-DIBOA de 0,81 mM (Figura 15).

EJEMPLO 6.

Método para obtener 8-Cl-D-DIBOA a partir de su precursor utilizando la enzima NfsB aislada como catalizador.

De las misma manera que los ejemplos anteriores, se trata de una biocatálisis en las que se utiliza la enzima NfsB purificada como biocatalizador, empleando un precusor diferente y un buffer de reacción distinto. Los ensayos realizados se llevan a cabo en tubos de 5 mL, con un volumen de reacción de 4 mL. Para evitar la inactivación de la enzima, durante la preparación de la reacción enzimática se mantiene la temperatura de los reactivos a 4 ºC. Las condiciones de reacción son las siguientes: 50 mM de tampón fosfato (NaH_2PO_4 + K_2HPO_4) a pH 6; 1 mM de precursor (6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo); 1 µg de enzima NfsB purificada y 5 mM de NADH. La reacción se lleva a cabo a 30 ºC durante 150 min. Para detener la reacción se añade 1 M de hidrocloruro de guanidina y la concentración de 6-Cl-D-DIBOA y su precursor se analiza mediante HPLC con una columna C18.

En este caso se alcanza un rendimiento de un 97%, lo que implica una producción de D-DIBOA de 0,97 mM (Figura 16).

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana perteneciente a la especie *E. coli* caracterizada porque dicha cepa presenta el gen *lapA* y/o el gen *fliQ* inactivado/s funcionalmente o completamente o parcialmente eliminados, porque dicha cepa sobreexpresa el gen de la enzima NfsB, y porque dicha cepa es capaz de producir D-DIBOA, 6-Cl-D-DIBOA o 8-Cl-D-DIBOA a partir de su precursor 2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de etilo, 4-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo, o 6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo.

2. La cepa bacteriana de acuerdo a la reivindicación 1, donde dicha cepa es la cepa BW25113.

3. La cepa bacteriana de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha cepa presenta el gen *lapA* y el gen *fliQ* inactivados funcionalmente o completamente o parcialmente eliminados.

4. La cepa bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha cepa se corresponde con la cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en fecha 14/11/2018, con número de acceso CECT 9760.

5. Uso *in vitro* de la cepa bacteriana tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la producción de D-DIBOA a partir de su precursor 2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de etilo.

6. Uso *in vitro* de la cepa bacteriana tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la producción de 8-Cl-D-DIBOA a partir de su precursor 6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo

7. Uso según la reivindicación 5 donde dicha producción se realiza en el medio mínimo de cultivo que comprende: $MgSO_4$; $CaCl_2$; Na_2HPO_4; KH_2PO_4; NaCl; NH_4Cl; y glucosa

8. El uso según la reivindicación anterior, donde dicha producción se realiza en el

medio mínimo de cultivo que comprende: 0,24 g/L $MgSO_4$; 0,01 g/L $CaCl_2$; 11,12 g/L Na_2HPO_4; 3 g/L KH_2PO4; 0,5 g/L NaCl; 1 g/L NH_4Cl; 4 g/L glucosa.

9. Medio cultivo que comprende: 0,24 g/L $MgSO_4$; 0,01 g/L $CaCl_2$; 11,12 g/L Na_2HPO_4; 3 g/L KH_2PO_4; 0,5 g/L NaCl; 1 g/L NH_4Cl; 4 g/L glucosa.

10. Uso del medio de cultivo según la reivindicación anterior para la producción de D-DIBOA a partir de su precursor 2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de etilo.

11. Uso del medio de cultivo según la reivindicación anterior, donde dicha producción se realiza con una cepa bacteriana, preferiblemente perteneciente a la especie *E. coli* caracterizada porque dicha cepa sobreexpresa el gen de la enzima NfsB,

12. Uso del medio de cultivo según la reividicación anterior, donde dicha cepa bacteriana está caracterizada porque dicha cepa presenta el gen *lapA* y el gen *fliQ* inactivados funcionalmente o completamente o parcialmente eliminados, y porque dicha cepa sobreexpresa el gen de la enzima NfsB,

13. Procedimiento de síntesis biológica del D-DIBOA utilizando como biocatalizador la cepa de *E. coli según cualquiera de las reividicaciones 1 a 4* , empleando como precursor 2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo, donde dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

    a. Cultivar la cepa de *E. coli* en el medio de cultivo definido en cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7;

    b. Inducir a la bacteria para la expresión de la proteína NfsB;

    c. Adicionar el precursor 2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo;

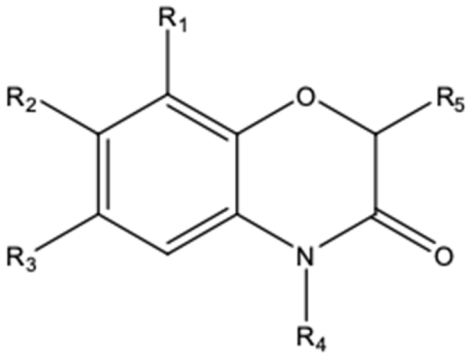
    d. Opcionalmente, adicionar nuevos lotes de sustrato en el medio de cultivo en distintos tiempos de biotransformación para obtener mayores rendimientos y/o concentraciones del producto.

15. El uso de la enzima NfsB purificada como catalizador de la reacción química de síntesis de D-DIBOA en la que se emplea el precursor 2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo como sustrato y NADH en su forma reducida como agente reductor.

16. El uso de la enzima NfsB purificada como catalizador de la reacción química de síntesis de 6-Cl-D-DIBOA en la que se emplea el precursor 4-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo como sustrato y NADH en su forma reducida como agente reductor.

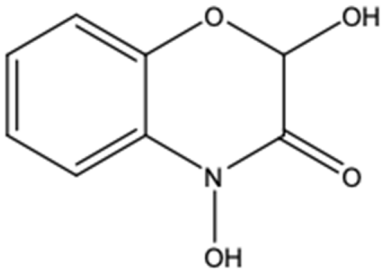
17. El uso de la enzima NfsB purificada como catalizador de la reacción química de síntesis de 8-Cl-D-DIBOA en la que se emplea el precursor 6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo como sustrato y NADH en su forma reducida como agente reductor.

Figura 1.



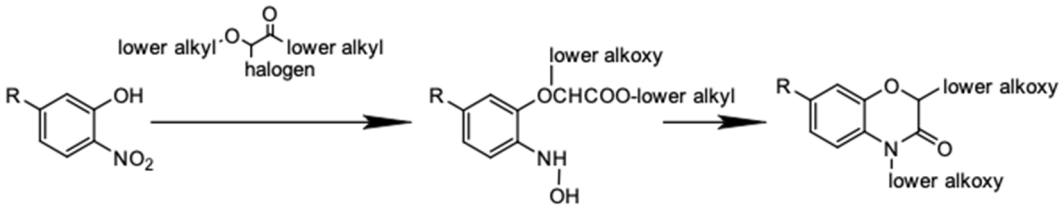
(I)

Figura 2.



(II)

Figura 3.



(III) (IV) (V)

Figura 4.

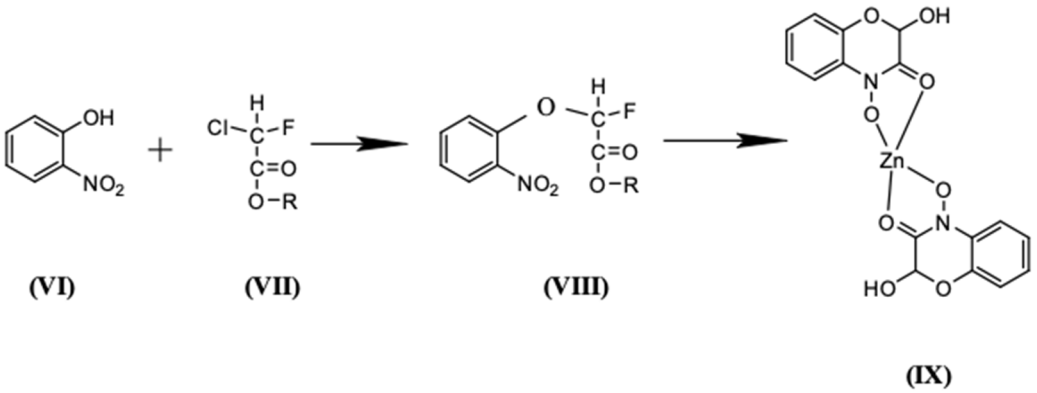


Figura 5.

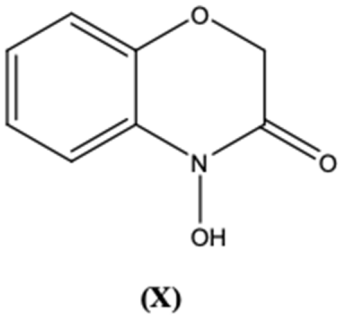


Figura 6.

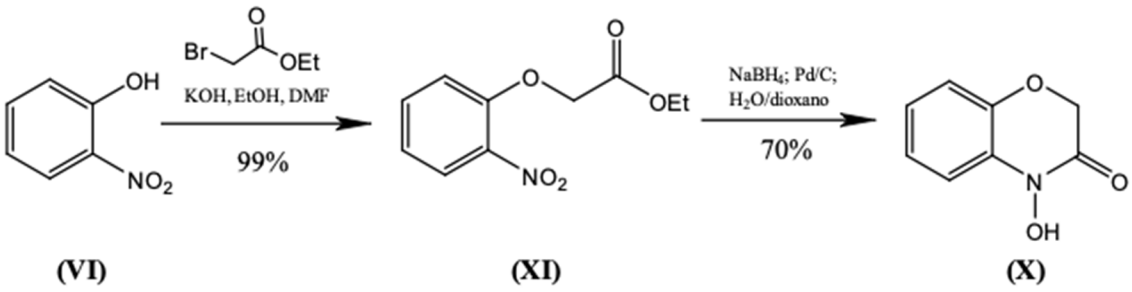


Figura 7.

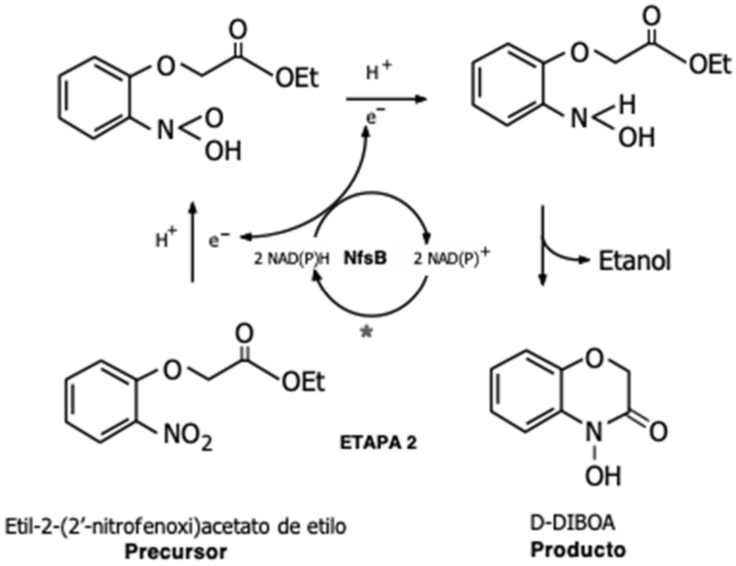

OEt
H+
e−
OEt
N
O
OH
N
H
OH
H+
e−
2 NAD(P)H
NfsB
2 NAD(P)+
Etanol
*
OEt
NO2
ETAPA 2
O
N
O
OH
Etil-2-(2'-nitrofenoxi)acetato de etilo
Precursor
D-DIBOA
Producto

Figura 8.

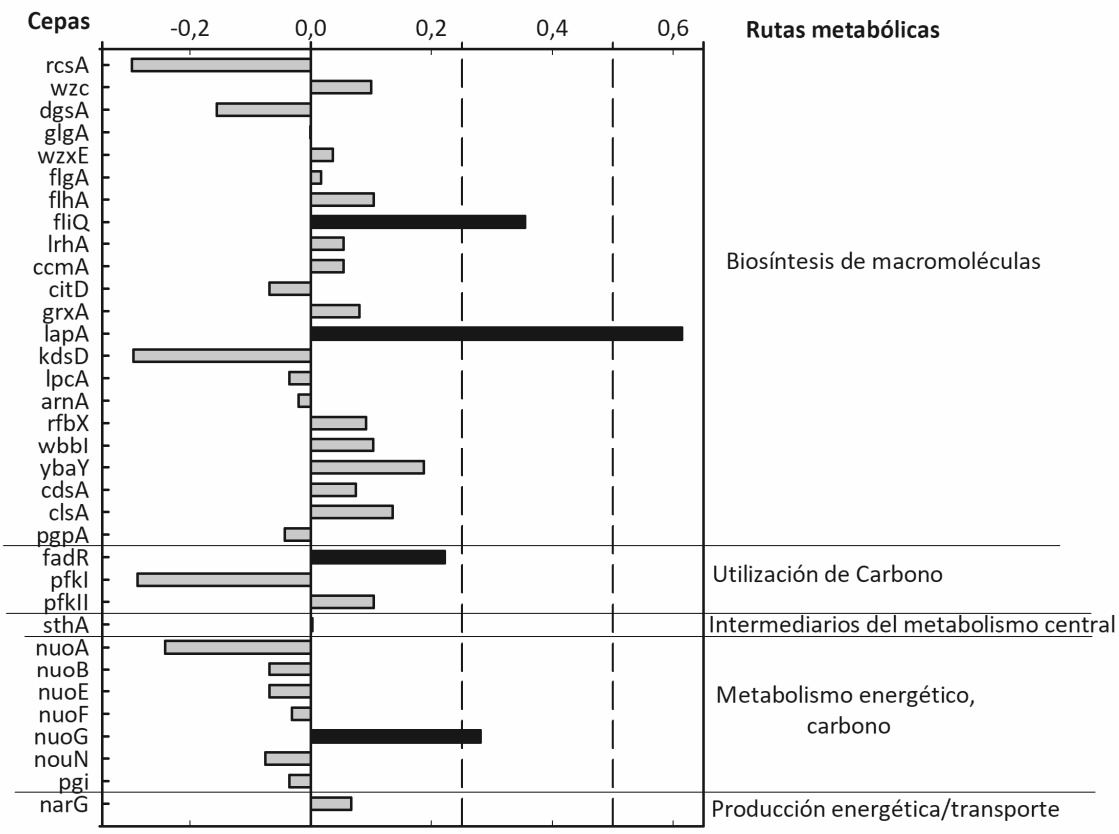

Cepas
-0,2
0,0
0,2
0,4
0,6
Rutas metabólicas
rcsA
wzc
dgsA
glgA
wzxE
flgA
flhA
fliQ
lrhA
ccmA
citD
grxA
lapA
kdsD
lpcA
arnA
rfbX
wbbI
ybaY
cdsA
clsA
pgpA
fadR
pfkI
pfkII
sthA
nuoA
nuoB
nuoE
nuoF
nuoG
nouN
pgi
narG
Biosíntesis de macromoléculas
Utilización de Carbono
Intermediarios del metabolismo central
Metabolismo energético, carbono
Producción energética/transporte

Figura 9.

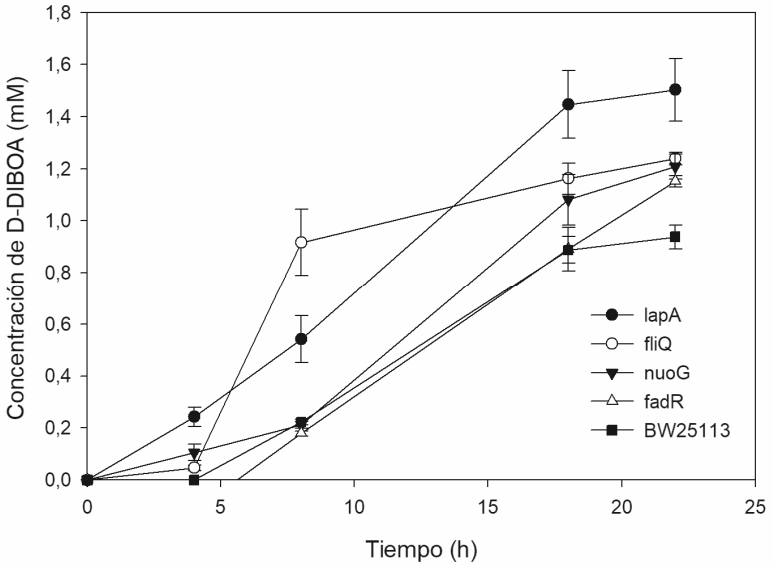


Figura 10.

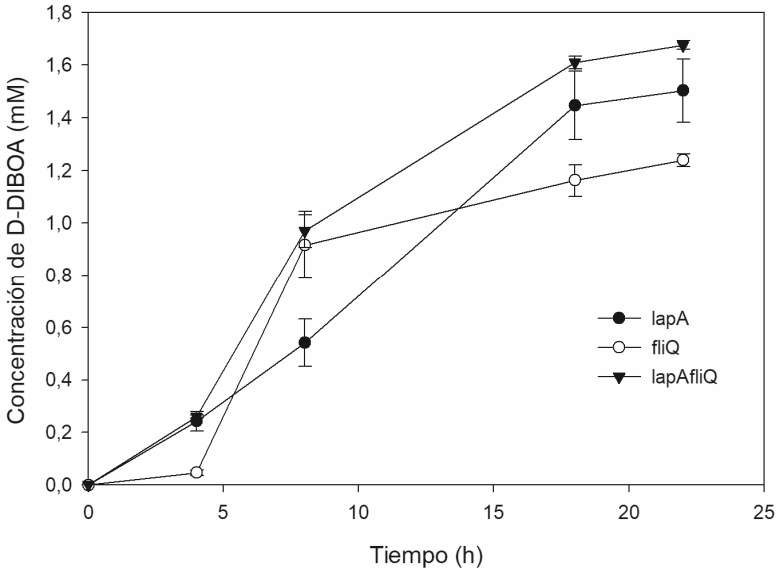


Figura 11.

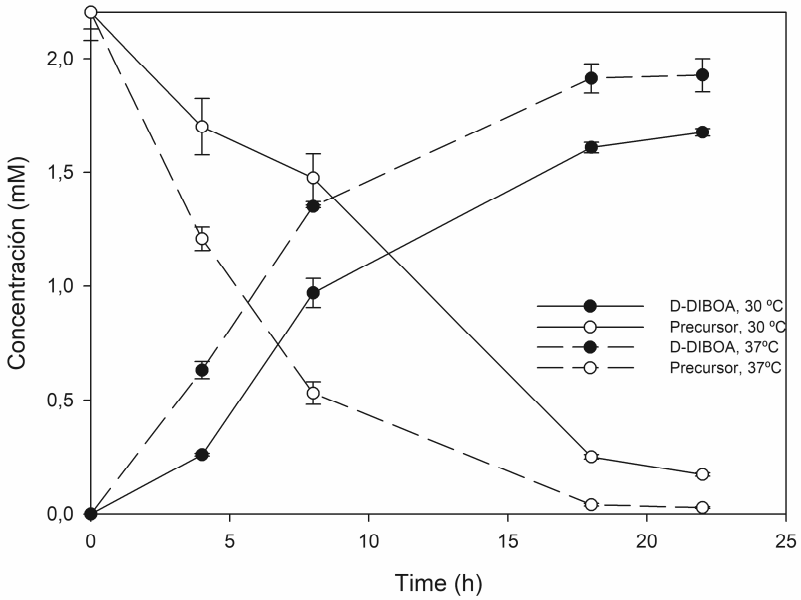


Figura 12.

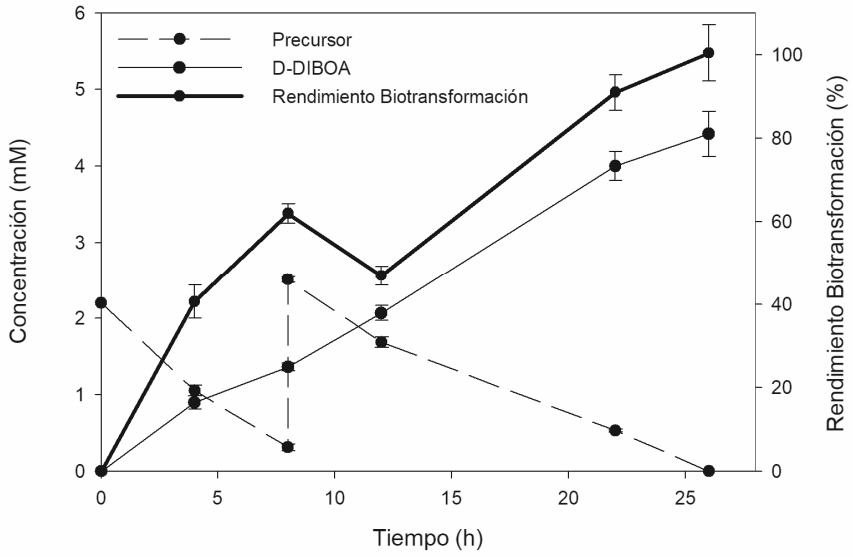


Figura 13.

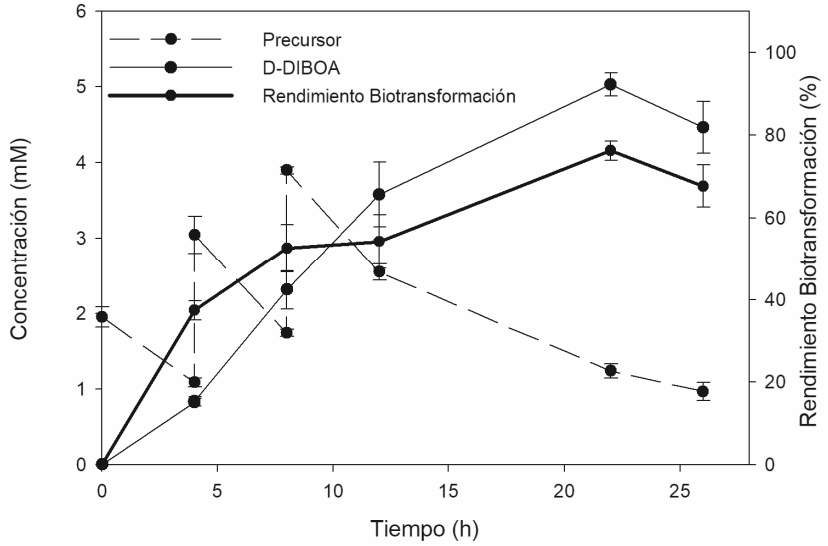


Figura 14.

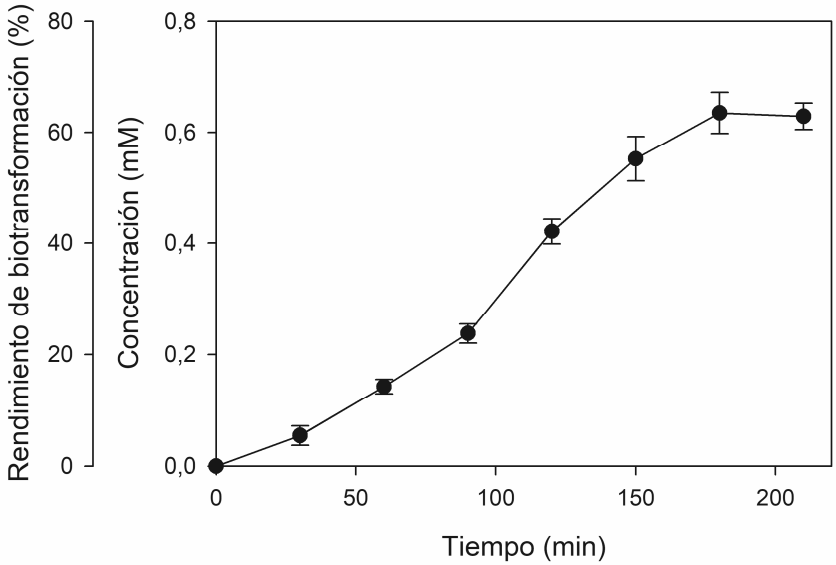


Figura 15.

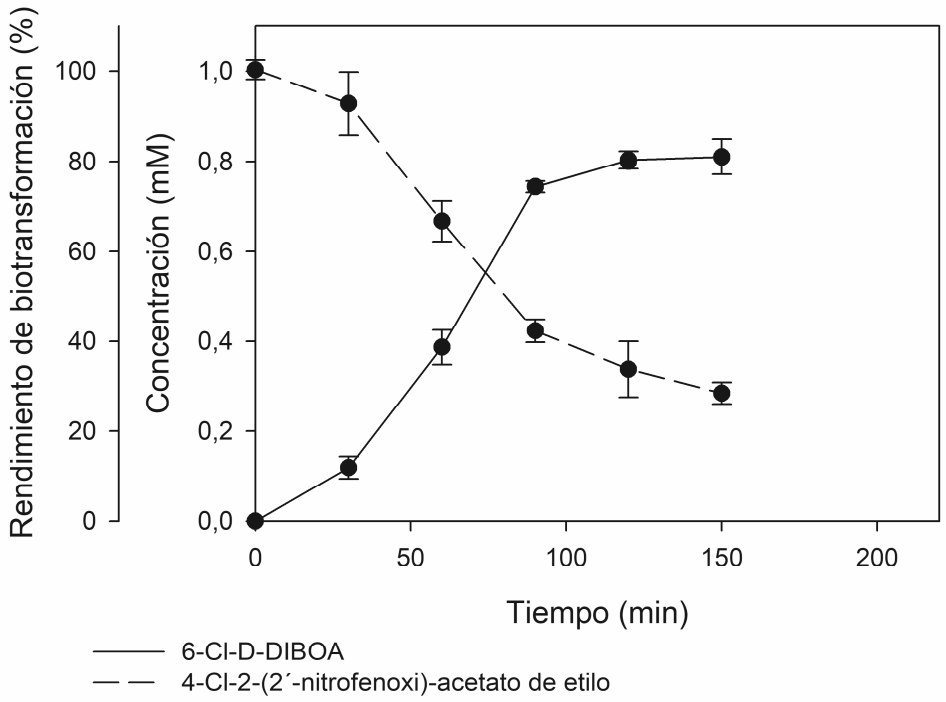
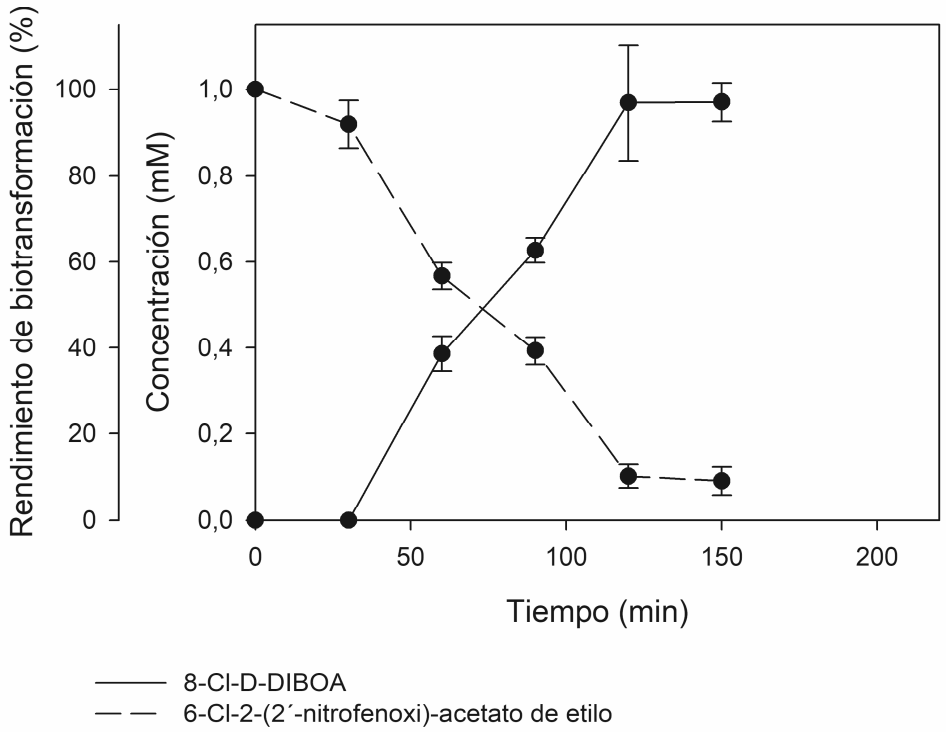

Rendimiento de biotransformación (%)
100
80
60
40
20
0
Concentración (mM)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
50
100
150
200
Tiempo (min)
6-Cl-D-DIBOA
4-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo

Figura 16.


Rendimiento de biotransformación (%)
100
80
60
40
20
0
Concentración (mM)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
50
100
150
200
Tiempo (min)
8-Cl-D-DIBOA
6-Cl-2-(2´-nitrofenoxi)-acetato de etilo

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201831274

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2018

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	VALLE A et al. *"Study of the role played by NfsA, NfsB nitroreductase and NemA flavin reductase from Escherichia coli in the conversion of D-DIBOA, a benzohydroxamic acid with interesting biological properties"*. Applied Microbiology and Biotechnology 2012 Springer Verlag deu. , 31/03/2012, Vol. 94, Páginas 163 - 171 [en línea][recuperado el 26/07/2019]. , ISSN 0175-7598 (print) ISSN 1432-0614 (electronic), <DOI: doi:10.1007/s00253-011-3787-0>. Resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE	1-8, 13-17
A	VALLE A et al. *"Biotransformation of ethyl 2-(2 '-nitrophenoxy)acetate to benzohydroxamic acid (D-DIBOA) by Escherichia coli"*. Process Biochemistry JAN 2011. , 31/12/2010, Vol. 46, Páginas 358-364 [en línea][recuperado el 26/07/2019]. , ISSN 1359-5113(print) ISSN 1873-3298(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.procbio.2010.09.011>. Todo el documento.	1-8, 13-17
A	RONCO, A. *"Fitotóxicos como alternativa a herbicidas contaminantes"*. Moleqla, revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide, 17/07/2018, Páginas 71-74 [en línea][recuperado el 26/10/2018], ISSN 2173-0903. Apartado 2.1.1, pág. 73, párrafos 2-5	1-8, 13-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1-8, 13-17

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
29.07.2019	M. L. Seriñá Ramírez	1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/00 (2006.01)
C12N15/52 (2006.01)
C12N15/70 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP, XPESP2