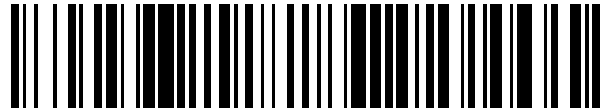


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 095**

51 Int. Cl.:

C12N 15/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2006 E 06768510 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 1885857**

54 Título: **Células o plantas que tienen una capacidad productora de polilactato o sus copolímeros, y procedimiento para la preparación de polilactato o sus copolímeros mediante su uso**

30 Prioridad:

24.05.2005 KR 20050043798

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

23.05.2013

73 Titular/es:

**LG CHEM, LTD. (50.0%)
LG TWIN TOWER, EAST TOWER, YEOIDO-DONG
20, YOUNGDUNGPO-GU
SEOUL 150-721, KR y
KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHO, JUN-HYEONG;
PARK, SI-JAE;
LEE, SANG-YUP y
JUNG, YU-KYUNG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 404 095 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

Células o plantas que tienen una capacidad productora de polilactato o sus copolímeros, y procedimiento para la preparación de polilactato o sus copolímeros mediante su uso

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a células o plantas que tienen la capacidad de producir polilactato o sus copolímeros, y un procedimiento para la preparación de polilactato o sus copolímeros mediante su uso, más específicamente, se refiere a células o plantas capaces de expresar un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA y un gen que codifica una enzima que interviene en la síntesis de PHA, y un procedimiento para la preparación de polilactato o copolímero de hidroxialcanoato-lactato, en donde el procedimiento comprende:
- 10 cultivar las células en un medio que contiene lactato, fuentes de carbono que proporcionan hidroxialcanoil-CoA o lactato y diversos hidroxialcanoatos, o cultivar las plantas.

Antecedentes de la técnica

- El polilactato (PLA) es un polímero biodegradable típico procedente del lactato, que tiene muy diversas aplicaciones como un polímero médico o habitual. En la actualidad, el PLA se prepara mediante la polimerización del lactato que
- 15 sintetizan los microorganismos fermentadores, pero sólo se produce PLA de bajo peso molecular (1000 a 5000 Da) mediante la polimerización directa de lactato. Para sintetizar el PLA de alto peso molecular (>100.000 Da) se puede utilizar un procedimiento que polimeriza el PLA de bajo peso molecular obtenido mediante la polimerización directa del lactato mediante un agente de conjugación de cadenas para obtener un PLA de mayor peso molecular. Pero esto tiene desventajas en el sentido de que el proceso de preparación del PLA de alto peso molecular es complicado
- 20 debido a la adición de un solvente o de un agente de conjugación de cadenas y también en que no resulta fácil retirarlos. En la actualidad, en el proceso para la preparación del PLA de alto peso molecular disponible comercialmente se utiliza un procedimiento en el cual el lactato se convierte en lactida para sintetizar el PLA mediante la ciclodeshidratación del anillo de lactida.

- Mientras tanto, el PHA es un poliéster que se acumula en los microorganismos como compuesto de almacenamiento de energía y de carbono cuando faltan otros elementos nutritivos (por ejemplo, fósforo, nitrógeno, magnesio, oxígeno) mientras que la fuente de carbono se encuentra en exceso. Se sabe que el PHA es un material alternativo para la síntesis de los plásticos actuales porque sus propiedades son similares a las de los polímeros sintetizados que derivan del petróleo actual y, al mismo tiempo, presenta una tasa de biodegradación excelente.
- 25

- El PHA actual se divide en SCL-PHA (por su nombre en inglés, que significa PHA con una longitud de cadena corta) que tiene cadenas de carbono cortas y en MCL-PHA (or su nombre en inglés, que significa PHA con una longitud de
- 30 cadena media) que tiene cadenas de carbono largas. Se clonó de *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas*, un gen que sintetiza PHA y se sintetizó PHA que consiste en varios monómeros mediante microorganismos recombinantes (Qi et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 157: 155, 1997; Qi et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 167: 89, 1998; Langenbach et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 150: 303, 1997; patente internacional WO 01/55436; patente de los EE.UU US 6.143.952;
- 35 patente internacional WO 98/54329; patente internacional WO 99/61624).

- Para producir el PHA en los microorganismos se requieren una enzima que convierte los metabolitos de los microorganismos en un monómero de PHA, y la PHA sintasa que sintetiza el polímero de PHA a partir del monómero de PHA. La PHA sintasa sintetiza el PHA a partir del sustrato hidroxialcanoil-CoA, y se sabe que la β -cetotiolasa (*PhaA*), acetoacetil-CoA reductasa (*PhaB*) clonada de *Ralstonia eutropha*, etc., la 3-hidroxidecanoil-ACP:CoA transferasa (*PhaG*) clonada de *Pseudomonas*, la enoil-CoA hidratasa específica del isómero *R* (*PhaJ*) procedente de *Aeromonas caviae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Fukui et al., *J. Bacteriol.*, 180: 667, 1998; Tsage et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 184: 193, 2000), 3-cetoacil-ACP reductasa (*FabG*) procedente de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Taguchi et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 176: 183, 1999; Ren et al., *J. Bacteriol.*, 182: 2978, 2000; Park et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 214: 217, 2002) son enzimas capaces de proporcionar el hidroxialcanoil-CoA que es sustrato
- 40 de PHA. Se han sintetizado varias clases de PHA mediante hidroxialcanoatos hidroxilados en distintas posiciones de la cadena de carbonos (principalmente en las posiciones 3, 4, 5, 6) con estas enzimas.
- 45

- Sin embargo, se ha descrito que tiene poca actividad PHA sintasa sobre los hidroxialcanoatos hidroxilados en la posición 2 (Zhang et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 131, 2001; Valentin y Steinbuchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40: 699, 1994; Yuan et al., *Arch. Biochem. Biophysics*; 394: 87, 2001). Hasta ahora se ha descrito la actividad de la PHA sintasa sobre el lactil-CoA mediante la medición *in vitro* de la actividad PHA polimerasa en presencia de lactil-CoA, pero hay muy poca actividad PHA sintasa en lactil-CoA (Zhang et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 131, 2001; Valentin y Steinbuchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40: 699, 1994). Es decir, no hay ejemplos de que el PHA y sus copolímeros se produzcan de forma natural o mediante células o plantas recombinantes porque el hidroxialcanoato, tal como el lactato hidroxilado en la posición del carbono 2, no es
- 55 adecuado para la especificidad de sustrato de la PHA sintasa.

Por lo tanto, los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos para producir el PLA de alto peso molecular y sus copolímeros mediante células o plantas, y como resultado confirmaron que los copolímeros de poli(hidroxicanoato-co-lactato) se produjeron al cultivar *Ralstonia eutropha* recombinante transformada con el gen de la propionil-CoA transferasa (*pct*) procedente de *Clostridium propionicum*, que es un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA en un medio de producción que contiene lactato, y el PLA se produjo mediante el cultivo de *E. coli* recombinante transformada con el gen de la PHA sintasa procedente de *Bacillus cereus* y el gen *pct* en un medio de producción que contiene lactato, con lo que se completa la presente invención.

Descripción de la invención

El principal objetivo de la presente invención es dar a conocer células transformadas que tienen la capacidad de producir polilactato o copolímero de hidroxicanoato-lactato [poli(hidroxicanoato-co-lactato)], que contienen un gen que codifica la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxicanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC*, en donde dichas células transformadas se obtienen mediante la transformación de las células que no tienen un gen que codifica la sintasa de polihidroxicanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC*, con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxicanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC*.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer células transformadas que tienen la capacidad de producir polilactato o copolímero de hidroxicanoato-lactato [poli(hidroxicanoato-co-lactato)], que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxicanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC*,

en donde dichas células transformadas se obtienen:

- por transformación de las células que tienen un gen que codifica la sintasa de polihidroxicanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC* con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa; o
- por transformación de las células que tienen un gen que codifica la propionil-CoA transferasa con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la sintasa de polihidroxicanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC*.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento para preparar polilactato o sus copolímeros mediante el cultivo de dichas células o plantas.

Para conseguir el objetivo anterior, en un aspecto, la presente invención da a conocer células o plantas que tienen la capacidad de producir polilactato o copolímeros de hidroxicanoato-lactato [poli(hidroxicanoato-co-lactato)], que simultáneamente tienen un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA y un gen que codifica la sintasa de polihidroxicanoatos (PHA) capaz de utilizar el lactil-CoA de sustrato.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para preparar polilactato o copolímeros de hidroxicanoato-lactato [poli(hidroxicanoato-co-lactato)], en donde el procedimiento comprende las etapas de cultivar las células en un medio que contiene lactato o hidroxicanoato como fuente de carbono; y recuperar el polilactato o los copolímeros de hidroxicanoato-lactato [poli(hidroxicanoato-co-lactato)] de las células cultivadas o mediante el cultivo de las plantas; y recuperar el polilactato o el copolímero de hidroxicanoato-lactato a partir de las plantas cultivadas.

Aún en otro aspecto, la presente invención da a conocer un vector recombinante para preparar polilactato o copolímeros de hidroxicanoato-lactato [poli(hidroxicanoato-co-lactato)] que contiene un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA y un gen que codifica la PHA sintasa capaz de utilizar la lactil-CoA de sustrato, y células o plantas transformadas con el vector recombinante.

Aún en otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para preparar polilactato o copolímeros de hidroxicanoato-lactato [poli(hidroxicanoato-co-lactato)], en donde el procedimiento comprende las etapas de cultivar las células transformadas en un medio que contiene lactato o hidroxicanoato y lactato como fuente de carbono; y recuperar el polilactato o los copolímeros de hidroxicanoato-lactato a partir de las células cultivadas o mediante el cultivo de las plantas transformadas; y recuperar el polilactato o el copolímero de hidroxicanoato-lactato a partir de las plantas cultivadas.

Aún en otro aspecto, la presente invención da a conocer copolímeros de hidroxicanoato-lactato [poli(hidroxicanoato-co-lactato)] que contienen, como monómero, lactato y uno o más hidroxicanoatos seleccionados del grupo que consiste en 3-hidroxiбутирато, 3-hidroxi valerato, 4-hidroxi бутирато, ácidos (D)-3-hidroxicarboxílicos de cadena de longitud media de (C₆₋₁₄), ácido 3-hidroxi propiónico, ácido 3-hidroxi hexanoico, ácido 3-hidroxi heptanoico, ácido 3-hidroxi octanoico, ácido 3-hidroxi nonanoico, ácido 3-hidroxi decanoico, ácido 3-

hidroxiundecanoico, ácido 3-hidroxidodecanoico, ácido 3-hidroxitetradecanoico, ácido 3-hidroxihexadecanoico, ácido 4-hidroxi-valérico, ácido 4-hidroxihexanoico, ácido 4-hidroxiheptanoico, ácido 4-hidroxi-octanoico, ácido 4-hidroxi-decanoico, ácido 5-hidroxi-valérico, ácido 5-hidroxihexanoico, ácido 6-hidroxidodecanoico, ácido 3-hidroxi-4-pentenoico, ácido 3-hidroxi-4-*trans*-hexenoico, ácido 3-hidroxi-4-*cis*-hexenoico, ácido 3-hidroxi-5-hexenoico, ácido 3-hidroxi-6-*trans*-octenoico, ácido 3-hidroxi-6-*cis*-octenoico, ácido 3-hidroxi-7-octenoico, ácido 3-hidroxi-8-nonenoico, ácido 3-hidroxi-9-decenoico, ácido 3-hidroxi-5-*cis*-dodecenoico, ácido 3-hidroxi-6-*cis*-dodecenoico, ácido 3-hidroxi-5-*cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-7-*cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-5,8-*cis-cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-4-metilvalérico, ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico, ácido 3-hidroxi-5-metilhexanoico, ácido 3-hidroxi-6-metilheptanoico, ácido 3-hidroxi-4-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-5-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-6-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-7-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-6-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-7-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-8-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-7-metildecanoico, ácido 3-hidroxi-9-metildecanoico, ácido 3-hidroxi-7-metil-6-octenoico, ácido málico, 3-hidroxisuccinato de metilo, 3-hidroxiadipinato de metilo, 3-hidroxisuberato de metilo, 3-hidroxisebazato de metilo, 3-hidroxi-azelaato de metilo, 3-hidroxisuberato de etilo, 3-hidroxisebazato de etilo, 3-hidroxi-pimelato de propilo, 3-hidroxisebazato de bencilo, ácido 3-hidroxi-8-acetoxioctanoico, ácido 3-hidroxi-9-acetoxinonanoico, ácido fenoxi-3-hidroxi-butírico, ácido fenoxi-3-hidroxi-valérico, ácido fenoxi-3-hidroxiheptanoico, ácido fenoxi-3-hidroxi-octanoico, ácido *para*-cianofenoxi-3-hidroxi-butírico, ácido *para*-cianofenoxi-3-hidroxi-valérico, ácido *para*-cianofenoxi-3-hidroxihexanoico, ácido *para*-nitrofenoxi-3-hidroxihexanoico, ácido 3-hidroxi-5-fenilvalérico, ácido 3-hidroxi-5-ciclohexilbutírico, ácido 3,12-dihidroxidodecanoico, ácido 3,8-dihidroxi-5-*cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-4,5-epoxidodecanoico, ácido 3-hidroxi-6,7-epoxidodecanoico, ácido 3-hidroxi-8,9-epoxi-5,6-*cis*-tetradecenoico, ácido 7-ciano-3-hidroxiheptanoico, ácido 9-ciano-3-hidroxi-nonanoico, ácido 3-hidroxi-7-fluoroheptanoico, ácido 3-hidroxi-9-fluorononanoico, ácido 3-hidroxi-6-clorohexanoico, ácido 3-hidroxi-8-clorooctanoico, ácido 3-hidroxi-6-bromohexanoico, ácido 3-hidroxi-8-bromooctanoico, ácido 3-hidroxi-11-bromoundecanoico, ácido 3-hidroxi-2-butenoico, ácido 6-hidroxi-3-dodecenoico, ácido 3-hidroxi-2-metilbutírico, ácido 3-hidroxi-2-metilvalérico y ácido 3-hidroxi-2,6-dimetil-5-heptenoico.

25 Aún en otro aspecto, la presente invención da a conocer 3HA que tiene de tres a doce carbonos y copolímero de lactato [poli(3HA-co-lactato)].

Otras peculiaridades y realizaciones de la presente invención serán aún más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 es un mapa de los genes del plásmido recombinante pTac99Pct que contiene el *pct* procedente de *Clostridium propionicum*.

La figura 2 es un mapa de los genes del plásmido recombinante pMCSTac99Pct que contiene el *pct* procedente de *Clostridium propionicum*.

35 La figura 3 es un mapa de los genes del plásmido recombinante p10499BcRBC que contiene el *phaRBC* procedente de *Bacillus cereus*.

La figura 4 es un mapa de los genes del plásmido recombinante p10499613C2 que contiene el *phaC2_{PS}*, un gen que codifica la PHA sintasa procedente de *Pseudomonas* sp. 61-3.

La figura 5 es un diagrama esquemático que muestra una vía para sintetizar P(3HB-co-lactato) a partir de glucosa y lactato.

40 La figura 6 es un diagrama esquemático que muestra una vía para sintetizar el copolímero P(3HB-co-4HB-co-lactato) a partir de glucosa, 4HB, 3HP y lactato.

La figura 7 es un diagrama esquemático que muestra una vía para sintetizar PLA con células.

45 La figura 8 es un diagrama esquemático que muestra una vía para sintetizar copolímeros P(3HA-co-lactato) que contienen 3-hidroxi-*l*-alcanoato (3HA) con una cadena de longitud media que tiene de tres a doce carbonos y el lactato como monómero.

La figura 9 es el resultado de una ¹H-RMN del P(3HB-co-LA) preparado por *R. eutropha* NCIMB11599 (pMCSTacPct).

La figura 10 es el resultado de una ¹³C-RMN del P(3HB-co-LA) preparado por *R. eutropha* NCIMB11599 (pMCSTacPct).

50 La figura 11 es el resultado de una ¹H-RMN del PLA preparado por *E. coli* XL1-Blue (p10499BcRBC + pMCSTacPct).

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

La presente invención, en un aspecto, se refiere a células transformadas que tienen la capacidad de producir polilactato o copolímero de hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)], que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC*, en donde dichas células transformadas se obtienen por la transformación de las células que no tienen un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC* con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC*.

La presente invención también se refiere a células transformadas que tienen la capacidad de producir polilactato o copolímero de hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)], que contienen un gen que codifica la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC*,

en donde dichas células transformadas se obtienen:

- por transformación de las células que tienen un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC* con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa; o
- por transformación de las células que tienen un gen que codifica la propionil-CoA transferasa con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre *phaC* y *phaRBC*.

Las células o plantas que tienen la capacidad de producir polilactato o copolímeros de hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)] (i) se obtienen por transformación de células o plantas que no tienen un gen que codifica la PHA sintasa con un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA y un gen que codifica una PHA sintasa capaz de utilizar el lactil-CoA de sustrato, o (ii) se obtienen por transformación de células o plantas que tienen un gen que codifica la PHA sintasa que utiliza el lactil-CoA de sustrato con un gen que codifica la enzima que convierte el lactato en lactil-CoA, o (iii) se obtienen por transformación de células o plantas que tienen un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA con un gen que codifica la PHA sintasa capaz de utilizar el lactil-CoA de sustrato, pero no se limita a ello. Por ejemplo, en una célula que tiene uno cualquiera de estos genes (un gen que codifica la PHA sintasa capaz de utilizar el lactil-CoA de sustrato y un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA), el gen amplificado e introducido por transformación con el otro gen también está incluido en el alcance de la presente invención.

En la presente invención, un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA es preferiblemente la propionil-CoA transferasa (*pct*). Las células o plantas de la invención están preferiblemente transformadas con un vector recombinante que contiene el gen *pct*, y que al mismo tiempo están transformadas con un vector que contiene *phaRBC* o *phaRBC* insertado preferiblemente en el cromosoma de las mismas. En este caso, si el lactato, o el hidroxialcanoato y el lactato, se utilizan como fuente de carbono, se pueden preparar polilactato o copolímeros de hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)]. Además, *phaC* es un gen preferido que codifica la PHA sintasa capaz de utilizar el lactil-CoA de sustrato. Las células o plantas de la invención están preferiblemente transformadas con un vector recombinante que contiene el gen *pct*, y que al mismo tiempo están transformadas con un vector que contiene *phaC* o *phaC* está preferiblemente insertado en un cromosoma de las mismas. En este caso, si el ácido graso y el lactato se utilizan como fuente de carbono, es posible preparar un copolímero [poli(3HA-co-lactato)] de 3HA que tiene de tres a doce carbonos y lactato.

Se conocen distintos microorganismos cuyas células contienen un gen que codifica la PHA sintasa (KR 10-250830 B1). Por ejemplo, hay microorganismos, que incluyen microorganismos del género *Achromobacter* que contiene *Achromobacter* sp., *Achromobacter xylosoxidans*, etc., microorganismos del género *Acinetobacter* que contiene *Acidovorax delafieldii*, *Acidovorax facilis*, *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*, etc., microorganismos del género *Aeromonas* que contiene *Actinomyces* sp., *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, etc., microorganismos del género *Alcaligenes* que contiene *Alcaligenes aestus*, *Alcaligenes denitrificans*, *Alcaligenes eutrophus* (después de cambiarle el nombre a *Ralstonia eutropha*, se le volvió a renombrar como *Wautersia eutropha*), *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes pacificus*, *Alcaligenes paradoxus*, *Alcaligenes venustus*, etc., microorganismos del género *Amoebobacter* que contiene *Alteromonas macleodii*, *Amoebobacter roseu*, *Amoebobacter pendens*, etc., microorganismos del género *Azospirillum* que contiene *Aphanocapa* sp., *Aphanothece* sp., *Aquaspirillum autotrophicum*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum* sp., *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, etc., microorganismos del género *Azotobacter* que contiene *Azotobacter* sp., *Azotobacter agilis*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter macrocytogenes*, *Azotobacter vinelandii*, etc., microorganismos del género *Bacillus* que contiene *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, etc., microorganismos del género *Beggiatoa* que contiene *Beggiatoa* sp., *Beggiatoa alba*, etc., microorganismos del género *Beijerinckia* que contiene *Beijerinckia indicus*, *Beijerinckia mobilis*,

etc., microorganismos del género *Beneckea* que contiene *Beneckea natrigens*, *Beneckea pelagia*, etc., microorganismos del género *Caulobacter* que contiene *Bordetella pertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Caryophanon latum*, *Caulobacter bacteroides*, *Caulobacter crescentus*, etc., microorganismos del género *Chlorogloea* que contiene *Chloroflexus aurantiacus*, *Chlorogloea fritschii*, etc., microorganismos del género

5 *Chromatium* que contiene *Chromatium minutissimum*, *Chromatium okenii*, *Chromatium tepidum*, etc., microorganismos del género *Chromobacterium* que contiene *Chromobacterium violaceum*, etc., microorganismos del género *Clostridium* que contiene *Clostridium botulinum*, *Clostridium sphenoides*, etc., microorganismos del género *Comamonas* que contiene *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni*, etc., microorganismos del género *Corynebacterium* que contiene *Corynebacterium autotrophicum*, *Corynebacterium hydrocarboxydans*, etc.,

10 microorganismos del género *Derxia* que contiene *Cyanobacteria*, *Derxia gummosa*, etc., microorganismos del género *Desulfonema* que contiene *Desulfococcus multivorans*, *Desulfonema limicola*, *Desulfonema magnum*, etc., microorganismos del género *Ectothiorhodospira* que contiene *Desulfosacina variabilis*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Ectothiorhodospira halochloris*, *Ectothiorhodospira mobilis*, *Ectothiorhodospira vacuolata*, etc., microorganismos del género *Halobacterium* que contiene *Ferrobacillus ferroxidans*, *Flavobacterium* sp., *Haemophilus influenzae*,

15 *Halobacterium gibbonsii*, *Halobacterium volcanii*, etc., microorganismos del género *Hydrogenophaga* que contiene *Haloferax mediterranei*, *Hydroclathratus clathratus*, *Hydrogenomonas facilis*, *Hydrogenophaga flava*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Hydrogenophaga taeniospiralis*, etc., microorganismos del género *Hyphomicrobium* que contiene *Hyphomicrobium vulgare*, etc., microorganismos del género *Methylbacterium* que contiene *Ilyobacter delafieldii*, *Labrys monachus*, *Lamprocystis reseopersicina*, *Lampropedia hyaline*, *Legionella* sp., *Leptothrix discophorus*, *Methylbacterium* AM1, *Methylbacterium extorquens*, etc., microorganismos del género *Methylosinus* que contiene *Methylococcus thermophilus*, *Methylocystis parvus*, *Methylomonas methanica*, *Methylosinus sporium*, *Methylosinus trichosporium*, etc., microorganismos del género *Micrococcus* que contiene *Methylovibrio soehngeni*, *Micrococcus denitrificans*, *Micrococcus halodenitrificans*, etc., microorganismos del género *Mycobacterium* que contiene *Mycobacterium album*, *Mycobacterium vaccae*, etc., microorganismos del género *Nitrobacter* que contiene

25 *Nitrobacter agilis*, *Nitrobacter winogradskyi*, etc., microorganismos del género *Nocardia* que contiene *Nocardia alba*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia lucida*, *Nocardia rubra*, etc., microorganismos del género *Photobacterium* que contiene *Paracoccus denitrificans*, *Oscillatoria limosa*, *Penicillium cyclopium*, *Photobacterium mandapamensis*, *Photobacterium phosphoreum*, etc., microorganismos del género *Pseudomonas* que contiene *Pysarium ploycephalum* y *Pseudomonas glathei*, *Pseudomonas indigofera*, *Pseudomonas lemonieri*, *Pseudomonas mallei*,

30 *Pseudomonas marina*, *Pseudomonas mixta*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas asplenii*, *Pseudomonas butanovora*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas coronafaciens*, *Pseudomonas dacunhae*, *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas echinoides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas rubrilneas*, *Pseudomonas saccharophila*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas syringae*,

35 *Pseudomonas termophilus*, *Pseudomonas viridiflava*, etc., microorganismos del género *Ralstonia*, microorganismos del género *Rhizobium* que contiene *Rhizobium hedyarum*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium trifoli*, etc., microorganismos del género *Rhodobacillus*, microorganismos del género *Rhodobacter* que contiene *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, etc., microorganismos del género *Rhodococcus* que contiene *Rhodococcus rhodochromus*, etc., microorganismos del género *Rhodocyclus* que contiene

40 *Rhodocyclus gelatinosus*, *Rhodocyclus tenuis*, etc., microorganismos del género *Rhodopseudomonas* que contiene *Rhodomicrobium vannielii* y *Rhodopseudomonas acidophila*, *Rhodopseudomonas capsulata*, etc., microorganismos del género *Rhodospirillum* que contiene *Rhodospirillum molischianum*, *Rhodospirillum rubrum*, etc., microorganismos del género *Spirillum* que contiene *Sphingomonas paucimobilis*, *Spirillum itersomii*, *Spirillum serpens*, etc., microorganismos del género *Spirulina* que contiene *Spirulina jeneri*, *Spirulina maxima*, *Spirulina subsaksa*, etc.,

45 microorganismos del género *Staphylococcus* que contiene *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, etc., microorganismos del género *Stella* que contiene *Stella humosa*, *Stella vacuolata*, etc., microorganismos del género *Streptomyces* que contiene *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces coelicolor*, etc., microorganismos del género *Thiobacillus* que contiene *Syntrophomonas wolfei*, *Thermophilic cyanobacteria*, *Thermus thermophilus*, *Thiobacillus* A2, *Thiobacillus acidophilus*, *Thiobacillus versutus*, etc., microorganismos del

50 género *Thiocapsa* que contiene *Thiocapsa pfennigii*, etc., microorganismos del género *Zoogloea* que contiene *Thiocystis violacea*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Xanthomonas maltophilia*, *Zoogloea ramigera*, etc.

La presente invención, en otro aspecto, se refiere a un procedimiento para preparar polilactato o copolímero de hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)], en donde el procedimiento comprende: cultivar las células

55 en un medio que contiene lactato o lactato y hidroxialcanoato como fuente de carbono; y recuperar el polilactato o el copolímero de hidroxialcanoato-lactato a partir de las células cultivadas o del cultivo de las plantas; y recuperar el polilactato o el copolímero de hidroxialcanoato-lactato de las plantas cultivadas.

En la presente invención, el copolímero de hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)] se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en poli(3HB-co-lactato), poli(4HB-co-lactato), poli(3HP-co-lactato), poli(3HB-co-4HB-co-lactato) y poli(3HP-co-4HB-co-lactato), pero no se limita a ellos. Por ejemplo, en el copolímero de

60 hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)] de acuerdo con la presente invención, el hidroxialcanoato puede ser uno o varios seleccionados del grupo que consiste en 3-hidroxitbutirato, 3-hidroxi valerato, 4-hidroxitbutirato,

ácidos (D)-3-hidroxicarboxílicos de cadena de longitud media (C₆₋₁₄), ácido 3-hidroxiopropiónico, ácido 3-hidroxihexanoico, ácido 3-hidroxiheptanoico, ácido 3-hidroxi octanoico, ácido 3-hidroxi nonanoico, ácido 3-hidroxi decanoico, ácido 3-hidroxi undecanoico, ácido 3-hidroxi dodecanoico, ácido 3-hidroxi tetradecanoico, ácido 3-hidroxi hexadecanoico, ácido 4-hidroxi valérico, ácido 4-hidroxi hexanoico, ácido 4-hidroxi heptanoico, ácido 4-hidroxi octanoico, ácido 4-hidroxi decanoico, ácido 5-hidroxi valérico, ácido 5-hidroxi hexanoico, ácido 6-hidroxi dodecanoico, ácido 3-hidroxi-4-pentenoico, ácido 3-hidroxi-4-*trans*-hexenoico, ácido 3-hidroxi-4-*cis*-hexenoico, ácido 3-hidroxi-5-hexenoico, ácido 3-hidroxi-6-*trans*-octenoico, ácido 3-hidroxi-6-*cis*-octenoico, ácido 3-hidroxi-7-octenoico, ácido 3-hidroxi-8-nonenoico, ácido 3-hidroxi-9-decenoico, ácido 3-hidroxi-5-*cis*-dodecenoico, ácido 3-hidroxi-6-*cis*-dodecenoico, ácido 3-hidroxi-5-*cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-7-*cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-5,8-*cis-cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-4-metilvalérico, ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico, ácido 3-hidroxi-5-metilhexanoico, ácido 3-hidroxi-6-metilheptanoico, ácido 3-hidroxi-4-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-5-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-6-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-7-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-6-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-7-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-8-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-7-metildecanoico, ácido 3-hidroxi-9-metildecanoico, ácido 3-hidroxi-7-metil-6-octenoico, ácido málico, 3-hidroxisuccinato de metilo, 3-hidroxiadipinato de metilo, 3-hidroxisuberato de metilo, 3-hidroxiazelato de metilo, 3-hidroxisebazato de metilo, 3-hidroxisuberato de etilo, 3-hidroxisebazato de etilo, 3-hidroxi pimelato de propilo, 3-hidroxisebazato de bencilo, ácido 3-hidroxi-8-acetooctanoico, ácido 3-hidroxi-9-acetoxinonanoico, ácido fenoxi-3-hidroxi butírico, ácido fenoxi-3-hidroxi valérico, ácido fenoxi-3-hidroxi heptanoico, ácido fenoxi-3-hidroxi octanoico, ácido *para*-cianofenoxi-3-hidroxi butírico, ácido *para*-cianofenoxi-3-hidroxi valérico, ácido *para*-cianofenoxi-3-hidroxi hexanoico, ácido *para*-nitrofenoxi-3-hidroxi hexanoico, ácido 3-hidroxi-5-fenilvalérico, 3-hidroxi-5-ciclohexilbutírico, ácido 3,12-dihidroxi dodecanoico, ácido 3,8-dihidroxi-5-*cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-4,5-epoxidecanoico, ácido 3-hidroxi-6,7-epoxidodecanoico, ácido 3-hidroxi-8,9-epoxi-5,6-*cis*-tetradecanoico, ácido-7-ciano-3-hidroxi heptanoico, ácido 9-ciano-3-hidroxi nonanoico, ácido 3-hidroxi-7-fluoroheptanoico, ácido 3-hidroxi-9-fluorononanoico, ácido 3-hidroxi-6-clorohexanoico, ácido 3-hidroxi-8-clorooctanoico, ácido 3-hidroxi-6-bromohexanoico, ácido 3-hidroxi-8-bromooctanoico, ácido 3-hidroxi-11-bromoundecanoico, ácido 3-hidroxi-2-butenoico, ácido 6-hidroxi-3-dedecenoico, ácido 3-hidroxi-2-metilbutírico, ácido 3-hidroxi-2-metilvalérico y ácido 3-hidroxi-2,6-dimetil-5-heptenoico.

La presente invención, aún en otro aspecto, se refiere a un vector recombinante para preparar polilactato o copolímero de hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)] que contiene un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA y un gen que codifica la PHA sintasa capaz de utilizar el lactil-CoA de sustrato, y células o plantas transformadas con el vector recombinante.

La terminología «vector» significa una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN unida operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de expresar el ADN en un hospedador adecuado. En la presente invención, el vector plasmídico, vector de bacteriófago, vector de cósmido, vector de YAC (cromosoma artificial de la levadura) pueden utilizarse como el vector anterior y es preferible utilizar el vector plasmídico para el propósito de la presente invención. Los vectores plasmídicos típicos que pueden utilizarse para el propósito tienen (a) un origen de replicación de modo que conduce a la replicación eficaz para tener en cada célula hospedadora varios cientos de copias del vector plasmídico (b) un gen de resistencia a antibiótico de modo que se pueda seleccionar una célula hospedadora transformada con un vector plasmídico y (c) una estructura que contiene un sitio de corte de enzima de restricción donde hay que insertar un fragmento de ADN foráneo. Incluso aunque no haya un sitio de corte para la enzima de restricción adecuada, se pueden ligar con facilidad un vector y un ADN foráneo mediante un adaptador oligonucleotídico sintético o un conector de acuerdo con el procedimiento convencional.

Después de la ligación, un vector debe introducirse por transformación en una célula hospedadora adecuada. La célula procarionota o la célula eucariota puede ser una célula hospedadora preferible para la presente invención, más preferiblemente, la célula procarionota. Los microorganismos que no tienen la PHA sintasa antes mencionada como *E. coli*, así como los microorganismos que tienen la PHA sintasa antes mencionada, pueden utilizarse a modo de célula procarionota adecuada. De igual forma, puede utilizarse una *E. coli* transformada con un gen que codifica la PHA sintasa como microorganismo que tiene un gen antes mencionado que codifica la PHA sintasa. Las *E. coli* preferibles incluyen *E. coli* DH5a, *E. coli* JM101, *E. coli* K12, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) y *E. coli* B. Pero también pueden utilizarse las *E. coli* tales como FMB101, NM522, NM538 y NM539 y otras especies y géneros procarionotas. Además de las *E. coli* y los microorganismos antes mencionados que tienen un gen que codifica la PHA sintasa, se pueden utilizar como célula hospedadora una del género *Agrobacterium*, tal como *Agrobacterium* A4, bacilos, tal como *Bacillus subtilis*, enterobacterias, tal como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcescens*. También pueden usarse las células eucariotas hospedadoras universales, tales como levadura, hongos, células de insectos, tal como *Spodoptera frugiperda* (SF9), células de animales, tal como las células CHO y de ratón, células humanas en cultivo de tejidos y células vegetales. Si se introducen por transformación en un hospedador adecuado, un vector puede replicarse y funcionar independientemente de un genoma hospedador, o puede incorporarse en un mismo genoma en varios casos.

Tal y como se sabe de forma general en la técnica, para tener un nivel de expresión elevado de un gen introducido por transformación en una célula hospedadora, el gen debe estar operativamente unido a secuencias reguladoras de transcripción, traducción y expresión que funcionan en un hospedador de expresión concreto. La secuencia de

ciano-3-hidroxiheptanoico, ácido 9-ciano-3-hidroxinonanoico, ácido 3-hidroxi-7-fluoroheptanoico, ácido 3-hidroxi-9-fluorononanoico, ácido 3-hidroxi-6-clorohexanoico, ácido 3-hidroxi-8-clorooctanoico, ácido 3-hidroxi-6-bromohexanoico, ácido 3-hidroxi-8-bromooctanoico, 3-hidroxi-11-bromoundecanoico, ácido 3-hidroxi-2-butenico, ácido 6-hidroxi-3-dodecenoico, ácido 3-hidroxi-2-metilbutírico, ácido 3-hidroxi-2-metilvalérico y ácido 3-hidroxi-2,6-dimetil-5-heptenoico.

En la presente invención, el hidroalcanoato contiene preferiblemente 3HB y 4HB o 3HP y 4HB.

La presente invención, aún en otro aspecto, se da a conocer un copolímero [poli(3HA-co-lactato)] de 3HA que tiene de tres a doce carbonos y lactato.

En la presente invención, el copolímero de 3HA que tiene de tres a doce carbonos y lactato es preferiblemente [poli(3HHx-co-3HO-co-3HD-co-lactato)] o [poli(3HHx-co-3HO-co-3HD-co-3HDD-lactato)].

En la presente invención, después de que un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA (*pct*) se insertara en pTac99A para construir el vector de expresión pTac99Pct (figura 1), el fragmento del gen que contiene el promotor *tac*, el gen *pct*, el terminador de transcripción del vector pTac99Pct, se insertó en pBBRIMCS para construir el vector de expresión recombinante pMCSTacPct (figura 2). Del mismo modo, un gen que codifica la PHA sintasa procedente de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (*phaRBC*) se insertó en el vector p10499A para construir un vector de expresión recombinante p10499BcRBC (figura 3). Además, se amplificó un gen que codifica la PHA sintasa procedente de *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phaC*) y se insertó en el p10499A para construir el vector de expresión recombinante p10499613C2 (figura 4).

Mientras tanto, se sabe bien que se pueden preparar diferentes PHA y sus copolímeros de acuerdo con el tipo de fuente de carbono utilizada (KR 10-250830 B1; Lee, *Biotechnol. Bioeng.* 49: 1, 1996; Steirbchel y Valentin, *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 219, 1995). Todos los hidroxialcanoatos, entre ellos (3-hidroxipropionato (3HP), 4-hidroxibutirato (4HB), 3-hidroxibutirato (3HB), 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxiocetanoato (3HO), 3-hidroxidecanoato (3HD), 3-hidroxidodecanoato (3HDD) etc.) comprenden un monómero de PHA. Es posible preparar PHA que comprende distintos monómeros y distinta proporción de composición molecular. Es decir, de acuerdo con la fuente de carbono utilizada en el cultivo, se pueden preparar el copolímero de hidroxialcanoato-lactato que contiene hidroxialcanoato, tal como 3-hidroxibutirato, 3-hidroxivalerato, 4-hidroxibutirato, ácidos (D)-3-hidroxicarboxílicos de cadena de longitud media (C₆₋₁₄), ácido 3-hidroxipropiónico, ácido 3-hidroxihexanoico, ácido 3-hidroxiheptanoico, ácido 3-hidroxiocetanoico, ácido 3-hidroxinonanoico, ácido 3-hidroxidecanoico, ácido 3-hidroxiundecanoico, ácido 3-hidroxidodecanoico, ácido 3-hidroxitetradecanoico, ácido 3-hidroxihexadecanoico, ácido 4-hidroxivalérico, ácido 4-hidroxihexanoico, ácido 4-hidroxihexanoico, ácido 4-hidroxiheptanoico, ácido 4-hidroxiocetanoico, ácido 4-hidroxidecanoico, ácido 5-hidroxivalérico, ácido 5-hidroxihexanoico, ácido 6-hidroxidodecanoico, ácido 3-hidroxi-4-pentenoico, ácido 3-hidroxi-4-*trans*-hexenoico, ácido 3-hidroxi-4-*cis*-hexenoico, ácido 3-hidroxi-5-hexenoico, ácido 3-hidroxi-6-*trans*-octenoico, ácido 3-hidroxi-6-*cis*-octenoico, ácido 3-hidroxi-7-octenoico, ácido 3-hidroxi-8-nonenoico, ácido 3-hidroxi-9-decenoico, ácido 3-hidroxi-5-*cis*-dodecenoico, ácido 3-hidroxi-6-*cis*-dodecenoico, ácido 3-hidroxi-5-*cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-7-*cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-5,8-*cis-cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-4-metilvalérico, ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico, ácido 3-hidroxi-5-metilhexanoico, ácido 3-hidroxi-6-metilheptanoico, ácido 3-hidroxi-4-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-5-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-6-metiloctanoico, ácido 3-hidroxi-7-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-6-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-7-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-8-metilnonanoico, ácido 3-hidroxi-7-metildecanoico, ácido 3-hidroxi-9-metildecanoico, ácido 3-hidroxi-7-metil-6-octenoico, ácido málico, 3-hidroxisuccinato de metilo, 3-hidroxiadipinato de metilo, 3-hidroxisuberato de metilo, 3-hidroxiazelato de metilo, 3-hidroxisebazato de metilo, 3-hidroxisuberato de etilo, 3-hidroxisebazato de etilo, 3-hidroxipimelato de propilo, 3-hidroxisebazato de bencilo, ácido 3-hidroxi-8-acetoxioctanoico, ácido 3-hidroxi-9-acetoxinonanoico, ácido fenoxi-3-hidroxibutírico, ácido fenoxi-3-hidroxivalérico, ácido fenoxi-3-hidroxihexanoico, ácido fenoxi-3-hidroxiocetanoico, ácido *para*-cianofenoxi-3-hidroxibutírico, ácido *para*-cianofenoxi-3-hidroxivalérico, ácido *para*-cianofenoxi-3-hidroxihexanoico, ácido *para*-nitrofenoxi-3-hidroxihexanoico, ácido 3-hidroxi-5-fenilvalérico, ácido 3-hidroxi-5-ciclohexilbutírico, ácido 3,12-dihidroxidodecanoico, ácido 3,8-dihidroxi-5-*cis*-tetradecenoico, ácido 3-hidroxi-4,5-epoxidodecanoico, ácido 3-hidroxi-6,7-epoxidodecanoico, ácido 3-hidroxi-8,9-epoxi-5,6-*cis*-tetradecenoico, ácido 7-ciano-3-hidroxiheptanoico, ácido 9-ciano-3-hidroxinonanoico, ácido 3-hidroxi-7-fluoroheptanoico, ácido 3-hidroxi-9-fluorononanoico, ácido 3-hidroxi-6-clorohexanoico, ácido 3-hidroxi-8-clorooctanoico, ácido 3-hidroxi-6-bromohexanoico, ácido 3-hidroxi-8-bromooctanoico, ácido 3-hidroxi-11-bromoundecanoico, ácido 3-hidroxi-2-butenico, ácido 6-hidroxi-3-dodecenoico, ácido 3-hidroxi-2-metilbutírico, ácido 3-hidroxi-2-metilvalérico y ácido 3-hidroxi-2,6-dimetil-5-heptenoico. De igual forma se pueden preparar copolímeros que comprenden hidroxialcanoato que tienen enlaces dobles o triples como monómero además de los compuestos con enlaces simples anteriores. Por consiguiente, «hidroxialcanoato» tal y como se utiliza en la presente invención se define para que incluya hidroxialcanoato que tiene un doble enlace o un triple enlace además del compuesto anterior con enlace simple.

Por consiguiente, en caso de utilizar células o plantas transformadas con los vectores recombinantes de la presente invención, se pueden preparar copolímeros [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)] de lactato y diferentes hidroxialcanoatos así como PLA (figura 5 a figura 8).

En el caso en el cual la *Ralstonia eutropha* NCIMB11599 que contiene un gen que codifica la PHA sintasa que usa el lactil-CoA como sustrato se transforma con un plásmido que contiene la propionil-CoA transferasa (*pct*) para obtener una *Ralstonia eutropha* recombinante y la *Ralstonia eutropha* recombinante se cultiva en un medio que contiene lactato o lactato y distintas fuentes de carbono, se pueden preparar distintas combinaciones de copolímeros. Por ejemplo, cuando la *Ralstonia eutropha* recombinante anterior se cultiva en un medio de producción que contiene lactato, se puede preparar poli(3HB-co-lactato) (figura 5). De igual forma, cuando la *Ralstonia eutropha* recombinante anterior se cultiva en un medio de producción que contiene 3HB, 4HB y lactato, se puede preparar poli(3HB-co-4HB-co-lactato) (figura 6).

En el caso en el cual una *E. coli* recombinante transformada con un vector recombinante que contiene *phaRBC* procedente de *Bacillus cereus* (ATCC 14579) y un vector recombinante que contiene *pct* (o una *E. coli* recombinante transformada con un vector recombinante que contiene tanto *phaRBC* como *pct*) se cultiva en un medio de producción complementado con lactato, se puede preparar el polilactato (figura 7). De igual forma, en el caso en el cual la *E. coli* recombinante anterior se cultiva en un medio complementado con lactato y diferentes fuentes de carbono, se pueden preparar diferentes combinaciones de copolímeros.

Mientras tanto se confirmó en KR 10-0447531B1 que en el caso en el cual una *E. coli* WB101 recombinante transformada con p10499613C2 se cultivó en medios con ácido decenoico y ácido dodecenoico, respectivamente, se preparó un copolímero que contenía 3HHx, 3HO y 3HD y un copolímero que contenía 3HHx, 3HO, 3HD y 3HDD. Por consiguiente, en el caso en el cual una *E. coli* recombinante transformada con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la PHA sintasa (*phaC*) procedente de *Pseudomonas* sp. 61-3 y un vector recombinante que contiene *pct* (o una *E. coli* recombinante transformada con un vector recombinante que contiene tanto *phaC* como *pct*) se cultivan en un medio de producción que contiene lactato y ácido graso, se puede preparar un copolímero [poli(3HA-co-lactato)] que contiene monómeros (C₃₋₁₂) de MCL-PHA y lactato (figura 8). Por ejemplo, en el caso en el cual la *E. coli* recombinante se cultiva en medios que contienen lactato y ácido decenoico, respectivamente, se puede preparar [poli(3HHx-co-3HO-co-3HD-co-lactato)], y en el caso en el cual la *E. coli* recombinante se cultiva en medios que contienen lactato y ácido dodecenoico, respectivamente, se puede preparar [poli(3HHx-co-3HO-co-3HD-co-3HDD-lactato)].

Los medios utilizados para preparar el polilactato biológico y su copolímero no están limitados específicamente en cuanto a que no se obstaculiza el propósito de la presente invención. En la presente invención se utilizó un medio complejo, el medio de Luria-Bertani (LB), cuando se cultivó la *E. coli* recombinante, y se utilizó un medio básico, el medio MR con poco N, cuando se cultivó la *Ralstonia eutropha* recombinante.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle mediante ejemplos específicos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos, y es obvio para los expertos en el campo de la presente invención que se podrían realizar numerosas variaciones o modificaciones dentro del espíritu y alcance de la presente invención.

Aunque se utilizó *pct* como gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA para proporcionar el sustrato de la PHA polimerasa, el lactil-CoA en los ejemplos que vienen a continuación, es obvio para los expertos en la técnica de la presente invención que una transferasa procedente de otros microorganismos puede dar lugar al mismo resultado.

De igual forma, aunque los ejemplos que vienen a continuación se ilustran con el *phaC* procedente de *Pseudomonas* sp. 61-3 y el *phaRBC* procedente de *Bacillus cereus* (ATCC 14579) como gen que codifica la PHA sintasa capaz de utilizar el lactil-CoA de sustrato, es obvio para los expertos en la técnica de la presente invención que se puede obtener el mismo resultado cuando se utiliza una PHA sintasa que tiene una especificidad de sustrato similar procedente de distintas clases de microorganismos, tales como *Wautersia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Sinorhizobium meliloti*, *Bacillus megaterium*, *Chromatium vinosum*, etc.

De igual forma, aunque los ejemplos que vienen a continuación se ilustran con *E. coli* y *Ralstonia eutropha* como microorganismos que no tienen un gen que codifica la PHA sintasa y microorganismos que tienen un gen que codifica la PHA sintasa, respectivamente, es obvio para los expertos en la técnica de la presente invención que se puede obtener el mismo resultado cuando se utilizan otras clases de células (bacterias, levadura, hongos, células de animales, células vegetales) y plantas.

Ejemplo 1: construcción del vector recombinante que contiene *pct*

Los cebadores que tienen las secuencias básicas de SEQ ID n.º 1 y 2 se sintetizaron basándose en la secuencia del gen *pct* (Selmer et al., *Eur. J. Biochem.*, 269: 372, 2002) para la clonación por PCR de *pct*:

SEQ ID n.º 1: 5'- **ggaattc**ATGAGAAAGGTTCCCAATTATTACCGCAGATGA

SEQ ID n.º 2: 5'-**gctctagattaggactcatttccttcagaccattaagcctctcg**

Para amplificar *pct* se llevó a cabo la PCR con el ADN del cromosoma de *Clostridium propionicum* como plantilla y los cebadores anteriores de SEQ ID n.º 1 y 2. Se realizó la PCR en la condición de 30 ciclos (50 s de desnaturalización a 94 °C, 50 s de hibridación a 52 °C, extensión de 2 min a 72 °C). Como resultado de examinar el producto de la reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, se observó un fragmento de gen de 1,5 kb que correspondía a *pct*. A continuación, el vector pTac99A (Park y Lee, *J. Bacteriol.*, 185: 5391, 2003) se digirió con las enzimas *EcoRI/XbaI*, se preparó el vector de expresión recombinante pTac99Pct por inserción de *pct* en el sitio de reconocimiento de *EcoRI/XbaI* de pTac99A (figura 1). De igual forma se preparó pMCSTacPct por inserción de un fragmento de gen obtenido al digerir pTac99Pct con *BamHI/Scal* en pBRR1MCS (Kovach et al., *Gene*, 166: 175, 1995) digerido con *BamHI/EcoRV* (figura 2).

Ejemplo 2: construcción del vector recombinante que contiene un gen que codifica la PHA sintasa

Para amplificar el operón *phaRBC* se llevó a cabo la PCR con el ADN del cromosoma de *Bacillus cereus* como plantilla y los cebadores de SEQ ID n.º 3 y 4. La PCR se realizó con la condición de 30 ciclos (50 s de desnaturalización a 94 °C, 50 s de hibridación a 52 °C, extensión de 2 min a 72 °C),

15 SEQ ID n.º 3: 5'-**ggaattcatgaattgtttcaaaaacga**

SEQ ID n.º 4: 5'-**cgggatcctaattagaacgctcttcaa**

Como resultado de examinar el producto de la reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, se observó un fragmento de gen de 2,5 kb que corresponde a *phaRBC*. Después de que el vector p10499A (KR 10-0447531B1) se digiriese con las enzimas *EcoRI/BamHI*, el vector de expresión recombinante p10499BcRBC se preparó por la inserción de *phaRBC* en el sitio de reconocimiento de *EcoRI/BamHI* de p10499A (figura 3).

De igual forma se amplificó un gen que codifica la PHA polimerasa (*phaC*) procedente de *Pseudomonas* sp. 61-3 y se insertó en el p10499A para preparar el vector de expresión recombinante p10499613C2 (KR 10-0447531B1) (figura 4).

25 Ejemplo 3: Construcción de *Ralstonia eutropha* recombinante y preparación del copolímero de hidroalcanoato-lactato mediante su uso

Después de construir la *Ralstonia eutropha* recombinante (pMCSTacPct) mediante la introducción del pMCSTacPct preparado en el ejemplo 1 en *Ralstonia eutropha* NCIMB11599, se llevó a cabo un cultivo de dos etapas. Después de que la *Ralstonia eutropha* recombinante se cultivase en medio NB (caldo nutritivo; 5 g/l de peptona, 3 g/l de extracto de ternera) durante una noche, las cepas recuperadas por centrifugación se cultivaron durante 3 días en un medio MR con poco N que contiene 2 g/l de lactato. La composición del medio MR con poco N fue la siguiente: 6,67 g de KH_2PO_4 , 4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,8 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,8 g de ácido cítrico y 5 ml de la solución de metales traza. Solución de metales traza (por litro): 5 ml de HCl a 5 M, 10 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g de CaCl_2 , 2,2 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0,02 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

35 Después de recuperar las cepas por centrifugación, y liofilizarlas, la sustancia de polímero acumulada en las cepas se recuperó con cloroformo. Como resultado del análisis de RMN sobre el polímero recuperado, se confirmó que la sustancia de polímero recuperada más arriba era el copolímero poli(3HB-co-lactato) como se muestra en la figura 9 y en la figura 10.

Ejemplo 4: Construcción de la *E. coli* recombinante y preparación del copolímero de polilactato e hidroxialcanoato-lactato mediante su uso

40 Se construyó la *E. coli* recombinante mediante la introducción del pMCSTacPct preparado en el ejemplo 1 y del p10499BcRBC preparado en el ejemplo 2 en *E. coli* XL1-Blue, y se cultivó durante 4 días en medio LB que contenía 2 g/l de lactato, y luego se centrifugó para recuperar las cepas. Las cepas recuperadas se liofilizaron para recuperar con cloroformo la sustancia de polímero acumulada en las cepas. Como resultado del análisis de RMN sobre el polímero recuperado, se confirmó que la sustancia de polímero obtenida más arriba era polilactato (figura 11).

45 Del mismo modo, se construyó una *E. coli* recombinante mediante la introducción del pMCSTacPct preparado en el ejemplo 1 y del p10499613C2 producido en el ejemplo 2 en *E. coli* WB101 [W3110(*fadB::Km*)]. La WB101 es una cepa que se ha identificado que es eficaz para producir MCL-PHA como *E. coli* mutante de *fadB* (KR 10-0447531B1). La *E. coli* WB101 recombinante se cultivó durante 4 días en medio LB que contenía 2 g/l de lactato y 2 g/l de ácido decenoico, respectivamente, y se centrifugó para recuperar las cepas. Las cepas recuperadas se liofilizaron para recuperar con cloroformo la sustancia de polímero acumulada en las cepas. Como resultado del análisis de RMN sobre la sustancia de polímero obtenida, se confirmó que el polímero recuperado más arriba era el copolímero [poli(3HHx-co-3HO-co-3HD-co-lactato)].

Aplicabilidad industrial

Tal y como se describe más arriba en detalle, la presente invención tiene por efecto dar a conocer células o plantas que expresan un gen que codifica una enzima que convierte el lactato en lactil-CoA y un gen que codifica la PHA sintasa capaz de utilizar el lactil-CoA de sustrato, y un procedimiento para preparar el polilactato o el copolímero de hidroxialcanoato-lactato mediante su uso. De acuerdo con la presente invención, el polilactato puede prepararse con células o plantas y también pueden prepararse diferentes clases de poliésteres que contienen lactato y diferentes hidroxialcanoatos de monómero.

<110> LG CHEM, LTD.

10 KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Células o plantas que tienen una capacidad productora de polilactato o sus copolímeros, y procedimiento para la preparación de polilactato o sus copolímeros mediante su uso

<130> PP-B0253

15 <150> KR 10-2005-0043798

<151> 2005-05-24

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

20

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> cebador

<400> 1

30 ggaattcatg agaaagggtc ccattattac cgcagatga

39

<210> 2

<211> 46

<212> DNA

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

gctctagatt aggactcat ttcctcaga cccattaagc cttctg 46

5 <210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> cebador

<400> 3

ggaattcatg aattgttca aaaacga 27

15

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> cebador

<400> 4

25 cgggatcctt aattagaacg ctctcaa 28

REIVINDICACIONES

1. Células transformadas que tienen la capacidad de producir polilactato o copolímero de hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)], que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre phaC y phaRBC,
- 5 en donde dichas células transformadas se obtienen por transformación de células que no tienen un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre phaC y phaRBC con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre phaC y phaRBC.
2. Células transformadas que tienen la capacidad de producir polilactato o copolímero de hidroxialcanoato-lactato [poli(hidroxialcanoato-co-lactato)], que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre phaC y phaRBC,
- 10 en donde dichas células transformadas se obtienen:
- por transformación de las células que tienen un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre phaC y phaRBC con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la propionil-CoA transferasa; o
 - 15 – por transformación de las células que tienen un gen que codifica la propionil-CoA transferasa con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre phaC y phaRBC.
3. Células transformadas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células están transformadas con un vector recombinante que contiene la propionil-CoA transferasa, al mismo tiempo que está transformada con un vector que contiene phaC o phaRBC, o phaC o phaRBC están insertados en el cromosoma de las mismas.
- 20 4. Células transformadas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células que no tienen un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos es *E. coli*.
5. Células transformadas de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichas células que tienen un gen que codifica la propionil-CoA transferasa se amplifican con dicho gen.
- 25 6. Células transformadas de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichas células que tienen un gen que codifica la propionil-CoA transferasa son de *Clostridium propionicum*.
7. Procedimiento para preparar polilactato o copolímero de poli(3HB-co-lactato), en donde el procedimiento comprende: cultivar las células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un medio que contiene lactato, o lactato y diferentes tipos de hidroxialcanoato como fuente de carbono; y recuperar el polilactato o el copolímero de poli(3HB-co-lactato) de las células cultivadas.
- 30 8. Procedimiento para preparar un copolímero [poli(3HHx-co-3HO-co-3HD-co-lactato)] y lactato, en donde el procedimiento comprende: cultivar las células de la reivindicación 1 en un medio que contiene lactato y ácido graso como fuentes de carbono; y recuperar el copolímero [poli(3HHx-co-3HO-co-3HD-co-lactato)] y lactato a partir de las células cultivadas, en donde dicho ácido graso es ácido decenoico.
- 35 9. Vector recombinante que contiene un gen que codifica el gen de la propionil-CoA transferasa y un gen que codifica la sintasa de polihidroxialcanoatos seleccionada entre phaC y phaRBC.
10. Vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, en donde phaC procede de *Pseudomonas sp.*
11. Células transformadas con el vector recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10.
- 40 12. Procedimiento para preparar polilactato o copolímero de poli(3HB-co-lactato), en donde el procedimiento comprende: cultivar las células transformadas de acuerdo con la reivindicación 11 en un medio que contiene lactato o lactato y diferentes tipos de hidroxialcanoatos como fuente de carbono; y recuperar el polilactato o el copolímero de poli(3HB-co-lactato) de las células cultivadas.

FIG. 1

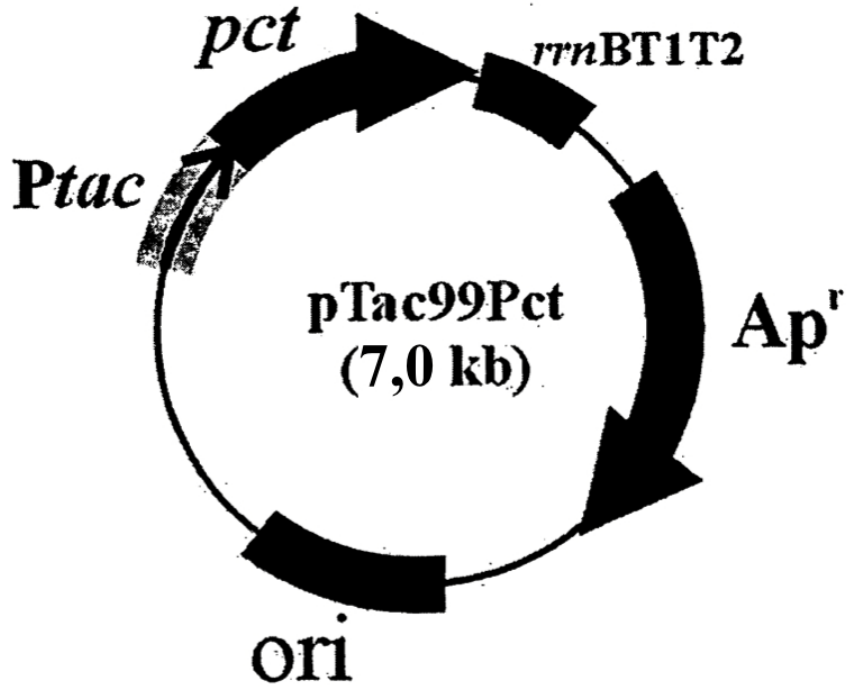


FIG. 2

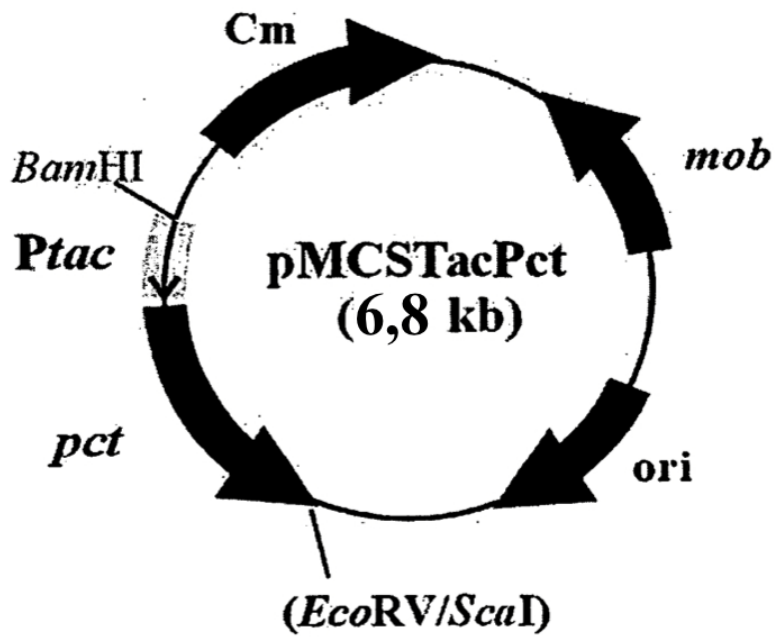


FIG. 3

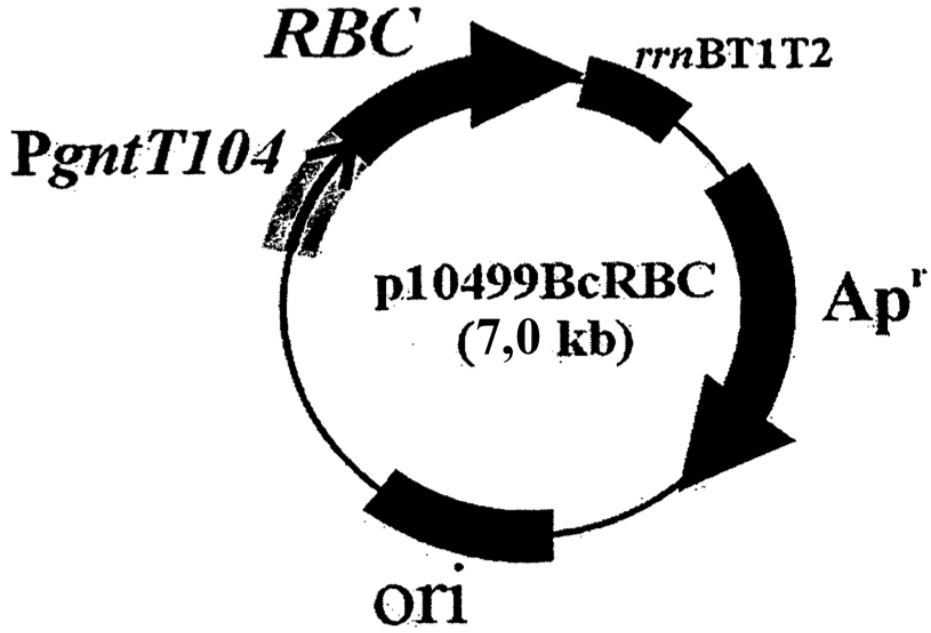


FIG. 4

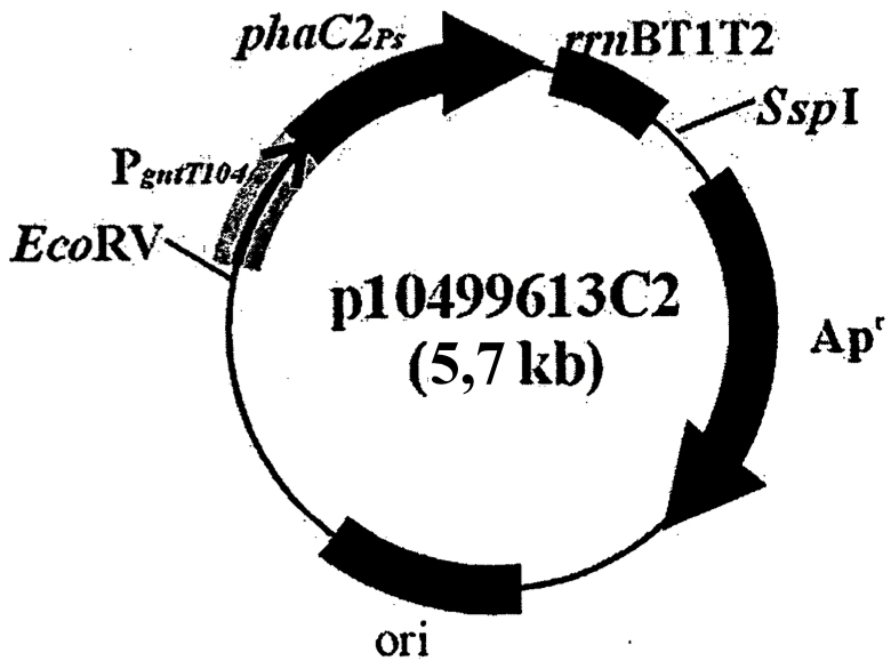


FIG. 5

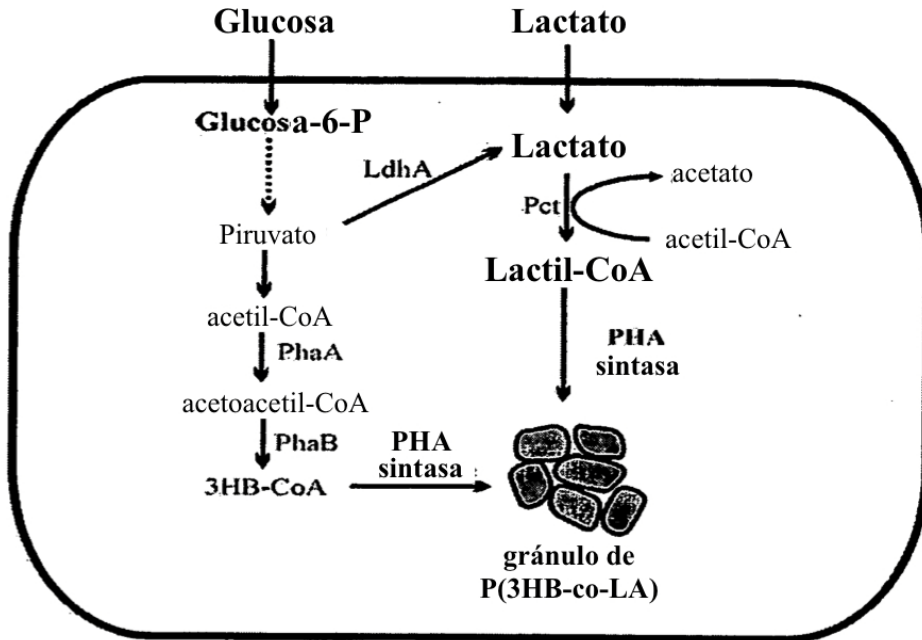


FIG. 6

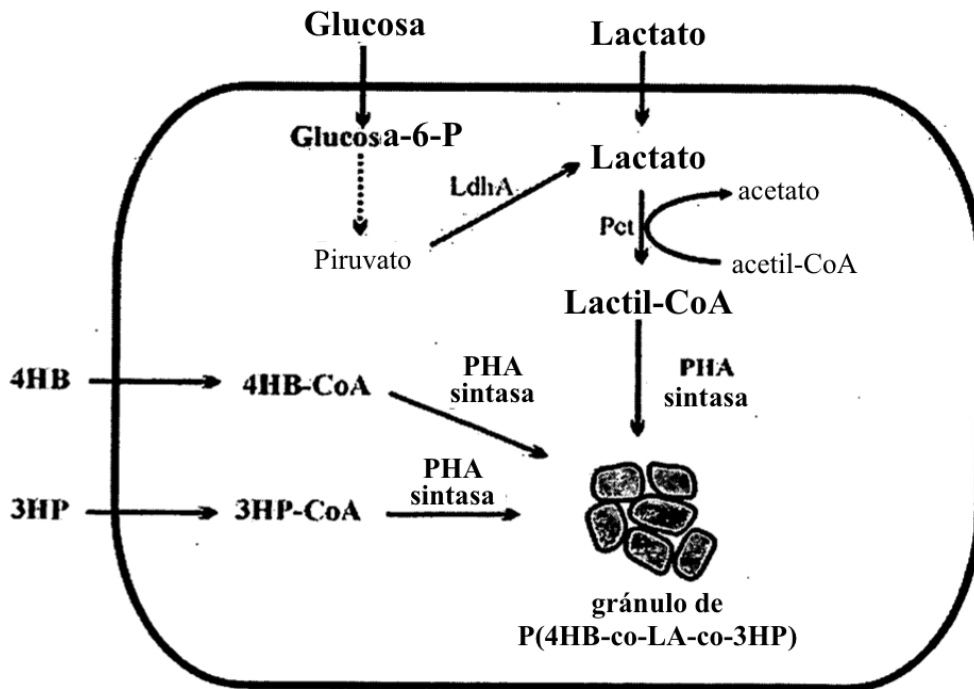


FIG. 7

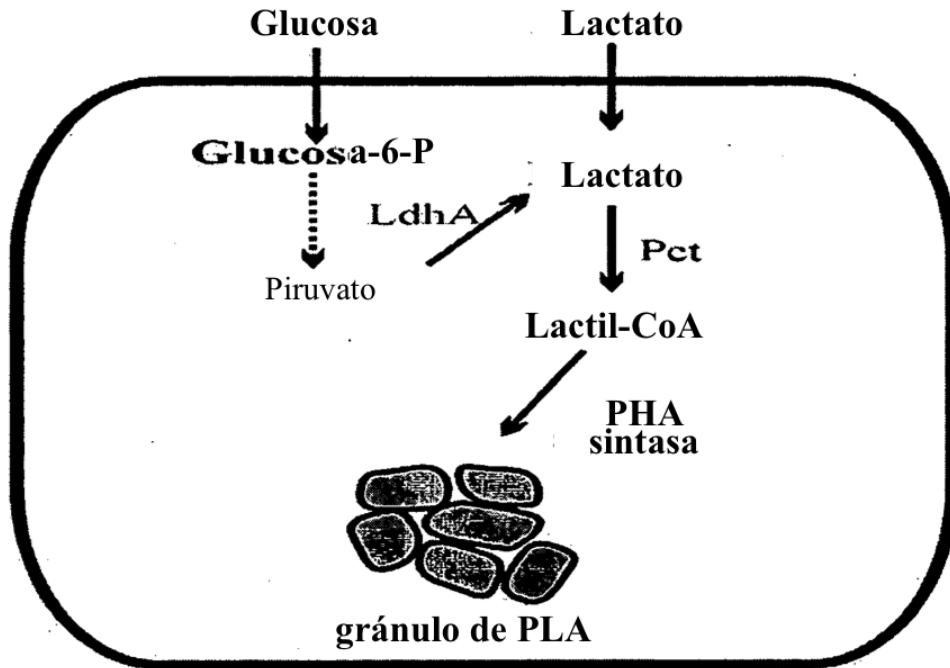


FIG. 8

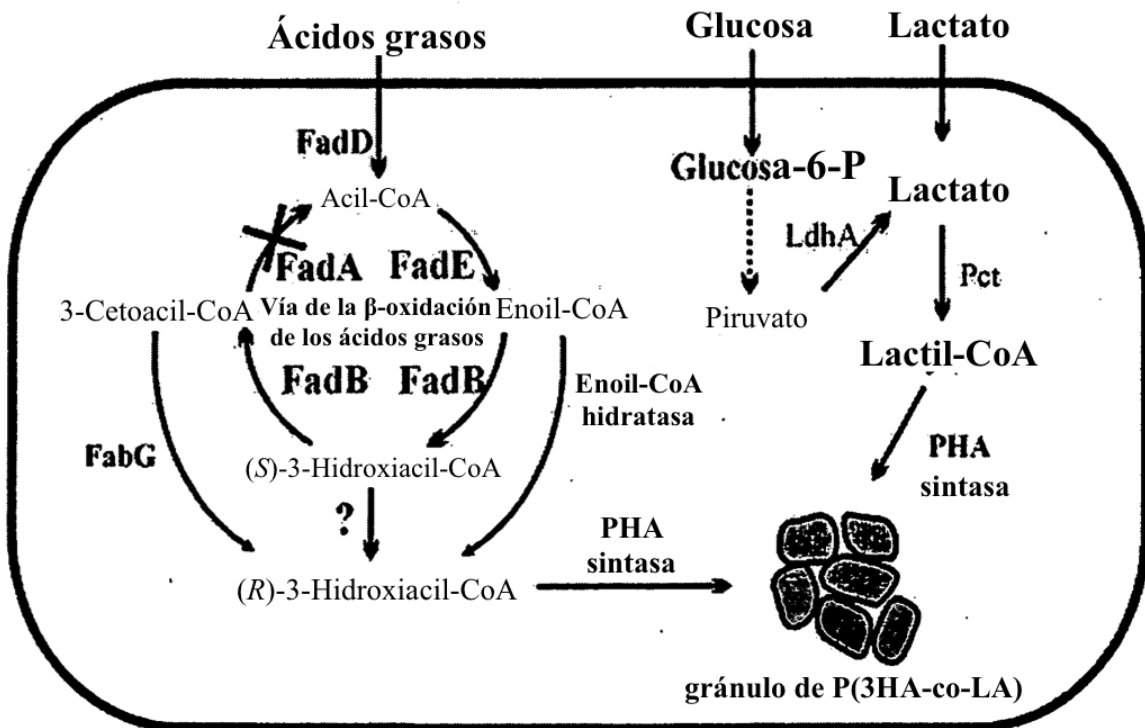


FIG. 9

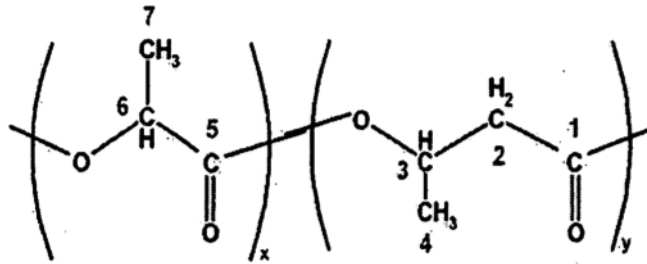
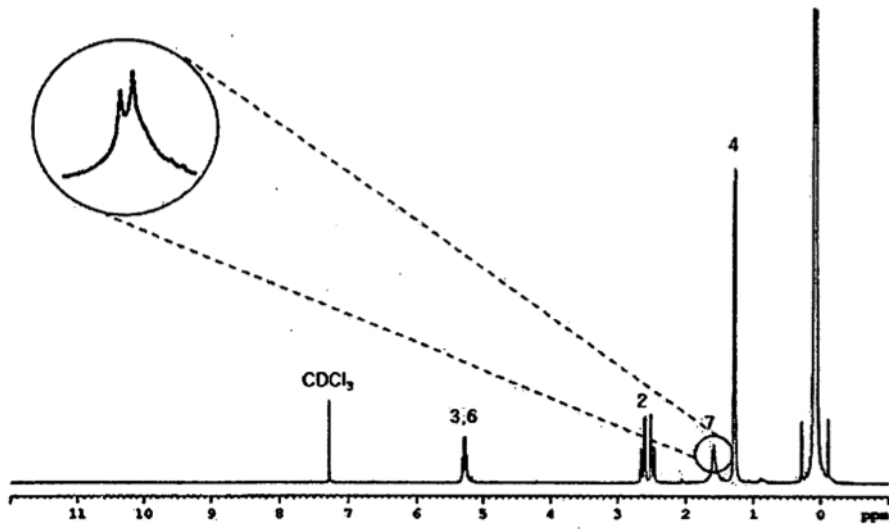


FIG. 10

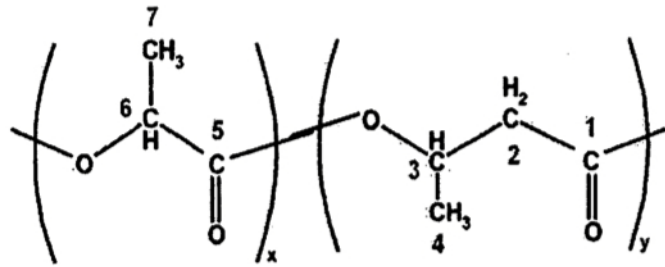
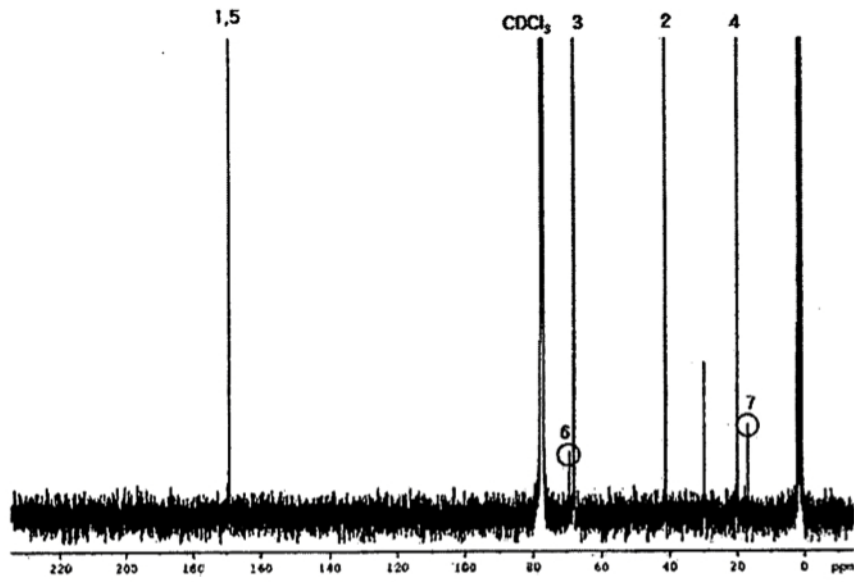


FIG. 11

