

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 382**

51 Int. Cl.:

C07C 57/04 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C08F 220/06 (2006.01)

C07C 69/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 08760294 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2152659**

54 Título: **Un procedimiento para la preparación de ácido metacrílico o ésteres del ácido metacrílico**

30 Prioridad:

01.06.2007 WO PCT/EP2007/055394

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

11.09.2013

73 Titular/es:

**EVONIK RÖHM GMBH (100.0%)
KIRSCHENALLEE 45
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**MARX, ACHIM;
PÖTTER, MARKUS;
BUCHHOLZ, STEFAN;
MAY, ALEXANDER;
SIEGERT, HERMANN;
ALBER, BIRGIT;
FUCHS, GEORG y
EGGELING, LOTHAR**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 422 382 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

Un procedimiento para la preparación de ácido metacrílico o ésteres del ácido metacrílico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ácido metacrílico o ésteres del ácido metacrílico, así como a un procedimiento para la preparación de ácido polimetacrílico o ésteres del ácido polimetacrílico.

10 El ácido metacrílico es un importante producto intermedio que encuentra aplicación, en particular, en forma de sus ésteres alquílicos para la preparación de polímeros. Un derivado del ácido metacrílico conocido es, por ejemplo, el éster metílico del ácido metacrílico. Actualmente, la producción anual mundial de ésteres metílicos del ácido metacrílico asciende a aprox. 1,5 millones de toneladas. Los ésteres del ácido polimetacrílico son materias primas empleables de manera variada en el sector de los materiales sintéticos.

15 La producción comercial de ácido metacrílico tiene lugar, habitualmente, mediante oxidación en fase gaseosa heterogénea, catalizada en dos etapas, de compuestos de carbono C₄ tales como butileno, isobutileno, butano, isobutano, alcohol t-butílico o metacroleína a masas de óxidos de múltiples metales sólidas como catalizador. La mezcla gaseosa de producto obtenida con ello, la cual contiene, junto al ácido metacrílico, además numerosos productos secundarios, es sometida a continuación a una condensación total obteniéndose una disolución acuosa
20 de ácido metacrílico, o es absorbida en una mezcla de disolventes adecuada. Después, le sigue habitualmente una purificación ulterior de las fases líquidas así obtenidas mediante destilación, cristalización, extracción o mediante una combinación de estas medidas. Junto a la oxidación en fase gaseosa catalítica de compuestos de carbono C₄, el ácido metacrílico puede formarse también mediante una deshidrogenación catalítica oxidativa a partir de ácido isobutírico, tal como se describe, por ejemplo, en el documento EP-A-0 356 315. Otra posibilidad para la
25 preparación de ácido metacrílico la ofrece el denominado "Proceso ACH", el que acetocianhidrina y ácido sulfúrico se hacen reaccionar bajo la formación de metacrilamida como producto intermedio, la cual se hace reaccionar luego posteriormente con agua para formar ácido metacrílico. A continuación, tiene lugar una purificación por destilación del ácido metacrílico así obtenido. Este procedimiento se describe, por ejemplo, en el documento EP-A-
30 1 359 137.

El documento EP1186592 describe un procedimiento para la producción de metacrilatos en el que ácido α -hidroxiisobutírico reacciona con un alcohol en presencia de un catalizador sólido. Por el contrario, el documento US 3.562.320 muestra la producción de ácido metacrílico en un procedimiento en el que el ácido α -hidroxiisobutírico es deshidrogenado bajo la influencia de calor y un catalizador de sal metálica.

35 El inconveniente de estos procedimientos habituales para la preparación de ácido metacrílico estriba, entre otros, en que tanto en la preparación del ácido metacrílico propiamente dicho como también en las siguientes etapas de purificación por destilación se produce, en virtud de la elevada tendencia a la polimerización del ácido metacrílico por parte de las etapas de procedimiento térmicamente lastrantes, una formación de dímeros u oligómeros lo cual está ligado, junto a la complejidad de purificación adicional, también con una pérdida de rendimiento.

La presente invención tuvo por misión superar los inconvenientes que resultan del estado conocido de la técnica.

45 En particular, la presente invención tuvo por misión indicar un procedimiento para la preparación de ácido metacrílico, en el que el ácido metacrílico se pueda obtener con el menor número posible de etapas térmicamente lastrantes.

También, este procedimiento debía hacer posible preparar el ácido metacrílico a partir de materias primas renovables, en particular a partir de hidratos de carbono y/o a partir de glicerol.

50 Una contribución a la solución de los problemas precedentemente mencionados la ofrece un procedimiento para la preparación de ácido metacrílico o ésteres del ácido metacrílico, que comprende las etapas de procedimiento

55 IA) preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico mediante un procedimiento que comprende la etapa de procedimiento de la puesta en contacto de una célula que fue modificada por tecnología genética con respecto a su tipo salvaje, de modo que, en comparación con su tipo salvaje, es capaz de formar más ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxialcanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico, con un medio nutritivo que contiene como fuente de carbono hidratos de carbono, glicerol, dióxido de carbono, metano, metanol, L-valina o L-glutamato, bajo condiciones en las que a partir de la fuente de carbono se forman
60 ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxialcanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico, eventual

purificación del ácido 3-hidroxiisobutírico a partir del medio nutritivo, así como, eventualmente, neutralización del ácido 3-hidroxiisobutírico, teniendo lugar la formación del ácido 3-hidroxiisobutírico o de los polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico preferiblemente a través de metilmalonato-semialdehído o a través de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como producto previo;

- 5
IB) deshidratación del ácido 3-hidroxiisobutírico bajo formación de ácido metacrílico, así como, eventualmente, esterificación del ácido metacrílico.

10 En la medida en que la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tenga lugar a través de metilmalonato-semialdehído como producto previo, se prefiere, además, que la formación tenga lugar a través de succinil-coenzima A, propionil-coenzima A o acrilil-coenzima A, de manera particularmente preferida a través de succinil-coenzima A como producto intermedio adicional. En la medida en que la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tenga lugar a través de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como producto previo, se prefiere, además, que la formación tenga lugar a través de isobutiril-coenzima A o a través de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A, preferiblemente a través de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como otro producto intermedio.

15 La expresión "producto previo", tal como se utiliza en esta memoria, define un compuesto químico el cual puede hacerse reaccionar en sólo una única etapa de reacción y por vía enzimática para formar ácido 3-hidroxiisobutírico, mientras que la expresión "producto intermedio" define un compuesto químico que no puede hacerse reaccionar en sólo una etapa de reacción por vía enzimática para formar ácido 3-hidroxiisobutírico.

20 La expresión "ácido 3-hidroxiisobutírico", tal como se utiliza en esta memoria, describe siempre el correspondiente ácido carboxílico C₄ en la forma en la que se presenta después de la formación mediante los correspondientes microorganismos en función del valor del pH. La expresión comprende, por consiguiente, siempre la forma de ácido pura (ácido 3-hidroxiisobutírico), la forma de base pura (3-hidroxiisobutirato) así como mezclas a base de la forma protonada y desprotonada del ácido. Además, la expresión "ácido 3-hidroxiisobutírico" comprende básicamente tanto el estereoisómero (R) como también el estereoisómero (S), siendo particularmente preferido el estereoisómero (S).

25 La formulación "de que es capaz de formar más ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico en comparación con su tipo salvaje" se refiere también al caso de que el tipo salvaje de la célula modificada por tecnología genética no sea capaz de formar en absoluto ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico, pero al menos cantidades detectables algunas de estos compuestos, y sólo puedan formarse cantidades detectables de estos componentes después de la modificación por tecnología genética.

30 Por un "tipo salvaje" de una célula se designa preferiblemente una célula, cuyo genoma se presenta en un estado tal como resulte de forma natural a través de la evolución. La expresión se utiliza tanto para la célula completa como también para genes individuales. Bajo la expresión "tipo salvaje" caen, por lo tanto, en particular no aquellas células o bien aquellos genes cuyas secuencias génicas hayan sido modificadas, al menos en parte, por el hombre mediante procedimientos recombinantes.

35 A partir del ácido 3-hidroxiisobutírico se obtiene a continuación ácido metacrílico mediante una reacción de deshidratación moderada. En el caso de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico pueden aislarse las vesículas contenidas en las células, que están llenas de estos polihidroxicanoatos, y a continuación disociarse los polímeros, obteniéndose ácido 3-hidroxiisobutírico que luego puede ser deshidratado, obteniéndose ácido metacrílico.

40 En este caso, se prefiere, de acuerdo con la invención que la célula modificada por tecnología genética y empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención sea modificada por tecnología genética de modo que en un intervalo de tiempo definido, preferiblemente en el espacio de 2 horas, todavía más preferiblemente en el espacio de 8 horas y lo más preferiblemente en el espacio de 24 horas, forme al menos 2 veces, de manera particularmente preferida al menos 10 veces, de manera más preferida al menos 100 veces, todavía de manera más preferida al menos 1.000 veces, y de la manera más preferida al menos 10.000 veces más ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico que el tipo salvaje de la célula. El aumento de la formación de productos puede determinarse en tal caso, por ejemplo, debido a que la célula empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención y la célula de tipo salvaje sean cultivadas en cada caso por separado y bajo las mismas condiciones (misma densidad celular, mismo medio nutritivo, mismas condiciones de cultivo) durante un intervalo de tiempo determinado en un medio nutritivo adecuado y, a continuación, se

determina la cantidad de producto diana (ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico) en el medio nutritivo.

5 Las células empleadas en el procedimiento de acuerdo con la invención pueden ser procariontas o eucariotas. En este caso, se puede tratar de células de mamíferos (tales como, por ejemplo, células de seres humanos), de células vegetales o de microorganismos tales como levaduras, hongos o bacterias, siendo particularmente preferidos microorganismos y siendo lo más preferido bacterias y levaduras.

10 En calidad de bacterias, levaduras u hongos son particularmente adecuados aquellas bacterias, levaduras u hongos que hayan sido depositados en la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Braunschweig, Alemania, como cepas de bacterias, levaduras u hongos.

15 Bacterias adecuadas de acuerdo con la invención pertenecen a los géneros que están recogidos en

<http://www.dsmz.de/species/bacteria.htm>

levaduras adecuadas de acuerdo con la invención pertenecen a aquellos géneros que están recogidos bajo

20 <http://www.dsmz.de/species/yeasts.htm>

y hongos adecuados de acuerdo con la invención son aquellos que están recogidos bajo

25 <http://www.dsmz.de/species/fungi.htm>

De manera particularmente preferida, de acuerdo con la invención se emplean células de los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Escherichia*, *Zymomonas*, *Yarrowia*, *Methylobacterium*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Clostridium*, empleándose de manera más preferida *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, *Candida blankii*, *Candida rugosa*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Zymomonas mobilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Methylobacterium extorquens*, *Ralstonia eutropha*, en particular *Ralstonia eutropha H16*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus versutus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* o *Pichia pastoris*.

35 Conforme a una primera variante del procedimiento de acuerdo con la invención se emplea una célula en la que la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar a través de metilmalonato-semialdehído como producto previo.

40 Conforme a una primera forma de realización particular de esta primera variante del procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere que la formación del ácido 3-hidroxiisobutírico o del polihidroxicanoato basado en ácido 3-hidroxiisobutírico tenga lugar preferiblemente a través de succinil-coenzima A como producto intermedio, en donde la célula modificada por tecnología genética y empleada en esta forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención es capaz de aprovechar como fuente de carbono a hidratos de carbono, glicerol o glutamato.

45 En tal caso, en relación con la primera forma de realización particular de la primera variante del procedimiento de acuerdo con la invención puede ser ventajoso que la célula modificada por tecnología genética y empleada en esta forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención presente una actividad incrementada de una enzima E₁ en comparación con su tipo salvaje, la cual cataliza la reacción de succinil-coenzima A para formar metilmalonil-coenzima A (véase la Figura 1).

50 La expresión "actividad incrementada de una enzima" tal como se utiliza precedentemente en relación con la enzima E₁ y en las especificaciones subsiguientes en relación con las enzimas E₂, etc., se ha de entender preferiblemente como actividad intracelular incrementada.

55 Las explicaciones que siguen ahora para el aumento de la actividad enzimática en células son válidas tanto para el aumento de la actividad de la enzima E₁ como también para todas las enzimas mencionadas en lo que sigue, cuya actividad puede ser eventualmente incrementada. Básicamente, un aumento de la actividad enzimática puede conseguirse aumentando el número de copias de la secuencia génica o bien de las secuencias génicas que codifican la enzima, utilizando un promotor potente o aprovechando un gen o alelo que codifica una

correspondiente enzima con una actividad incrementada, y eventualmente combinando estas medidas. Células modificadas por tecnología genética de acuerdo con la invención se generan, por ejemplo, mediante transformación, transducción, conjugación o una combinación de estos métodos con un vector que contiene al gen deseado, a un alelo de este gen o a partes del mismo y un vector que posibilita la expresión del gen. La expresión heteróloga se alcanza, en particular, mediante la integración del gen o de los alelos en el cromosoma de la célula o en un vector extracromosómico replicante.

Una panorámica sobre las posibilidades para el aumento de la actividad enzimática en células en el ejemplo de la piruvato-carboxilasa la proporciona el documento DE-A-100 31 999.

La expresión de las enzimas o bien genes mencionados precedentemente y de todos los mencionados en lo que sigue se puede detectar con ayuda de la separación en gel de proteínas mono- y bi-dimensional y subsiguiente identificación óptica de la concentración de proteínas con un correspondiente software de evaluación en el gel. Si el aumento de una actividad enzimática se basa exclusivamente en un aumento de la expresión del gen correspondiente, entonces la cuantificación del aumento de la actividad enzimática puede determinarse de manera sencilla mediante una comparación de las separaciones de proteínas mono- o bi-dimensionales entre tipo salvaje y célula modificada por tecnología genética. Un método habitual para la preparación de los geles de proteínas en el caso de bacterias corineformes y para la identificación de las proteínas es el modo de proceder descrito por Hermann et al. (*Electrophoresis*, 22: 1712-23 (2001)). La concentración de proteínas puede analizarse asimismo mediante hibridación de transferencia Western con un anticuerpo específico para la proteína a detectar (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. EE.UU. 1989) y subsiguiente evaluación óptica con un correspondiente software para la determinación de la concentración (Lohaus y Meyer (1989) *Biospektrum* 5: 32-39; Lottspeich (1999), *Angewandte Chemie* 111: 2630-2647). La actividad de proteínas de unión a ADN puede medirse por medio de ensayos de desplazamiento de banda de ADN (también designados como retardo en gel) (Wilson et al. (2001) *Journal of Bacteriology*, 183: 2151-2155). El efecto de proteínas de unión a ADN sobre la expresión de otros genes puede detectarse mediante diferentes métodos bien descritos del ensayo del gen informador (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. EE.UU., 1989). Las actividades enzimáticas intracelulares pueden determinarse según distintos métodos descritos (Donahue et al. (2000) *Journal of Bacteriology* 182 (19): 5624-5627; Ray et al. (2000) *Journal of Bacteriology* 182 (8): 2277-2284; Freedberg et al. (1973) *Journal of Bacteriology* 115 (3): 816-823). En la medida en que en las realizaciones que siguen no se indiquen métodos concretos para la determinación de la actividad de una determinada enzima, la determinación del aumento de la actividad enzimática y también la determinación de la disminución de una actividad enzimática tienen lugar preferiblemente mediante los métodos descritos en Hermann et al., *Electrophoresis*, 22: 1712-23 (2001), Lohaus et al., *Biospektrum* 5 32-39 (1998), Lottspeich, *Angewandte Chemie* 111: 2630-2647 (1999) y Wilson et al., *Journal of Bacteriology* 183: 2151-2155 (2001).

Si el aumento de la actividad enzimática se realiza mediante mutación del gen endógeno, entonces pueden generarse de forma no orientada, mutaciones de este tipo, ya sea según métodos clásicos tales como, por ejemplo, mediante irradiación UV, o mediante productos químicos desencadenantes de mutaciones, o de forma deliberada por medio de métodos de tecnología genética tales como delección o delecciones, inserción o inserciones y/o intercambio o intercambios de nucleótidos. Mediante estas mutaciones se obtienen células modificadas por tecnología genética. Mutantes particularmente preferidos de enzimas son, en particular, también aquellas enzimas que ya no pueden ser inhibidas por retroalimentación o que lo sean al menos de manera reducida en comparación con la enzima de tipo salvaje.

Si el aumento de la actividad enzimática se realiza mediante el aumento de la expresión de una enzima, entonces se aumenta, por ejemplo, el número de copias de los genes correspondientes o se muta la región del promotor y de regulación o el sitio de unión al ribosoma que se encuentra aguas arriba del gen estructural. De igual manera actúan las casetes de expresión que se incorporan aguas arriba del gen estructural. Mediante promotores inducibles es adicionalmente posible aumentar la expresión en cualquier instante arbitrario. Además de ello, al gen de la enzima pueden asociarse, en calidad de secuencias reguladoras, sin embargo también los denominados "potenciadores" que determinan asimismo una expresión del gen incrementada a través de una interacción mejorada entre ARN-polimerasa y ADN. Mediante medidas para prolongar la vida del ARNm se mejora asimismo la expresión. Además, impidiendo la degradación de la proteína enzimática se refuerza asimismo la actividad enzimática. Los genes o construcciones de genes se presentan en tal caso en plásmidos con un número diferente de copias o están integrados y amplificados en el cromosoma. Alternativamente, se puede alcanzar, además, una sobre-expresión de los genes respectivos mediante variación de la composición de los medios y la realización del cultivo. Instrucciones para ello las encuentra el experto en la materia, entre otros, en Martin et al. (*Bio/Technology* 5, 137-146 (1987)), en Guerrero et al. (*Gene* 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya y Morinaga (*Bio/Technology* 6, 428-430

(1988)), en Eikmanns et al. (*Gene* 102, 93-98 (1991)), en el documento EP-A-0 472 869, en el documento US 4.601.893, en Schwarzer y Pühler (*Bio/Technology* 9, 84-87 (1991), en Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 126-132 (1994)), en LaBarre et al. (*Journal of Bacteriology* 175, 1001-1007 (1993)), en el documento WO-A-96/15246, en Malumbres et al. (*Gene* 134, 15-24 (1993), en el documento JP-A-10-229891, en Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58, 191-195 (1998)) y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular. Las medidas precedentemente descritas conducen, al igual que las mutaciones, a células modificadas por tecnología genética.

Para el aumento de la expresión de los genes respectivos se emplean, por ejemplo, plásmidos episomales. En calidad de plásmidos se adecuan, en particular, aquellos que son replicados en bacterias corineformes. Numerosos vectores de plásmidos conocidos tales como, por ejemplo, pZ1 (Menkel et al., *Applied and Environmental Microbiology* 64: 549-554 (1989)), pEKEx1 (Eikmanns et al., *Gene* 107: 69-74 (1991) o pHS2-1 (Sonnen et al., *Gene* 107: 69-74 (1991)) se basan en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. Otros vectores de plásmidos tales como, por ejemplo, aquellos que se basan en pCG4 (documento US 4.489.160) o pNG2 (Serwold-Davis et al., *FEMS Microbiology Letters* 66: 119-124 (1990)) o pAG1 (documento US 5.158.891) pueden emplearse de igual manera.

Además, también vectores de plásmidos de este tipo, con ayuda de los cuales se puede aplicar el procedimiento a la amplificación del gen mediante integración en el cromosoma, se adecuan además, tal como se describió, por ejemplo, por Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60: 126-132 (1994)) para la duplicación o bien amplificación del operón hom-thrB. En el caso de este método, el gen completo es clonado en un vector de plásmido que puede replicarse en un hospedante (típicamente *Escherichia coli*), pero no en *Corynebacterium glutamicum*. En calidad de vectores entran en consideración, por ejemplo, pSUP301 (Simon et al., *Bio/Technology* 1: 784-791 (1983)), pK18mob o pK19mob (Schäfer et al., *Gene* 145: 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.), pCR2.1-TOPO (Shuman, *Journal of Biological Chemistry* 269: 32678-84 (1994)), pCR[®]Blunt (Invitrogen, Groningen, Holanda), pEM1 (Schrupf et al., *Journal of Bacteriology* 173: 4510-4516) o pBGS8 (Spratt et al., *Gene* 41: 337-342 (1986)). El vector del plásmido que contiene el gen a amplificar es transformado a continuación, mediante conjugación o transformación, en la cepa deseada de *Corynebacterium glutamicum*. El método de la conjugación se describe, por ejemplo, en Schäfer et al., *Applied and Environmental Microbiology* 60: 756-759 (1994). Métodos para la transformación se describen, por ejemplo, en Thierbach et al., *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 356-362 (1988), Dunican y Shivnan, *Bio/Technology* 7: 1067-1070 (1989) y Tauch et al., *FEMS Microbiology Letters* 123: 343-347 (1994). Después de recombinación homóloga por medio de un acontecimiento de "cross-over" (sobrecruzamiento), la cepa resultante contiene al menos dos copias del gen correspondiente.

Por la formulación utilizada precedentemente y en las realizaciones subsiguientes "una actividad de una enzima E_x incrementada con respecto a su tipo salvaje" se ha de entender, preferiblemente, siempre una actividad de la respectiva enzima E_x incrementada en un factor de al menos 2, de manera particularmente preferida de al menos 10, de manera más preferida de al menos 100, de manera todavía más preferida de al menos 1.000 y, de la manera más preferida de al menos 10.000. Además, la célula modificada por tecnología genética y empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención, la cual presenta "una actividad de una enzima E_x incrementada con respecto a su tipo salvaje", comprende también una célula, cuyo tipo salvaje no presenta o al menos no presenta actividad detectable alguna de esta enzima E_x y que, sólo después del aumento de la actividad enzimática, por ejemplo mediante sobre-expresión, muestra una actividad detectable de esta enzima E_x . A este respecto, el término "sobre-expresión" o la formulación "aumento de la expresión" utilizada en las siguientes realizaciones, comprende también el caso de que una célula de partida, por ejemplo una célula de tipo salvaje, no presente o no presente al menos expresión detectable alguna y sólo mediante procedimientos recombinantes sea inducida una expresión detectable de la enzima E_x .

Por la formulación utilizada en lo que sigue, "actividad reducida de una enzima E_x " se entiende de manera correspondiente, preferiblemente, una actividad disminuida en un factor de al menos 0,5, de manera particularmente preferida de al menos 0,1, de manera más preferida de al menos 0,01, de manera todavía más preferida de al menos 0,001 y de la manera más preferida, de al menos 0,0001. La disminución de la actividad de una enzima determinada puede tener lugar, por ejemplo, mediante mutación dirigida, mediante la adición de inhibidores competitivos o no competitivos o mediante otras medidas conocidas por el experto en la materia para disminuir la expresión de una enzima determinada.

En el caso de la enzima E_1 , la cual cataliza la reacción de succinil-coenzima A en metilmalonil-coenzima A, se trata preferiblemente de una metilmalonil-coenzima A-mutasa (EC 5.4.99.2). Esta enzima es codificada preferiblemente por los genes elegidos del grupo que consiste en mut, mutA, mutB, sbm, sbmA, sbmB, sbm5, bhbA, mcmA,

mcmA1, mcmA2, mcmB, mcm1, mcm2, mcm3, icmA, meaA1 y meaA2. Las secuencias de nucleótidos de estos genes pueden tomarse, por ejemplo, de la "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (banco de datos de KEGG), los bancos de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.) o de los bancos de datos de secuencias de nucleótidos de European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania o bien Cambridge, Reino Unido).

Conforme a una forma de realización particularmente preferida de la primera variante del procedimiento del procedimiento de acuerdo con la invención, en el caso de la enzima E₁ se trata de la metilmalonil-coenzima A-mutasa de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, que es codificada por un gen con la secuencia de ADN conforme a SEQ.-ID-NO. 01 y que presenta la secuencia de aminoácidos conforme a SEQ.-ID-NO. 02.

Además, conforme a una primera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética, en la que se forman succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxialcanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico, se prefiere que la célula modificada por tecnología genética y empleada conforme a esta alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención presente, eventualmente de manera adicional a la actividad incrementada de la enzima E₁, una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₂ a E₄ (véase la Figura 2):

- de una enzima E₂ que cataliza la reacción de metilmalonil-coenzima A para formar metilmalonato;
- de una enzima E₃ que cataliza la reacción de metilmalonato para formar metilmalonato-semialdehído;
- de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar ácido 3-hidroxiisobutírico.

De acuerdo con la invención se emplean particularmente células en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₂, E₃, E₄, E₂E₃, E₂E₄, E₃E₄, E₂E₃E₄, siendo la más preferida E₂E₃E₄. Además, es posible que una enzima sea capaz de catalizar también al menos a dos de las etapas de reacción precedentemente descritas. Así, por ejemplo, puede emplearse una enzima que presente tanto la actividad de la enzima E₂ como también la de la enzima E₃ (y, por consiguiente, catalice la reacción de metilmalonil-coenzima A directamente para formar metilmalonato-semialdehído) tal como, por ejemplo, la malonil-coenzima A-reductasa de *Sulfolobus tokodaii*, la cual es codificada por la secuencia de ADN con la SEQ.-ID.-NO. 03 y que presenta la secuencia de aminoácidos conforme a SEQ.-ID.-NO. 04, o bien una enzima que presente las tres actividades enzimáticas E₂, E₃ y E₄ tal como la malonil-coenzima A-reductasa de *Chloroflexus aurantiacus* (Hügler et al., Journal of Bacteriology 184, páginas 2.404-2.410, 2002).

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

E₂ sea una metilmalonil-coenzima A-hidrolasa (EC 3.1.2.17)

E₃ sea una aldehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.3) o una aldehído-oxidasa (EC 1.2.3.1) y

E₄ sea una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35).

La enzima E₂ es codificada preferiblemente por el gen aox1. La metilmalonil-coenzima A-hidrolasa del hígado de rata se describe, por ejemplo, en Kovachy et al., "Recognition, isolation, and characterization of rat liver D-methylmalonyl coenzyme A hydrolase", *J. Biol. Chem.* 258 (1983), páginas 11.415-11.421.

La enzima E₃ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que consiste en aldh2, aldh3a1, aldh3a2, aldh1b1, aldh9a1, aldh7a1, aldh1a4, aldh1a1, aldh1a2, mgc80785, mgc83352, mgc89020, dmel-CG31075, cg3752, cg9629, alh-9, alh-1, alh-2, f508.35, t7O23.15, f15I1.19, tT17F15.130, ald1, ald2, ald4, ald5, ald6, acl044Wp, adr417wp, msc7, tb06.5F5.780, aldH, puuC, putA, aldA, badH, alkH, pcD, rsp1591, rs01031, exaC, acoD, dhaL, pchA, aldB, dhaS, betB, ywdH, ycbD, aldX, aldY, aldA1, aldA2, aldC, pcd, cgl0546, cgl2668, cgl2796, scg11A.05, sci30A.27c, sce9.27c, sck13.05c, sc5H4.03, thcA, gabD2, alkH, aldH, aldH1, aldY1, aldY2, aldY3, aldY4, aldY5, aldY6, aldY7 y aldhT.

Genes adecuados para la enzima E₄ se eligen del grupo consistente en hibadh, cg15093, cg15093, cg4747, mwL2.23, t13k14.90, f19b15.150, hibA, ygbJ, mmsB, mmsB, garR, tsar, mmsB-1, mmsB-2, yfjR, ykwC, ywjF, hibD, glxR, SCM1.40c, hibD, ehahd, hadh2, hadhsc, hsd17B4, loc488110, had, mgC81885, hadh2-prov, cg3415, cg7113, ech-1, ech-8, ech-9, ard-1, yfcX, fadB, faoA, fadB2x, hbd-1, hbd-2, hbd-3, hbd-4, hbd-5, hbd-6, hbd-7, hbd-8, hbd-9, hbd-10, fadJ, rs04421, rs02946, rs05766, bbsD, bbsC, fadB1, fadB2, fadB5, hbdA, pimF, fabJ-1, fabJ, scbac19f3.11, sci35.13, scbac8d1.10c, sc5f2a.15, sc6a5.38, fadC2, fadC4, fadC5, fadC6, had y paaH. Otras 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasas adecuadas se describen, por ejemplo, en Bannerjee et al. (1970), *J. Biol.*

Chem., 245, páginas 1.828 a 1.835, Steele et al.-(1992), *J. Biol. Chem.*, 267, páginas 13.585 a 13.592, Harris et al. (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, páginas 327 a 331, Harris et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1645 (1), páginas 89 a 95, Hawes et al. (2000), *Methods Enzymol.*, 324, páginas 218 a 228, Harris et al., *J. Biol. Chem.*, 275 (49), páginas 38.780 a 38.786, Rougraff et al. (1988), *J. Biol. Chem.*, 263(1), páginas 327 a 331, Robinson et al., *J. Biol. Chem.*, 225, páginas 511 a 521, Hawes et al. (1995), *Biochemistry*, 34, páginas 4.231 a 4.237, Hasegawa J. (1981), *Agric. Biol. Chem.*, 45, páginas 2.805 a 2814, Hawes et al. (1996), *FEBS Lett.*, 389, páginas 263 a 267, Hawes et al. (1996), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, Plenum Press, Nueva York, páginas 395 a 402, Adams et al. (1994), *Structure*, 2, páginas 651 a 668, Zhang et al. (1999), *Biochemistry*, 38, páginas 11.231 a 11.238, Mirny et al., (1999), *J. Mol. Biol.*, 291, páginas 177 a 196 y Lokanath et al. (2005), *J Mol Biol.*

Las secuencias de nucleótidos de los genes precedentemente mencionados, así como de otros genes para las enzimas E₂ a E₄ pueden tomarse, entre otros, también del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida de esta alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que succinil-coenzima A se forma como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído se forma como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico, se prefiere que para la reacción de metilmalonil-coenzima A para formar metilmalonato-semialdehído se emplee la malonil-coenzima A-reductasa de *Sulfolobus tokodaii*, la cual es codificada por la secuencia de ADN con la SEQ.-ID.-NO. 03 y que presenta la secuencia de aminoácidos conforme a SEQ.-ID.-NO. 04. De acuerdo con otra forma de realización particularmente preferida de esta variante, para la reacción de metilmalonil-coenzima A para formar ácido 3-hidroxiisobutírico se emplea la malonil-coenzima A-reductasa de *Chloroflexus aurantiacus* (Hügler et al., *Journal of Bacteriology* 184, páginas 2.404-2.410, 2002).

Además, en relación con esta primera alternativa de la primera forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere que la célula modificada por tecnología genética y empleada de acuerdo con esta forma de realización presente una actividad de una enzima E₅ disminuida en comparación con su tipo salvaje, la cual presenta la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar propionil-coenzima A, tratándose en el caso de esta enzima, preferiblemente, de una metilmalonato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.27).

De acuerdo con una segunda alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman succinil-coenzima A en calidad de producto intermedio y metilmalonato-semialdehído en calidad de producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico, se prefiere que la célula, eventualmente de manera adicional a la actividad incrementada de la enzima E₁, presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₄ a E₇ (véase la Figura 3):

- de una enzima E₆ que cataliza la reacción de (R)-metilmalonil-coenzima A para formar (S)-metilmalonil-coenzima A;
- de una enzima E₇ que cataliza la reacción de (S)-metilmalonil-coenzima A para formar propionil-coenzima A;
- de una enzima E₅ que cataliza la reacción de propionil-coenzima A para formar metilmalonato-semialdehído;
- de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar ácido 3-hidroxiisobutírico.

De acuerdo con la invención, de manera particularmente preferida se emplean células en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₄, E₅, E₆, E₇, E₄E₅, E₄E₆, E₄E₇, E₅E₆, E₅E₇, E₆E₇, E₄E₅E₆, E₄E₅E₇, E₄E₆E₇, E₅E₆E₇ y E₄E₅E₆E₇, siendo la más preferida E₄E₅E₆E₇.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima E₆ sea una metilmalonil-coenzima A-epimerasa (EC 5.1.99.1)
 E₇ sea un metilmalonil-coenzima A-d Descarboxilasa (EC 4.1.1.41),
 E₅ sea una metilmalonato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.27) y
 E₄ sea una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35).

Enzimas E₄ preferidas son en este caso aquellas que ya se han descrito precedentemente en relación con la

primera variante de la primera forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención.

La enzima E₆ es codificada preferiblemente por el gen mcee. Una metilmalonil-coenzima A-descarboxilasa (enzima E₇) adecuada se describe, por ejemplo, en Biochemistry, Vol. 39 (2000), páginas 4.630-4.639 por parte de Benning et al. Genes adecuados para la enzima E₅ se eligen preferiblemente del grupo consistente en ald6a1, cg17896, t22c12.10, ald6, putA1, mmsA, mmsA-1, mmsA-2, mmsA-3, mmsA-4, msdA, io1A e io1AB.

Genes adecuados para la enzima E₇ se eligen preferiblemente del grupo consistente en mmdA, bcc, oadB, oadB2, oadB3, SC1C2.16, SC1G7.10, pccB1, accA2, mmdB, mmdC y ppcB.

Las secuencias de nucleótidos de los genes precedentemente mencionados para las enzimas E₅, E₆ y E₇ pueden tomarse, entre otros, también del banco de datos de KEGG.

De acuerdo con una tercera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que succinil-coenzima A se forma como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído se forma como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico, se prefiere que la célula, eventualmente de manera adicional a la actividad incrementada de la enzima E₁, presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₄, E₅ y E₇ (véase la Figura 4):

- de una enzima E₇ que cataliza la reacción de metilmalonil-coenzima A para formar propionil-coenzima A;
- de una enzima E₅ que cataliza la reacción de propionil-coenzima A para formar metilmalonato-semialdehído;
- de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar ácido 3-hidroxiisobutírico.

Esta vía corresponde esencialmente a la segunda variante de la primera forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención en la que, sin embargo, a diferencia de la segunda variante, la preparación de propionil-CoA tiene lugar directamente a partir de metilmalonil-coenzima A. Enzimas y genes preferidos para las enzimas E₄, E₅ y E₇ son aquellos genes o bien enzimas que ya han sido mencionados precedentemente en relación con la segunda variante.

Además, de acuerdo con la primera forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención (y también de acuerdo con todas las formas de realización que se describen todavía en lo que sigue) puede preferirse emplear una célula modificada por tecnología genética que esté en condiciones de transformar el ácido 3-hidroxiisobutírico formado en un polihidroxicanoato. Polihidroxicanoatos de este tipo son almacenados intracelularmente por muchos microorganismos en forma de gránulos que difractan intensamente la luz. A este respecto, es especialmente preferido que la célula modificada por tecnología genética y empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una, preferiblemente de las dos siguientes enzimas E₈ y E₉ (véase la Figura 5):

- de una enzima E₈ que cataliza la reacción de ácido 3-hidroxiisobutírico para formar 3-hidroxiisobutiril-coenzima A;
- de una enzima E₉ que cataliza la reacción de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A para formar un polihidroxicanoato basado en ácido 3-hidroxiisobutírico.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₈ sea una 3-hidroxiisobutiril-CoA-hidrolasa (EC 3.1.2.4) y
- E₉ sea un polihidroxicanoato-sintasa.

Tal como ya se ha explicado precedentemente, en el caso de la primera forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el ácido 3-hidroxiisobutírico o los polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico se forman a partir de succinil-coenzima A como producto intermedio y a partir de metilmalonato-semialdehído como producto previo. En tal caso, puede ser básicamente conveniente, junto a una influencia de una o varias de las actividades de las enzimas E₁ a E₉ precedentemente mencionadas, influir también sobre aquellas actividades de las enzimas que conduzcan a un aumento de la formación de succinil-coenzima A en la célula.

En la medida en que de acuerdo con la primera forma de realización particular de la primera variante del

procedimiento de acuerdo con la invención la formación del ácido 3-hidroxiisobutírico o del polihidroxiálcanoato basado en ácido 3-hidroxiisobutírico tenga lugar a través de succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo a partir de hidratos de carbono o glicerol, conforme a una ejecución particular de la primera, segunda o tercera alternativa precedentemente descrita del procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere que la célula empleada, modificada por tecnología genética, presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una, preferiblemente de las dos siguientes enzimas E₁₀ y E₁₁ (véase la Figura 6):

- de una enzima E₁₀ que cataliza la reacción de fosfoenol-piruvato para formar oxalacetato;
- de una enzima E₁₁ que cataliza la reacción de piruvato para formar oxalacetato.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₁₀ sea una fosfoenolpiruvato-carboxilasa (EC 4.1.1.31) y
- E₁₁ sea una piruvato-carboxilasa (EC 6.4.1.1.).

La enzima E₁₀ es codificada por los genes elegidos del grupo que comprende fl2m16.21, fl4n22.13, k15m2.8, ppc, clpA, pepC, capP, cg1585, pepC, pck, ppc y pccA, siendo particularmente preferido el gen ppc. Fosfoenolpiruvato-carboxilasas preferidas de acuerdo con la invención están también descritas, en particular, en los documentos US 4.757.009, US 4.980.285, US 5.573.945, US 6.872.553 y US 6.599.732.

La enzima E₁₁ se elige preferiblemente de los genes del grupo que comprende pc, pcx, cg1516, cg1516, pyc-1, pyc-2, aar162Cp, pyr1, accC-2, pycA, pycA2, pca, cg10689, pyc, pycB, accC, oadA, acc y accC1, siendo particularmente preferido el gen pyc. Piruvato-carboxilasas preferidas de acuerdo con la invención se describen también, en particular, en los documentos US 6.455.284, US 6.171.833, US 6.884.606, US 6.403.351, US 6.852.516 y US 6.861.246. Otra piruvato-carboxilasa particularmente preferida de acuerdo con la invención es el mutante que está descrito en "A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new *L-lysine-producing mutant*.", Ohnishi J et al., Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 58 (2), páginas 217-223 (2002).

Las secuencias de nucleótidos de genes adecuados de las enzimas E₁₀ y E₁₁ pueden tomarse del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

A partir de la etapa intermedia de oxalacetato existen varias posibilidades para acceder a succinil-coenzima A que luego puede hacerse reaccionar para formar ácido 3-hidroxiisobutírico a través de metilmalonil-coenzima A por medio de las tres variantes mencionadas al comienzo.

Una primera vía conduce a través de fumarato como producto intermedio. En este caso, de acuerdo con una primera ejecución particular de la primera, segunda o tercera alternativa precedentemente descrita del procedimiento de acuerdo con la invención en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética, en la que se forma metilmalonato-semialdehído como producto previo y succinil-coenzima A como producto intermedio, se prefiere que la célula, eventualmente de manera adicional a una actividad incrementada de la enzima E₁₀ o E₁₁, presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₁₂ a E₁₅ (véase la Figura 7):

- de una enzima E₁₂ que cataliza la reacción de oxalacetato para formar malato;
- de una enzima E₁₃ que cataliza la reacción de malato para formar fumarato;
- de una enzima E₁₄ que cataliza la reacción de fumarato para formar succinato;
- de una enzima E₁₅ que cataliza la reacción de succinato para formar succinil-coenzima A.

De acuerdo con la invención, se emplean particularmente en tal caso células en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₁₂, E₁₃, E₁₄, E₁₅, E₁₂E₁₃, E₁₂E₁₄, E₁₂E₁₅, E₁₃E₁₄, E₁₃E₁₅, E₁₄E₁₅, E₁₂E₁₃E₁₄, E₁₂E₁₃E₁₅, E₁₂E₁₄E₁₅, E₁₃E₁₄E₁₅, E₁₂E₁₃E₁₄E₁₅, siendo la más preferida E₁₂E₁₃E₁₄E₁₅.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₁₂ sea una malato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.37) o una malato-quinona-oxidoreductasa (1.1.99.16),
- E₁₃ sea una fumarato-hidratasa (EC 4.2.1.2),
- E₁₄ sea una succinato-deshidrogenasa (EC 1.3.99.1 o EC 1.3.5.1) o una succinato-quinona-oxidoreductasa (1.3.5.1), y

ES 2 422 382 T3

E₁₅ sea una succinato-coenzima A-ligasa (EC 6.2.1.4 o EC 6.2.1.5).

5 La enzima E₁₂ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende mdh1, mdh2, mor1, cg10748, cg10749, cg5362, mdh-1, f46e10.10, f19p19.13, f12m16.14, t30l20.4, k15m2.16, f1p2.70, f17i14.150, mnl12.18, mik19.17, mdh3, adl164cp, adr152cp, adr252wp, mdhA, mdhC, mdhB, ybiC, mdh, yiaK, ybiC, allD, citH, yjmC, citH, cgl2380, ldh, sqdB, mqo, yojH, mqoA, mqoB, mqo1, mqo2, mqo3, mqo4 y cgl2001, siendo particularmente preferido el gene mqo y el gen mdh.

10 La enzima E₁₃ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende fh, fh1, sc4094, sc4095, t30b22.19, k3k7.11, acr013Cp, fum1, fum2, fum3, fum4, fumH, fumA, fumB, fumC, fumC1, fumC2, fum, ttdA, ttdB, fumB-alfa, fumB-beta, citG, citB, fumX, fum-1 y fum-2, siendo particularmente preferido el gen fum.

15 La enzima E₁₄ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende sdh1, sdh2, sdh3, sdh4, sdh5, sdh6, osm1, osm2, sdhA, sdhB, sdhC, sdhD, frdA, frdB, frdC, frdD, ifcA-1, ifcA-2, sdhB-1, sdhB-2, frdC2, cgl0370, cgl0371, cgl0372, scm10.10c, scm10.11c, scm10.12c, sc5g8.25c, sc5g8.26c, scbac-31e11.02c, scbac31e11.02c, sc4b10.10c, s-dhA2, sdhB2, sdhA1, sdhB1, qcrB2, sdhA3, sdhB3, frdB1 y frdB2, siendo particularmente preferidos los genes sdhA, sdhB y sdhC.

20 La enzima E₁₅ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende suclg1, suclg2, loc434885, cg10622, dmel-CG6255, f11a3.3, f8115.30, mkd15.11, lsc1, lsc2, a-el211wp, afr134cp, scsA, scsB, sucC y sucD.

Las secuencias de nucleótidos de genes adecuados de las enzimas E₁₂ a E₁₅ pueden tomarse de nuevo también del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

25 En la medida en que esté aumentada la actividad de una o varias de las enzimas E₁₂ a E₁₅, también se puede manifestar como ventajoso que la célula presente una actividad reducida en comparación con su tipo salvaje de una de las siguientes enzimas E₁₆ a E₂₃:

- 30 - de una enzima E₁₆ que cataliza la reacción de oxalacetato para formar citrato;
- de una enzima E₁₇ que cataliza la reacción de malato para formar oxalacetato;
- de una enzima E₁₈ que cataliza la reacción de succinil-coenzima A para formar succinato;
- de una enzima E₁₉ que cataliza la reacción de oxalacetato para formar fosfoenolpiruvato;
- de una enzima E₂₀ que cataliza la reacción de oxalacetato para formar piruvato;
- 35 - de una enzima E₂₁ que cataliza la reacción de oxalacetato para formar aspartato;
- de una enzima E₂₂ que cataliza la reacción de malato para formar piruvato;
- de una enzima E₂₃ que cataliza la reacción de piruvato para formar acetato.

40 Células particularmente preferidas de acuerdo con la invención son en tal caso aquellas en las que está reducida la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₁₆, E₁₇, E₁₈, E₁₉, E₂₀, E₂₁ y E₁₆E₁₇E₁₈E₁₉E₂₀E₂₁E₂₂E₂₃.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- 45 E₁₆ sea una citrato-sintasa (EC 2.3.3.1 o EC 2.3.3.8),
- E₁₇ sea una malato-oxidasa (EC 1.1.3.3.),
- E₁₈ sea una succinil-CoA-hidrolasa (EC 3.1.2.3),
- E₁₉ sea una fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (EC 4.1.1.49 o 4.1.1.32),
- E₂₀ sea una oxalacetato-descarboxilasa (EC 4.1.1.3),
- E₂₁ sea un aspartato-transaminasa (EC 2.6.1.1),
- 50 E₂₂ sea una malato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.38, o EC 1.1.1.39 o EC 1.1.1.40),
- E₂₃ sea una piruvato-deshidrogenasa (EC 1.2.1.51).

55 La enzima E₁₆ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende glt, cs, csl, cg3861, cts-1, f7f19.21, f4i1.16, t20n10.90, t20n10.100, t2O9.80, cit1, cit2, cit3, aar004cp, agr002wp, cshA, gltA, citZ, cit, prpC, cisY, cis, mmgD, citA, gltA1, gltA2, gltA3, cgl0829, prpC1, scd10.20, citA1, citA2, citA3, acly, cg8322, f5e6.2, k7jJ8.14 y citE, siendo el más preferido gltA.

La enzima E₁₉ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende pckA, pck1, pck2, cg10924, cg17725, cg17725, pckG, ppck, cgl2863, pck y 2sck36.02. La enzima E₂₀ es codificada preferiblemente

por genes elegidos del grupo que comprende oadA, oadB, oadC, oadG, oag3, eda, dcoA, oadA1, oadA2, pycB y mmdB.

5 La enzima E₂₁ es preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende myn8.7, glt1, adr290wp, gltB, gltD, glt1, gls1, gltA, glt, glxD, gltD1, gltD2, gdh2, agl040Cp, gdhA1, gdhA, gdhA2, gluD, gluD1, gluD2, rocG, ypcA, gudB, t11i18.2, t2i1.150, mrg7.13, f19c24.7, gdh, gdh1, gdh2, gdh3, got1, got2, cg4233, cg8430, f23n19.17, f13j11.16, t26c19.9, f7f1.18, F10N7.200, t16l1.170, f15n18.110, t20d1.70, aat1, aat2, abl038wp, afr211cp, agx1, bna4, aatA, aatB, ybdL, aspC, yfbQ, aat, avtA1, avtA2, tyrB, avtA, avtB, argD1, argD2, aspB1, aspB2, aspB3, aspB, aspC1, aspC2, aspC3, aspC4, RS05143, aspAT, ywfG, yhdR, argD, mtnV, alaT, hisC, avtA1, avtA2, avtA3, cgl0240, cgl1103, cgl2599, cgl2844, 2sck36.07c, sc9e12.21, sc2h4.04c, tyrB, gtp, gtp1, gtp2, cg1640, f20d23.34, f26f24.16, f24j13.15, t10d10.20 y agr085wp, siendo particularmente preferidos aspC, aatA, gdh, gudB, gdhA, gltB y gltD.

15 La enzima E₂₁ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende myn8.7, glt1, adr290wp, gltB, gltD, glt1, gls1, gltA, glt, glxD, gltD1, gltD2, gdh2, agl040Cp, gdhA1, gdhA, gdhA2, gluD, gluD1, gluD2, rocG, ypcA,

20 La enzima E₂₂ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende me, me1, me2, me3, mae, mae1, mae2, sfcA, sfcA1, maeA, maeB, tme, yqkJ, ywkA, yqkJ, malS, ytsJ, mleA, mleS, mez, sce59.10c, 2sc7g11.23, malS1, malS2, dme, maeB1, maeB2, mdh, mdh1, mdh2, dmel_cg10120, dmel_cg10120, dmel_cg5889, f19k16.27, f6f22.7, t22p22.60, f18a17.1, mod1, tme, mao, cgl3007, malS y malE.

25 La enzima E₂₃ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende me, me1, me2, me3, mae, mae1, mae2, sfcA, sfcA1, maeA, maeB, tme, yqkJ, ywkA, yqkJ, malS, ytsJ, mleA, mleS, mez, sce59.10c, 2sc7g11.23, malS1, malS2, dme, maeB1, maeB2, mdh, mdh1, mdh2, dmel_cg10120, dmel_cg10120, dmel_cg5889, f19k16.27, f6f22.7, t22p22.60, f18a17.1, mod1, tme, mao, cgl3007, malS y malE.

30 Además, se prefiere de acuerdo con la invención que en el caso en el que la habilitación incrementada de succinil-coenzima A en la célula tenga lugar por medio de la vía precedentemente descrita (oxalacetato → malato → fumarato → succinil-coenzima A) incrementar de manera preestablecida en la célula también la habilitación de equivalentes de reducción.

35 Una posibilidad de aumentar los equivalentes de reducción consiste en aumentar la vía de pentosafosfato oxidativa. A este respecto, se prefiere particularmente aumentar la actividad de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) y/o de la 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.44), la cual es codificada preferiblemente por el gen gnd y, eventualmente, al mismo tiempo inhibir la glicólisis, por ejemplo mediante debilitamiento de la actividad de la glucosa-6-fosfato-isomerasa tal como se describe en el documento WO-A-01/07626. Junto a o en lugar del fomento preestablecido de la vía de pentosafosfato, puede preferirse, además, habilitar equivalentes de reducción de forma que a las células se les ofrezca etanol como fuente de carbono y en las células se fomente la reducción del etanol en acetaldehído mediante alcohol-deshidrogenasas (EC 1.1.1.1, EC 1.1.1.2, EC 1.1.1.71 o EC 1.1.99.8) y fomentar la reacción ulterior del acetaldehído para formar acetil-coenzima A mediante acetaldehído-deshidrogenasas (EC 1.2.1.10). Genes adecuados para alcohol-deshidrogenasas y acetaldehído-deshidrogenasas pueden tomarse de nuevo por parte del experto en la materia de bancos de datos de genes conocidos tales como, por ejemplo, del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

45 Una segunda vía de oxalacetato para formar succinil-coenzima A conduce a través de citrato como producto intermedio. En este caso, de acuerdo con una segunda ejecución particular de la primera, segunda o tercera alternativa precedentemente descrita del procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere emplear una célula modificada por tecnología genética, que eventualmente presente de manera adicional a una actividad incrementada de la enzima E₁₀ o E₁₁, una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₁₃ a E₁₆ y E₂₄ a E₂₆ (véase la Figura 8):

- 55 - de una enzima E₁₆ que cataliza la reacción de oxalacetato para formar citrato;
- de una enzima E₂₄ que cataliza la reacción de citrato para formar isocitrato;
- de una enzima E₂₅ que cataliza la reacción de isocitrato para formar glioxalato y succinato;
- de una enzima E₂₆ que cataliza la reacción de glioxalato para formar malato;
- de una enzima E₁₃ que cataliza la reacción de malato para formar fumarato;
- de una enzima E₁₄ que cataliza la reacción de fumarato para formar succinato;
- 60 - de una enzima E₁₅ que cataliza la reacción de succinato para formar succinil-coenzima A.

Células particularmente preferidas de acuerdo con la invención son en tal caso aquellas en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₁₃, E₁₄, E₁₅, E₁₆, E₂₄, E₂₅, E₂₆, E₁₃E₁₄, E₁₃E₁₅, E₁₃E₁₆, E₁₃E₂₄, E₁₃E₂₅, E₁₃E₂₆, E₁₄E₁₅, E₁₄E₁₆, E₁₄E₂₄, E₁₄E₂₅, E₁₄E₂₆, E₁₅E₁₆, E₁₅E₂₄, E₁₅E₂₅, E₁₅E₂₆ y E₁₃E₁₄E₁₅E₁₆E₂₄E₂₅E₂₆, siendo la más preferida E₁₃E₁₄E₁₅E₁₆E₂₄E₂₅E₂₆.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₁₃ sea una fumarato-hidratasa (EC 4.2.1.2),
 E₁₄ sea una succinato-deshidrogenasa (EC 1.3.99.1 o EC 1.3.5.1) o una succinato-quinona-oxidoreductasa (1.3.5.1),
 E₁₅ sea una succinato-coenzima A-ligasa (EC 6.2.1.4 o EC 6.2.1.5),
 E₁₆ sea una citrato-sintasa (EC 2.3.3.1 o EC 2.3.3.8),
 E₂₄ sea una aconitato-hidratasa (EC 4.2.1.3),
 E₂₅ sea una isocitrato-liasa (EC 4.1.3.1) y
 E₂₆ sea una malato-sintasa (EC 2.3.3.9).

Genes preferidos para las enzimas E₁₃ a E₁₆ son aquellos que ya se describieron precedentemente en relación con la primera vía de oxalacetato para formar succinil-coenzima A.

La enzima E₂₄ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende aco1, aco2, ratireb, dmel-CG4706, dmel-CG4900, dmel-cg6342, cg9244, t3p4.5, f10m23.310, f4b14.100, ad1032Wp, afr629wp, acnA, acnB, acnC, acnD, rpfA, acnA1, acnA2, acnM, citB, leuC, cgl1540, sacA, can y aco, siendo particularmente preferidos acnA y acnB.

La enzima E₂₅ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende msd21.4, icl1, icl2, adl066cp, agl057wp, aceA, icl, aceAa, aceAb, cgl0097 y cgl2331, siendo particularmente preferido aceA. De acuerdo con una forma de realización particular, se prefieren aquellos genes que codifican una isocitrato-liasa desregulada en el plano del gen o en el plano de la proteína.

La enzima E₂₆ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende med24.5, mlsS1, acr268cp, masA, glcB, aceB, mls, glcB-1, glcB-2, cg12329, masZ, aceB1, aceB2 y mas, siendo particularmente preferido el gen aceB.

También aquí, las secuencias de nucleótidos de genes adecuados de las enzimas E₂₄ a E₂₆ pueden tomarse del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

Cuando se fomenta la habilitación de oxalacetato a partir de fosfoenolpiruvato o a partir de piruvato mediante el incremento de la actividad de la enzima E₁₀ o E₁₁, el succinato formado en la disociación del isocitrato por parte de la isocitrato-liasa junto a glioxalato puede aprovecharse asimismo para la formación de succinil-coenzima A. Además, en el caso de esta segunda vía del oxalacetato al succinato puede ser ventajoso reducir la actividad de una enzima E₂₇ la cual cataliza la reacción de isocitrato para formar 2-oxoglutarato y de la que se trata preferiblemente de una isocitrato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.41 o EC 1.1.1.42). Preferiblemente, en el caso de la isocitrato-deshidrogenasa se trata de una enzima que es codificada por un gen elegido del grupo que comprende idh1, idh2, cg7176, cg7176, cg7176, f20d21.16, f12p19.10, t15n1.80, idp1, idp2, idp3, aal022Wp, aer061Cp, idhC, idhM, icdA, icd, idh, icd1, icd2, leuB, citC, citC, cgl0664, leuB2, idh3A, idg3B, idh3G, cg12233, dmel-CG5028, dmel-CG6439, f6p23.14, f23e12.180, f8d20.160, f12e4.20, adl223wp y afr137cp, siendo particularmente preferidos icdA y citC.

Una tercera vía del oxalacetato a la succinil-coenzima A conduce a través de 2-oxoglutarato como producto intermedio. En este caso, conforme a una tercera ejecución particular de la primera, segunda o tercera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención precedentemente descrita se prefiere emplear una célula modificada por tecnología genética que, eventualmente de forma adicional a una actividad incrementada de la enzima E₁₀ o E₁₁, presenta una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de una de las siguientes enzimas: E₁₆, E₂₄, E₂₇ y E₂₈ (véase la Figura 9):

- de una enzima E₁₆ que cataliza la reacción de oxalacetato para formar citrato;
- de una enzima E₂₄ que cataliza la reacción de citrato para formar isocitrato;
- de una enzima E₂₇ que cataliza la reacción de isocitrato para formar 2-oxoglutarato;
- de una enzima E₂₈ que cataliza la reacción de 2-oxoglutarato para formar succinil-coenzima A.

Células particularmente preferidas de acuerdo con la invención son en este caso aquellas en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₁₆, E₂₄, E₂₇, E₂₈, E₁₆E₂₄, E₁₆E₂₇, E₁₃E₂₈, E₂₄E₂₇, E₂₄E₂₈, E₂₇E₂₈, E₁₆E₂₄E₂₇, E₁₆E₂₄E₂₈, E₂₄E₂₇E₂₈ y E₁₆E₂₄E₂₇E₂₈, siendo la más preferida E₁₆E₂₄E₂₇E₂₈.

5

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

E₁₆ sea una citrato-sintasa (EC 2.3.3.1 o EC 2.3.3.8),
 E₂₄ sea una aconitato-hidratasa (EC 4.2.1.3),
 10 E₂₇ sea una isocitrato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.41 o EC 1.1.1.42) y
 E₂₈ sea una 2-oxoglutarato-sintasa (EC 1.2.7.3).

Genes preferidos para las enzimas E₁₆, E₂₄ y E₂₇ son aquellos que ya han sido descritos precedentemente en relación con la primera y segunda vías de oxalacetato a succinil-coenzima A.

15

La enzima E₂₈ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende korA, korB, korD, korA1, korA2, korB1, korB2, oorA, oorB, oorC, oorD, oforA, oforB, porA, porB, porA1, porA2, porA3, porA4, porG, porG1, porG2, porB1, porB2, porB3, SCD20.12c, SCD20.13c, SCAH10.34c, SCAH10.35c, korG, orA, orB, korG1 y korG2. Además, en el caso de E₂₈ puede tratarse también de un complejo de deshidrogenasas a base de varias subunidades que presentan diferentes actividades enzimáticas. En particular, se puede tratar de un complejo de deshidrogenasas que comprende una oxoglutarato-deshidrogenasa (EC 1.2.4.2), una dihidrolipoil-deshidrogenasa (EC 1.8.1.4) y una dihidrolipoil-lisin-radical-succinil-transferasa (EC 2.3.1.61). La oxoglutarato-deshidrogenasa (EC 1.2.4.2) es codificada en tal caso preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende ogdh, ghdl, loc239017, mgc68800, mgc80496, cg11661, t22e16.70, mpA24.10, kgd1, aer374cp, sucA, odhA, kgdA y cgl1129, siendo particularmente preferidos sucA y odhA. La dihidrolipoil-deshidrogenasa (EC 1.8.1.4) es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende dld, dldprov, dldh, cg7430, t2j15.6, k14a17.6, at3g17240, mgd8.7lpd1, afr512wp, dld1, lpd, tb03.26j7.650, tb04.3m17.450, tb927.8.7380, tb08.10k10.200, lpdA, lpdG, lpdV, lpd3, acoD, lpdA1, lpdA2, lpdA3, odhL, pdhD, pdhD1, pdhD2, pdhD3, pdhD42, lpdAch1, lpdAch2, lpdAc, acoL, bfmbC, bkdD, cgl0366, cgl0688, scm1.17c, pdhL, sck13.11, lpdB2 y dld1, siendo lpd particularmente preferido. La dihidrolipoil-lisina-radical-succinil-transferasa (EC 2.3.1.61) es codificada en tal caso preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende dlst, dlst-prov, mgc89125, dmel_CG5214, f10m23.250, k13p22.8, kgd2agl200wp, kgd2, odhB, sucB, aceF, kgdB, sucB1, sucB2, pdhC, dlaT, kgd, sc5F7.20 y sc4B10.24c, siendo particularmente preferidos sucB y odhB.

20

25

30

35

Las secuencias de nucleótidos de genes adecuados de la enzima E₂₈ o bien de las subunidades precedentemente mencionadas de la enzima E₂₈ pueden tomarse de nuevo del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

40

Las vías precedentemente descritas del oxalacetato a la succinil-coenzima A parten de fosfoenolpiruvato o de piruvato como precursores del sustrato. A este respecto, puede ser además preferido modificar por tecnología genética a las células de manera que puedan habilitar, a partir de hidratos de carbono y/o a partir de glicerol, cantidades particularmente grandes de piruvato o fosfoenolpiruvato.

45

En la medida en que las células puedan aprovechar glicerol como fuente nutricia, se prefiere que la célula modificada por tecnología genética y empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una, preferiblemente de todas las siguientes enzimas E₂₉ a E₄₂:

50

55

60

- de una enzima E₂₉ que facilita la difusión de glicerol en la célula,
- de una enzima E₃₀ que cataliza la reacción de glicerol para formar glicerol-3-fosfato,
- de una enzima E₃₁ que cataliza la reacción de glicerol-3-fosfato para formar dihidroxiacetona-fosfato,
- de una enzima E₃₂ que cataliza la transferencia de azufre al aceptor de azufre tiorredoxina 1,
- de una enzima E₃₃ que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos bajo formación de alcoholes y glicerol,
- de una enzima E₃₄ que cataliza el transporte de glicerol-3-fosfato en la célula en intercambio por fosfato;
- 55 - de una enzima E₃₅ que cataliza la reacción de dihidroxiacetona-fosfato para formar gliceraldehído-3-fosfato,
- de una enzima E₃₆ que cataliza la reacción de gliceraldehído-3-fosfato para formar 1,3-bifosfoglicerato,
- de una enzima E₃₇ que cataliza la reacción de 1,3-bifosfoglicerato para formar 3-fosfoglicerato,
- de una enzima E₃₈ que cataliza la reacción de 3-fosfoglicerato para formar 2-fosfoglicerato,
- 60 - de una enzima E₃₉ que cataliza la reacción de 2-fosfoglicerato para formar fosfoenolpiruvato,

- de una enzima E₄₀ que cataliza la reacción de fosfoenolpiruvato para formar piruvato,
- de una enzima E₄₁ que cataliza la reacción de glicerol para formar dihidroxiacetona,
- de una enzima E₄₂ que cataliza la reacción de dihidroxiacetona para formar dihidroxiacetona-fosfato.

5 Células particularmente preferidas de acuerdo con la invención son este caso aquellas en las que está reducida la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas E₂₉, E₃₀, E₃₁, E₃₂, E₃₃, E₃₄, E₃₅, E₃₆, E₃₇, E₃₈, E₃₉, E₄₀, E₄₁, E₄₂, E₂₉E₃₀, E₂₉E₃₁, E₂₉E₃₂, E₂₉E₃₃, E₂₉E₃₄, E₂₉E₃₅, E₂₉E₃₆, E₂₉E₃₇, E₂₉E₃₈, E₂₉E₃₉, E₂₉E₄₀, E₂₉E₄₁, E₂₉E₄₂, E₃₀E₃₁, E₃₀E₃₂, E₃₀E₃₃, E₃₀E₃₄, E₃₀E₃₅, E₃₀E₃₆, E₃₀E₃₇, E₃₀E₃₈, E₃₀E₃₉, E₃₀E₄₀, E₃₀E₄₁, E₃₀E₄₂, E₃₁E₃₂, E₃₁E₃₃, E₃₁E₃₄, E₃₁E₃₅, E₃₁E₃₆, E₃₁E₃₇, E₃₁E₃₈, E₃₁E₃₉, E₃₁E₄₀, E₃₁E₄₁, E₃₁E₄₂, E₃₂E₃₃, E₃₂E₃₄, E₃₂E₃₅, E₃₂E₃₆, E₃₂E₃₇, E₃₂E₃₈, E₃₂E₃₉, E₃₂E₄₀, E₃₂E₄₁, E₃₂E₄₂, E₃₃E₃₄, E₃₃E₃₅, E₃₃E₃₆, E₃₃E₃₇, E₃₃E₃₈, E₃₃E₃₉, E₃₃E₄₀, E₃₃E₄₁, E₃₃E₄₂, E₃₄E₃₅, E₃₄E₃₆, E₃₄E₄₇, E₃₄E₃₈, E₃₄E₃₉, E₃₄E₄₀, E₃₄E₄₁, E₃₄E₄₂, E₃₅E₃₆, E₃₅E₃₇, E₃₅E₃₈, E₃₅E₃₉, E₃₅E₄₀, E₃₅E₄₁, E₃₅E₄₂, E₃₆E₃₇, E₃₆E₃₈, E₃₆E₃₉, E₃₆E₄₀, E₃₆E₄₁, E₃₆E₄₂, E₃₇E₃₈, E₃₇E₃₉, E₃₇E₄₀, E₃₇E₄₁, E₃₇E₄₂, E₃₈E₃₉, E₃₈E₄₀, E₃₈E₄₁, E₃₈E₄₂, E₄₀E₄₁, E₄₀E₄₂, E₄₁E₄₂ y E₂₉E₃₀E₃₁E₃₂E₃₃E₃₄E₃₅E₃₆E₃₇E₃₈E₃₉E₄₀E₄₁E₄₂.

15 A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₂₉ sea una aquagliceroporina (facilitador de glicerol) que es codificada preferiblemente por el gen glpF,
- E₃₀ sea una glicerol-quinasa (EC 2.7.1.30) que es codificada preferiblemente por el gen glpK,
- E₃₁ sea una glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.99.5) preferiblemente una glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa dependiente de FAD, siendo codificada la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa preferiblemente por el gen glpA, el gen glpB, el gen glpC o el gen glpD, de manera particularmente preferida por el gen glpD,
- E₃₂ sea una azufre-transferasa que es codificada por el gen glpE,
- E₃₃ sea una glicerolfosfodiesterasa (EC 3.1.4.46) que es codificada preferiblemente por el gen glpQ,
- E₃₄ sea una glicerol-3-fosfato-permeasa que es codificada preferiblemente por el gen glpT,
- E₃₅ sea una triosa fosfato-isomerasa (EC 5.3.1.1),
- E₃₆ sea una gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.2.1.12),
- E₃₇ sea una fosfoglicerato-quinasa (EC 2.7.2.3),
- E₃₈ sea una fosfoglicerato-mutasa (EC 5.4.2.1),
- E₃₉ sea una enolasa (EC 4.2.1.11),
- E₄₀ sea una piruvato-quinasa (EC 2.7.1.40),
- E₄₁ sea una glicerol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.6), que es codificada preferiblemente por el gen gldA, y
- E₄₂ sea una dihidroxiacetona-quinasa (EC 2.7.1.29), que es codificada preferiblemente por el gen dhaK.

35 Las secuencias de genes de las enzimas precedentemente mencionadas pueden tomarse de nuevo de los bancos de datos de genes conocidos por el experto en la materia, en particular del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

40 Además de ello, el gen gap que codifica gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086), el gen tpi que codifica triosa fosfato-isomerasa (Eikmanns (1992) Journal of Bacteriology 174: 6076-6086) y el gen pgk que codifica la 3-fosfoglicerato-quinasa (Eikmanns (1992) Journal of Bacteriology 174: 6076-6086) son también conocidos de otras fuentes.

45 Con los genes conocidos de las enzimas E₂₉ a E₄₂ se pueden preparar células modificadas por tecnología genética en las que al menos una, de manera particularmente preferida al menos dos, de manera más preferida al menos tres y de la manera más preferida todas las actividades de las enzimas E₂₉ a E₄₂ están incrementadas por las técnicas descritas al comienzo en relación con la enzima E₁ (mutación de la enzima o incremento de la expresión de la enzima). Estas células están en condiciones de poder ser cultivadas en presencia de glicerol como única fuente de carbono (o bien junto con hidratos de carbono como otra fuente de carbono).

50 Junto al incremento de una o varias de las actividades de las enzimas E₂₉ a E₄₂ puede ser también ventajoso que la célula sea capaz de aprovechar glicerol como fuente de carbono si en las células empleadas en el procedimiento de acuerdo con la invención son expresados los siguientes genes, preferiblemente de forma heteróloga:

- 55 - el gen glpG o el gen 3925,
- el gen glpX,
- el gen dhaR, el gen ycgU o el gen b1201,
- el gen fsa, el gen mipB, el gen ybiZ o el gen B0825,
- el gen talC, el gen fsaB, el gen yijG o el gen b3946.

60

Las secuencias de nucleótidos de estos genes pueden ser tomadas de nuevo del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

5 En la medida en que las células puedan aprovechar hidratos de carbono como fuente de sustancias nutricias, se prefiere que la célula empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una, preferiblemente de todas las siguientes enzimas E₄₃ a E₄₅ y E₃₆ a E₄₀:

- 10 - de una enzima E₄₃ que cataliza la reacción de α -D-glucosa-6-fosfato para formar β -D-fructosa-6-fosfato,
- de una enzima E₄₄ que cataliza la reacción de β -D-fructosa-6-fosfato en β -D-fructosa-1,6-bifosfato,
- de una enzima E₄₅ que cataliza la reacción de β -D-fructosa-1,6-bifosfato para formar gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato,
- de una enzima E₃₆ que cataliza la reacción de gliceraldehído-3-fosfato para formar 1,3-bifosfoglicerato,
- 15 - de una enzima E₃₇ que cataliza la reacción de 1,3-bifosfoglicerato para formar 3- fosfoglicerato,
- de una enzima E₃₈ que cataliza la reacción de 3-fosfoglicerato para formar 2-fosfoglicerato,
- de una enzima E₃₉ que cataliza la reacción de 2-fosfoglicerato para formar fosfoenolpiruvato, y
- de una enzima E₄₀ que cataliza la reacción de fosfoenolpiruvato para formar piruvato.

20 Células modificadas por tecnología genética particularmente preferidas de acuerdo con la invención son en tal caso aquellas en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₃₆, E₃₇, E₃₈, E₃₉, E₄₀, E₄₃, E₄₄, E₄₅, E₃₆E₃₇, E₃₆E₃₈, E₃₆E₃₉, E₃₆E₄₀, E₃₆E₄₃, E₃₆E₄₄, E₃₆E₄₅, E₃₇E₃₈, E₃₇E₃₉, E₃₇E₄₀, E₃₇E₄₃, E₃₇E₄₄, E₃₇E₄₅, E₃₈E₃₉, E₃₈E₄₀, E₃₈E₄₃, E₃₈E₄₄, E₃₈E₄₅, E₃₉E₄₀, E₃₉E₄₃, E₃₉E₄₄, E₃₉E₄₅, E₄₀E₄₃, E₄₀E₄₄, E₄₀E₄₅, E₄₃E₄₄, E₄₃E₄₅, E₄₄E₄₅ y E₃₆E₃₇E₃₈E₃₉E₄₀E₄₃E₄₄E₄₅.

25 A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₄₃ sea una glucosa-6-fosfato-isomerasa (EC 5.3.1.9),
- E₄₄ sea una 6-fosfofructo-quinasa (EC 2.7.1.11),
- E₄₅ sea una fructosa-bifosfato-aldolasa (EC 4.1.2.13),
- 30 E₃₆ sea una gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.2.1.12),
- E₃₇ sea una fosfoglicerato-quinasa (EC 2.7.2.3),
- E₃₈ sea una fosfoglicerato-mutasa (EC 5.4.2.1),
- E₃₉ sea una enolasa (EC 4.2.1.11) y
- E₄₀ sea una piruvato-quinasa (EC 2.7.1.40).

35 Las secuencias de nucleótidos de estos genes pueden tomarse de nuevo del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

40 Además, cuando la célula es capaz de aprovechar hidratos de carbono como fuente de carbono, se prefiere que, junto a la actividad de las enzimas E₄₃ a E₄₅ y E₃₆ a E₄₀ precedentemente mencionadas se incremente también la absorción de glucosa en las células, por ejemplo mediante el incremento de la actividad de enzimas del sistema de fosfotransferasa, en particular de aquellas enzimas que son codificadas por los genes ptsI, ptsH y ptsM, o por el refuerzo de la glucoquinasa (EC 2.7.1.2) que es codificada preferiblemente por el gen glk. A este respecto, se remite en particular a los documentos US 6.680.187, US 6.818.432, US 6.913.910 y US 6.884.614. También, en el

45 caso de hidratos de carbono como fuente de carbono puede ser ventajoso fomentar la vía de la pentosa fosfato, por ejemplo mediante el incremento de la actividad de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) y de la 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) que es codificada preferiblemente por el gen gnd, y eventualmente al mismo tiempo inhibir la glicolisis, por ejemplo mediante el debilitamiento de la actividad de la glucosa-6-fosfato-

50 isomerasa tal como se describe en el documento WO-A-01/07626.

En la medida en que las células formen ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxialcanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico de acuerdo con la ejecución particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman metilmalonato-semialdehído como producto previo y succinil-coenzima A como producto intermedio, a través de oxalacetato y piruvato como

55 productos intermedios, puede preferirse, además, reducir la actividad de al menos una, preferiblemente de todas las siguientes actividades de enzimas en la célula:

- de una enzima que cataliza la reacción de oxalacetato para formar fosfoenolpiruvato tal como, por ejemplo, la fosfoenolpiruvato-carboxi-quinasa (EC 4.1.1.49) (véase también el documento DE-A-199 50
- 60 409),

- de una enzima que cataliza la reacción de piruvato para formar acetato tal como, por ejemplo, la piruvato-oxidasa (EC 1.2.2.2) (véase también el documento DE-A-199 51 975),
- de una enzima que cataliza la reacción de α -D-glucosa-6-fosfato para formar β -D-fructosa-6-fosfato (véase también el documento US 09/396.478),
- 5 - de una enzima que cataliza la reacción de piruvato para formar lactato tal como, por ejemplo, la 1-lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) o la lactato-malato-transhidrogenasa (EC 1.1.99.7),
- de una enzima que cataliza la reacción de piruvato para formar acetil-coenzima A tal como, por ejemplo, la piruvato-deshidrogenasa (EC 1.2.1.51),
- de una enzima que cataliza la reacción de piruvato para formar acetilfosfato tal como, por ejemplo, la piruvato-oxidasa (EC 1.2.3.3),
- 10 - de una enzima que cataliza la reacción de piruvato para formar acetato tal como, por ejemplo, la piruvato-deshidrogenasa (EC 1.2.2.2),
- de una enzima que cataliza la reacción de piruvato para formar fosfoenol-piruvato tal como, por ejemplo, la fosfoenolpiruvato-sintasa (EC 2.7.9.2) o la piruvato-fosfato-diquinasa (EC 2.7.9.1),
- 15 - de una enzima que cataliza la reacción de piruvato para formar alanina tal como, por ejemplo, la alanin-transaminasa (EC 2.6.1.2) o la alanin-oxácido-transaminasa (EC 2.6.1.12) y/o
- de una enzima que hace reaccionar piruvato para formar acetolactato tal como, por ejemplo, la acetohidroxiácido-sintasa (EC 2.2.1.6).

20 Células particularmente preferidas de acuerdo con la invención que pueden formar ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxiálcanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico a través de succinil-coenzima A como producto intermedio a partir de hidratos de carbono como fuente de carbono y en las que pueden incrementarse una o varias de las actividades de enzimas antes mencionadas, en particular una de las actividades de las enzimas E₁ a E₄₅, más preferiblemente las actividades de enzimas E₁, E₁E₂E₃E₄, E₁E₄E₅E₆E₇ y/o E₁E₄E₅E₇, son aquellos

25 microorganismos que se describen por Bennett et al., *Metab. Eng.* (2005), 7 (3), páginas 229 a 239, Bennett et al., *Biotechnol. Bioeng.* (2005), 90 (6), páginas 775 a 779, Bennett et al., *Biotechnol. Prog.* (2005), 21 (2), páginas 358 a 365, Bennett et al. (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67 (4), páginas 515 a 523, Vemuri et al. (2002), *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4), páginas 1.715 a 1.727 y en el document US 6.455.284.

30 Si, de acuerdo con la primera forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la formación del ácido 3-hidroxiisobutírico o del polihidroxiálcanoato basado en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar a través de succinil-coenzima A como producto intermedio a partir de L-glutamato como fuente de carbono, entonces, de acuerdo con otra forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman metilmalonato-semialdehído

35 como producto previo y succinil-coenzima A como producto intermedio, se prefiere además, de acuerdo con la invención, que la célula empleada presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una, preferiblemente de las dos siguientes enzimas E₂₈ y E₄₆ (véase la Figura 10):

- de una enzima E₄₆ que cataliza la reacción de L-glutamato para formar 2-oxoglutarato;
- 40 - de una enzima E₂₈ que cataliza la reacción de 2-oxoglutarato para formar succinil-coenzima A.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₄₆ sea una glutamato-sintasa (EC 1.4.1.13 o EC 1.4.1.14), una glutamato-deshidrogenasa (EC 1.4.1.2, EC 1.4.1.3 o EC 1.4.1.4) o una aspartato-transaminasa (EC 2.6.1.1 o EC 2.6.1.2) y
- 45 E₂₈ sea una 2-oxoglutarato-sintasa (EC 1.2.7.3).

Como enzimas E₂₈ se prefieren aquellas que ya han sido mencionadas al comienzo como enzimas E₂₈ preferidas.

50 La enzima E₄₆ es codificada preferiblemente por los genes elegidos del grupo que comprende myn8., glt1, adr290wp, gltB, gltD, yeiT, aegA, ygfT, gltD-1, gltD-2, glt1, glt2, gls1, gltA, glxD, gltA, yerD, cg10184, cgl0185, sc3c9.12, gdh1, gdh2, ag140cp, gdhA, gdhA1, gdhA2, gluD, rocG, ypcA, gudB, gluD, gdhA, gdhA2, gdh, gdhA-1, gdhA2-2, gdhA-3, gluD1, gluD2, glud1-prov, glud1a, t1118.2, t211.150, mrg7.13, got1, got2, caspat, got2-prov, xr406-prov, 406-prov, cg4233, cg4233, cg8430, cg8430, f23n19.17, f13j11.16, t26c19.9, f7f1.18, f10n7.200,

55 t1611.170, f15n18.110, t20d1.70, aat, aat1, aat2, abl038wp, afr211cp, agx1, bnA4, aatA, aatB, ybdL, aspC, yfbQ, ydcR, avtA2, aspC-1, aspC-2, aspC-3, aspC-4, aspB, aspB-1, aspB-2, aspB-3, aspB-4, argD1, argD2, aatAc, ywfG, mtnV, alaT, avtA1, avtA2, avtA3, cgl0240, cgl1103, cgl2599, cgl2844, dapC, 2sck36.07c, sc9e12.21, sc2h4.04c, aspB1, aspB2, aspB3, tyrB, gpt, gpt1, gpt2, mgc82097, cg1640, c32f10.8, f20d23.34, f26f24.16, f24j13.15, t10d10.20 y agrwp.

60

Las secuencias de nucleótidos de estos genes pueden tomarse de nuevo del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

5 De acuerdo con una segunda forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética, en la que la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar a través de metilmalonato-semialdehído como producto previo, se prefiere que la formación del ácido 3-hidroxiisobutírico o del polihidroxicanoato basado en ácido 3-hidroxiisobutírico tenga lugar a través de propionil-coenzima A como producto intermedio, siendo capaz de aprovechar la célula empleada preferiblemente hidratos de carbono, glicerol, metano o metanol como fuente de carbono. En tal caso, existen diferentes vías para acceder de la propionil-coenzima A al ácido 3-hidroxiisobutírico o bien los a los polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

15 De acuerdo con una primera alternativa de esta segunda forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, la formación del producto intermedio propionil-coenzima A tiene lugar a través de acetil-coenzima A como producto intermedio adicional. A este respecto, se prefiere particularmente que la célula modificada por tecnología genética empleada presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₄, E₅ y E₄₇ a E₅₂ (véanse las Figuras 11 y 12):

- 20 - de una enzima E₄₇ que cataliza la reacción de acetil-coenzima A para formar malonil-coenzima A;
- de una enzima E₄₈ que cataliza la reacción de malonil-coenzima A para formar malonato-semialdehído;
- de una enzima E₄₉ que cataliza la reacción de malonato-semialdehído para formar 3-hidroxiopropionato;
- de una enzima E₅₀ que cataliza la reacción de 3-hidroxiopropionato para formar 3-hidroxiopropionil-coenzima A;
- 25 - de una enzima E₅₁ que cataliza la reacción de 3-hidroxiopropionil-coenzima A para formar acrilil-coenzima A;
- de una enzima E₅₂ que cataliza la reacción de acrilil-coenzima A para formar propionil-coenzima A;
- de una enzima E₅ que cataliza la reacción de propionil-coenzima A para formar metilmalonato-semialdehído;
- 30 - de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar 3-hidroxiisobutirato.

De manera particularmente preferida de acuerdo con la invención se emplean células modificadas por tecnología genética en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₄₇, E₄₈, E₄₉, E₅₀, E₅₁, E₅₂, E₄, E₅ y E₄₇E₄₈E₄₉E₅₀E₅₁E₅₂E₄E₅.

35 Además, a este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₄ sea una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35),
- 40 E₅ sea una metilmalonato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.27),
- E₄₇ sea una malonil-conenzima A-descarboxilasa (EC 4.1.1.9), una malonato-coenzima A-transferasa (EC 2.8.3.3), una metilmalonil-coenzima A-carboxitransferasa (EC 2.1.3.1) o una acetil-coenzima A-carboxilasa (EC 6.4.1.2),
- E₄₈ sea una malonato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.18),
- 45 E₄₉ sea una 3-hidroxiopropionato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.59),
- E₅₀ sea una 3-hidroxiisobutiril-coenzima A-hidrolasa (EC 3.1.2.4),
- E₅₁ sea una enoil-coenzima-A-hidratasa (EC 4.2.1.17) y
- E₅₂ sea una acil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.3).

50 Genes preferidos para las enzimas E₄ y E₅ son aquellos que ya se han descrito precedentemente en relación con la primera forma de realización particular de la célula de acuerdo con la invención.

La enzima E₄₇ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende mlycd, t19b17.4, tb08.2904.110, matA, acac, acaca, acacb, f5j5.21, f15c21.2, t8p21.5, acc1, aar071wp, accA, accB, accC, accD, accC1, accC2, mmdA, fabG, accD1, accD2, accD3, cgl0831, accBC, dtsR1, accDA, scc24.16c y cgl1327, siendo accA, accC y accD los más preferidos.

La enzima E₄₈ es codificada preferiblemente por el gen iolD.

La enzima E₅₁ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende echS1, ehhadh, hadha, echs1-prov, cg4389, cg4389, cg6543, cg6984, cg8778, ech-1, ech-2, ech-3, ech-4, ech-5, ech-6, ech-7, FCAALL.314, fcaall.21, fox2, eci1,-eci2, paaF, paaG, yfcX, fadB, faoA, rpfF, phaA, phaB, echA1, echA2, echA3, echA4, echA5, echA6, echA7, echA8, e-chA9, echA9, echA10, echA11, echA12, echA13, echA14, e-chA15, echA16, echA17, echA18, echA19, echA20, echA21, fad-1, fad-2, fad-3, dcaE, hcaA, fadJ, rsp0671, rsp0035, rsp0648, rsp0647, rs03234, rs03271, rs04421, rs04419, rs02820, rs02946, paaG1, paaG2, paaG3, ech, pksH, ydbS, eccH1, eccH2, pimF, fabJ1, fabJ2, caiD2, ysiB, yngF, yusL, fucA, cgl0919, scf41.23, scd10.16, sck13.22, scp8.07c, stbac16h6.14, sc5f2a.15, sc6a5.38, hbd-1, hbd-2, hdb-3, hdb-4, hdb-5, hdb-6, hdb-7, hdb-8, hdb-9, hdb-10, fad-1, fad-2, fad-3, fad-4, fad-5, paaF-1, paaF-2, paaF-3, paaF-4, paaF-5, paaF-6, paaF-7 y crt.

La enzima E₅₂ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende acadl, acadm, acad10, acad11, acadmprov, acadl-prov, mgc81873, cg12262, cg4703, cg4860, f3e22.5, afl213wp, acdC, fadE13, acd-1, acd-2, acd-3, acd-4, acd-5, acd-6, acd-7, acd-8, acd-9, acd-10, acd-11, acd-12, acd, fadE1, fadE2, fadE3, fadE4, fadE5, fadE6, fadE7, fadE13, fadE14, fadE15, fadE16, fadE17, fadE18, fadE19, fadE20, fadE21, fadE22, fadE23, fadE26, fadE27, fadE30, fadE31, fadE33, fadE35, fadE38, fadE45, fadE, caiA, aidB, RSp0036, RS03588, mmgC, acdA-3, bcd, acdA, acdH1, acdH2, acdH3, aidB, acdI y acdH.

Las secuencias de nucleótidos de genes adecuados para las enzimas E₄₇ a E₅₂, en particular también de las enzimas E₄₉ y E₅₀ pueden tomarse del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

De acuerdo con una segunda alternativa de esta segunda forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la formación del producto intermedio propionil-coenzima A tiene lugar asimismo a través de acetil-coenzima A como producto intermedio adicional, en donde de acuerdo con esta alternativa, la propionil-coenzima-A no es hecha reaccionar directamente, sino a través de metilmalonil-coenzima A para formar metilmalonato-semialdehído. A este respecto, se prefiere particularmente que la célula modificada por tecnología genética empleada presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₂ a E₄, E₆, E₇ y E₄₇ a E₅₂ (véanse las Figuras 13 y 14):

- de una enzima E₄₇ que cataliza la reacción de acetil-coenzima A para formar malonil-coenzima A;
- de una enzima E₄₈ que cataliza la reacción de malonil-coenzima A para formar malonato-semialdehído;
- de una enzima E₄₉ que cataliza la reacción de malonato-semialdehído para formar 3-hidroxiopropionato;
- de una enzima E₅₀ que cataliza la reacción de 3-hidroxiopropionato para formar 3-hidroxiopropionil-coenzima A;
- de una enzima E₅₁ que cataliza la reacción de 3-hidroxiopropionil-coenzima A para formar acriloil-coenzima A;
- de una enzima E₅₂ que cataliza la reacción de acriloil-coenzima A para formar propionil-coenzima A;
- de una enzima E₇ que cataliza la reacción de propionil-coenzima A para formar (S)-metilmalonil-coenzima A;
- de una enzima E₆ que cataliza la reacción de (S)-metilmalonil-coenzima A para formar (R)-metilmalonil-coenzima A;
- de una enzima E₂ que cataliza la reacción de (R)-metilmalonil-coenzima A para formar metilmalonato;
- de una enzima E₃ que cataliza la reacción de metilmalonato para formar metilmalonato-semialdehído;
- de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar 3-hidroxiisobutirato.

De manera particularmente preferida de acuerdo con la invención se emplean células modificadas por tecnología genética en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₂, E₃, E₄, E₆, E₇, E₄₇, E₄₈, E₄₉, E₅₀, E₅₁, E₅₂ y E₂E₃E₄E₆E₇E₄₇E₄₈E₄₉E₅₀E₅₁E₅₂.

Enzimas y genes preferidos de estas enzimas son aquellos genes y enzimas que ya han sido citados precedentemente en relación con las enzimas E₂ a E₄, E₆, E₇ y E₄₇ a E₅₂.

Conforme a una tercera alternativa de esta primera alternativa de la segunda forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, la formación del producto intermedio propionil-coenzima A tiene lugar asimismo a través de acetil-coenzima A como producto intermedio adicional, haciéndose reaccionar conforme a esta alternativa la propionil-coenzima A asimismo de forma no directa, sino a través de (R)-metilmalonil-coenzima A (y no a través de (S)-metilmalonil-coenzima A) para formar metilmalonato-semialdehído. A este respecto, se prefiere particularmente que la célula modificada por tecnología genética empleada presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₂ a E₄, E₇ y E₄₇ a

E₅₂ (véanse las Figuras 15 y 16):

- de una enzima E₄₇ que cataliza la reacción de acetil-coenzima A para formar malonil-coenzima A;
- de una enzima E₄₈ que cataliza la reacción de malonil-coenzima A para formar malonato-semialdehído;
- 5 - de una enzima E₄₉ que cataliza la reacción de malonato-semialdehído para formar 3-hidroxiipropionato;
- de una enzima E₅₀ que cataliza la reacción de 3-hidroxiipropionato para formar 3-hidroxiipropionil-coenzima A;
- de una enzima E₅₁ que cataliza la reacción de 3-hidroxiipropionil-coenzima A para formar acriloil-coenzima A;
- 10 - de una enzima E₅₂ que cataliza la reacción de acriloil-coenzima A para formar propionil-coenzima A;
- de una enzima E₇ que cataliza la reacción de propionil-coenzima A para formar metilmalonil-coenzima A;
- de una enzima E₂ que cataliza la reacción de metilmalonil-coenzima A para formar metilmalonato;
- de una enzima E₃ que cataliza la reacción de metilmalonato para formar metilmalonato-semialdehído;
- 15 - de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar 3-hidroxiisobutirato.

De manera particularmente preferida de acuerdo con la invención se emplean células modificadas por tecnología genética en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₂, E₃, E₄, E₇, E₄₇, E₄₈, E₄₉, E₅₀, E₅₁, E₅₂ y E₂E₃E₄E₇E₄₇E₄₈E₄₉E₅₀E₅₁E₅₂.

20 Enzimas y genes preferidos también de estas enzimas son de nuevo aquellos genes y enzimas que ya se citaron precedentemente en relación con las enzimas E₂ a E₄, E₇ y E₄₇ a E₅₂.

De acuerdo con una cuarta alternativa de la segunda forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, la formación del producto intermedio propionil-coenzima A tiene lugar asimismo a través de acetil-coenzima A como producto intermedio adicional, formándose conforme a esta alternativa acetoacetilcoenzima A como producto intermedio. A este respecto, se prefiere particularmente que la célula modificada por tecnología genética empleada presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₈ y E₅₃ a E₆₁.

- 30 - de una enzima E₅₃ que cataliza la reacción de dos unidades de acetil-coenzima A para formar acetoacetil-coenzima A;
- de una enzima E₅₄ que cataliza la reacción de acetoacetilcoenzima A para formar 3-hidroxiibutanoil-coenzima A;
- 35 - de una enzima E₅₅ que cataliza la reacción de 3-hidroxiibutanoil-coenzima A para formar crotonil-coenzima A;
- de una enzima E₅₆ que cataliza la reacción de crotonil-coenzima A para formar butiril-coenzima A;
- de una enzima E₅₇ que cataliza la reacción de butiril-coenzima A para formar etilmalonil-coenzima A;
- 40 - de una enzima E₅₈ que cataliza la reacción de etilmalonil-coenzima A para formar metilsuccinil-coenzima A;
- de una enzima E₅₉ que cataliza la reacción de metilsuccinil-coenzima A para formar isobutiril-coenzima A;
- de una enzima E₆₀ que cataliza la reacción de isobutiril-coenzima A para formar metacrilil-coenzima A;
- de una enzima E₆₁ que cataliza la reacción de metacrilil-coenzima A para formar 3-hidroxiisobutiril-coenzima A;
- 45 - de una enzima E₈ que cataliza la reacción de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A para formar 3-hidroxiisobutirato.

Células modificadas por tecnología genética particularmente preferidas de acuerdo con la invención son en tal caso aquellas en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₈, E₅₃, E₅₄, E₅₅, E₅₆, E₅₇, E₅₈, E₅₉, E₆₀, E₆₁ y E₈E₅₃E₅₄E₅₅E₅₆E₅₇E₅₈E₅₉E₆₀E₆₁.

Esta vía del metabolismo y las enzimas que participan en esta vía del metabolismo están descritas, por ejemplo, en Korotkova et al., *Journal of Bacteriology* (2002), páginas 1.750 a 1.758.

55 De acuerdo con una quinta alternativa de la segunda forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, la formación del producto intermedio propionil-coenzima A tiene lugar de nuevo a través de acetil-coenzima A como producto intermedio adicional, formándose de acuerdo con esta modificación asimismo acetoatil-coenzima A como producto intermedio adicional, pero formándose en este caso a partir de crotonil-coenzima A directamente etilmalonil-coenzima A. A este respecto, se puede preferir que la célula presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₈, E₅₃ a

60

E₅₅, E₅₈ y E₆₂ a E₆₅ (véase la Figura 17):

- de una enzima E₅₃ que cataliza la reacción de dos unidades de acetil-coenzima A para formar acetoacetyl-coenzima A;
- 5 - de una enzima E₅₄ que cataliza la reacción de acetoacetyl-coenzima A para formar 3-hidroxiacetyl-coenzima A;
- de una enzima E₅₅ que cataliza la reacción de 3-hidroxiacetyl-coenzima A para formar crotonil-coenzima A;
- de una enzima E₆₂ que cataliza la reacción de crotonil-coenzima A para formar etilmalonil-coenzima A;
- 10 - de una enzima E₅₈ que cataliza la reacción de etilmalonil-coenzima A para formar metilsuccinil-coenzima A;
- de una enzima E₆₃ que cataliza la reacción de metilsuccinil-coenzima A para formar mesaconil-coenzima A;
- de una enzima E₆₄ que cataliza la reacción de mesaconil-coenzima A para formar β-metilmalil-coenzima A;
- 15 - de una enzima E₆₅ que cataliza la reacción de β-metilmalil-coenzima A para formar glioxilato y propionil-coenzima A.

20 A partir de la propionil-coenzima A puede formarse entonces ácido 3-hidroxiisobutírico de la manera precedentemente descrita (incremento de la actividad de una o varias de las enzimas E₇, E₂, E₃ y E₄, incremento de la actividad de una o varias de las enzimas E₇, E₆, E₂, E₃ y E₄ o incremento de la actividad de una o de las dos enzimas E₄ y E₅).

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- 25 - E₅₃ sea una β-cetotiolasa (EC 2.3.1.9),
- E₅₄ sea una acetoacetyl-coenzima A-reductasa (una EC 1.1.1.36),
- E₅₅ sea una enoil-coenzima A-hidratasa (EC 4.2.1.17),
- E₆₂ sea una crotonil-coenzima A-descarboxilasa,
- 30 - E₅₈ sea una etilmalonil-coenzima A-mutasa (EC 5.4.99.2),
- E₆₃ sea una metilsuccinil-coenzima A-deshidrogenasa,
- E₆₄ sea una mesaconil-coenzima A-hidratasa y
- E₆₅ sea una β-metilmalil/L-malil-coenzima A-liasa.

35 La enzima E₅₃ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo consistente en *acat1*, *acat2*, *loc484063*, *loc489421*, *mgc69098*, *mgc81403*, *mgc81256*, *mgc83664*, *kat-1*, *erg10*, *ygeF*, *atoB*, *fadAx*, *phbA-1*, *phbA-2*, *atoB-2*, *pcaF*, *pcaF-2*, *phb-A*, *bktB*, *phaA*, *tiol*, *thlA*, *fadA*, *paaJ*, *phbAf*, *pimB*, *mmgA*, *yhfS*, *th1*, *vraB*, *th1*, *mvaC*, *thiL*, *paaJ*, *fadA3*, *fadA4*, *fadA5*, *fadA6*, *cgl12392* *catF*, *sc8f4.03*, *thiL1*, *thiL2*, *acaB1*, *acaB2*, *acaB3* o *acaB4*, siendo particularmente preferidos *acat1*, *acat2*, *atoB* y *phbA*, así como el correspondiente gen de *Rhodobacter sphaeroides*.

40 La enzima E₅₄ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo consistente en *phbB*, *fabG*, *phbN1*, *phbB2* o *cgl12444*, siendo particularmente preferido *phbB*, y siendo particularmente preferido el correspondiente gen de *Rhodobacter sphaeroides*.

45 La enzima E₅₅ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo consistente en *echS1*, *ehhadh*, *hadha*, *echS1-prov*, *cg4389*, *cg4389*, *cg6543*, *cg6984*, *cg8778*, *ech-1*, *ech-2*, *ech-3*, *ech-4*, *ech-5*, *ech-6*, *ech-7*, *FCAALL.314*, *fcaall.21*, *fox2*, *eci1*, *eci2*, *paaF*, *paaG*, *yfcX*, *fadB*, *faoA*, *rpfF*, *phaA*, *phaB*, *echA1*, *echA2*, *echA3*, *echA4*, *echA5*, *echA6*, *echA7*, *echA8*, *e-chA9*, *echA9*, *echA10*, *echA11*, *echA12*, *echA13*, *echA14*, *e-chA15*, *echA16*, *echA17*, *echA18*, *echA19*, *echA20*, *echA21*, *fad-1*, *fad-2*, *fad-3*, *dcaE*, *hcaA*, *fadJ*, *rsp0671*, *rsp0035*, *rsp0648*, *rsp0647*, *rs03234*, *rs03271*, *rs04421*, *rs04419*, *rs02820*, *rs02946*, *paaG1*, *paaG2*, *paaG3*, *ech*, *pksH*, *ydbS*, *eccH1*, *eccH2*, *pimF*, *fabJ1*, *fabJ2*, *caiD2*, *ysiB*, *yingF*, *yusL*, *fucA*, *cgl0919*, *scf41.23*, *scd10.16*, *sck13.22*, *scp8.07c*, *stbac16h6.14*, *sc5f2a.15*, *sc6a5.38*, *hbd-1*, *hbd-2*, *hdb-3*, *hdb-4*, *hdb-5*, *hdb-6*, *hdb-7*, *hdb-8*, *hdb-9*, *hdb-10*, *fad-1*, *fad-2*, *fad-3*, *fad-4*, *fad-5*, *paaF-1*, *paaF-2*, *paaF-3*, *paaF-4*, *paaF-5*, *paaF-6*, *paaF-7* y *crt*, siendo particularmente preferido el correspondiente gen de *Rhodobacter sphaeroides*.

55 Genes adecuados para la enzima E₅₈ se eligen del grupo consistente en *mut*, *mutA*, *mutB*, *sbm*, *sbmA*, *sbmB*, *sbm5*, *bhbA*, *mcmA*, *mcmA1*, *mcmA2*, *mcmB*, *mcm1*, *mcm2*, *mcm3*, *icmA*, *meaA1* y *meaA2*, siendo aquí también particularmente preferido el correspondiente gen de *Rhodobacter sphaeroides*.

60

En calidad de enzima E₆₂ se emplea preferiblemente una enzima de *Rhodobacter sphaeroides* que es codificada por la secuencia de ADN con la SEQ.-ID.-NO. 05 y que presenta la secuencia de aminoácidos conforme a SEQ.-ID.-NO. 06.

5 Genes preferidos para las enzimas E₆₃, E₆₄ y E₆₅ son, en particular, los genes para estas enzimas de *Rhodobacter sphaeroides*.

Otros ejemplos de secuencias de nucleótidos de los genes precedentemente mencionados pueden tomarse, entre otros, también del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

10 Como ya se explicado precedentemente, en el caso de la primera alternativa de la segunda forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el ácido 3-hidroxiisobutírico o los polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico se forman a través de propionil-coenzima A y acetil-coenzima A como productos intermedios. En este caso, puede ser básicamente conveniente ejercer junto a una influencia de una o varias de las actividades de enzimas precedentemente mencionados E₂ a E₈ y E₄₇ a E₆₅, influir también sobre aquellas actividades de enzimas que conducen a un aumento de la formación de acetil-coenzima A en la célula.

15 Si el ácido 3-hidroxiisobutírico se forma a partir de hidratos de carbono o a partir de glicerol como fuente de carbono, entonces se puede preferir que la célula presente una actividad incrementada de una enzima E₆₆ que cataliza la reacción de piruvato para formar acetil-coenzima A. En el caso de esta enzima E₆₆ se trata preferiblemente de una piruvato-deshidrogenasa (EC. 1.2.1.51).

20 Si el ácido 3-hidroxiisobutírico se forma a partir de fuentes de carbono C₁ tales como, por ejemplo, metano o metanol, entonces se puede preferir que la célula presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las enzimas E₆₇ a E₇₁:

- de una enzima E₆₇ que cataliza la reacción de metano para formar metanol;
- de una enzima E₆₈ que cataliza la reacción de metanol para formar formaldehído;
- de una enzima E₆₉ que cataliza la reacción de formaldehído para formar 5,10-metiltetrahidrofolato;
- 30 - de una enzima E₇₀ que cataliza la reacción de 5,10-metiltetrahidrofolato para formar 5-metiltetrahidrofolato;
- de una enzima E₇₁ que cataliza la reacción de 5-metiltetrahidrofolato para formar acetil-coenzima A.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₆₇ sea una metano-monooxigenasa (EC 1.14.13.25),
- E₆₈ sea una metanol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.244),
- E₆₉ sea una metilmalonato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.27),
- E₇₀ sea una metiltetrahidrofolato-reductasa (EC 1.5.1.20),
- 40 E₇₁ sea un monóxido de carbono-deshidrogenasa (EC 1.2.99.2).

Las secuencias de nucleótidos de genes adecuados para las enzimas E₆₃ a E₆₇ pueden tomarse, entre otros, también del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

45 De acuerdo con una tercera forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética, en la que la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar a través de metilmalonato-semialdehído como producto previo, se prefiere que la formación del ácido 3-hidroxiisobutírico o del polihidroxicanoato basado en el ácido 3-hidroxiisobutírico tenga lugar a través de acrilil-coenzima A como producto intermedio, en donde la célula empleada debe poder aprovechar preferiblemente hidratos de carbono, glicerol o glutamato como fuente de carbono.

55 En relación con la tercera forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, se prefiere particularmente que la célula modificada por tecnología genética empleada presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₂ a E₄, E₆₂, E₇₂ y E₇₃ (véase la Figura 18):

- de una enzima E₇₂ que cataliza la reacción de beta-alanina para formar beta-alanil-coenzima A,
- de una enzima E₇₃ que cataliza la reacción de beta-alanil-coenzima A para formar acrilil-coenzima A,
- 60 - de una enzima E₆₂ que cataliza la reacción de acrilil-coenzima A para formar metilmalonil-coenzima A (o

- la reacción de crotonil-coenzima A para formar etilmalonil-coenzima A),
- de una enzima E₂ que cataliza la reacción de metilmalonil-coenzima A para formar metilmalonato;
 - de una enzima E₃ que cataliza la reacción de metilmalonato para formar metilmalonato-semialdehído;
 - de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar ácido 3-hidroxiisobutírico.

5 Células particularmente preferidas de acuerdo con la invención son en tal caso aquellas en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₆₂E₂, E₆₂E₃, E₆₂E₄, E₆₂E₂E₃ y E₇₂E₇₃E₆₂E₂E₃E₄. También en relación con la cuarta forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención puede ser ventajoso emplear una célula modificada por tecnología genética en la que se sobre-expresa una enzima que pueda catalizar al menos dos de las etapas de reacción precedentemente descritas. Así, también aquí puede emplearse, por ejemplo, una enzima que presente tanto la actividad de la enzima E₂ como también la de la enzima E₃, tal como, por ejemplo la malonil-coenzima A-reductasa de *Sulfolobus tokodaii* que es codificada por la secuencia de ADN con la SEQ.-ID.-NO. 03 y que presenta la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ.-ID.-NO. 04. Además, en relación con la cuarta forma de realización particular de la célula de acuerdo con la invención, es básicamente también posible emplear una célula que ya está en condiciones de formar cantidades particularmente grandes de acrilil-coenzima A.

20 A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- E₇₂ sea una coenzima A-transferasa (EC 2.8.3.1) o coenzima A-sintetasa, preferiblemente una coenzima A-transferasa,
- E₇₃ sea una beta-alanil-coenzima A-amonio-liasa (EC 4.3.1.6),
- E₆₂ sea una crotonil-coenzima A-d Descarboxilasa,
- 25 E₂ sea una metilmalonil-coenzima A-hidrolasa (EC 3.1.2.17),
- E₃ sea una aldehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.3) o un aldehído-oxidasa (EC 1.2.3.1) y
- E₄ sea una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35).

30 Enzimas E₇₂ preferidas con una actividad de CoA-transferasa son aquellas de *Megasphaera elsdenii*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium kluyveri* y también de *Escherichia coli*. Como ejemplos de una secuencia de ADN que codifica una CoA-transferasa se ha de mencionar en este punto la secuencia de *Megasphaera elsdenii* designada en el documento WO-A-03/062173 con la SEQ.-ID.-NO.: 24. Enzimas adicionalmente preferidas son aquellas variantes de la CoA-transferasa que se describen en el documento WO-A-03/062173.

35 Enzimas E₇₃ adecuadas con una actividad de beta-alanil-coenzima A-amonio-liasa son, por ejemplo, las de *Clostridium propionicum*. Secuencias de ADN que codifican una enzima de este tipo pueden obtenerse, por ejemplo, de *Clostridium propionicum* tal como se describe en el Ejemplo 10 del documento WO-A-03/062173. La secuencia de ADN que codifica la beta-alanil-coenzima A-amonio-liasa de *Clostridium propionicum* se indica en el documento WO-A-03/062173 como SEQ.-ID.-NO.: 22.

40 Como enzima E₆₂ se emplea preferiblemente de nuevo la crotonil-coenzima A-d Descarboxilasa de *Rhodobacter sphaeroides* que es codificada por la secuencia de ADN con la SEQ.-ID.-NO.: 05 y que presenta la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ.-ID.-NO.: 06. Esta enzima no sólo está en condiciones de hacer reaccionar crotonil-coenzima A para formar etilmalonil-coenzima A, sino también acrilil-coenzima A para formar metilmalonil-coenzima A.

45 Genes adecuados para las enzimas E₂ a E₄ ya se mencionaron en relación con la primera variante del procedimiento de acuerdo con la invención, siendo también preferido en relación con relación a la segunda variante, siendo preterido en particular como gen para la enzima E₃ el gen precedentemente descrito de *Sulfolobus tokodaii*.

50 De acuerdo con una variante particularmente preferida de la tercera forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención se emplea una célula modificada por tecnología genética que, en comparación con su tipo salvaje, presenta al menos una actividad incrementada de las enzimas E₂ y E₆₂ o bien de las enzimas E₂, E₃ y E₆₂, siendo codificada la enzima E₂ o bien las enzimas E₂ y E₃ por una secuencia de ADN conforme a SEQ.-ID.-NO.: 03 y siendo codifica la enzima E₆₂ por una secuencia de ADN conforme a SEQ.-ID.-NO.: 05. A este respecto, se prefiere que la actividad incrementada de estas dos enzimas se alcance debido a que los polipéptidos con SEQ.-ID.-NO.: 04 y SEQ.-ID.-NO.: 06 o bien las secuencias de aminoácidos que presentan una identidad de al menos el 50%, preferiblemente de al menos el 55%, más preferiblemente de al menos el 60%,

más preferiblemente al menos el 65% y de la manera más preferida de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos conforme a SEQ.-ID.-NO.: 04 o bien SEQ.-ID.-NO.: 06. En tal caso, estas dos secuencias de ADN pueden estar integradas en el genoma de la célula o pueden presentarse en un vector en el interior de la célula.

5 En relación con la tercera forma de realización particular, precedentemente descrita, del procedimiento de acuerdo con la invención puede ser ventajoso, además, que la célula modificada por tecnología genética empleada presente, junto al aumento de la actividad de la enzima E₆₂ y/o de la enzima E₂ o bien de las enzimas E₂ y E₃, al menos una, preferiblemente las dos de las siguientes propiedades:

10 - una actividad de una enzima E₁₁, incrementada en comparación con su tipo salvaje, que cataliza la reacción de piruvato para formar oxalacetato, o de una enzima E₇₄ que cataliza la reacción de fosfoenolpiruvato para formar oxalacetato, pero preferiblemente de una enzima E₁₁ que cataliza la reacción de piruvato para formar oxalacetato, así como

15 - una actividad incrementada de una enzima E₇₅ que cataliza la reacción de aspartato para formar beta-alanina.

20 En el caso de la enzima E₁₁ se trata preferiblemente de una carboxilasa, de manera particularmente preferida de una piruvato-carboxilasa (número EC 6.4.1.1) que cataliza la reacción de piruvato para formar oxalacetato. Una piruvato-carboxilasa particularmente preferida a este respecto, es aquel mutante que se describe en "A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant.", Ohnishi J et al., Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 58 (2), páginas 217-223 (2002). En el caso de esta mutación se reemplazó el aminoácido prolina en la posición 458 por serina.

25 En el caso de la enzima E₇₅ se trata preferiblemente de una descarboxilasa, de manera particularmente preferida de una glutamato-descarboxilasa o de una aspartato-descarboxilasa, siendo la más preferida 1-aspartato-1-descarboxilasa (número EC 4.1.1.11), que es codificada por el gen panD. La aspartato-descarboxilasa cataliza la reacción de aspartato para formar beta-alanina. Genes para la aspartato-descarboxilasa (genes panD), entre otros de *Escherichia coli* (FEMS Microbiology Letters, 143, páginas 247-252 (1996)), "Photorhabdus luminescens subsp. Laumondii, Mycobacterium bovis subsp. Bovis") así como de numerosos otros microorganismos ya fueron clonados y secuenciados. En particular, la secuencia de nucleótidos del gen panD de *Corynebacterium glutamicum* está descrito en el documento DE-A-198 55 313. Básicamente, pueden utilizarse genes panD de cualquier origen imaginable, independientemente de que sea de bacterias, levaduras u hongos. Además, pueden utilizarse todos los alelos del gen panD, en particular también aquellos que resultan de la capacidad de degeneración del código genético mediante mutaciones sentidos (sense mutations) funcionales neutras. Una aspartato-descarboxilasa particularmente preferida de acuerdo con la invención junto a la aspartato-descarboxilasa de *Corynebacterium glutamicum* es la mutante DV9 de *Escherichia coli* (Vallari y Rock, Journal of Bacteriology, 164, páginas 136-142 (1985)). La preparación de células recombinantes, en las que está incrementada tanto la actividad de la piruvato-carboxilasa como también la actividad de la aspartato-descarboxilasa, se describe en el documento DE-A-10 2005 40 048 818.

45 Conforme a una segunda variante del procedimiento de acuerdo con la invención, la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiálcanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar a través de ácido 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como producto previo.

50 Si en el procedimiento de acuerdo con la invención se emplea una célula en la que la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiálcanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar conforme a la segunda variante a través de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como producto previo, se prefiere, conforme a una primera forma de realización particular, que la formación del ácido 3-hidroxiisobutírico o del polihidroxiálcanoato basado en ácido 3-hidroxiisobutírico tenga lugar a través de isobutiril-coenzima A como producto intermedio, siendo capaz de aprovechar la célula preferiblemente hidratos de carbono, glicerol o L-valina en calidad de fuente de carbono.

55 En la medida en que hidratos de carbono o glicerol sirvan como fuente de carbono, conforme a una primera alternativa de esta primera forma de realización particular de la segunda variante del procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere emplear una célula modificada por tecnología genética que presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de una de las siguientes enzimas E₇₆ a E₇₉, E₆₀, E₆₁ y E₈ (véase la Figura 19):

60 - de una enzima E₇₆ que cataliza la reacción de piruvato para formar 2-acetolactato;

- de una enzima E₇₇ que cataliza la reacción de 2-acetolactato para formar 2,3-dihidroxiisovalerato;
- de una enzima E₇₈ que cataliza la reacción de 2,3-dihidroxiisovalerato para formar 2-oxoisovalerato;
- de una enzima E₇₉ que cataliza la reacción de 2-oxoisovalerato para formar isobutiril-coenzima A;
- de una enzima E₆₀ que cataliza la reacción de isobutiril-coenzima A para formar metacrilil-coenzima A;
- 5 - de una enzima E₆₁ que cataliza la reacción de metacrilil-coenzima A para formar 3-hidroxiisobutiril-coenzima A;
- de una enzima E₈ que cataliza la reacción de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A para formar 3-hidroxiisobutirato.

10 De manera particularmente preferida de acuerdo con la invención, se emplean células modificadas por tecnología genética en las que está incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₈, E₆₀, E₆₁, E₇₆, E₇₇, E₇₈, E₇₉ y E₈E₆₀E₆₁E₇₆E₇₇E₇₈E₇₉.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- 15
- E₈ sea una 3-hidroxiisobutiril-coenzima A-hidrolasa (EC 3.1.2.4),
 - E₇₆ sea una acetolactato-sintasa (EC 2.2.1.6),
 - E₇₇ sea una dihidroxiisovalerato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.86),
 - E₇₈ sea una 2,3-dihidroxiisovalerato-deshidratasa (EC 4.2.1.9),
 - 20 E₇₉ sea una 2-oxoisovalerato-deshidrogenasa (EC 1.2.1.25 o EC 1.2.4.4),
 - E₆₀ sea una acil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.3), una butiril-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.2) o una 2-metilacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.12), y
 - E₆₁ sea una enoil-coenzima A-hidratasa (EC 4.2.1.17).

25 Enzimas E₈, E₆₀ y E₆₁ preferidas son aquellas que ya han sido descritas precedentemente.

La enzima E₇₆ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende ilvbl, t8p19.70, ilv1, ilv2, ilv6, aal021wp, ael305cp, ilvI, ilvH, ilvN, ilvB, ilvM, ilvG, ilvN, budB, ilvN-1, ilvN-2, atrC, ilvX, iolD, budB, alsS, ilvK, ilvB1, ilvB2, ilvB3, ilvN1, ilvN2, cgl1271, cgl1272, iolD y scc57A.40c.

30 La enzima E₇₇ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende f14p22.200, ilv5, acl198Wp, ilvC, ilvY, ilvC-1, ilvC-2, ilvC-3 y cgl1273, siendo el más preferido el gen ilvC.

35 La enzima E₇₈ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende f14o13.18, ilv3, acl117wp, ilvD, cgl1268, ilvD1 e ilvD2, siendo el más preferido ilvD.

En la medida en que L-valina sirva como fuente de carbono, se prefiere conforme a una segunda modificación de la primera forma de realización particular de la segunda alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiacanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar a través de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como producto previo e isobutiril-coenzima A como producto intermedio, que esta célula empleada presente una actividad incrementada en comparación con su tipo salvaje de al menos una de las siguientes enzimas E₇₉, E₈₀, E₆₀, E₆₁ y E₈ (véase la Figura 20):

- 45 - de una enzima E₈₀ que cataliza la reacción de L-valina para formar 2-oxoisovalerato;
- de una enzima E₇₉ que cataliza la reacción de 2-oxoisovalerato para formar isobutiril-coenzima A;
- de una enzima E₆₀ que cataliza la reacción de isobutiril-coenzima A para formar metacrilil-coenzima A;
- de una enzima E₆₁ que cataliza la reacción de metacrilil-coenzima A para formar 3-hidroxiisobutiril-coenzima A;
- 50 - de una enzima E₈ que cataliza la reacción de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A para formar 3-hidroxiisobutirato.

De manera particularmente preferida de acuerdo con la invención se emplean células modificadas por tecnología genética en las que esta incrementada la actividad de las siguientes enzimas o combinaciones de enzimas: E₈, E₆₀, E₆₁, E₇₉, E₈₀ y E₈E₆₀E₆₁E₇₉E₈₀.

A este respecto, se prefiere particularmente que la enzima

- 60
- E₈ sea una 3-hidroxiisobutiril-coenzima A-hidrolasa (EC 3.1.2.4),
 - E₆₀ sea una acil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.3), una butiril-coenzima A-deshidrogenasa (EC

1.3.99.2) o una 2-metilacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.12),
 E₆₁ sea una enoil-coenzima A-hidratasa (EC 4.2.1.17),
 E₇₉ sea una 2-oxoisovalerato-deshidrogenasa (EC 1.2.1.25 o EC 1.2.4.4) y
 E₈₀ sea una aminoácido-transferasa (EC 2.6.1.42).

5

Enzimas E₈, E₆₀, E₆₁ y E₇₉ preferidas son aquellas que ya han sido descritas precedentemente.

La enzima E₈₀ es codificada preferiblemente por genes elegidos del grupo que comprende bcat1, bcat2, t2711.8, t2711.9, f2j10.5, f2j10.4, t12h1.16, mmb12.20, t9c5.3, mpa24.13, bat1, bat2, adl384wp, eca39, bcaA, ilvE, ilvE1, ilvE2, ilvE3, ywaA, ybgE, bcaT y cgl2204, siendo particularmente preferido ilvE.

10

Las secuencias de nucleótidos de genes adecuados de la enzima E₈₀ pueden tomarse de nuevo del banco de datos de KEGG, del banco de datos de NCBI o del banco de datos de EMBL.

15 En relación con esta segunda alternativa de la primera forma de realización particular de la segunda variante del procedimiento de acuerdo con la invención puede ser, además, ventajoso emplear una célula modificada por tecnología genética en la que esté disminuida la actividad de una enzima E₄, la cual cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar ácido 3-hidroxiisobutírico tratándose de esta enzima E₄, preferiblemente, de una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o de una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35).

20

Además, conforme a la segunda modificación de la primera forma de realización particular de la segunda variante del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiacanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar a través de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como producto previo y de isobutiril-coenzima A como producto intermedio y partiendo de L-valina como fuente de carbono, se puede preferir emplear aquellas células que ya pueden formar grandes cantidades de L-valina. En este caso, entran en consideración, en particular, aquellas células que fueron descritas en *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 73 (7) (2007), páginas 2.079-2.084 de Blombach et al.

25

De acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere, además, que la célula modificada por tecnología genética empleada presente una expresión incrementada con respecto a su tipo salvaje del gen glbO. Además, bajo determinadas circunstancias puede preferirse que la célula modificada por tecnología genética empleada presente una actividad disminuida en comparación con su tipo salvaje de la proteína con transporte citrato que es codificada por el gen dctA o el gen citP.

30

La célula modificada por tecnología genética y empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención se puede obtener, preferiblemente, mediante un procedimiento que comprende la etapa de procedimiento del aumento de la actividad de al menos una de las enzimas precedentemente descritas, preferiblemente una o varias de las enzimas

35

- E₁ a E₄,
- E₁, E₄, E₅, E₆ y E₇,
- E₁, E₄, E₅ y E₇,
- 45 - E₄, E₅ y E₄₇ a E₅₂,
- E₂ a E₄, E₆, E₇ y E₄₇ a E₅₂,
- E₂ a E₄, E₇ y E₄₇ a E₅₂,
- E₈ y E₅₃ a E₆₁,
- E₈, E₅₃ a E₅₅, E₅₈ y E₆₂ a E₆₄,
- 50 - E₂ a E₃, E₆₂, E₇₂ y E₇₃,
- E₈, E₆₀, E₆₁ y E₇₆ a E₇₉, o
- E₈, E₆₀, E₆₁, E₇₉ y E₈₀

55

en la célula teniendo lugar el incremento de la actividad enzimática preferiblemente mediante los procedimientos descritos al comienzo.

En la etapa IA) del procedimiento de acuerdo con la invención, las células modificadas por tecnología genética pueden ser puestas en contacto con el medio nutricio y, por consiguiente, cultivadas de forma continua o discontinua en el procedimiento por tandas (cultivo por tandas) o en el procedimiento de alimentación por tandas (procedimiento de afluencia) o en el procedimiento de alimentación por tandas repetido (procedimiento de afluencia

60

repetitivo) con el fin de la producción de 3-hidroxiisobutirato o de polihidroxiacanoatos basados en 3-hidroxiisobutirato. También es imaginable un procedimiento semi-continuo tal como se describe en el documento GB-A-1009370. Una recopilación sobre medios de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de Chmiel (*"Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik"* (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en libro de texto de Storhas (*"Bioreaktoren und periphere Einrichtungen"*, editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994).

El medio de cultivo a utilizar debe satisfacer las exigencias de las respectivas cepas. Descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos están contenidas en el manual *"Manual of Methods for General Bacteriology"* de American Society for Bacteriology (Washington D. C., EE.UU., 1981).

Como fuente de carbono pueden utilizarse hidratos de carbono tales como, p. ej., glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa, aceites y grasas tales como, p. ej., aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite y grasa de coco, ácidos grasos tales como, p. ej., ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como, p. ej., glicerol y metanol, hidrocarburos tales como metano, aminoácidos tales como L-glutamato o L-valina, o ácidos orgánicos tal como, p. ej., ácido acético. Estas sustancias pueden utilizarse individualmente o en forma de mezcla. Se prefiere particularmente el empleo de hidratos de carbono, en particular monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos tal como se describe en los documentos US 6.01.494 y US 6.136.576, de azúcares C₅ o de glicerol.

Como fuente de nitrógeno pueden utilizarse compuestos nitrogenados orgánicos tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, líquido de maceración de maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno pueden utilizarse individualmente o en forma de mezcla.

Como fuente de fósforo pueden utilizarse ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio o hidrógeno-fosfato de dipotasio o las correspondientes sales con contenido en sodio. El medio de cultivo debe contener, además, sales de metales tales como, p. ej., sulfato de magnesio o sulfato de hierro que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, pueden emplearse, adicionalmente a las sustancias arriba mencionadas, sustancias para el crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas. Al medio de cultivo se le pueden añadir, además, precursores adecuados. Las sustancias de partida mencionadas pueden añadirse al cultivo en forma de una tanda de una vez o aportarse de manera adecuada durante el cultivo.

Para el control del pH del cultivo se emplean de manera adecuada compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o bien agua amoniacal, o compuestos de carácter ácido tal como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control del desarrollo de la espuma pueden emplearse agentes antiespumantes tales como, p. ej., poliglicolésteres de ácidos grasos. Para conservar la estabilidad de plásmidos pueden añadirse al medio sustancias de acción selectiva adecuadas tales como, p. ej., antibióticos. Con el fin de conservar las condiciones aerobias se incorporan en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas con contenido en oxígeno tales como, p. ej., aire. La temperatura del cultivo se encuentra normalmente en 20°C a 45°C y, preferiblemente, en 25°C a 40°C. En particular, en el caso de utilizar células que puedan transformar glicerol como sustrato, se puede preferir emplear como células aquellas que se describen en el documento US 6.803.218. En este caso, las células pueden cultivarse a temperaturas en el intervalo de 40 a 100°C.

La purificación del ácido 3-hidroxiisobutírico a partir de la disolución nutricia tiene lugar preferiblemente de forma continua, siendo a este respecto además preferido llevar a cabo de manera continua la preparación del ácido 3-hidroxiisobutírico mediante fermentación, de modo que todo el proceso desde la preparación del ácido 3-hidroxiisobutírico hasta su purificación a partir del caldo de fermentación pueda llevarse a cabo de forma continua. Para la purificación continua de la preparación del ácido 3-hidroxiisobutírico a partir del caldo de fermentación, éste es conducido de forma continua a través de un dispositivo para la separación de los microorganismos empleados en la fermentación, preferiblemente a través de un filtro con un tamaño de exclusión en un intervalo de 20 a 200 kDa, en el que tiene lugar una separación sólido/líquido. Es imaginable también el empleo de una centrifuga, de un dispositivo de sedimentación adecuado o de una combinación de estos dispositivos, siendo particularmente preferido separar al menos una parte de los microorganismos primeramente mediante sedimentación y, a continuación, aportar el caldo de fermentación parcialmente liberado de los microorganismos a una ultrafiltración o dispositivo de centrifugación.

El producto de la fermentación enriquecido en relación con su porción de ácido 3-hidroxiisobutírico es aportado, después de la separación de los microorganismos, a una instalación de separación preferiblemente de varias etapas. En esta instalación de separación están previstas varias etapas de separación conectadas una tras otra, de

las que en cada caso desembocan tuberías de retorno que son devueltas al tanque de fermentación. Además, a partir de las etapas de separación respectivas salen tuberías de evacuación. Las distintas etapas de separación pueden trabajar según el principio de la electrodiálisis, de la ósmosis inversa, de la ultrafiltración o de la nanofiltración. Por norma general, en las distintas etapas de separación se trata de dispositivos de separación de membrana. La elección de las distintas etapas de separación resulta del tipo y magnitud de los productos secundarios de la fermentación y los restos de sustratos.

Junto a la separación del ácido 3-hidroxiisobutírico por medio de electrodiálisis, ósmosis inversa, ultrafiltración o nanofiltración, en cuyo transcurso se obtiene como producto final una disolución acuosa de ácido 3-hidroxiisobutírico, el ácido 3-hidroxiisobutírico puede también separarse mediante procesos de extracción de la disolución de fermentación liberada de microorganismos, pudiendo obtenerse en este caso en última instancia, el ácido 3-hidroxiisobutírico. Para la separación del ácido 3-hidroxiisobutírico mediante extracción pueden añadirse a la disolución de fermentación, por ejemplo, compuestos de amonio o aminas con el fin de formar una sal de amonio del ácido 3-hidroxiisobutírico. Esta sal de amonio puede separarse entonces de la disolución de fermentación añadiendo un agente de extracción orgánico y calentando a continuación la mezcla así obtenida, con lo cual la sal de amonio se acumula en la fase orgánica. A partir de esta fase puede entonces aislarse el ácido 3-hidroxiisobutírico, obteniéndose el ácido 3-hidroxiisobutírico puro, por ejemplo mediante otras etapas de extracción. Particularidades más precisas en relación con este procedimiento de separación se pueden tomar del documento WO-A-02/090312, cuyo contenido divulgatorio se introduce en este caso como referencia en relación con la separación de ácidos hidroxicarboxílicos a partir de disoluciones de fermentación y forma una parte de la divulgación de la presente solicitud.

En función del tipo de separación del ácido 3-hidroxiisobutírico a partir de la disolución de fermentación se obtiene una disolución acuosa de ácido 3-hidroxiisobutírico, que contiene 2 a 90% en peso, preferiblemente 7,5 a 50% en peso y de manera particularmente preferida 10 a 25% en peso de ácido 3-hidroxiisobutírico, o bien ácido 3-hidroxiisobutírico puro.

Además de ello, el ácido 3-hidroxiisobutírico preparado en la etapa IA) del procedimiento de acuerdo con la invención puede todavía neutralizarse antes, durante o después de la purificación, pudiendo emplearse para ello en este caso bases tales como, por ejemplo, hidróxido de calcio o hidróxido de sodio.

En la etapa IB) del procedimiento de acuerdo con la invención, el ácido 3-hidroxiisobutírico se deshidrata bajo formación de ácido metacrílico, pudiendo emplearse para ello el ácido 3-hidroxiisobutírico puro, aislado a partir de la disolución de fermentación, o bien la disolución acuosa de ácido 3-hidroxiisobutírico aislada durante el tratamiento de la disolución de fermentación, concentrándose ésta, eventualmente todavía antes de la deshidratación, por ejemplo mediante destilación, eventualmente en presencia de un agente de arrastre adecuado.

La deshidratación puede llevarse a cabo básicamente en fase líquida o en la fase gaseosa. Además, de acuerdo con la invención se prefiere que la deshidratación tenga lugar en presencia de un catalizador, dependiendo el tipo de catalizador empleado de si se lleva a cabo una reacción en fase gaseosa o una reacción en fase líquida.

Como catalizadores de deshidratación entran en consideración tanto catalizadores de carácter ácido como también alcalinos. Catalizadores de carácter ácido son particularmente preferidos debido a la escasa tendencia a la formación de oligómeros. El catalizador de deshidratación puede emplearse tanto como catalizador homogéneo como también como catalizador heterogéneo. Si el catalizador de deshidratación está presente como un catalizador heterogéneo, se prefiere que el catalizador de deshidratación sea puesto en contacto con un soporte x. En calidad de soportes x entran en consideración todos los sólidos considerados como adecuados por el experto en la materia. A este respecto, se prefiere que estos sólidos presenten volúmenes de poros adecuados que son adecuados para la buena unión y absorción del catalizador de deshidratación. Además, se prefieren volúmenes de poros totales según la norma DIN 66133 en un intervalo de 0,01 a 3 ml/g y se prefieren particularmente volúmenes de poros totales en un intervalo de 0,1 a 1,5 ml/g. Además, se prefiere que los sólidos adecuados como soporte x presenten una superficie en el intervalo de 0,001 a 1000 m²/g, preferiblemente en el intervalo de 0,005 a 450 m²/g y más preferiblemente, en el intervalo de 0,01 a 300 m²/g según el ensayo BET conforme a la norma DIN 66131. Como soportes para el catalizador de deshidratación puede emplearse, por una parte, un material a granel que presente un diámetro medio de partículas en el intervalo de 0,1 a 40 mm, preferiblemente en el intervalo de 1 a 10 mm y más preferiblemente en el intervalo de 1,5 a 5 mm. Además, la pared del reactor de deshidratación puede servir como soporte. Además, el soporte puede ser de carácter ácido o básico en sí o se puede aplicar sobre un soporte un catalizador de deshidratación de carácter ácido o básico. Como técnicas de aplicación se han de mencionar, en particular, inmersión o bien impregnación o la incorporación en una matriz de soporte.

En calidad de soportes x, que pueden presentar también propiedades de catalizador de deshidratación, se adecuan, en particular, sustancias silicáticas naturales o sintéticas tales como, en particular, mordenita, montmorillonita, zeolitas de carácter ácido; sustancias de soporte revestidas con ácidos inorgánicos mono-, di- o poli-básicos, en particular ácido fosfórico, o sales de carácter ácido de ácidos inorgánicos tales como sustancias oxídicas o silicáticas, por ejemplo Al_2O_3 , TiO_2 ; óxidos y óxidos mixtos tales como, por ejemplo, $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ y óxidos mixtos de $\text{ZnO-Al}_2\text{O}_3$ de los heteropolíácidos.

Corresponde a una forma de realización de acuerdo con la invención el que el soporte x se componga, al menos en parte, de un compuesto oxídico. Compuestos oxídicos de este tipo deberían presentar al menos uno de los elementos de Si, Ti, Zr, Al, P o una combinación de al menos dos de los mismos. Soportes de este tipo pueden actuar también por sí mismos como catalizador de deshidratación debido a sus propiedades ácidas o básicas. Una clase de compuestos preferida que actúa tanto como soporte x como también como catalizador de deshidratación contiene óxidos de silicio/aluminio/fósforo. Sustancias de carácter básico preferidas que funcionan tanto como catalizador de deshidratación como también como soporte x contienen metales alcalinos, metales alcalinotérreos, lantano, lantanoides o una combinación de al menos dos de ellos en su forma oxídica. Catalizadores de deshidratación de carácter ácido o básico de este tipo se pueden adquirir comercialmente tanto de Degussa AG como también de Südchemie AG. Otra clase la representan los intercambiadores de iones. También estos pueden presentarse tanto en forma básica como también en forma ácida.

En calidad de catalizadores de deshidratación homogéneos, entran en consideración, en particular, ácidos inorgánicos, preferiblemente ácidos con contenido en fósforo y, más preferiblemente, ácido fosfórico. Estos ácidos inorgánicos pueden ser inmovilizados sobre el soporte x mediante inmersión o bien impregnación.

En particular, en el caso de la deshidratación en fase gaseosa se ha acreditado particularmente el empleo de catalizadores heterogéneos. En el caso de la deshidratación en fase líquida se emplean, sin embargo, tanto catalizadores de deshidratación homogéneos como también heterogéneos.

Además, se prefiere que en el procedimiento de acuerdo con la invención se emplee un catalizador de deshidratación con un valor H_0 en el intervalo de +1 a -10, preferiblemente en un intervalo de +2 a -8,2 y, más preferiblemente, en la deshidratación en fase líquida en un intervalo de +2 a -3 y en la deshidratación en fase gaseosa en un intervalo de -3 a -8,2. El valor H_0 corresponde a la función ácido según Hämmerl y se puede determinar mediante la denominada titulación con amina utilizando indicadores o mediante absorción de una base gaseosa (véase "*Studies in Surface Science and Catalysis*", Vol. 51, 1989; "*New solid Acids and Bases, their catalytic Properties*", K. Tannabe et al.

Conforme a una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en calidad de catalizador sólido de carácter ácido se emplea un cuerpo de soporte en forma de poros puesto en contacto preferiblemente con ácido fosfórico o con superácidos tales como, por ejemplo, óxido de zirconio sulfatado o fosfatado, cuerpo que se basa preferiblemente en al menos un 90% en peso, más preferiblemente en al menos un 95% en peso y lo más preferiblemente en al menos un 99% en peso en un óxido de silicio, preferiblemente en SiO_2 . La puesta en contacto del cuerpo de soporte en forma de poros con el ácido inorgánico tiene lugar preferiblemente mediante la impregnación del cuerpo de soporte con el ácido, en donde éste se pone en contacto con el cuerpo de soporte preferiblemente en una cantidad en un intervalo de 10 a 70% en peso, de manera particularmente preferida en un intervalo de 20 a 60% en peso, y más preferiblemente en un intervalo de 30 a 50% en peso, referido al peso del cuerpo de soporte y, a continuación, se seca. A continuación del secado, el cuerpo de soporte es calentado para la fijación del ácido inorgánico preferiblemente hasta una temperatura en un intervalo de 300 a 600°C, más preferiblemente en un intervalo de 400 a 500°C.

De acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, la deshidratación se lleva a cabo en la fase gaseosa. En este caso, pueden emplearse sistemas de aparatos habituales tal como se conocen por el experto en la materia para la reacción en fase gaseosa, por ejemplo reactores de tubos. Particularmente preferido es el empleo de intercambiadores de calor de haces de tubos, así como de reactores, que contienen termoplacas en calidad de intercambiadores de calor.

De acuerdo con una forma de realización de la deshidratación en fase gaseosa se incorpora ácido 3-hidroxiisobutírico puro en un reactor que comprende uno de los catalizadores de lecho fijo precedentemente mencionados. De acuerdo con otra forma de realización, el ácido 3-hidroxiisobutírico se incorpora en el reactor en forma de una disolución acuosa que contiene 2 a 80% en peso, de manera particularmente preferida 5 a 50% en peso, y más preferiblemente 10 a 25% en peso de ácido 3-hidroxiisobutírico, en cada caso referido al peso total de la disolución acuosa. Las condiciones de presión y de temperatura en el interior del reactor se eligen de manera

que el ácido 3-hidroxiisobutírico o bien la disolución acuosa se presente en forma gaseosa en su entrada al reactor. La deshidratación en la fase gaseosa tiene lugar preferiblemente en un intervalo de temperaturas entre 200 y 400°C, de manera particularmente preferida entre 250 y 350°C. La presión en el interior del reactor se encuentra en la deshidratación en fase gaseosa preferiblemente en un intervalo de 0,1 a 50 bar, de manera particularmente preferida en un intervalo de 0,2 a 10 bar y lo más preferido en un intervalo de 0,5 a 5 bar.

La cantidad de ácido 3-hidroxiisobutírico incorporado en el reactor se encuentra en la deshidratación en fase gaseosa preferiblemente en un intervalo de 10 a 100% en vol., de manera particularmente preferida en un intervalo de 20 a 100% en vol. y lo más preferiblemente en un intervalo de 30 a 100% en vol.

De acuerdo con otra forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, la deshidratación se lleva a cabo en la fase líquida. La deshidratación en fase líquida puede llevarse a cabo asimismo en todos los sistemas de aparatos conocidos por el experto en la materia en los que un fluido puede ser calentado hasta una temperatura de reacción deseada, pudiendo ser solicitado el sistema de aparatos con una presión que sea suficiente como para mantener líquidos a los componentes de la reacción bajo las condiciones de temperatura deseadas.

De acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, el procedimiento comprende la deshidratación en fase líquida de una primera etapa de procedimiento, en la que ácido 3-hidroxiisobutírico puro o una disolución acuosa que contiene 5 a 100% en peso, de manera particularmente preferida 20 a 100% en peso, y lo más preferiblemente 50 a 100% en peso de ácido 3-hidroxiisobutírico, referido al peso total de la disolución acuosa, se incorpora en un reactor. Las condiciones de presión y temperatura en el interior del reactor se eligen de modo que el ácido 3-hidroxiisobutírico o bien la disolución acuosa esté presente en forma líquida en su entrada al reactor. De acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se lleva a cabo una deshidratación en la fase líquida, el ácido 3-hidroxiisobutírico o bien la disolución acuosa es conducida en el interior del reactor de deshidratación de tal modo a través de un lecho fijo de catalizador que la fase líquida gotea por encima de la superficie de las partículas de catalizador. Un modo de proceder de este tipo puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un reactor de lecho por goteo.

La deshidratación en la fase líquida tiene lugar preferiblemente en el intervalo de temperaturas entre 200 y 350°C, de manera particularmente preferida entre 250 y 300°C. La presión en el interior del reactor se encuentra, en el caso de la deshidratación en fase líquida, preferiblemente en un intervalo de 1 a 50 bar, de manera particularmente preferida en un intervalo de 2 a 25 bar, y lo más preferido en un intervalo de 3 a 10 bar.

La catálisis de la deshidratación puede tener lugar tanto en la deshidratación en fase gaseosa como también en la deshidratación en fase líquida en forma homogénea o heterogénea.

En el caso de la catálisis homogénea el catalizador, del que entonces se trata preferiblemente de un ácido inorgánico tal como, por ejemplo, ácido fosfórico o ácido sulfúrico, se pone primeramente en contacto con el ácido 3-hidroxiisobutírico puro o con la disolución acuosa que contiene el ácido 3-hidroxiisobutírico. A continuación, la composición, así obtenida, se incorpora en el reactor y se transforma en ácido metacrílico bajo las condiciones de presión y temperatura deseadas. También es imaginable incorporar en el reactor el ácido inorgánico independientemente del ácido 3-hidroxiisobutírico o bien de la disolución acuosa. En este caso, el reactor presenta al menos dos tuberías de entrada, una para el ácido 3-hidroxiisobutírico o bien la disolución acuosa que contiene el ácido 3-hidroxiisobutírico, y una para el catalizador. Si la deshidratación se lleva a cabo en fase líquida en un reactor de lecho por goteo, entonces se prefiere que el catalizador sea incorporado en la zona superior del reactor junto con el ácido 3-hidroxiisobutírico o bien la disolución acuosa que contiene el ácido 3-hidroxiisobutírico.

En el caso de la catálisis heterogénea, el catalizador se encuentra en forma de un sustrato sólido en la zona de reacción, por ejemplo en forma de una carga de lecho fijo, en forma de placas revestidas con catalizador, preferiblemente termoplacas que están dispuestas en el interior del reactor, o bien en forma de paredes del reactor revestidas con catalizador. Reactores posibles se describen, por ejemplo, en los documentos DE-A-198 48 208, DE-A-100 19 381 y EP-A-1 234 612. En el caso de la catálisis heterogénea se prefieren en calidad de catalizadores cuerpos de soporte preferiblemente en forma de poros impregnados, puestos en contacto con ácidos inorgánicos. El ácido 3-hidroxiisobutírico o bien la disolución acuosa que contiene el ácido 3-hidroxiisobutírico se pone luego en contacto en forma de vapor o en forma líquida con la superficie del material de catalizador sólido.

De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la deshidratación del ácido 3-hidroxiisobutírico en fase líquida se lleva a cabo a una presión en un intervalo de 200

a 500 mbar, a una temperatura en un intervalo de 200 a 230°C y en presencia de iones de metales alcalinos en cantidad de catalizador.

5 Como mezcla de reacción, la cual se obtiene a continuación de la deshidratación, se obtiene una disolución acuosa de ácido metacrílico que no contiene componentes de catalizador (una de este tipo se obtiene en el caso de una deshidratación catalizada de forma heterogénea) o bien una disolución acuosa de ácido metacrílico que contiene catalizadores (una de este tipo se obtiene en el caso de una deshidratación catalizada de forma homogénea). Además, la disolución acuosa de ácido metacrílico puede presentarse en forma líquida (en la medida en que la deshidratación tenga lugar en la fase líquida) o gaseosa (en la medida en que la deshidratación tenga lugar en la fase gaseosa).

15 Conforme a una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención la disolución de ácido metacrílico, así obtenida, puede aportarse, sin tratamiento ulterior, eventualmente para la esterificación. En tal caso, la disolución de ácido metacrílico se pone en contacto, bajo calentamiento, con alcoholes correspondientes tales como, por ejemplo, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol o 1-butanol, así como catalizadores de esterificación adecuados y conocidos por el experto en la materia tales como, por ejemplo, ácidos concentrados, y el ácido metacrílico se transforma de esta manera en los correspondientes ésteres. Sin embargo, puede ser ventajoso purificar todavía el ácido metacrílico antes de la esterificación, pudiendo aplicarse para la purificación básicamente cualquier procedimiento de purificación conocido por el experto en la materia que encuentre aplicación convencionalmente para la purificación de ácido (met)acrílico impurificado y obtenido mediante oxidación en fase gaseosa catalítica de propileno.

25 Si la deshidratación se llevó a cabo en la fase gaseosa, entonces se prefiere que el ácido metacrílico sea condensado primeramente, obteniéndose una disolución acuosa de ácido metacrílico. En tal caso, puede emplearse básicamente cualquier procedimiento de condensación conocido por el experto en la materia, por ejemplo una condensación fraccionada tal como se describe en los documentos WO-A-2004/035514, WO-A-03/014172 o EP-A-EP 1 163 201, o mediante una condensación total tal como se describe en el documento EP-A-0 695 736. También es imaginable añadir durante la condensación disolvente adicional, en particular agua, con el fin de absorber de la forma más completa posible al ácido metacrílico.

30 La disolución acuosa de ácido metacrílico, obtenida después de la condensación, o bien la disolución acuosa de ácido metacrílico obtenida en el caso de la deshidratación en fase líquida puede entonces liberarse de agua y de otras impurezas en etapas de purificación ulteriores. En tal caso, primeramente puede separarse mediante destilación azeotrópica el agua en presencia de un agente de arrastre tal como se describe, por ejemplo, en el documento DE-A-198 53 064. También es imaginable el empleo de disolventes orgánicos de elevado punto de ebullición para la absorción del ácido metacrílico tal como se da a conocer, por ejemplo, en el documento EP-A-0 974 574. Junto a estos procedimientos por destilación también pueden emplearse membranas para la deshidratación tal como se propone, por ejemplo, en el documento DE-A-44 01 405. Es imaginable, además, una purificación, mediante procedimientos de cristalización, de la disolución acuosa de ácido metacrílico obtenida en el caso de la deshidratación en fase líquida o mediante condensación.

45 El ácido metacrílico obtenido después de la deshidratación puede continuar siendo purificado adicionalmente en otras etapas del procedimiento. Así, impurezas de elevado punto de ebullición, todavía contenidas, pueden separarse mediante etapas de destilación adicionales. Sin embargo, se prefiere particularmente que el ácido metacrílico obtenido después de la deshidratación sea purificado ulteriormente mediante procesos de cristalización tal como se describe, por ejemplo, en el documento DE-A-101 49 353.

El ácido metacrílico purificado, así obtenido, puede someterse entonces eventualmente a la esterificación.

50 Una aportación a la solución de los problemas mencionados al comienzo la proporciona, además, un procedimiento para la preparación de ácido metacrílico o ésteres del ácido metacrílico, que comprende las etapas de procedimiento

55 IIA) preparación de polihidroxialcanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico mediante el procedimiento precedentemente descrito,

IIB) disociación de los polihidroxialcanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico bajo formación de ácido 3-hidroxiisobutírico, así como, eventualmente, neutralización del ácido 3-hidroxiisobutírico y/o purificación del ácido 3-hidroxiisobutírico,

60

IIC) deshidratación del ácido 3-hidroxiisobutírico bajo formación de ácido metacrílico así como, eventualmente, esterificación del metacrilato o bien del ácido metacrílico.

5 Una aportación a la solución de los problemas mencionados al comienzo la proporciona también un procedimiento para la preparación de ácido polimetacrílico o ésteres del ácido polimetacrílico, que comprende las etapas de procedimiento

III A) preparación de ácido metacrílico mediante el procedimiento precedentemente descrito,

10 III B) polimerización en los radicales del ácido metacrílico,

pudiendo esterificarse, al menos en parte, eventualmente los grupos carboxilo del ácido metacrílico antes o después de la polimerización en los radicales.

15 La presente invención se explica ahora con mayor detalle con ayuda de Figuras y Ejemplos no limitantes.

La Figura 1 muestra la reacción, catalizada por la enzima E₁, de succinil-coenzima A para formar metilmalonil-coenzima A.

20 La Figura 2 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₂ a E₄, de metilmalonil-coenzima A para formar ácido 3-hidroxiisobutírico conforme a la primera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiacanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

25 La Figura 3 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₄, E₆ y E₇, de (R)-metilmalonil-coenzima A para formar ácido 3-hidroxiisobutírico de acuerdo con la segunda alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiacanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

30 La Figura 4 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₄, E₅ y E₇, de metilmalonil-coenzima A para formar ácido 3-hidroxiisobutírico de acuerdo con la tercera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiacanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

35 La Figura 5 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₈ y E₉, de ácido 3-hidroxiisobutírico para formar un polihidroxiacanoato.

40 La Figura 6 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₁₀ o E₁₁, de fosfoenolpiruvato o bien piruvato para formar oxalacetato de acuerdo con una ejecución particular de la primera, segunda o tercera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiacanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

45 La Figura 7 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₁₂ a E₁₅, de oxalacetato para formar succinil-coenzima A de acuerdo con una primera ejecución particular de la primera, segunda o tercera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiacanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

50 La Figura 8 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₁₃ a E₁₆ y E₂₄ a E₂₆, de oxalacetato para formar succinil-coenzima A de acuerdo con una segunda ejecución particular de la primera, segunda o tercera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxiacanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

60 hidroxisobutírico.

5 La Figura 9 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₁₆, E₂₄, E₂₇ y E₂₈, de oxalacetato para formar succinil-coenzima A de acuerdo con una tercera ejecución particular de la primera, segunda o tercera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

10 La Figura 10 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₄₆ y E₂₈, de L-glutamato para formar succinil-coenzima A de acuerdo con otra ejecución particular de la primera, segunda o tercera alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman succinil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

15 Las Figuras 11 y 12 muestran la reacción, catalizada por las enzimas E₄, E₅ y E₄₇ a E₅₂, de acetil-coenzima A para formar ácido 3-hidroxiisobutírico de acuerdo con una primera alternativa de la segunda forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman propionil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

20 Las Figuras 13 y 14 muestran la reacción, catalizada por las enzimas E₂ a E₄, E₆, E₇ y E₄₇ a E₅₂, de propionil-coenzima A para formar ácido 3-hidroxiisobutírico de acuerdo con una segunda alternativa de la segunda forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman propionil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

25 Las Figuras 15 y 16 muestran la reacción, catalizada por las enzimas E₂ a E₄, E₇ y E₄₇ a E₅₂, de propionil-coenzima A para formar ácido 3-hidroxiisobutírico de acuerdo con una tercera alternativa de la segunda forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman propionil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

30 La Figura 17 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₅₃ a E₅₅, E₅₈ y E₆₂ a E₆₅, de dos unidades de acetil-coenzima A para formar glioxilato y propionil-coenzima A de acuerdo con una quinta alternativa de la segunda forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman propionil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

35 La Figura 18 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₂ a E₄, E₆₂, E₇₂ y E₇₃, de beta-alanina para formar ácido 3-hidroxiisobutírico de acuerdo con una tercera forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman acrilil-coenzima A como producto intermedio y metilmalonato-semialdehído como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

40 La Figura 19 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₇₆ a E₇₉, E₆₀, E₆₁ y E₈, de piruvato para formar ácido 3-hidroxiisobutírico de acuerdo con una primera alternativa de la primera forma de realización particular de la segunda variante del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman isobutiril-coenzima A como producto intermedio y 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

45 La Figura 20 muestra la reacción, catalizada por las enzimas E₈, E₆₀, E₆₁, E₇₉ y E₈₀ de L-valina para formar ácido 3-hidroxiisobutírico de acuerdo con una segunda alternativa de la primera forma de realización particular de la segunda variante del procedimiento de acuerdo con la invención, en la que se emplea una célula modificada por tecnología genética en la que se forman isobutiril-coenzima A como producto intermedio y 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como producto previo en la preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico o de polihidroxicanoatos

basados en ácido 3-hidroxiisobutírico.

La Figura 21 muestra el plásmido pEKEx2MCM cgl del Ejemplo 3.

5 La Figura 22 muestra el vector pGA4_3HIBDH del Ejemplo 3.

La Figura 23 muestra el vector pGA5_MMCoAR_3HIBDH del Ejemplo 3.

La Figura 24 muestra el vector pECXT99A del Ejemplo 3.

10 La Figura 25 muestra el vector pECXT99A_MMCoAR_3HIBDH del Ejemplo 3.

La Figura 26 muestra la detección por cromatografía de iones de una formación de ácido 3-hidroxiisobutírico mediante las células recombinantes en el Ejemplo 3.

15 La Figura 27 muestra la detección por cromatografía de iones de que en el caso del pico caracterizado en la Figura 26 se trata del ácido 3-hidroxiisobutírico.

Ejemplos

20 Ejemplo 1

La presente invención se explica ahora en el Ejemplo 1 con ayuda de una célula recombinante que es capaz de producir ácido 3-hidroxiisobutírico a través de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A como producto previo e isobutiril-coenzima A como producto intermedio partiendo de L-valina como fuente de carbono. Esta célula puede emplearse de acuerdo con la invención para la preparación de ácido metacrílico. Para ello, en BL21 (DE3) de *E. coli* se sobre-expresaron las enzimas EC 2.6.1.42 y EC 1.2.4.4 (en cada caso de *Pseudomonas aeruginosa*) así como un racimo que comprende las tres enzimas EC 1.3.99.12, EC 4.2.1.17 y EC 3.1.2.4 (de *Acinetobacter calcoaceticus*).

30 La enzima EC 1.2.4.4 es codificada en tal caso por un gen con la secuencia de ADN conforme a SEQ.-ID.-NO. 07 y 08 (subunidad α y β), mientras que la enzima EC 2.6.1.42 es codificada por un gen con la secuencia de ADN conforme a SEQ.-ID.-NO. 09. La enzima EC 1.3.99.12 es codificada por un gen con la secuencia de ADN con la SEQ.-ID.-NO. 10, la enzima EC 4.2.1.17 es codificada por un gen con la secuencia de ADN conforme a SEQ.-ID.-NO. 11 y la enzima EC 3.1.2.4 es codificada por un gen con la secuencia de ADN conforme a SEQ.-ID.-NO. 12.

35 1. Organismos, plásmidos y oligonucleótidos

Para la preparación de esta célula recombinante se utilizaron las siguientes cepas de bacterias, vectores, ADN genómico y oligonucleótidos:

40 Tab. 1: Cepas de bacterias utilizadas

Cepa	Referencia (fabricante)
DH5 de <i>E. coli</i>	NEB
BL21 (DE3) de <i>E. coli</i>	Invitrogen

45 Tab. 2: Vectores utilizados

Vector	Referencia (fabricante)
pCDFDuet-1	Novagen
pET101/D-TOPO	Invitrogen
pCR2.1-TOPO	Invitrogen

Tab. 3: ADN genómico utilizado

Cepa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ADP1

Tab. 4: Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia
A-ca_VClus_fw	5'-ATGCAATTTAATGAAGAACAGCTATTAATTC-3' (SEQ.-ID-NO. 13)
A-ca_VClus_rev	5'-CAGTCTGAAATGACTAACCTAATTGGC-3' (SEQ.-ID-NO. 14)
Pae_26142_fw	5'-ACGGAATTCTGAAGGAGCTGGCAACTATG-3' (SEQ.-ID-NO. 15)
Pae_26142_rev	5'-TTGTCGACTTACTTGACCAGGGTACGCC-3' (SEQ.-ID-NO. 16)
Pae_1244_fw	5'-ACAGATCTGGAGGCCTGTCATGAGTGATTAC-3' (SEQ.-ID-NO. 17)
Pae_1244_rev	5'-ATGGGTACCCATTCAGACCTCCATC-3' (SEQ.-ID-NO. 18)

2. Amplificación de los fragmentos de PCR 1.2.4.4 (2.313 kb) y 2.6.1.42 (958 pb)

Primeramente, se amplifican mediante PCR los fragmentos de 1.2.4.4 y 2.6.1.42 por medio de los cebadores indicados en la Tabla 4 conforme a SEQ.-ID.-NO. 15 a SEQ.-ID.-NO. 18 partiendo del ADN total de *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Digestión del vector pCDF-Duet-1 y del fragmento de PCR 2.6.1.42 (958 pb)

El vector pCDFDuet-1 (que presenta una resistencia a estreptomycin/espectinomycin) se corta, al igual que el fragmento de PCR 2.6.1.42 por medio de *EcoRI/SalI*, y las restricciones, así obtenidas, se ligan durante una noche con T4-ligasa. Se obtiene el vector pCDFDuet::2.6.1.42.

4. Clonación de los fragmentos de PCR en el vector pCR2.1-TOPO

La preparación de un vector de clonación que comprende el fragmento 2.6.1.42 o bien el fragmento 1.2.4.4 bajo el empleo del vector pCR2.1-TOPO tuvo lugar conforme a las indicaciones del fabricante. Con los vectores de clonación pCR2.1-TOPO::1.2.4.4 y pCR2.1-TOPO::2.6.1.42 obtenidos de esta manera se transformaron células DH5 α de *E. coli*. Dado que los vectores pCR2.1-TOPO presentan una resistencia a canamicina y una resistencia a ampicilina, se extendieron en 2 placas de AXI y KXI (20 y 40 μ l). Los plásmidos de los clones obtenidos se aislaron y digirieron:

pCR2.1-TOPO::1.2.4.4 *BglIII + KpnI* tamaño del fragmento 2313 pb
pCR2.1-TOPO::2.6.1.42 *EcoRI + SalI* tamaño del fragmento 958 pb

Los fragmentos se eluyeron en cada caso a partir del gel y se purificaron con el kit QIAquick de Qiagen (según las instrucciones).

5. Preparación del vector pCDFDuet: 2.6.1.42 – 1.2.4.4

El vector pCDFDuet::2.6.1.42 así como el vector pCR2.1-TOPO::1.2.4.4 se digirieron con *BglIII/KpnI*. A continuación, tiene lugar el ligamiento de pCDFDuet::2.6.1.42 (*BglIII/KpnI*) con pCR2.1-TOPO::1.2.4.4, obteniéndose el vector pCDFDuet::2.6.1.42- 1.2.4.4. Mediante este vector de clonación se transformaron de nuevo células DH5 α de *E. coli*. Los plásmidos se aislaron. El plásmido pCDFDuet::2.6.1.42 - 1.2.4.4. presenta la secuencia de ADN conforme a SEQ.-ID.-NO. 19.

6. Clonación del racimo de valina procedente de *Acinetobacter calcoaceticus* (V-Clus_{Aca})

La cepa ATCC 33304 de *Acinetobacter calcoaceticus* se ligó para un aislamiento del ADN total (agar o bien medio HH). El aislamiento del ADN total tuvo lugar con el kit DNEasy de Qiagen (L1 y L2) y mediante un procedimiento que comprende las etapas de procedimiento i) centrifugación de 1 mL de cultivo, ii) adición de 200 μ L de H₂O al sedimento, iii) calentamiento durante 10 min hasta 95°C, iv) centrifugación (10 min, 13.000 rpm), así como v) retirada del residuo para una PCR.

Para la amplificación del racimo de valina a partir de *A. calcoaceticus* se llevó a cabo una PCR utilizando el cebador indicado en la Tabla 4, conforme a SEQ.-ID.-NO. 13 y SEQ.-ID.-NO. 14 (según las instrucciones del fabricante con las polimerasas *Pfu* o bien *Taq*).

Los productos de la PCR se purificaron y se ligaron según las instrucciones al plásmido pET101/D-TOPO, así como se incorporaron en DH5 α de *E. coli*. Se obtiene el plásmido pET101/D-TOPO::V-Cluster_{Aca}. El plásmido pET101/D-TOPO::V-Cluster_{Aca} presenta la secuencia de ADN conforme a SEQ.-ID.-NO. 20.

5 7. Preparación de una célula recombinante que es capaz de formar ácido 3-hidroxiisobutírico a partir de L-valina

BL21 (DE3) de *E. coli* se transformó con los plásmidos pET101/D-TOPO::V-Cluster_{Aca} y PcDF-Duet::2.6.1.42-1.2.4.4 (extendida en placas con medio LB-Spec./Amp). Las células, así obtenidas, estaban en condiciones de hacer reaccionar la L-valina para formar ácido 3-hidroxiisobutírico en un medio nutritivo que contenía L-valina. Por el contrario, el tipo salvaje de las células (BL21 (DE3) de *E. coli*) no pudo formar en un medio nutritivo de este tipo cantidades detectables de ácido 3-hidroxiisobutírico.

15 Ejemplo 2

En este ejemplo se aísla un ADN que codifica un gen, y el gen se sobre-expresa en *E. coli*. El ADN codifica una enzima que presenta tanto la actividad de la enzima E₂ como también la de la enzima E₃.

20 1. Cultivo y recolección de *Sulfolobus tokodaii*

Sulfolobus tokodaii se cultivó en un pequeño volumen de cultivo (40-200 ml) a 75°C y a un valor del pH de 3,0 bajo sacudimiento (150 rpm). El crecimiento se vigiló fotométricamente a través de la medición de la densidad óptica a 578 nm (DO₅₇₈ nm). Se utilizó un medio de *Sulfolobus* (modificado según Brock et al., *Archives of Microbiology* 84, páginas 54-68, 1972; Suzuki et al., *Extremophiles*, 6, páginas 39-44, 2002). Como fuente de energía y de carbono servían extracto de levadura, casaminoácidos y glucosa. El medio consistía en los siguientes componentes: medio base, solución madre de glucosa, solución madre de hierro y solución madre de oligoelementos. A una DO₅₇₈ nm de 0,3-0,5 (fase exponencial) se cultivaron las células. La centrifugación tuvo lugar en una centrífuga Sorvall (rotor SS34) durante 15 min a 9.000 rpm. El precipitado celular se empleó directamente para la extracción de ADN.

30 **Medio base.** KH₂PO₄ (0,28 g/l), (NH₄)₂SO₄ (1,3 g/l), MgSO₄ x 7 H₂O (0,25 g/l), CaCl₂ x 6 H₂O (0,07 g/l), extracto de levadura (1 g/l) y casaminoácidos (1 g/l). El valor del pH se ajustó con H₂SO₄ a 3,0 antes del sometimiento en autoclave.

35 **Solución madre de glucosa (100 veces).** Glucosa (100 g/l). La disolución se filtró en condiciones estériles.

Solución madre de hierro (1000 veces). FeCl₃ x 6 H₂O (20 g/l). La disolución se filtró en condiciones estériles.

40 **Solución madre de oligoelementos (1000 veces).** MnCl₂ x 4 H₂O (1,8 g/l), Na₂B₄O₇ x 10 H₂O (4, 5 g/l), ZnSO₄ x 7 H₂O (220 mg/l), CuCl₂ x 2 H₂O (50 mg/l), Na₂MoO₄ x 2 H₂O (30 mg/l), VOSO₄ x 5 H₂O (30 mg/l), CoCl₂ x 6 H₂O (8,4 mg/l). Los distintos componentes se disolvieron sucesivamente en H₂O dest., el valor del pH se ajustó a 3,0 con HCl y la disolución se filtró en condiciones estériles.

45 2. Aislamiento de ADN genómico a partir de *S. tokodaii*

El aislamiento de ADN genómico se llevó a cabo según el método de Murray y Thompson (*Nucleic Acid Research*, 8, páginas 4.321-4.325, 1980). Para ello, se pesaron 10-50 mg (peso en húmedo) de células recién recolectadas en un recipiente de reacción Eppendorf de 1,5 ml y se resuspendieron en 570 μ l tampón TE (Tris 10 mM/HCl, pH 8,0), NaEDTA 1 mM). Se añadieron 30 μ l de una disolución al 10% (p/v) en SDS (disolución en dodecilsulfato de sodio) y se añadieron 3 μ l de proteinasa K (20 μ g/ μ l) y se incubaron durante 1 h a 52°C. Después, se añadieron 100 μ l de disolución 5 M de NaCl y 80 μ l de disolución previamente calentada al 10% (p/v) de bromuro de cetiltrimetil-amonio (CTAB) (CTAB al 10% p/v) en NaCl 0,7 M). Después de incubación durante 10 min a 65°C, se extrajeron los complejos a base de CTAB, fragmentos de la pared celular y proteínas con 780 μ l de cloroformo/alcohol iso-amílico (24:1 (v/v)) y se separaron por centrifugación durante 15 min a 14.000 rpm. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo recipiente de reacción Eppendorf y se repitió la extracción. Después de que la fase acuosa estaba exenta de pigmentos, se revistió con 400 μ l de isopropanol al 100%. Mediante cuidadosa mezclado de las dos fases, el ADN cromosómico precipitó en la capa límite. El ADN pudo recogerse con una pipeta de Pasteur extraída y se lavó en 200 μ l de etanol al 70%. Después de centrifugación renovada (5 min, 14.000 rpm), se retiró el residuo, el ADN se secó a la temperatura ambiente durante 2 h y finalmente se disolvió en 100 μ l de tampón TE.

60

3. Amplificación del gen para la malonil-coenzima A-reductasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51, páginas 263-273, 1986) se empleó para amplificar de manera preestablecida el gen para la malonil-CoA-reductasa partiendo del ADN genómico de *Sulfolobus tokodaii* obtenido en el Ejemplo 2. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador (Biometra, Göttingen).

Pasó a emplearse una PCR preparativa en la que se utilizó la Pfu-polimerasa (*Pfu*, Genaxxon). La Pfu-polimerasa contiene una función exonucleasa 3'-5' (lectura de prueba - "proofreading").

Se utilizaron los siguientes cebadores:

5'-ATTATCCCATGGGGAGAACATTTAAAGC-3' ("cebador directo"; el punto de corte NcoI está subrayado; SEQ.-ID-NO. 21) y

5'-CGGGATCCTTACTTTTCAATATATCC-3' ("cebador inverso"; el punto de corte BamHI está subrayado; SEQ.-ID-NO. 22)

Para las reacciones PCR se utilizó el planteamiento de reacción indicado en la siguiente Tabla 1. La PCR se llevó a cabo como PCR de arranque en caliente, es decir, la tanda de la reacción se incubó antes de la adición de la Pfu-polimerasa durante 2 min a 95°C. A continuación siguieron 30 ciclos en cada caso de 1 minuto a 95°C, de 1 minuto a 45°C y de 5 minutos a 72°C, seguidos de una última etapa con 30 segundos a 45°C, 15 minutos a 72°C y, finalmente, una pausa a 6°C.

Tabla 1: Tanda de reacción estándar (50 µl) para PCR con lectura de prueba con Pfu-polimerasa

Composición	µl/ tanda de 50 µl
Tampón de reacción Pfu-PCR 10 x	5
Mezcla de dNTP (2 mM cada nucleótido)	5
Cebador directo (2 µM)	12,5
Cebador inverso (2 µM)	12,5
ADN cromosómico	1 (10 – 50 ng)
Pfu-polimerasa (2,5 U/µl)	2
H ₂ O _{bidest.}	12

Se obtuvo un fragmento de gen con una longitud de 1,1 kb.

4. Clonación del gen para la malonil-coenzima A-reductasa

Para la clonación del gen para la malonil-coenzima A-reductasa de *Sulfolobus tokodaii* se clonó el gen amplificado en el Ejemplo 3 de manera no específica con el kit de expresión "pCR T7 Topo TA Expresión Kit" (Invitrogen, Karlsruhe) en el vector pCR T7/CT-Topo (Invitrogen, Karlsruhe). La realización tuvo lugar de acuerdo con los datos del fabricante.

Para el aislamiento del ADN del plásmido, a partir de cultivos durante una noche de 5 ml de células de TOP10F' de *E. coli* transformadas se preparó el ADN del plásmido con el kit "QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit" de Qiagen (Hilden) según las instrucciones del fabricante.

5. Preparación de un vector de expresión

Para la preparación de un vector de expresión que comprende el gen para malonil-coenzima A-reductasa, el vector de clonación aislado y obtenido en el Ejemplo 4 se somete a una digestión por restricción con las enzimas de restricción NcoI y BamHI. Para ello, se mezclan bien 25-27 µl de ADN del plásmido (vector de expresión pTrc99A o bien vector pCR T7/CT-Topo con el gen incorporado de la malonil-coenzima A-reductasa) con 5 µl de tampón de reducción 10 veces concentrado y 2-3 µl de enzima de restricción (10 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot). La tanda de reacción se completó con H₂O dest hasta 50 µl y se incubó durante 5 h a la temperatura indicada por el fabricante. Antes del uso ulterior se llevó a cabo una precipitación en etanol. Para ello, el ADN se mezcló con 3 unidades en volumen de etanol al 100% y 0,1 unidades en volumen de tampón acetato de sodio 3 M (pH 5,3) y se incubó durante 2 h o a lo largo de una noche a -80°C. Después de una etapa de centrifugación (20 min, 14.000 rpm, 4°C, centrífuga de mesa Eppendorf), el residuo se retiró cuidadosamente y el ADN se lavó con 3 unidades en volumen

de etanol al 70% (v/v). Después de incubación durante 10 min a la temperatura ambiente, se centrifugó de nuevo (10 min, 14.000 rpm, 4°C, centrífuga de mesa Eppendorf) y se desechó el residuo. El ADN se secó durante 1 hora a la temperatura ambiente y, a continuación, se recogió en el volumen deseado H₂O o tampón TE (Tris 10 mM/HCl (pH 8,0), NaEDTA 1 mM).

5 A continuación, se utiliza fosfatasa alcalina con el fin de separar los grupos 5'-fosfato del vector de doble cadena linearizado. De este modo, se aumenta la eficacia de clonación, ya que se impide un religamiento del vector. Se utilizó fosfatasa alcalina de intestinos de ternero para la desfosforilación del vector digerido.

10 La desfosforilación se llevó a cabo en el mismo tampón que la digestión por restricción. 50 µl de tanda de restricción se mezclaron con 1,5 µl de CIAP (siglas inglesas de fosfatasa alcalina del intestino de ternero) (1U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) y se incubaron durante 30 min a 37°C. Antes del uso ulterior del vector cortado y desfosforilado, se llevó a cabo la precipitación en etanol tal como se ha descrito precedentemente.

15 Para el ligamiento del ADN del inserto con el vector de expresión se utiliza la T4 ADN-ligasa, empleándose ADN del plásmido y ADN del inserto en una relación molar de 1:3 - 1:6.

Soluciones patrón:

20 *Tampón de ligamiento* (10 veces): Tris 0,5 M/HCl, pH 7,6
MgCl₂ 100 mM,
0,5 mg/ml de BSA
filtrar en condiciones estériles, almacenamiento a la temperatura ambiente,

25 *ATP* (adenosintrifosfato) 5 mM emplearlo siempre reciente en H₂O dest estéril
DTE (ditioeritritol) 5 mM emplearlo siempre reciente en tampón de ligamiento

30 Las tandas de ligamiento tenían un volumen de 50 µl. ADN del plásmido (2-10 µl), ADN del inserto (2-20 µl), 5 µl de tampón de ligamiento con DTE (50 mM) y la cantidad correspondiente de H₂O_{dest} estéril se pipetearon conjuntamente, se sometieron a un vórtice, se separaron brevemente por centrifugación y, a continuación, se incubaron durante 5 min a 45°C. La tanda se enfrió en hielo. Se añadieron 5 µl de ATP 5 mM y 1,5 µl de T4 ADN-ligasa (1U/µl; Fermentas; St. Leon-Rot), y la tanda se mezcló. El ligamiento tuvo lugar durante una noche a 16°C.

35 La tanda de ligamiento se empleó directamente para la transformación de células químicamente competentes.

6. Transformación de células de *E. coli* con el vector de expresión

40 Partiendo de una colonia individual de células Rosetta 2 de *E. coli* se cultivó un cultivo durante una noche de 5 ml. Con 0,5-1,0 ml de este cultivo se inocularon a la mañana siguiente 50 ml de medio LB (Sambrook et al., "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). Después de incubación durante 1,5 - 2 h (37°C, sacudimiento (180 rpm)) se alcanzó una DO_{578 nm} de 0,6. Las células se enfriaron durante 10 min en hielo y, a continuación, se separaron por centrifugación durante 5 min a 5.000 rpm y 4°C (rotor GSA, centrífuga Sorvall). El sobrenadante se desechó y el precipitado celular se resuspendió en 2,7 ml de disolución fría de CaCl₂ 0,1 M. Después de la adición de 2,3 ml de glicerol estéril al 50% (v/v), la suspensión de células se distribuyó en porciones (en cada caso 300 µl) en recipientes de reacción Eppendorf de 1,5 ml. Las células competentes se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y, a continuación, se almacenaron a -80°C.

50 Para la transformación de las células se descongeló una parte alícuota de las células químicamente competentes (300 µl) en hielo y se mezcló con 25 µl de una tanda de ligamiento. La tanda se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 30 min en hielo. Después de un choque de calor (42°C, 1 min) se incubó de nuevo durante 5 min en hielo. A continuación, se añadieron 800 µl de medio LB (Sambrook et al., 1989), y las células se sacudieron durante 1 h a 37°C (termomezclador, Eppendorf 5436). Antes de extender la tanda sobre medio LB, la tanda se concentró todavía. Para ello, se separó por centrifugación durante 1 min a 10.000 rpm, del sobrenadante se desecharon 750 µl y el precipitado celular se resuspendió. De esta tanda concentrada se extendieron 50 µl, 100 µl y 200 µl en placas LB (Sambrook et al., 1989) con 10 µg/ml de ampicilina y se incubó durante una noche a 37°C en la incubadora. Las placas se aclararon con 1 ml de medio LB. Con esta suspensión de células se inocularon a continuación 150 ml de medio LB (con 100 µg/ml de ampicilina) en matraces con deflector de Erlenmeyer de 500 ml. Los cultivos crecieron a 37°C y a 180 rpm. La sobre-expresión tuvo lugar mediante inducción del promotor en pTrc99A mediante la adición de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) 0,5 M a una DO_{578 nm} de 0,6. Los cultivos

inducidos se incubaron durante 3 h bajo las condiciones mencionadas y, a continuación, se recolectaron a una $DO_{578\text{ nm}} = 2,7$.

7. Detección de la actividad enzimática

La cepa de *E. coli* obtenida en el Ejemplo 6 se disgregó por medio de un molino de células. El material disgregado de las células se calentó durante 15 min hasta 85°C. A esta precipitación de calor coagulan las enzimas no estables térmicamente y precipitan. Dado que la proteína diana es estable al calor, queda retenida en el sobrenadante. Para la medición de la actividad de malonil-coenzima A-reductasa, el sobrenadante se diluyó en la relación 1:50 en tampón TM (Tris 50 mM/Cl, $MgCl_2$ 1 mM, pH 8,1). A 500 μ l de tampón HIPS (HEPES 100 mM/NaOH, $MgCl_2$ 5 mM, ditioneitol 1 mM, que contenía NADPH 0,5 mM se pipetearon 30 μ l del sobrenadante diluido o bien no diluido (para la detección de la actividad de metilmalonil-coenzima A-reductasa). En una primera tanda se inició la reacción mediante la adición de malonil-coenzima A, siendo la concentración final de 0,5 mM. Se determinó la disminución de la absorción de NADPH a 365 nm. La actividad enzimática determinada ascendió a 15,5 μ mol/min/mg de proteína (15,5 U/mg).

En una segunda tanda se inició la reacción mediante la adición de metilmalonil-coenzima A (razón social Fluka, n° de art.: 67767), ascendiendo la concentración final a 2,0 mM. Se determinó la disminución de la absorción de NADPH. La actividad enzimática determinada ascendió a 0,24 μ mol/min/mg de proteína (0,24 U/mg).

De estos resultados se puede deducir que el polipéptido que codifica la secuencia de ADN con la SEQ.-ID.-NO. 03 cataliza tanto la reacción de malonil-CoA como también de metilmalonil-coenzima A.

Por cada mol de malonil-CoA o bien de metilmalonil-CoA empleado se oxidó 1 mol de NADPH. De ello se puede deducir que la reacción enzimática conduce al correspondiente semialdehído.

Ejemplo 3

La presente invención se continúa explicando en el Ejemplo 3 con ayuda de la preparación de ácido metacrílico mediante una célula recombinante que es capaz de producir ácido 3-hidroxiisobutírico a través de metilmalonato-semialdehído como producto previo partiendo de glucosa como fuente de carbono. Para ello se sobre-expresaron en *C. glutamicum* ATCC13032, entre otras, las enzimas metilmalonil-coenzima A-mutasa (E_1) y 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (E_4).

1. Clonación de los genes NCg1470, NCg1471 y NCg1472 (arginina/sistema de transporte de ornitina-ATPasa, metilmalonil-coenzima A-mutasa y metilmalonil-coenzima A-mutasa, dominio/subunidad N-terminal) en pEKEx2, construcción de pEKEx2MCM cgl

Para las manipulaciones de ADN se utilizaron técnicas convencionales tal como se indican en Sambrook, J. et al. (1989), "*Molecular Cloning: a laboratory manual*", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo con la Pwo-ADN polimerasa de SAWADY (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Alemania) o Pfx-ADN-polimerasa de platino (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Si no se indicó de otro modo, la utilización de las polimerasas tuvo lugar de manera correspondiente a los datos de los fabricantes. Oligonucleótidos para las amplificaciones por PCR y la introducción de puntos de corte por restricción se obtuvieron de MWG-Biotech (Ebersberg, Alemania). La detección de cepas construidas tuvo lugar mediante PCR de colonias con Taq *Polymerase* READYMIX (Sigma, Taufkirchen, Alemania), así como preparaciones de plásmidos. Fragmentos de ADN se purificaron y obtuvieron con el kit de extracción de gel MinElute (Qiagen, Hilden, Alemania) según los datos del fabricante. El ADN del plásmido se aisló mediante kits Qiaprep spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemania). Todos los plásmidos construidos se verificaron mediante análisis de restricción con subsiguiente secuenciación.

Para la construcción de pEKEx2MCM_cgl se empleó el vector pEKEx2 (Kleinertz et al., 1991, *Gene* 102:93), que permite la transcripción de genes clonados bajo el control del promotor tac inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y del sistema represor lac (IacIq). El fragmento de ADN de 5,2 kb de tamaño, el cual codifica los genes NCg1470, NCg1471 y NCg1472 se amplificó mediante los siguientes oligonucleótidos y ADN de *Corynebacterim glutamicum* ATCC13032 como moldes:

pcg1859-57_directo (SEQ.-ID-NO. 23):
5'-cggtcgacaaggagatatagataTGACTGATCTCACAAGACTGC-3,
y
pcg1857-59_inverso (SEQ.-ID-NO. 24):
5'-cTTAGGCTTTGTCGAACGCCTCC-3'.

(En mayúsculas se indican las secuencias complementarias a la secuencia del genoma).

5 En los productos amplificados se introdujeron adicionalmente puntos de corte por restricción (subrayados) y un lugar de unión al ribosoma (aaggag) de 8 nucleótidos delante del codón de iniciación. En tal caso, el codón de iniciación TTG original fue sustituido por ATG. El material amplificado por PCR se fosforiló con polinucleótido quinasa (Roche, Basilea, Suiza) y el extremo romo se clonó en el punto de corte *Sma*I de vector pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985, Gene 33: 103-19). La identidad y el carácter correcto del inserto de 5,2 kb, se confirmó mediante secuenciación. A continuación, a partir del derivado pUC19 se aisló el fragmento de 5,2 kb como
10 fragmento *Sa*II y se ligó en el punto de corte *Sa*II del vector pEKEx2. Con ayuda de la digestión por restricción se eligieron plásmidos con la orientación correcta y uno de ellos se designó pEKEx2MCM cgl. El plásmido obtenido se muestra en la Figura 21.

15 2. Clonación de la 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* en pEKEx2, construcción de pECXT99A MMCoAR 3HIBDH

El gen de la 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (3HIBDH) de *Thermus thermophilus* (TTHA0237) se sintetizó teniendo en cuenta el uso de codones de *C. glutamicum*. El gen optimizado por el uso del codón (SEQ.-ID.-NO. 25) se sintetizó en el vector pGA4 (pGA4_3HIBDH, Figura 22). Mediante digestión del vector pGA4_3HIBDH con las
20 endonucleasas *Kpn*I y *Ecl*136II, el gen de 3HIBDH se ligó en el vector pGA5_MMCoAR linearizado con las enzimas de restricción *Bam*HI (y subsiguiente reacción de relleno) y *Kpn*I, un vector que ya contiene una secuencia derivada de la metilmalonil-coenzima A-mutasa de *Sulfolobus tokodaii* bajo el control de la expresión funcional del promotor T7. El vector pGA5_MMCoAR_3HIBDH resultante se representa en la Figura 23.

25 A partir del vector pGA5_MMCoAR_3HIBDH se clonó, mediante digestión con *Kpn*I y *Ecl*136II, el inserto con la metilmalonil-coenzima A-reductasa y la 3HIBDH en el vector diana pECXT99A linearizado mediante digestión con las endonucleasas de restricción *Bam*HI (y subsiguiente reacción de relleno) y *Kpn*I (número de acceso: AY219684, Figura 24) (vector resultante pECXT99A_MMCoAR_3HIBDH, Figura 25).

30 3. Preparación con pEKEx2MCM cgl y pECXT99A 2HIBDH varIIMMCoAR de células de *C. glutamicum* transformadas

La preparación de células competentes de *C. glutamicum* ATCC13032 tuvo lugar tal como se describe en Tauch et al. (*Curr Microbiol.* 2002, 45: 362-367). ADN de pEKEx2MCM_cgl y pEC-XT99A_3HIBDH_varIIMMCoAR se
35 introdujo mediante electroporación y se seleccionaron transformantes en agar de cerebro-corazón de la razón social Merck (Darmstadt, Alemania) que había sido suplementado con 50 mg/l de canamicina y 5 mg/l de tetraciclina (Liebl et al. *FEMS Microbiol Lett.*, 1989, 53: 299-303). De los transformantes se aisló el ADN del plásmido, y éste se caracterizó mediante digestión por restricción. De este modo se obtuvo pEKEx2MCM_cgl/pEC-XT99A_3HIBDH_varIIMMCoAR de *C. glutamicum*.

40 4. Cultivo y preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico

Colonias individuales de *C. glutamicum* pEKEx2MCM_cgl/pEC-XT99A_3HIBDH_varIIMMCoAR se inocularon en 25
45 ml de medio completo (medio de cerebro-corazón) con 15 µg/l de canamicina y 5 µg/l de tetraciclina y se cultivaron durante una noche a 30°C y 200 rpm. Como control se cultivó el tipo salvaje sin antibióticos.

Los cultivos se separaron por centrifugación (10 min, 4°C, 5292 x g) y se lavaron con solución salina (NaCl al 0,9%). Las células se resuspendieron en 25 ml (en matraces de 250 ml) de medio GCXII con antibióticos (15 µg/l de canamicina y 5 µg/l de tetraciclina). La cepa portadora de plásmidos se indujo con IPTG 0,5 mM (12,5 µl de la
50 solución madre 1 M).

Medio mínimo CGXII (según Keilhauer et al., J Bacteriol. 1993, 175: 5595-5603):

55 20 g de (NH₄)₂SO₄
5 g de urea
1 g de K₂HPO₄
1 g de KH₂PO₄
42 g de MOPS
1 ml de MgSO₄ x 7 H₂O (25 g/100 ml, filtrado en condiciones estériles)
60 1 ml de CaCl₂ x 2 H₂O (1,32 g/100 ml, filtrado en condiciones estériles)

Las sales se disolvieron en aprox. 800 ml de agua bidest. y el pH se ajustó a 7 con KOH. Para ello, se añadieron aprox. 20-25 plaquitas de KOH y a continuación se titularon con KOH 10 N a pH 7. Los componentes de los medios se completaron entonces con agua bidestilada hasta 900 ml y se trataron en autoclave.

5 Después del tratamiento en autoclave, se añadió 1 ml de disolución salina de trazas.

Disolución salina de trazas:

	1 g	de FeSO ₄ x 7 H ₂ O
	1 g	de MnSO ₄ x 7 H ₂ O
10	0,1 g	de ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,02 g	de CuSO ₄
	0,002 g	de NiCl ₂ x 6 H ₂ O

15 Las sales se disolvieron en 100 ml de H₂O desionizada y en tal caso se acidificó con HCl (papel de pH aprox. pH 1). A continuación, la disolución se filtró en condiciones estériles.

Al medio se añadieron 100 ml de glucosa al 50% (concentración final 5%), para una concentración final de 4% se añaden 80 ml de glucosa al 50% y 20 ml de agua bidest. estéril.

20 El medio se suplementó con 1 ml de biotina (20 mg/100 ml), 60 µg/l de coenzima B12 (después de 7 h), propionato 0,1 mM (después de 22 h) y disolución salina de trazas.

25 Al cabo de 27 h pudieron detectarse en una muestra 6 mg/l de ácido 3-hidroxiisobutírico mediante cromatografía de iones (Metrohm Compact IC 761 con automuestreador, fase móvil: NaOH 8 mM; columna: Dionex AS15 4 x 250 mm + antecolumna AG15 4 x 50 mm; temperatura de la columna: 25°C, caudal: 1,4 mL/min; detector: conductividad; volumen de inyección: 10 µl; tiempo de funcionamiento: 30 min (Figura 26). La identidad del ácido 3-hidroxiisobutírico se confirmó mediante acumulación de ácido 3-hidroxiisobutírico químicamente puro (30 mg/l) (Figura 27).

30 5. Deshidratación de ácido 3-hidroxiisobutírico para formar metacrilato

35 5 ml de disolución de ácido 3-hidroxiisobutírico (0,2 g/L), producida según el Ejemplo 4 precedente, se mezclan con agitación con NaOH (0,06 mg). La disolución se incuba bajo agitación y enfriamiento a reflujo a 185 - 195°C bajo vacío (300 torr). A lo largo de un espacio de tiempo de 5 h, se añaden cada hora en cada caso otros 0,5 mg de ácido 3-hidroxiisobutírico en 5 mL. La disolución contiene p-metoxifenol al 0,4 por ciento en peso con el fin de impedir una polimerización del metacrilato. Después de 24 h de incubación, finaliza la reacción. La conversión de ácido 3-hidroxiisobutírico en metacrilato asciende a más de 90%. La separación del ácido metacrílico de la tanda de reacción tiene lugar mediante destilación.

40 Ejemplo 4

La presente invención se explica adicionalmente en el Ejemplo 4 con la ayuda de la preparación de ácido metacrílico mediante una célula de *E. coli* recombinante que es capaz de formar ácido 3-hidroxiisobutírico a través de metilmalonato-semialdehído como producto previo y a través de acriloil-coenzima A como producto intermedio.

45 Para la reacción de la fuente de C glicerol para formar ácido 3-hidroxiisobutírico con células de *E. coli* recombinantes, los genes de siete enzimas diferentes se clonaron en una serie de plásmidos de expresión. Para ello, se aprovecharon los vectores Duet (Merck, Alemania). En este caso, se trata de un sistema de cuatro vectores de expresión que son todos compatibles entre sí y, además, presentan diferentes marcadores de resistencia a antibióticos.

50 1. En particular, para la reacción de glicerol para formar ácido 3-hidroxiisobutírico se clonaron en vectores de expresión los genes que codifican las siguientes enzimas:

55 a) Glicerol-deshidratasa (EC 4.2.1.30) (GD) de *Klebsiella pneumoniae*. La enzima cataliza la deshidratación, dependiente de adenosilcobalamina de glicerol para formar 3-HPA (3-hidroxiisobutiraldehído). Se compone de tres subunidades (GD-alfa, GD-beta y GD-gamma), que se presentan codificadas en un operón en *K. pneumoniae* de 3 genes (*gldA*, *gldB* y *gldC*).

60 b) Factor de reactivación de *K-pneumoniae*. Dado que glicerol-deshidratasa dependientes de

adenosilcobalamina son inactivadas mediante glicerol, se requiere adicionalmente para la reacción de glicerol para formar 3-HPA, la actividad de un factor de reactivación. El factor de reactivación para la glicerol-deshidratasa de *K. pneumoniae* es codificado por los genes *gdrA* y *gdrB*.

- 5 c) Aldehído-deshidrogenasa AldH de *E. coli*. Para la reacción de 3-HPA para formar ácido 3-hidroxiisobutírico (3-HIB) se amplificó el gen *aldH* de *E. coli*.
- d) Propionil-coenzima A-sintasa (Pcs) de *Chloroflexus aurantiacus* (codificada por el gen *pcs*). La propionil-coenzima A-sintasa cataliza la reacción de 3-HP para formar propionil-coenzima A. Se trata de una enzima trifuncional y contiene tres dominios funcionales. El dominio de acil-coenzima A-sintetasa (ACS) cataliza la activación de 3-HP para formar 3-hidroxiisobutiril-CoA. A continuación de ello tiene lugar la deshidratación para formar acrilil-CoA, catalizada por el dominio enoil-CoA-hidratasa (ECH) de la Pcs. El dominio de enoil-CoA-reductasa (ECR) de la Pcs cataliza finalmente la reducción dependiente de NADPH del acrilil-CoA para formar propionil-CoA. No obstante, esta reacción es irrelevante para el proyecto descrito, ya que aquí el producto intermedio acrilil-CoA es hecho reaccionar posteriormente por parte de la siguiente enzima (crotonil-CoA carboxilasa/reductasa, véase más abajo).
- 10
- 15
- e) Crotonil-coenzima A-carboxilasa/reductasa (enzima E₆₂) (Ccr) de *Rhodobacter sphaeroides* (codificada por el gen *ccr*). La actividad principal de la Ccr se encuentra en la carboxilación reductora de crotonil-coenzima A para formar etilmalonil-CoA. Sin embargo, la enzima muestra una amplia especificidad por el sustrato y convierte de manera muy eficaz acrilil-coenzima A en metilmalonil-coenzima A.
- 20
- f) Malonil-CoA reductasa (Mcr, E₂ y E₃) de *Sulfolobus tokodaii* (codificada por el gen *mcr*). La Mcr cataliza preferentemente la reducción dependiente de NADPH de malonil-coenzima A para formar malonato-semialdehído. Sin embargo, también presenta una actividad secundaria con metilmalonil-coenzima A como sustrato y convierte a éste en metilmalonato-semialdehído.
- 25
- g) 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (E₄) (3-HIB-DH) de *Thermus thermophilus* (codificada por el gen *MmsB*). Esta enzima cataliza la reacción reversible, dependiente de NADPH, de metilmalonato-semialdehído para formar ácido 3-hidroxiisobutírico (3-HIB).
- 30

2. En lo que sigue se describe con detalle la estrategia de clonación para la sobre-expresión heteróloga de las enzimas arriba descritas.

- 35 a) Construcción del plásmido pACYCDuet-KpGDRF para la sobre-expresión del factor de reactivación de glicerol-deshidratasa (GDRF).

Primeramente se amplificaron mediante PCR los genes *gdrA* (sinónimo ORF4) y *gdrB* (sinónimo ORF2b), que codifican las dos subunidades de GDRF de *K. pneumoniae*. Como matriz se utilizó ADN cromosómico de la cepa DSM2026 de *K. pneumoniae*.

40

Para la amplificación de *gdrA* se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

orf4fw (SEQ.-ID-NO. 26):

5'-TGAAGATCCTAGGAGGTTTAAACATATGCCGTTAATAGCCGGGATTG-3')

45

orf4Salrv (SEQ.-ID-NO. 27):

5'-TATATAGTCGACTTAATTCGCCTGACCGGCCAG-3';
(subrayada la secuencia de reconocimiento de *Sall*).

50

Para la amplificación de *gdrB* se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

orf2bPcifw (SEQ.-ID-NO. 28):

5'-TATATAACATGTCGCTTTCACCGCCAGGC-3'

(subrayada la secuencia de reconocimiento de *PciI*)

55

orf2brv (SEQ.-ID-NO. 29):

5'-CATATGTTTAAACCTCCTAGGATCTTCAGTTTCTCTCACTTAACGGCA GG-3').

Los productos de la PCR obtenidos se fusionaron entre sí seguidamente mediante PCR de sobrecruzamiento.

Para ello se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

5 orf2bNcofw (SEQ.-ID-NO. 30):
 (5'-TATATACCATGGCGCTTTCACCGCCAGGC-3'
 (subrayada la secuencia de reconocimiento de *NcoI*)

10 orf4Salrv (SEQ.-ID-NO. 31):
 5'-TATATAGTCGACTTAATTCGCCTGACCGGCCAG-3'
 (subrayada la secuencia de reconocimiento de *SalI*)

15 El producto de la PCR (2.220 pb) se purificó por medio del kit de purificación de PCR QIAquick de Qiagen, Hilden, de acuerdo con los datos del fabricante y se ligó en el vector pCR-BluntII-TOPO, obteniéndose el vector pCR-BluntII-Topo-KpGDRF. El ligamiento y la subsiguiente transformación en células de *E. coli* tienen lugar según los datos del fabricante Invitrogen Corporation, Carlsbad (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit).

20 La secuencia de GDRF se separó por corte del vector a continuación mediante digestión de pCR-BluntII-Topo-KpGDRF con *PciI* y *SalI* y se ligó en el vector de expresión pACYC-Duet cortado con *NcoI* y *SalI*, obteniéndose pACYC-Duet-KpGDRF (6.142 pb).

b) 25 Contrucción del plásmido pAS50_Ec_aldH para la sobre-expresión de la glicerol-deshidratasa (GD) de *K. pneumoniae* y de la aldehído-deshidrogenasa aldH de *E. coli*.

Las tres subunidades de la GD de *K. pneumoniae* están organizadas de forma natural en un operón (genes *gldA*, *gldB* y *gldC*). Se amplificaron mediante PCR, utilizándose como matriz de nuevo ADN cromosómico de DSM2026 de *K. pneumoniae*.

30 Se emplearon los siguientes oligonucleótidos para la amplificación:

KpGDNdefw (SEQ.-ID-NO. 32):
 5'-TATATACATATGAAAAGATCAAACGATTTGCAGTACTGG-3'
 (subrayada la secuencia de reconocimiento de *NdeI*)

40 KpGDSalrv (SEQ.-ID-NO. 33):
 5'-TATATAGTCGACTTAGCTTTCCTTTACGCAGCTTATGC-3'
 (subrayada la secuencia de reconocimiento de *SalI*)

El material amplificado se ligó en el vector pCR-BluntII-TOPO, obteniéndose el vector pCR-BluntII-Topo-KpGD. El ligamiento y la subsiguiente transformación en células de *E. coli* tuvo lugar según los datos del fabricante Invitrogen Corporation, Carlsbad (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit).

45 El fragmento que codifica GD se separó por corte del vector pCR-BluntII-Topo-KpGD con *XbaI* (rellenado en los extremos romos mediante Klenow) y *NdeI* y se ligó en un vector de expresión pET-Duet cortado con *NdeI* y *EcoRV*, obteniéndose el plásmido pAS50 (8161 pb).

50 Seguidamente, se amplificó el gen *aldH* de *E. coli*. Para ello, se empleó ADN cromosómico de *E. coli* K12 como molde, y como cebadores de PCR se emplearon los oligonucleótidos

1228_ald_fp (SEQ.-ID-NO. 34):
 5'-AAAACATATGAATTTTCATCATCTGGCTTACTGG-3'
 (subrayada la secuencia de reconocimiento de *NdeI*) y

55 1228_ald_rp (SEQ.-ID-NO. 35):
 5'-AAAACATATGTATATTTCTTCTTTTCAGGCCTCCAGGCTTATCCAGATG-3'
 (subrayada la secuencia de reconocimiento de *NdeI*)

60 El material amplificado por PCR se purificó a través de gel y, a continuación, se ligó en el sitio *NdeI* del

plásmido pAS50 mediante digestión con *NedI*, obteniéndose el plásmido pAS50_Ec_aldH (9.666 pb).

- c) Construcción del plásmido pCDFDuet-1_Rs_ccr_Cau_pcs para la sobre-expresión de la propionil-coenzima A-sintasa (Pcs) de *Chloroflexus aurantiacus* así como de la crotonil-coenzima A-carboxilasa/reductasa (CCR) de *Rhodobacter sphaeroides*.

Para la expresión heteróloga en *E. coli* y la purificación de la CCR, el gen se clonó en el vector de expresión pTE3d, obteniéndose el plásmido pTE13: el gen *ccr* de *R. sphaeroides* se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos

ccr-fw (SEQ.-ID-NO. 36):
5'-GGAGGCAACCATGGCCCTCGACGTGCAGAG-3'
(subrayada la secuencia de reconocimiento de *NcoI*) y

ccr-rev (SEQ.-ID-NO. 37):
5'-GAGACTTGCGGATCCCTCCGATCAGGCCTTGC-3'
(subrayada la secuencia de reconocimiento de *BamHI*)

empleándose ADN cromosómico de la cepa *R. sphaeroides* 2.4.1. (DSMZ 158) como moldes. El producto de la PCR se ligó como fragmento *NcoI/BamHI* en el vector pET3d cortado con *NcoI/BamHI* (Merck, Alemania), obteniéndose el plásmido pTE13.

A partir del pTE13 se clonó el gen *ccr* como fragmento *NcoI/BamHI* en los lugares de corte de *NcoI/BamHI* del plásmido pCDFDuet-1 (Merck, Alemania), obteniéndose el plásmido pCDFDuet-1_Rs_ccr.

Seguidamente, el gen *pcs* de *C. aurantiacus* se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos

1228_Cau_pcs_fp(71) (SEQ.-ID-NO. 38):
5'-AAAACATATGATCGACTGCGCCCTTGC-3'
(subrayada la secuencia de reconocimiento de *NdeI*) y

1228_Cau_pcs_rp(74) (SEQ.-ID-NO. 39):
5'-AAGACGTCCTACCGCTCGCCGGCCGTCC-3'
(subrayada la secuencia de reconocimiento de *AatII*)

utilizándose ADN cromosómico de la cepa *C. aurantiacus* OK-70-fl (DSM 636) como moldes. El material amplificado se ligó en el vector pCDFDuet-1_Rs_ccr correspondientemente cortado después de la purificación mediante extracción en gel a través de digestión con *NdeI/AatII*, obteniéndose el plásmido pCDFDuet-1_Rs_ccr_Cau_pcs (10472 pb).

- d) Construcción del plásmido pCOLA-Duet_St_mcr_Ocg_Tth_HIBDH_oCg para la sobre-expresión de la malonil-CoA-reductasa (Mcr) de *Sulfolobus tokodaii* así como de la 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (3-HIB-DH) de *Thermus thermophilus*.

Mediante la síntesis del gen se preparó primeramente una variante del gen *mcr* de *S. tokodaii* adaptada al uso del codón de *Corynebacterium glutamicum* (St_mcr_oCg). La síntesis tuvo lugar en la razón social GeneArt, Alemania, y se habilitó el gen artificial St_mcr_oCg en forma del plásmido pGA4-MMCoAR_ST (SEQ.-ID.-NO. 40). El ADN de pGA4-MMCoAR_ST se empleó como molde de PCR con el fin de amplificar el gen artificial St_mcr_oCg con los oligonucleótidos

1228_MMCoAR_fp (SEQ.-ID-NO. 41):
5'-AACCATGGGCGCACCCCTGAAGG-3'
(subrayada la secuencia de reconocimiento de *NcoI*) y

1228_MMCoAR_rp (SEQ.-ID-NO. 42):
5'-AAGGATCCTTACTTTTCGATGTAGCCCTTTCC-3'
(subrayada la secuencia de reconocimiento de *BamHI*)

Después de la purificación mediante extracción en gel, el material amplificado se digirió con *NcoI/BamHI* y se ligó en los correspondientes lugares de corte del plásmido pCOLADuet_1 (Merck, Alemania),

obteniéndose el plásmido pCOLA-Duet_St_mcr_oCg.

Una variante del gen *MmsB* de *T. thermophilus* adaptada al uso del codón de *Corynebacterium glutamicum* (que codifica una 3-HIB-DH) se habilitó asimismo mediante la síntesis de gen (GeneArt, Alemania), a saber en forma del plásmido pGA4_3HIBDH_TT (SEQ ID NO 43).

pGA4_3HIBDH_TT se empleó como molde de PCR con el fin de amplificar el gen *Tth_HIBDH_oCg* artificial con los oligonucleótidos

1228_Tth_HIBDH_fp (SEQ.-ID-NO. 44):
5'-AAAACATATGGAAAAGGTGGCATTTCATCG-3'
(subrayada la secuencia de reconocimiento de *NdeI*) y

1228_Tth_HIBDH_rp (SEQ.-ID-NO. 45):
5'-AAAAGATCTTTAGCGGATTTCCACACCGCC-3'
(subrayada la secuencia de reconocimiento de *BglII*)

Después de la extracción del gel, el material amplificado se cortó con *NdeI/BglII* y se ligó en los lugares de corte *NdeI/BglII* del plásmido pCOLA-Duet_St_mcr_oCg, obteniéndose el plásmido pCOLA-Duet_St_mcr_oCg_Tth_HIBDH_oCg (5.620 pb).

e) Los 4 plásmidos pACYCDuet-KpGDRF, pAS50_Ec_aldH, pCDFDuet-1_Rs_ccR_Cau_pcs y pCOLA-Duet_St_mcr_oCg_Tth_HIBDH_oCg se co-transformaron subsiguientemente de acuerdo con el protocolo del fabricante en células BL21 (DE3) de *E. coli* químicamente competentes y adquiribles en el comercio (Merck, Alemania). La selección tuvo lugar en agar LB suplementado con ampicilina (25 µg/ml), cloranfenicol (17 µg/ml), canamicina (15 µg/ml) y estreptomycin (25 µg/ml).

f) Inducción de los plásmidos de expresión en *E. coli*

Las cepas de *E. coli* descritas precedentemente en e) y portadoras de plásmidos se cultivaron en medio M9 modificado (6,8 g/l de Na₂HPO₄ x 2H₂O; 3 g/l de KH₂PO₄; 0,5 g/l de NaCl; 1 g/l de NH₄Cl; 1,25 g/l de extracto de levadura; glicerol al 1% v/v; 15 mg/l de CaCl₂ x 2H₂O; 250 mg/l de MgSO₄ x 7 H₂O; solución de vitamina Gibco MEM al 1% v/v; 41,9 g/l de MOPS). El medio se suplementó con ampicilina (25 µg/ml), cloranfenicol (17 µg/ml), canamicina (15 µg/ml) y estreptomycin (25 µg/ml). Todo el cultivo (cultivos previos y cultivos principales) tuvo lugar en un sacudidor regulado en temperatura a 37°C. Primeramente se cultivaron las cepas en 5 ml de medio a lo largo de una noche. Seguidamente, 20 ml de medio se inocularon en matraces con deflectores de 100 ml en la relación 1 : 20 a partir del cultivo durante una noche y se continuaron cultivando. Al alcanzar una DO₆₀₀ de aprox. 0,8, se añadieron 6 µM de cobalamina y 1 µM de IPTG y se continuaron incubando durante 4 horas. En este instante se retiraron 2,5 ml de suspensión de células y se almacenaron a -20°C hasta el análisis.

g) La detección y cuantificación de 3-HIB tuvo lugar mediante cromatografía de iones (IC) y detección de la conductividad. Para ello, muestras de 2,5 ml se descongelaron a la temperatura ambiente y se separaron por centrifugación (10 min, 13.200 rpm). El sobrenadante se purifica a través de un filtro de jeringa (tamaño de poros 0,44 µm). La medición tiene lugar con un aparato Metrohm Compact IC 761 con automuestreador. Fase móvil: NaOH 8 mM. Columna: Dionex AS15 4 x 250 mm, antecolumna AG15 4 x 50 mm. Temperatura de la columna: 25°C. Caudal: 1,4 ml/min. Volumen de inyección: 10 µl.

h) Deshidratación de ácido 3-hidroxiisobutírico para formar metacrilato

5 ml de disolución concentrada de ácido 3-hidroxiisobutírico (0,2 g/L), producida según el procedimiento precedente, descrito en f), se mezclan con agitación con NaOH (0,06 mg). La disolución se incuba con agitación y refrigeración a reflujo a 185 - 195°C bajo vacío (300 torr). A lo largo de un espacio de tiempo de 5 h se añaden cada hora en cada caso otros 0,5 mg de ácido 3-hidroxiisobutírico en 5 mL. La disolución contiene p-metoxifenol al 0,4 por ciento en peso con el fin de impedir una polimerización de metacrilato. Después de incubación durante 24 h, termina la reacción. La conversión de ácido 3-hidroxiisobutírico en metacrilato asciende a más del 90%. La separación de ácido metacrílico a partir de la tanda de reacción tiene lugar mediante destilación.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Evonik Degussa GmbH
- 5 <120> Preparación microbiológica de ácido 3-hidroxiisobutírico
- <130> DR82387
- <160> 45
- 10 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- 15 <211> 2214
- <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032
- <400> 1
- 20
- atgacgtcga tcctaattt ttcagacatc ccattgactg ctgagacacg tgcacggag 60
- tcacacaacg ttgacgccgg caaggtgtgg aacactcccg aaggcattga tgtcaagcgc 120
- gtattcacgc aggctgaccg cgacgaggcg caagcggcgg gacatccggt ggattctttg 180
- ccaggtcaaa agccatttat ggcggggccg tacccaacta tgtacaccaa tcagccgtgg 240
- acgattcgcc agtacgcagg ctttcaacc gccgcggaat ccaatgcgtt ttacggagg 300
- aaccttgctg cgggtcaaaa aggtttgtcg gttgcgttcg atctagcgac ccaccgcggt 360
- tatgactcgg ataatgagcg cgtggtcggc gatgtgggta tggccggcgt ggcgattgat 420
- tcgattttgg atatcgctca gctgtttgat ggcattgatt tgccagcgt gtcggtgtcg 480
- atgacatga atggcgctgt gctgccgatt cttgcgttct atatcgtggc ggctgaggaa 540
- caaggtgtgg gtccggagca gcttgcgggc acgatccaga atgacatctt gaaagaattt 600
- atggtgcgca acacctatat ttatccgccg aagccgtcga tgcgcatcat ttccaacatc 660

5

ttgagtaca cctcctgaa gatgccacgt ttaactcca ttctgattc tggctatcac 720
 atccaggaag cgggagcgac tgccgattg gagctggcct acactctggc ggatggtatt 780
 gaatacatcc gtgcaggtaa agaggtaggc ctgacgtgg alaagttcgc gcctcgtctg 840
 tccttctct ggggtattc tatgtacacc ttcattggaga tcgcaaagct gcgtgcggga 900
 cgactgctgt ggagcgagtt ggtggcaaaa ttogatccga aaaacgcaa gtcccagtcg 960
 ctgcgcacgc actcgcagac ctctgggtgg tcgttgaccg cgcaggatgt gtacaacaac 1020
 gtcgcccga ccgcgattga ggcatggct gcaaccagg gccacacca gtcgctgcac 1080
 accaatgcac ttgatgaggc gttggcgtg cccaccgatt tctctgctcg tatgcccga 1140
 aacaccagc tgttctgca gcaggaatct ggcacgtgc gtccagtga tccatggcg 1200
 ggctctatt acgtggagt gttaccaat gagctggcta accgcgcgcg caagcacatc 1260
 gatgaggtgg aggaagccgg cggatggcg caggccaccg cgcagggaaat tctaagctg 1320
 cgcattgagg aatcagcggc acgcaccag gctcgcattg attccggccg ccaggcgtg 1380
 atcggcgtga atcgtactg ggcggaagaa gatgagaaa ttgaagtct caaggtgac 1440
 aacaccaagg ttcgcgaga acagtggct aaactcgc aactgaaagc agagcgaac 1500
 gatcggaag tcaaggctgc gctggatgc ttgacagctg ctgcccga cgagcataaa 1560
 gagccagggg atttgatca gaacctgctc aaactgccc tcgatgctgc gcgcaaaa 1620
 gctaccattg gagagatc ccatgcttg gaagttgtct ttggccca cgaagcagaa 1680

10

15

atcaggacgc tgtctggcgt gtacaaggat gaggttgaa aggaaggcac agtgagcaac 1740

gtcgaacgcg cgateccct ggctgaoccc ttgaggctg aggaaggccg ccgcccacgt 1800

atctttattg ccaagatggg ccaggatgga catgaccgtg gacagaaggt tgcgctct 1860

gcctatgctg acctgggcat ggacgtggat gttggaccgc tgttcaaac tccagccgaa 1920

gctgcccgcg ccgccgtgga cgccgatgtt cacgtggtgg gtatgtctc gctggcagca 1980

ggccacctca ccttctgcc cgagctgaag aaagaactg cagctcttg ccgcatgac 2040

attctggtca ccgtgggcgg cgtcattccg ccgggcgatt tccaggatct ctacgatg 2100

ggtgccgcg cgattacc tccaggaacc gtcacgagg agtcggcgat cgatctgac 2160

accgactcg ccgacacct ggctttgac ctggatgtgg atgtgaatga gtga 2214

<210> 2

5 <211> 737

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

<400> 2

10

Met Thr Ser Ile Pro Asn Phe Ser Asp Ile Pro Leu Thr Ala Glu Thr
1 5 10 15

Arg Ala Ser Glu Ser His Asn Val Asp Ala Gly Lys Val Trp Asn Thr
20 25 30

Pro Glu Gly Ile Asp Val Lys Arg Val Phe Thr Gln Ala Asp Arg Asp
35 40 45

Glu Ala Gln Ala Ala Gly His Pro Val Asp Ser Leu Pro Gly Gln Lys
50 55 60

15

Pro Phe Met Arg Gly Pro Tyr Pro Thr Met Tyr Thr Asn Gln Pro Trp
 65 70 75 80

Thr Ile Arg Gln Tyr Ala Gly Phe Ser Thr Ala Ala Glu Ser Asn Ala
 85 90 95

Phe Tyr Arg Arg Asn Leu Ala Ala Gly Gln Lys Gly Leu Ser Val Ala
 100 105 110

Phe Asp Leu Ala Thr His Arg Gly Tyr Asp Ser Asp Asn Glu Arg Val
 115 120 125

Val Gly Asp Val Gly Met Ala Gly Val Ala Ile Asp Ser Ile Leu Asp
 130 135 140

Met Arg Gln Leu Phe Asp Gly Ile Asp Leu Ser Ser Val Ser Val Ser
 145 150 155 160

Met Thr Met Asn Gly Ala Val Leu Pro Ile Leu Ala Phe Tyr Ile Val
 165 170 175

Ala Ala Glu Glu Gln Gly Val Gly Pro Glu Gln Leu Ala Gly Thr Ile
 180 185 190

Gln Asn Asp Ile Leu Lys Glu Phe Met Val Arg Asn Thr Tyr Ile Tyr
 195 200 205

Pro Pro Lys Pro Ser Met Arg Ile Ile Ser Asn Ile Phe Glu Tyr Thr
 210 215 220

Ser Leu Lys Met Pro Arg Phe Asn Ser Ile Ser Ile Ser Gly Tyr His
 225 230 235 240

Ile Gln Glu Ala Gly Ala Thr Ala Asp Leu Glu Leu Ala Tyr Thr Leu
 245 250 255

Ala Asp Gly Ile Glu Tyr Ile Arg Ala Gly Lys Glu Val Gly Leu Asp
 260 265 270

Val Asp Lys Phe Ala Pro Arg Leu Ser Phe Phe Trp Gly Ile Ser Met
 275 280 285

Tyr Thr Phe Met Glu Ile Ala Lys Leu Arg Ala Gly Arg Leu Leu Trp
 290 295 300

Ser Glu Leu Val Ala Lys Phe Asp Pro Lys Asn Ala Lys Ser Gln Ser
 305 310 315 320

Leu Arg Thr His Ser Gln Thr Ser Gly Trp Ser Leu Thr Ala Gln Asp
 325 330 335

Val Tyr Asn Asn Val Ala Arg Thr Ala Ile Glu Ala Met Ala Ala Thr
 340 345 350

Gln Gly His Thr Gln Ser Leu His Thr Asn Ala Leu Asp Glu Ala Leu
 355 360 365

Ala Leu Pro Thr Asp Phe Ser Ala Arg Ile Ala Arg Asn Thr Gln Leu
 370 375 380

Leu Leu Gln Gln Glu Ser Gly Thr Val Arg Pro Val Asp Pro Trp Ala
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Tyr Val Glu Trp Leu Thr Asn Glu Leu Ala Asn Arg Ala
 405 410 415

Arg Lys His Ile Asp Glu Val Glu Glu Ala Gly Gly Met Ala Gln Ala
 420 425 430

Thr Ala Gln Gly Ile Pro Lys Leu Arg Ile Glu Glu Ser Ala Ala Arg
 435 440 445

Thr Gln Ala Arg Ile Asp Ser Gly Arg Gln Ala Leu Ile Gly Val Asn
 450 455 460

Arg Tyr Val Ala Glu Glu Asp Glu Glu Ile Glu Val Leu Lys Val Asp
 465 470 475 480

Asn Thr Lys Val Arg Ala Glu Gln Leu Ala Lys Leu Ala Gln Leu Lys
485 490 495

Ala Glu Arg Asn Asp Ala Glu Val Lys Ala Ala Leu Asp Ala Leu Thr
500 505 510

Ala Ala Ala Arg Asn Glu His Lys Glu Pro Gly Asp Leu Asp Gln Asn
515 520 525

Leu Leu Lys Leu Ala Val Asp Ala Ala Arg Ala Lys Ala Thr Ile Gly
530 535 540

Glu Ile Ser Asp Ala Leu Glu Val Val Phe Gly Arg His Glu Ala Glu
545 550 555 560

Ile Arg Thr Leu Ser Gly Val Tyr Lys Asp Glu Val Gly Lys Glu Gly
565 570 575

Thr Val Ser Asn Val Glu Arg Ala Ile Ala Leu Ala Asp Ala Phe Glu
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Arg Arg Pro Arg Ile Phe Ile Ala Lys Met Gly Gln
595 600 605

Asp Gly His Asp Arg Gly Gln Lys Val Val Ala Ser Ala Tyr Ala Asp
610 615 620

Leu Gly Met Asp Val Asp Val Gly Pro Leu Phe Gln Thr Pro Ala Glu
625 630 635 640

Ala Ala Arg Ala Ala Val Asp Ala Asp Val His Val Val Gly Met Ser
645 650 655

Ser Leu Ala Ala Gly His Leu Thr Leu Leu Pro Glu Leu Lys Lys Glu
660 665 670

Leu Ala Ala Leu Gly Arg Asp Asp Ile Leu Val Thr Val Gly Gly Val

675 680 685

Ile Pro Pro Gly Asp Phe Gln Asp Leu Tyr Asp Met Gly Ala Ala Ala
 690 695 700

Ile Tyr Pro Pro Gly Thr Val Ile Ala Glu Ser Ala Ile Asp Leu Ile
 705 710 715 720

Thr Arg Leu Ala Ala His Leu Gly Phe Asp Leu Asp Val Asp Val Asn
 725 730 735

Glu

- 5 <210> 3
- <211> 1071
- <212> ADN
- <213> Sulfolobus tokodaii

- 10 <400> 3

atgaggagaa cattaaaagc cgcaatatta ggtgctactg gtttagtagg aatcgaatac 60

gtaagaatgc tatcaaatca tccttatatt aaaccagcat atttagctgg aaaaggtca 120

gtgggtaaac cgtatggtga ggtagtaaga tggcaaacag taggacaagt tcctaaggaa 180

atagctgata tggaaataaa accaactgat cctaagttaa tggatgatgt agacataata 240

tttttccat tacctcaagg tgctgctggc ccagtagaag aacaatttcg aaaagaagga 300

ttcctgtga itagtaattc accagatcat agatttgatc ctgatgtcc cttattggtt 360

cctgaactaa atcctcatac tattagctta attgatgagc aaagaaaaag aagagaatgg 420

aaaggattta tagtaactac accactatgc acagcccagg gtcagcaat accattaggt 480

gctatatta aagattataa gatggatgga gcatttataa ctactattca atcgctatct 540

ggtgccgggt atccaggaat accatcatta gatgtagtag ataatatctt gccttaggt 600
 gatggatacg atgccaagac gataaaagag atcttcagaa tttaagcga agttaagaga 660
 aatgtagatg aacctaaatt agaagatgta agcttagcag caacaactca tagaatagct 720
 actatacatg gtcattatga agtactatat gtatcgtca aagaggaaac tgctgctgaa 780
 aaagttaagg agactttaga aaactttaga ggggaaccac aagatctaaa attaccaact 840
 gcacctcaa agccaattat cggtatgaat gaggatacaa gacctcaagt ctattttgat 900
 agatgggctg gggatattcc aggaatgagt gtagttgtag gtagattaa gcaagtgaat 960
 aagagaatga taaggttagt atcattaatt cataacacgg tcagaggagc cgcaggagga 1020
 ggtatattag cagctgaatt actgtcga aaaggatata tgaaaagta a 1071

<210> 4
 <211> 356
 5 <212> PRT
 <213> Sulfolobus tokodaii
 <400> 4

Met Arg Arg Thr Leu Lys Ala Ala Ile Leu Gly Ala Thr Gly Leu Val
 1 5 10 15

Gly Ile Glu Tyr Val Arg Met Leu Ser Asn His Pro Tyr Ile Lys Pro
 20 25 30

Ala Tyr Leu Ala Gly Lys Gly Ser Val Gly Lys Pro Tyr Gly Glu Val
 35 40 45

Val Arg Trp Gln Thr Val Gly Gln Val Pro Lys Glu Ile Ala Asp Met
 50 55 60

10

15

Glu Ile Lys Pro Thr Asp Pro Lys Leu Met Asp Asp Val Asp Ile Ile
 65 70 75 80

Phe Ser Pro Leu Pro Gln Gly Ala Ala Gly Pro Val Glu Glu Gln Phe
 85 90 95

Ala Lys Glu Gly Phe Pro Val Ile Ser Asn Ser Pro Asp His Arg Phe
 100 105 110

Asp Pro Asp Val Pro Leu Leu Val Pro Glu Leu Asn Pro His Thr Ile
 115 120 125

Ser Leu Ile Asp Glu Gln Arg Lys Arg Arg Glu Trp Lys Gly Phe Ile
 130 135 140

Val Thr Thr Pro Leu Cys Thr Ala Gln Gly Ala Ala Ile Pro Leu Gly
 145 150 155 160

Ala Ile Phe Lys Asp Tyr Lys Met Asp Gly Ala Phe Ile Thr Thr Ile
 165 170 175

Gln Ser Leu Ser Gly Ala Gly Tyr Pro Gly Ile Pro Ser Leu Asp Val
 180 185 190

Val Asp Asn Ile Leu Pro Leu Gly Asp Gly Tyr Asp Ala Lys Thr Ile
 195 200 205

Lys Glu Ile Phe Arg Ile Leu Ser Glu Val Lys Arg Asn Val Asp Glu
 210 215 220

Pro Lys Leu Glu Asp Val Ser Leu Ala Ala Thr Thr His Arg Ile Ala
 225 230 235 240

Thr Ile His Gly His Tyr Glu Val Leu Tyr Val Ser Phe Lys Glu Glu
 245 250 255

Thr Ala Ala Glu Lys Val Lys Glu Thr Leu Glu Asn Phe Arg Gly Glu
 260 265 270

Pro Gln Asp Leu Lys Leu Pro Thr Ala Pro Ser Lys Pro Ile Ile Val
 275 280 285

Met Asn Glu Asp Thr Arg Pro Gln Val Tyr Phe Asp Arg Trp Ala Gly
 290 295 300

Asp Ile Pro Gly Met Ser Val Val Val Gly Arg Leu Lys Gln Val Asn
 305 310 315 320

Lys Arg Met Ile Arg Leu Val Ser Leu Ile His Asn Thr Val Arg Gly
 325 330 335

Ala Ala Gly Gly Gly Ile Leu Ala Ala Glu Leu Leu Val Glu Lys Gly
 340 345 350

Tyr Ile Glu Lys
 355

- 5 <210> 5
- <211> 1293
- <212> ADN
- <213> Rhodobacter spaeroides

10 <400> 5

atggcctcgc acgtgcagag cgatcgcgc gcctacgacg cgccaagaa ggacctctac 60

gagatcggcg agatgccgcc tctcggccat gtgccgaagg agatgtatgc ttgggccatc 120

cggcgcgagc gtcattggcga gccggatcag gccatgcaga tcgaggtggt cgagacgccc 180

tcgatcgaca gccacgaggt gtcgttctc gtgatggcgg cgggcgtgaa ctacaacggc 240

atctgggccg gcctcggcgt gccctctcgc ccgtcgcacg gtcacaagca gccctatcac 300

atcgcgggct ccgacgcgtc gggcatcgtc tggcggtgg gcgacaaggt caagcgtgg 360

aagtgggcg acgaggtcgt gatccactgc aaccaggacg acggcgacga cgaggaatgc 420

aacggcggcg acccgatggt ctcgcccacc cagcggatct ggggctacga gacgccggac 480
 ggctccttcg cccagttcac ccgctgcag ggcgagcagc tgatgaagcg tccgaagcac 540
 ctgacctggg aagaggcggc ctgctacag ctgacctcg ccaccgcta ccggatgctc 600
 ttcggccaca agccgcacga cctgaagccg gggcagaacg tgctggtctg gggcgcctcg 660
 ggcgcctcgc gctcctacgc gatccagctc atcaaacagg cgggcgcaa tgccatcggc 720
 gtcattcag aggaagacaa gcgcgacttc gtcattggggc tgggcgcaa gggcgtcatc 780
 aaccgcaagg acttcaagt ctggggccag ctgccaagg tgaactgcc cgaatataac 840
 gattggctga aggaggcgcg caagttcggc aaggccatct gggacatcac cggcaagggc 900
 atcaacgtcg acatggtgtt cgaacatccg ggcgaggcga ccttccgggt ctgctgctg 960
 gtggtgaaga agggcggcat ggtcgtgac tgccgggca ccaccggctt caactgcacc 1020
 ttcgacgtcc gctacatgtg gatgcaccag aagcgcctgc agggcagcca tttcgccaac 1080
 ctcaagcagg cctccgcggc caaccagctg atgatcgagc gccgcctcga tccctgcatg 1140
 tccgaggtct tccctgggc cgagatcccg gctgcccata cgaagatgia taagaaccag 1200
 cacaagcccg gcaacatggc ggtgctggtg caggccccgc gcacggggtt gcgcaccttc 1260
 gccgacgtgc tcgaggccgg ccgcaaggcc tga 1293

- <210> 6
- 5 <211> 430
- <212> PRT
- <213> Rhodobacter spaeroides
- <400> 6
- 10

Met Ala Leu Asp Val Gln Ser Asp Ile Val Ala Tyr Asp Ala Pro Lys
 1 5 10 15

Lys Asp Leu Tyr Glu Ile Gly Glu Met Pro Pro Leu Gly His Val Pro
 20 25 30

Lys Glu Met Tyr Ala Trp Ala Ile Arg Arg Glu Arg His Gly Glu Pro
 35 40 45

Asp Gln Ala Met Gln Ile Glu Val Val Glu Thr Pro Ser Ile Asp Ser
 50 55 60

His Glu Val Leu Val Leu Val Met Ala Ala Gly Val Asn Tyr Asn Gly
 65 70 75 80

Ile Trp Ala Gly Leu Gly Val Pro Val Ser Pro Phe Asp Gly His Lys
 85 90 95

Gln Pro Tyr His Ile Ala Gly Ser Asp Ala Ser Gly Ile Val Trp Ala
 100 105 110

Val Gly Asp Lys Val Lys Arg Trp Lys Val Gly Asp Glu Val Val Ile
 115 120 125

His Cys Asn Gln Asp Asp Gly Asp Asp Glu Glu Cys Asn Gly Gly Asp
 130 135 140

Pro Met Phe Ser Pro Thr Gln Arg Ile Trp Gly Tyr Glu Thr Pro Asp
 145 150 155 160

Gly Ser Phe Ala Gln Phe Thr Arg Val Gln Ala Gln Gln Leu Met Lys
 165 170 175

Arg Pro Lys His Leu Thr Trp Glu Glu Ala Ala Cys Tyr Thr Leu Thr
 180 185 190

Leu Ala Thr Ala Tyr Arg Met Leu Phe Gly His Lys Pro His Asp Leu
 195 200 205

Lys Pro Gly Gln Asn Val Leu Val Trp Gly Ala Ser Gly Gly Leu Gly
 210 215 220

Ser Tyr Ala Ile Gln Leu Ile Asn Thr Ala Gly Ala Asn Ala Ile Gly
 225 230 235 240

Val Ile Ser Glu Glu Asp Lys Arg Asp Phe Val Met Gly Leu Gly Ala
 245 250 255

Lys Gly Val Ile Asn Arg Lys Asp Phe Lys Cys Trp Gly Gln Leu Pro
 260 265 270

Lys Val Asn Ser Pro Glu Tyr Asn Glu Trp Leu Lys Glu Ala Arg Lys
 275 280 285

Phe Gly Lys Ala Ile Trp Asp Ile Thr Gly Lys Gly Ile Asn Val Asp
 290 295 300

Met Val Phe Glu His Pro Gly Glu Ala Thr Phe Pro Val Ser Ser Leu
 305 310 315 320

Val Val Lys Lys Gly Gly Met Val Val Ile Cys Ala Gly Thr Thr Gly
 325 330 335

Phe Asn Cys Thr Phe Asp Val Arg Tyr Met Trp Met His Gln Lys Arg
 340 345 350

Leu Gln Gly Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gln Ala Ser Ala Ala Asn
 355 360 365

Gln Leu Met Ile Glu Arg Arg Leu Asp Pro Cys Met Ser Glu Val Phe
 370 375 380

Pro Trp Ala Glu Ile Pro Ala Ala His Thr Lys Met Tyr Lys Asn Gln
 385 390 395 400

His Lys Pro Gly Asn Met Ala Val Leu Val Gln Ala Pro Arg Thr Gly

405 410 415

Leu Arg Thr Phe Ala Asp Val Leu Glu Ala Gly Arg Lys Ala
 420 425 430

5 <210> 7
 <211> 1233
 <212> ADN
 <213> Pseudomonas aeruginosa

10 <400> 7

atgagtgatt acgagccgtt gcgtctgcat gtcccggagc ccaccgggcg tcttggtgc 60
 aagaccgact ttctctatct gcacctgtcc cccgccggcg aggtacgcaa gccgccggtg 120
 gatgtcgagc ccgccgagac cagcgacctg gcctacagcc tggtagtgtt gctcgacgac 180
 gacggccacg ccgtcgggtc ctggaatccg cagctcagca acgaacaact gctgcgcggc 240
 atcggggcga tgctcaagac ccgcctgttc gacgcgcgca tgctcacccg gcaacggcag 300
 aaaaagcttt ccttctatat gcaatgcctc ggcgaggaag ccatcgccac cgcccacacc 360
 ctggccctgc gcgacggcga catgtgtttt ccgacctatc gccagcaagg catcctgac 420
 acccggaat acccgctggt ggacatgac tgccagcttc tctccaacga ggccgaccgg 480
 ctcaagggcc gccagctgcc gatcatgtac tcgagcaagg aggcagggtt cttctccatc 540
 tccggaacc tcgccacca gttcatccag gcggtcggct ggggcatggc ctcgcgatc 600
 aaggcgaca cgcgcatcgc ctcggcctgg atcggcgacg gcgccaccgc cgagtcggac 660
 ttccacaccg cctcacctt cgcccagtc taccgcgcgc cgtaatacct caacgtggtc 720
 aacaaccagt ggcgatctc cacctccag gccatgccg gcggcgaagg caccaccttc 780

gccaaccgtg gcgtagggctg cgggatcgcc tcgctcgggg tcgacggcaa tgacttctg 840

gggtctacg ccgcctccga gtggccgccc gagcgcgccc ggcgcaacct cgggcccgagc 900

ctgatcgaat gggcaccta ccgcgccggc ccgcactcga cttcggacga cccgtccaag 960

taccgccccg ccgacgactg gaccaacttc ccgctgggcg acccgatcgc ccgcctgaag 1020

cggcacatga tcggcctcgg catctggctg gaggaacagc acgaagccac ccacaaggcc 1080

ctcgaagccg aagtactggc cgcgcagaaa caggcggaga gccatggcac cctgatcgac 1140

ggccgggtgc cgagcggcg cagcatgttc gaggacgtct atgcagaact gccggagcac 1200

ctgcgccggc aacgccagga gctcggggta tga 1233

<210> 8

5 <211> 1049

<212> ADN

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 8

10

atgcatgaa cccgcaacac gagaacgccc agacggtcac cagcatgacc atgatccagg 60

cgctgcgctc ggcgatggac atcatgctcg agcgcgacga cgacgtggtg gtattcggcc 120

aggacgtcgg ctactcggc ggcgtgtcc gctgcaccga aggcctgcag aagaaatagc 180

gcacctcgcg ggtgttcgat gcgccgatct ccgagagcgg catcatcggc gccgcggtcg 240

gcatgggtgc ctacggcctg cgcccgggtg tggagatcca gttcggcgac tacgtctacc 300

cggcctccga ccagttgatc tccgaggcgg cgcgcctcgc ctatcgtcgc gccggcgact 360

tcatcgtgcc gatgaccgta cgcgatccct gtggcggcgg catctacggc gggcaaacgc 420

acagccagag cccggaggcg atgttcaccc aggtctgcgg cctgcgcacg gtgatgccgt 480

ccaacccta cgacccaag ggcctgctga tgcctgcat cgagaacgac gaccgggta 540

tcttctcga gcccaagcg cttacaacg gccgttcga tggccaccac gaccgccgg 600

tgagccctg gtccaagcat ccggccagcc aggtgccgga cggctactac aaggtgccg 660

tggacaaggc ggcatcgtc cgccccggcg cggcgctgac cgtgctgacc tacggacca 720

tggtctacgt ggcccaggcc gcgccgacg agaccggcct ggacgccgag atcatcgacc 780

tcgcagcct ctggccgctg gacctgaaa ccacgtcgc ctcggtgaag aagaccggc 840

gctgctcat cgcccacgag gcgaccgca cctgcgggtt cggcgccgag ctgatgtcg 900

tggtgcagga gcaactgtc caccacctg aggcgccgat cgagcgcgtc accggtggg 960

acaccccta cccgatgcc caggagtggg cgtattccc cggccccg cgcgtcggcg 1020

cggcattcaa gcgtgtgatg gaggtctga 1049

<210> 9

5 <211> 924

<212> ADN

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 9

10

atgtcgatgg ccgatcgtga tggcgtgac tggtatgac gtgaactggt gcagtggcgc 60

gacgcgacca cgacgtgct gaccatacc ctgcactatg gaatgggct gttcgagggc 120

gtgcgcgct acgacacccc gcagggcacg gcgatcttc gcctgcaggc gcataccgac 180

cggctgttc actccgcgca calcatgaac atgcagatcc cgtacagccg cgacgagatc 240

aacgaggcga cccgcgccg cgtgcgcgag aacaacctg aaagcgccta tatccgccg 300

atggtgttct acggaagcga aggcattggc ctgcgcgcca gcggcctgaa ggtccatgtg 360

atcatcgccg cctggagctg gggcgcctac atgggcgagg aagccctgca gcaaggcatc 420
 aaggtgcgca ccagttcctt cacccgccac cacgtcaaca tctc gatgac ccgcgccaag 480
 tccaacggcg cctacatcaa ctcgatgctg gccctccagg aagcgatctc cggcggcgcc 540
 gacgaggcca tgatgctcga tccggaaggc tacgtggccg aaggctccgg cgagaacatc 600
 ttcacatca aggatggcgt gatctacacc ccggaagtca ccgcctgcct gaacggcatc 660
 actcgtaca ctatcctgac cctggccgcc gaacacggtt taaactggt cgagaagcgc 720
 atcacccgag acgaggtgta catcgccgac gaggccttct tcaactggcac tgcgcggaa 780
 gtcacgccga tccggaagt ggacggctgc aagatcggcg ccggcccgcc tggcccggtc 840
 accgaaaagc tgcagaaagc ctatttcgac ctggtcagcg gcaagaccga ggcccacgcc 900
 gagtggcgta ccctggta gtaa 924

5 <210> 10
 <211> 1128
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter calcoaceticus

10 <400> 10
 atgcaattta atgaagaaca gctattaatt caggatatgg cgaaaagtt tgccaatgaa 60
 cagattaat ctaatgcagc agaatgggat aagcatagca ttttccaaa agacgtttg 120
 tcccaaatgg ggcaattggg ttttatggga atgctggtga gtgagaaatg gggcggatca 180
 aatacaggaa atttagctta tgtgctggca ctgaagaaa tcgctgccgc agatggtgcg 240
 actcaacca ttatgagtgt acataattct gttggctgtg taccattgc taaatttgg 300
 acagaggagc aaaagcagaa atatctagt cctttagcac aagtgaaat gatcgggtgca 360
 tttgcttaa cggaaccaca tacaggttcc gatgccgag ccattaaac ccgagcaatt 420
 aaacaagggt atgaatggat tattaatggc gctaaacaat ttataacatc aggtcataat 480
 gcggcgctga ttattgtatt tgctgtgaca gatccgaatg cagggaaaaa agggctgagt 540
 gcatttatt tgccgcgtga aacctgggt tatgaggtga ttcgaccga agaaaaattg 600
 ggtttacatg cgtcagatac gtgccaatt gctttaacgg atgttcgagt acatcacagc 660
 ttaatgcttg gtcaggaagg tgagggacta aaaatagcat tgtctaact ggaaggtggc 720

cgtattggga ttgcagcgca agccgttggg ttggcacgtg ctgcactaga agaagcgaca 780
 aaatatgcca aagagcgtgt gacctttgga aagcctattt ttgagcatca ggcgttagcc 840
 tttcgtttag ccagtatggc cacagaaatt gaagcagcac gacaattggg tcattacgca 900
 gcgcggtta aagaagctgg aaaaccttgg ttaatgaag catcaatggc gaaattattt 960
 tcactgaaa tggtcgaacg cgtatgttct gctgctttgc aaatctttgg tggctatggc 1020
 tatttaaaag accttcccat cgagcgaatt tctcgtgatg cacgtatttg ccagatttat 1080
 gaaggtacaa gtgatattca gcgttttagt atagcaagaa gcctataa 1128

5 <210> 11
 <211> 774
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter calcoaceticus

10 <400> 11
 atgacattcg caacaatttt attggaaaaa cgtaaggggtg tgggcttgat tacacttaac 60
 cgtccaaaag cattaatgca ttaaaactca gaattaattt atgaaataaa tttagcctta 120
 gacgatttag aaaatgatca aacgattggg tgtatcgtcc ttacaggttc agaaaaagcc 180
 tttgccgag gtgcggatat caaagaaatg gcagaattaa cttttccaaa tatttatttt 240
 gatgattttt ttagtcttgc agatcgtatt gcacagcgtc gtaagccttt aattgccgca 300
 gtgagtgggt atgctttagg tgggtggctgt gagttagcac tcattgtgga ctttatttat 360
 tgtgccgaca atgccaagtt tgcactacca gaagtaactt taggtgtcat tcctggattt 420
 ggtggaacac agcgtctaac gcttgcaata ggcaaagcca aagccatgga aatgtgtttg 480
 actgcacggc aatgcaggc tgctgaggca gaacaaagtg gtttggtggc acgcgttttt 540
 agtaaagaag aacttttaga acaaacctta caggctgccg aaaaaatagc ggaaaaatca 600
 cgggtatcta ccataatgat taaagagtca attaatcgag cttttgaagt gagtttagca 660
 gagggtttac gttttgagcg ccgaatgttc cattcagttt ttgcgacctt agatcagaaa 720
 gaagcgtatg aagcatttat tgataaacgt ccagcccaat ttaaacatca ataa 774

15 <210> 12
 <211> 1029
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 12

5

atgactacta ctgacaatca tttactcatt gaacataaaa acgctttagg aacaattatt 60
 ttaaactgct cagcgagtct gaacgcgcta tctctagaaa tgattaatgc gattcgtcaa 120
 caagttgagg attggcaagg tgatgtaaat gttcaggcca tattaattaa atcaaatagt 180
 cctaaagcat tttgtgcagg tggatgatatt cgctatcttt atgaaagta taaaagtgga 240
 tcagaagagt ataaagatta tttcattgct gaatatgaga tgctcaatag cattcgaacg 300
 tctaaaaaaaa cagtgattgt tttattggat ggatagtat tgggtggtgg ttttggttta 360
 gcacaggctt gtcatatctt ggtgagtagt gaaaaatcac gattttcaat gccagaaaca 420
 gcaatagggt ttttccaga tgtgcagcg acttatttct tatctcgttt agatgatgtt 480
 ggggtatatt tggcactgac tggatgacaa atcagtagta gtgatgcatt gtatttagat 540
 ctgattgatt atcatgttcc gaggcagaat tttgagcgac tagaaaatgc attcagccaa 600
 tcacagaact tagataaatt tcatattcag aagattattt ctgcttatat ctccagccct 660
 gttcagagtg aactcagtct atggcctgaa gccattcgtc agcattttgg tcttaaaaat 720
 gtgcaagata tcgaagaaag tttgaaaaat gaacaagatc ccaactatca agtatggaca 780
 agtaaagtgt taaatacttt gcaacaacgt tctctattg caaaaaaac cagtttaaag 840
 ttacagctgc tagggcggtg atggtcatta cagcaatgta tgcgtatcga gcgaaaatta 900
 caggatatct ggtttgaaca tggatgatatg attgaggggtg ttcgagcgtt gattattgat 960
 aaagataaac aaccgcaatg gcagcagcat aatgcgactt tagataatat attaggccaa 1020
 ttaggttag 1029

10 <210> 13
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cebador

<400> 13

atgcaattta atgaagaaca gctattaatt c

31

5 <210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 14

cagtctgaaa tgactaacct aattggc

27

15 <210> 15
 <211> 29
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

25 <400> 15

acggaattct gaaggagctg gcaactatg

29

30 <210> 16
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cebador

<400> 16

ttgtcgactt actgaccag ggtacgcc

28

40 <210> 17
 <211> 31
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

50 <400> 17

acagatctgg aggcctgtca tgagtgatta c

31

55 <210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

5 <400> 18

atgggtaccc attcagacct ccatac 25

10 <210> 19
<211> 6960
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Nuevo Plásmido

<400> 19

ggggaattgt gagcggataa caattcccct gtagaaataa tttgtttaa cttaataag 60
gagatatacc atgggcagca gccatcacca tcatcaccac agccaggatc cgaattctga 120
aggagctggc aactatgtcg atggccgatc gtgatggcgt gatctggtat gacggtgaac 180
tggtgcagtg gcgcgacgcg accacgcacg tgctgacca taccctgcac tatggaatgg 240
gcgtgttcga gggcgtgcgc gcctacgaca ccccgaggg cacggcgatc ttccgctgc 300
aggegcatac cgaccggctg ttcgactccg cgcacatcat gaacatgcag atcccgtaca 360
gccgcgacga gatcaacgag gcgaccgcg ccgccgtgcg cgagaacaac ctggaaagcg 420
cctatatccg cccgatggcg ttctacggaa gcgaaggcat gggcctgcgc gccagcggcc 480
tgaaggcca tgtgatcacc gccgcctgga gctggggcgc ctacatgggc gaggaagccc 540
tgcagcaagg catcaaggcg cgcaccagtt cctcaccg ccaccacgac aacatctcga 600
tgacccgcgc caagtccaac ggcgacctaca tcaactcgat gctggccctc caggaagcga 660
tctccggcgg cgccgacgag gccatgatgc tcgatccgga aggctacgtg gccgaaggct 720
ccggcgagaa catcttcac atcaaggatg gcgtgatcta caccgggaa gtcaccgct 780

20

gcctgaacgg catcactcgt aacactatcc tgaccctggc cgccgaacac ggttttaaac 840
 tggtcgagaa gcgcatcacc cgcgacgagg tgtacatcgc cgacgaggcc ttcttactg 900
 gcactgccgc ggaagtcacg ccgatccgcg aagtggacgg tcgcaagatc ggcgccggcc 960
 gccgtggccc ggtcaccgaa aagctgcaga aagcctattt cgacctggtc agcggcaaga 1020
 ccgaggccca cgccgagtgg cgtaccctgg tcaagtaagt cgacaagctt gcggccgcat 1080
 aatgcttaag tcgaacagaa agtaatcgta ttgtacacgg ccgcataatc gaaattaata 1140
 cgactcacta taggggaatt gtgagcggat aacaattccc catcttagta tattagtaa 1200
 gtataagaag gagatataca tatggcagat ctggaggcct gtcattgagt attacgagcc 1260
 gttgcgtctg catgtcccgg agcccaccgg gcgtctggc tgcaagaccg acttttctta 1320
 tctgacactg tccccgccc gcgaggtacg caagccgccc gtggatgtcg agcccgccga 1380
 gaccagcgac ctggcctaca gcctggtacg tgtgctcgac gacgacggcc acgccgtcgg 1440
 tccctggaat ccgcagctca gcaacgaaca actgctgcgc ggcatgcggg cgatgctcaa 1500
 gaccgcctg ttcgacgcgc gcatgctcac cgcgcaacgg cagaaaaage tttcttctta 1560
 tatgcaatgc ctcggcgagg aagccatcgc caccgcccac acctggccc tgcgcgacgg 1620
 cgacatgtgc ttccgacct atcgccagca aggcatcctg atcaccgcg aataccgct 1680
 ggtggacatg atctgccagc ttctctcaa cgaggccgac ccgtcaagg gccgccagct 1740
 gccgatcatg tactcgagca aggaggcagg ttcttctcc atctccggca acctgccac 1800
 ccagttcatc caggcggtcg gctggggcat ggcctcggcg atcaagggcg acacgcgcat 1860
 cgctcggcc tggatcggcg acggcgccac cgccgagtcg gacttcaca ccgccctcac 1920
 ctcccccat gtctaccgcg cgccggtaat cctcaacgtg gtcaacaacc agtgggcat 1980
 ctccaccctc caggccatcg ccggcggcga aggaccacc ttgcccaacc gtggcgtggg 2040
 ctgcgggatc gcctcgtgc gggtcgacgg caatgacttc ctggcgtct acgccgctc 2100

cgagtgggcc gccgagcgcg cccggcgcaa cctcgggccg agcctgatcg aatgggtcac 2160
 ctaccgcgcc ggccccact cgacttcgga cgaccctcc aagtaccgcc ccgccgacga 2220
 ctggaccaac ttcccgtgg gcgaccgat cgccccctg aagcggcaca tgatcggcct 2280
 cggcatctgg tccgaggaac agcacgaagc cacccacaag gccctcgaag ccgaagtact 2340
 ggccgcgcag aacagggcg agagccatgg caccctgatc gacggccggg tgccgagcgc 2400
 cgccagcatg ttcgaggacg tctatgcaga actgccggag cacctgcgcc ggcaacgcca 2460
 ggagctcggg gtatgaatgc catgaaccg caacacgaga acgcccagac ggtcaccagc 2520
 atgacatga tccagggcgt gcgctcggcg atggacatca tgctcgagcg cgacgacgac 2580
 gtggtggtat tcggccagga cgtcggctac ttcggcggcg tgtccgctg caccgaaggc 2640
 ctgcagaaga aatacggcac ctgcggggtg ttcgatgcgc cgatctccga gagcggcatc 2700
 atcggcgccg cggtcggcat ggggtgcctac ggcctgcgcc cggtggtgga gatccagttc 2760
 gccgactacg tctaccggc ctccgaccag ttgatctccg aggcggcgcg cctgcgctat 2820
 cgctcggccg gcgactcat cgtgccgatg accgtacgca tgcctgtgg cggcggcatc 2880
 tacggcgggc aaacgcacag ccagagcccc gaggcgatgt tcaccaggt ctgcggcctg 2940
 cgcacggtga tgccgtcaa ccctacgac gccaaaggcc tgctgatcgc ctgcatcgag 3000
 aacgacgacc cggtgatctt cctcgagccc aagcgcctct acaacggccc gttc gatggc 3060
 caccacgacc gcccgggtgac gccctgtcc aagcatccgg ccagccaggt gccggacggc 3120
 tactacaagg tgccgctgga caaggcggcg atcgtccgcc ccggcgcggc gctgaccgtg 3180
 ctgacctacg gcacatggt ctactggcc caggccgcgg ccgacgagac cggcctggac 3240
 gccgagatca tcgacctgcg cagcctctgg ccgctggacc tggaacat cgctgcctcg 3300
 gtgaagaaga ccggccgctg cgtcatcgcc cagagggcga cccgcacctg cgggttcggc 3360
 gccgagctga tgctgctggt gcaggagcac tgctccacc acctggaggc gccgatcgag 3420

gccgagatca tcgacctgcg cagcctctgg ccgctggacc tggaacat cgctgcctcg 3300
 gtgaagaaga ccggccgctg cgctatgcc cagaggcga cccgcacctg cgggttcggc 3360
 gccgagctga tctcgtggt gcaggagcac tgctccacc acctggaggc gccgatcgag 3420
 cgcgtaccg gttgggacac cccctaccg catgccagg agtgggcgta tttccccggc 3480
 cccgcgcgcg tcggcgcggc attcaagcgt gtgatggagg tctgaatggg tacctcgag 3540
 tctgtaaag aaaccgctgc tgcgaaatt gaacgccagc acatggactc gtctactagc 3600
 gcagctaat taacctaggc tgctgccacc gctgagcaat aactagcata accccttggg 3660
 gcctctaac gggctttag gggttttg ctgaaacctc aggcattga gaagcacacg 3720
 gtcactgc tccggtagt caataaacg gtaaaccagc aatagacata agcggctatt 3780
 taacaccct gccctgaacc gacgaccggg tcatcgtggc cggatcttgc ggcccctcgg 3840
 ctgaacgaa ttgtagaca ttattgccg actaccttgg tgatctgcc ttcacgtag 3900
 tggaaaatt ctccaactg atctgcgcg gaggccaagc gatctcttc ttgccaaga 3960
 taagcctgtc tagctcaag tatgacgggc tgatactggg ccggcaggcg ctccattgcc 4020
 cagtcggcag cgacatcct cggcgcgatt ttgccggtta ctgcgctgta ccaaatgcgg 4080
 gacaacgtaa gcactacatt tcgctatcg ccagcccagt cgggcggcga gttccatagc 4140
 gtaagggtt catttagcgc ctcaaataga tctgttcag gaaccggatc aaagagtcc 4200
 tccgccgctg gacctacaa ggcaacgcta tgttctttg cttttgtcag caagatagcc 4260
 agatcaatgt cgatcgtggc tggctcgaag atacctgcaa gaatgtcatt gcgctgcat 4320
 tctcaaatt gcagtcgcg cttagctgga taagccacg gaatgatgtc gtcgtgcaca 4380
 acaatggtga cttctacagc gcggagaatc tcgctctctc cagggaagc cgaagttcc 4440
 aaaaggtcgt tgatcaaagc tcgccggtt gtttcaaa gccttacggt caccgtaacc 4500
 agcaaatcaa tatactgtg tggcttcagg ccgcatcca ctgaggagcc gtacaaatgt 4560
 acggccagca acgtcggctc gagatggcgc tcgatgacg cactacctc tgatagtga 4620

gtcgatactt cggcgatcac cgcctccctc atactctcc ttttcaata ttattgaagc 4680
 atttatcagg gttattgtct catgagcggg tacatattg aatgtattta gaaaaataaa 4740
 caaatagcta gctcactcgg tcgctacgct ccgggcgtga gactgcgcg ggcgctcgg 4800
 acacatacaa agttaccac agattccgtg gataagcagg ggactaacat gtgaggcaaa 4860
 acagcagggc cgcgccggtg gcgttttcc ataggctccg ccctcctgcc agagttcaca 4920
 taaacagacg ctttccggt gcatctgtgg gagccgtgag gctcaacat gaatctgaca 4980
 gtacgggca aaccgacag gacttaaaga tccccaccgt ttccggcggg tcgctccctc 5040
 ttgcgctctc ctgtccgac cctgccgtt accggatacc tgttccgct ttctcccta 5100
 cgggaagtgt ggcgcttct catagctcac aactggtat ctcggctcgg ttaggtcgt 5160
 tcgctccaag ctgggctgta agcaagaact ccccgctcag cccgactgct ggccttacc 5220
 cggtaactgt tcaactgagt ccaaccgga aaagcacggt aaaacgccac tggcagcagc 5280
 cattgtaac tgggagtcg cagaggattt gtttagctaa acacgcggtt gctctgaag 5340
 tgtgcgcaa agtccggcta cactggaagg acagatttg ttgctgtgct ctgcgaaagc 5400
 cagttaccac ggtaagcag ttcccaact gactaacct tcgatcaaac cacctccca 5460
 ggtggtttt tcgttacag ggcaaaagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 5520
 tctttgatc ttttactg aaccgctca gattcagtg caattatct ctcaaatgt 5580
 agcacctgaa gtcagccca tacgatataa gttgtaattc tcatgttagt catgccccgc 5640
 gccaccgga aggagctgac tgggtgaag gctctcaagg gcatcggtc agatcccgt 5700
 gcctaatgag tgagctaact tacattaatt gcgttgcgt cactgccccgc ttccagtcg 5760
 ggaaacctgt cgtccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggttg 5820
 cgtattggc gccagggtg ttttcttt caccagtgag acgggcaaca gctgattgcc 5880
 cttcaccgcc tggccctgag agagttgag caagcgtcc acgtggtt gccccagcag 5940
 gcgaaaatcc tgtttgatgg tggtaacgg cgggatataa catgagctgt ctccggtacc 6000

gtcgtatccc actaccgaga tgcctgcacc aacgcgcagc ccggactcgg taatggcgcg 6060
 cattgcgccc agcgccatct gatcgttggc aaccagcatc gcagtgggaa cgatgccctc 6120
 attcagcatt tgcattggtt gttgaaaacc ggacatggca ctccagtcgc ctcccgttc 6180
 cgctatcggc tgaattgat tgcgagttag atatttatgc cagccagcca gacgcagacg 6240
 cgccgagaca gaactaatg ggcccgctaa cagcgcgatt tgctggtgac ccaatgcgac 6300
 cagatgctcc acgcccagtc gcgtaccgtc ttcattggag aaaataatac tgttgatggg 6360
 tgtctggtca gagacatcaa gaaataacgc cggaacatta gtgcaggcag ctccacagc 6420
 aatggcatcc tggatcatca gcggatagtt aatgatcagc cactgacgc gttgcgcgag 6480
 aagattgtgc accgcccgtt tacaggcttc gacgcccgtt cgttctacca tcgacaccac 6540
 cacgctggca cccagttgat cggcgcgaga tttaatgcc gcgacaattt gcgacggcgc 6600
 gtgcagggcc agactggagg tggcaacgcc aatcagcaac gactgtttgc ccgccagttg 6660
 ttgtgccacg cggttgggaa tgaattcag ctccgccatc gccgcttcca cttttcccg 6720
 cgtttctgca gaaacgtggc tggcctggtt caccacgcgg gaaacggtct gataagagac 6780
 accggcatac tctgcgacat cgtataacgt tactggttcc acattacca ccctgaattg 6840
 actctctcc gggecgtatc atgccatacc gcgaaagggt ttgcgccatt cgatggtgtc 6900
 cgggatctcg acgctctccc ttatgcgact cctgcattag gaaattaata cgactcacta 6960

<210> 20
 <211> 8757
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Nuevo Plásmido

10 <400> 20

caaggagatg gcgccaaca gccccggc cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa 60
 acaagcgctc atgagcccga agtggcgagc ccgatctcc ccatcgggta tgcggcgat 120
 ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta 180
 gaggatcgag atctcgatcc cgcgaaatta atacgactca ctatagggga attgtgagcg 240
 gataacaatt ccctctaga aataatttg ttaacttta agaaggaatt caggagccct 300
 tatgcaattt aatgaagaac agctattaat tcaggatatg gcgaaaagtt ttgccaatga 360
 acagattaaa tctaatgcag cagaatggga taagcatagc attttcaa aagacgttt 420
 gtcctaaatg gggcaattgg gtttatggg aatgctggtg agtgagaaat ggggcggatc 480
 aaatacagga aatttagctt atgtctggc actgaagaa atcgtgccg cagatggtgc 540
 gactcaacc attatgagtg tacataattc tgttgctgt gtaccattg ctaaattgg 600
 tacagaggag caaaagcaga aatatctagt gccttagca caagtgaaa tgatcgggta 660
 attgcttta acggaaccac atacaggtc cgatgccgca gccattaaa cccgagcaat 720
 taaacaaggt gatgaatgga ttattaatgg cgctaaaca ttataacat caggcataa 780
 tgcggcggtg attattgat ttgctgtgac agatccgaat gcagggaaa aagggtgag 840
 tgcatttatt gtccgcgtg aaaccttggg ttatgaggtg attcgcaccg aagaaaaatt 900
 gggttacat gcgtcagata cgtgccaat tgcttaacg gatgttcgag tacatcacag 960
 cttaatgctt ggtcaggaag gtgagggact aaaaatagca ttgtctaac tggaaggtg 1020
 ccgtattggg attgcagcgc aagccgttg tttggcacgt gctgcactag aagaagcgac 1080
 aaaatatgcc aaagagcgtg tgaccttgg aaagcctatt tttgagcacc aggcgttagc 1140
 ctttcgttta gccagtatgg ccacagaaat tgaagcagca cgacaattgg tcattacgc 1200
 agcgcggctt aaagaagctg gaaaacctg ttaaatgaa gcatcaatgg cgaaattatt 1260
 ttcatctgaa atggtcgaac gcgtatgtc tgetgcttg caaatcttg gtggctatg 1320
 ctatttaaaa gactttcca tcgagcgaat ttatcgtgat gcacgtatt gccagattta 1380

tgaaggtaca agtgateattc agcgtttagt gatagcaaga agcctataac tgacctttgc 1440
 tgctgtattt ttatcataaa attaagataa ggattctaaa aatgacattc gcaacaattt 1500
 tattggaaaa acgtaaggggt gtgggcttga ttacacttaa cegtccaaaa gcattaaatg 1560
 ctttaaacctc agaattaatt tatgaaataa atttagcctt agacgattta gaaaatgatc 1620
 aaacgattgg ttgatcgtc cttacaggtt cagaaaaagc ctttgccgca ggtgcggata 1680
 tcaaagaaat ggcagaatta acttttccaa atatttattt tgatgatttt tttagtcttg 1740
 cagatcgtat tgcacagcgt cgtaacctt taattgccgc agtgagtgggt tatgctttag 1800
 gtgggtggctg tgagttagca ctcattgtgt actttattta ttgtgccgac aatgccaagt 1860
 ttgcactacc agaagtaact ttagggtgca ttcttggtat tgggtggaaca cagcgtctaa 1920
 cgcttgcaat aggcaaagcc aaagccatgg aatgtgttt gactgcacgg caaatgcagg 1980
 ctgctgaggc agaacaaagt ggtttgggtg cacgcgtttt tagtaaagaa gaacttttag 2040
 aacaaacctt acaggctgcc gaaaaaatag cggaaaaatc acgggtatct accataatga 2100
 ttaaagagtc aattaatcga gcttttgaag tgagtttagc agagggttta cgttttgagc 2160
 gccgaatggt ccattcagtt tttgcgacct tagatcagaa agaaggcattg caagcattta 2220
 ttgataaacg tccagcccaa tttaacatc aataatagga tgaagcgtatg actactactg 2280
 acaatcattt actcattgaa cataaaaacg ctttaggaac aattatttta aatcgtccag 2340
 cgagtctgaa cgcgctatct ctagaaatga ttaatgcgat tctcaacaa gttgaggatt 2400
 ggcaaggtga tgaaatggt caggccatat taattaaatc aaatagtcct aaagcatttt 2460
 gtgcaggtgg tgatattcgc tatctttatg aaagtataa aagtggatca gaagagtata 2520
 aagattattt cattgctgaa tatgagatgc tcaatagcat tcgaactgtt aaaaaaacag 2580
 tgattgtttt attggtatgga tatgtattgg gtgggtgttt tggtttagca caggcttgc 2640
 atatcttgggt gagtagtgaa aaatcacgat tttcaatgcc agaaacagca ataggttttt 2700
 tcccagatgt tgcagcgact tatttcttat ctcgtttaga tgatgttggg gtatatttgg 2760
 cactgactgg tgatcaaac agtagtagtg atgcattgta tttagatctg attgattatc 2820
 atgttccgag tcagaatttt gagcgactag aaaaatgcatt cagccaatca cagaacttag 2880

ataaattca tattcagaag attattctg cttatatctc cagccctgtt cagagtgaac 2940
 tcagtctatg gcttgaagcc attcgtcagc attttggctt taaaatgtg caagatatcg 3000
 aagaaagttt gaaaaatgaa caagatccca actatcaagt atggacaagt aaagtgttaa 3060
 atactttgca acaacgttcc tctattgcaa aaaaaaccag tttaaagta cagctgctag 3120
 ggctgggatg gtcattacag caatgtatgc gtatcgagcg aaaattacag gatatctggt 3180
 ttgaacatgg tgatatgatt gaggggttgc gagcgttgat tattgataaa gataaacaac 3240
 cgcaatggca gcagcataat gcgactttag ataatatatt aggccaatta ggtagtcat 3300
 ttcagactga agggcgagct caattcgaag ctggaagga agcctatccc taaccctctc 3360
 ctcggtctcg attctacgcg taccggctcat catcaccatc accattgagt ttgatccggc 3420
 tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc aataactagc 3480
 ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat 3540
 atccggatat cccgcaagag gcccggcagt accggcataa ccaagcctat gcctacagca 3600
 tccaggtgga cgggtccgag gatgacgatg agcgcattgt tagatttcat acacggtgcc 3660
 tgactgcgtt agcaatttaa ctgtgataaa ctaccgcatt aaagcittac gatgataagc 3720
 tgtcaaacat gagaattaat tcttgaagac gaaaggcct cgtgatacgc ctattttat 3780
 aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
 tgcgcggaac ccctattgt ttattttctt aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900
 gacaataacc ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
 atttccgtg cgccttatt ccctttttg cggcatttg ccttctggtt tttgctcacc 4020
 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080
 tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
 caatgatgag cacttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt gttgacgccg 4200
 ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac 4260
 cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320
 taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
 agctaaccgc tttttgcaac aacatggggg atcatgtaac tcgcttgat cgttgggaac 4440

cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gcagcaatgg 4500
 caacaacgtt gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560
 taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
 ctggctggtt tattgctgat aaatctggag cgggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680
 cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acgggggagtc 4740
 aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
 attgtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaactcatt 4860
 ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
 aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
 gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040
 cggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100
 gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160
 agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220
 ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt tggactcaag acgatagta ccgataagg 5280
 cgcagcggtc gggctgaacg ggggggtcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
 gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcgggacct atggaaaaac gccagcaacg 5580
 cggcctttt acggttctg gccttttctt ggccttttgc tcacatgtt tttctgctg 5640
 tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
 gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcctgatgc 5760
 ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggtta ttacacaccg caatggtgca ctctcagtac 5820
 aatctgctct gatgccgat agttaagcca gtatacactc cgctatcgct acgtgactgg 5880
 gtcatggctg cgccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttctctg 5940

ctccccgcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 6000
ttttaccgt catcaccgaa acgcgcgagg cagctgcggt aaagctcacc agcgtggctc 6060
tgaagcgatt cacagatgtc tgcctgttca iccgcgtcca gctcgttgag tttctccaga 6120
agcgtaaatg tctggcttct gataaagcgg gccatgtaa gggcggtttt ttctgtttg 6180
gtcactgatg cctccgtgta aggggggattt ctgttcatgg gggtaatgat accgatgaaa 6240
cgagagagga tgctcacgat acgggttact gatgatgaac atgcccgggt actggaacgt 6300
tgtgagggta aacaactggc ggtatggatg cggcgggacc agagaaaaat cactcagggt 6360
caatgccagc gcttcgtaa tacagatgta ggtgtccac agggtagcca gcagcacc 6420
gcgatgcaga tccggaacat aatggtgcag ggcgctgact tccgcgttc cagacttac 6480
gaaacacgga aaccgaagac cattcatgtt gttgctcagg tcgcagacgt ttgcagcag 6540
cagtcgctc acgttcgctc gcgtatcggg gattcattct gctaaccagt aaggcaacc 6600
cgccagccta gccgggtcct caacgacagg agcacgatca tgcgcaccgg tggccaggac 6660
ccaacgctgc ccgagatgcg ccgcgtgcgg ctgctggaga tggcggacgc gatggatag 6720
ttctgccaag ggttggtttg cgcattcaca gttctccgca agaattgatt ggctccaatt 6780
cttgagtggt tgaatccgtt agcgaggtgc cgccggcttc cattcaggtc gaggtggccc 6840
ggctccatgc accgcgacgc aacgcgggga ggagacaag gtatagggcg gcgcctaca 6900
tccatgcaa cccgttccat gtgctcggc aggcggcata aatcgccgtg acgatcagcg 6960
gtccaatgat cgaagttagg ctgtaagag ccgcgagcga tccttgaagc tgcctctgat 7020
ggctgctac tacctgctg gacagcatgg cctgcaacgc gggcatcccg atcccggcg 7080
aagcgagaag aatcataatg gggaaggcca tccagcctcg cgtcgcgaac gccagcaaga 7140
cgtagcccag cgcgtcggcc gccatgccgg cgataatggc ctgcttctcg ccgaaacgtt 7200
tggtaggggg accagtgcg aaggcttgag cgagggcgtg caagattccg aataccgcaa 7260
gcgacaggcc gatcctgtc gcgctccagc gaaagcggc ctcgccgaaa atgaccaga 7320
gcgctgcccg cacctgtcct acgagttgca tgataaagaa gacagtcata agtgccggcga 7380
cgatagtcac gccccgcgc caccggaagg agctgactgg gttgaaggct ctcaagggca 7440
tcggtcgaga tcccggtgcc taatgagtga gctaacttac attaattgcg ttgcgctcac 7500

tgcccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 7560
 cggggagagg cggttgcgt attgggcgcc aggggtggtt ttctttcac cagtgagacg 7620
 ggcaacagct gattgccctt caccgcctgg ccctgagaga gttgcagcaa gcggtccacg 7680
 ctggttgcc ccagcaggcg aaaatcctgt ttgatggtgg ttaacggcgg gatataacat 7740
 gagctgtctt cggatcgtc gtatccact accgagatat ccgcaccaac gcgcagcccg 7800
 gactcggtaa tggcgcgat tgcgccagc gccatctgat cgttggcaac cagcatcgca 7860
 gtgggaacga tgcctcatt cagcattgc atggttgtt gaaaaccgga catggcactc 7920
 cagtcgcctt cccgtccgc taccgctga attgattgc gactgagata ttatgccag 7980
 ccagccagac gcagacgcgc cgagacagaa ctaatgggc ccgctaacag cgcgattgc 8040
 tggtagacca atgcgaccag atgtccacg cccagtcgcg taccgtctc atgggagaaa 8100
 ataatactgt tgatgggtgt ctggtcagag acatcaagaa ataacgccgg aacattagt 8160
 caggcagctt ccacagcaat ggcatcctgg tcatccagcg gatagttaat gatcagccca 8220
 ctgacgcgtt gcgcgagaag attgtgcacc gccgctttac aggttcgac gccgcttcg 8280
 tctaccatcg acaccaccac gctggcacc agttgatcgg cgcgagattt aatgcccgcg 8340
 acaatttgcg acggcgcgtg cagggccaga ctggaggtgg caacgccaat cagcaacgac 8400
 tgtttgcccg ccagttgtg tgccacgcgg ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc 8460
 gcttccactt ttcccgcgt ttccgagaa acgtggctgg cctggttcac cacgcgggaa 8520
 acggtctgat aagagacacc ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac tggttcaca 8580
 ttaccacc tgaattgact ctctccggg cgctatcatg ccataccgag aaaggtttg 8640
 cgccattcga tgggtccgg gatctcgacg ctctccctta tgcgactcct gcattaggaa 8700
 gcagcccagt agtaggttga ggccgtgag caccgccgcc gcaaggaatg gtgcatg 8757

- 5 <210> 21
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	21	
5		attatcccat ggggagaaca ttaaagc	28
	<210>	22	
	<211>	24	
10	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
15	<400>	22	
		cgggatcctt acttttcaat atat	24
20	<210>	23	
	<211>	35	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
25	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	23	
30		cggtcgacaa ggagatatag atatgactga ttcacaaag actgc	35
	<210>	24	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
35	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
40	<400>	24	
		cttaggcttt gtcgaacgcc tcc	23
45	<210>	25	
	<211>	870	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	Nuevo Vector	
	<400>	25	

atggaaaagg tggcattcat cggcctgggc gcaatgggct acccaatggc aggtcacctg 60

gctcgccgct tccaaccct ggtgtggaac cgcaccttcg aaaaggcact gcgccaccag 120

gaagagttcg gctccgaagc agtgccactg gaacgcgtgg ctgaagcacg cgtgatctc 180

acctgcctgc caaccacccg cgaagtgtac gaagtggcag aagcactgta cccatacctg 240

cgcgaaggca cctactgggt ggatgcaacc tccggcgaac cagaagcatc cggccgctg 300

gctgaacgcc tgcgcgaaaa gggcgtgacc tacctggatg caccagtgtc cggtggcacc 360

tccggtgcag aagcaggcac cctgaccgtt atgctgggcg gtccagaaga agcagtcgaa 420

cgcgtccgcc cattctggc ctacgcaaag aagtggtcc acgtcggccc agttggtgca 480

ggccacgcag tgaaggcaat caacaacgca ctgctggccg tgaacctgtg ggcagcaggc 540

gaaggtctgc tggccctggt gaagcagggc gtgtccgcag aaaaggccct ggaagtgatc 600

aacgcatcct ccggccgctc caacgcaacc gaaaacctga tcccacagcg cgttctgacc 660

cgcgcattcc caaagacctt cgactgggc ctgctggtga aggatctggg catcgaatg 720

ggcgtgctgg atggcgaaaa ggcaccatcc ccaactgtgc gcctggctcg cgaagtctac 780

gagatggcaa agcgcgaact cggcccagat gcagatcacg tggaaagcact gcgcctgctc 840

gaacgctggg gcggtgtgga aatccgctaa 870

5 <210> 26
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

	<400> 26	
	tgaagatcct aggaggttta aacatatgcc gttaatagcc gggattg	47
5	<210> 27	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 27	
15	tatatagtcg acttaattcg cctgaccggc cag	33
	<210> 28	
	<211> 29	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 28	
	tatataacat gtcgctttca ccgccaggc	29
30	<210> 29	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 29	
40	catatgttta aacctcctag gatcttcagt ttctctcaact taacggcagg	50
	<210> 30	
	<211> 29	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 30	
	tatataccat ggcgctttca ccgccaggc	29
	<210> 31	
55	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223>	Cebador	
5	<400>	31	
		tatatagtcg acttaattcg cctgaccggc cag	33
10	<210>	32	
	<211>	40	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
15	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	32	
		tatatacata tgaaaagatc aaaacgattt gcagtactgg	40
20	<210>	33	
	<211>	37	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
25	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	33	
30		tatatagtcg acttagcttc ctttagcag cttatgc	37
35	<210>	34	
	<211>	34	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
40	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	34	
		aaaacatatg aattttcatc atctggctta ctgg	34
45	<210>	35	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
50	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	35	
55		aaaacatatg tatatttctt tctttcaggc ctccaggctt atccagatg	49
	<210>	36	
	<211>	30	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador	
	<400> 36	
	ggaggcaacc atggcctcg acgtgcagag	30
10		
	<210> 37	
	<211> 32	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 37	
	gagactgcg gatccctccg atcaggcctt gc	32
25		
	<210> 38	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 38	
	aaaacatag atcgactg cgccccttgc	30
35		
	<210> 39	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40		
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 39	
45		
	aagacgtcct accgctgcc ggccgtcc	28
50		
	<210> 40	
	<211> 3967	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Nuevo Plásmido	
	<400> 40	

atgcgccgca ccctgaaggc agcaatcctg ggcgccaccg gcctggtggg catcgaatac 60
 gtgcgcatgc tgtcaacca ccatacatc aagccagcat acctggccgg caagggctcc 120
 gttggaagc catacggcga agtgggtgcg tggcagaccg tgggccaggt gccaaaggaa 180
 atgcagata tggaaatcaa gccaacgat ccaaagctga tggatgatgt ggatatcatc 240
 ttctccccac tgccacaggg tgcagcaggc ccagtggaag aacagttcgc aaaggaaggc 300
 ttccagtgatg tctcaactc ccagatcac cgcttcgac cagatgtgcc actgctggtg 360
 ccagaactca acccacacac catctcctg atcgatgaac agcgcaagcg ccgcaatgg 420
 aagggttca tctgaccac cccactgtgc accgcacagg ggcagcaat cccactgggc 480
 gcaatctca aggattacaa gatggatggc gcattcatca ccaccatca gtcctgtcc 540
 ggcgaggct acccaggtat cccatcctg gatgtggtgg ataatacct gccactgggc 600
 gatggctacg atgcaaagac catcaaggaa atcttccga tctgtccga agtgaagcgc 660
 aacgtggatg aaccaaagct ggaagatgtg tcctggccg caaccacca ccgcatcgca 720
 accatccacg gccactacga agtgcgttac gtgtcctca aggaagaaac cgagcagaa 780
 aaggtgaagg aaacctgga aaactccgc ggccaaccac aggatctgaa gctgccaacc 840
 gcaccatca agccaatcat cgtgatgaac gaagataccc gccacaggt gtacttcgat 900
 cgctgggcag gcgatatccc aggcatgtcc gtggtggtgg gccgcctgaa gcaggtgaac 960

aagcgcatga tccgcctggt gtcctgac cacaacaccg ttcggcgc agcaggtgt 1020
 ggtatcctgg ccgcagaact cctggtggaa aagggtaca tcgaaaagta agaattccgc 1080
 gagctccagc tttgtccc ttagtgagg gtaattgcg cgcttggcgt aatcatggtc 1140
 atagctgttt cctgttgaa attgtatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg 1200
 aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactacat taattgcgtt 1260
 gcgctactg cccgcttcc agtcgggaaa cctgtcgtc cagctgcatt aatgaatcgg 1320
 ccaacgcgcg gggagaggcg gttgcgtat tgggcgctct tccgcttct cgctactga 1380
 ctgctgcgc tcgctgtc ggctgcgcg agcggtatca gctactcaa aggcgtaat 1440
 acggtatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca 1500
 aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt tccataggc tccgcccc 1560
 tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata 1620
 aagataaccag gcgttcccc ctggaagctc cctcgtcgc tctcctgtc cgaccctgcc 1680
 gcitaccgga tacctgtccg ctttctccc ttcgggaagc gtggcgctt tcatagctc 1740
 acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgctcgtcc aagctgggct gtgtgcacga 1800
 acccccgtt cagcccagc gctgcgcct atccgtaac tctcgtctg agtccaacc 1860
 ggtaagacac gacttatgc cactggcagc agccactgtt aacaggatta gcagagcgag 1920
 gtatgtaggc ggtgctacag agttctgaa gtgggtgcct aactacggct aactagaag 1980

aacagtatt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag 2040
 ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgitt gcaagcagca 2100
 gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atctttcta cggggtctga 2160
 cgctcagtgg aacgaaaact cacgtaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 2220
 cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttaaa tcaatctaaa gtatatatga 2280
 gtaaactgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgg gcacctatct cagcgatctg 2340
 tctatttctg tcatcatag ttgcctgact ccccgctgtag tagataacta cgatacggga 2400
 gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca gaaccacgct caccggctcc 2460
 agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgagaagtg gtctgcaac 2520
 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagtctgcc 2580
 agttaatagt ttgcgcaacg ttgttccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 2640
 gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 2700
 catgttgctc aaaaaagcgg ttagtctctt cggctctccg atcgttgta gaagtaagt 2760
 ggccgagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctcta ctgtcatgcc 2820
 atccgtaaga tgctttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 2880
 tatggggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 2940
 cagaacttta aaagtctca tcattgaaa acgttctctg gggcgaanaac tctcaaggat 3000

cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc 3060

atcttttact ttcaccagcg ttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 3120

aaaggaata agggcgacac ggaatgttg aatactcata ctcttcttt tcaatatta 3180

ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 3240

aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccaccta aattgtaagc 3300

gtaaatatt tgtaaaatt cgcgttaaatt tttgttaaa tcagctcatt tttaaccaa 3360

taggccgaaa tcggcaaaat ccctataaa tcaaaagaat agaccgagat agggttgagt 3420

gtgttccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa cgtaaaggg 3480

cgaaaaccg tctatcaggg ctatggccca ctacgtgaac catcaccta atcaagttt 3540

ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccta aaggagccc ccgatttaga 3600

gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagcg 3660

ggcgctaggg cgctggcaag ttagcggtc acgctgcgcg taaccaccac acccgccgcg 3720

cttaatgctc cgctacaggg cgcgtccat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa 3780

ggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca 3840

aggcgattaa gttgggtaac gccagggtt tccagtcac gacgtttaa aacgacggcc 3900

agtgagcgcg cgtaatacga ctactatag ggcaattgg gtaccgcgga tccaaggaga 3960

tatagat

ES 2 422 382 T3

	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 41	
10	aaccatgggc cgcaccctga agg	23
	<210> 42	
	<211> 33	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 42	
	aaggatcctt acttttcgat gtagcccttt tcc	33
25	<210> 43	
	<211> 3766	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Nuevo Plásmido	
	<400> 43	
35	atggaaaagg tggcattcat cggcctgggc gcaatgggct acccaatggc aggtcacctg	60
	gctcggcgt tccaaccct ggtgtggaac cgcaccttcg aaaaggcact gcgccaccag	120
	gaagagtctg gctccgaagc agtgccactg gaacgcgtgg ctgaagcacg cgtgatcttc	180
	acctgcctgc caaccaccg cgaagtgtac gaagtggcag aagcactgta cccatacctg	240
	cgcgaaggca cctactgggt ggatgcaacc tccggcgaac cagaagcatc ccgccgctg	300
	gctgaacgcc tgcgcgaaaa gggcgtgacc tacctggatg caccagtgtc cgggtggcacc	360

tccggtgcag aagcaggcac cctgaccgtt atgctgggcg gtccagaaga agcagtcgaa 420

cgctccgcc cattcctggc ctacgcaaag aagtggtcc acgtcggccc agttggtgca 480

ggccacgcag tgaaggcaat caacaacgca ctgctggccg tgaacctgtg ggcagcaggc 540

gaaggtctgc tggccctggt gaagcagggc gtgtccgcag aaaaggcctt ggaagtgatc 600

aacgcatect cgggccgctc caacgcaacc gaaaacctga tcccacagcg cgttctgacc 660

cgcgattcc caaagacctt cgcactgggc ctgctggtga aggatctggg catcgcaatg 720

ggcgtgctgg atggcgaaaa ggcacatcc ccaactgctgc gcctggctcg cgaagtctac 780

gagatggcaa agcgcgaact cggcccagat gcagatcacg tggaagcact gcgcctgctc 840

gaacgctggg gcggtgtgga aatccgctaa gaattccgcg agctccagct tttgttcct 900

ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca tagctgttc ctgttgaaa 960

ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 1020

gggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattcggtg cgctcactgc ccgctttcca 1080

gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg 1140

tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg 1200

gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg 1260

ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 1320

ggccgcgttg ctggcgTTTT tccatagget ccgccccct gacgagcatc acaaaaaatcg 1380

acgctcaagt cagaggtggc gaaaccggac aggactataa agataccagg cgtttcccc 1440

tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc 1500

ctttctcct tcggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagtc 1560

ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg 1620

ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc 1680

actggcagca gccactgga acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 1740

gttctgaag tggtagccta actacggcta cactagaaga acagtattg gtatctgcgc 1800

tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttgtagc tctgatccg gcaaaaaac 1860

caccgctggt agcgggtggt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg 1920

atctcaagaa gatccttga tctttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc 1980

acgttaaggg attttgctca tgagattac aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa 2040

ttaaaaatga agttttaa caatctaaag tatatatgag taaactggg ctgacagta 2100

ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctattcgtt catccatag 2160

tgctgactc cccgtcgtg agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 2220

tgctgcaatg ataccgcgag aaccacgctc accggctcca gatttatcag caataaeca 2280

gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgct ccatccagtc 2340

tattaattgt tgccggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 2400

tggtgccatt gctacaggca tcgtggtgac acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag 2460

ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgca aaaaagcgg 2520

tagtccctc ggtcctccga tcgtgtcag aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat 2580

ggttatggca gcactgcata attctcttac tgatcgcca tccgtaagat gcttttctgt 2640

gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagttg atgcggcgac cgagttgctc 2700

ttgcccggcg tcaatacggg ataatacgc gccacatagc agaacttaa aagtgtcat 2760

cattgaaaa cgttctcgg ggcgaaaact ctaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 2820

ttgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 2880

ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa ggcgacacg 2940

gaaatgtga atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 3000

ttgtctatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc 3060

gcgcacattt cccgaaaag tgccaccta attgtaagcg ttaatattt gttaaaatc 3120

gcgttaaatt ttgttaaat cagctcattt ttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc 3180

ccttataat caaaagaata gaccgagata ggggtgagtg ttgtccagt ttggaacaag 3240

agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc 3300

tatggcccac tacgtgaacc ataccctaa tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa 3360

gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg 3420

aacgtggcga gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt 3480

gtagcggcca cgctgcgctg aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc 3540

gcgtccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttggaag ggcgatcggg gcgggcctct 3600

tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttggtaacg 3660

ccagggtttt ccagtcacg acgttgtaa acgacggcca gtgagcgcgc gtaatacgac 3720

tcactatagg gcaattggg taccgcgat ccaaggagat atagat 3766

<210> 44
 <211> 29
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

10 <400> 44

aaaacatatg gaaaaggtgg cattcatcg 29

15 <210> 45
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 45

25 aaaagatctt tagcggattt ccacaccgcc 30

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para la preparación de ácido metacrílico o ésteres del ácido metacrílico, que comprende las etapas de procedimiento
- 5 IA) preparación de ácido 3-hidroxiisobutírico mediante un procedimiento que comprende la etapa de procedimiento de la puesta en contacto de una célula que fue modificada por tecnología genética con respecto a su tipo salvaje, de modo que, en comparación con su tipo salvaje, es capaz de formar más ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico, con un medio nutritivo que
- 10 contiene como fuente de carbono hidratos de carbono, glicerol, dióxido de carbono, metano, metanol, L-valina o L-glutamato, bajo condiciones en las que a partir de la fuente de carbono se forman ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico, eventual purificación del ácido 3-hidroxiisobutírico a partir del medio nutritivo, así como, eventualmente, neutralización del ácido 3-hidroxiisobutírico,
- 15 IB) deshidratación del ácido 3-hidroxiisobutírico bajo formación de ácido metacrílico, así como, eventualmente, esterificación del ácido metacrílico, en el que
- 1) la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar a través de metilmalonato-semialdehído en calidad de producto previo, y en el que
- 20 1a) la célula es capaz de formar ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico a través de succinil-coenzima A como producto intermedio, y en el que
- 1a₁) la célula presenta una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de una enzima E₁ que cataliza la reacción de succinil-coenzima A para formar metilmalonil-coenzima A, y/o
- 25 1a₂) la célula presenta una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de al menos una de las siguientes enzimas E₂ a E₄:
- de una enzima E₂ que cataliza la reacción de metilmalonil-coenzima A para formar metilmalonato,
 - de una enzima E₃ que cataliza la reacción de metilmalonato para formar metilmalonato-semialdehído,
 - de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar 3-hidroxiisobutirato, o
- 30 1a₃) la célula presenta una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de al menos una de las siguientes enzimas E₄, E₅, E₆ y E₇:
- de una enzima E₆ que cataliza la reacción de (R)-metilmalonil-coenzima A para formar (S)-metilmalonil-coenzima A,
 - de una enzima E₇ que cataliza la reacción de (S)-metilmalonil-coenzima A para formar propionil-coenzima A,
 - de una enzima E₅ que cataliza la reacción de propionil-coenzima A para formar metilmalonato-semialdehído,
 - de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar ácido 3-hidroxiisobutírico, o
- 35 1a₄) la célula presenta una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de al menos una de las siguientes enzimas E₄, E₅ y E₇:
- de una enzima E₇ que cataliza la reacción de metilmalonil-coenzima A para formar propionil-coenzima A,
 - de una enzima E₅ que cataliza la reacción de propionil-coenzima A para formar metilmalonato-semialdehído,
 - de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar ácido 3-hidroxiisobutírico, o
- 40 1a₅) la célula presenta una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de al menos una de las siguientes enzimas E₂₈ y E₄₆:
- de una enzima E₄₆ que cataliza la reacción de L-glutamato para formar 2-oxoglutarato;
 - de una enzima E₂₈ que cataliza la reacción de 2-oxoglutarato para formar succinil-coenzima A, o
- 55 1b) la célula es capaz de formar ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico a través de propionil-coenzima A como producto intermedio, y en el que
- 1b₁) la célula presenta una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de al menos una de las siguientes enzimas E₄, E₅ y E₄₇ a E₅₂:
- 60

- de una enzima E₄₇ que cataliza la reacción de acetil-coenzima A para formar malonil-coenzima A,
 - de una enzima E₄₈ que cataliza la reacción de malonil-coenzima A para formar malonato-semialdehído,
 - 5 - de una enzima E₄₉ que cataliza la reacción de malonato-semialdehído para formar 3-hidroxiopropionato,
 - de una enzima E₅₀ que cataliza la reacción de 3-hidroxiopropionato para formar 3-hidroxiopropionil-coenzima A,
 - 10 - de una enzima E₅₁ que cataliza la reacción de 3-hidroxiopropionil-coenzima A para formar acrilil-coenzima A,
 - de una enzima E₅₂ que cataliza la reacción de acrilil-coenzima A para formar propionil-coenzima A,
 - de una enzima E₅ que cataliza la reacción de propionil-coenzima A para formar metilmalonato-semialdehído,
 - 15 - de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar 3-hidroxiisobutirato, o
- 1c) la célula es capaz de formar ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico a través de propionil-coenzima A como producto intermedio, y
- 1c₁) la célula presenta una actividad, incrementada en comparación
- 20 con su tipo salvaje, de al menos una de las siguientes enzimas E₂ a E₄ y E₅₆, E₇₂ y E₇₃:
- de una enzima E₇₂ que cataliza la reacción de beta-alanina para formar beta-alanil-coenzima A,
 - de una enzima E₇₃ que cataliza la reacción de beta-alanil-coenzima A para formar acrilil-coenzima A,
 - 25 - de una enzima E₅₆ que cataliza la reacción de acrilil-coenzima A para formar metilmalonil-coenzima A,
 - de una enzima E₂ que cataliza la reacción de metilmalonil-coenzima A para formar metilmalonato,
 - de una enzima E₃ que cataliza la reacción de metilmalonato para formar metilmalonato-semialdehído,
 - 30 - de una enzima E₄ que cataliza la reacción de metilmalonato-semialdehído para formar ácido 3-hidroxiisobutírico, o
- 2) la formación de ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico tiene lugar a través de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A en calidad de producto previo, y en el que
- 2a) la célula es capaz de formar ácido 3-hidroxiisobutírico o polihidroxicanoatos basados en ácido 3-hidroxiisobutírico a través de isobutiril-coenzima A como producto intermedio, y en el que
- 2a₁) la célula presenta una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de al menos una de las siguientes enzimas E₇₆ a E₇₉, E₆₀, E₆₁ y E₈:
- 40 - de una enzima E₇₆ que cataliza la reacción de piruvato para formar 2-acetolactato,
- de una enzima E₇₇ que cataliza la reacción de 2-acetolactato para formar 2,3-dihidroxiisovalerato,
 - 45 - de una enzima E₇₈ que cataliza la reacción de 2,3-dihidroxiisovalerato para formar 2-oxoisovalerato,
 - de una enzima E₇₉ que cataliza la reacción de 2-oxoisovalerato para formar isobutiril-coenzima A,
 - de una enzima E₆₀ que cataliza la reacción de isobutiril-coenzima A para formar metacrilil-coenzima A,
 - 50 - de una enzima E₆₁ que cataliza la reacción de metacrilil-coenzima A para formar 3-hidroxiisobutiril-coenzima A,
 - de una enzima E₈ que cataliza la reacción de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A para formar 3-hidroxi-isobutirato, o
- 2a₂) la célula presenta una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de al menos una de las siguientes enzimas E₈ E₆₀ a E₆₁ y E₇₉ a E₈₀:
- 55 - de una enzima E₈₀ que cataliza la reacción de L-valina para formar 2-oxoisovalerato,
- de una enzima E₇₉ que cataliza la reacción de 2-oxoisovalerato para formar isobutiril-coenzima A,
 - 60 - de una enzima E₆₀ que cataliza la reacción de isobutiril-coenzima A para formar

- 5 metacrilil-coenzima A,
 - de una enzima E₆₁ que cataliza la reacción de metacrilil-coenzima A para formar 3-hidroxiisobutiril-coenzima A,
 - de una enzima E₈ que cataliza la reacción de 3-hidroxiisobutiril-coenzima A para formar 3-hidroxiisobutirato.
- 2.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima E₁ en 1a₁) es una metilmalonil-coenzima A-hidrolasa (EC 5.4.99.2).
- 10 3.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en 1a₁) la enzima E₂ es una metilmalonil-coenzima A-hidrolasa (EC 3.2.1.17), E₃ es una aldehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.3) o una aldehído-oxidasa (EC 1.2.3.1) y E₄ es una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35).
- 15 4.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en 1a₃) la enzima E₆ es una metilmalonil-coenzima A-epimerasa (EC 5.1.99.1), E₇ es una metilmalonil-coenzima A-d Descarboxilasa (EC 4.1.1.41), E₅ es una metilmalonato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.27), y
- 20 E₄ es una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35).
- 5.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en 1a₄) la enzima E₇ es una metilmalonil-coenzima A-d Descarboxilasa (EC 4.1.1.41),
- 25 E₅ es una metilmalonato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.27), y E₄ es una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35).
- 6.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en 1a₅) la enzima E₄₆ es una glutamato-sintasa (EC 1.4.1.13 o EC 1.4.1.14), una glutamato-deshidrogenasa (EC 1.4.1.2, EC 1.4.1.3 o EC 1.4.1.4) o una aspartato-transaminasa (EC 2.6.1.1 o EC 2.6.1.2) y
- 30 E₂₈ es una 2-oxoglutarato-sintasa (EC 1.2.7.3).
- 7.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en 1b₁) la enzima E₄ es una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35),
- 35 E₅ es una metilmalonato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.27), E₄₇ es una malonil-coenzima A-d Descarboxilasa (EC 4.1.1.9), una malonato-coenzima A-transferasa (EC 2.8.3.3), una metilmalonil-coenzima A-carboxitransferasa (EC 2.1.3.1) o una acetil-coenzima A-carboxilasa (EC 6.4.1.2),
- 40 E₄₈ es una malonato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.18), E₄₉ es una 3-hidroxiopropionato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.59), E₅₀ es una 3-hidroxiisobutiril-coenzima A hidrolasa (EC 3.1.2.4), E₅₁ es una enoil-coenzima A-hidratasa (EC 4.2.1.17) y
- 45 E₅₂ es una acil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.3).
- 8.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en 1c₁) la enzima E₇₂ es una coenzima A-transferasa (EC 2.8.3.1) o coenzima A-sintetasa, preferiblemente una coenzima A-transferasa,
- 50 E₇₃ es una beta-alanil-coenzima A-amonio-lisasa (EC 4.3.1.6), E₅₆ es una crotonil-coenzima A-d Descarboxilasa E₂ es una metilmalonil-coenzima A-hidrolasa (EC 3.1.2.17), E₃ es una aldehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.3) o una aldehído-oxidasa (EC 1.2.3.1) y E₄ es una 3-hidroxiisobutirato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.31) o una 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35).
- 55 9.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en 2a₂) la enzima E₈ es una 3-hidroxiisobutiril-coenzima A-hidrolasa (EC 3.1.2.4), E₇₆ es una acetolactato-sintasa (EC 2.2.1.6), E₇₇ es una dihidroxiisovalerato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.86),
- 60 E₇₈ es una 2,3-dihidroxiisovalerato-deshidratasa (EC 4.2.1.9),

E₇₉ es una 2-oxoisovalerato-deshidrogenasa (EC 1.2.1.25 o EC 1.2.4.4),
E₆₀ es una acil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.3), una butiril-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.2) o
una 2-metilacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.12) y
E₆₁ es una enoil-coenzima A-hidratasa (EC 4.2.1.17).

5
10.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en 2a₂) la enzima
E₈ es una 3-hidroxiisobutiril-coenzima A-hidrolasa (EC 3.1.2.4),
E₆₀ es una acil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.3), una butiril-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.2) o
una 2-metilacil-coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.3.99.12),
10 E₆₁ es una enoil-coenzima A-hidratasa (EC 4-2.1.17),
E₇₉ es una 2-oxoisovalerato-deshidrogenasa (EC 1.2.1.25 o EC 1.2.4.4) y
E₈₀ es una aminoácido-transferasa (EC 2.6.1.42).

15 11.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la célula se puede obtener mediante un procedimiento para
la preparación de una célula modificada por tecnología genética, que comprende la etapa de procedimiento del
incremento de la actividad de al menos una de las enzimas mencionadas en las reivindicaciones 1 a 10 en la célula.

12.- Un procedimiento para la preparación de ácido polimetacrílico o ésteres del ácido polimetacrílico, que
comprende las etapas de procedimiento
20 IIIA) preparación de ácido metacrílico mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11,
IIIB) polimerización en los radicales del ácido metacrílico,
pudiendo esterificarse, al menos en parte, eventualmente los grupos carboxilo del ácido metacrílico o bien el grupo
carboxilato del metacrilato antes o después de la polimerización en los radicales.

25

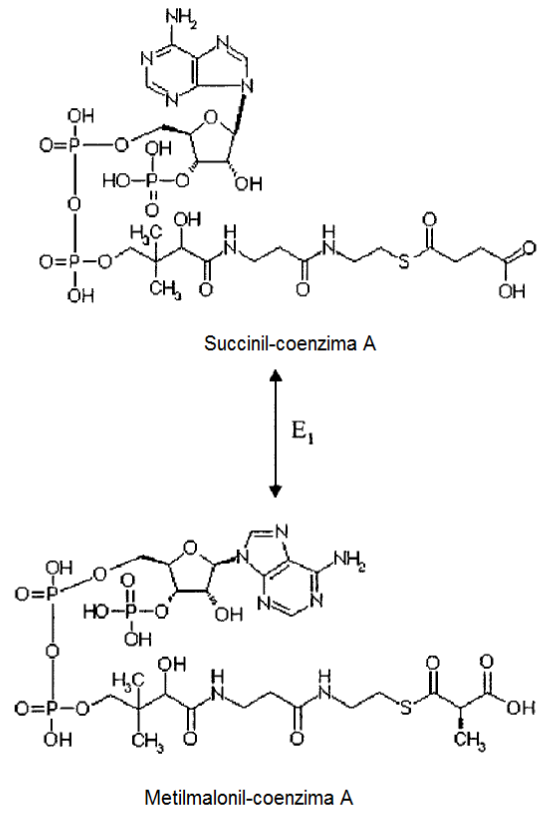
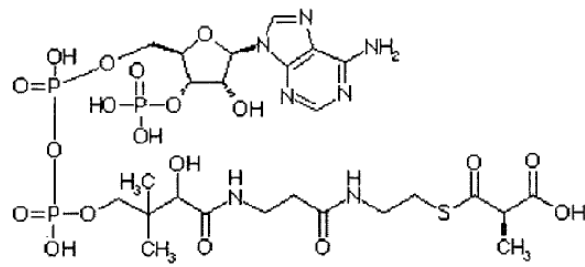
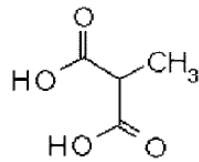


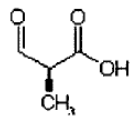
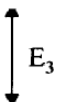
Fig. 1



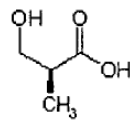
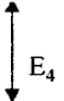
Metilmalonil-coenzima A



Metilamlonato



Semiladehído del ácido metilmalónico



Ácido 3-hidroxiisobutírico

Fig. 2

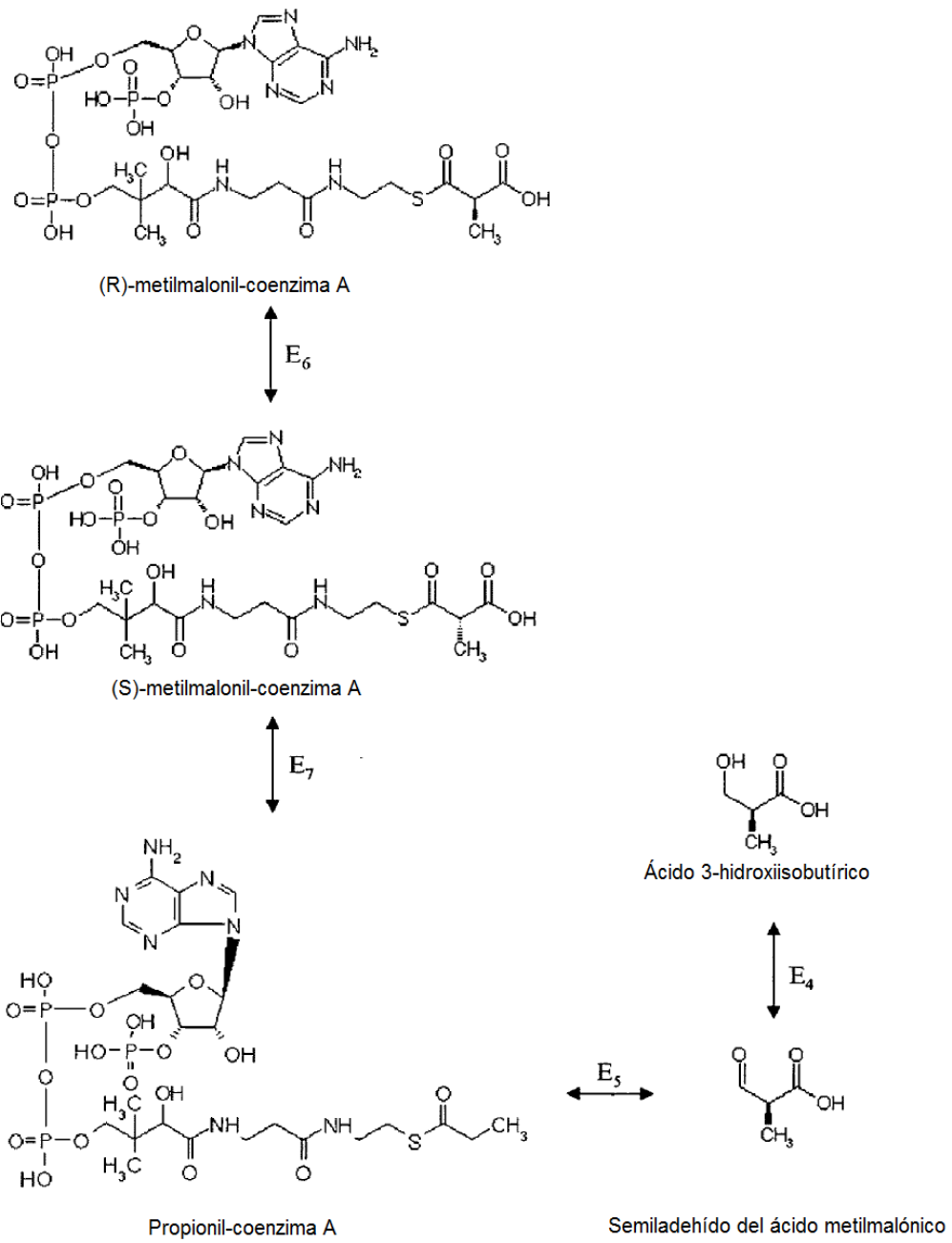


Fig. 3

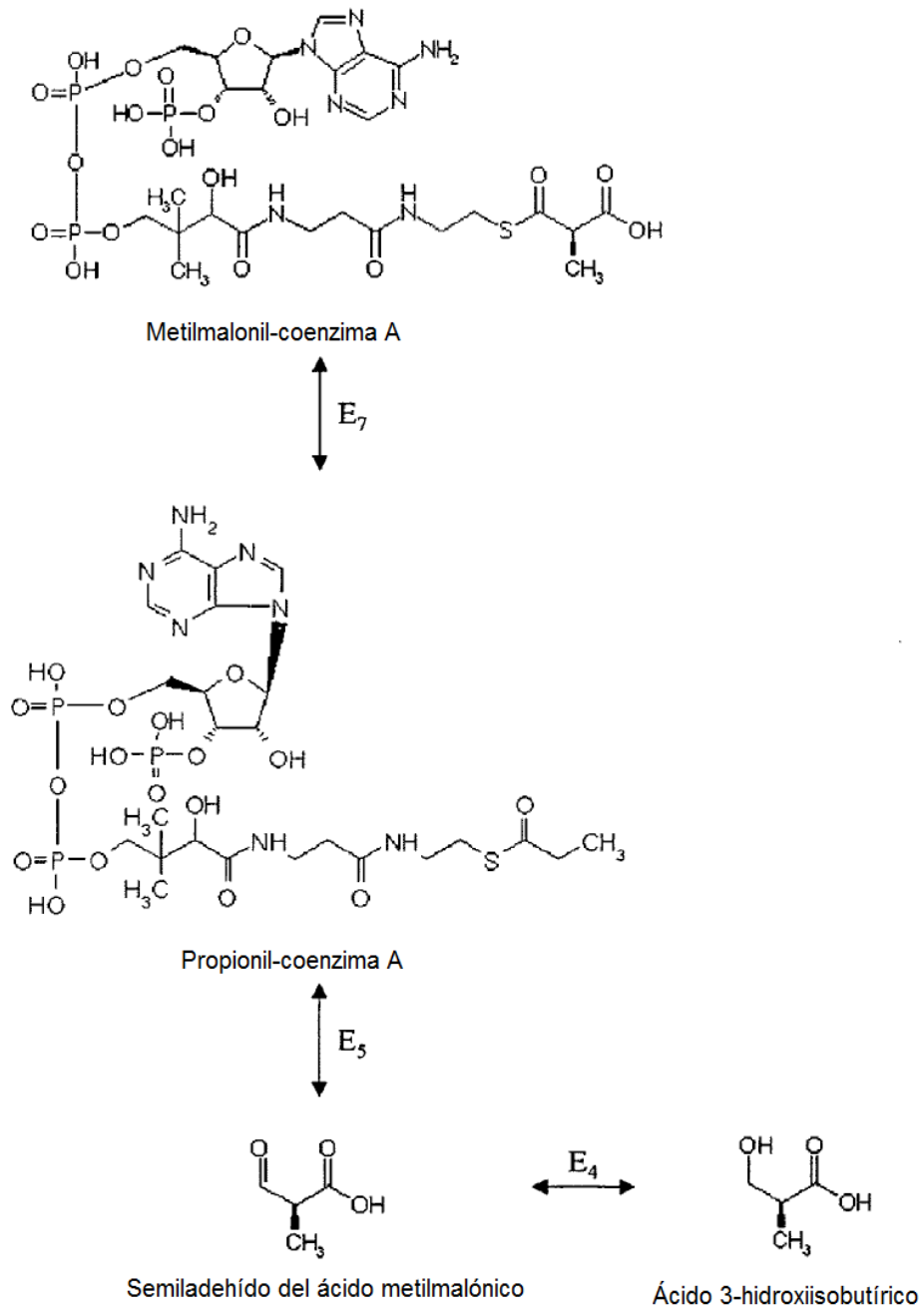


Fig. 4

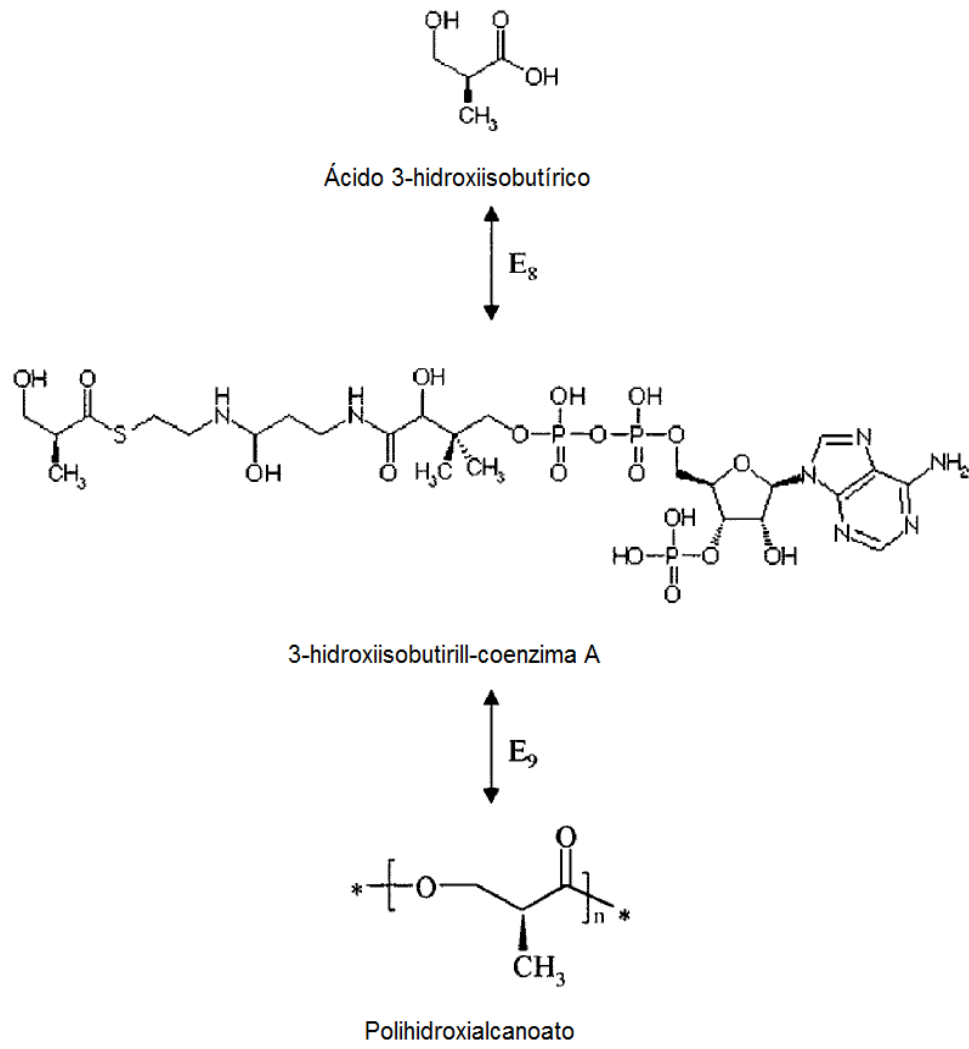


Fig. 5

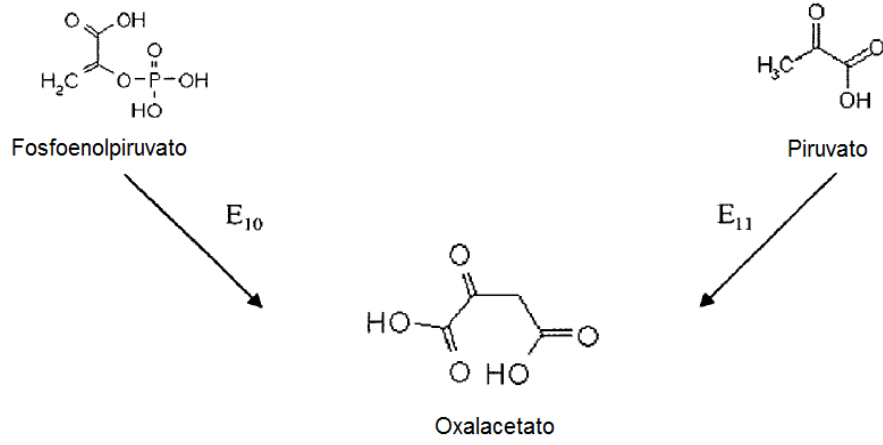


Fig. 6

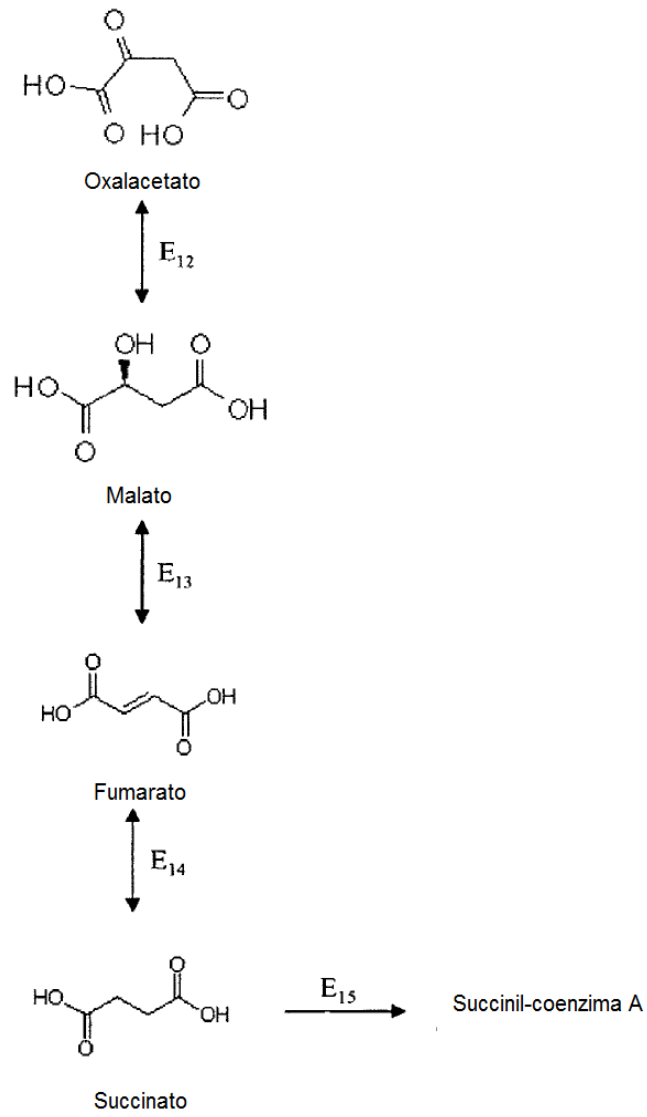


Fig. 7

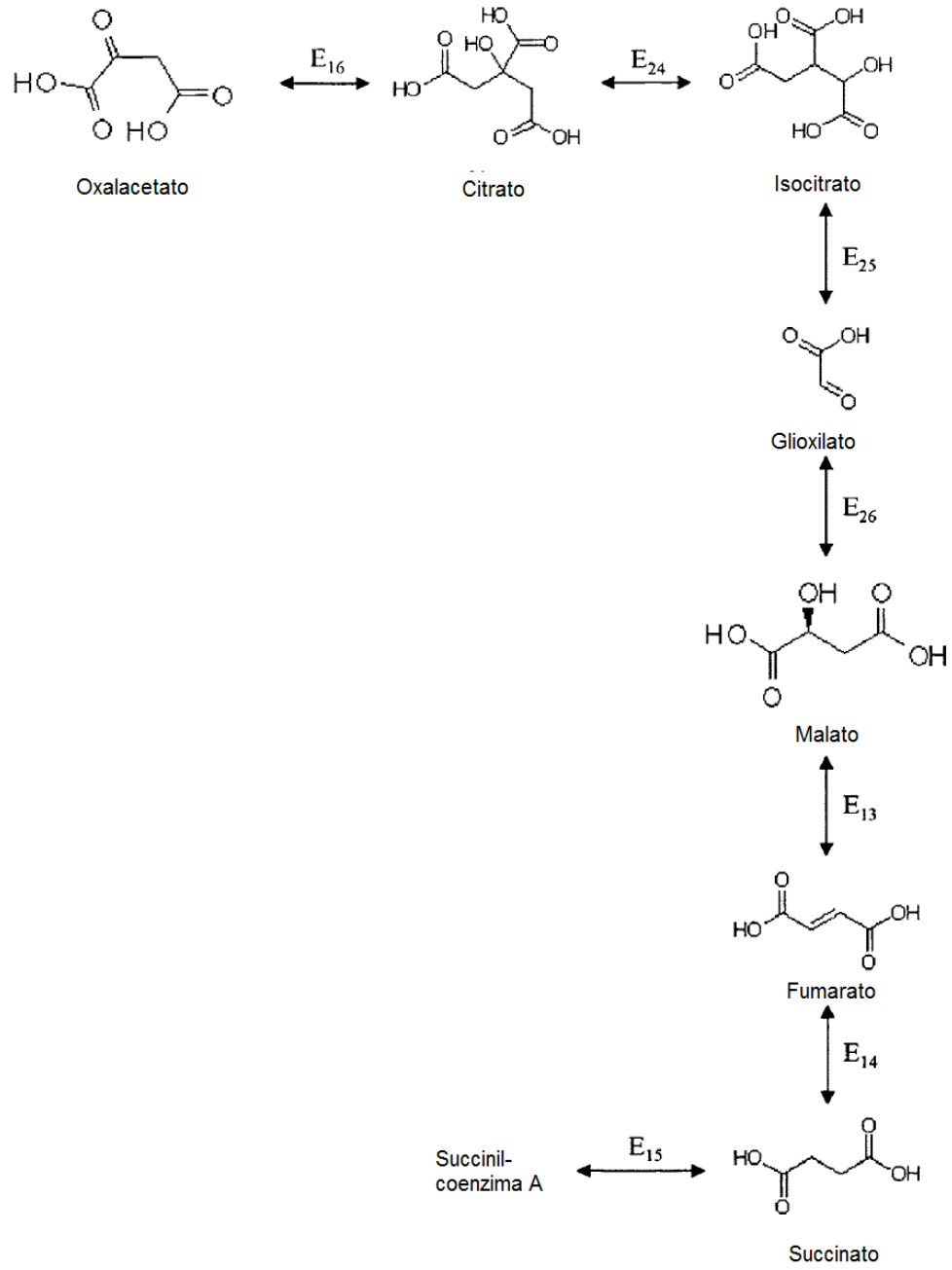


Fig. 8

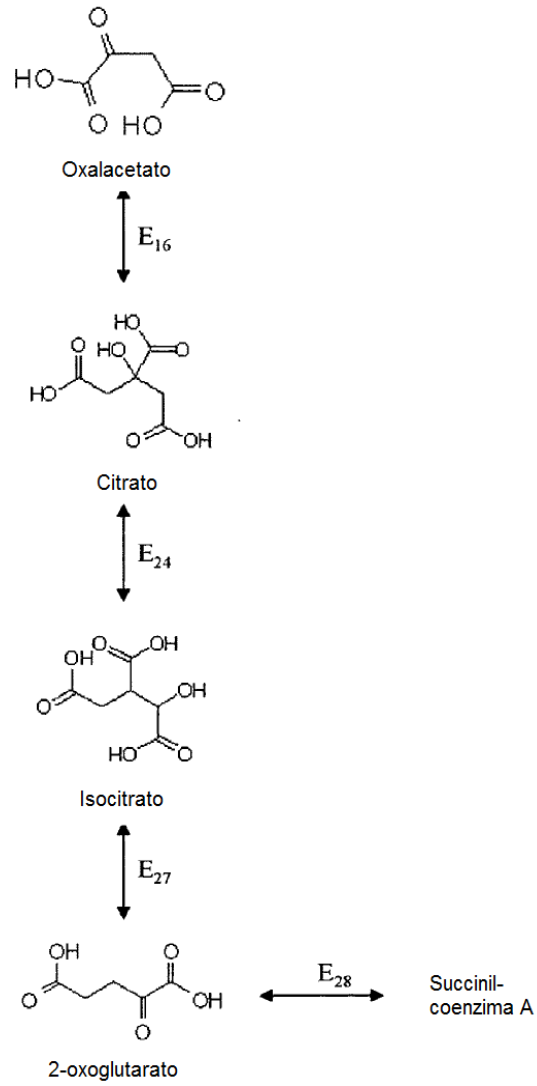


Fig. 9

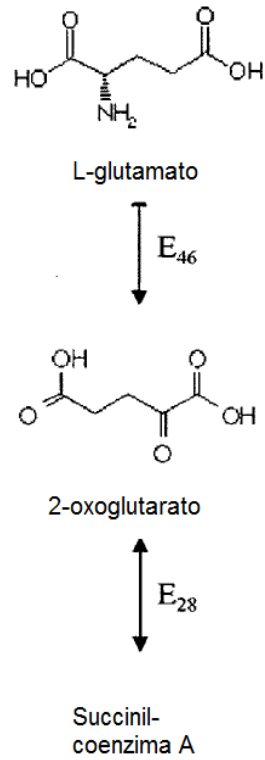


Fig. 10

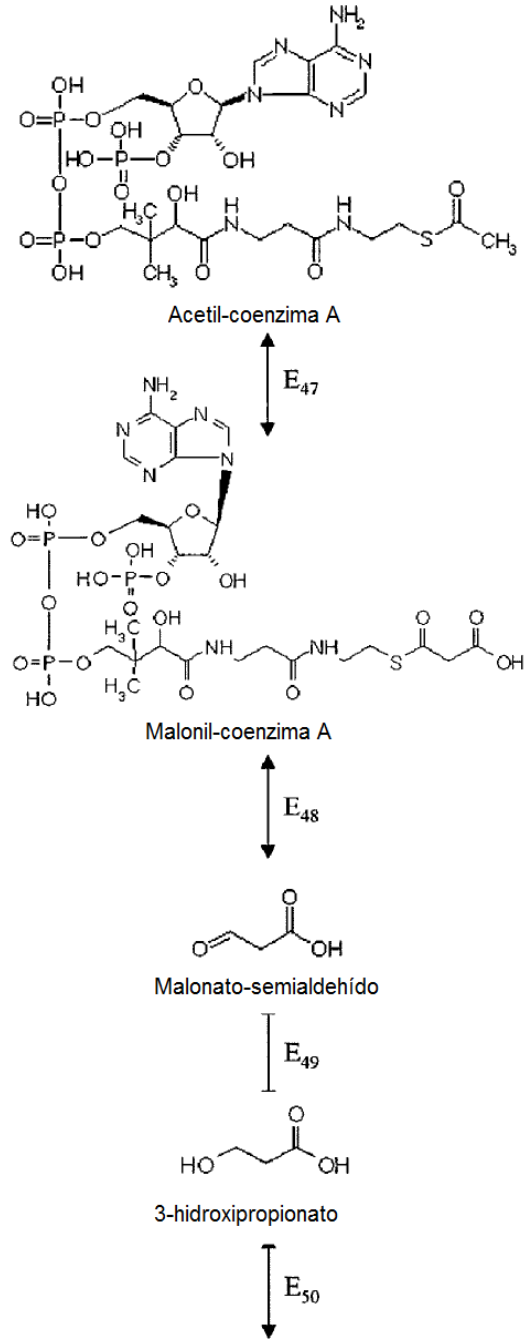


Fig. 11

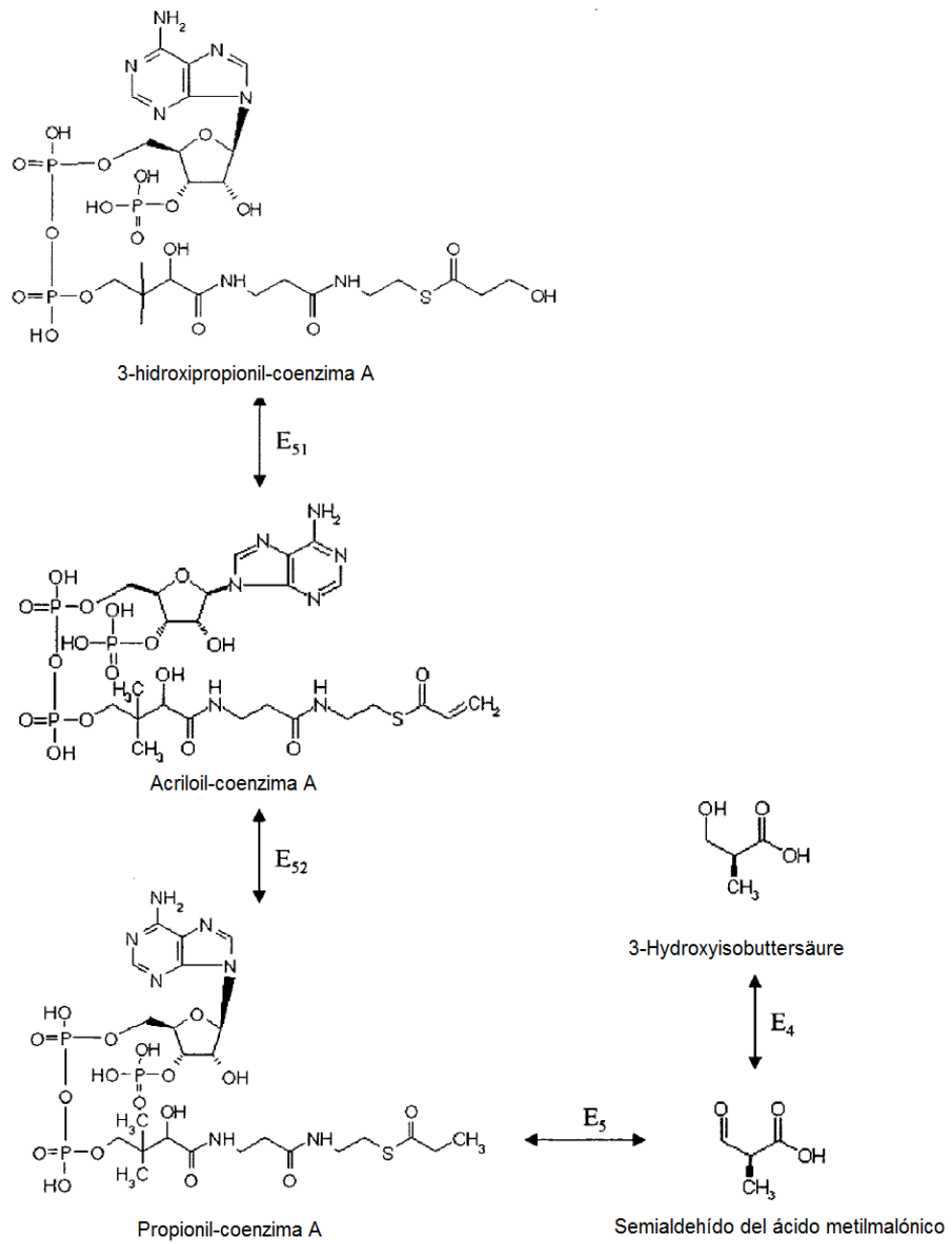


Fig. 12

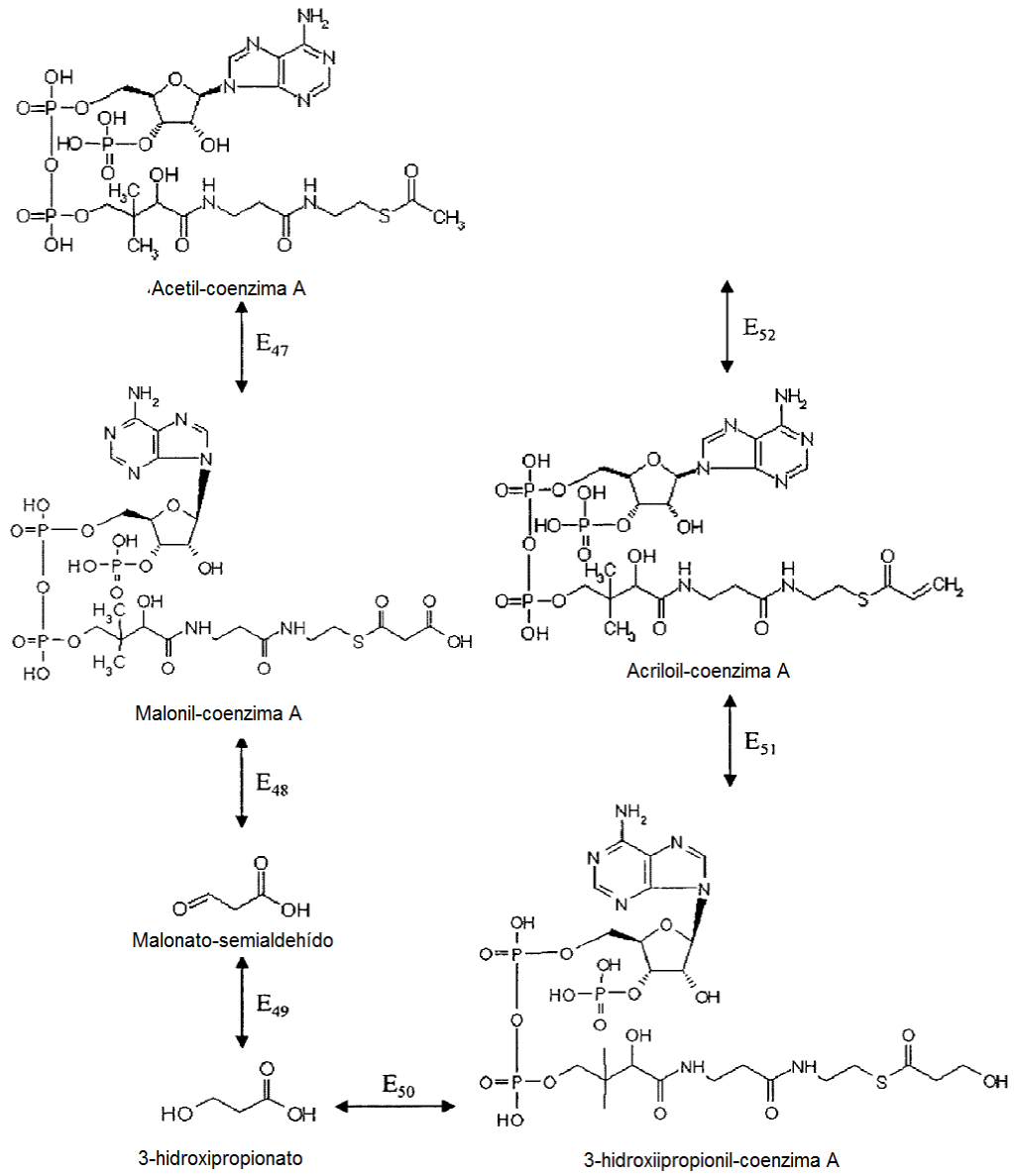


Fig. 13

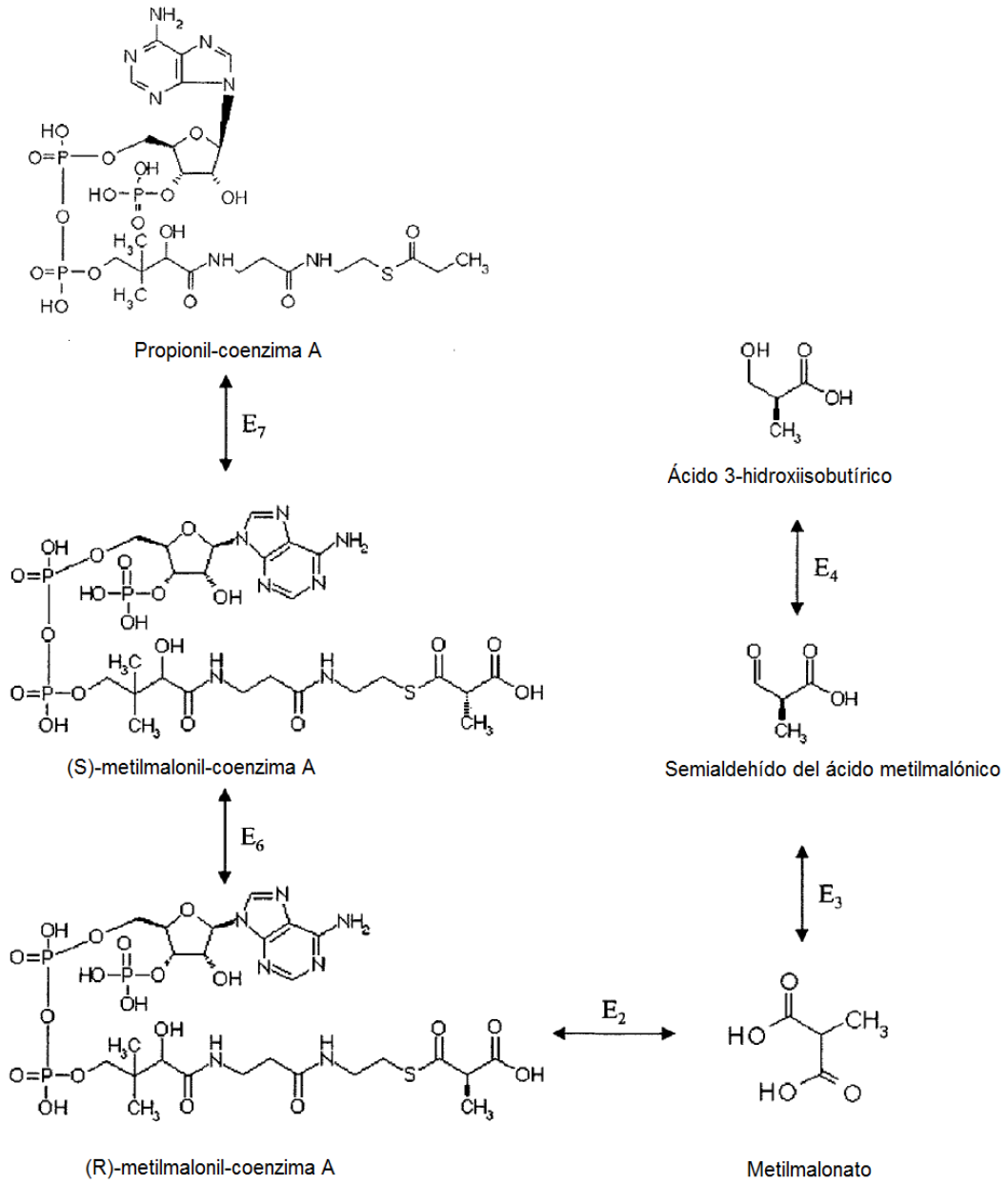


Fig. 14

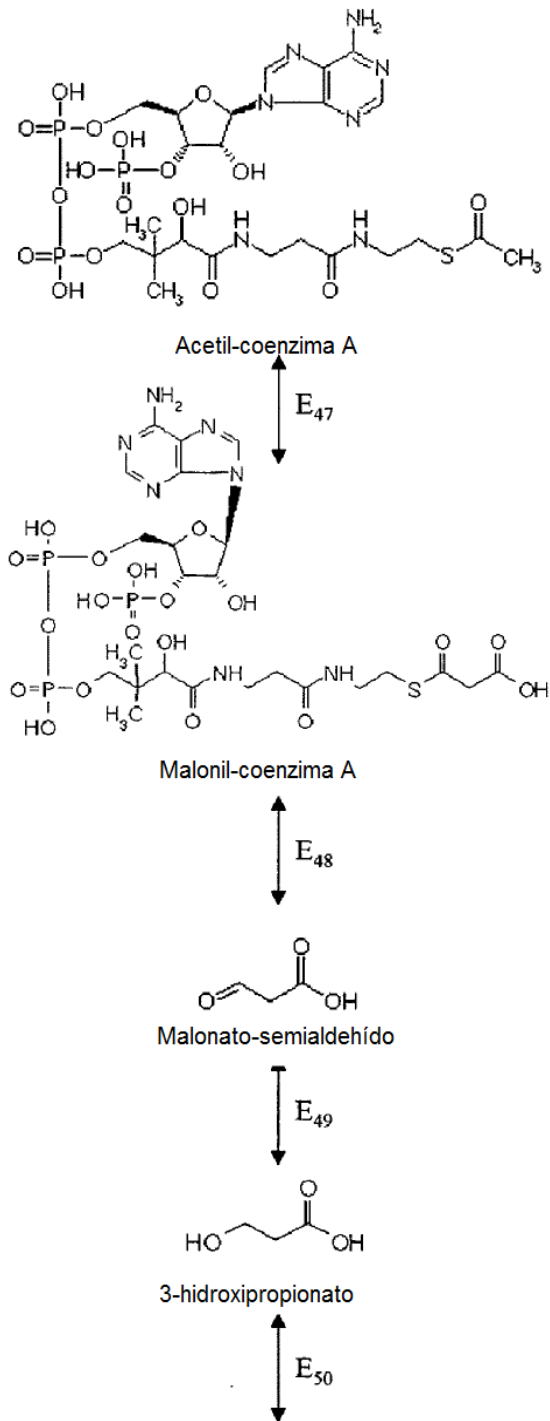


Fig. 15

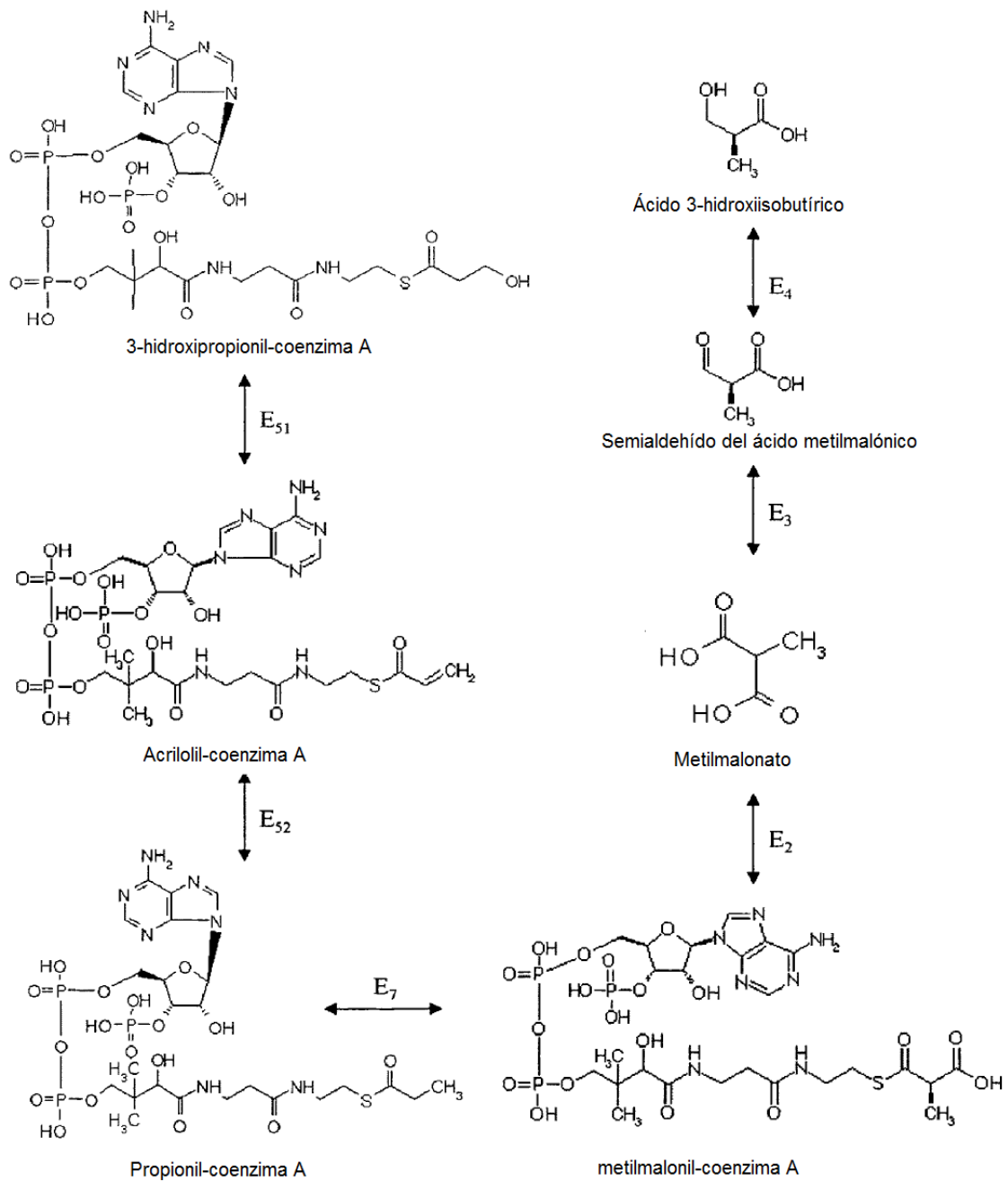


Fig. 16

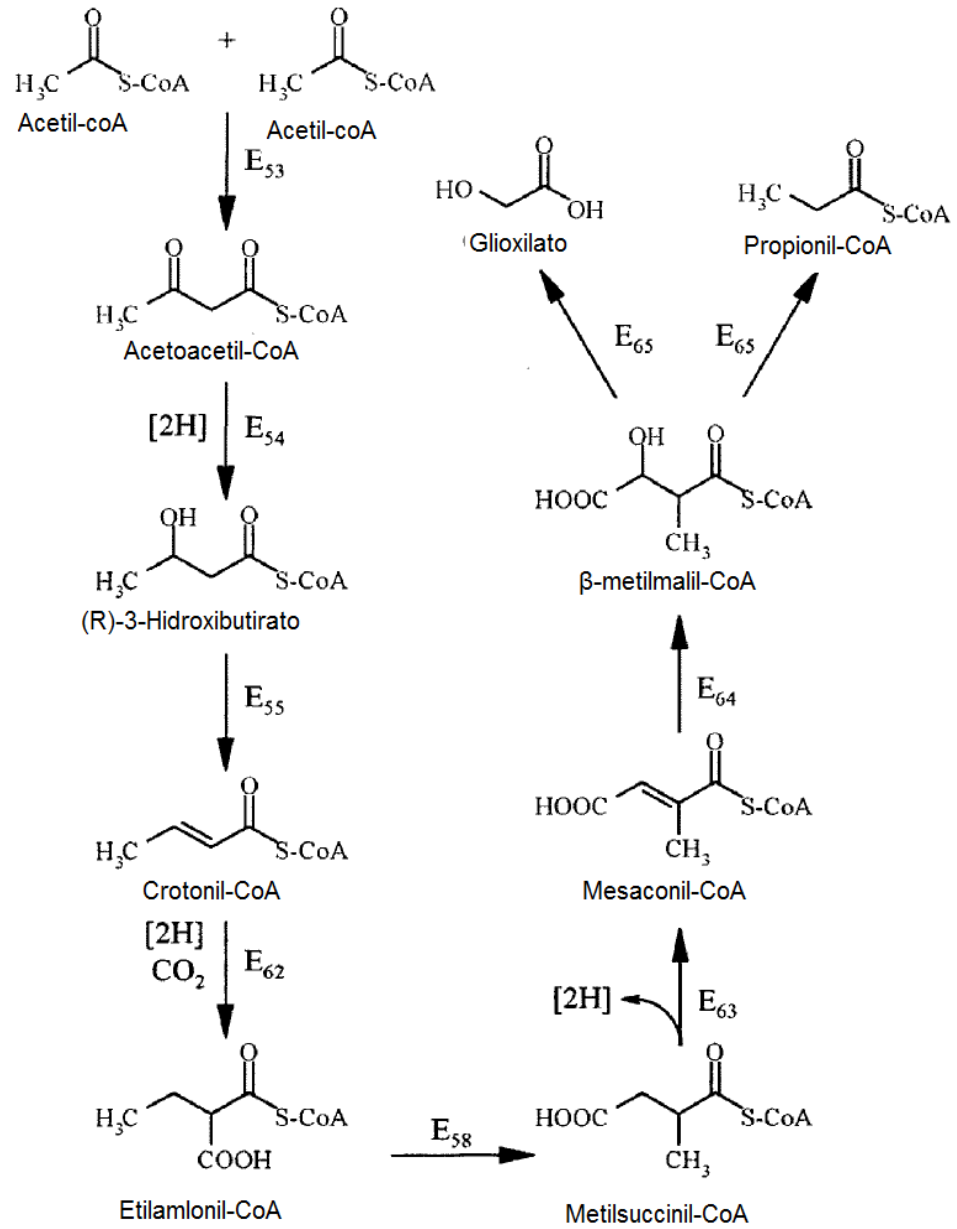


Fig. 17

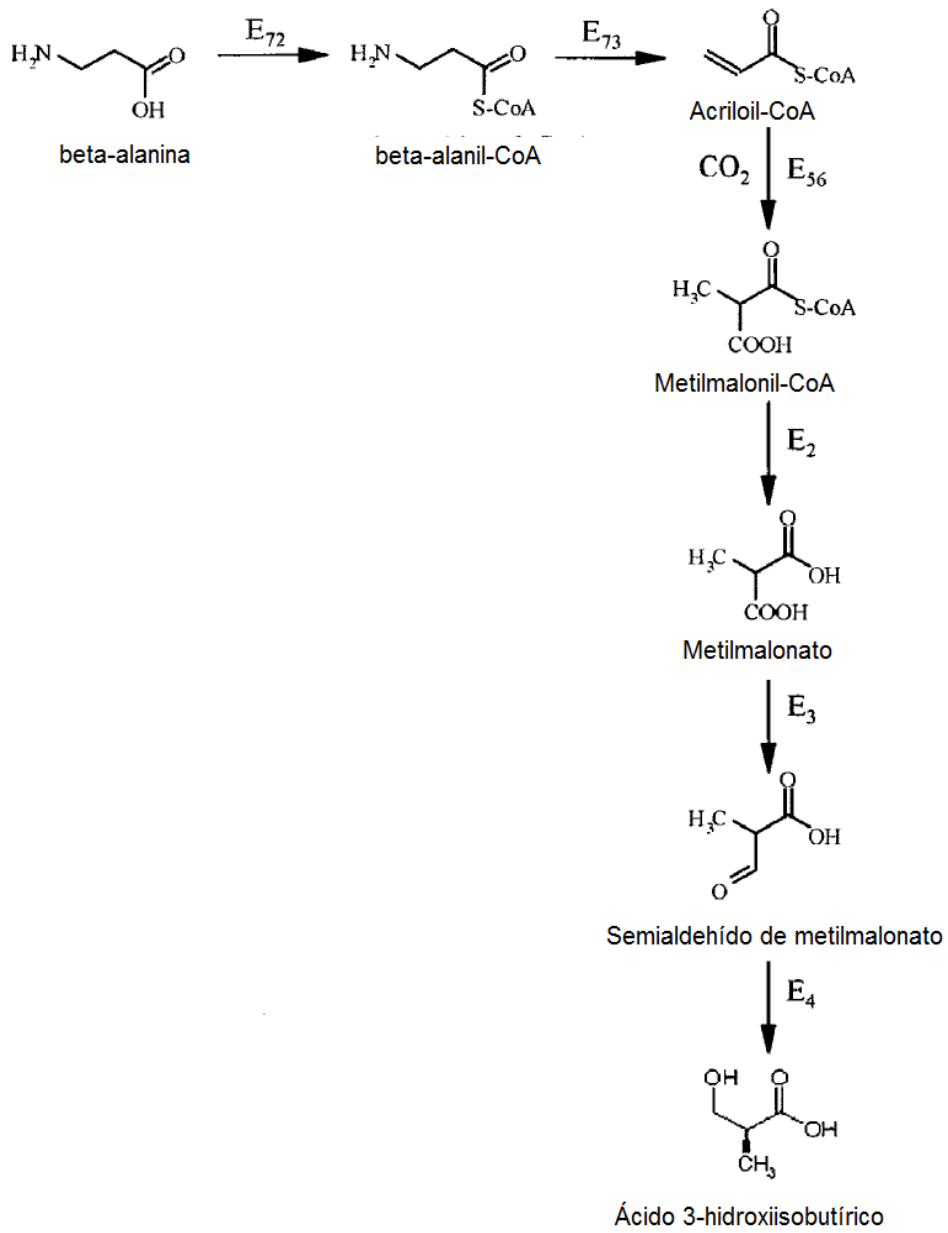


Fig. 18

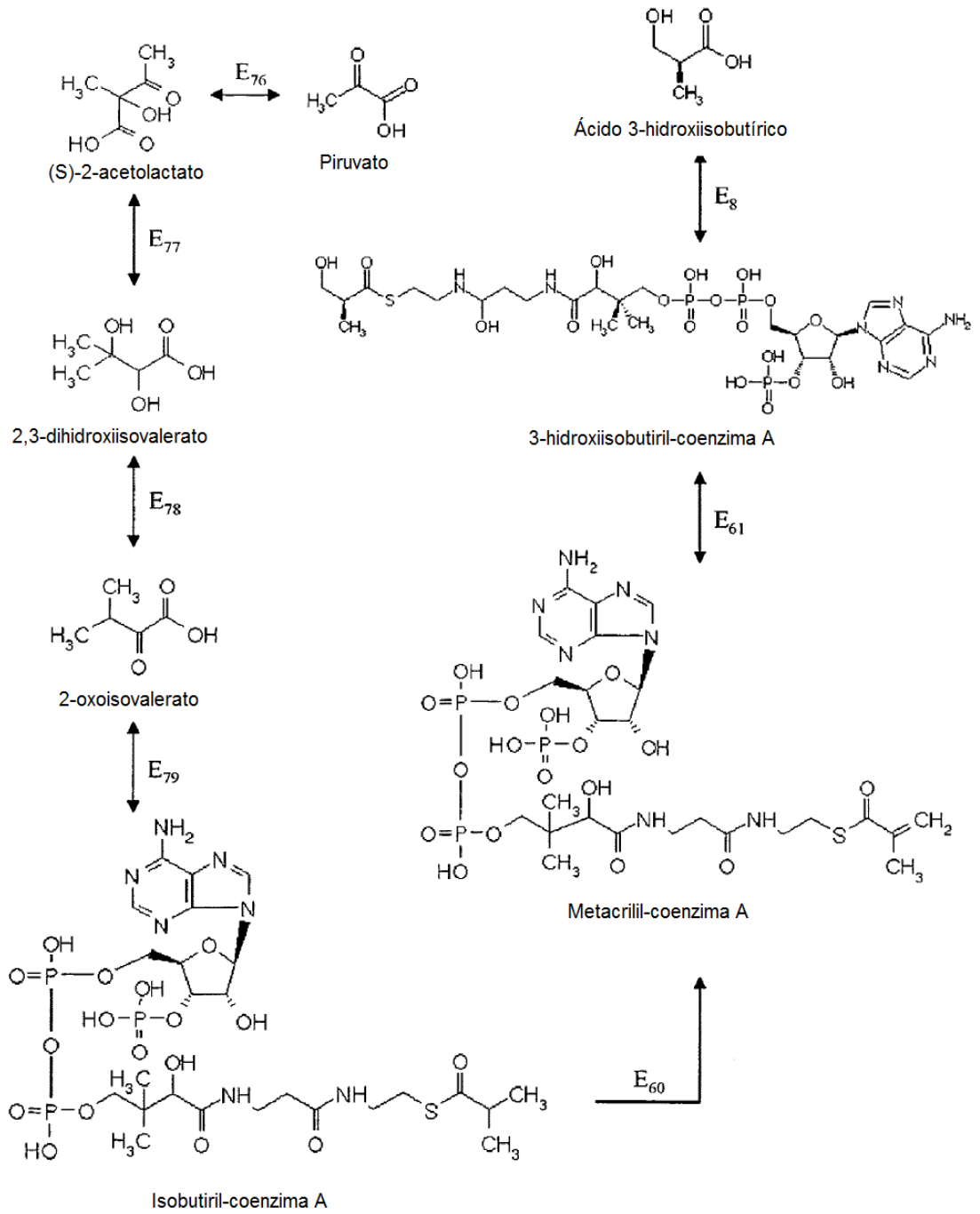


Fig. 19

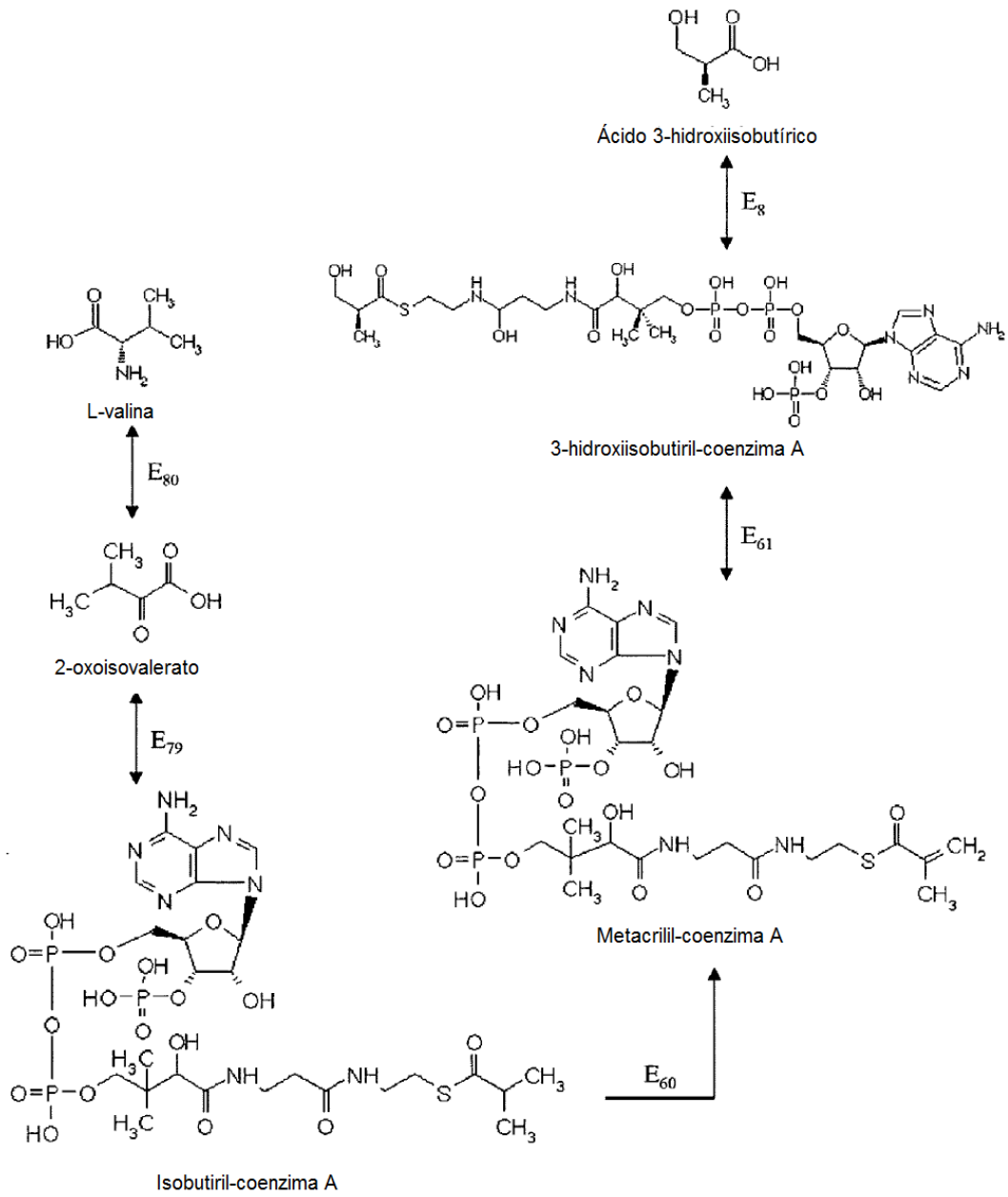


Fig. 27

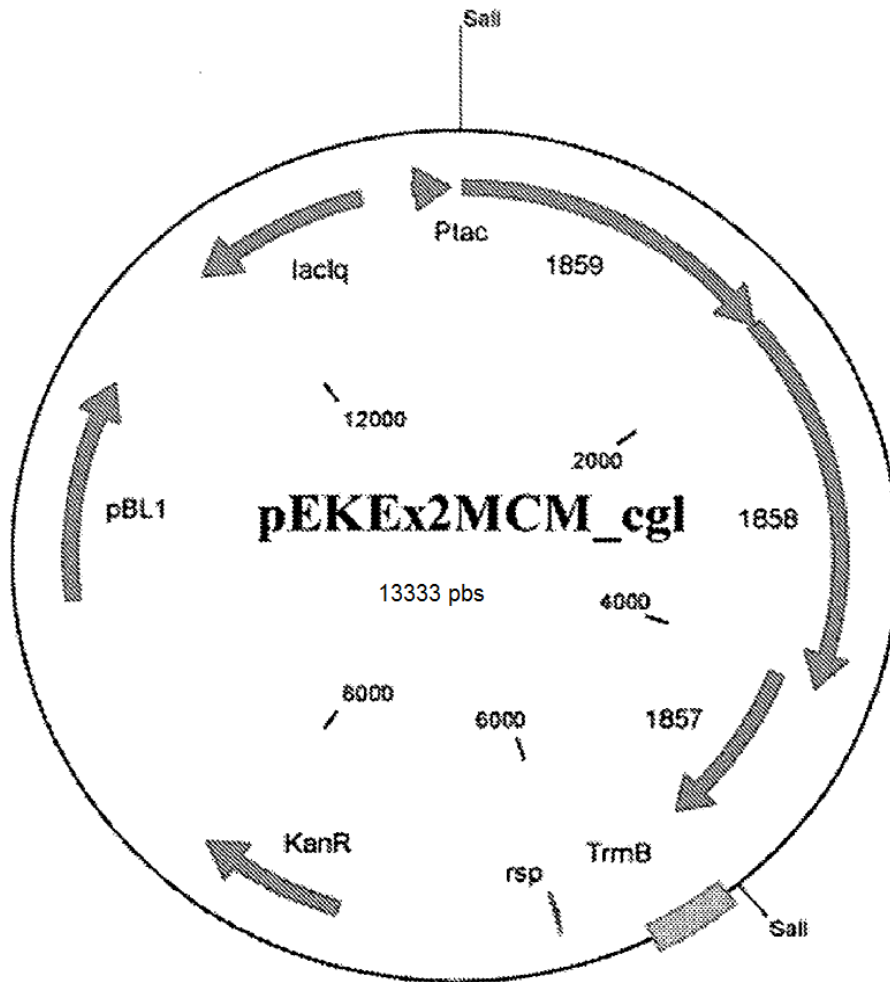


Fig. 21

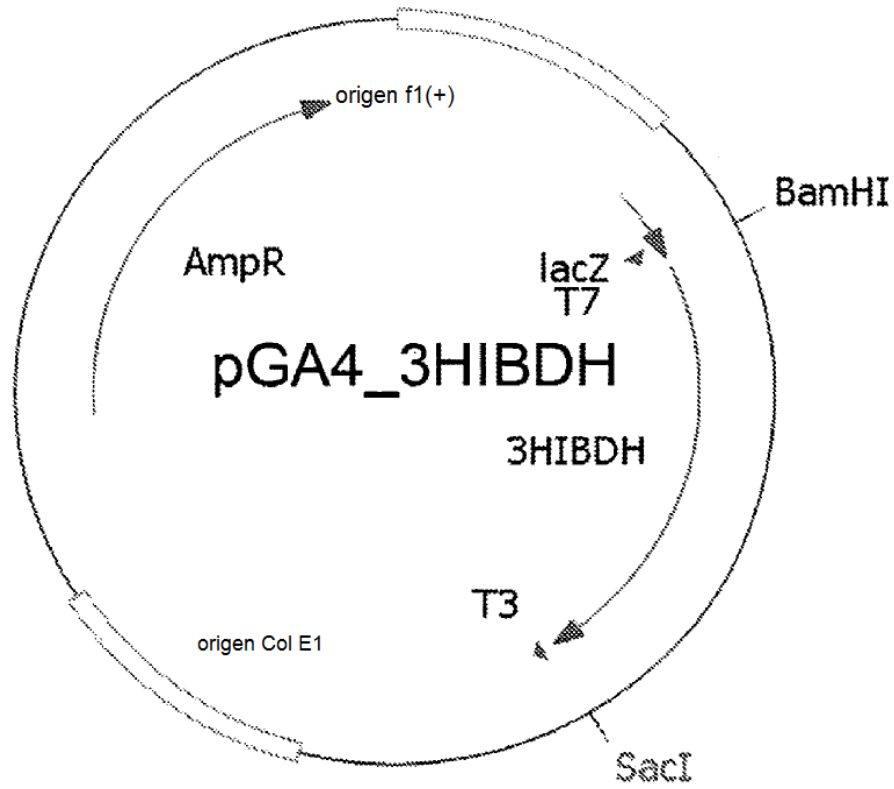


Fig. 22

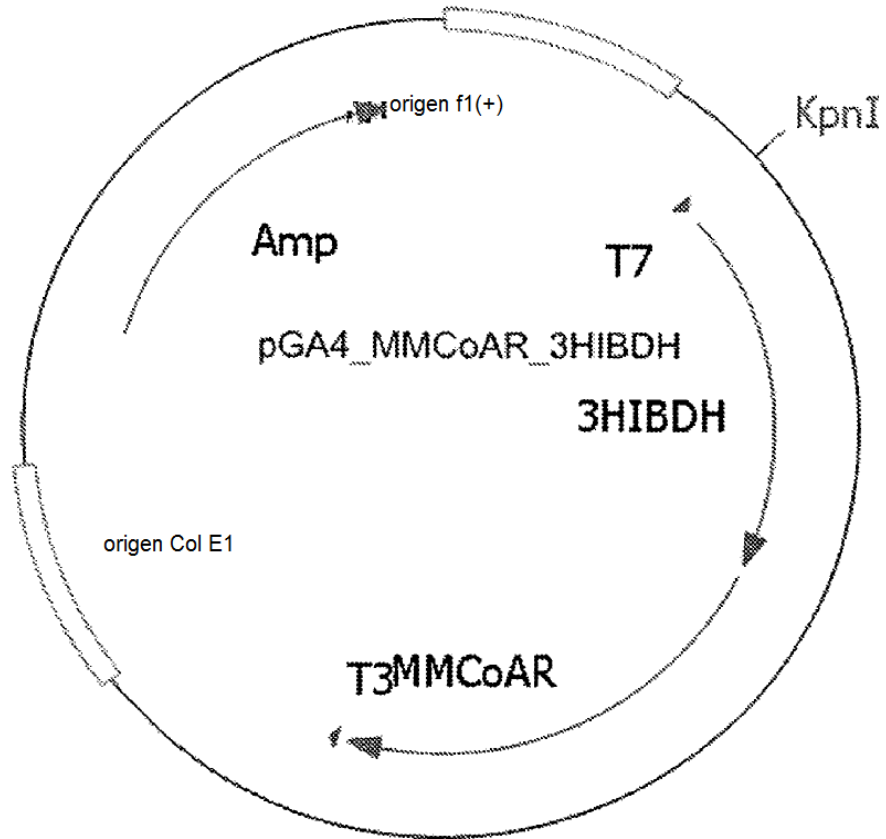


Fig. 23

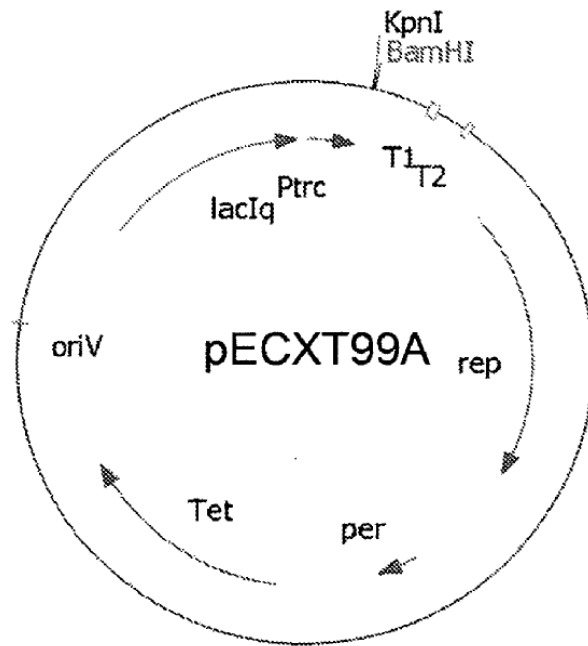


Fig. 24

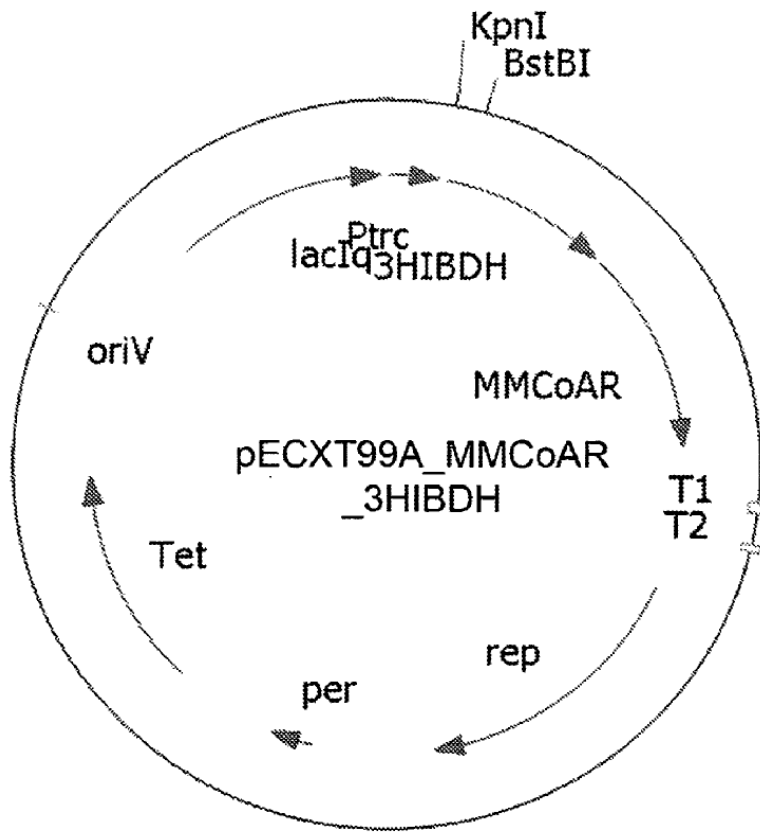


Fig. 25

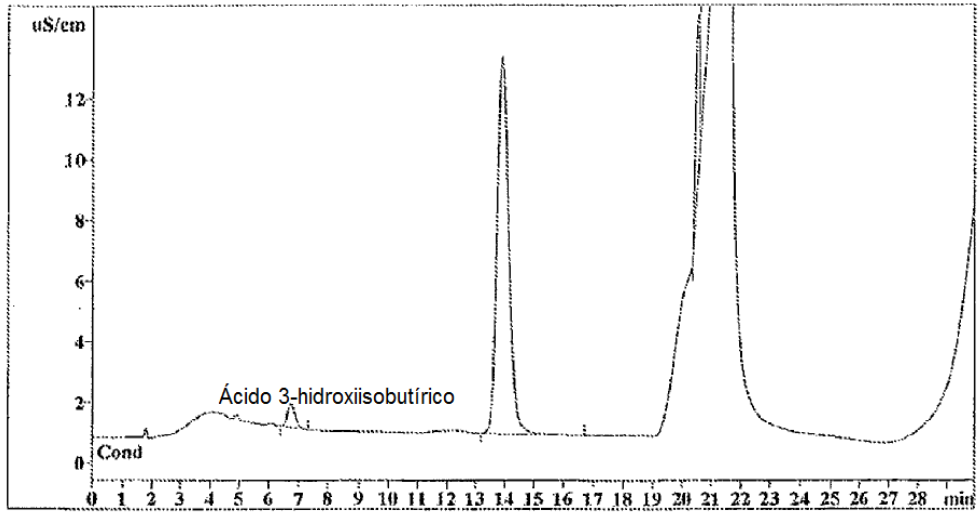


Fig. 26

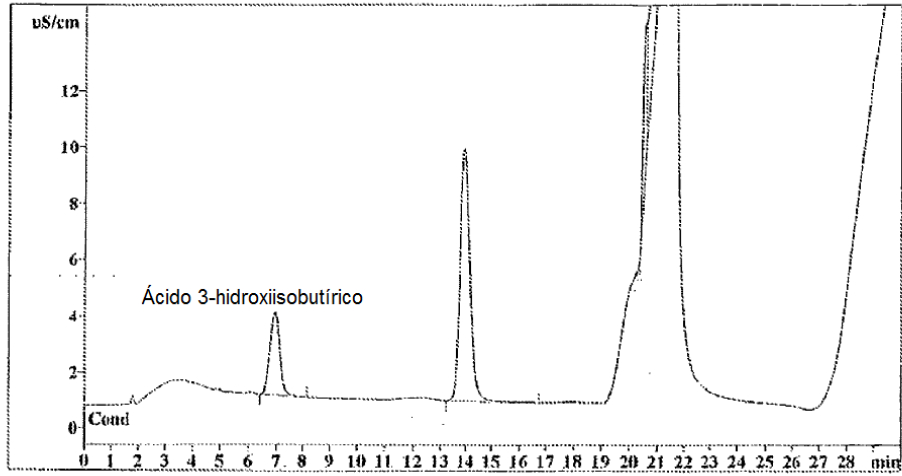


Fig. 27