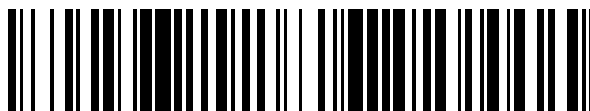


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 745**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2008 E 08792894 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 2188375**

54 Título: **Mutante de la propionil CoA transferasa de Clostridium propionicum y método de preparación de PLA o copolímeros de PLA utilizando el mismo**

30 Prioridad:

14.08.2007 KR 20070081855

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

30.01.2014

73 Titular/es:

**LG CHEM, LTD. (100.0%)
20, Yoido-dong Youngdungpo-gu
Seoul 150-721, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, SI JAE;
YANG, TAEK HO;
KANG, HYE OK;
LEE, SANG HYUN;
LEE, EUN JUNG y
KIM, TAE WAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 440 745 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

Mutante de la propionil CoA transferasa de *Clostridium propionicum* y método de preparación de PLA o copolímeros de PLA utilizando el mismo.

Sector técnico

- 5 La presente invención se refiere a un mutante de la propionil-CoA transferasa de *Clostridium propionicum*, que puede convertir el lactato en lactil-CoA con alta eficiencia en un método de preparación de polilactatos (PLA) o copolímeros de PLA utilizando microorganismos.

Técnica anterior

- 10 El polilactato (PLA) es un polímero biodegradable típico derivado del lactato de gran aplicabilidad comercial y biomédica. Aunque en la actualidad la preparación de PLA supone la polimerización del lactato producido por microorganismos fermentadores, de la polimerización directa del lactato solamente se obtiene PLA de bajo peso molecular entre 1.000 y 5.000 Daltons. Para sintetizar PLA de un peso molecular de 100.000 Daltons o superior, puede polimerizarse el PLA de bajo peso molecular obtenido mediante la polimerización directa del lactato utilizando un agente acoplador de cadenas. Sin embargo, en este método, todo el proceso se complica debido a la adición de un solvente orgánico o un agente acoplador de cadenas, que no es fácil de eliminar. Un proceso comercialmente disponible en la actualidad de preparación de PLA de alto peso molecular puede incluir convertir el lactato en lactido y sintetizar PLA utilizando una policondensación con apertura de anillo de los anillos lactido.

- 20 Cuando se sintetiza PLA mediante síntesis química de lactato, se obtiene fácilmente un homopolímero de PLA, sin embargo, un copolímero de PLA compuesto de varios tipos de monómeros es difícil de sintetizar y no se dispone del mismo a nivel comercial.

- 25 Por otro lado, el polihidroxicanoato (PHA) es un poliéster almacenado por los microorganismos como fuente de energía o de carbono cuando existe un exceso de fuentes de carbono y falta de otros nutrientes, tales como el fósforo (P), nitrógeno (N), magnesio (Mg) y oxígeno (O), etc. Dado que el PHA posee unas propiedades físicas similares a un polímero sintético convencional obtenido del petróleo y muestra una biodegradabilidad completa, se está reconociendo como un sustituto de los plásticos sintéticos convencionales.

- 30 Para producir PHA utilizando microorganismos, se necesita un enzima para convertir productos metabólicos microbianos en monómeros de PHA y una PHA sintasa para sintetizar el polímero de PHA a partir de los monómeros de PHA. Cuando se sintetizan PLA y copolímeros de PLA utilizando microorganismos, se necesita el mismo sistema, necesitando un enzima para proporcionar lactil-CoA además de un enzima para proporcionar hidroxilacil-CoA, que es un sustrato original de la sintasa de PHA.

- Por lo tanto, para obtener lactil-CoA, los presentes inventores han utilizado la propionil-CoA transferasa de *Clostridium propionicum* y un mutante de la PHA sintasa de *Pseudomonas* sp. 6-19 que utiliza la propionil-CoA transferasa como sustrato, pudiendo de este modo sintetizar con éxito PLA y copolímeros de PLA tal como se da a conocer en la solicitud de patente coreana nº 10-2006-0116234.

- 35 Sin embargo, se ha notificado que cuando la propionil-CoA transferasa de *Clostridium propionicum*, que es un enzima que suministra lactil-CoA, se expresa a niveles elevados en *E. Coli* mediante un promotor muy potente, se produce una alteración metabólica grave, que inhibe el crecimiento celular (Selmer y otros, notificado en *Eur. J. Biochem.* 269:372, 2002). También, dado que la utilización de codones de un gen que codifica la propionil-CoA transferasa de *Clostridium propionicum* es bastante diferente a la de *E. Coli*, puede ser muy difícil expresar de forma normal la propionil-CoA transferasa. Por lo tanto, para sintetizar PLA y copolímeros de PLA de forma más eficiente que en los sistemas convencionales, es muy importante introducir la propionil-CoA transferasa, de manera que proporcione lactil-CoA poco a poco y que se exprese de forma suficiente sin inhibir de forma importante el crecimiento celular.

- 45 En Selmert y otros "Gen pct de la propionato CoA-transferasa y gen *lcdB* parcial de la sub-unidad beta de la lactoil-CoA dehidratasa de *Clostridium propionicum*" Base de datos Genbank [En línea] NCBI, de 12 de febrero de 2002, se ofrece la secuencia del identificador de secuencia nº: 3 depositado con el nº de acceso AJ276553.

WO 2008/062995 A1 también hace referencia a dicha secuencia en el ejemplo 1.

Por consiguiente, el PLA o copolímero de PLA de la presente invención puede ser polilactato, poli(hidroxiacanoato-co-3-lactato), poli(hidroxiacanoato-co-hidroxiacanoato-co-lactato), poli(hidroxiacanoato-co-hidroxiacanoato-co-poli(hidroxiacanoato-co-lactato) y así sucesivamente, sin quedar la presente invención limitada a los mismos.

5 Por ejemplo, el copolímero PLA puede ser poli(4-hidroxiacetato-co-lactato), poli(4-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato-co-lactato), poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato-co-lactato), poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato-co-lactato), poli(3-hidroxiacanoato de cadena media (MCL)-co-lactato), poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato MCL-co-lactato), poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato-co-lactato), poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato-co-lactato), poli(3-hidroxiacetato-co-lactato) y así sucesivamente, sin quedar la presente invención limitada a los mismos.

10 En la presente invención, el término vector se refiere a un constructo de ADN que contiene una secuencia de ADN unida operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de expresar el ADN en el huésped adecuado. El vector puede ser un plásmido, una partícula fago, o un inserto de genoma simplemente latente. Cuando el vector es transformado en el huésped adecuado, es capaz de replicarse o funcionar de forma independiente del genoma del huésped o, en algunos casos, integrándose en el genoma. Dado que en la actualidad los plásmidos son el tipo más habitual de vector, en la presente invención los términos plásmido y vector pueden en ocasiones utilizarse de forma intercambiable. Sin embargo, la presente invención incluye otros tipos de vectores conocidos por los expertos en la técnica o aquellos con funciones equivalentes.

15 El término "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ADN que es esencial para la expresión de una secuencia de codificación unida operativamente en un huésped específico. La secuencia de control incluye un promotor necesario para la transcripción, una secuencia de operador arbitraria para el control de la transcripción, una secuencia para codificar un sitio de unión a ribosomas (RBS) del ARNm, y una secuencia para controlar la finalización de la transcripción y la traducción. Por ejemplo, una secuencia de control adecuada para procariontes incluye un promotor, una secuencia de operador aleatoria y un RBS. Una secuencia de control adecuada para las células eucariotas incluye un promotor, una señal de poliadenilación y un potenciador. El factor más importante que afecta la cantidad de expresión de un gen en un plásmido es el promotor. Como promotores de elevada expresión pueden utilizarse el promotor SR α o el promotor de citomegalovirus.

20 Para expresar una secuencia de ADN de la presente invención, puede utilizarse en el vector cualquiera de las diversas secuencias de control de la expresión. La secuencia de control de la expresión puede ser, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos de SV40 o adenovirus, el sistema lac, el sistema trp, el sistema tac, el sistema trc, los promotores T3 y T7, las regiones promotoras y operadoras principales del fago λ , la región de control de la proteína código fd, los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas de la glicolisis, los promotores de la fosfatasa, por ejemplo, Pho5, sistemas de acoplamiento α de las levaduras, otras secuencias con diferentes configuraciones o derivaciones que se conoce que controlan la expresión de las células procariontes, eucariotas o virus, y diversas combinaciones de las mismas.

30 Cuando un ácido nucleico se dispone en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico, se une operativamente a la secuencia de ácido nucleico. Una molécula adecuada (por ejemplo, una proteína de activación de la transcripción) puede ser un gen y una o varias secuencias de control unidos de manera que permiten la expresión del gen cuando se acopla con la o las secuencias de control. Por ejemplo, el ADN de una pre-secuencia o de un líder de la secreción se une operativamente al ADN de un polipéptido cuando se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une operativamente a una secuencia de codificación cuando afecta la transcripción de la secuencia de codificación; un RBS se une operativamente a una secuencia de codificación cuando afecta la transcripción de la secuencia de codificación; o un RBS se une operativamente a la secuencia de codificación cuando se dispone de manera que facilita la traducción. En general, el término "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN unidas son contiguas y en el caso de los líderes de la secreción, contiguas y en un marco de lectura. Sin embargo, un potenciador no tiene por qué estar en contacto con una secuencia de codificación. La unión de las secuencias puede realizarse mediante ligadura en un sitio de enzima de restricción adecuado. Sin embargo, cuando no existe sitio de enzima de restricción adecuado, puede utilizarse un oligonucleótido sintético adaptador o enlazador, según métodos ordinarios.

35 En la presente invención, el término "vector de expresión" se refiere a un portador recombinante en el cual se insertan fragmentos de ADN heterólogo, siendo generalmente el fragmento de ADN un fragmento de ADN de doble cadena. En la presente invención, el término ADN heterólogo significa un ADN tipo hetero que no se halla en la célula huésped de forma natural. Una vez se ha incorporado el vector de expresión en la célula huésped, puede replicarse de forma independiente del ADN genómico del huésped para generar varias copias y sus ADN (heterólogos) insertados.

40 Como conocen los expertos en la técnica, para incrementar el nivel de expresión de un gen transfectado en una célula huésped, el gen correspondiente debe unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión que realiza funciones de transcripción y traducción en un huésped de expresión seleccionado. Preferentemente, la secuencia de control de la expresión y el gen están incluidos en un único vector de expresión que comprende tanto

un marcador bacteriano seleccionable y un origen de replicación. Cuando el huésped de expresión es una célula eucariota, el vector de expresión debe incluir además un marcador de expresión útil en el huésped de expresión eucariota.

5 En la presente invención pueden adoptarse como vectores recombinantes, diversos vectores de expresión incluyendo vectores plásmidos, vectores bacteriófagos, vectores cósmidos y cromosomas artificiales de levadura (YAC). Un vector plásmido típico útil para el objeto de la presente invención incluye (a) un origen de replicación que permite una replicación eficiente de manera que la célula huésped incluye varios cientos de vectores plásmido, (b) un gen de resistencia a antibióticos que permite la selección de la célula huésped transformada con el vector plásmido, y (c) un sitio de escisión de enzima de restricción en el cual puede insertarse el fragmento de ADN
10 precedente. Incluso si no existe un sitio de escisión de enzima de restricción adecuado, el vector puede ligarse fácilmente con el ADN precedente mediante métodos ordinarios utilizando un oligonucleótido sintético adaptador o enlazador.

15 Un vector recombinante según la presente invención puede transformarse dentro de una célula huésped adecuada utilizando métodos ordinarios. La célula huésped puede ser una bacteria, levadura, hongo, sin que la invención quede limitada a los mismos. Preferentemente, la célula huésped puede ser una célula procariota, por ejemplo *E. coli*. Como ejemplos de células huésped procariotas adecuadas se pueden incluir *E. coli* cepa JM1 09, *E. coli* cepa DH5a, *E. coli* cepa JM101, *E. coli* K12 cepa 294, *E. coli* cepa W3110, *E. coli* cepa X1776, *E. coli* XL-1Blue(Stratagene), *E. coli* B, etc. Sin embargo, también pueden utilizarse otras cepas de *E. coli* como FMB101, NM522, NM538 y NM539, y otras especies y géneros procariotas. Además de los *E. coli* anteriormente descritos
20 también pueden utilizarse como células huésped cepas de *Agrobacterium sp.* tales como *Agrobacterium A4*, bacilos tales como *Bacillus subtilis*, otras enterobacterias como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcescens*, y varias cepas de *Pseudomonas sp.* Sin embargo, la presente invención no queda limitada por los ejemplos anteriormente descritos.

25 También puede conseguirse fácilmente la transformación de una célula eucariota utilizando el método del cloruro de calcio descrito en la sección 1.82 del libro de Sambrook y otros citado anteriormente. Alternativamente, puede emplearse la electroporación para transformar estas células (Neumann y otros, EMBO J., 1:841(1982)).

30 Para preparar una planta que contenga un gen de un enzima convertir y un gen de una sintasa según la presente invención, puede realizarse la transfección de la planta mediante métodos ordinarios utilizando *Agrobacterium*, un vector viral, etc. Por ejemplo, un microbio *Agrobacterium sp.* es transformado con un vector recombinante que contiene el gen según la presente invención, y el microbio *Agrobacterium sp.* transformado puede infectar tejidos de la planta diana, obteniéndose de este modo una planta transfectada. De forma más específica, la preparación de plantas transfectadas puede incluir (a) pre-cultivar un explante de una planta diana y co-cultivar el explante con el *Agrobacterium* transformado para transfectar el explante; (b) cultivar el explante transfectado en un medio inductor de callos para obtener un callo; y (c) cortar y cultivar el callo obtenido en un medio inductor de brotes para obtener
35 un brote.

En la presente invención, el término "explante" se refiere a un fragmento de tejido separado de una planta e incluye un cotiledón o un hipocotilo. El cotiledón o el hipocotilo pueden utilizarse como explantes de una planta utilizada para el método de la presente invención. Se utiliza preferentemente el cotiledón que se obtiene desinfectando y limpiando una semilla de una planta y germinándola en medio de Murashige y Skoog (MS).

40 En la presente invención, las plantas diana a transfectar pueden ser plantas de tabacos, tomates, pimientos rojos, judías, arroz, maíces etc. pero la presente invención no queda limitada a las mismas. También es conocido por los expertos en la técnica que incluso si una planta utilizada para la transformación es reproducible sexualmente, puede reproducirse asexualmente mediante cultivo celular etc.

Efectos ventajosos

45 Tal como se ha explicado anteriormente, es difícil expresar de forma convencional la propionil-CoA transferasa en *E. coli*, impidiendo de este modo el suministro eficiente de lactil-CoA. Sin embargo, según la presente invención, se introduce un mutante de la propionil-CoA transferasa de *Clostridium propionicum* dentro de *E. coli* recombinante para facilitar el suministro de lactil-CoA, preparándose de este modo polilactatos (PLA) y copolímeros de polilactato con elevada eficiencia.

50 Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de una vía de síntesis intracelular del copolímero lactato (poli(3HB-co-lactato)) utilizando glucosa, 3HB y lactato.

La Figura 2 es un diagrama esquemático de un proceso de preparación de un vector de expresión recombinante que contiene el gen de la polihidroxialcanoato (PHA) sintasa de *Pseudomonas* sp. 6-19, y un mutante del gen de la propionil-CoA transferasa de *Clostridium propionicum*, según un ejemplo de la presente invención.

Modo de la invención

- 5 A partir de ahora, se describirá en detalle la presente invención mediante ejemplos. Es obvio para los expertos en la técnica que los ejemplos se aportan solamente para explicar la presente invención en detalle, no quedando la misma limitada a los ejemplos.

10 Según una invención previa de los inventores, dada a conocer en la solicitud de patente coreana nº 10-2006-0116234, para obtener lactil-CoA, que es un monómero necesario para la síntesis de polilactatos (PLA) y copolímeros de PLA, se construyó un sistema de expresión constante tipo operón en el cual se expresan conjuntamente la propionil-CoA transferasa de *Clostridium propionicum* (CP-PCT) y la polihidroxialcanoato (PHA) sintasa, que ahora se describirá con mayor detalle.

Ejemplo 1-1: Clonación del gen de la PHA sintasa de *Pseudomonas* sp. 6-19 y preparación de un vector de expresión.

15 Para la PHA sintasa (gen (phaC1_{Ps6-19}) de *Pseudomonas* sp. 6-19 (KCTC 11027BP) utilizada en la presente invención, se extrajo el ADN total de *Pseudomonas* sp. 6-19, se prepararon los cebadores con los Identificadores de secuencia nº 5 y 6 sobre la base de la secuencia del gen phaC1_{Ps6-19} (Tesis de máster de Ae-jin Song, Departamento de ingeniería química y biomolecular, KAIST, 2004), y se realizó una reacción en cadena de la polimerasa obteniéndose el gen phaC1_{Ps6-19}.

20 Identificador de secuencia nº 5: 5'-GAG AGA CAA TCA AAT CAT GAG TAA CAA GAG TAA CG-3'

Identificador de secuencia nº 6: 5'-CAC TCA TGC AAG CGT CAC CGT TCG TGC ACG TAC-3'

El resultado de la electroforesis en gel de Agarosa del producto de la PCR, confirmó un fragmento génico de 1,7 kbp. correspondiente al gen phaC1_{Ps6-19}.

25 Se cortó un fragmento de ADN que contenía el operón productor de PHB de *Ralstonia eutropha* H16 con BamHI/EcoRI a partir del vector pSYL105 (Lee y otros, *Biotech. Bioeng.*, 1994, 44:1337-1347), y se insertó en el sitio de reconocimiento BamHI/EcoRI de pBluescript II (Stratagene), preparándose de este modo un vector recombinante pReCAB.

30 Es sabido que el vector pReCAB en el cual se expresan de forma constante la PHA sintasa (phaC_{RE}) y enzimas suministradoras de monómeros (phaA_{RE} y phaB_{RE}), también funciona de forma efectiva en *E. Coli* (Lee y otros *Biotech. Bioeng.*, 1994, 44:1337-1347). Se cortó el vector pReCAB con BstBI/SbfI para eliminar la PHA sintasa (phaC_{RE}) de *R. eutropha* H16 y se insertó el gen phaC1_{Ps6-19} en un sitio de reconocimiento de BstBI/SbfI, preparándose de este modo el vector recombinante pPs619C1-ReAB.

35 Para producir un fragmento génico de la sintasa phaC1_{Ps6-19} que posea solamente un sitio de reconocimiento BstBI/SbfI en uno de los extremos, se eliminó un sitio BstBI endógeno utilizando la mutagénesis dirigida (SDM) sin cambios en los aminoácidos, y se realizó una PCR de superposición utilizando los cebadores de los identificadores de secuencia nº 7 y 8, los identificadores de secuencia nº 9 y 10, y los identificadores de secuencia nº 11 y 12 para añadir el sitio de reconocimiento BstBI/SbfI.

Identificador de secuencia nº 7: 5'- ATG CCC GGA GCC GGTTCGAA-3' SEQ ID NO: 8: 5'- CGT TAC TCT TGT TAC TCA TGA TTT GAT TGT CTC TC -3'

40 Identificador de secuencia nº 8: 5'- GAG AGA CAA TCA AAT CAT GAG TAA CAA GAG TAA CG -3'

Identificador de secuencia nº 9: 5'- GAG AGA CAA TCA AAT CAT GAG TAA CAA GAG TAA CG -3'

Identificador de secuencia nº 10: 5'- CAC TCA TGC AAG CGT CAC CGT TCG TGC ACG TAC -3'

Identificador de secuencia nº 11: 5'- GTA CGT GCA CGA ACG GTG ACG CTT GCA TGA GTG -3'

Identificador de secuencia nº 12: 5'- AAC GGG AGG GAA CCT GCA GG -3'

Se confirmó la secuencia de bases del gen phaC1_{Ps6-19} del vector recombinante preparado pPs619CI-ReAB mediante secuenciación y se representó por el Identificador de secuencia nº 13, y la secuencia de aminoácidos codificada se representó por el identificador de secuencias nº 14.

5 Los resultados del análisis de similitud de secuencias génicas mostraron que el gen phaC1_{Ps6-19} posee una homología del 84% con el gen phaCI de Pseudomonas sp. Cepa 61-3 (Matsusaki y otros., J. Bacteriol., 180:6459, 1998) y una homología en la secuencia de aminoácidos del 88,9%. Por lo tanto, se confirmó que las dos sintasas eran enzimas muy similares. Como resultado, se confirmó que la sintasa phaC1_{Ps6-19} obtenida según la presente invención es una sintasa PHA tipo II.

Ejemplo 1-2: Preparación de un mutante específico de sustrato de la PHA sintasa de Pseudomonas sp. 6-19

10 Entre diversos tipos de PHA sintasa, se conoce la PHA sintasa tipo II como una sintasa de PHA de cadena media (MCL-PHA) que polimeriza sustratos con relativamente muchos átomos de carbono, esperándose que la MCL-PHA sea aplicable para polimerizar de copolímeros de PLA. Aunque la phaCI sintasa de Pseudomonas aeruginosa sp. Sp 61-3, que posee un grado de homología elevado con la sintasa phaC1_{Ps6-19} obtenida según la presente invención, es la sintasa tipo II, se ha notificado que la phaCI sintasa posee un abanico de especificidad de sustrato
 15 relativamente amplio (Matsusaki y otros, J. Bacteriol, 180:6459, 1998), habiéndose notificado los resultados de las investigaciones sobre un mutante adecuado para la producción de PHA de cadena corta (SCL-PHA) (Takase y otros Biomacromolecules, 5:480, 2004). En base a lo anterior, los presentes inventores ha hallado cuatro sitios de aminoácido que afectan la activación de SCL mediante análisis de configuración de secuencias de aminoácidos, y han preparado mutantes de la sintasa phaC1_{Ps6-19} mediante un método SDM utilizando los cebadores los
 20 identificadores de secuencia nº 15 a 20, tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Vector recombinante	Sustitución de ácido nucleico	Sustitución de aminoácido	Cebador
pPs619C1200-ReAB	AGC → ACC	S325T	Identificadores de secuencia nº: 15/16
	CAG → ATG	Q481M	Identificadores de secuencia nº: 17/18
pPs619C1300-ReAB	GAA → GAT	E130D	Identificadores de secuencia nº: 19/20
	AGC → ACC	S325T	Identificadores de secuencia nº: 15/16
	CAG → ATG	Q481M	Identificadores de secuencia nº: 17/18

Identificador de secuencia nº: 15: 5'- CTG ACC TTG CTG GTG ACC GTG CTT GAT ACC
 ACC -3'

25

Identificador de secuencia nº: 16: 5¹- GGT GGT ATC AAG CAC GGT CAC CAG CAA GGT
 CAG -3'

Identificador de secuencia nº: 17: 5'- CGA GCA GCG GGC ATA TC A TGA GCA TCC TGA
 ACC CGC -3'

30

Identificador de secuencia nº: 18: 5'- GCG GGT TCA GGA TGC TCA TGA TAT GCC CGC

TGC TCG -3'

Identificador de secuencia nº: 19: 5'- ATC AAC CTC ATG ACC GAT GCG ATG GCG CCG

ACC -3'

Identificador de secuencia nº: 20: 5'- GGT CGG CGC CAT CGC ATC GGT CAT GAG GTT

5 GAT -3'

Ejemplo 1-3: Preparación y cribado de una biblioteca de un mutante de la propionil-CoA transferasa de Clostridium propionicum

10 En el presente ejemplo, para obtener lactil-CoA que es un monómero necesario para la síntesis de PLA y copolímeros de PLA, se utilizó la propionil-CoA transferasa de Clostridium propionicum (CP-PCT), representándose su secuencia por el Identificador de secuencia nº 3. Se utilizó como CP-PCT un fragmento obtenido mediante la realización de una PCR sobre el ADN cromosómico de Clostridium propionicum utilizando los cebadores con los identificadores de secuencia nº 21 y 22. En este caso se eliminó un sitio NdeI existente en el CP-PCT salvaje utilizando SDM para facilitar la clonación.

Identificador de secuencia nº: 21: 5'- GGA ATT CAT GAG AAA GGT TCC CAT TAT TAC CGC AGA TGA -3'

15 Identificador de secuencia nº: 5'- GC TCT AGA TTA GGA CTT CAT TTC CTT CAG ACC CAT TAA GCC TTC TG -3'

También se realizó una PCR de superposición utilizando cebadores con los Identificadores de secuencia nº 23 y 24 para añadir un sitio de reconocimiento SbfI/NdeI.

Identificador de secuencia nº: 23: 5'- agg cct gca ggc gga taa caa ttt cac aca gg -3'

Identificador de secuencia nº: 24: 5'- gcc cat atg tct aga tta gga ctt cat ttc c -3'

20 Se cortó un vector pPs619C1300-ReAB que contenía phaC1_{ps6-19}300, que es un mutante SCL de la sintasa phaC1_{ps6-19}, con SbfI/NdeI para eliminar los enzimas suministradores de monómeros (phaA_{RE} y phaB_{RE}) de R. eutropha H16, y se insertó el gen CP-PCT clonado mediante PCR en el sitio de reconocimiento SbfI/NdeI, preparándose de este modo un vector recombinante pPs619C1300-CPPCT.

25 **Ejemplo 2: Preparación y cribado de una biblioteca de un mutante de la propionil-CoA transferasa de Clostridium propionicum**

30 Como es sabido, cuando la CP-PCT se expresa a niveles elevados en E. coli, provoca alteraciones metabólicas graves y muestra toxicidad. En general, las E. coli recombinantes murieron cuando se añadió un inductor en un sistema de producción de la proteína inducible por isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG) utilizando un promotor tac o un promotor T7, sistema utilizado ampliamente para expresar proteínas recombinantes. Por esta razón, la síntesis de PLA y copolímeros de PLA se realizó utilizando un sistema de expresión constitutivo que expresa genes de forma débil pero continua con el crecimiento de los organismos. Para introducir una mutación aleatoria dentro de CP-PCT, se utilizó como molde pPs619C1300-CPPCT dado a conocer en la Solicitud de patente coreana nº 10-2006-0116234, se realizó una PCR tendente a error utilizando los cebadores con los identificadores de secuencia nº 1 y 2 bajo condiciones de adición de Mn²⁺ y la diferencia de concentración entre dNTPs (ver Figura 2).

35 Identificador de secuencia nº 1: 5'- cgc egg cag gcc tgc agg -3'

Identificador de secuencia nº 2: 5'- ggc agg tea gcc cat atg tc -3'

40 A continuación, para amplificar un fragmento de PCR que incluía una mutación aleatoria, se realizó una PCR bajo condiciones habituales utilizando los identificadores de secuencia nº 1 y 2. Se cortó con SbfI/NdeI un vector PPS619C1300-CPPCT que contenía phaC1_{ps6-19}300 que es un mutante SCL de la sintasa phaC1_{ps6-19} para eliminar la CP-PCT salvaje, y el fragmento de PCR mutante amplificado se insertó en el sitio de reconocimiento SbfI/NdeI produciendo una mezcla de ligadura. La mezcla de ligadura se introdujo en E. coli JN1 09, preparando de este modo una biblioteca CP-PCT de una dimensión de aproximadamente ~10⁵ (ver figura 2). La biblioteca CP-PCT preparada se cultivó durante 3 días en un medio de detección de polímeros (Agar Luria Bertani (LB), glucosa 20 g/L, 3HB 1g/L, Rojo Nilo 0,5µg/ml) y se cribó para confirmar si se habían generado polímeros, seleccionándose de este modo aproximadamente 80 candidatos. Los candidatos se cultivaron durante 4 días en un medio líquido (agar LB, glucosa 20 g/L, 3HB 1g/L, ampicilina 100 mg/l 37°C) bajo condiciones generadoras de polímeros y se analizaron

5 utilizando la técnica de clasificación de células por fluorescencia (FACS), seleccionándose de este modo dos muestras. También se recuperó de *E. coli* un vector de expresión recombinante que contenía el mutante y se introdujo de nuevo en *E. coli* JM 109 para confirmar la producción del polímero. De este modo, se confirmó que el *E. coli* transformado con un vector que contiene un mutante de CP-PCT muestra un rendimiento mejor que el que posee la CP-PCT salvaje.

Ejemplo 3: Preparación de un copolímero PLA utilizando un mutante de la propionil-CoA transferasa de *Clostridium propionicum*.

10 Para analizar de forma cuantitativa la activación de los mutantes finalmente seleccionados en el ejemplo 2, se cultivó *E. coli* JMI 09 transformada con el vector de expresión que contenía los mutantes tal como se muestra en la Figura 2 durante 4 días a una temperatura de 37 °C en un frasco de cultivo con medio LB que contenía glucosa (20 g/l) y 3HB (2 g/l). El pellet de células cultivadas se recuperó mediante centrifugación y se secó durante 24 horas en un secador a una temperatura de 100 °C. A continuación, se realizó una cromatografía de gases para estimar el contenido en polímeros sintetizados en las células tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

Nombre de la cepa	Contenido en PLA (% peso/peso)	Contenido en PHB (% peso/peso)
pPs619C1300-CPPCT/JM109	0,86%	5,85%
Mutante CP-PCT 512/JM109	2,19%	12,82%
Mutante CP-PCT 522/JM109	7,49%	35,59%

15 Como resultado de la cromatografía de gases, puede observarse que el vector de expresión recombinante que contiene el mutante de CP-PCT preparado según la presente invención presentaba una actividad de síntesis de copolímero-PLA entre aproximadamente dos y ocho veces superior a la del vector pPs619C1300-CPPCT que contiene la CP-PCT salvaje. Ello es debido a que el mutante de la CP-PCT suministra monómeros para la síntesis del polímero (es decir, lactil-CoA y 3HB-CoA) de forma más eficiente que la CP-PCT salvaje.

20 Para dilucidar las posiciones mutadas de los mutantes CP-PCT preparados, se realizó la secuenciación génica de los mutantes CP-PCT, mostrándose los resultados en la tabla 3.

Tabla 3

Vector recombinante	Sustitución de ácido nucleico
Mutante CP-PCT 512	A1200G
Mutante CP-PCT 522	T78C, T669C, A1125G, T1158C*

*indicado en la reivindicación 1

25 Como resultado de la secuenciación de los mutantes de CP-PCT, se observó una sustitución de un ácido nucleico en el mutante 512, y cuatro sustituciones de ácidos nucleicos en el mutante 522. Sin embargo, se confirmó que todas las sustituciones de ácidos nucleicos eran mutaciones silentes que no provocaban ninguna sustitución de aminoácidos. Es decir, se asume que la mejoría en la capacidad de suministro de monómeros de los mutantes de CP-PCT preparados según la presente invención es debida no a un incremento de la actividad por sustitución de aminoácidos en el enzima si no a variaciones en la expresión del enzima en *E. coli*. Por ello, se analizó, tal como se muestra en la tabla 4, la utilización de codones de las secuencias génicas de la CP-PCT salvaje y de los mutantes de la CP-PCT preparados según la presente invención en *E. coli* típicos

Tabla 4

	78	669	1125	1158	1200
CP-PCT salvaje	GGT (Gly) 24,7	GGT (Gly) 24,7	AAA (Lys) 33,6	CGT (Arg) 20,9	ACA (Thr) 7,1
CP-PCT mutante 512	GGT (Gly) 24,7	GGT (Gly) 24,7	AAA (Lys) 33,6	CGT (Arg) 20,9	ACG (Thr) 14,4
CP-PCT mutante 522	GGC (Gly) 29,6	GGT (Gly) 29,6	AAA (Lys) 10,3	CGT (Arg) 22,0	ACA (Thr) 7,1

5 Tal como se muestra en la tabla 4, las sustituciones de ácidos nucleicos excepto A1125G presente en el mutante 522 eran ventajosas para la utilización de codones en E. coli. Es decir, debido a que la sustitución de ácidos nucleicos es ventajosa para la utilización de codones en E. coli, los mutantes de la CP-PCT preparados según la presente invención incrementaron la expresión de un enzima activado y por lo tanto mostraron una capacidad de suministro de monómeros superior, necesaria para la producción de copolímeros de PLA.

Ejemplo 4: Preparación de un copolímero de PLA utilizando un mutante de la propionil-CoA transferasa de Clostridium propionicum

10 Se realizó una mutagénesis aleatoria sobre los mutantes finalmente seleccionados en el Ejemplo 2 (512 y 522), del mismo modo descrito en el Ejemplo 2, obteniéndose de este modo los siguiente mutantes de CP-PCT 531-537 y 540.

15 Para realizar un análisis cuantitativo de los mutantes de CP-PCT, se cultivó E. coli JM 109 transformada con los vectores de expresión que contienen los mutantes de CP-PCT 531-537 y 540 durante 4 días a una temperatura de 30°C en un frasco con de medio rojo metilo (MR) rico en P que contenía glucosa (20 g/l) y 3HB (2 g/l). Se recuperó el pellet de células cultivadas mediante centrifugación t se secó durante 24 horas en un secador mantenido a una temperatura de 100°C. A continuación, se realizó una cromatografía de gases para estimar el contenido de polímeros sintetizados en las células. Los resultados de la secuenciación génica referentes a los mutantes CP-PCT para elucidar loas posiciones mutadas de los mismos se muestran en la tabla 5, y el contenido de polímeros sintetizados en las células se muestra en la tabla 6.

20 En el experimento anteriormente descrito, el MR enriquecido en P contenía 22g de KH₂PO₄; 3g de (NH₄)₂HPO₄; 0,8g de citrato; 0,7g de MgSO₄.7H₂O; y 5 mL de solución de metales traza por litro, y la solución de metales traza contenía 10 g de FeSO₄7H₂O; 2,25g de ZnSO₄7H₂O; 1 g de CuSO₄,5H₂O; 0,5g de MnSO₄,5H₂O; 2g de CaCl₂,2H₂O; 0,23g de Na₂B₄O₇H₂O; 0,1 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄; y 10 mL de HCl al 35 % por litro.

Tabla 5

	Mutaciones	Mutaciones silentes
CpPct512		A1200G
CpPct522		T78C, T669C, A1125G, T1158C*
CpPct531	Gly335Asp	A1200G
CpPct532	Ala243Thr	A1200G
CpPct533	Asp65Gly	T669C, A1125G, T1158C*
CpPct534	Asp257Asn	A1200G
CpPct535	Asp65Asn	T669C, A1125G, T1158C*
CpPct537	Thr199Ile	T669C, A1125G, T1158C*
CpPct540	Val193Ala	T78C, T669C, A1125G, T1158C*

*indicado en la reivindicación 1

Tabla 6

Nombre	Contenido en polímeros (%)	%mol Lac	%mol 3HB
PCT (control salvaje)	24,9	38,0	62,0
531	26,5	56,5	43,5
532	23,5	54,5	45,5
533	25,2	63,8	36,2
534	23,9	58,0	42,0
535	30,7	59,2	40,8
537	33,3	52,4	47,6
540	23,7	21,3	78,7

- 5 Tal como se muestra en la tabla 6, los mutantes de CP-PCT preparados según la presente invención incrementar de forma remarcable el porcentaje de moles de lactato en comparación con la CP-PCT salvaje. También se confirmó que los vectores de expresión recombinante que contenían los mutantes 531, 533, 535 y 537 mostraban una actividad de síntesis de copolímeros-PLA mejor que la del vector que contenía la CP-PCT salvaje

<110> LG CHEM, LTD.

- 10 <120> Mutante de la propionil CoA transferasa de Clostridium propionicum y método de preparación de PLA o copolímeros de PLA utilizando el mismo

<130> 2008-0083PC(X08026)

<150> KR10-2007-0081855

<151> 2007-08-14
 <160> 24
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 5 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 1
 cgccggcagg cctgcagg 18
 <210> 1
 <211> 18
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 ggcaggtcag cccatattgc 20
 20 <210> 3
 <211> 1572
 <212> ADN
 <213> Propionil CoA transferasa de Clostridium propionicum
 <400> 3
 atgagaaagg ttcccattat taccgcagat gaggtctcaa agcttattaa agacggatgat 60
 acagttacaa caagtgggtt cgttggaaat gcaatccctg aggtctttga tagagctgta 120
 gaaaaaagat tcttagaaac aggcgaacc aaaaacatta cctatgttta ttgtggttct 180
 caaggtaaaca gagacggaag aggtgctgag cactttgctc atgaaggcct tttaaaacgt 240
 tacatcctg gtcactgggc tacagttcct gctttgggta aaatggctat ggaatatasa 300
 atggaagcat ataatgtatc tcagggtgca ttgtgtcatt tgttccgtga tatagcttct 360
 cataagccag gcgtatttac aaaggtaggt atcggctact tcattgacc cagaaatggc 420
 25 ggcggtaaag taaatgatat taccaaagaa gatattgttg aattggtaga gattaagggc 480

ES 2 440 745 T3

```

caggaatatt tatlctaccc tgcctttcct atccatgtag ctcttattcg tggtaacttac      540
gctgatgaaa gcggaaatat cacatctgag aaagaagtgg ctccctctga aggsaactca      600
gtatgccagg ctgttaaaaa cagtggcggg atcgttgtag ttcaggttga aagagtagta      660
aaagctggta ctcttgaccg tcgtcatgta aaagttccag gaatttatgt tgaactatgt      720
gttgttgcg acccagaaga tcctcagcaa tctttagatt gtgaatatga tcctgcatta      780
tcaggcgagc atagaagacc tgaagttggt ggagaaccac ttcccttgag tgcaaagaaa      840
gttattgggc gtcgtgggtc cattgaatta gaaaagatg ttgctgtaaa tttaggtgtt      900
ggtgcgectg aatatgtagc aagtgttgcg gatgagaag gtatcgttga ttttatgact      960
ttaactgctg aaagtgggcg tattgggtgt gttcctgctg gtggcgctcg ctttgggtct     1020
tcttataatg cggatgcatt gatcgatcaa ggttatcaat tcgattacta tgatggcggc     1080
ggcttagacc tttgctatct aggcctagct gaatgcgat aaaaaggcaa tatcaacgct     1140
tcaagatttg gccctcgtat cgcctggtgt ggtggtttca tcaacattac acagaataca     1200
cctaaggat tcttctgtgg tactttcaca gcaggtggct taaaggtaa aattgaagat     1260
ggcaagggta ttattgttca agaaggcaag cagaaaaaat tcttgaaagc tgttgagcag     1320
attacattca atggtgacgt tgcacttgcg aataagcaac aagtaactta tattacagaa     1380
agatcgtat tccttttgaa ggaagatggt ttgcaotiat ctgaaattgc acctggtatt     1440
gatttcgaga cacagattct tgacgttatg gattttgcac ctattattga cagagatgca     1500
aacggccaaa tcaaatgat ggacgctgct ttgtttgcag aaggcttaat gggctcgaag     1560
gaaatgaagt cc

```

<210> 4

<211> 1677

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen de la PHA sintasa

<400> 4

```

atgagtaaca agagtaacga tgagtgaaag tatcsagcct ctgaaaacac cttggggcct      60
aatcctgtcg ttggcctgcg tggaaaggat ctactggcct ctgctcgaat ggtgcttagg     120
caggccatca agcaaccggg gcacagcgtc aaacatgtcg cgcactttgg tcttgaactc     180
aagaacgtac tgctgggtaa atcggggtg caaccgacca gcgatgaccg tcgcttegcc     240
gatccggcct ggagccagaa cccgctctat aaacgttatt tgcaaaccta cctggcgtgg     300
cgcaaggaac tccscgactg gatcgatgaa agtaacctcg cccccaagga tgtggcgcgt     360

```

ES 2 440 745 T3

gggcacttcg tgatcaacct catgaccgat gcgatggcgc cgaccaacac cgcggccaac 420
 cggcgccag tcaaacgctt ttttgaacc ggtggcaaaa gcctgctcga cggcctctcg 480
 cacctggcca aggatctggt acacaacggc ggcattgccg gccaggtaa catgggtgca 540
 ttcgaggteg gcaagagcct gggcgtgacc gaaggcggg tgggttttcg caacgatgtg 600
 ctggaactga tccagtaaca gccgaccacc gagcaggtat acgaacgcc gctgctggtg 660
 gtgcgcgcgc agatcaacaa gttctacggt ttcgacctga gcccgacaa gagcctggcg 720
 cggttctgcc tgcgaacaa cgtgcaaacg ttcctcgtca gctggcgaaa tcccaccaag 780
 gaacagcgag agtggggcct gtcgacctac atcgaagccc tcaaggaagc ggttgacgtc 840
 gttaccgoga tcaccggcag caaagacgtg aacatgctcg gggcctgctc cggcggcacc 900
 acttgcactg cgtctgctgg ccattacgcg gcgattggcg aaaacaaggt caacgcctg 960
 acctgctgg tgaccgtgct tgataccacc ctgcacagcg acgtcgccct gttcgtcaat 1020
 gaacagcccc ttgaagccgc caagcgcacc tctgaccagg ccggcgtact ggaagggcgc 1080
 gacatggcga aggtcttcgc ctggatgccc cccaacgata tgatctggaa ctactgggtc 1140
 aacaattacc tgctaggcaa cgaaccgccc gtgttcgaca tctgttctg gaacaacgac 1200
 accacacggt tgcgcggcgc gttccacggc gacctgatcg aactgttcaa aaataaccca 1260
 ctgattcgc cgaatgcact ggaagtgtgc ggcaccccc taacctcaa gcaggtgacg 1320
 gccgacatct tttccctggc cggcaccac gaccacatca ccccgtggaa gtctgctac 1380
 aagtcggcgc aactgtttgg cggcaacggt gaattcgtgc tctcgagcag cgggcataac 1440
 atgagcatcc tgaaccgcc gggcaatccg aatcgcgct acatgaccag caccgaagtg 1500
 gccgaaaatg ccgatgaatg gcaagcgaat gccaccaagc atacagattc ctggtggctg 1560
 cactggcagc cctggcaggc ccaacgctcg ggcgagctga aaaagtcgcc gacaaaactg 1620
 ggcagcaagg cgtatccggc aggtgaagc gcgcacggca cgtacgtgca cgaacgg 1677

<210> 5

<211> 35

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5

gagagacaat caaatcatga gtaacaagag taacg

35

10 <210> 6

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 6

ES 2 440 745 T3

	<code>cactcatgca agcgtcaccg ttcgtgcaag tac</code>	33
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 7	
	<code>atgcccggag ccggttcgaa</code>	20
10	<210> 8	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 8	
	<code>cgttactctt gttactcatg atttgattgt ctctc</code>	35
	<210> 9	
	<211> 35	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 9	
25	<code>gagagacaat caaatcatga gtaacaagag taacg</code>	35
	<210> 10	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador	

ES 2 440 745 T3

<400> 10

cactcatgca agcgtcaccg ttcgtgcaag tac

33

<210> 11

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 11

10 gtacgtgac gaacggtgac gcttgcataa gtg

33

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador

<400> 12

aacgggaggg aacctgcagg

20

<210> 13

20 <211> 1677

<212> ADN

<213> Pseudomonas sp. 6-19 (KCTC 11027BP)

<400> 13

ES 2 440 745 T3

```

atgagtaaca agagtaacga tgagttgaag tatcaagcct ctgaaaacac cttggggcct      60
aatcctgtcg ttgggctgcg tggaaaggat ctactggcct ctgctcgaat ggtgcttagg      120
caggccatca agcaaccggg gcacagcgtc aaacatgtcg cgcactttgg tcttgaactc      180
aagaacgtac tgctgggtaa atccgggctg caaccgacca gcgatgaccg tgccttgcgc      240
gatccggcct ggagccagaa cccgctctat aaacgttatt tgcaaaccta cctggcgtgg      300
cgcaaggaac tccacgactg gatcgatgaa agtaacctcg cccccaagga tgtggcgcgt      360
gggcacttgc tgatcaacct catgaccgaa gcgatggcgc cgaccaacac cgcggccaac      420
cggcggcag tcaaacgctt ttttgaacc ggtggcaaaa gcctgctcga cggcctctcg      480
cacctggcca aggatctggt acacaaccgc ggcctgccga gccaggtcaa catgggtgca      540
ttcgaggctc gcaagagcct gggcgtgacc gaaggcgcgg tgggtgttctg caacgatgtg      600
ctggaactga tccagtacaa gccgaccacc gagcaggtat acgaacgcc cctgctggtg      660
gtgcgcgcgc agatcaacaa gttctacgtt ttcgacctga gcccgacaa gagcctggcg      720
cggttctgcc tgcgaacaa cgtgcaaacg ttcctcgtca gctggcgaaa tcccaccaag      780
gaacagcgag agtggggcct gtgcacctac atcgaagccc tcaaggaagc ggttgacgtc      840

gttaccgoga tcaccggcag caaagacgtg aacatgctcg gggcctgctc cggcggcacc      900
acttgcactg cgtgctggg ccattacgcg gcgattggcg aaaacaaggt caacgcctg      960
accttgcctg tgagcgtgct tgataccacc ctgcacagcg acgtcgcctt gttcgtcaat      1020
gaacagacc ttgaagccgc caagcgcac tcgtaccagg cggcgtact ggaaggcgc      1080
gacatggcga aggtcttcgc ctggatgcgc cccaacgatc tgatctggaa ctactgggtc      1140
aacaattacc tgctaggcaa cgaaccgccg gtgttcgaca tctgttctg gaacaacgac      1200
accacacggt tgcccgcgcg gttccacggc gacctgatcg aactgttcaa aaataaccca      1260
ctgattgcc cgaatgcact ggaagtgtgc ggcaccccca tcgacctcaa gcaggtgacg      1320
gccgacatct tttcctggc cggcaccac gaccacatca ccccgaggaa gtctgctac      1380
aagtcggcgc aactgtttg cggcaacgtt gaattcgtgc tgcgagcag cgggcatac      1440
cagagcatcc tgaaccgcc gggcaatccg aaatcgcct acatgaccag caccgaagtg      1500
cgggaaatg ccgatgaatg gcaagcgaat gccaccaagc atcagattc ctggtggctg      1560
cactggcagg cctggcagge ccaacgctcg ggcgagctga aaaagtcccc gacaaaactg      1620
ggcagcaagg cgtatccgce aggtgaagcg gcgccaggca cgtacgtgca cgaacgg      1677

```

<210> 14

<211> 559

5 <212> PRT

<213> Pseudomonas sp. 6-19 (KCTC 11027BP)

<400> 14

ES 2 440 745 T3

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

ES 2 440 745 T3

130 135 140
 Lys Arg Phe Phe Glu Thr Gly Gly Lys Ser Leu Leu Asp Gly Leu Ser
 145 150 155 160
 His Leu Ala Lys Asp Leu Val His Asn Gly Gly Met Pro Ser Gln Val
 165 170 175
 Asn Met Gly Ala Phe Glu Val Gly Lys Ser Leu Gly Val Thr Glu Gly
 180 185 190
 Ala Val Val Phe Arg Asn Asp Val Leu Glu Leu Ile Gln Tyr Lys Pro
 195 200 205
 Thr Thr Glu Gln Val Tyr Glu Arg Pro Leu Leu Val Val Pro Pro Gln
 210 215 220
 Ile Asn Lys Phe Tyr Val Phe Asp Leu Ser Pro Asp Lys Ser Leu Ala
 225 230 235
 Arg Phe Cys Leu Arg Asn Asn Val Gln Thr Phe Ile Val Ser Trp Arg
 245 250 255
 Asn Pro Thr Lys Glu Gln Arg Glu Trp Gly Leu Ser Thr Tyr Ile Glu
 260 265
 Ala Leu Lys Glu Ala Val Asp Val Val Thr Ala Ile Thr Gly Ser Lys
 275 280 285
 Asp Val Asn Met Leu Gly Ala Cys Ser Gly Gly Ile Thr Cys Thr Ala
 290 295 300
 Leu Leu Gly His Tyr Ala Ala Ile Gly Glu Asn Lys Val Asn Ala Leu
 305 310 315
 Thr Leu Leu Val Ser Val Leu Asp Thr Thr Leu Asp Ser Asp Val Ala
 325 330 335
 Leu Phe Val Asn Glu Gln Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser Tyr
 340 345 350
 Gln Ala Gly Val Leu Glu Gly Arg Asp Met Ala Lys Val Phe Ala Trp
 355 360 365
 Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr Leu
 370 375 380
 Leu Gly Asn Glu Pro Pro Val Phe Asp Ile Leu Phe Trp Asn Asn Asp
 385 390 395 400
 Thr Thr Arg Leu Pro Ala Ala Phe His Gly Asp Leu Ile Glu Leu Phe
 405 410 415
 Lys Asn Asn Pro Leu Ile Arg Pro Asn Ala Leu Glu Val Cys Gly Thr
 420 425 430
 Pro Ile Asp Leu Lys Gln Val Thr Ala Asp Ile Phe Ser Leu Ala Gly
 435 440 445
 Thr Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Lys Ser Cys Tyr Lys Ser Ala Gln
 450 455 460

 Leu Phe Gly Gly Asn Val Glu Phe Val Leu Ser Ser Ser Gly His Ile
 465 470 475 480
 Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Gly Asn Pro Lys Ser Arg Tyr Met Thr
 485 490 495
 Ser Thr Glu Val Ala Glu Asn Ala Asp Glu Trp Gln Ala Asn Ala Thr
 500 505 510
 Lys His Thr Asp Ser Trp Trp Leu His Trp Gln Ala Trp Gln Ala Gln
 515 520 525
 Arg Ser Gly Glu Leu Lys Lys Ser Pro Thr Lys Leu Gly Ser Lys Ala
 530 535 540
 Tyr Pro Ala Gly Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val His Glu Arg
 545 550 555

<210> 15

ES 2 440 745 T3

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador

<400> 15

ctgaccttgc tggtagccgt gcttgatacc acc

33

<210> 16

<211> 33

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 16

ggtggatca agcacggcca ccagcaaggt cag

33

15

<210> 17

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador

<400> 17

cgagcagcgg gcatatcatg agcatcctga acccgc

36

<210> 18

25 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

30 <400> 18

ES 2 440 745 T3

	<code>gcgggttcag gatgctcatg atatgcccgc tgctcg</code>	36
	<210> 19	
	<211> 33	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 19	
	<code>atcaacctca tgaccgatgc gatggcgccg acc</code>	33
10	<210> 20	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 20	
	<code>ggtcggcgcc atcgcatcgg tcatgaggtt gat</code>	33
	<210> 21	
	<211> 39	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 21	
25	<code>ggaattcatg agaaagggtc ccattattac cgcagatga</code>	39
	<210> 22	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	

ES 2 440 745 T3

<223> Cebador

<400> 22

gctctagatt aggacttcac ttccttcaga cccattaagc ettctg

46

<210> 23

5 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

10 <400> 23

aggcctgcag gcggataaca atttcacaca gg

32

<210> 24

<211> 31

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 24

gcccatatgt ctagattagg acttcatttc c

31

20

REIVINDICACIONES

1. Propionil-CoA transferasa que suministra lactil-CoA, que posee la secuencia génica del identificador de secuencia nº 3, en el que T669C, A1125G y T1158C están mutados,

en la que la propionil-CoA transferasa posee:

- 5 a) la secuencia génica del identificador de secuencia nº 3, en el que T68C, T669C, A1125G y T1158C están mutados,
- b) la secuencia génica del identificador de secuencia nº 3, en el que T669C, A1125G y T1158C están mutados y en la que se introduce al menos una mutación adicional del ácido nucleico para provocar la mutación de Asp65Gly;
- 10 c) la secuencia génica del identificador de secuencia nº 3, en el que T669C, A1125G y T1158C están mutados y en la que se introduce al menos una mutación adicional del ácido nucleico para provocar la mutación de Asp65Asn; o
- 15 d) la secuencia génica del identificador de secuencia nº 3, en el que T669C, A1125G y T1158C están mutados y en la que se introduce al menos una mutación adicional del ácido nucleico para provocar la mutación de Thr199Ile.

2. Gen que codifica un mutante de la propionil-CoA transferasa, según la reivindicación 1.

3. Vector recombinante para sintetizar polilactatos (PLA) o copolímeros de PLA que contiene el gen, según la reivindicación 2.

20 4. Vector recombinante, según la reivindicación 3, que contiene además un gen de la polihidroxialcanoato (PHA) sintasa (phaC1_{PS6-19300}) del identificador de secuencia nº 4, el cual es capaz de sintetizar PLA o copolímeros de PLA utilizando lactil-CoA como sustrato.

5. Bacteria transformada con el vector recombinante según la reivindicación 3 o 4.

6. Procedimiento de preparación de polilactatos (PLA) o copolímeros de PLA, que comprende cultivar o hacer crecer la bacteria, según la reivindicación 5.

25 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, el cultivo o crecimiento se realiza en un ambiente que contiene hidroxialcanoato.

FIG. 1

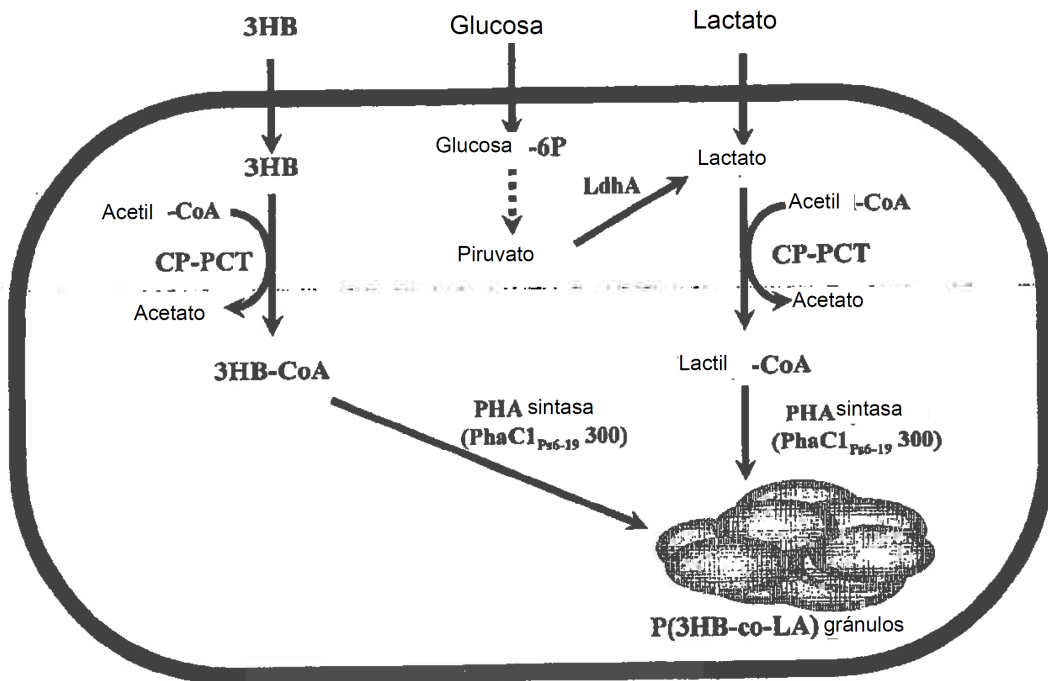


FIG. 2

