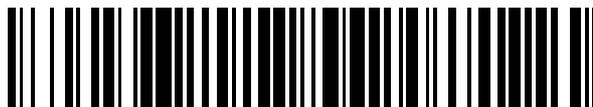


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 823**

21 Número de solicitud: 201231305

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12P 7/42** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**14.08.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**17.03.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070595**

71 Solicitantes:

**NEOL BIOSOLUTIONS, S.A. (100.0%)  
Avda. Innovación 1, EDIFICIO BIC, E  
18100 Armilla (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**RONCHEL BARRENO, Carmen;  
MARTÍNEZ GARCÍA, Lorena;  
GIBERT AMAT, Jordi;  
LARA CAMBIL, Armando;  
SUÁREZ GONZÁLEZ, Beatriz;  
ADRIO FONDEVILA, José Luis y  
VELASCO ÁLVAREZ, Javier**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Producción de bioplásticos**

57 Resumen:

Producción de bioplásticos.

Se ha aislado e identificado microorganismo de la especie *Pseudomonas putida* que resulta ser súper-productor y que, de manera natural, es capaz: a) de metabolizar diferentes fuentes de carbono incluyendo derivados aromáticos, b) crecer a elevadas concentraciones celulares, y c) producir una gran cantidad de polihidroxialcanoatos o 3-hidroxiácidos.

ES 2 448 823 A1

## DESCRIPCIÓN

Producción de bioplásticos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a la producción de polímeros plásticos y sus monómeros a partir de cultivos de un microorganismo en presencia de diferentes fuentes de carbono.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

En los últimos años se ha producido un gran desarrollo de los plásticos obtenidos a partir de fuentes renovables. La Comisión Europea en su "Lead Markets Initiative" (Final Evaluation of the Lead Market Initiative, 2011) ha identificado a los plásticos obtenidos a partir de fuentes renovables como uno de los mercados de mayor importancia. El elevado precio del petróleo y los problemas de contaminación que generan los plásticos tradicionales ha provocado que se desarrollen nuevas tecnologías para producir materiales con características similares a los productos petroquímicos, que ofrezcan otras vías de recuperación y reciclado para ayudar a reducir el impacto sobre el medio ambiente.

Entre estos materiales se incluyen los polihidroxicanoatos (PHAs), las polilactonas, ciertos poliésteres alifáticos, algunos polisacáridos y copolímeros derivados del petróleo (Shen *et al.* 2010. *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 4, 25-40; Gavrilescu *et al.* 2005. *Biotechnol. Adv.*, 23, 471-499).

Los PHAs constituyen una familia de poliésteres de 3, 4, 5 y 6 hidroxiaácidos sintetizados por diferentes grupos de microorganismos que se acumulan en el interior celular en forma de gránulos cuyo número y tamaño varía entre diferentes especies y sirven como compuestos de reserva de carbono y energía (Chen GQ. 2010. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and applications*, GQ Chen Ed., Springer, 17-37). El 30% de las bacterias del suelo tienen la capacidad de sintetizar PHA (Wu *et al.*, 2000. *Acta Polym. Sin.* 6, 751-756). Dependiendo del número de átomos de carbono de la unidad monomérica los PHAs se clasifican en PHAs de cadena corta (contienen de 3-5 átomos de carbono) y PHAs de cadena media (contienen 6-14 átomos de carbono).

La biosíntesis de polihidroxicanoatos depende principalmente del microorganismo y de la fuente de carbono utilizada, diferentes rutas metabólicas están relacionadas con la formación de moléculas de hidroxiaacil-CoA, principal precursor de los PHA. Por otra parte, sus propiedades físico-químicas varían considerablemente dependiendo de su composición monomérica y su estructura química. Hasta el momento se han descrito más de 150 monómeros diferentes producidos por bacterias a partir de diferentes fuentes de carbono (Steinbüchel y Valentin. 1995. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 219-228), lo que da una idea de la gran diversidad de PHAs que pueden ser sintetizados y el amplio rango de propiedades físicas y mecánicas que pueden llegar a tener. Además, éstos bioplásticos son biodegradables y biocompatibles, lo que los hacen muy adecuados para aplicaciones médicas y los 3-hidroxiaácidos obtenidos de su despolimerización son compuestos con el elevado potencial biotecnológico.

Se han descrito las rutas metabólicas para la síntesis de PHA en diversos grupos de bacterias (*Cupriavidus necator*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonads*). Uno de los grupos más estudiados son las especies del género *Pseudomonas*, las cuales son capaces de acumular PHA a partir de ácidos grasos obtenidos a partir de las rutas de  $\beta$ -oxidación y síntesis *de novo* (Rhem. 2010. *Nature* 8, 578-592; Koller *et al.* 2010. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 255-269) Los genes implicados en la biosíntesis de PHAmcl han sido caracterizados en varias especies de *Pseudomonas* y en todas ellas los genes están agrupados en el *cluster pha*, el cual está muy conservado entre cepas. El *cluster* está compuesto por dos genes que codifican para PHA sintasas (*phaC1* y *phaC2*), el gen *phaZ* que codifica para una despolimerasa responsable de la movilización de PHA y el gen *phaD* que codifica un regulador transcripcional. Además existen otros dos genes en el *cluster*, *phaF* y *phaI* que codifican las fasinias.

A pesar de la gran variabilidad de PHA que pueden ser sintetizados por los microorganismos, tan solo unos pocos se producen a escala industrial para su comercialización debido a los elevados costes de producción. La producción de PHA involucra pasos de fermentación, separación de la biomasa del caldo de cultivo, secado de la biomasa y la extracción, purificación y secado del PHA (Queiroz *et al.* 2009. *Polymer Reviews.* 49, 65-78; Shen *et al.* 2010. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 4, 25-40.). El aislamiento de cepas superproductoras de PHA, el aumento de la tasa de conversión de sustrato en PHA, el diseño de un buen proceso de fermentación o la optimización de los procesos de extracción y purificación son factores claves para conseguir un proceso rentable a nivel industrial para la producción de PHA

60 **SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención tiene por objetivo resolver desde el punto de vista estratégico, económico y técnico la producción de polímeros plásticos de origen microbiano (polihidroxicanoatos) y los monómeros que los forman (3-hidroxiaácidos).

Los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento para la producción de polímeros plásticos de origen microbiano (bioplásticos) y de los monómeros que los forman. El procedimiento se basa en la utilización de un nuevo microorganismo, que resulta ser súper-productor y que, de manera natural, es capaz: a) de metabolizar diferentes fuentes de carbono incluyendo derivados aromáticos, b) crecer a elevadas concentraciones celulares, y c) producir una gran cantidad de polihidroxialcanoatos o 3-hidroxiácidos. Ambos procesos de producción alcanzan elevados rendimientos de forma rápida, sencilla y con un bajo coste de producción.

En un primer aspecto la invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Pseudomonas putida* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8092. Dentro de dicho primer aspecto, la invención también se relaciona con un microorganismo de la especie *Pseudomonas putida* CECT 8092 que presenta una delección en los genes *fadB* y *fadA* y, finalmente, con un microorganismo de la especie *Pseudomonas putida* CECT 8092, que presenta una delección en los genes *fadB* y *fadA*, y que contiene al menos una copia adicional del propio gen *phaZ* o, expresado de otra manera, que presenta una mayor dosis génica del propio gen *phaZ*.

En un segundo aspecto la invención se relaciona con un cultivo biológicamente puro de cada uno de los microorganismos referidos en el párrafo anterior.

En un tercer aspecto la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de bioplásticos que comprende las siguientes etapas:

- a. cultivo de un microorganismo seleccionado entre *Pseudomonas putida* CECT 8092 y *Pseudomonas putida* CECT 8092 $\Delta$ *fadBA*, en presencia de al menos una fuente de carbono que incluye un ácido carboxílico, y de al menos una fuente de nitrógeno,
- b. separación de la biomasa microbiana del caldo de cultivo,
- c. extracción del bioplástico de la biomasa microbiana obtenida en la etapa anterior y, opcionalmente,
- d. purificación del bioplástico

En un cuarto aspecto la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de 3-hidroxiácidos que comprende las siguientes etapas:

- a. cultivo de *Pseudomonas putida* CECT 8092 $\Delta$ *fadBA* que contiene al menos una copia adicional del propio gen *phaZ*, en presencia de al menos una fuente de carbono que incluye un ácido arilcarboxílico, y de al menos una fuente de nitrógeno,
- b. separación de la biomasa microbiana del caldo de cultivo, y
- c. extracción de los 3-hidroxiácidos del caldo de cultivo obtenido en la etapa anterior.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con el uso de un microorganismo de la especie *Pseudomonas putida* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8092 y el de dicho microorganismo que presenta una delección en los genes *fadB* y *fadA*, en la obtención de biopolímeros.

En otro aspecto adicional, la invención se relaciona con el uso del microorganismo anterior delecionado que contiene una mayor dosis génica del propio gen *phaZ* en la obtención de 3-hidroxiácidos.

En otro aspecto adicional, la invención se relaciona con un polinucleótido que presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 5.

Finalmente, en un último aspecto, la invención se relaciona con el uso del propio gen *phaZ* para aumentar el rendimiento en la obtención de 3-hidroxiácidos por un microorganismo de la especie *Pseudomonas putida* CECT 8092 y por un microorganismo *Pseudomonas putida* CECT 8092 que presenta una delección en los genes *fadB* y *fadA*.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### *Pseudomonas putida* CECT 8092

El primer aspecto de la invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Pseudomonas putida* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8092. La selección de esta cepa súper-productora de *Pseudomonas putida* se realizó aplicando procedimientos estándares (Gómez *et al.* 1996. Appl. Microbiol. Biotecnol. 45, 785-791) de una muestra de suelos, restos vegetales, etc. Dicha cepa se identificó mediante la secuenciación del gen *rpoB* (SEQ ID NO 1) y de la subunidad 16S del ADN ribosómico (SEQ ID NO 2) como *Pseudomonas putida* mostrando diferencias frente a otras secuencias de esta especie depositadas en las bases de datos consultadas. El microorganismo se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como *Pseudomonas putida* CECT 8092.

La presente cepa de *Pseudomonas putida* es capaz de metabolizar diferentes fuentes de carbono incluyendo

derivados aromáticos (ácidos n-fenilalcanoicos); de crecer a elevadas concentraciones celulares (DO600nm superiores a 250 y densidades de 60 g/l de biomasa) y, finalmente, de producir una gran cantidad de polihidroxicanoatos y 3-hidroxiácidos de forma rápida, sencilla y a un bajo coste de producción. Como se demuestra en los ejemplos incluidos en el texto de la presente solicitud (ejemplo 1 y tabla 1 en el ejemplo 4), esta cepa llega a acumular más de un 50% de su peso seco en forma de polihidroxicanoatos, con un rendimiento de conversión del ácido utilizado en PHA de 0,5.

En la presente invención se entiende por “bioplásticos” aquellos plásticos obtenidos a partir de fuentes naturales (origen microbiano) o renovables (total o parcialmente), así como los plásticos biodegradables, aquellos que pueden descomponerse en condiciones que se dan en la naturaleza, mediante la acción enzimática de microorganismos como bacterias, hongos y algas. En particular, los polihidroxicanoatos obtenidos mediante los microorganismos de la presente invención son bioplásticos. De manera general, los “plásticos” son materiales sintéticos obtenidos mediante fenómenos de polimerización o multiplicación semi-natural de los átomos de carbono en las largas cadenas moleculares de compuestos orgánicos derivados del petróleo y otras sustancias naturales.

#### *Pseudomonas putida* CECT 8092 $\Delta$ *fadBA*

Dentro del primer aspecto, y en una realización particular, la invención se relaciona con el microorganismo *Pseudomonas putida* CECT 8092 $\Delta$ *fadBA*. Este microorganismo corresponde a *Pseudomonas putida* CECT 8092 que presenta una delección de los genes *fadA* (SEQ ID NO 3) y *fadB* (SEQ ID NO 4), implicados en el metabolismo de los ácidos grasos. Por este motivo la cepa o microorganismo delecionado ve aumentada la producción de polihidroxicanoatos (polímeros o bioplásticos). Así, según se muestra en los ejemplos de la presente solicitud (ver tabla 1), la producción de polihidroxicanoatos (PHA) producidos por el microorganismo *Pseudomonas putida* CECT 8092 $\Delta$ *fadBA* es entre un 5 y un 32% superior a la obtenida por el microorganismo o cepa parental.

#### Gen *phaZ*

También dentro del primer aspecto, y en otra realización particular, la invención se relaciona con otro nuevo microorganismo que corresponde a *Pseudomonas putida* CECT 8092 $\Delta$ *fadBA* que contiene una mayor dosis génica del propio gen *phaZ* (SEQ ID NO 5). Esto es, que contienen al menos una copia adicional del propio gen *phaZ*. Por “al menos una copia adicional” se entiende, en el contexto de la presente invención, la presencia de una o más copias adicionales; preferiblemente entre 1 y 20; más preferiblemente entre 5 y 20 copias adicionales. Este gen codifica una despolimerasa cuya expresión evita la formación y acumulación intracelular de polihidroxicanoatos, favoreciendo, por el contrario, la liberación de 3-hidroxiácidos al medio de cultivo (Ren *et al.* 2005, Biomacromoleculas 6:2290-2298; Prieto *et al.* 2007, Ramos JL y Filloux A (eds) *Pseudomonas*, 5. Springer, Amsterdam, 397-428; Sandoval *et al.* 2005, Appl. Microbiol. Biotechnol 67, 97-105). La presencia de varias copias de este gen en el microorganismo referido resulta en un aumento en el rendimiento de la producción de ácidos 3-hidroxicarboxílicos. En una realización preferida de la invención el número de copias adicionales del propio gen *phaZ* presente en el microorganismo es de 5 a 20 copias. Así, según muestran los ejemplos de la presente solicitud, el rendimiento en la conversión de un ácido n-fenilalquilcarboxílico en 3-OH-fenilalquilcarboxílico puede ser superior al 75%.

En un segundo aspecto la invención se relaciona con un cultivo biológicamente puro de cada uno de los nuevos microorganismos descritos en la presente invención. En la presente invención se entiende por “cultivo biológicamente puro”, aquel cultivo en el que el microorganismo de la invención se encuentra en una proporción igual o superior al 95% respecto al resto de microorganismos presentes en el cultivo. En el texto de la presente solicitud se ejemplifican cultivos biológicamente puros de los microorganismos de la invención.

#### Procedimiento para la obtención de bioplásticos

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de bioplásticos, en particular polihidroxicanoatos, que comprende las siguientes etapas:

- a. cultivo de un microorganismo seleccionado entre *Pseudomonas putida* CECT 8092 y *Pseudomonas Putida* CECT 8092 $\Delta$ *fadBA* en presencia de al menos una fuente de carbono que incluye un ácido carboxílico, y de al menos una fuente de nitrógeno,
- b. separación de la biomasa microbiana del caldo de cultivo,
- c. extracción del bioplástico de la biomasa microbiana obtenida en la etapa anterior y, opcionalmente,
- d. purificación del bioplástico

El cultivo del microorganismo en la etapa a) implica el crecimiento del microorganismo productor, bien *Pseudomonas putida* CECT 8092 o bien *Pseudomonas Putida* CECT 8092 $\Delta$ *fadBA*, preferentemente en matraces o biorreactores hasta alcanzar un contenido en polihidroxicanoatos que preferiblemente se encuentra entre el 20% y el 70% del peso seco.

El microorganismo se crece en medios de cultivo en los que está presente al menos una fuente de carbono que incluye un ácido carboxílico, y al menos una fuente de nitrógeno.

La fuente de carbono incluye un ácido carboxílico. El ácido carboxílico presenta una cadena alquílica, la cual puede presentar entre 3 y 13 preferiblemente entre 5 y 11 átomos de carbono, ser lineal o ramificada, y puede presentar al menos un hidrógeno sustituido por un grupo OH, un grupo éster o un grupo amino. La cadena también puede contener grupos tiol, grupos halógeno y presentar una o más insaturaciones. Dicha cadena también puede presentar sustituyentes arilo (ácido arilcarboxílico), en particular en la posición n de la cadena (ácido n-arilcarboxílico), esto es, en la posición opuesta al grupo carboxilo.

En la presente invención se entiende por grupo "arilo" un grupo aromático que presenta entre 6 y 18, más preferiblemente 6 ó 10 átomos de carbono, comprendiendo 1, 2 ó 3 núcleos aromáticos unidos a través de enlace carbono-carbono o fusionados entre sí. Ejemplos ilustrativos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, etc.

Preferentemente, el ácido carboxílico presenta una cadena lineal. En una realización particular, el ácido carboxílico es un ácido arilcarboxílico, preferiblemente n-arilcarboxílico; o un ácido graso.

En una realización preferida, la fuente de carbono es un ácido carboxílico de entre 4 y 14 átomos de carbono, más preferiblemente de entre 6 y 12 átomos de carbono; o un ácido aril-carboxílico, preferiblemente n-arilcarboxílico, de entre 10 y 32 átomos de carbono, más preferiblemente n-fenil-carboxílico. En una realización preferida, la fuente de carbono incluye adicionalmente glucosa, lactosa, glicerol, melazas, manosa, fructosa, acetato o combinaciones de los mismos; en particular glucosa o glicerina o combinaciones de las mismas.

En otra realización preferida de la invención, la fuente de carbono utilizada es una mezcla de glicerina y un ácido carboxílico, preferiblemente de cadena lineal, conteniendo entre 6 y 12 átomos de carbono. La glicerina se emplea en una cantidad entre el 0,1% (p/v) y el 10% (p/v), preferiblemente entre el 2% (p/v) y el 6% (p/v) y más preferiblemente entre el 3% (p/v) y el 5% (p/v). En otra realización preferida de la invención, la fuente de carbono utilizada es una mezcla de glucosa y un ácido carboxílico, preferiblemente de cadena lineal, conteniendo entre 6 y 12 átomos de carbono. La glucosa se emplea en una cantidad entre el 0,1% (p/v) y el 10% (p/v), preferiblemente entre el 2% (p/v) y el 6% (p/v) y más preferiblemente entre el 3% (p/v) y el 5% (p/v).

En otra realización de la invención, el ácido carboxílico utilizado como fuente de carbono se selecciona entre ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico y ácido decanoico. Estos ácidos se emplean en una concentración entre 5 mM y 500 mM, preferentemente entre 10 y 400 mM, y más preferentemente entre 20 y 250 mM.

En otra realización de la invención, el ácido n-fenilcarboxílico utilizado como fuente de carbono se selecciona entre ácido 6-fenilhexanoico, ácido 7-fenilheptanoico y ácido 8-feniloctanoico. Estos ácidos se emplean en una concentración entre 5 mM y 200 mM, preferentemente entre 10 y 150 mM, y más preferentemente entre 15 y 100 mM.

En una realización particular, el microorganismo se alimenta inicialmente empleando glicerina y/o glucosa como fuente de carbono, para posteriormente emplear un ácido carboxílico como con fuente de carbono.

Normalmente, la fuente de carbono se encuentra en exceso en relación de masa con la fuente de nitrógeno presente en el mismo medio.

La fuente de nitrógeno puede seleccionarse del grupo formado por extracto de levadura, peptona, corn steep liquor (líquido de macerado de maíz), urea, glutamato sódico y fuentes de nitrógeno inorgánico, como por ejemplo diferentes sales de amonio (cloruro, nitrato, sulfato), y combinaciones de ellos.

En una realización de la invención, el cultivo de los microorganismos se realiza durante 2 a 5 días a una temperatura entre 18°C y 37°C, preferiblemente entre 25°C y 35°C, y más preferiblemente entre 28°C y 32°C, con agitación constante.

Una vez realizado el cultivo de los microorganismos, preferiblemente hasta alcanzar la máxima cantidad intracelular de polihidroxialcanoatos, la biomasa microbiana o celular se separa del caldo de cultivo. Esta separación se realiza mediante alguno de los procedimientos habitualmente utilizados para este fin como, por ejemplo, filtración, microfiltración, centrifugación, o combinaciones de los mismos, entre otros. En una realización preferente, tras realizar la etapa de separación de la biomasa microbiana del caldo de cultivo (etapa b), y antes de realizar la extracción del bioplástico de la biomasa (etapa c), la biomasa se seca en estufa u horno, preferentemente a unos 50-70 °C y durante 48-72 horas, o se realiza una liofilización de la biomasa separada.

La tercera etapa del procedimiento (etapa c) comprende la extracción del bioplástico de la biomasa celular o microbiana obtenida en la etapa anterior del procedimiento. En una realización particular, dicha extracción se realiza mediante un proceso de extracción sólido-líquido. Como disolvente puede emplearse cualquier disolvente orgánico inmiscible con el agua como, por ejemplo, n-hexano, tolueno, acetona, acetato de etilo o dimetoximetano, entre otros. Ejemplos conocidos de extracción de polihidroxialcanoatos de una biomasa con disolventes orgánicos se describen en documentos como US 4,310,684 y US 4,705,604, en particular sobre la extracción de PHB (poli-hidroxibutirato) con disolventes clorados; US 4,968,611 sobre el uso de dioles, butirolactona o ésteres de ácidos di o tricarboxílicos para la extracción de PHB y copolímeros de éste; US 5,213,976 describe la extracción de PHB con cloruro de metileno seguido de precipitación con agua. Los

documentos WO97/15681 y WO93/11656 describen la extracción con acetona de poli-3-hidroxi octanoato a partir de *Pseudomonas oleovorans*; WO2005/052175 describe un proceso para la extracción con diferentes tipos de disolventes de PHB y PHBV (poli-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). Finalmente, EP1781721 describe la extracción del copolímero PHB-co-PHH mediante el uso de acetona, metil-etil cetonas, o mezclas entre ambos.

Los polímeros extraídos en la etapa c) pueden someterse, en función de su grado de pureza y utilización posterior, a un proceso de purificación (etapa d). Esta última etapa del procedimiento, que es opcional, se basa generalmente en la precipitación de las impurezas incluidas en el producto resultante de la etapa c) y puede realizarse mediante la adición de un agente precipitante en el que los polihidroxialcanoatos no son solubles como, por ejemplo, agua o diferentes tipos de alcoholes, como metanol, etanol, isopropanol o n-butanol (WO00/68409, WO2005/052175); mediante la adición de peróxido de hidrógeno y agentes quelantes (US 5,691,174), o mediante la adición de ozono (WO99/51760).

Los polihidroxialcanoatos (bioplásticos) obtenidos por el procedimiento de la invención son copolímeros formados a partir de derivados del ácido carboxílico empleado como fuente de carbono. Así, si la fuente de carbono es ácido octanoico, se obtendrán copolímeros formados por 3-hidroxi octanoato (80-90%) y 3-hidroxi hexanoato (20-10%). Dichos polihidroxialcanoatos (bioplástico) pueden servir como materia prima para la producción de diferentes productos como, por ejemplo, envases, films para embalaje, dispositivos biomédicos, productos para higiene personal, bolsas, etc. (Philip *et al.* 2007. J. Chem. Technol. Biotechnol., 82, 233; Mikova *et al.* 2006. Chem. Listy, 100, 1075; Chen *et al.* 2005. Biomaterials, 67, 592; Chen GQ. 2009. Chem. Soc. Rev., 38, 2434-2446).

#### Procedimiento para la obtención de 3-hidroxiácidos

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de 3-hidroxiácidos que comprende las siguientes etapas:

- a. cultivo de *Pseudomonas putida* CECT 8092 $\Delta$ *fadBA* que contiene al menos una copia adicional del propio gen *phaZ* en presencia de al menos una fuente de carbono que incluye un ácido arilcarboxílico, y de al menos una fuente de nitrógeno,
- b. separación de la biomasa microbiana del caldo de cultivo, y
- c. extracción de los 3-hidroxiácidos del caldo de cultivo de la etapa anterior.

En una realización preferida de la invención, el número de copias adicionales del propio gen *phaZ* presente en el microorganismo delecionado es de 1 a 20 copias, más preferiblemente de 5 a 20 copias.

El cultivo del microorganismo se realiza de manera similar al de la etapa a) del procedimiento para la obtención de bioplásticos descrito más arriba. Sin embargo, la fuente de carbono en este procedimiento incluye necesariamente un ácido arilcarboxílico, preferiblemente un ácido n-arilcarboxílico, que presenta preferiblemente de entre 10 y 32 átomos de carbono, más preferiblemente n-fenil-carboxílico. La fuente de nitrógeno es la misma que la empleada en el procedimiento para la obtención de bioplásticos descrito más arriba.

En una realización de la invención, el cultivo de los microorganismos se realiza durante 2 a 5 días a una temperatura entre 18°C y 37°C, preferiblemente entre 25°C y 35°C, y más preferiblemente entre 28°C y 32°C, con agitación constante

Preferiblemente una vez alcanzada la máxima producción de 3-hidroxiácidos, la biomasa microbiana o celular se separa del caldo de cultivo en la etapa b) mediante alguno de los procedimientos habitualmente utilizados para este fin como, por ejemplo, filtración, microfiltración, centrifugación o combinaciones de los mismos, entre otros.

A continuación, el caldo de cultivo obtenido en la etapa b) se somete a una extracción para recuperar los 3-hidroxiácidos (etapa c). En una realización particular, esta extracción consiste en una extracción de dicho caldo de cultivo (fase acuosa) con un disolvente orgánico. Disolventes orgánicos adecuados para esta extracción son, entre otros, dietil-éter, metil-terc-butil-éter, cloruro de metileno y acetato de etilo.

Los 3-hidroxiácidos obtenidos en el procedimiento descrito en la presente invención son aquellos derivados del ácido alquilcarboxílico empleado como fuente de carbono. Así, si la fuente de carbono es ácido fenilhexanoico, el producto obtenido será el ácido 3-hidroxi hexanoico. Los 3-hidroxiácidos obtenidos pueden servir como precursores en la industria farmacéutica para la síntesis de compuestos como antibióticos, vitaminas, o feromonas (Chen G.Q. 2009, Chem. Soc. Rev. 38, 2434-2446).

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con el uso en la obtención de biopolímeros, en particular de polihidroxialcanoatos, de los microorganismos:

- Pseudomonas putida* CECT 8092 y
- Pseudomonas putida* CECT 8092 que presenta una deleción en los genes *fadB* y *fadA*.

En otro aspecto adicional, la invención se relaciona con el uso en la obtención de 3-hidroxiácidos del microorganismo:

- Pseudomonas putida* CECT 8092 que presenta una deleción en los genes *fadB* y *fadA* que contiene al menos una copia adicional del propio gen *phaZ*. En la presente solicitud se entiende por la expresión "más de

una copia del propio gen *phaZ* que el microorganismo contiene una mayor dosis génica del propio gen *phaZ*, esto es, del polinucleótido de secuencia ID SEQ NO 5. Dicha(s) copia(s) adicional(es) del propio gen *phaZ* se introducen en los referidos microorganismo siguiendo métodos estándar (Sambrook J. y Russell D. W. 2001., Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, NY), tal y como se ilustra en el ejemplo 5 de la solicitud. El número de copias adicionales del propio gen *phaZ* es preferentemente de 1 a 20, más preferentemente de 5 a 20 copias adicionales.

En otro aspecto adicional, la invención se relaciona con un polinucleótido que presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 5. Este polinucleótido corresponde al gen *phaZ* del microorganismo de la invención *Pseudomonas putida* CECT 8092.

Finalmente, en un último aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido que presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 5 para aumentar el rendimiento en la obtención de 3-hidroxiácidos por un microorganismo de la especie *Pseudomonas putida* CECT 8092 que presenta una deleción en los genes *fadB* y *fadA*.

## EJEMPLOS

### 1. Producción de PHA

La síntesis de PHA en biorreactores de 30 litros con la cepa *P. putida* CECT 8092 se realizó en medio M9 suplementado con una solución de elementos traza (Abril *et al.* 1989, J. Bacteriol. 171, 6782-6790) con glicerina (30 g/L) como fuente de carbono inicial. El cultivo se creció hasta una DO600nm de 20 y a partir de ese momento se inició una fase de alimentación con ácido octanoico. Después de 60 h de cultivo se obtuvieron 60 g/L de biomasa con un contenido de PHA superior al 50% de su peso seco.

Una vez separada la biomasa celular del caldo de cultivo mediante microfiltración, ésta se secó a 65°C durante 3-5 días. La biomasa seca se sometió a un proceso de extracción con acetato de etilo. La mezcla se mantuvo en el Soxhlet a 35-40°C durante 20 horas. Una vez finalizada la extracción se evaporó el disolvente y el PHA obtenido (copolímero formado por aproximadamente 90% de 3-hidroxi octanoico y 10% de 3-hidroxi hexanoico) se purificó con isopropanol. La cantidad final de PHA purificado obtenido fue de 625 g, lo que supone un rendimiento de conversión de ácido octanoico en PHA de 47,60%.

### 2. Construcción de la cepa *P. putida* CECT8092 $\Delta$ *fadBA*

Una vez obtenida la secuencia de los genes *fadA* (SEQ ID NO 3) y *fadB* (SEQ ID NO 4) de la cepa *P. putida* CECT 8092, se llevó a cabo el diseño de la construcción que iba a ser utilizada para la deleción. Para ello se amplificaron por PCR dos fragmentos situados en los extremos de los genes *fadBA*. Uno de ellos -de 665 pb- se localiza en el extremo 5' del gen *fadB* y el otro -de 667 pb- en el extremo 3' del gen *fadA*. Estos dos fragmentos se ligaron, y la construcción resultante se clonó en el plásmido pGEM-Teasy, desde aquí se liberaron los fragmentos y se clonaron en el pJQ200KS (plásmido que contiene el marcador de resistencia a gentamicina y el gen *sacB* que codifica una sacarasa). Esa construcción se transfirió a *E. coli* y posteriormente a *P. putida* CECT 8092 mediante conjugación.

Para conseguir un mutante delecionado mediante una doble recombinación, en primer lugar se hizo una selección en medio LB suplementado con ampicilina y gentamicina. Posteriormente, los transformantes seleccionados en este medio se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina y sacarosa al 10%.

El análisis de los transconjugantes se realizó mediante PCR utilizando el DNA genómico de los mismos. Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos correspondientes a las regiones exteriores de los fragmentos clonados en el vector pJQ200KS.

### 3. Producción de PHA a partir de *P. putida* CECT8092 $\Delta$ *fadBA*

*P. putida* CECT 8092 y *P. putida* CECT 8092  $\Delta$ *fadBA* se crecieron en sendos matraces en medio mínimo definido (Martínez-Blanco H. 1990, J. Biol. Chem. 265, 7084-7090), cuya composición en g l<sup>-1</sup> es: KPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, 13,6; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,25; FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,0005. Se utilizó como fuente de carbono una mezcla compuesta por ácido octanoico a una concentración final de 30 mM y glucosa al 1% (p/v). 500 mL de medio se inocularon con una suspensión celular de la cepa correspondiente. Los matraces se incubaron a 30°C y 250 rpm durante el tiempo requerido. Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria, las bacterias se recogieron por centrifugación y, tras eliminar el sobrenadante, se congelaron a -80 °C. Posteriormente, las bacterias se liofilizaron y este material fue el utilizado para extraer PHAs como se describe en el ejemplo 1.

Los resultados obtenidos en los distintos medios se muestran en la tabla 1. La cantidad final de PHA obtenido por la cepa *P. putida* CECT 8092  $\Delta$ *fadBA* fue de 53,1% de su peso seco, es decir, aproximadamente un 5% superior al obtenido con la cepa parental.

### 4. Producción de PHA conteniendo residuos aromáticos

*P. putida* CECT 8092 y *P. putida* CECT 8092  $\Delta$ *fadBA* se crecieron en sendos matraces en medio mínimo definido descrito en ejemplo 3. Se utilizaron como fuentes de carbono una mezcla compuesta por diferentes

ácidos n-fenilalcanoicos (6-fenilhexanoico, 7-fenilheptanoico y 8-feniloctanoico) a una concentración final de 15 mM y glucosa al 1% (p/v). 500 mL de medio se inocularon con una suspensión celular de la cepa correspondiente. Los matraces se incubaron a 30°C y 250rpm durante el tiempo requerido. Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria, las bacterias se recogieron por centrifugación y, tras eliminar el sobrenadante, se congelaron a -80 °C. Posteriormente, las bacterias se liofilizaron y este material fue el utilizado para extraer PHAs siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Los resultados obtenidos en los distintos medios se muestran en la tabla 1 como % del peso seco del microorganismo.

Tabla 1. Producción de PHA en las cepas en medio definido suplementado con distintos ácidos grasos

	MM + glucosa 1%			
	+ Octanoico 30mM	6-φ- Hexanoico 15 mM	7-φ-Heptanoico 15 mM	8-φ-Octanoico 15 mM
<i>P. putida</i> CECT 8092	47,60%	17,3%	36,2%	40,6%
<i>P. putida</i> CECT 8092 Δ <i>fadBA</i>	53,1%	49,7%	55,9%	61,3%

Dependiendo del precursor utilizado, la cantidad final de PHA producida por la cepa *P. putida* CECT 8092 Δ*fadBA* fue entre un 19% y un 32% superior al obtenido con la cepa parental.

### 5. Producción de 3-hidroxiácidos

El gen *phaZ* de *P. putida* CECT 8092 se amplificó mediante PCR (SEQ ID NO 5) y se clonó en el plásmido pBBR1-MCS3 (Tc<sup>R</sup>).

La construcción se transfirió a *E. coli* DH10B mediante transformación y se comprobó mediante secuenciación del gen *phaZ* que el plásmido había sido incorporado. Posteriormente el plásmido fue transferido a la cepa *P. putida* CECT 8092 Δ*fadBA* mediante conjugación. Para comprobar el éxito de la construcción, se extrajo plásmido de los transconjugantes y éste se utilizó para transformar *E. coli* DH10B. A continuación se extrajo el plásmido de la cepa de *E. coli* y se amplificó mediante PCR el gen *phaZ*. La secuenciación del fragmento obtenido confirmó que la cepa de *Pseudomonas* contenía la construcción deseada.

Para analizar la producción de 3-hidroxiácidos por la cepa *P. putida* CECT 8092 Δ*fadBA* conteniendo al menos una copia adicional del propio gen *phaZ*, ésta se cultivó en medio descrito en ejemplo 3, pero empleando glicerina en vez de glucosa y ácido 6-fenilhexanoico en lugar de ácido octanoico. Los matraces se incubaron a 30°C y 250 rpm durante 72 h. Las células se recogieron por centrifugación y el caldo de cultivo se filtró a través de un filtro de 0,2 μm. La obtención de los 3-OH-monómeros se realizó mediante extracción líquido/líquido con disolventes orgánicos, como cloruro de metileno, dietil éter o acetato de etilo (Sandoval *et al.* 2005, Appl. Microbiol. Biotechnol, 67, 97-105). La fase orgánica (extracto de acetato de etilo) obtenida se secó con sulfato sódico anhidro y una alícuota se analizó mediante HPLC/Masas y por RMN, confirmándose que los compuestos contenidos en la misma consistían en una mezcla formada por ácido 3-hidroxi-6-fenilhexanoico (más de un 90%), trazas de ácidos libres y de ácido 3-hidroxi-4-fenilbutanoico, así como ésteres de ambos ácidos. El resto del extracto obtenido se evaporó hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno y luego se secó en un liofilizador durante 12 horas.

La separación y caracterización de los componentes de este extracto, se llevó a cabo mediante HPLC semipreparativo (columna Zorbax RX-C8, 9.4 X 250 mm, 5 μm, gradiente 5- 100% ACN/Agua con 0.1 % de TFA, flujo 3.6 ml/min, detección en UV a 210 y 340 nm). El análisis de la fracción mayoritaria del extracto (más de un 90% del total) mediante RMN CDCl<sub>3</sub> confirmó la estructura correspondiente al ácido 3-hidroxi-fenilhexanoico. El rendimiento total de conversión a partir del ácido 6-fenilhexanoico fue del 75%.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo de la especie *Pseudomonas putida* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8092.
2. Un microorganismo según la reivindicación 1 que presenta una delección en los genes *fadB* y *fadA*.
- 10 3. Un microorganismo según la reivindicación 2 que contiene al menos una copia adicional del propio gen *phaZ*
4. Cultivo biológicamente puro de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. Procedimiento para la obtención de bioplásticos que comprende las siguientes etapas:
  - a. cultivo de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en presencia de al menos una fuente de carbono que incluye un ácido carboxílico, y de al menos una fuente de nitrógeno,
  - b. separación de la biomasa microbiana del caldo de cultivo,
  - 20 c. extracción del bioplástico de la biomasa microbiana obtenida en la etapa anterior y, opcionalmente,
  - d. purificación del bioplástico.
6. Procedimiento según la reivindicación 5 en el que el ácido carboxílico presenta una cadena lineal.
- 25 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6 en el que el ácido carboxílico es un ácido arilcarboxílico, preferiblemente n-arilcarboxílico o un ácido graso.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en el que el ácido carboxílico sin sustitución aromática tiene entre 4 y 14, preferiblemente entre 6 y 12 átomos de carbono, y el ácido arilcarboxílico tiene entre 10 y 32 átomos de carbono y preferiblemente es n-fenilcarboxílico.
- 30 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 en que la fuente de carbono también incluye glucosa, lactosa, glicerol, melazas, manosa, fructosa, acetato, o combinaciones de los mismos.
- 35 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 en donde los polímeros obtenidos contienen 3-hidroxiácidos con cadenas alifáticas de longitud de entre 3 y 13, preferiblemente entre 5 y 11 átomos de carbono.
- 40 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 en el que los polímeros obtenidos contienen al menos un residuo aromático, preferiblemente fenilo.
- 45 12. Procedimiento para la obtención de 3-hidroxiácidos que comprende las siguientes etapas:
  - a. cultivo de un microorganismo según la reivindicación 3 en presencia de al menos una fuente de carbono que incluye un ácido arilcarboxílico, y de al menos una fuente de nitrógeno,
  - b. separación de la biomasa microbiana del caldo de cultivo, y
  - c. extracción de los 3-hidroxiácidos del caldo de cultivo de la etapa anterior.
- 50 13. Procedimiento según la reivindicación 12 en el que el ácido arilcarboxílico presenta una cadena alquílica lineal.
14. Procedimiento según la reivindicación 13 en la que el ácido arilcarboxílico es un ácido n-arilcarboxílico.
- 55 15. Procedimiento según la reivindicación 14 en el que el ácido n-arilcarboxílico tiene entre 10 y 32 átomos de carbono, preferiblemente es un n-fenilcarboxílico.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 en el que la fuente de carbono también incluye glucosa, lactosa, glicerol, melazas, manosa, fructosa, acetato o combinaciones de los mismos.
- 60 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 en el que los hidroxiácidos obtenidos contienen al menos un residuo aromático, preferiblemente fenilo, y una cadena alifática de longitud entre 3 y 10, preferiblemente entre 4 y 8 átomos de carbono.
18. Uso de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en la obtención de biopolímeros.
- 65 19. Uso de un microorganismo según la reivindicación 3 en la obtención de 3-hidroxiácidos.

20. Uso de un polinucleótido que presenta la secuencia de nucleótidos del gen phaZ mostrada en la SEQ. ID NO: 5 para aumentar el rendimiento en la obtención de 3-hidroxiácidos por un microorganismo según la reivindicación 2.

5

# ES 2 448 823 A1

## Listado de Secuencias

<110> NEURON BIOPHARMA, S.A.

<120> PRODUCCIÓN DE BIOPLÁSTICOS

<130> P8398ES00

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1229

<212> DNA

<213> Pseudomonas putida, gen rpoB

<400> 1

ggccgagaac cagttccgcg ttggcctggt gcgtgtcgag cgcgcggtca aggaacgcct 60

gtcgatggcg gaaagcgaag gctgatgcc gcaagacctg atcaacgcca agccggtagc 120

ggcggcggcg aaagagttct ttggctccag ccagctgtcc cagttcatgg accagaacaa 180

ccctctctcg gagattacc acaagcgccg cgtctctgca ctcgccctg gcggtctgac 240

ccgtgagcgt gccggcttcg aagtccgtga cgtacaccgg acccactatg gccgtgtgtg 300

cccgatcgag acccctgaag gtccgaacat cggctctgatc aactccttgg cggcctacgc 360

ccgcaccaac cagtacggct tectggaaag cccgtaccgc gtgggtaagg aaggcgttgt 420

aagtgaacgac atcgtgttcc tgtcggcaat cgaagaggcg gatcacgtca tcgcacaggc 480

ttcggccgcg atgaacgaca agaagcaact gatcgatgag ctggtagcag ttcgtcacct 540

# ES 2 448 823 A1

gaacgaattc accgtcaagc cgccggaaga cgtcacctg atggacgtt cgccgaagca 600

ggttgtttcc gttgcagcgt cgctgattcc gttcctcgag cagcagcag ccaaccgtgc 660

gttgatgggt tcgaacatgc agcgtcaggc tgtaccaacc ctgctgccc acaagccgct 720

ggtaggtacc ggcatggagc gcaacgttgc cegtgaactc ggtgtctgtg tggttgctcg 780

ccgcggtggt gtgatcgact cggtcgacgc tagccgtatc gttgttcgcg ttgccgacga 840

cgaagtggaa accggcgaag caggtgtgga tatctacaac ctgaccaagt acacccttc 900

gaaccagaac acctgcatca accagcgtcc gctggtgagc aaaggtgaca aggttcagcg 960

tggtgacatc atggccgacg gcccgctccac cgacatgggt gagctggctc tgggtcagaa 1020

catgcgcac cgcgttcattg cgtggaacgg cttcaactc gaagactcca tctgcctgtc 1080

cgagcgtgtg gttcaggaag atcgcttcac caccatccac attcaggaac tgacctgtgt 1140

ggcgcgtgac accaagctcg gccagagga aatcactgcg gacatcccga acgtgggtga 1200

agccgcactg aacaagctgg acgaagccg 1229

<210> 2

<211> 1460

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida*, ARN ribosomal 16S

<400> 2

attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc ggatgacggg agcttgetcc 60

ttgattcagc ggcggacggg tgagtaatgc ctaggaatct gcctggtagt gggggacaac 120

# ES 2 448 823 A1

gtttcgaaaag gaacgctaata accgcatacgc tectacggga gaaagcaggg gaccttcggg 180

ccttgcgcta tcagatgagc ctaggtcggga ttagctagtt ggtggggtaa tggctcacca 240

aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga tgatcagtca cactggaact gagacacggt 300

ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgaaa gcctgatcca 360

gccatgccgc gtgtgtgaag aaggtcttcg gattgtaaag cactttaagt tgggaggaag 420

ggcagtaagc taataccttg ctgttttgac gttaccgaca gaataagcac cggctaactc 480

tgtgccagca gccgcggtaa tacagagggt gcaagcgta atcggaatta ctgggcgtaa 540

agcgcgcgta ggtggtttgt taagttggat gtgaaagccc cgggctcaac ctgggaactg 600

catcaaaac tggcaagcta gagtacgga gagggtggtg gaatttcctg tgtagcggtg 660

aatgcgtag atataggaag gaacaccagt ggcgaaggcg accacctgga ctgataactga 720

cactgaggtg cgaaagcgtg gggagcgaac aggattagat accctggtag tccacgcctg 780

aaacgatgtc aactagccgt tggaatcctt gagattttag tggcgcagct aacgcattaa 840

gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aatgaattga cgggggcccc 900

cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccaggccttg 960

acatgcagag aactttccag agatggattg gtgccttcgg gaactctgac acaggtgctg 1020

catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgtaac gagcgcaacc 1080

cttgtcctta gttaccagca cgttatggtg ggcactctaa ggagactgcc ggtgacaaac 1140

# ES 2 448 823 A1

cggaggaagg tgggatgac gtcaagtcac catggccctt acggcctggg ctacacacgt 1200  
gctacaatgg tcggtacaga gggttgccaa gccgcgaggt ggagctaata tcacaaaacc 1260  
gatcgtagtc cggatcgag tctgcaactc gactgcgtga agtcggaata gctagtaata 1320  
gogaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc 1380  
atgggagtgg gttgcaccag aagtagctag tctaaccctc gggaggacgg ttaccacggt 1440  
gtgattcatg actgggggtga 1460

<210> 3

<211> 1176

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida*, gen fadA

<400> 3

atgagcctga atccaagaga cgtgggtgatt gtcgacttcg gtcgcacgcc aatgggcccg 60  
tccaagggtg gcatgcaccg caacaccgc gccgaagaca tgtcggcgca cctgatcagc 120  
aagctgctgg aacgcaacgg caagggtgac ccgaaagaag tcgaggacgt gatctggggc 180  
tgcgtcaacc agaccctgga gcagggctgg aacatcgccc gcatggcctc gctgatgacc 240  
cagatcccgc aacttccgc ggccgagacc gtcagccgcc tgtcgggctc gtccatgagc 300  
ggcgtgcaca cggccgccca ggcgatcatg accggtaacg gtgatgtgtt cgtggtcggt 360  
ggcgtggagc acatgggcca cgtcagcatg atgcatggcg tagaccccaa ccgcacctg 420  
tccttgcatt ccgccaaggc ttccgggatg atgggcctga ctgcagaaat gctcggcaag 480

# ES 2 448 823 A1

atgcacggca tcacccgtga gcagcaggac ctgttcggct tgcgttcgca ccagctggcc 540

cacaaggcca cggtcgaagg caagttcaag gacgagatca tcccgatgca gggctacgac 600

gagaacggct tccctgaagg gttcgatttc gacgaaacca ttcgcccgga aaccaccctc 660

gaaggcctgg catcgcctgaa gcctgcgttc aaccgaaaag gcggtacggt cacggccggt 720

acctcgtcgc agatcaccca cggcgcctcg tgcatgatcg tcatgtccgg tcagcgtgcc 780

atggacctcg gtatccagcc attggcggtg atccgttcga tggcagtggc cggtgctcgac 840

ccggcaatca tgggctacgg cccggtgcca togaccaga aagccctcaa gcgtgcgggg 900

ttgacctg cggatcgcga ctccatcgag ctcaacgaag ccttcgctgc acaggccctg 960

cccgctgctga aagacttgaa agtgctcgac aagatggatg agaaggtaa cctgcacggc 1020

ggcgccattg ctttgggcca cccgtttggt tgctccgggg cgcggatttc cggcacctg 1080

ctcaacgtca tgaagcaaaa tggcggtagc ctgggtgttg cgacctgtg cgtcggcctg 1140

ggccaaggta tcaccactgt ctttgaacgc gtctga 1176

<210> 4

<211> 2148

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* , gen fadB

<400> 4

atgatttacg aaggtaaagc catcacggtt aaggctcttg aaagtggcat cgtcgagctc 60

aagttcgacc tcaagggtga gtccgtcaac aagttcaacc gccttaccct gaacgagctg 120

# ES 2 448 823 A1

cgccaggccg tcgatgccat ccaggccgat gcctcggcca aaggcgtgat cgtcagcagt 180

ggcaaggacg tgttcacgtt eggcgcccac atcaccgagt tcgtcgacaa cttcaagctg 240

cctgaggccg aactggtcgc cggcaacctg gaagccaatc gtatcttcaa cgccttcgaa 300

gacctgaag tgccgaccgt tgccgccatc aacggcatcg cgctgggccc cggcctggaa 360

atgtgcctgg cggccgacta cggggtcatg tccaccagcg ccaggatcgg cctgccggaa 420

gtcaagctgg gtatctaccg gggctttggc ggtaccgtgc gcctgccgcg cctgatcggc 480

tgggacaacg ccatcgagtg gatcgcccgc ggcaaggaaa accgtgccga agacgccttg 540

aaagtggggg ccgtcgacgc ggtggtcgc cctgagctgc tgctggcccg tgccctcgac 600

ctgatcaagc gtgccatcag tggcgagctg gactacaagg ccaagcgcca gccgaagctg 660

gaaaagctca agctcaatgc catcgagcag atgatggcct tcgagacggc caagggttc 720

gtcgtggcc aggccggccc gaactacca gccccggtcg aagcaatcaa gagcatccag 780

aaagccgcca acttcggtcg cgacaaggcc ctggaagttg aagccgcagg ctttgccaag 840

ctggccaaga cctcggtcgc cgagagcctg atcggttgt tectcaacga tcaggaactc 900

aagcgcaagg ccaaggcgca tgacgagatc gccacgacg tgaagcaggc cgcctgtctc 960

ggcgccggca tcatgggccc cggtatcgc taccagtcgg cggtaaagg tacgccgatc 1020

ctgatgaaag acatccgca agaagccatt cagctgggtc tgaacgaggc ctccaagttg 1080

cttggaacc ggcgcgagaa gggccgctg accccagcca agatggcccga ggccctcaac 1140

gccattcgac cgaccctgtc ctatggcgat tttgccaatg tcgacatcgt cgtcgaggca 1200

# ES 2 448 823 A1

gtggtcgaga acccgaaggt caagcaagcg gtactggcgg aagtggaagg ccaggtgaag 1260  
gacgatgcga tctctgcttc caacacctct accatctcta tcaacctgct ggccaaggcg 1320  
ctcaagcgcc cggaaaactt cgtcggcatg cacttcttca acccggtgca catgatgccg 1380  
ctggtggaag tgatccgtgg tgagaagtcc agtgacgtgg cggtcgccac caccgtggcc 1440  
tacgccaaga aatgggcaa gaacccgatc gtggccaacg actgccggg ctttttggtc 1500  
aacccgctgc tgttcccgta ctttggcggg tttgccaaagc tggtcagcgc cgggtgctgac 1560  
ttcgtgcgca togacaaggt catggagaag ttcggctggc cgatgggcc accctacttg 1620  
atggacgtgg tcggcatcga caccggccac cacggccgtg acgtcatggc cgaaggcttc 1680  
ccggatcgca tgaaggacga gcgccgctcg gcagtcgacg cgttgtagca ggccaaccgc 1740  
ctgggccaga agaacggtaa gggcttctac gcctacgaaa ccgacaagcg cggcaagccg 1800  
aagaaggttt tcgatgccac cgtgctcgac gtgctcaaac cgatcgtggt cgagcagcgc 1860  
gaagtcaactg acgaagacat catcaactgg atgatggccc cgctgtgcct ggagaccgtg 1920  
cgttgccctgg aagacggcat cgtcgaaacc gctgccgaag ccgacatggg cctggctctac 1980  
ggcattgggtt tccctccctt ccgcgggtggg gcgctgcggt acatcgactc gatcgggtg 2040  
gccgaattcg tcgcctggc cgatcagtat gccgacctgg ggccgctgta ccacccgacc 2100  
gccaaagctgc gtgaaatggc caagaacggc cagcgttct tcaactga 2148

<210> 5

# ES 2 448 823 A1

<211> 852

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida*, gen phaZ

<400> 5

```
atgccgcaac cctatatattt caggaccgtc gagctggacc accagtccat ccgcaccgct      60
gttcgccccg gcaaaccgca cctgacgccg ttgctgatct tcaacggcat cggcgccaac      120
ctcgagctgg tgttcccgtt catcgatgca cttgaccggg acctggaagt catcgccctc      180
gatgtgcctg gggtcggcgg ctcgccaca ccacgccacc cgtatcgctt ccctgggctg      240
gccaagctga ccgcacgcat gctcgactac ctcgactacg gccaggtaa cgtcatcggc      300
gtgtcctggg gggcgccct ggcccagcag tttgctcagc attaccccga gcgctgcaag      360
aaactggcgc tggccgccac cgctgccggt gcggtaatgg tgccaggcaa gcccaagtg      420
ctgtggatga tggccagccc ccggcggtac gtgcagccgt cgcattgcat ccgcattgca      480
ccgatgatct atggcgggcg cttccgacgt gaccccagc tggccatgca ccattgctgcc      540
aaagtgcgct ccggcggcaa gctgggctac tactggcagc tgttcgccgg gctgggctgg      600
accagcatcc actggctgca caagatccag cagcccaccc tggctactgg ccgtgacgac      660
gacccgctga tcccgtgat caacatgcgc ctgctggcct ggccgattcc caatgccag      720
ctacacatta tcgacgacgg ccattctgtc ctgatcacc gtgccgaagc cgtcgccccg      780
atcatcatga agttcctgca ggaagaacgt cagcgtgcgg tcatgcatcc ccgtccggcc      840
tcgggggggt ga      852
```